(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114958764 A
(43)申请公布日 2022.08.30

(21)申请号 202210208342.7

(22)申请日 2016.04.08

(30)优先权数据
62/144,497 2015.04.08 US
62/144,615 2015.04.08 US
62/144,639 2015.04.08 US
62/207,255 2015.08.19 US
62/263,423 2015.12.04 US

(62)分案原申请数据
201680031677.9 2016.04.08

(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔
申请人 宾夕法尼亚大学托管会

(72)发明人 H·比特 J·M·波尔多 B·布拉尼迪 J·布罗格顿 N·K·达卡帕加里 S·吉尔 S·海菲尔 L·黄 C·H·琼 J·Y·金姆 M·雷 N·李 A·洛 E·奥兰多 M·鲁艾拉 T·德兰 J·张 L·周

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)

权利要求书6页 说明书399页 附图113页

(54)发明名称

CD20疗法、CD22疗法和与CD19嵌合抗原受体(CAR)表达细胞的联合疗法

(57)摘要

本发明提供了用于治疗与CD19表达相关的疾病的组合物和方法，例如通过与一种或多种B细胞抑制剂，例如CCD10，CD20，CD22，CD34，CD123，FLT-3，ROR1，CD79b，CD179b，或CD79a的一种或多种的抑制剂组合施用包含本文所述的CD19CAR的重组T细胞。本公开另外描述了针对CD20和CD22的新的抗原结合结构域和CAR分子，和例如用作单一疗法或联合疗法的用途。本发明还提供了本文所述的药盒和组合物。

CN 114958764 A

1.表达结合CD19,例如CD19 CAR的CAR分子的细胞,其用于治疗具有与CD19表达相关的疾病的受试者,并且其中所述受试者已经接收或正在接受或将要接受一种或多种B细胞抑制剂,其中所述B细胞抑制剂包含CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或多种的抑制剂。

2.一种治疗患有与CD19表达相关的疾病的受试者的方法,包括向所述受试者施用有效数目的一种或多种表达结合CD19,例如CD19 CAR的CAR分子的细胞与一种或多种B细胞抑制剂的组合,其中所述B细胞抑制剂包含CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抑制剂。

3.一种B细胞抑制剂,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抑制剂,用于治疗受试者,所述受试者是或被鉴定为是CD19抑制剂,例如CD19 CAR疗法的非应答者,部分应答者或复发者。

4.一种治疗患者的方法,所述患者是或被鉴定为是CD19抑制剂,例如CD19 CAR疗法的非应答者,部分应答者或复发者,所述方法包括向所述受试者施用B细胞抑制剂,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抑制剂。

5.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1中的一种或多种的抑制剂。

6.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含有效数目的一种或多种表达CAR分子的细胞,所述CAR分子结合CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种。

7.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述表达结合CD19的CAR分子的一种或多种细胞与所述一种或多种B细胞抑制剂同时施用,或在所述一种或多种B细胞抑制剂之前或之后施用。

8.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述受试者在用表达结合CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的一种或多种细胞治疗后已经复发或被鉴定为已经复发。

9.用于根据权利要求11用途的组合物或方法,其中所述受试者在完全应答后已经复发或基于血液,骨髓(>5%)或任何髓外部位中母细胞重现的一种或多种而被鉴定为已经复发;或

其中所述受试者已经复发或基于高于预定阈值,例如超过1%,2%,3%,4%,5%或10%的CD19-母细胞的检测而被鉴定为已经复发;或

其中所述受试者已经复发或基于MIR199A1,MIR1203,uc021ovp,ITM2C,或HLA-DQB1中的一种或多种的RNA水平的增加而被鉴定为已经复发;或

其中所述受试者已经复发或基于PPIAL4D,TTTY10,TXLNG2P,MIR4650-1,KDM5D,USP9Y,PRKY,RPS4Y2,RPS4Y1,NCRNA00185,SULT1E1,和EIF1AY中的一种或多种的RNA水平的降低而被鉴定为已经复发。

10.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,还包括例如在施用表达结合CD19的CAR分子的一种或多种细胞之前,对所述受试者进行淋巴清除,其中任选地,所述淋巴清除包括施用美法仑,环磷酰胺制剂(cytoxan),环磷酰胺和氟达拉滨的一种或多种。

11.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含有效数量的一种或多种细胞,所述细胞表达:结合CD10的CAR分子,例如如本文所述;结合CD20的

CAR分子,例如如本文所述;结合CD22的CAR分子,例如如本文所述;结合CD34的CAR分子,例如如本文所述;结合CD123的CAR分子,例如如本文所述;结合FLT-3的CAR分子,例如如本文所述;或结合ROR1的CAR分子,例如如本文所述。

12.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述CD19 CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括CD19结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD19结合结构域包含表2或表3中列出的任何CD19 scFv或轻链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)中的一个或多个(例如全部三个),和表2或表3中列出的任何CD19 scFv或重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)的一个或多个(例如全部三个)。

13.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中CD19 CAR包含表2或3中列出的scFv的任何轻链可变区和表2或3列出的scFv的任何重链可变区。

14.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述CD19 CAR包含CD19结合结构域,该CD19结合结构域包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列,或其具有95-99%同一性的序列,或SEQ ID NO:58的多肽。

15.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CD20CAR,该CD20 CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括CD20结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD20结合结构域包含表13中列出的任何CD20轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和表12A或12B中列出的任何CD20重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

16.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CD22CAR,该CD22 CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括CD22结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD22结合结构域包含表8A或8B中列出的任何CD22轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和表7A,7B,或7C中列出的任何CD22重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

17.用于根据权利要求16用途的组合物或方法,其中所述CD22 CAR包含表10A或10B中列出的任何轻链可变区,表9A或9B中列出的任何重链可变区,或表10A或10B中列出的任何轻链可变区和表9A或9B列出的任何重链可变区。

18.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CD123CAR,所述含CD123 CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括CD123结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD123结合结构域包含表18中列出的任何CD123轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和表17中列出

的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

19.用于根据权利要求18用途的组合物或方法,其中所述CD123 CAR包含表16所列的任何轻链可变区,表16中列出的任何重链可变区,或表16中列出的任何轻链可变区和表16中列出的任何重链可变区。

20.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CD123CAR,所述CD123 CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括CD123结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD123结合结构域包含表27中列出的任何CD123轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和表26中列出的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

21.用于根据权利要求20用途的组合物或方法,其中所述CD123 CAR包含表25列出的任何轻链可变区,表25中列出的任何重链可变区,或表25中列出的任何轻链可变区和表25中列出的任何重链可变区。

22.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CAR,所述CAR包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括抗原结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述抗原结合结构域包含一个或多个(例如全部)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和一个或多个(例如全部)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

23.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含含有scFv的CAR。

24.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述B细胞抑制剂包含CAR,该CAR包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154的蛋白质的跨膜结构域。

25.用于根据权利要求22用途的组合物或方法,其中所述抗原结合结构域通过铰链区连接到所述跨膜结构域,其中任选地,所述铰链区包含SEQ ID NO:14或其具有95-99%同一性的序列。

26.用于根据权利要求22用途的组合物或方法,其中所述共刺激结构域是从选自OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278),和4-1BB(CD137)的蛋白质获得的功能性信号传导结构域,其中任选地共刺激结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的序列。

27.用于权利要求22的用途的组合物或方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3ζ的功能性信号传导结构域;或

其中所述细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列。

28.用于权利要求22的用途的组合物或方法,其中所述CAR进一步包含前导序列,其中

任选地,所述前导序列包含SEQ ID NO:13。

29.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述细胞包含T细胞或NK细胞。

30.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中与CD19表达相关的疾病选自增生性疾病如癌症,肿瘤或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良,骨髓增生异常综合征或白血病前期,或是与CD19表达相关的非癌症相关适应证,或

其中所述疾病是血液癌症,急性白血病,B细胞急性淋巴性白血病(BALL),T细胞急性淋巴性白血病(TALL),小淋巴细胞白血病(SLL),急性淋巴性白血病(ALL);慢性白血病,慢性髓性白血病(CML),慢性淋巴细胞白血病(CLL),非霍奇金淋巴瘤或骨髓瘤的一种或多种;或

其中所述疾病是CD19阴性癌症,例如CD19阴性复发性癌症。

31.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,还包括施用:

增加表达CAR分子的细胞功效的活性剂,或

改善与施用表达CAR分子的细胞相关的一种或多种副作用的活性剂,或

治疗与CD19相关疾病的活性剂;或

检查点抑制剂。

32.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述受试者在开始CART疗法前接受活性剂例如检查点抑制剂的预治疗、同时治疗或CART疗法后治疗。

33.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述患者包含CD19阴性癌细胞和对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种为阳性的癌细胞。

34.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,还包括向患者施用癌细胞对其为阳性的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或多种的抑制剂。

35.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其还包括确定所述患者是否包含CD19阴性癌细胞或所述患者是否包含对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种是阳性的癌细胞的步骤。

36.一种组合物,其包含分开或混合的:

(i)表达结合CD19的CAR分子,例如结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19CAR的一种或多种细胞,和

(ii)选自CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1中的一种或多种的抑制剂的一种或多种B细胞抑制剂。

37.一种组合物,其包含:

(i)编码结合CD19的CAR分子,例如结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19CAR的第一核酸,和

(ii)编码结合选自CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种的B细胞抗原的CAR分子的第二核酸,其中第一核酸和第二核酸在相同或分开的核酸分子中。

38.组合物,其包含一种或多种免疫效应细胞和,

(i)编码第一多肽的第一核酸或第一多肽,所述第一多肽包含结合CD19的CAR分子,例

如结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR,和

(ii)编码第二多肽的第二核酸或第二多肽,所述第二多肽包含结合选自CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的B细胞抗原的CAR分子。

39.权利要求38的组合物,其中:

第一核酸或第一多肽和第二核酸或第二多肽各自包含在第一免疫效应细胞内,例如由第一免疫效应细胞表达;

组合物包含含有例如表达第一核酸或第一多肽的第一免疫效应细胞和含有例如表达第二核酸或第二多肽的第二免疫效应细胞;或者

所述组合物不包含含有例如表达第一核酸或第一多肽和第二核酸或第二多肽的细胞。

40.一种包含权利要求37的核酸组合物的细胞,其中所述细胞任选是人T细胞,CD8+T细胞或NK细胞。

41.权利要求40的细胞,其进一步表达包含第一多肽的抑制性分子,所述第一多肽包含与第二多肽相关的至少一部分抑制性分子,所述第二多肽包含来自细胞内信号传导结构域的阳性信号,其中任选地所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和包含共刺激结构域和主要信号传导结构域的第二多肽。

42.一种制备细胞的方法,其包括将权利要求37的核酸组合物引入T细胞或NK细胞,例如用权利要求94-100中任一项的载体转导T细胞或NK细胞,其中所述方法任选地包括:

测定基因特征,其指示用所述细胞治疗的受试者是否可能复发或已经复发;

在输注到受试者之前测定细胞中的基因特征;或

降低包含转导的细胞的细胞群体的TREG特征,其中降低TREG特征任选地包括对细胞群体进行CD25消耗。

43.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,其中所述CD19抑制剂包含CD19CAR,并且所述B细胞抑制剂包含CD123 CAR,其中任选地所述CD19 CAR或CD123 CAR包含分裂的细胞内信号传导结构域,使得与CD19 CAR和CD123 CAR结合到表达CD19或CD123之一的靶细胞(例如,造血干细胞)时的活化相比,当CD19 CAR和CD123 CAR都结合靶细胞,例如靶CD19+CD123+细胞(例如,B-ALL母细胞)时,发生细胞例如免疫效应细胞群体的完全活化。

44.用于前述权利要求中任一项用途的组合物或方法,还包括将细胞例如造血干细胞或骨髓移植到哺乳动物中。

45.一种治疗患有DLBCL,例如,原发DLBCL的受试者的方法,其包括向受试者施用有效数目的一种或多种表达结合CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的细胞与PD1抑制剂的组合,其中任选地受试者具有或被鉴定为具有至少5%,6%,7%,8%,9%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,或90%的为CD3+/PD1+的DLBCL细胞。

46.一种治疗患有DLBCL,例如,原发DLBCL的受试者的方法,其包括向受试者施用有效数目的一种或多种表达结合CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的细胞,其中任选受试者具有或被鉴定为具有至少5%,6%,7%,8%,9%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的为CD3+/PD1+的DLBCL细胞。

47.一种治疗患有DLBCL的受试者的方法,包括向受试者施用有效数目的一种或多种表

达结合CD19的CAR分子，例如CD19 CAR的细胞与PD-L1抑制剂的组合，其中任选地受试者具有或被鉴定为具有少于20％，10％，9％，8％，7％，6％，5％，4％，3％，2％，或1％的癌症，例如癌症微环境中的细胞，所述细胞对CD19和PD-L1是双阳性的。

48.编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子，其中所述CAR包含抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包括CD20结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，并且其中所述CD20结合结构域包含表13,15A,或15B中列出的任何CD20轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1)，轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)，和表12A,12B,14A,或14B中列出的任何CD20重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

49.一种分离的CAR分子，其包含CD20结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，其中所述CD20结合结构域包含表13,15A,或15B中列出的任何CD20结合结构域的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1)，轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)，和表12A,12B,14A,或14B中列出的任何CD20结合结构域的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

50.一种治疗具有与CD20表达相关疾病的哺乳动物的方法，包括向哺乳动物施用有效量的包含权利要求49的CAR分子的细胞。

51.编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子，其中所述CAR包含抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包括CD22结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，并且其中所述CD22结合结构域包含表8A,8B,10A或10B中列出的任何CD22轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1)，轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)，和表7A,7B,7C,9A,或9B中列出的任何CD22重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

52.一种分离的CAR分子，其包含CD22结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，其中所述CD22结合结构域包含表8A,8B,10A或10B中列出的任何CD22结合结构域的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1)，轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)，和表7A,7B,7C,9A,或9B中列出的任何CD22结合结构域的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

53.一种治疗具有与CD22表达相关疾病的哺乳动物的方法，包括向哺乳动物施用有效量的包含权利要求52的CAR分子的细胞。

CD20疗法、CD22疗法和与CD19嵌合抗原受体(CAR)表达细胞的联合疗法

[0001] 本申请是申请日为2016年4月8日的、发明名称为“CD20疗法、CD22疗法和与CD19嵌合 抗原受体(CAR)表达细胞的联合疗法”的中国专利申请201680031677.9(PCT/US2016/026655) 的分案申请。

[0002] 本申请要求2015年4月8日提交的美国序列号62/144,615、2015年4月8日提交的美国序列号 62/144,497、2015年4月8日提交的美国序列号62/144,639、2015年8月19日提交的美国序列号 62/207,255、2015年12月4日提交的美国序列号62/263,423的优先权,将其内容通过引用整体并 入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞,任选与B细胞抑制剂,例 如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或 多种组合以治疗与分化抗原簇19蛋白(CD19)的表达相关的疾病的用途。

背景技术

[0004] 许多患有B细胞恶性肿瘤的患者通过标准治疗无法治愈。此外,传统治疗方案往往具有 严重的副作用。在癌症免疫治疗方面已经做了尝试,但是几个障碍使得实现临床有效性是非 常困难的目标。虽然已经鉴定了数百种所谓的肿瘤抗原,但它们通常来源于自身,因此其免 疫原性差。此外,肿瘤使用几种机制来使自己对免疫攻击的起始和传播具有敌意。

[0005] 使用嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞(CART)疗法的最新发展在利用免疫系统的力 量治疗B细胞恶性肿瘤和其他癌症中显示出有希望的结果,所述疗法依赖于将T细胞重定向 到癌细胞如B细胞恶性肿瘤上的合适的细胞表面分子(参见,例如,Sadelain et al.,CANCER DISCOVERY 3:388-398(2013))。鼠源CART19(即“CTL019”)的临床结果已经显示出在CLL 和儿童ALL患者中建立完全缓解的希望(参见,例如,Kalos et al.,Sci Transl Med 3:95ra73 (2011),Porter et al.,NEJM 365:725-733(2011),Grupp et al.,NEJM 368:1509-1518(2013))。除了 遗传修饰的T细胞上的嵌合抗原受体识别和破坏靶细胞的能力之外,成功的治疗性T细胞疗 法需要具有随时间增殖和持续的能力,以便调查白血病复发。由于无反应性,抑制或衰竭而 导致的T细胞的变化的质量将对CAR转化的T细胞的性能产生影响,熟练的医生在此时对 所述性能的控制有限。为了有效,CAR转化的患者T细胞需要持久并保持响应于同源抗原而 增殖的能力。已经显示ALL患者T细胞可以用包含鼠scFv的CART19进行(参见例如Grupp et al.,NEJM 368:1509-1518(2013))。

[0006] 发明概述

[0007] 该公开内容至少部分地涉及治疗与分化抗原簇19蛋白(CD19)表达相关的病症的方法(例 如,OMIM Acc.No.107265,Swiss Prot.Acc No.P15391)。在某些实施方案中,该病症是癌症, 例如血液癌症。在一些实施方案中,该方法包括施用与B细胞抑制剂例如一种或

多种(例如， 一种,两种,三种或更多种)B细胞抑制剂组合的结合CD19的嵌合抗原受体(CAR)分子。 在一些实施方案中,B细胞抑制剂选自CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3 或ROR1的抑制剂或其组合。在一些实施方案中,与单独的任一疗法相比,该组合保持或具有 更好的临床有效性。在一些实施方案中,本文的方法涉及使用工程化细胞,例如表达结合CD19 的CAR分子的T细胞与第二种B靶标(例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3 或ROR1)的B细胞抑制剂(例如,抗体(例如,单特异性或双特异性抗体)或结合第二种B 靶标的CAR表达细胞,例如CAR表达免疫效应细胞,其组合)的组合来治疗与CD19的表达相关的病症。本公开另外描述了针对CD20和CD22的新型抗原结合结构域和CAR分子,并且例如用作单一疗法或联合疗法的用途。

[0008] 因此,一方面,本发明涉及治疗具有与CD19表达相关的疾病的受试者(例如哺乳动物) 的方法。该方法包括向受试者施用与B细胞抑制剂组合的CD19抑制剂,例如结合本文所述的 CD19的CAR分子。例如,该方法包括向受试者施用与B细胞抑制剂组合的有效数目的一种或 多种表达结合CD19的CAR分子,例如结合本文所述的CD19(例如,野生型或突变型CD19) 的CAR分子的细胞。在某些实施方案中,B细胞抑制剂选自CD10抑制剂,例如本文所述的一 种或多种CD10抑制剂;CD20抑制剂,例如本文所述的一种或多种CD20抑制剂;CD22抑制剂， 例如本文所述的一种或多种CD22抑制剂;CD34抑制剂,例如本文所述的一种或多种CD34抑 制剂;CD123抑制剂,例如本文所述的一种或多种CD123抑制剂;FLT-3抑制剂,例如本文所述 的一种或多种FLT-3抑制剂;ROR1抑制剂,例如本文所述的一种或多种ROR1抑制剂;CD79b 抑制剂,例如本文所述的一种或多种CD79b抑制剂;CD179b抑制剂,例如本文所述的一种或 多种CD179b抑制剂;CD79a抑制剂,例如本文所述的一种或多种CD79a抑制剂或其任何组合。 在某些方面,公开了一种治疗患有B细胞白血病或B细胞淋巴瘤的受试者的方法,包括向受试 者施用有效数目的一种或多种表达结合CD19的CAR分子的细胞,与CD10,CD20,CD22, CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或多种抑制剂的组合。

[0009] 在相关方面,本公开提供了减少CD19表达细胞增殖的方法,例如通过向受试者(例如有 此需要的患者)施用如本文所述的组合疗法,例如CD19抑制剂与B细胞抑制剂,例如本文所 述的一种或多种B细胞抑制剂组合。在另一方面,本公开提供了选择性地杀死表达CD19的细 胞的方法,例如通过向受试者(例如有此需要的患者)施用如本文所述的组合疗法,例如CD19 抑制剂与B细胞抑制剂,例如本文所述的一种或多种B细胞抑制剂组合。在某些方面,本公 开提供了在受试者例如哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,包括向哺乳动物施用有效量的如 本文所述的组合(例如,一种或多种CAR表达细胞)。

[0010] 在一方面,本公开提供了预防哺乳动物中CD19阴性复发的方法,包括向所述哺乳动物施 用一种或多种B细胞抑制剂,其中所述B细胞抑制剂包含CD10,CD20,CD22,CD34,CD123, FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抑制剂。

[0011] 在另一方面,本公开提供了治疗患有与CD19表达相关的疾病,例如DLBCL(例如原发 性DLBCL))的受试者的方法。该方法包括向受试者施用有效数量的一种或多种表达结合CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的细胞,任选与PD1抑制剂组合。任选地,受试者具有或 被鉴定为具有至少5%,6%,7%,8%,9%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的 癌细胞,例如DLBCL细胞,其为CD3+/PD1+。

[0012] 在一方面,本公开提供了治疗患有与CD19表达相关的疾病(例如DLBCL)的受试者

的 方法。该方法包括向受试者施用有效数量的一种或多种细胞，其表达结合CD19的CAR分子， 例如CD19 CAR，与PD-L1抑制剂组合。任选地，受试者具有或被鉴定为具有小于20％，10％，9％， 8％，7％，6％，5％，4％，3％，2％或1％癌症细胞，例如癌症微环境，对CD19和PD-L1是双阳性的。

[0013] 一方面，本公开提供一种或多种B细胞抑制剂，其中所述B细胞抑制剂包含CD10，CD20， CD22，CD34，CD123，FLT-3，ROR1，CD79b，CD179b或CD79a的一种或多种，用于治疗具有与 CD19表达相关疾病的受试者，并且其中所述受试者已经接受或正在接受或即将接受表达结合 CD19的CAR分子，例如CD19 CAR的细胞。

[0014] 组合施用的定时和剂量

[0015] 本文所述的一种或多种疗法可以基本上同时或以任何顺序施用于受试者。例如，CD19抑 制剂，例如本文所述的CD19 CAR表达细胞，一种或多种B细胞抑制剂和/或任选的至少一种另 外的治疗剂可以在相同或分开的组合物中同时施用，或顺序施用。

[0016] 对于顺序施用，可首先施用本文所述的CAR表达细胞(例如，CD19 CAR表达细胞，CD20 CAR表达细胞或CD22 CAR表达细胞)，并且可以其次施用另外的药剂，或者施用的顺序可 以颠倒。在一些实施方案中，当引入第二种疗法时，第一种疗法(例如，CAR表达细胞，例如CD19 CART细胞，CD20 CART细胞或CD22 CART细胞)继续进行，并且在其它实施方案 中，第一种疗法在引入第二种疗法之前、之后撤出或与第二种疗法同时撤出。在顺序施用的 情况下，在一些实施方案中，第二种疗法在预定量的时间之后启动或在受试者展示出已经发生或可能发生复发的一个或多个指征之后启动。指征可以是例如在第一种疗法的靶标例如CD19，CD20或CD22中具有干扰的癌细胞的存在。干扰可能是例如移码突变和/或过早终止密码子。

[0017] 在其他实施方案中，同时施用两种或更多种疗法(例如CD19 CAR表达细胞和B细胞抑制 剂)。不受理论的约束，在一些实施方案中，疗法的同时施用可以减少复发的可能性和/或延 迟复发。

[0018] 当组合施用时，第一疗法(例如CAR疗法，例如针对CD19，CD20或CD22的CAR表达细胞)和另外的药剂(例如，第二或第三药剂，例如B细胞抑制剂)，或全部可以以与单独使 用的每种药剂(例如作为单一疗法)的量或剂量更高，更低或相同的量或剂量施用。在某些 实施方案中，第一疗法，第二疗法，任选的第三疗法或全部的给药量或剂量比例如作为单一疗法的单独使用的每种药剂的量或剂量更低(例如，低至少20％，至少30％，至少40％，或至少50％)。在其它实施方案中，导致期望效果(例如，癌症的治疗)的第一疗法，第二疗 法，任选的第三疗法或全部的量或剂量比例如实现相同治疗效果所需的作为单一疗法单独使用的每种药剂的量或剂量更低(例如，低至少20％，至少30％，至少40％或至少50％)。在 某些实施方案中，与施用常规(单一疗法)剂量时看到的副作用相比，较低剂量导致减少的 副作用。

[0019] 在一个实施方案中，疗法包括细胞群。在实施方案中，细胞是免疫效应细胞，例如CAR 表达细胞。

[0020] 或者，或与本文描述的方法组合，公开了包括诊断步骤或患者选择步骤的方法，例如如 下所述。

[0021] 在一个方面，本发明提供了评估受试者(例如患者)的复发者状态(例如在CAR疗法

之 后的复发者或非复发者)的方法。在一个实施方案中,在用CAR疗法(例如CD19 CART疗法, 例如本文所述,例如CTL019疗法)治疗后,该方法鉴定已经复发(“复发者”)或可能复发或 未复发(“非复发者”)或可能不复发的受试者,例如患者。在一个实施方案中,通过测定CD19 的一个或多个特征来确定复发者状态(例如在CART疗法之后的复发者或非复发者)。

[0022] 在一个实施方案中,CD19的一个或多个特征包括核酸序列的改变(例如,突变,例如插 入,缺失或取代,或其组合),核酸水平的改变,蛋白质序列的改变,或蛋白质水平的改变, 或其组合。在一个实施方案中,复发者在CD19中具有一个或多个突变,例如在CD19的外显 子2中具有一个或多个突变(例如插入或缺失)。在一个实施方案中,复发者在CD19的外显 子1,外显子2,外显子3,外显子4,外显子5,外显子6或外显子7中具有一个或多个突变。在 一个实施方案中,突变产生过早终止密码子,例如通过插入或缺失导致移码,例如在CD19的 外显子2中的移码。在一个实施方案中,突变是表31的突变。

[0023] 在一个实施方案中,将CD19的特征与参考特征进行比较。例如,当特征是序列(例如, 来自生物样品的蛋白质或核酸序列)时,参考特征可以是CD19的野生型序列(例如蛋白质或 核酸序列)。特征可以是样品中具有突变序列的细胞的百分比。当特征是水平(例如,蛋白 质或核酸水平)时,参考特征可以是CD19的野生型水平(例如,蛋白质或核酸水平)。特征 可以是样品中蛋白质或核酸的水平。特征可以是样品中具有高于给定阈值的蛋白质或核酸水 平的细胞的百分比。

[0024] 在一个实施方案中,提供了用于鉴定患有癌症的受试者(例如,诸如CLL或ALL的血液 癌症)作为包括CAR疗法,例如CD19 CART疗法的治疗之后的复发者或非复发者的方法。该方法包括:(1)从受试者获取样品(例如,从受试者的血液获得的单采血液成分术样品;和/ 或例如制成品样品,例如从受试者的血液获得的经遗传工程化的T细胞);(2)确定CD19的 特征,例如本文所述的序列或水平;和(3)(任选地)将确定的CD19的特征与参考特征进行 比较;其中所确定的特性与参考特征之间的差异,例如统计学显著性差异预示着对CAR疗法的 复发;以及(4)例如基于所确定的CD19特征,将该受试者鉴定为CAR疗法的复发者或非复发 者。在一个实施方案中,CD19的特征的存在或不存在是过早终止密码子的存在或不存在,例 如通过导致移码的插入或缺失。在一个实施方案中,CD19的特征的存在是表31的突变。

[0025] 在一个实施方案中,所提供的方法包括(1)从受试者获取样品(例如,从受试者的血液 获得的单采血液成分术样品;和/或例如制成品样品,例如从受试者的血液,例如制造的 CART19产品获得的遗传工程化T细胞);(2)确定CD19的特征,例如本文所述的序列或水平; 和(3)(任选地)将确定的CD19的特性与参考特征进行比较;其中CD19的特征的存在(例如, 与参考特征相比,所确定的特征之间的差异,例如统计学显著差异)预示着CAR疗法的复发。 在一个实施方案中,CD19的特征的存在是过早终止密码子的存在,例如通过导致移码的插入 或缺失。在一个实施方案中,CD19的特征的存在是表31的突变。

[0026] 在一个实施方案中,提供了用于在包括CAR疗法(例如本文所述的CD19 CAR疗法)的 治疗之后,确定具有癌症(例如,血液癌症如CLL或ALL)的受试者的复发的方法。该方法包括确定复发前获得的样品中CD19的特征。在一个实施方案中,CD19的特征的存在(例如,与参考特征相比,确定的特征之间的差异,例如统计学显著性差异)指示CAR疗法后的复发。在一个实施方案中,CD19的特征的存在是过早终止密码子的存在,例如通过导致移码的插

入 或缺失。在一个实施方案中,CD19的特征的存在是表31的突变。

[0027] 在一个实施方案中,提供了用于评估患有癌症,例如血液癌症如CLL或ALL的受试者的 方法。该方法包括获取受试者的复发者状态值,包括CD19的一个或特征(例如本文所述的 CD19的一个或多个特征)的测量值,从而评估受试者。

[0028] 在一个实施方案中,提供了用于评价或监测CAR疗法(例如CD19 CART疗法)在具有癌 症的受试者中的有效性的方法,所述方法包括获取所述受试者的复发者状态值,包括测量 CD19的一种或多种特征,例如本文所述的CD19的一种或多种特征,从而评估或监测CAR疗 法在受试者中的有效性。

[0029] 在一个实施方案中,提供了用于提供CAR疗法(例如本文所述的CD19 CART疗法)在具 有癌症的受试者中的成功率预测的方法,所述方法包括步骤:提供来自受试者的生物样品;确 定CD19的一个或多个特征,例如本文所述的CD19的一个或多个特征;并基于确定的特征,为 受试者提供预后。

[0030] 在一些方面,本公开内容提供了例如鉴定患有癌症的受试者具有对包括嵌合抗原受体 (CAR)疗法的治疗应答的增加或减少的可能性的方法或测定法,所述方法包括:

[0031] (1)从受试者获取样品;

[0032] (2)确定以下的一个或多个的值:

[0033] (i)样品中表29中列出的一种或多种标记的水平;

[0034] (ii)CD19的特征,例如突变,例如导致移码或过早终止密码子或两者的突变,或

[0035] (iii)T_{REG}细胞的水平或活性;和

[0036] (3)(任选地)将确定的值例如(i),(ii)或(iii)或其组合的水平,活性或特性与参考值进行比较,其中在确定的值与参考值相比之间的差异,例如统计学显著性差异预测受 试者对CAR疗法的应答性;和

[0037] (4)根据确定的值将受试者鉴定为对CAR疗法的完全的应答者,部分应答者或非应答者, 或复发或非复发者。

[0038] 在某些实施方案中,任一上述方法可以进一步包括以下:

[0039] (i)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中没有检测到差异(例如没有统计学显著性差异),那么对 受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含CD19表达细胞的疗法;

[0040] (ii)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么向受试者施 用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含表达CD19的细胞和一种或多种B细胞抑制剂(例如如 本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂);或

[0041] (iii)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么停止第一疗 法,例如包含CD19表达细胞的疗法,以及施用第二疗法,例如一种或多种B细胞抑制剂(例 如如本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)。

[0042] 可以在患者评估步骤之前或之后进行施用步骤(i)-(iii),如下面的示例性实施方案 中所述。

[0043] 在某些方面,公开了一种治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括:

[0044] (a)获取,例如确定所述受试者是否具有以下值的一个,两个或更多(全部):

[0045] (i)表29中列出的一种或多种标记的水平;

[0046] (ii)CD19的特征,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或

[0047] (iii)生物样品中T_{REG}细胞的水平或活性,以及

[0048] (b)响应所述值,进一步包括以下内容:

[0049] (i)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中没有检测到差异(例如没有统计学显著性差异),那么对 受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含CD19表达细胞的疗法;

[0050] (ii)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么向受试者施 用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含表达CD19的细胞和一种或多种B细胞抑制剂(例如如 本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)的疗 法;或

[0051] (iii)如果(i)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的一 个,两个或更多个(所有)的值中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么停止第一疗 法,例如包含CD19表达细胞的疗法,以及施用第二疗法,例如一种或多种B细胞抑制剂(例 如如本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)。

[0052] 另一方面,提供了治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括:

[0053] (a)向受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含CD19表达细胞的疗 法,

[0054] (b)获取(例如,确定受试者是否具有)以下值的一个,两个或更多(全部):

[0055] (i)表29中列出的一种或多种标记的水平;

[0056] (ii)CD19的特征,例如突变,例如,引起移码或过早终止密码子或两者的突变, 或

[0057] (iii)生物样品中T_{REG}细胞的水平或活性,以及

[0058] (c)响应步骤(b)(I-III)中的值或测定,执行以下一项或多项:

[0059] (i)如果(I)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(II)CD19的特征,例 如突变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(III)生物样品中$_{TREG}$细胞的水 平的一个或更多个中没有检测到差异(例如没有统计学显著性差异),那么对受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法,例如包含CD19表达细胞的疗法;

[0060] (ii)如果(I)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(II)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(III)生物样品中$_{TREG}$细胞的水平的 一个或更多个中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么向受试者施用治疗有效剂量的 CAR疗法,例如包含表达CD19的细胞和一种或多种B细胞抑制剂(例如如本文所述的CD10, CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)的疗法;或

[0061] (iii)如果(I)表29中列出的一种或多种标记的水平或活性;(II)CD19的特征,例如突 变,例如引起移码或过早终止密码子或两者的突变,或(III)生物样品中T_{REG}细胞的水平的 一个或更多个中检测到差异(例如统计学显著性差异),那么停止第一疗法,例如包含CD19 表达细胞的疗法,以及施用第二疗法,例如一种或多种B细胞抑制剂(例如如本文所述的CD10, CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)。

[0062] 在任何上述方法的一些实施方案中,样品是选自血液,血浆或血清样品的生物样品。在 具体实施方案中,生物样品是血液样品。在一个实施方案中,样品是单采血液成分术样品, 例如从受试者的血液获得的T细胞。在一个实施方案中,样品是制成品样品,例如,从受试者 的血液获得的遗传工程化T细胞,例如制造的CAR产品,例如制造的CART19产品。

[0063] 在一个实施方案中,本文的方法可用于确定患者是否可能应答CAR疗法(例如CD19 CART),例如,尚未接受CAR疗法的患者是否可能应答CAR疗法,或者已接受CAR疗法的 患者是否可能应答持续的CAR疗法。一般来说,预测复发的相同CD19特征预测患者不太可能 应答CD19 CAR疗法。被识别为不太可能应答CD19 CAR疗法的患者可以被施用不同类型的疗法,例如B细胞抑制剂(例如,如本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或多种抑制剂)。

[0064] 另一方面,提供了治疗患有癌症例如血液癌症的受试者的方法。在一个实施方案中,所 述方法包括确定受试者在CD19的特征相对于参考特征是否具有差异,例如统计学显著性差 异,以及如果所确定的特征和参考特征之间存在差异,例如统计学显著性差异,那么对受试 者施用治疗有效剂量的CAR疗法,例如CART,从而治疗受试者。在一个实施方案中,特征 是CD19序列,例如蛋白质或核酸序列。在一个实施方案中,该方法包括测定是否存在移码的 CD19,例如,包含过早终止密码子的CD19。

[0065] 在任何上述方法的实施方案中,治疗包括施用CD19 CAR表达细胞,任选与一种或多种B 细胞抑制剂组合。在一个实施方案中,CD19 CAR疗法与一种或多种B细胞抑制剂(例如如 本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的一种 或多种抑制剂)同时施用。在一个实施方案中,CD19 CAR疗法在一种或多种B细胞抑制剂之 前施用。在一个实施方案中,CD19 CAR疗法在一种或多种B细胞抑制剂之后施用。

[0066] 在其中确定的特征和参考特征之间存在差异的实施方案中,该方法包括在输注到受试者 之前修饰CAR产品。在其中确定的特征与参考特征之间存在差异的一个实施方案中,所述方 法包括在输注到受试者之前修饰CAR产品的制造。在一个实施方案中,如果确定的特征和参 考特征之间存在差异,则该方法包括调整CAR输注剂量以实现抗癌效果。

[0067] 在一个实施方案中,治疗方法包括通过将来自受试者的样品中CD19的特征相对于参考特 征比较,确定受试者是否具有增加的应答CAR疗法,例如CD19 CART疗法,例如本文所述的 CD19 CART疗法的可能性,其中所述特征相对于所述参考特征的差异表示增加的应答可能性; 以及向受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法,从而治疗受试者。

[0068] 在一个实施方案中,治疗方法包括从受试者获得样品;相对于参考特征确定CD19的特征 (例如,移码或过早终止密码子的存在或不存在);以及如果所述受试者被鉴定为在样品的 CD19特征与样品中的参考特征之间具有统计学显著性差异,则施用治疗有效剂量的CAR表达 细胞。

[0069] CD19特征可用于为患者设计治疗。例如,在一个实施方案中,当患者样品包含野生

型 CD19时,向患者施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如CD19 CART。在一个 实施方案中,当患者样品包含突变体CD19(例如,移码CD19,例如包含过早终止密码子的CD19)时,向患者施用除了CD19抑制剂之外的疗法,例如,该患者被施用另一种B细胞抑制剂。在一个实施方案中,当患者样品包含至少正常水平的CD19时,向患者施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如CD19 CART。在一个实施方案中,当患者样品包含低于正 常水平的CD19时,向患者施用除了CD19抑制剂之外的疗法,例如,该患者被施用另一种B细 胞抑制剂(例如,本文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b, 或CD79a的一种或多种抑制剂)。

[0070] 在一个实施方案中,治疗方法包括获取受试者的复发者状态的值,包括CD19特征的量度, 并且响应于复发者状态的确定,执行以下中的一个,两个,三个或更多个:(1)将该受试者 鉴定为复发或非复发者;(2)施用CAR疗法;(3)选择或改变CAR疗法的剂量;(4)选择或改 变CAR疗法的时间表或时间过程;(5)例如对复发者组合施用另外的药剂与CAR疗法,例如 施用一种或多种B细胞抑制剂,或检查点抑制剂,例如本文所述的检查点抑制剂,或激酶抑 制剂,例如本文所述的激酶抑制剂;(6)在用CAR疗法治疗前对复发者施用增加受试者中初 始T细胞数量的疗法;修改CAR疗法的制造方法,例如对于被鉴定为复发者的受试者,例如在 引入编码CAR的核酸之前,富集初始T细胞;或(7)选择备选疗法,例如针对特定癌症(例如, 如本文所述)的护理标准(例如为复发者);从而治疗受试者的癌症。

[0071] 在一些实施方案中,该方法包括施用一种,两种,三种或更多种B细胞抑制剂(例如本 文所述的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂)。例如, 在一个实施方案中,该方法包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞与CD10抑制剂 组合或CD10抑制剂和本文所述的CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的抑制剂的任 一组合。在另一个实施方案中,所述方法包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞 与CD20抑制剂组合或CD20抑制剂和如本文所述的CD10,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 抑制剂的任何组合。在另一个实施方案中,该方法包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR 的细胞与CD22抑制剂组合,或CD22抑制剂与如本文所述的CD10,CD22,CD34,CD123, FLT-3或ROR1抑制剂的任何组合。在另一个实施方案中,该方法包括施用CD19抑制剂,例如 表达CD19 CAR的细胞与CD34抑制剂组合或CD34抑制剂和如本文所述的CD10,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1抑制剂的任何组合。在另一个实施方案中,该方法包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞与CD123抑制剂组合,或CD123抑制剂和如本文所述的CD10,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1抑制剂的任何组合。在另一个实施方案中,该方法包 括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞与FLT-3抑制剂的组合或FLT-3抑制剂与如本 文所述的CD10,CD22,CD34,CD123,或ROR1抑制剂的任何组合。在另一个实施方案中, 该方法包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,与ROR1抑制剂组合或ROR1抑制 剂与如本文所述的CD10,CD22,CD34,CD123,FLT-3抑制剂的任何组合。在一些实施方 案中,所述方法包括施用一种,两种,三种或更多种B细胞抑制剂(例如,如本文所述CD10, CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的一种或多种抑制 剂)。

[0072] 在一些实施方案中,本文所述的治疗方法进一步包括以下之一或两者:确定患者样品中免 疫检查点分子(例如PD-L1,PD1,LAG3或TIM3)的水平;以及向患者施用免疫检查点抑制 剂(例如PD-L1,PD1,LAG3和TIM3中的一种或多种的抑制剂)。例如,该方法可以包括

用 本文所述的一种或多种CAR表达细胞治疗患者(例如,CD19 CAR与B细胞抑制剂,CD20 CAR 或CD22 CAR组合)并确定在治疗前后的患者中免疫检查点分子的水平。在一些实施方案中，所述方法包括将免疫检查点抑制剂施用于与参考水平相比具有升高的免疫检查点分子水平的 患者,例如,响应于升高的PD-L1水平施用PD-L1抑制剂,响应于升高的PD1水平施用PD1抑 制剂,响应升高的LAG3水平施用LAG3抑制剂,或响应升高的TIM3水平施用TIM3抑制剂。 在一些实施方案中,所述方法包括向已经接受,正在接受或将要接受本文所述的一种或多种 CAR表达细胞的治疗的患者施用免疫检查点抑制剂(例如,CD19 CAR与B细胞抑制剂,CD20 CAR或CD22 CAR组合),其中与参考水平相比,患者具有或被鉴定为具有升高水平的免疫 检查点分子。

[0073] 组合物

[0074] 在一些方面,本公开提供了例如组合物,其包含:(i)表达结合CD19的CAR分子,例如 结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的一种或多种细胞,和(ii)B细胞抑制剂， 例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种抑制剂。在实施方案中,分别提供(i)和(ii),并且在实施方案中混合(i)和(ii)。

[0075] 在一些方面,本公开提供了例如编码以下的核酸:(i)结合CD19的CAR分子,例如结合 本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR,和(ii)一种或多种B细胞抑制剂,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的抑制剂。在一些方面,本公 开提供了例如编码以下的核酸:(i)结合CD19的CAR分子,例如结合本文所述的CD19的CAR 分子,例如CD19 CAR,和(ii)CAR分子,其结合B细胞抗原,例如CD10,CD20,CD22， CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种。在实施方案中,核酸包含RNA或DNA。

[0076] 在一些方面,本公开提供了例如编码以下的核酸:(i)结合CD19的CAR分子,例如结合 本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR,和(ii)CAR分子,其结合B细胞抗原,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种 或多种。在实施方案中,核酸包含RNA或DNA。在实施方案中,编码(i)和(ii)的核酸序 列位于相同的取向,例如编码(i)和(ii)的核酸序列的转录在相同方向上进行。在实施方 案中,编码(i)和(ii)的核酸序列位于不同的取向。在实施方案中,单个启动子控制编码 (i)和(ii)的核酸序列的表达。在实施方案中,编码蛋白酶切割位点(例如T2A,P2A,E2A 或F2A切割位点)的核酸位于编码(i)和(ii)的核酸序列之间。在实施方案中,放置蛋白酶 切割位点使得细胞可以表达包含(i)和(ii)的融合蛋白,该蛋白随后通过蛋白水解切割加 工成两种肽。在一些实施方案中,编码(i)的核酸序列在编码(ii)的核酸序列的上游,或 编码(ii)的核酸序列位于编码(i)的核酸序列的上游。在实施方案中,第一启动子控制编 码(i)的核酸序列的表达,第二启动子控制编码(ii)的核酸序列的表达。在实施方案中， 核酸是质粒。在实施方案中,核酸包含病毒包装元件。在一些方面,本公开提供了包含本文 所述的核酸,例如包含如上所述的(i)和(ii)的核酸的细胞,例如免疫效应细胞。细胞可 以包含切割T2A,P2A,E2A或F2A切割位点的蛋白酶(例如内源或外源的)。

[0077] 在一些方面,本公开提供了例如组合物,其包含:(i)编码结合CD19的CAR分子,例如 结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的第一核酸,和(ii)编码一种或多种B细胞 抑制剂,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的抑制剂 的第二核酸。在一些方面,本公开内容提供了例如组合物,其包含:(i)编码结合CD19的CAR 分

子,例如结合本文所述的CD19的CAR分子,例如CD19 CAR的第一核酸,和(ii)结合B细胞 抗原,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的CAR分 子。在实施方案中,第一核酸和第二核酸各自包含RNA或DNA。

[0078] 在一些方面,本公开提供了例如包含本文所述的一种或多种核酸的载体。在某些方面, 本公开还提供包含如本文所述的载体或核酸的细胞。

[0079] 本公开还在某些方面提供组合物,其包含一种或多种免疫效应细胞,和:(i)编码第一多 肽的第一核酸或第一多肽,所述第一多肽包含结合CD19的CAR分子,例如结合本文所述的 CD19的CAR分子,例如CD19 CAR,和(ii)编码第二多肽的第一核酸或第二多肽,所述第 二多肽包含结合B细胞抗原,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种的CAR分子。在实施方案中,第一核酸或第一多肽和第二核酸或第二多肽各自包含在第一免疫效应细胞内,例如由第一免疫效应细胞表达。在实施方案 中,组合物包含含有例如表达第一核酸或第一多肽的第一免疫效应细胞和含有例如表达第二 核酸或第二多肽的第二免疫效应细胞。在实施方案中,组合物不包含含有例如表达第一核酸 或第一多肽和第二核酸或第二多肽的细胞。

[0080] 制造

[0081] 在某些方面,本公开提供了制备细胞的方法,包括用本文所述的载体(例如编码CAR的 载体)转导免疫效应细胞,例如T细胞或NK细胞。在某些方面,本公开提供了制备细胞的方 法,包括将如本文所述的核酸(例如,编码CAR的核酸)引入免疫效应细胞例如T细胞或NK 细胞。在某些方面,本公开提供了产生RNA工程化细胞群体的方法,包括将体外转录的RNA 或合成RNA引入细胞,其中RNA包含本文所述的核酸,例如编码CAR的核酸。

[0082] 在一些实施方案中,本文公开的制备方法还包括使细胞群(例如表达CD19 CAR的细胞, 表达CD20 CAR的细胞,表达CD22 CAR的细胞,B细胞抑制剂细胞或CD19 CAR表达细胞和B细胞抑制剂细胞两者)与编码端粒酶亚基例如hTERT的核酸接触。编码端粒酶亚基的 核酸可以是DNA。

[0083] 在一些实施方案中,本文公开的制备方法还包括在含有2%hAB血清的血清中培养细胞 群体(例如表达CD19 CAR的细胞,表达CD20 CAR的细胞,表达CD22 CAR的细胞,B细 胞抑制剂细胞或表达CD19 CAR的细胞和B细胞抑制剂细胞两者)。

[0084] 适应证

[0085] 在一个实施方案中,与CD19表达相关的疾病选自增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病 症如脊髓发育不良,骨髓增生异常综合征或白血病前期,或与CD19的表达相关联的非癌症相 关的适应证。在一个实施方案中,该疾病是实体或液体肿瘤。在一个实施方案中,癌症是胰 腺癌。在一个实施方案中,该疾病是血液癌症。在一个实施方案中,血液癌是白血病。在一 个实施方案中,癌症选自一种或多种急性白血病,包括但不限于B细胞急性淋巴性白血病 (BALL),T细胞急性淋巴性白血病(TALL),小淋巴细胞性白血病(SLL),急性淋巴性白血 病(ALL)(例如复发和难治性ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性髓性白血 病(CML)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。附加的血液癌症或病症包括但不限于套细胞淋巴瘤(MCL),B细胞幼淋巴细胞白血病,母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤,伯基特淋巴 瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞滤泡淋巴瘤,恶 性淋巴细胞增生症,MALT淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓发育不良和骨髓增 生异常

综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆母细胞淋巴瘤,浆细胞样树突细胞瘤, 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,以及“白血病前期”。白血病前期包括由无效产生(或发育异常) 髓血细胞联合的一组不同的血液学状况。在实施方案中,与CD19表达相关的疾病包括但不限 于非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病症或表达CD19的增生性疾病;及其任何组合。

[0086] 在一个实施方案中,与CD19表达相关的疾病是淋巴瘤,例如MCL或霍奇金淋巴瘤。在一 个实施方案中,与CD19表达相关的疾病是白血病,例如SLL,CLL和/或ALL。

[0087] 在一个实施方案中,与肿瘤抗原(例如本文所述的肿瘤抗原)相关的疾病选自增生性疾 病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良,骨髓增生异常综合征或白血病前期,或者 是与本文所述的肿瘤抗原表达相关的非癌症相关适应证。在一个实施方案中,与本文所述的 肿瘤抗原相关的疾病是实体肿瘤,例如本文所述的实体肿瘤,例如前列腺癌,结肠直肠癌, 胰腺癌,子宫颈,胃癌,卵巢癌,头癌或肺癌。

[0088] 在一个实施方案中,癌症选自AML,ALL,B-ALL,T-ALL,B细胞幼淋巴细胞白血病,慢性淋巴细胞白血病,CML,毛细胞白血病,霍奇金淋巴瘤,肥大细胞病症,骨髓增生异常 综合征,骨髓增生性肿瘤,浆细胞骨髓瘤,浆细胞样树突状细胞肿瘤或其组合。

[0089] 在一个实施方案中,受试者(例如,用CD19 CAR治疗的受试者,任选地与第二药剂如 PD1抑制剂或PD-L1抑制剂组合)具有或被鉴定为具有至少5%,6%,7%,8%,9%,10%,20%, 30%,40%,50%,60%,70%,80%,或90%的癌细胞,例如DLBCL细胞,其是CD3+/PD1+。

[0090] 在一个实施方案中,受试者在用表达结合CD19的CAR分子(例如CD19 CAR)的一种或 多种细胞治疗后已经复发或被鉴定为复发。在一个实施方案中,受试者在完全应答后基于血 液,骨髓(>5%)或任何髓外部位中胚细胞的一种或多种重现已经复发或被鉴定为已经复发。 在一个实施方案中,受试者已经复发或基于高于预定阈值(例如超过1%,2%,3%,4%,5% 或10%)的CD19-胚细胞的检测被鉴定为已经复发。

[0091] CAR疗法

[0092] 在某些实施方案中,治疗方法包括CAR疗法,例如施用表达一种或多种CAR分子的一种 或多种细胞。表达一种或多种CAR分子的细胞可以是免疫效应细胞,例如T细胞或NK细胞。 在一个实施方案中,受试者是人。

[0093] 在一个实施方案中,表达CAR分子的细胞包含包括编码CAR分子的核酸序列的载体。在 一个实施方案中,载体选自DNA,RNA,质粒,慢病毒载体,腺病毒载体或逆转录病毒载体。 在一个实施方案中,载体是慢病毒载体。在一个实施方案中,载体还包含启动子。在一个实 施方案中,启动子是EF-1启动子。在一个实施方案中,EF-1启动子包含SEQ ID NO:100的序 列。在一个实施方案中,载体是体外转录的载体,例如转录本文所述的核酸分子的RNA的载 体。在一个实施方案中,体外载体中的核酸序列还包含聚(A)尾,例如本文所述的聚A尾, 例如包含约150个腺苷碱基。在一个实施方案中,体外载体中的核酸序列还包含3’UTR,例如 本文所述的3’UTR,例如包含来自人β-球蛋白的3’UTR的至少一个重复序列。在一个实施方案 中,体外载体中的核酸序列还包含启动子。在一个实施方案中,核酸序列包含T2A序列。

[0094] 在一个实施方案中,表达CAR分子的细胞是本文所述的细胞,例如人T细胞或人NK细胞, 例如本文所述的人T细胞或本文所述的人NK细胞。在一个实施方案中,人T细胞是CD8

+T细 胞。在一个实施方案中，人T细胞是CD4+T细胞。在一个实施方案中，人T细胞是CD4+/CD8+T 细胞。在一个实施方案中，人T细胞是CD8+和CD4+T细胞的混合物。在一个实施方案中，细 胞是自体T细胞。在一个实施方案中，细胞是同种异体T细胞。在一个实施方案中，细胞是T 细胞，T细胞是二酰基甘油激酶(DGK)缺陷的。在一个实施方案中，细胞是T细胞，T细胞 是Ikaros缺陷的。在一个实施方案中，细胞是T细胞，并且T细胞是DGK和Ikaros缺陷的。

[0095] 在另一个实施方案中，表达CAR分子的细胞，例如如本文所述，可以进一步表达另一种 活性剂，例如增强CAR表达细胞活性的活性剂。

[0096] 在一个实施方案中，所述方法包括将本文所述的表达CAR分子的细胞与增强CAR表达细 胞活性的活性剂组合施用，其中所述活性剂是细胞因子，例如IL-7，IL-15，IL-21或其组合。所述细胞因子可与所述CAR表达细胞施用组合递送，例如同时或不久之后。或者，可以在施 用CAR表达细胞后，例如在评估受试者对CAR表达细胞的应答后，在延长的时间段后递送细 胞因子。

[0097] 例如，在一个实施方案中，增强CAR表达细胞活性的活性剂可以是抑制免疫抑制分子的 活性剂。免疫抑制分子的实例包括PD1，PD-L1，CTLA4，TIM3，CEACAM(例如CEACAM-1，CEACAM-3和/或CEACAM-5)，LAG3，VISTA，BTLA，TIGIT，LAIR1，CD160，2B4和TGFRβ。在一个实施方案中，抑制免疫抑制分子的活性剂包含与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例 如本文所述的细胞内信号传导结构域)结合的第一多肽，例如抑制性分子。在一个实施方案 中，该活性剂包含例如免疫抑制分子如PD1，PD-L1，CTLA4，TIM3，CEACAM(例如 CEACAM-1，CEACAM-3和/或CEACAM-5)，LAG3，VISTA，BTLA，TIGIT，LAIR1，CD160， 2B4或TGFRβ，或这些任何一种的片段(例如，这些任何一种的细胞外结构域的至少一部分) 的第一多肽，以及第二多肽，其是在本文中描述的细胞内信号传导结构域(例如，包括共刺 激结构域(例如，41BB，CD27或CD28，例如本文所述)和/或主要信号传导结构域(例如， 本文所述的CD3ζ信号传导结构域)。在一个实施方案中，所述活性剂包含PD1或其片段(例 如，PD1的细胞外结构域的至少一部分)的第一多肽，和本文所述细胞内信号传导结构域的 第二多肽(例如，本文所述的CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3ζ信号传导结构域)。

[0098] 在一个实施方案中，淋巴细胞输注(例如同种异体淋巴细胞输注)用于治疗癌症，其中 淋巴细胞输注包含本文所述的至少一种CD19 CAR表达细胞和任选地至少一种表达针对B细 胞抗原的CAR的细胞。在一个实施方案中，自体淋巴细胞输注用于治疗癌症，其中自体淋巴 细胞输注包含至少一种表达CD19的细胞和任选地至少一种表达针对B细胞抗原的CAR的细 胞。

[0099] 在一个实施方案中，将CAR表达细胞例如T细胞施用于已经接受先前的干细胞移植(例 如自体干细胞移植)的受试者，或接受先前剂量的美法仑的受试者。

[0100] 在一个实施方案中，表达CAR分子，例如本文所述的CAR分子的细胞，与改善与表达CAR 分子的细胞的施用或与细胞抑制剂施用相关的一种或多种副作用的活性剂，例如本文所述的 活性剂组合施用。

[0101] 在一个实施方案中，表达CAR分子，例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞和B细胞抑制 剂与治疗与CD19相关的疾病的另外的活性剂，例如本文所述的另外的活性剂组合施用。

[0102] 在一个实施方案中，表达CAR分子，例如本文所述的CAR分子的细胞以本文所述的

剂量 和/或剂量方案施用。

[0103] 在一个实施方案中，将CAR分子引入T细胞中，例如使用体外转录，并且受试者(例如， 人)接受包含CAR分子的细胞的初始施用，以及包含CAR分子的细胞的一个或多个随后的施 用，其中所述一次或多次随后的施用在先前施用后少于15天，例如14,13,12,11,10,9,8,7,6， 5,4,3,或2天施用。在一个实施方案中，每周多于一次施用包含CAR分子的细胞给受试者(例 如人)，例如每周2,3或4次施用包含CAR分子的细胞。在一个实施方案中，受试者(例如， 人类受试者)每周接受多于一次的包含CAR分子的细胞施用(例如每周2,3或4次施用)(本 文也称为周期)，随后是一周不施用包含CAR分子的细胞，然后向受试者施用包含CAR分子 的细胞的一次或多次额外施用(例如，每周多于一次施用包含CAR分子的细胞)。在另一个 实施方案中，受试者(例如，人受试者)接受多于一个周期的包含CAR分子的细胞，并且每 个周期之间的时间小于10,9,8,7,6,5,4或3天。在一个实施方案中，包含CAR分子的细胞每隔一 天施用，每周施用3次。在一个实施方案中，包含CAR分子的细胞施用至少两周，三周，四周， 五周，六周，七周，八周或更多周。

[0104] 在一个实施方案中，施用本文所述的疗法(例如，CD20 CAR疗法，CD22 CAR疗法或B细胞抑制剂和表达CD19 CAR分子，例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞的组合)作为疾病，例如癌症，例如本文所述的癌症的一线治疗。在另一个实施方案中，施用本文所述的疗法(例如，CD20 CAR疗法，CD22 CAR疗法或B细胞抑制剂和表达CD19 CAR分子，例如本 文所述的CD19 CAR分子的细胞的组合)作为疾病，例如癌症，例如本文所述的癌症的第二， 第三，第四线治疗。

[0105] 在一个实施方案中，施用本文所述的细胞群。在一些实施方案中，细胞群被分离或纯化。

[0106] 在一个实施方案中，该方法包括施用一群细胞，其中多个细胞包含本文所述的CAR分子。 在一些实施方案中，CAR表达细胞的群体包含表达不同CAR的细胞的混合物。例如，在一个 实施方案中，CAR表达细胞的群体可以包括表达具有本文所述的抗CD19结合结构域的CAR 的第一细胞和表达具有不同B细胞抗原结合结构域的CAR的第二细胞。在实施方案中，第一 和第二细胞群体是T细胞。在实施方案中，T细胞的第一和第二群体是相同的同种型，例如是 CD4+T细胞，或者都是CD8+T细胞。在其他实施方案中，T细胞的第一和第二群体是不同的 同种型，例如，第一群体包含CD4+T细胞，第二群体包含CD8+T细胞。在实施方案中，T细胞的第一和第二群体是WO2012/129514中描述的细胞类型，其全部内容通过引用并入本文。作为另一个实例，细胞群体可以包含表达具有本文所述的抗CD19结合结构域的CAR和具有不 同B细胞抗原结合结构域的CAR的单细胞类型。作为另一个实例，细胞群体可以包含表达具 有两个或更多个(例如2,3,4或5个)B细胞抗原结合结构域的CAR的单细胞类型，例如是双特 异性CAR，例如，如本文所述。作为另一个实例，CAR表达细胞的群体可以包括表达CAR的 第一细胞，所述CAR包括抗CD19结合结构域，例如如本文所述，以及表达CAR的第二细胞，所述CAR包含针对除了CD19之外的靶标(例如，CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3， ROR1,CD79b,CD179b,CD79a或间皮素)的抗原结合结构域。在一个实施方案中，CAR表达 细胞的群体包括例如表达包含主要细胞内信号传导结构域的CAR的第一细胞和表达包括次要 信号传导结构域的CAR的第二细胞。在一个实施方案中，CAR表达细胞的群体包括例如表达 包含第一个次要信号传导结构域的CAR的第一细胞和表达CAR的第二细胞，所述CAR包括不 同于

第一次要信号传导结构域的次要信号传导结构域。

[0107] 例如，当第一B细胞抑制剂为CD19 CAR表达细胞，第二B细胞抑制剂为CD10 CAR表达 细胞时，第一CAR和第二CAR可由相同细胞类型或不同类型表达。例如，在一些实施方案中， 表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞，表达CD10 CAR的细胞是CD8+T细胞，或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞，表达CD10 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其它实施方案中，表达 CD19 CAR的细胞是T细胞，表达CD10 CAR的细胞是NK细胞，或表达CD19 CAR的细胞是NK 细胞，并且表达CD10 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中，表达CD19 CAR的细胞和表 达CD10 CAR的细胞都是NK细胞，或者都是T细胞，例如都是CD4+T细胞，或者都是CD8+T 细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和CD10 CAR，并且该细胞是例如NK细 胞或T细胞如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或不同的细胞内 信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结构域，并且CD10 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在一些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域，CD10 CAR包含CD3ζ信 号传导结构域。在其它实施方案中，CD19 CAR和CD10 CAR中的每一个都包含相同类型的主 要信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域，但CD19 CAR和CD10 CAR包含不同的共刺 激结构域，例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，并且CD10 CAR包含不同的共刺激 结构域，例如CD27共刺激结构域，(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构域，CD10 CAR包 含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域(3)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，CD10 CAR包含CD28共刺激结构域，(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构域，CD10 CAR包 含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(5)CD19 CAR包含CD27共刺激结构域， CD10 CAR包含CD28共刺激结构域，或(6)CD19 CAR包含CD28共刺激结构域，CD10 CAR 包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中，细胞包含CAR，其包含CD19抗原结合结构 域和CD10抗原结合结构域，例如双特异性抗体。

[0108] 作为另一个例子，当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞，第二B细胞抑制剂是CD20 CAR表达细胞时，第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如，在一 些实施方案中，表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞，表达CD20 CAR的细胞是CD8+T细胞，或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞，并且表达CD20 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他实 施方案中，表达CD19 CAR的细胞是T细胞，表达CD20 CAR的细胞是NK细胞，或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞，并且表达CD20 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中，表达CD19 CAR的细胞和表达CD20 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞，例如，都是CD4+T细胞，或 者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和CD20 CAR，并且该细胞 是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或 不同的细胞内信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结 构域，并且CD20 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在一 些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域， CD20 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中，CD19 CAR和CD20 CAR中的每一 种包含相同类型的主要信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域，但CD19 CAR和CD20 CAR包含不同的共刺激结构域，例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，并且CD20 CAR 包含不同的共刺激结构域，例如CD27共刺激结构域，(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域，CD20 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域(3)CD19 CAR包含41BB 共刺激结构域，CD20 CAR包含CD28共

刺激结构域，(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构 域，CD20 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(5)CD19 CAR包含 CD27共刺激结构域，CD20 CAR包含CD28共刺激结构域，或(6)CD19 CAR包含CD28共刺 激结构域，CD20 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中，细胞包含CAR，其包 含CD19抗原结合结构域和CD20抗原结合结构域，例如双特异性抗体。

[0109] 作为另一个例子，当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞，第二B细胞抑制剂是CD22 CAR表达细胞时，第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如，在一 些实施方案中，表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞，表达CD22 CAR的细胞是CD8+T细胞，或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞，并且表达CD22 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他实 施方案中，表达CD19 CAR的细胞是T细胞，表达CD22 CAR的细胞是NK细胞，或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞，并且表达CD22 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中，表达CD19 CAR的细胞和表达CD22 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞，例如，都是CD4+T细胞，或 者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和CD22 CAR，并且该细胞 是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或 不同的细胞内信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结 构域，并且CD22 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在一 些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域， CD22 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中，CD19 CAR和CD22 CAR中的每一 个包含相同类型的主要信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域，但CD19 CAR和CD22 CAR包含不同的共刺激结构域，例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，并且CD22 CAR 包含不同的共刺激结构域，例如CD27共刺激结构域，(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域，CD22 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(3)CD19 CAR包含41BB 共刺激结构域，CD22 CAR包含CD28共刺激结构域，(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构 域，CD22 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(5)CD19 CAR包含 CD27共刺激结构域，CD22 CAR包含CD28共刺激结构域，或(6)CD19 CAR包含CD28共刺 激结构域，CD22 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中，细胞包含CAR，其包 含CD19抗原结合结构域和CD22抗原结合结构域，例如双特异性抗体。

[0110] 作为另一个例子，当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞，第二B细胞抑制剂是CD34 CAR表达细胞时，第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如，在一 些实施方案中，表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞，表达CD34 CAR的细胞是CD8+T细胞，或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞，并且表达CD34 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他实 施方案中，表达CD19 CAR的细胞是T细胞，表达CD34 CAR的细胞是NK细胞，或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞，并且表达CD34 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中，表达CD19 CAR的细胞和表达CD34 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞，例如，都是CD4+T细胞，或 者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和CD34 CAR，并且该细胞 是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或 不同的细胞内信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结 构域，并且CD34 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在一 些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域， CD34 CAR包含CD3ζ信号传

导结构域。在其它实施方案中,CD19 CAR和CD34 CAR中的每一 个包含相同类型的主要信号传导结构域,例如CD3ζ信号传导结构域,但CD19 CAR和CD34 CAR包含不同的共刺激结构域,例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域,并且CD34 CAR 包含不同的共刺激结构域,例如CD27共刺激结构域,(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域,CD34 CAR包含不同的共刺激结构域,例如41BB共刺激结构域,(3)CD19 CAR包含41BB 共刺激结构域,CD34 CAR包含CD28共刺激结构域,(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构 域,CD34 CAR包含不同的共刺激结构域,例如41BB共刺激结构域,(5)CD19 CAR包含 CD27共刺激结构域,CD34 CAR包含CD28共刺激结构域,或(6)CD19 CAR包含CD28共刺 激结构域,CD34 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中,细胞包含CAR,其包 含CD19抗原结合结构域和CD34抗原结合结构域,例如双特异性抗体。

[0111] 作为另一个例子,当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞,第二B细胞抑制剂是CD123 CAR表达细胞时,第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如,在一 些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞,表达CD123 CAR的细胞是CD8+T细胞, 或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞,并且表达CD123 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是T细胞,表达CD123 CAR的细胞是NK细胞,或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞,并且表达CD123 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞和表达CD123 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞,例如,都是CD4+T细胞,或 者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中,单个细胞表达CD19 CAR和CD123 CAR,并且该细 胞是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同 或不同的细胞内信号传导结构域。例如,在一些实施方案中,CD19 CAR包含CD3ζ信号传导 结构域,并且CD123 CAR包含共刺激结构域,例如41BB,CD27或CD28共刺激结构域,而在 一些实施方案中,CD19 CAR包含共刺激结构域,例如,41BB,CD27或CD28共刺激结构域, CD123 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中,CD19 CAR和CD123 CAR中的每 一种包含相同类型的主要信号传导结构域,例如CD3ζ信号传导结构域,但CD19 CAR和CD123 CAR包含不同的共刺激结构域,例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域,并且CD123 CAR 包含不同的共刺激结构域,例如CD27共刺激结构域,(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域,CD123 CAR包含不同的共刺激结构域,例如41BB共刺激结构域,(3)CD19 CAR包含 41BB共刺激结构域,CD123 CAR包含CD28共刺激结构域,(4)CD19 CAR包含CD28共刺激 结构域,CD123 CAR包含不同的共刺激结构域,例如41BB共刺激结构域,(5)CD19 CAR 包含CD27共刺激结构域,CD123 CAR包含CD28共刺激结构域,或(6)CD19 CAR包含CD28 共刺激结构域,CD123 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中,细胞包含CAR, 其包含CD19抗原结合结构域和CD123抗原结合结构域,例如双特异性抗体。

[0112] 作为另一个例子,当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞,第二B细胞抑制剂是FLT-3 CAR表达细胞时,第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如,在一 些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞,表达FLT-3 CAR的细胞是CD8+T细胞, 或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞,并且表达FLT-3 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是T细胞,表达FLT-3 CAR的细胞是NK细胞,或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞,并且表达FLT-3 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞和表达FLT-3 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞,例如,都是CD4+T细胞,或 者

都是CD8+T细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和FLT-3 CAR，并且该细 胞是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同 或不同的细胞内信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导 结构域，并且FLT-3 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在 一些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域，FLT-3 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中，CD19 CAR和FLT-3 CAR中的每 一种包含相同类型的主要信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域，但CD19 CAR和FLT-3 CAR包含不同的共刺激结构域，例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，并且FLT-3 CAR 包含不同的共刺激结构域，例如CD27共刺激结构域，(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域，FLT-3 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(3)CD19 CAR包含41BB 共刺激结构域，FLT-3 CAR包含CD28共刺激结构域，(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构 域，FLT-3 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(5)CD19 CAR包含 CD27共刺激结构域，FLT-3 CAR包含CD28共刺激结构域，或(6)CD19 CAR包含CD28共刺 激结构域，FLT-3 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中，细胞包含CAR，其包 含CD19抗原结合结构域和FLT-3抗原结合结构域，例如双特异性抗体。

[0113] 作为另一个例子，当第一B细胞抑制剂是CD19 CAR表达细胞，第二B细胞抑制剂是ROR1 CAR表达细胞时，第一CAR和第二CAR可以由相同的细胞类型或不同类型表达。例如，在一 些实施方案中，表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞，表达ROR1 CAR的细胞是CD8+T细胞，或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞，并且表达ROR1 CAR的细胞是CD4+T细胞。在其他 实施方案中，表达CD19 CAR的细胞是T细胞，表达ROR1 CAR的细胞是NK细胞，或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞，并且表达ROR1 CAR的细胞是T细胞。在其他实施方案中，表达CD19 CAR的细胞和表达ROR1 CAR的细胞都是NK细胞或都是T细胞，例如，都是CD4+T细胞，或 者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中，单个细胞表达CD19 CAR和ROR1 CAR，并且该细胞 是例如NK细胞或T细胞例如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或 不同的细胞内信号传导结构域。例如，在一些实施方案中，CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结 构域，并且ROR1 CAR包含共刺激结构域，例如41BB，CD27或CD28共刺激结构域，而在一 些实施方案中，CD19 CAR包含共刺激结构域，例如，41BB，CD27或CD28共刺激结构域， ROR1 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中，CD19 CAR和ROR1 CAR中的每 一种包含相同类型的主要信号传导结构域，例如CD3ζ信号传导结构域，但CD19 CAR和ROR1 CAR包含不同的共刺激结构域，例如(1)CD19 CAR包含41BB共刺激结构域，并且ROR1 CAR 包含不同的共刺激结构域，例如CD27共刺激结构域，(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构 域，ROR1 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(3)CD19 CAR包含41BB 共刺激结构域，ROR1 CAR包含CD28共刺激结构域，(4)CD19 CAR包含CD28共刺激结构 域，ROR1 CAR包含不同的共刺激结构域，例如41BB共刺激结构域，(5)CD19 CAR包含 CD27共刺激结构域，ROR1 CAR包含CD28共刺激结构域，或(6)CD19 CAR包含CD28共刺 激结构域，ROR1 CAR包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中，细胞包含CAR，其包 含CD19抗原结合结构域和ROR1抗原结合结构域，例如双特异性抗体。

[0114] 更一般地，当第一B细胞抑制剂包含CD19 CAR并且存在第二B细胞抑制剂，例如包含第 二CAR的第二B细胞抑制剂时，第一CAR和第二B细胞抑制剂可以由相同的细胞类型或

不同种 类表达。例如,在一些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是CD4+T细胞,并且表达第二B细 胞抑制剂的细胞是CD8+T细胞,或表达CD19 CAR的细胞是CD8+T细胞,并且表达第二B细胞 抑制剂的细胞是CD4+T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞是T细胞,表达第二 B细胞抑制剂的细胞是NK细胞,或表达CD19 CAR的细胞是NK细胞,并且表达第二B细胞抑 制剂的细胞是T细胞。在其他实施方案中,表达CD19 CAR的细胞和表达第二B细胞抑制剂的 细胞都是NK细胞,或者都是T细胞,例如都是CD4+T细胞,或者都是CD8+T细胞。在其它实施方案中,单个细胞表达CD19 CAR和第二B细胞抑制剂,并且该细胞是例如NK细胞或T细胞如CD4+T细胞或CD8+T细胞。第一CAR和第二CAR可以包含相同或不同的细胞内信号传导结构域。例如,在一些实施方案中,CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结构域和第二B细胞抑制剂(或CAR),包含共刺激结构域,例如41BB,CD27或CD28共刺激结构域,而在一些实施方 案中,CD19 CAR包含共刺激结构域,例如41BB,CD27或CD28共刺激结构域和第二B细胞抑 制剂(或第二CAR)包含CD3ζ信号传导结构域。在其它实施方案中,CD19 CAR和第二B细 胞抑制剂(或第二CAR)中的每一个包含相同类型的主要信号传导结构域,例如CD3ζ信号传 导结构域,但CD19 CAR和第二B细胞抑制剂包含不同的共刺激结构域,例如(1)CD19 CAR 包含41BB共刺激结构域和第二B细胞抑制剂(或第二CAR)包含不同的共刺激结构域,例如 CD27共刺激结构域,(2)CD19 CAR包含CD27共刺激结构域和第二B细胞抑制剂(或第二 CAR)包含不同的共刺激结构域,例如41BB共刺激结构域,(3)CD19 CAR包含41BB共刺 激结构域和第二B细胞抑制剂(或第二CAR)包括CD28共刺激结构域,(4)CD19 CAR包含 CD28共刺激结构域,第二B细胞抑制剂(或第二CAR)包含不同的共刺激结构域,例如41BB 共刺激结构域,(5)CD19 CAR包含CD27共刺激结构域和第二B细胞抑制剂(或第二CAR) 包含CD28共刺激结构域,或(6)CD19 CAR包含CD28共刺激结构域和第二B细胞抑制剂(或 第二CAR)包含CD27共刺激结构域。在另一个实施方案中,细胞包含CAR,该CAR包含CD19 抗原结合结构域和针对第二抗原的抗原结合结构域,例如双特异性抗体。

[0115] 在一个实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中, 4-1BB共刺激结构域包含氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的至少一个,两个 或三个修饰(例如,取代)但是不超过20,10或5个修饰(例如,取代)或与SEQ ID NO:16 的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,4-1BB共刺激结构域由SEQ ID NO:60的核酸序列或其95-99%同一性的序列编码。

[0116] 在一个实施方案中,CD27共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中, CD27共刺激结构域包含氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的至少一个,两个 或三个修饰(例如,取代)但是不超过20,10或5个修饰(例如,取代)或与SEQ ID NO:16 的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD27共刺激结构域由SEQ ID NO:17的核酸序列或其95-99%同一性的序列编码。

[0117] 在一个实施方案中,CD28共刺激结构域包含SEQ ID NO:1317的序列。在一个实施方案 中,CD28共刺激结构域包含氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:1317的氨基酸序列的至少一个, 两个或三个修饰(例如,取代)但是不超过20,10或5个修饰(例如,取代)或与SEQ ID NO:1317 的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:1318的核酸序列或其95-99%同一性的序列编码。

[0118] 在一个实施方案中,野生型ICOS共刺激结构域包含SEQ ID NO:1319的序列。在一

个实 施方案中,野生型ICOS共刺激结构域包含氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:1319的氨基酸序 列的至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但是不超过20,10或5个修饰(例如,取代) 或与SEQ ID NO:1319的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,野生型 ICOS共刺激结构域由SEQ ID NO:1320的核酸序列或其95-99%同一性的序列编码。

[0119] 在一个实施方案中,Y至F突变体ICOS共刺激结构域包含SEQ ID NO:1321的序列。在 一个实施方案中,Y至F突变体ICOS共刺激结构域包含氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:1321 的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如,取代)但是不超过20,10或5个修饰(例 如,取代)或与SEQ ID NO:1321的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案 中,Y至F突变体ICOS共刺激结构域由与SEQ ID NO:1320(其中SEQ ID NO:1320编码野生型ICOS)的核酸序列具有95-99%同一性的核酸序列编码。

[0120] 在实施方案中,主要信号传导结构域包含CD3ζ的功能性信号传导结构域。在实施方案 中,CD3ζ的功能性信号传导结构域包含SEQ ID NO:17(突变体CD3ζ)或SEQ ID NO:43(野 生型人CD3ζ)。

[0121] 在一个实施方案中,该方法包括施用细胞群体,其中群体中的至少一个细胞表达CAR, 例如具有本文所述的抗CD19结构域的CAR,和增强CAR表达细胞活性的活性剂,例如,表达 增强CAR表达细胞活性的活性剂的第二细胞。例如,在一个实施方案中,所述活性剂可以是 抑制免疫抑制分子的活性剂。免疫抑制分子的实例包括PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,CEACAM (例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFRβ。在一个实施方案中,抑制免疫抑制分子的活性剂包含第一多肽,例如抑制性分子,其结合向细胞提供阳性信号的第二多肽,例如本文所述的细胞内信号传导结构 域。在一个实施方案中,该活性剂包含第一多肽,例如抑制性分子如PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3, CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4或TGFRβ或这些的任何一种的片段(例如,这些的任何一种的至少一部分细胞外结构域)的第一多肽和第二多肽,所述第二多肽是在本文中所述的细胞内信号传导结 构域(例如,包括共刺激结构域(例如,41BB,CD27或CD28,例如本文所述)和/或主要信号传导结构域(例如,本文所述的CD3ζ信号传导结构域)。在一个实施方案中,所述活性剂包含PD1或其片段(例如,PD1的细胞外结构域的至少一部分)的第一多肽和本文所述细胞内信号传导结构域的第二多肽(例如本文所述的CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3ζ信 号传导结构域)。

[0122] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,FLT-3或ROR1中的一种或多种的抑制剂。在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含有效数目的一种或多种细胞,所述细胞表达结合CD10,CD20,CD22,CD34,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的 一种或多种的CAR分子。在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD123 CAR。在一个实施方 案中,B细胞抑制剂包含表达结合CD123的CAR分子的一种或多种细胞。在一个实施方案中, 该疾病是CD19阴性癌症,例如CD19阴性复发性癌症。在一个实施方案中,CD19 CAR表达细 胞与一种或多种B细胞抑制剂同时施用,之前或之后施用。

[0123] 在一个实施方案中,所述方法还包括施用CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞。在 一个实施方案中,CD19抑制剂包含CD19 CAR,B细胞抑制剂包含CD123 CAR。在一个实施方案中,CD19 CAR或CD123 CAR包含分裂的细胞内信号传导结构域,使得与CD19 CAR和

CD123 CAR结合到表达CD19或CD123之一的靶细胞(例如,造血干细胞)时的活化相比,当CD19 CAR和CD123 CAR两者都结合到靶细胞,例如靶CD19+CD123+细胞(例如,B-ALL胚 细胞)时,发生细胞例如免疫效应细胞群的完全活化。在一个实施方案中,CD123 CAR包含 4-1BB信号传导结构域,CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。在一个实施方案中,CD123 CAR包含共刺激结构域,例如4-1BB信号传导结构域,并且CD19 CAR包含主要信号传导结构域,例如CD3ζ信号传导结构域。在一个实施方案中,CD123 CAR包含主要信号传导结构域,例如CD3ζ信号传导结构域,并且CD19 CAR包含共刺激结构域,例如4-1BB信号传导结构域。在 一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CAR(例如,针对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的CAR),其包含共刺激结构域,CD19 CAR包括主要信号 传导结构域。在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CAR(例如,针对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的CAR),其包含主要信号传导结构域,CD19 CAR包括共刺激结构域。在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含表达结合CD123的CAR分子 的一种或多种细胞,并且其中与B细胞抑制剂同时施用CD19 CAR表达细胞。在一个实施方案 中,CD123 CAR包含4-1BB信号传导结构域,CD19 CAR包含CD3ζ信号传导结构域。

[0124] 在一个实施方案中,该方法还包括将细胞例如造血干细胞或骨髓移植到哺乳动物中。

[0125] 另一方面,本发明涉及一种表达本文所述的CAR分子,例如CD19 CAR分子的细胞,与B 细胞抑制剂,例如本文所述的B细胞抑制剂组合用作药物。另一方面,本发明涉及本文所述的B 细胞抑制剂与本文所述的表达CAR分子例如CD19 CAR分子的细胞组合用作药物。

[0126] 另一方面,本发明涉及一种表达本文所述的CAR分子,例如,CD19 CAR分子的细胞,与B细胞抑制剂,例如本文所述的B细胞抑制剂组合使用,用于治疗表达CD19的疾病。另一方面,本发明涉及本文所述的B细胞抑制剂与表达本文所述的CAR分子例如CD19 CAR分子的细胞组合用于治疗表达CD19的疾病。另一方面,本发明涉及一种表达本文所述的CAR分子,例如CD19 CAR分子的细胞,与B细胞抑制剂,例如本文所述的B细胞抑制剂组合使用,用于治疗癌症,例如本文所述的癌症。

[0127] 在一个实施方案中,该方法包括施用细胞群体,其中群体中的至少一个细胞表达本文的 疗法(例如,CD20 CAR,CD22 CAR或具有本文所述的抗CD19结构域的CAR与B细胞抑制 剂组合)和增强CAR表达细胞活性的活性剂,其中所述活性剂是细胞因子,例如IL-7,IL-15, IL-21或其组合。所述细胞因子可与CAR表达细胞的施用例如同时或不久之后组合递送。或者, 可以在施用CAR表达细胞后,例如在评估受试者对CAR表达细胞的应答后,在延长的时间段 后递送细胞因子。还提供了用于使用的相关组合物和制备药物的方法。

[0128] 在一个实施方案中,本文所述的细胞(例如,表达CD20 CAR分子的细胞,表达CD22 CAR 分子的细胞,或表达CD19 CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞,与B细胞抑制 剂组合)与增加表达CAR分子的细胞或抑制剂之一的功效的活性剂(例如本文所述的活性剂) 组合施用。

[0129] 在一个实施方案中,本文所述的细胞(例如,表达CD20 CAR分子的细胞,表达CD22 CAR 分子的细胞或表达CD19 CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞与B细胞抑制剂的 组合)与改善与表达CAR分子的细胞或抑制剂之一的施用相关的一种或多种副作用的活性剂 (例如本文所述的活性剂)组合施用。

[0130] 在一个实施方案中,表达CD19 CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞与B细胞 抑制剂和治疗霍奇金淋巴瘤的活性剂(例如本文所述的活性剂)组合施用。

[0131] 在一些方面,本公开提供了一种治疗作为CD19抑制剂(例如CD19 CAR疗法)的非应答 者,部分应答者或复发者的患者的方法,包括向患者施用B细胞抑制剂,例如,如本文所述 的B细胞抑制剂,例如,CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的一种或多种(例如2,3,4,5,6,7,8,9或全部)的抑制剂。在实施方案中,B细胞抑制剂是 CAR表达细胞(例如,T细胞或NK细胞),其是CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1的一种或多种(例如2,3,4,5,6或全部)的抑制剂。在实施方案中,患者具有或被鉴定为具有CD19阴性癌细胞和对于CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b, CD179b,或CD79a一种或多种(例如,2,3,4,5,6,7,8,9,或全部)阳性的癌细胞。在实施方 案中,该方法还包括对患者施用癌细胞对其为阳性的B细胞抑制剂,例如,癌细胞对其为阳 性的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a一种或多种 (例如,2,3,4,5,6,7,8,9,或全部)的抑制剂。在实施方案中,该方法还包括确定患者是否 包含CD19阴性癌细胞的步骤中的一个或两个,以及确定患者是否包含对于CD10,CD20,CD22, CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的一种或多种(例如,2,3,4,5,6,7,8, 9,或全部)阳性的癌细胞。在实施方案中,受试者具有或被鉴定为具有测试对CD19表达阴性 的肿瘤或癌细胞群体,如通过结合抗CD19抗体(例如,与表2或表3中任何CAR分子具有相同 特异性的抗体)测量的。

[0132] 另一方面,本发明的特征在于组合物,其包含表达结合CD19的嵌合抗原受体(CAR)分 子的细胞与B细胞抑制剂组合,所述B细胞抑制剂例如选自CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a,或其组合。CAR表达细胞和B细胞抑制剂可 以单剂型存在,或以两种或更多种剂型存在。

[0133] 在一个实施方案中,组合物是药学上可接受的组合物。

[0134] 在实施方案中,本文公开的组合物(例如,核酸,载体或细胞)用作药物。

[0135] 在实施方案中,本文公开的组合物用于治疗与B细胞抗原(例如CD19)表达相关的疾病, 例如B细胞白血病或淋巴瘤。

[0136] CD19抑制剂

[0137] 在实施方案中,CD19抑制剂是小分子,抗体,抗体片段或细胞疗法。

[0138] 在一些实施方案中,CD19抑制剂(例如,细胞疗法或抗体)与B细胞抑制剂组合施用或 与B细胞抑制剂一起存在于组合物中,所述B细胞抑制剂为例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的一种或多种抑制剂。

[0139] 在一个实施方案中,细胞表达包含抗CD19结合结构域(例如,特异性结合CD19的鼠或 人源化抗体或抗体片段),跨膜结构域和细胞内信号传导结构域(例如,包含共刺激结构域 和/或主要信号传导结构域的细胞内信号传导结构域)的CAR分子。在一个实施方案中,CAR 包含抗体或抗体片段,其包含本文所述的抗-CD19结合结构域(例如,与本文所述CD19特异 性结合的鼠或人源化抗体或抗体片段),本文所述的跨膜结构域,以及本文描述的细胞内信 号传导结构域(例如,包含本文所述的共刺激结构域和/或主要信号传导结构域的细胞内传导 结构域)。

[0140] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗CD19结合结构域,其包含本文描述的抗CD19结

合 结构域的一个或多个(例如全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)和本文描述的抗CD19结合结构域的一个或多个(例 如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR以及一个或多个,例如全 部三个HC CDR的抗CD19结合结构域。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域包含本文所 述的抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重 链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如抗CD19结合结构域具 有两个可变重链区,每个包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案 中,抗CD19结合结构域包含本文所述的鼠轻链可变区(例如,在表3中)和/或本文所述的鼠 重链可变区(例如,在表3中)。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域是包含表3的氨基酸 序列的鼠轻链和鼠重链的scFv。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域(例如scFv)包含: 轻链可变区,其包含具有表3中提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰 (例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表3的氨基酸序列 具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表3中提供的重链可变区的氨基酸序 列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨 基酸序列或与表3的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域包含SEQ ID NO:59的序列或其具有95-99%的同一性的序列。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域是scFv,并且例如在表3中的包含本文所述的氨基酸序列的轻链可变区通过 接头,例如本文所述的接头连接到例如在表3中的包含本文所述的氨基酸序列的重链可变区。 在一个实施方案中,抗CD19结合结构域包括$(Gly_4\text{-}Ser)_n$接头,其中n为1,2,3,4,5或6,例如3或4 (SEQ ID NO:53)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以下取向中的任一个:轻链可 变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0141] 在一个实施方案中,CAR分子包含人源化抗CD19结合结构域,其包含本文描述的人源化 抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互 补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)和本文所述的人源化抗-CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和 一个或多个,例如,所有三个HC CDR的人源化抗CD19结合结构域。在一个实施方案中,人 源化抗CD19结合结构域至少包含HC CDR2。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域 包含本文所述的人源化抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1 (HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,人 源化抗CD19结合结构域具有两个可变重链区,每个可变重链区包含本文所述的HC CDR1, HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域至少包含HC CDR2。 在一个实施方案中,轻链可变区包含VK3_L25种系序列的一个,两个,三个或全部四个构架 区。在一个实施方案中,轻链可变区具有修饰(例如,取代,例如,在SEQ ID NO:58的鼠轻 链可变区的相应位置中发现的一个或多个氨基酸的取代,例如在位置71和87的一个或多个位 置的取代)。在一个实施方案中,重链可变区包含VH4_4-59种系序列的一个,两个,三个或 全部四个构架区。在一个实施方案中,重链可变区具有修饰(例如,取代,例如,在SEQ ID NO:58的鼠重链可变区的相应位置中发现的一个或多个氨基酸的取代,例如在位置71,73和78 中的一个

或多个位置的取代)。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含本文所述 的轻链可变区(例如,在表2中)和/或本文所述的重链可变区(例如,在表2中)。在一个实 施方案中,人源化抗CD19结合结构域是包含表2的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个 实施方案中,人源化抗CD19结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表2中 提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或 10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表2的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表2中提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修 饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表2的氨基酸序 列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列,或其具 有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域是scFv,并且包含例 如在表2中本文所述的氨基酸序列的轻链可变区通过接头,例如本文所述的接头连接到包含例 如,在表2中本文所述的氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合 结构域包括(Gly_4-Ser)n接头,其中n为1,2,3,4,5或6,例如3或4(SEQ ID NO:53)。scFv的轻链 可变区和重链可变区可以是例如以下取向中的任一个:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可 变区-接头-轻链可变区。

[0142] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗CD19结合结构域,其包括表4和5的构建体,例如 murine_CART19,humanized_CART19 a,humanized_CART19 b,或humanized_CART19 c的一 个或多个(例如,2,3,4,5或6)个LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2和 HC CDR3。

[0143] 在一个实施方案中,CAR分子包含前导序列,例如本文所述的前导序列,例如SEQ ID NO:13的前导序列,或其具有95-99%同一性的序列;本文描述的抗CD19结合结构域,例如包 含本文所述的LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3的抗CD19 结合结构域,例如表3中描述的鼠抗CD19结合结构域,表2中描述的人源化抗-CD19结合结构域,或其具有95-99%同一性的序列;铰链区,例如本文所述的铰链区,例如SEQ ID NO:14的铰链区或其具有95-99%同一性的铰链区;跨膜结构域,例如本文所述的跨膜结构域,例如具有 SEQ ID NO:15的序列或其具有95-99%同一性的序列的跨膜结构域;细胞内信号传导结构域, 例如本文所述的细胞内信号传导结构域(例如,包含共刺激结构域和/或主要信号传导结构域 的细胞内信号传导结构域)。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域, 例如本文所述的共刺激结构域,例如具有SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的序列或其具有 95-99%同一性的4-1BB共刺激结构域,和/或主要信号传导结构域,例如本文所述的主要信号 传导结构域,例如具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列或其具有95-99%同一性的序列的 CD3ζ-刺激结构域。

[0144] 在一个实施方案中,CAR分子包含(例如,组成为)SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35,SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42的氨基酸序列,或 SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:40,

SEQ ID NO:41 或SEQ ID NO:42的氨基酸序列的具有至少一个,二个,三个,四个,五个,10个,15个, 20个或30个修饰(例如取代)但不超过60,50或40个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与 SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 或SEQ ID NO:42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。

[0145] 本发明一般在一些方面涉及被工程化以表达CAR的细胞,例如T细胞或天然杀伤(NK) 细胞与一种或多种B细胞抑制剂组合用于治疗与分化抗原簇19蛋白(CD19)表达相关的疾病 的用途。在一些实施方案中,B细胞抑制剂是CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123, FLT-3, ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抑制剂。

[0146] 在一些实施方案中,CD19抑制剂包含抗体分子,例如具有本文所述的CD19结合序列的 抗体分子。例如,抗体分子可以包含如表2,3,4和5中任一个所述的CDR或VH和VL,或与其同 源的序列,例如与其具有95-99%同一性的序列。抗体分子可以包含具有本节例如在CAR的上 下文中所述序列的CD19结合区域。

[0147] 在实施方案中,B细胞抑制剂选自与一种或多种B细胞抗原(例如,CD10,CD19, CD20, CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种)结合的抑制性 核酸,可溶性配体,抗体或其抗原结合片段,CAR或表达CAR的细胞。

[0148] CD20结合结构域和抑制剂

[0149] 在一些方面,本公开提供了CD20抑制剂或结合结构域,例如本文所述的CD20抑制剂或 结合结构域。本公开还提供了编码CD20结合结构域的核酸,例如编码包含CD20结合结构域 的CAR的核酸。组合物还可以包含第二活性剂,例如抗CD19 CAR表达细胞或CD19结合结构 域。活性剂可以是例如由单个核酸或不同核酸编码的。

[0150] 在一些方面,作为单一疗法施用CD20抑制剂或结合结构域。在一些方面,CD20抑制剂 或结合结构域与第二活性剂如抗CD19 CAR表达细胞组合施用。

[0151] CD20抑制剂可以是例如小分子,抗体或其抗原结合片段,CAR或CAR表达细胞。在一个 实施方案中,CD20抑制剂是抗CD20抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体是单特异性抗 体,在另一个实施方案中,抗体是双特异性抗体。在一个实施方案中,CD20抑制剂是嵌合小 鼠/人单克隆抗体,例如利妥昔单抗。在一个实施方案中,CD20抑制剂是人单克隆抗体,例 如奥法木单抗(ofatumumab)。在一个实施方案中,CD20抑制剂是人源化抗体,例如奥瑞珠 单抗,veltuzumab,obinutuzumab,ocaratuzumab或PRO131921(Genentech)。在一个实施方 案中,CD20抑制剂是包含部分抗CD20抗体的融合蛋白,如TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)。

[0152] 在一个实施方案中,CD20抑制剂是抗CD20表达细胞,例如CD20 CART或表达CD20的NK细胞。

[0153] 在一些实施方案中,CD20-CAR包含任选的前导序列(例如,本文所述的任选的前导序 列),细胞外抗原结合结构域,铰链(例如本文所述的铰链),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如,本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个实施方案中,示例性CD20 CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细 胞外抗原结合结构域,铰链,跨膜结构域,细胞内共刺激结构域(例如,本文所述的细胞内 共

刺激结构域)和细胞内刺激结构域。

[0154] 在一个实施方案中,CD20结合结构域包含本文所述的CD20结合结构域的一个或多个(例 如全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决 定区3(LC CDR3)和/或本文所述的CD20结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互 补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3), 例如,包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个,例如全部三个HC CDR的CD20 结合结构域。这些CDR可以是例如表12A,12B和/或表13的那些CDR。在一个实施方案中, CD20结合结构域包含本文所述的CD20结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补 决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3), 例如CD20结合结构域具有两个可变重链区,每个包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,CD20结合结构域包含本文所述的轻链可变区(例如表15A或15B 中)和/或本文所述的重链可变区(例如表14A或14B中)。在一个实施方案中,CD20结合结 构域包含本文所述的重链可变区(例如,在表14A或14B中),例如本文所述的至少两个重链 可变区(例如,在表14A或14B中)。在一个实施方案中,CD20结合结构域是包含表14A或14B 或15A或15B的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD20结合结构域(例 如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表15A或15B中提供的轻链可变区的氨基酸序列的至 少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰的氨基酸序列或与表15A或 15B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表14A或14B中提 供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10 个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表14A或14B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序 列。CD20结合结构域可以是例如抗体分子或CAR分子的一部分。

[0155] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗CD20结合结构域,其包括表12A,12B和/或13的构 建体的一个或多个(例如,2,3,4,5或6个)LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2, 和HC CDR3,例如CAR20-1,CAR20-2,CAR20-3,CAR20-4,CAR20-5,CAR20-6,CAR20-7, CAR20-8,CAR20-9,CAR20-10,CAR20-11,CAR20-12,CAR20-13,CAR20-14,CAR20-15,或 CAR20-16。

[0156] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗-CD22结合结构域,其包括表14A或14B和15A或15B 构建体的VL和/或VH,例如CAR20-1,CAR20-2,CAR20-3,CAR20-4,CAR20-5,CAR20-6, CAR20-7,CAR20-8,CAR20-9,CAR20-10,CAR20-11,CAR20-12,CAR20-13,CAR20-14, CAR20-15或CAR20-16。

[0157] CD20 scFv之前可以是例如SEQ ID NO:13中提供的任选的前导序列,然后是例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提供的任选的铰链序列,如SEQ ID NO:15中提供的跨膜区,包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞内信号传导结构域和包 含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的CD3ζ序列,例如,其中所述结构域相邻并且在相同阅读 框中以形成单个融合蛋白。

[0158] 另外的实施方案包括编码表11A-15B中任一个的多肽的核苷酸序列。其他实施方案包括 编码表11A-15B中任一个的多肽,以及SEQ ID NO:13,14,15,16,17和任选地51的每一个的核 苷酸序列。

[0159] 在一个实施方案中,CD20结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征

或特 性。例如,在一个实施方案中,包含抗原结合结构域的本发明的CAR组合物的部分特异性结 合人CD20或其片段。

[0160] 在一个实施方案中,CD20结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个实施 方案中,CD20结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野生型 或增强的亲和力结合CD20蛋白或其片段。在某些情况下,人类scFv可以来源于展示文库。

[0161] 在一个实施方案中,CD20结合结构域,例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋 予CART20构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,CD20结合结构域例如scFv包含至少 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个突变,其例如从人源化过程产生,使得突变的scFv赋予CART20构建体提 高的稳定性。

[0162] 在一些实施方案中,CD20抑制剂包含抗体分子,例如具有本文所述的CD20结合序列的 抗体分子。例如,抗体分子可以包含如表11A-15B中任一个所述的CDR或VH和VL,或与其同 源的序列,例如与其具有95-99%同一性的序列。抗体分子可以包含具有本节,例如在CAR的 上下文中所述序列的CD20结合区域。

[0163] 一方面,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD20 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD20 CAR的第二细胞。

[0164] 在一些方面,本文所述的结合结构域或抗体分子与针对CD20的第二抗体分子结合相同 (或基本相同)或重叠(或基本上重叠的)的表位,其中第二抗体分子是本文所述的抗体分 子,例如,选自表11A-15B的抗体分子。在一些实施方案中,本文所述的结合结构域或抗体 分子与针对CD20的第二抗体分子竞争结合和/或结合相同(或基本相同)或重叠(或基本上 重叠的)的表位,其中所述第二抗体分子是本文所述的抗体分子,例如选自表11A-15B中的 抗体分子,例如,通过实施例25中所述的方法测定。在一些实施方案中,双互补位CD20结 合结构域结合第一表位,例如选自表11A-15B的抗体分子结合的表位,并且双互补位结合结 构域还结合第二表位,例如由选自表11A-15B的抗体分子结合的第二表位。在一些方面,本 公开提供了一种治疗方法,其包括施用结合第一表位(例如由选自表11A-15B的抗体分子结 合的表位)的第一CD20结合结构域,和结合第二表位(例如由选自表11A-15B的抗体分子 结合的第二表位)的第二CD20结合结构域。在一些实施方案中,CD20结合结构域是CAR分子的一部分,例如由表达CAR的细胞表达。

[0165] CD22结合结构域和抑制剂

[0166] 在一些方面,本公开提供了CD22抑制剂或结合结构域,例如本文所述的CD22抑制剂或 结合结构域。本公开还提供了编码CD22结合结构域的核酸,例如编码包含CD22结合结构域 的CAR的核酸。组合物还可以包含第二活性剂,例如抗CD19 CAR表达细胞或CD19结合结构 域。活性剂可以是例如由单个核酸或不同核酸编码的。

[0167] 在一些方面,作为单一疗法施用CD22抑制剂或结合结构域。在一些方面,CD22抑制剂 或结合结构域与第二活性剂如抗CD19 CAR表达细胞组合施用。

[0168] CD22抑制剂可以是例如小分子,抗体或其抗原结合片段,CAR或CAR表达细胞。在一个 实施方案中,CD22抑制剂是抗CD22抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体是单特异性

抗 体,在另一个实施方案中,抗体是双特异性抗体。在一个实施方案中,抗体是单特异性抗体, 任选地缀合至第二活性剂例如化学治疗剂。例如,在一个实施方案中,抗体是抗CD22单克隆 抗体-MMAE缀合物(例如DCDT2980S)。在一个实施方案中,抗体是抗CD22抗体的scFv,例如抗体RFB4的scFv。该scFv可以与假单胞菌外毒素-A(例如BL22)的全部或片段融合。在一个实施方案中,抗体是人源化抗CD22单克隆抗体(例如,依帕珠单抗)。在一个实施方案中,抗体或其片段包含抗CD22抗体的Fv部分,其任选地共价融合到假单胞菌外毒素-A(例如, moxetumomab pasudotox)的全部或片段(例如,38KDa片段)。在一个实施方案中,抗CD22 抗体是抗CD19/CD22双特异性抗体,任选地与毒素缀合。例如,在一个实施方案中,抗-CD22 抗体包含任选地连接到白喉毒素(DT)的全部或部分的抗CD19/CD22双特异性部分(例如, 两个scFv配体,识别人CD19和CD22),例如,白喉毒素(DT)的前389个氨基酸,DT 390,例如配体导向的毒素如DT2219ARL)。在另一个实施方案中,双特异性部分(例如抗CD19/抗-CD22)与毒素例如去糖基化的蓖麻毒蛋白A链(例如,Combotox)连接。

[0169] 在一个实施方案中,CD22抑制剂是抗CD22表达细胞,例如CD22 CART或表达CD22的NK细胞。

[0170] 一方面,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD22 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD22 CAR的第二细胞。作为另一个实例,CAR T细胞的群体可以包括表达多于一个,例如2,3,4,5或6个或更多个CAR,例如CD19 CAR和CD22 CAR的单个群体。

[0171] 在一些实施方案中,CD22-CAR包含任选的前导序列(例如,本文所述的任选的前导序 列),细胞外抗原结合结构域,铰链(例如本文所述的铰链),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如,本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个实施方案中,示例性CD22 CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细 胞外抗原结合结构域,铰链,跨膜结构域,细胞内共刺激结构域(例如,本文所述的细胞内 共刺激结构域)和细胞内刺激结构域。

[0172] 在一个实施方案中,CD22结合结构域包含本文所述的CD22结合结构域的一个或多个(例 如全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决 定区3(LC CDR3)和/或本文所述的CD22结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互 补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3), 例如,包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个,例如全部三个HC CDR的CD22 结合结构域。这些CDR可以是例如表7A,7B,7C,8A和/或表8B的一个或多个CDR。在一个实 施方案中,CD22结合结构域包含本文所述的CD22结合结构域的一个或多个(例如全部三个) 重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3), 例如CD22结合结构域具有两个可变重链区,每个包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,CD22结合结构域包含本文所述的轻链可变区(例如表10A或10B中)和/或本文所述的重链可变区(例如表9A或9B中)。在一个实施方案中,CD22结合结构 域包含本文所述的重链可变区(例如,在表9A或9B中),例如本文所述的至少两个重链可变 区(例如,在表9A或9B中)。在一个实施方案中,CD22结合结构域是包含表9A或9B或10A 或10B的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,CD22结合结构域(例如,scFv) 包含:轻链可变区,其包含具有表10A或10B中提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,

两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰的氨基酸序列或与表10A或10B的氨基 酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表9A或9B中提供的重链可变 区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如, 取代)的氨基酸序列或与表9A或9B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。CD22结合结构 域可以是例如抗体分子或CAR分子的一部分。

[0173] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗CD22结合结构域,其包括表7A,7B,7C,8A和/或8B 的构建体的一个或多个(例如,2,3,4,5或6个)LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3,例如m971,CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3,CAR22-4,CAR22-5, CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11,CAR22-12,CAR22-13, CAR22-14,CAR22-15,CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19,CAR22-20,CAR22-21, CAR22-22,CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27,CAR22-28,CAR22-29, CAR22-30,CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35,CAR22-36,CAR22-37, 或CAR22-38。

[0174] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗-CD22结合结构域,其包括表9A,9B,10A,和/或10B 的构建体的VL和/或VH,例如m971,CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3,CAR22-4,CAR22-5,CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11,CAR22-12,CAR22-13, CAR22-14,CAR22-15,CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19,CAR22-20,CAR22-21, CAR22-22,CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27,CAR22-28,CAR22-29, CAR22-30,CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35,CAR22-36,CAR22-37, 或CAR22-38或与其95-99%同一性的序列。。

[0175] scFv之前可以是例如SEQ ID NO:13中提供的任选的前导序列,然后是例如SEQ ID NO:14 或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提供的任选的铰链序列,如SEQ ID NO:15中提供的跨膜区,包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞内信号传导结构域和包含 SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:ID NO:43的CD3ζ序列,例如,其中所述结构域相邻并且在相同 阅读框中以形成单个融合蛋白。

[0176] 另外的实施方案包括编码表6A-10B中任一个的多肽的核苷酸序列。其他实施方案包括编 码表6A-10B中任一个的多肽,以及SEQ ID NO:13,14,15,16,17和任选地51的每一个的核苷酸 序列。

[0177] 在一个实施方案中,CD22结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特 性。例如,在一个实施方案中,包含抗原结合结构域的本发明的CAR组合物的部分特异性结 合人CD22或其片段。

[0178] 在一个实施方案中,CD22结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个实施 方案中,CD22结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野生型 或增强的亲和力结合CD22蛋白或其片段。在某些情况下,人类scFv可以来源于展示文库。

[0179] 在一个实施方案中,CD22结合结构域,例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋 予CART22构建体更好的稳定性。在另一个实施方案中,CD22结合结构域例如scFv包含至少 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个突变,其例如从人源化过程产生,使得突变的scFv赋予CART22构建体提 高的稳定性。

[0180] 在一些实施方案中,CD22抑制剂包含抗体分子,例如具有本文所述的CD22结合序列的 抗体分子。例如,抗体分子可以包含如表6A-10B中任一个所述的CDR或VH和VL,或与其同 源的序列,例如与其具有95-99%同一性的序列。抗体分子可以包含具有本节,例如在CAR的 上下文中所述序列的CD22结合区域。

[0181] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD22 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一个细胞和表达CD22 CAR的第二个细胞。

[0182] 在一些方面,本文所述的结合结构域或抗体分子与针对CD22的第二抗体分子结合相同 (或基本相同)或重叠(或基本上重叠的)的表位,其中第二抗体分子是本文所述的抗体分 子,例如,选自表6A-10B的抗体分子。在一些实施方案中,本文所述的结合结构域或抗体 分子与针对CD22的第二抗体分子竞争结合和/或结合相同(或基本相同)或重叠(或基本上 重叠的)的表位,其中所述第二抗体分子是本文所述的抗体分子,例如选自表6A-10B中的 抗体分子,例如,通过实施例25中所述的方法测定。在一些实施方案中,双互补位CD22结合结构域结合第一表位,例如选自表6A-10B的抗体分子结合的表位,并且双互补位结合结构域还结合第二表位,例如由选自表6A-10B的抗体分子结合的第二表位。在一些方面,本公开提供了一种治疗方法,其包括施用结合第一表位(例如由选自表6A-10B的抗体分子结合的表位)的第一CD22结合结构域,和结合第二表位(例如由选自表6A-10B的抗体分子结合的第二表位)的第二CD22结合结构域。在一些实施方案中,CD22结合结构域是CAR分 子的一部分,例如由表达CAR的细胞表达。

[0183] 在一些实施方案中,CD22结合结构域与CD22的Ig样结构域1,2,3,4,5,6或7中的一个或 多个结合。在一些实施方案中,CD22结合结构域结合到结构域1和2;结构域3和4;或者结构域5,6和7。

[0184] 在一些方面,本公开提供了一种治疗CD19阴性癌症,例如白血病,例如ALL,例如B-ALL 的方法,包括施用CD22抑制剂,例如本文所述的CD22结合结构域或CD22 CAR表达细胞。在一些实施方案中,该方法包括确定癌症是CD19阴性的步骤。在一些实施方案中,受试者已经接受CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,并且对CD19抑制剂具有抗性,复发性 或难治性。

[0185] ROR1抑制剂

[0186] ROR1抑制剂可以是例如小分子,抗体或其片段。在一个实施方案中,ROR1抑制剂是抗 ROR1抗体或其片段。在一个实施方案中,抗ROR1抗体或其片段是单克隆抗体,例如,cirmtuzumab。

[0187] 在一个实施方案中,ROR1抑制剂是抗ROR1表达细胞,例如ROR1 CART或表达ROR1的NK细胞。

[0188] 在一些实施方案中,ROR1-CAR包含任选的前导序列(例如,本文所述的任选的前导序 列),细胞外抗原结合结构域,铰链(例如本文所述的铰链),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如,本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个实施方案中,示例性ROR1 CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细 胞外抗原结合结构域,铰链,跨膜结构域,细胞内共刺激结构域(例如,本文所述的细胞内 共刺激结构域)和细胞内刺激结构域。

[0189] 在一个实施方案中,ROR1结合结构域包含scFv部分,例如人scFv部分。scFv之前可以是 任选的前导序列,例如SEQ ID NO:13中提供的前导序列,接着是任选的铰链序列,例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提供的铰链序列,如SEQ ID NO:15 中提供的跨膜区,包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞内信号传导结构域和包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的CD3ζ序列,例如,其中所述结构域相邻并且在相同阅读框中以形成 单个融合蛋白。

[0190] 在一些实施方案中,本公开涵盖包含编码ROR1 CAR的核酸分子的重组核酸构建体,其 中所述核酸分子包含编码ROR1结合结构域的核酸序列,例如本文所述,例如,与编码细胞内 信号传导结构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框中。可以在CAR中使用的示例性细胞内 信号传导结构域包括但不限于例如CD3-ζ,CD28,4-1BB等的一个或多个胞内信号传导结构域。在一些情况下,CAR可以包含CD3-ζ,CD28,4-1BB等的任何组合。

[0191] 在一个实施方案中,ROR1结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特 性。例如,在一个实施方案中,包含抗原结合结构域的本发明的CAR组合物的部分特异性结 合人ROR1或其片段。在某些实施方案中,scFv与前导序列相邻并且在相同的可读框中。一方 面,前导序列是如SEQ ID NO:13所提供的多肽序列。

[0192] 在一个实施方案中,ROR1结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个实施 方案中,ROR1结合结构域是Fv,Fab,a(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野 生型或增强的亲和力结合ROR1蛋白或其片段。在某些情况下,人类scFv可以来源于展示文库。

[0193] 在一个实施方案中,ROR1结合结构域,例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋 予ROR1CART构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,ROR1结合结构域例如scFv包含 至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个来自人源化过程的突变,使得突变的scFv赋予ROR1 CART构建体改 善的稳定性。

[0194] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和ROR1 CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达 CD19 CAR的第一细胞和表达ROR1 CAR的第二细胞。

[0195] CD123抑制剂

[0196] CD123抑制剂可以是例如小分子,抗体或其片段(例如单特异性或双特异性抗体或其片 段);与CD123结合的重组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD123 CAR的细胞,例 如CD123 CART。

[0197] 在一个实施方案中,CD123抑制剂是重组蛋白,例如包含CD123受体的天然配体(或片 段),例如SL-401(也称为DT388IL3,德克萨斯大学西南医学中心)。

[0198] 在另一个实施方案中,CD123抑制剂是抗CD123抗体或其片段,例如单克隆抗体(例如, 单特异性或双特异性抗体或其片段),例如CSL360(CSL Limited),CSL362(CSL Limited) 或MGD006(MacroGenics)。

[0199] 在一个实施方案中,CD123抑制剂是抗CD123 CAR表达细胞,例如CD123 CART或表达 CD123 CAR的NK细胞。

[0200] 在一些实施方案中,CD123-CAR包含任选的前导序列(例如,本文所述的任选的前

导序 列)，细胞外抗原结合结构域，铰链(例如本文所述的铰链)，跨膜结构域(例如本文所述 的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如，本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个实施 方案中，示例性CD123 CAR构建体包含任选的前导序列(例如，本文所述的前导序列)，细胞外抗原结合结构域，铰链，跨膜结构域，细胞内共刺激结构域(例如，本文所述的细胞内共刺激结构域)和细胞内刺激结构域。

[0201] 在一个实施方案中，CD123结合结构域包含本文描述的CD123结合结构域的一个或多个 (例如，全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)，轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)和/或本文描述的CD123结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)，例如，包含一个或多个，例如全部三个LC CDR和一个或多个，例如全部三个HC CDR的CD123结合结构域。这些CDR可以是例如表17,18,26或27中任一个的那些CDR。在一个实施方案中，CD123结合结构域包含本文描述的CD123结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)，重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)， 例如CD123结合结构域具有两个可变重链区，每个包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中，CD123结合结构域包含本文所述的轻链可变区和/或本文所述的 重链可变区。在一个实施方案中，CD123结合结构域包含本文所述的重链可变区，例如本文 所述的至少两个重链可变区。在一个实施方案中，CD123结合结构域是包含表16或25的氨基 酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中，CD123结合结构域(例如，scFv)包含:轻 链可变区，其包含具有表16或25中轻链可变区的氨基酸序列的至少一个，两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如取代)的氨基酸序列，或与表16或25中的轻链可变区具有95-99％同一性的序列;和/或重链可变区，其包含具有表16或25中的重链可变区的氨基 酸序列的至少一个，两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如取代)的 氨基酸序列或与表16或25中的重链可变区具有95-99％同一性的序列。

[0202] 在一个实施方案中，CAR分子包含抗CD123结合结构域，其包含表17和18的构建体的一 个或多个(例如，2,3,4,5或6)LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3，例如CAR123-1,CAR123-2,CAR123-3或CAR123-4。在一个实施方案中，CAR分子 包含抗CD123结合结构域，其包含表26和27的构建体的一个或多个(例如，2,3,4,5或6个)LC CDR1,LC CDR2,LC CDR3,HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3，例如hzCAR123。

[0203] CD123 scFv之前可以是任选的前导序列，例如SEQ ID NO:13中提供的前导序列，然后是 任选的铰链序列，例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提 供的铰链序列，如SEQ ID NO:15中提供的跨膜区，包括SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞 内信号传导结构域和包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的CD3ζ序列，例如，其中结构域是相 邻的并且在相同可读框内以形成单个融合蛋白。

[0204] 另外的实施方案包括编码表16-27中任一个的多肽的核苷酸序列。另外的实施方案包括编 码表16-27任一个的多肽，和SEQ ID NO:13,14,15,16,17和任选地51的结构域每一个的核苷酸序 列。

[0205] 在一个实施方案中，CD123结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特 性。例如，在一个实施方案中，包含抗原结合结构域的本发明的CAR组合物的部分特异性结 合人CD123或其片段。

[0206] 在一个实施方案中,CD123结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个实 施方案中,CD123结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野 生型或增强的亲和力结合CD123蛋白或其片段。在某些情况下,人类scFv可以来自展示文库。

[0207] 在一个实施方案中,CD123结合结构域例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋 予CART123构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,CD123结合结构域例如scFv包含至 少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个突变,例如从人源化过程产生的突变,使得突变的scFv赋予CART123 构建体提高的稳定性。

[0208] 在一些实施方案中,CD123抑制剂包含抗体分子,例如具有如本文所述的CD123结合序 列的抗体分子。例如,抗体分子可以包含如表16-27中任一个所述的CDR或VH和VL,或与其 同源的序列,例如与其具有95-99%同一性的序列。抗体分子可以包含具有本节例如在CAR的 上下文中所述序列的CD123结合区。

[0209] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD123 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达 CD19 CAR的第一细胞和表达CD123 CAR的第二细胞。

[0210] CD10抑制剂

[0211] CD10抑制剂可以是例如小分子,抗体或其片段(例如,单特异性或双特异性抗体或其片 段);与CD10结合的重组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD10 CAR的细胞,例如 CD10 CART。

[0212] 在一个实施方案中,CD10抑制剂包含小分子,例如sacubitril(Novartis),缬沙坦/sacubritril (Novartis),奥马曲拉(Bristol-Myers Squibb),RB-101,UK-414,495(Pfizer)或其药学 上可接受的盐或衍生物。

[0213] 在一个实施方案中,CD10抑制剂是抗CD10 CAR表达细胞,例如CD10 CART或表达CD10 CAR的NK细胞。

[0214] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD10 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD10 CAR的第二细胞。

[0215] CD34抑制剂

[0216] CD34抑制剂可以是例如小分子,抗体或其片段(例如,单特异性或双特异性抗体或其片 段);与CD34结合的重组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD34 CAR的细胞,例如 CD34 CART。

[0217] 在一个实施方案中,CD34抑制剂包含靶向CD34的单克隆抗体或其片段或包含抗CD34单 克隆抗体或其片段的免疫脂质体。

[0218] 在一个实施方案中,CD34抑制剂是抗CD34 CAR表达细胞,例如CD34 CART或表达CD34 CAR的NK细胞。

[0219] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和CD34 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD34 CAR的第二细胞。

[0220] FLT-3抑制剂

[0221] FLT-3抑制剂可以是例如小分子,抗体或其片段(例如,单特异性或双特异性抗体或其片 段);与FLT-3结合的重组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达FLT-3 CAR的细胞,例 如FLT-3 CART。

[0222] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包含小分子,例如quizartinib(Ambit Biosciences),米 哚妥林(Technische Universitat Dresden),索拉非尼(Bayer and Onyx Pharmaceuticals),舒尼替尼 (Pfizer),lestaurtinib(Cephalon)或其可接受的盐或衍生物。

[0223] 在一个实施方案中,FLT-3抑制剂是抗FLT-3 CAR表达细胞,例如FLT-3 CART或表达 FLT-3 CAR的NK细胞。

[0224] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和FLT-3 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达 CD19 CAR的第一细胞和表达FLT-3 CAR的第二细胞。

[0225] CD79b抑制剂

[0226] 在某些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞与CD79b抑制剂一起施用。CD79b抑制剂可以 是例如小分子,抗体或其片段(例如单特异性或双特异性抗体或其片段);结合CD79b的重 组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD79b CAR的细胞,例如表达CD79b CAR的T 细胞或NK细胞。在一个实施方案中,CD79b抑制剂是抗CD79b CAR表达细胞,例如CD79b CART或表达CD79b CAR的NK细胞。示例性的CD79b抑制剂在下面更详细地描述。

[0227] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的NK 细胞,其包含表达CD19 CAR和CD79b CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD79b CAR的第二细胞。

[0228] CD179b抑制剂

[0229] 在某些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞与CD179b抑制剂一起施用。CD179b抑制剂可 以是例如小分子,抗体或其片段(例如单特异性或双特异性抗体或其片段);结合CD179b的 重组蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD179b CAR的细胞,例如表达CD179b CAR 的T细胞或NK细胞。在一个实施方案中,CD179b抑制剂是抗CD179b CAR表达细胞,例如 CD179b CART或表达CD179b CAR的NK细胞。示例性的CD179b抑制剂在下面更详细地描述。

[0230] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的NK 细胞,其包含表达CD19 CAR和CD179b CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,CAR 表达细胞的群体包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD179b CAR的第二细胞。

[0231] CD79a抑制剂

[0232] 在某些实施方案中,表达CD19 CAR的细胞与CD79a抑制剂一起施用。CD79a抑制剂可以 是例如小分子,抗体或其片段(例如单特异性或双特异性抗体或其片段);结合CD79a的重组 蛋白,例如融合蛋白;抑制性核酸;或表达CD79a CAR的细胞,例如表达CD79a CAR的T细胞 或NK细胞。在一个实施方案中,CD79a抑制剂是抗CD79a CAR表达细胞,例如CD79a CART 或表达CD79a CAR的NK细胞。示例性的CD79a抑制剂在下面更详细地描述。

[0233] 在一个实施方案中,本公开提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的

NK 细胞,其包含表达CD19 CAR和CD79a CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD79a CAR的第二细胞。

[0234] CAR分子

[0235] 本文描述的结合结构域(例如,针对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种的结合结构域)可以进一步包含一个或多个另外的氨 基酸序列。

[0236] 在一个实施方案中,CAR分子包含选自T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4, CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154的蛋 白质的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0237] 在一个实施方案中,结合结构域通过铰链区(例如本文所述的铰链区)连接到跨膜结构 域。在一个实施方案中,编码的铰链区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45,或其具有95-99% 同一性的序列。

[0238] 在一个实施方案中,CAR分子还包含编码共刺激结构域,例如本文所述的共刺激结构域 的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含选自以下的蛋白质的功能信号传导结构 域:OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:51的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含具有SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过 20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的氨基酸 序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域包含选自MHC I类分子, TNF受体蛋白,免疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白),激活性NK细胞受体,BTLA,Toll配体受体,OX40,CD2,CD7,CD27,CD28,CD30,CD40,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),4-1BB(CD137),B7-H3,CDS,ICAM-1, ICOS(CD278),GITR,BAFFR,LIGHT,HVEM(LIGHTR),KIRDS2,SLAMF7,NKp80(KLRF1), NKp44,NKp30,NKp46,CD19,CD4,CD8α,CD8β,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα,ITGA4,VLA1,CD49a, ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a, LFA-1,ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,NKG2D, NKG2C,TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1(CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96 (Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69, SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1,CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG (CD162),LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp,CD19a和与CD83特异性结合的配体的蛋白质 的功能性信号传导结构域。在实施方案中,共刺激结构域包含4-1BB,CD27,CD28或ICOS。

[0239] 在一个实施方案中,CAR分子还包含编码细胞内信号传导结构域,例如本文所述的细胞 内信号传导结构域的序列。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性 信号传导结构域和/或CD3ζ的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,细胞内信号传导结 构域包含SEQ ID NO:16的序列和/或SEQ ID NO:17的序列。在一个实施方案

中,细胞内信号传 导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和/或SEQ ID NO:43的序列。在一个实施方案中,细胞内信 号传导结构域包含CD27的功能性信号传导结构域和/或CD3ζ的功能性信号传导结构域。在一 个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:51的序列和/或SEQ ID NO:17的序列。 在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:51的序列和/或SEQ ID NO:43的序 列。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含具有SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的氨 基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例 如取代)但不超过20,10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的氨基酸序列和/或SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有95-99%同一性的 序列。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的序列 和SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列,其中包含细胞内信号传导结构域的序列在相同的框 架内并且作为单个多肽链表达。

[0240] 在一个实施方案中,CAR分子还包含前导序列,例如本文所述的前导序列。在一个实施 方案中,前导序列包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有 95-99%同一性的序列。

[0241] 一方面,CAR(例如,CD19 CAR,ROR1 CAR,CD20 CAR,CD22 CAR,CD123 CAR, CD10 CAR,CD34 CAR,FLT-3 CAR,CD79b CAR,CD179b CAR,或CD79a CAR)包含任 选的前导序列(例如,本文所述的任选的前导序列),细胞外抗原结合结构域,铰链(例如 本文所述的铰链),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如 本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个方面,示例性CAR构建体包含任选的前导序列(例 如,本文所述的前导序列),细胞外抗原结合结构域,铰链,跨膜结构域,细胞内共刺激结 构域(例如本文所述的细胞内共刺激结构域)和细胞内刺激结构域。

[0242] 双特异性抗体

[0243] 双特异性抗体分子(其可以例如单独施用或作为CAR的一部分施用)可以包含两个VH区 和两个VL区。在一些实施方案中,上游抗体或其部分(例如scFv)排列为其VH(VH_1)在其VL (VL_1)上游,并且下游抗体或其部分(例如scFv)排列为其VL(VL_2)在其VH(VH_2)上游,使得整个双特异性抗体分子具有排列VH_1-VL_1-VL_2-VH_2。在其他实施方案中,上游抗体或其部分(例如scFv)排列为其VL(VL_1)在其VH(VH_1)上游,并且下游抗体或其部分(例如scFv) 排列为其VH(VH_2)在其VL(VL_2)上游,使得整个双特异性抗体分子具有排列 VL_1-VH_1-VH_2-VL_2。

[0244] 双特异性CD22/CD19抑制剂

[0245] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含双特异性CAR19/CAR22抗体分子。例如,在一些 实施方案中,B细胞抑制剂包含表28的一个或多个氨基酸序列或与其具有95-99%同一性的序 列。还提供了根据表28的核酸或与其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,B细胞 抑制剂包含表2或3的CD19特异性抗体分子(或与其具有95-99%同一性的序列)和表6A或6B 的CD22特异性抗体分子(或与其具有95-99%同一性的序列)。在一个实施方案中,B细胞 抑制剂包含具有表4或5的一个或多个CDR的CD19特异性抗体分子(或与其具有1,2,3,4,5或6 个改变,例如取代的序列)和具有表7A,7B,7C,8A或8B的CDR的CDR22特异性抗体分子 (或与其具有1,2,3,4,5或6个改变,例如取代的序列)的CD22特异性抗体分子。

[0246] MTOR抑制剂

[0247] 在一个实施方案中,任选地与B细胞抑制剂组合施用的表达CAR分子(例如CD19

CAR分 子,CD20 CAR分子或CD22 CAR分子,例如本文所述的CAR分子)的细胞与低的免疫增强剂 量的mTOR抑制剂共同施用。虽然不希望被理论束缚,但认为用低的免疫增强剂量(例如, 不足以完全抑制免疫系统但足以提高免疫功能的剂量)的治疗伴随着PD-1阳性T细胞的减少 或PD-1阴性细胞的增加。可以通过与表达PD-1配体例如PD-L1或PD-L2的细胞接合而使PD-1 阳性T细胞而不是PD-1阴性T细胞被消耗。

[0248] 在一个实施方案中,该方法可用于优化受试者中本文所述的CAR细胞的性能。尽管不希 望受理论束缚,但是相信在一个实施方案中,内源性未修饰的免疫效应细胞(例如T细胞)的 性能得到改善。虽然不希望受理论束缚,但是相信在一个实施方案中,CAR表达细胞的性能 得到改善。在其它实施方案中,已经或将被工程化以表达CAR的细胞,例如T细胞可以通过 与一定量的mTOR抑制剂接触而离体治疗,所述一定量的mTOR抑制剂增加PD1阴性免疫效应 细胞,例如T细胞的数量或增加PD1阴性免疫效应细胞,例如T细胞/PD1阳性免疫效应细胞, 例如T细胞的比例。

[0249] 在一个实施方案中,在施用本文所述的CAR表达细胞,例如T细胞之前,开始施用低的 免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如变构抑制剂例如RAD001或催化抑制剂。在一个实施方案 中,CAR细胞在足够的时间或足量剂量的mTOR抑制剂之后施用,使得PD1阴性免疫效应细胞 (例如T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞,例如T细胞/PD1阳性免疫效应细胞,例如T细胞的比例至少暂时增加了。

[0250] 在一个实施方案中,足够时间或足够剂量的低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂之后收获 被工程化以表达CAR的细胞,例如T细胞,使得受试者中或从受试者收获的PD1阴性免疫效应 细胞(例如T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞,例如T细胞/PD1阳性免疫效应细胞,例 如T细胞的比例至少暂时增加了。

[0251] 本文描述的组合物或方法的其它特征或实施方案包括以下一个或多个:

[0252] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的抑制剂。在实施方案中,B细胞抑制剂包含有效数量的一种或多种细胞,其表达结合CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的CAR分子。

[0253] 在实施方案中,表达结合CD19的CAR分子的一种或多种细胞与一种或多种B细胞抑制剂 同时,之前或之后施用。

[0254] 在实施方案中,在与生物样品中的表29中列出的一种或多种标记的参考水平相比,受试 者具有或被鉴定为具有在测定的水平之间的差异,例如统计学显著差异。

[0255] 在实施方案中,与在生物样品中的CD19的特征中的参考特征(例如,引起移码或过早终 止密码子或两者的突变)相比,受试者具有或被鉴定为具有在确定的特征之间的差异。

[0256] 在实施方案中,与在生物样品中的Treg细胞的参考水平相比,受试者具有或被鉴定为具 有在确定的水平之间的差异,例如统计学显著差异。

[0257] 在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的嵌合抗原受体(CAR) 疗法,例如本文所述的CAR疗法,例如包含CD19 CAR表达细胞和任选的一种或多种B细胞抑 制剂的疗法,并且受试者在以下项的一种或多种中被鉴定为具有与参考水平相比的确定水平 或与参考特征相比的确定特征之间的差异(例如,统计学显著性差异):(i)表29中列出的一 种或多种标记的水平或活性;(ii)CD19的特征,例如突变,例如导致移码或

过早终止密码子 或两者的突变,或(iii)生物样品中T_{REG}细胞的水平。在一个实施方案中,所述方法包括在 (i)表29中列出的一种或多种标记的水平;(ii)CD19的特征,例如突变,例如导致移码或过 早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中T_{REG}细胞的水平或活性中的一个或多个中 确定所述受试者是否具有与参考水平相比的确定水平之间或与参考特征相比的确定特征之间 的差异,例如统计学显著差异,并对受试者施用治疗有效剂量的嵌合抗原受体(CAR)疗法, 例如本文所述的CAR疗法,例如包含CD19 CAR表达细胞和任选的一种或多种B细胞抑制剂的 疗法。在一个实施方案中,所述方法包括在(i)表29中列出的一种或多种标记的水平;(ii) CD19的特征,例如突变,例如导致移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品 中T_{REG}细胞的水平或活性中的一个或多个中确定所述受试者是否具有与参考水平相比的确定 水平之间或与参考特征相比的确定特征之间的差异,例如统计学显著差异,并对受试者施用 治疗有效剂量的嵌合抗原受体(CAR)疗法,例如本文所述的CAR疗法,例如包含CD19 CAR 表达细胞和任选的一种或多种B细胞抑制剂的疗法。在一个实施方案中,该方法包括向受试 者施用治疗有效剂量的嵌合抗原受体(CAR)疗法,例如本文所述的CAR疗法,例如包含CD19 CAR表达细胞的疗法,确定受试者是否在(i)表29中列出的一种或多种标记的水平;(ii)CD19 的特征,例如突变,例如导致移码或过早终止密码子或两者的突变,或(iii)生物样品中T_{REG}细胞的水平或活性中的一个或多个中具有与参考水平相比的确定水平之间或与参考特征相比 的确定特征之间的差异,例如统计学上显著差异,并且如果差异存在,那么向受试者施用治 疗有效剂量的一种或多种B细胞抑制剂。

[0258] 在实施方案中,受试者具有或被鉴定为具有在生物样品中的Treg细胞的确定水平和参考 水平之间的增加,例如统计学上显著增加。

[0259] 在实施方案中,受试者在用表达结合CD19的CAR分子(例如CD19 CAR)的一种或多种 细胞治疗后已经复发或被鉴定为已经复发。

[0260] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含有效数量的一种或多种细胞,其表达:结合CD10的CAR 分子,例如本文所述的CD10 CAR;结合CD20的CAR分子,例如本文所述的CD20 CAR;结合CD22的CAR分子,例如本文所述的CD22 CAR;结合CD34的CAR分子,例如本文所述的CD34 CAR;结合CD123的CAR分子,例如本文所述的CD123 CAR;结合FLT-3的CAR分子,例如本 文所述的FLT-3 CAR;或结合ROR1的CAR分子,例如本文所述的ROR1 CAR。

[0261] 在实施方案中,CD19抑制剂包含抗体或抗体片段,其包含CD19结合结构域,跨膜结构 域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述CD19结合结构域包含表2或表3 中列出的任何CD19轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决 定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),以及表2或表3中列出的任何CD19重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[0262] 在实施方案中,CD19 CAR包含表2或3中列出的轻链可变区和表2或3所列的任何重链可 变区。

[0263] 在实施方案中,CD19抑制剂包含CD19结合结构域,其包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列,或其具有95-99%同一 性的序列。在实施方案中,CD19 CAR包含SEQ ID NO:58的多肽。

[0264] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含CD20 CAR,其包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体 片段包括CD20结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其 中所述CD20结合结构域包含表13中所列的任何CD20轻链结合结构域氨基酸序列的一个或多 个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),以及表12A或12B中列出的任何CD19重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链 互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[0265] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含CD22 CAR,其包含抗体或抗体片段,该抗体或抗体片 段包括CD22结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中 所述CD22结合结构域包含表8A,8B,10A和/或10B中所列的任何CD22轻链结合结构域氨基 酸序列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链 互补决定区3(LC CDR3),以及表7A,7B,7C,9A和/或9B中列出的任何CD22重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[0266] 在实施方案中,CD22 CAR包含表10A或10B中列出的任何轻链可变区。在实施方案中, CD22 CAR包含在表9A或9B中列出的任何重链可变区。在实施方案中,CD22 CAR包括表10A 或10B中列出的任何轻链可变区以及列于表9A或9B中的任何重链可变区。

[0267] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含CAR,其包含抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段 包括抗原结合结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所 述抗原结合结构域包含一个或多个(例如全部)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决 定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和一个或多个(例如全部)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[0268] 在实施方案中,B细胞抑制剂包含CAR,其包含scFv。在实施方案中,B细胞抑制剂包含 CAR,其包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和 CD154的蛋白质的跨膜结构域。在实施方案中,抗原结合结构域通过铰链区连接到跨膜结构 域。在实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:14或其具有95-99%同一性的序列。在实施方案中, 共刺激结构域是从选自OX40,CD2,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278),和4-1BB(CD137)的蛋白质获得的功能性信号传导结构域。在实施方案中,共刺激结构域是从选自MHC I类分子,TNF受体蛋白,免疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号传导性淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白),激活NK细胞受体,BTLA,Toll配体受体,OX40,CD2,CD7,CD27,CD28,CD30,CD40,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),4-1BB (CD137),B7-H3,CDS,ICAM-1,ICOS(CD278),GITR,BAFFR,LIGHT,HVEM(LIGHTR), KIRDS2,SLAMF7,NKp80(KLRF1),NKp44,NKp30,NKp46,CD19,CD4,CD8α,CD8β,IL2Rβ, IL2Rγ,IL7Rα,ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD, CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1,ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1, CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,NKG2D,NKG2C,TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1 (CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229), CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69,SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1, CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp, CD19a和与CD83特异性结合的配体的蛋白质获得的功能性信号传导结构

域。在实施方案中，共刺激结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的序列。在实施方案中，细胞内信号传导结 构域包含4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3ζ的功能性信号传导结构域。

[0269] 在实施方案中，细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和/或SEQ ID NO:17或 SEQ ID NO:43的序列。在实施方案中，CAR还包含前导序列。在实施方案中，前导序列包含 SEQ ID NO:13。

[0270] 在实施方案中，表达CAR分子的细胞包含T细胞或NK细胞。

[0271] 在实施方案中，与CD19表达相关的疾病选自增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症例 如脊髓发育不良，骨髓增生异常综合征或白血病前期，或是与CD19表达相关的非癌症相关适 应证。在实施方案中，该疾病是血液癌症，急性白血病，B细胞急性淋巴性白血病(BALL)， T细胞急性淋巴性白血病(TALL)，小淋巴细胞白血病(SLL)，急性淋巴性白血病(ALL)；慢性白血病，慢性髓性白血病(CML)或慢性淋巴细胞白血病(CLL)的一种或多种。

[0272] 在实施方案中，所述方法还包括施用增加表达CAR分子的细胞功效的活性剂。在实施方 案中，所述方法还包括施用改善与施用表达CAR分子的细胞相关的一种或多种副作用的活性 剂。在实施方案中，表达CAR分子的细胞与治疗与CD19相关疾病的活性剂组合施用。

[0273] 在实施方案中，根据本文所述的方法，例如，向哺乳动物提供抗肿瘤免疫的方法或治疗 哺乳动物的方法，哺乳动物是先前施用的癌症疗法，例如CD19 CAR疗法或除CD19 CAR表达 细胞之外的癌症疗法的非应答者，部分应答者或完全应答者。在实施方案中，哺乳动物是先 前施用的癌症疗法，例如CD19 CAR疗法或除CD19 CAR表达细胞之外的癌症疗法的非复发 者，部分复发者或完全复发者。在实施方案中，哺乳动物包含CD19阴性癌细胞或CD19阳性 癌细胞，任选其中哺乳动物还包含CD22阳性，CD123阳性，FLT-3阳性，ROR-1阳性，CD79b 阳性，CD179b阳性，CD79a阳性，CD10阳性，CD34阳性和/或CD20阳性癌细胞。在实施方案中，哺乳动物具有复发的ALL癌症。在实施方案中，哺乳动物预先施用CD19 CAR表达细胞，并且对CD19 CAR治疗是顽固性的。

[0274] 在实施方案中，所述活性剂是mTOR抑制剂，并且所述受试者被施用低的免疫增强剂量 的mTOR抑制剂，例如RAD001或雷帕霉素。在实施方案中，mTOR抑制剂是RAD001。在实施方案中，剂量包含变构和催化性mTOR抑制剂。在实施方案中，mTOR抑制剂的施用时间量足以降低受试者的外周血液或从受试者分离的T细胞的制备物中PD-1阳性T细胞的比例，增加 PD-1阴性T细胞的比例，或增加PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞的比例。

[0275] 在实施方案中，待工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如，T细胞)在足够的时间之 后或在足量施用mTOR抑制剂的低的免疫增强剂量之后被收获，使得受试者中或从受试者收 获的PD1阴性免疫效应细胞，例如T细胞的水平，或PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1 阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比例已至少暂时增加了。在实施方案中，mTOR抑制剂 的剂量与至少5但不超过90％的mTOR抑制相关，例如通过p70 S6 K抑制测量。在实施方案中， mTOR抑制剂的剂量与至少10％但不超过40％的mTOR抑制相关，例如通过p70 S6 K抑制测 量。

[0276] 在一个实施方案中，所述方法还包括施用检查点抑制剂。在实施方案中，受试者在开始 CART疗法之前接受活性剂例如mTOR抑制剂和/或检查点抑制剂的预治疗。在实施方案中， 受试者接受活性剂例如mTOR抑制剂和/或检查点抑制剂的同时治疗。在实施方案中，受

试者 在CART疗法后接受活性剂例如mTOR抑制剂和/或检查点抑制剂的治疗。

[0277] 在实施方案中,确定的水平或确定的特征在CART疗法之前或同时或过程中获得。

[0278] 在实施方案中,该方法包括测定指示受试者是否可能复发或已经复发的基因特征。在实 施方案中,该方法包括在用CAR表达细胞治疗,例如CART治疗(例如,CART19治疗,例如 CTL019疗法)之前测定受试者中的基因特征,其预测CAR治疗的复发。在实施方案中,一种 或多种标记的水平是表29中列出的至少2,3,4,5,6,7,8,9或10种标记的水平。在实施方案中,标 记的水平包含mRNA水平或可溶性蛋白的水平。

[0279] 在实施方案中,CD19的特征是外显子2中的突变,例如引起移码或过早终止密码子或两 者的突变。在实施方案中,通过用T_{REG}细胞表达的标记染色样品来确定T_{REG}细胞的水平。在 实施方案中,T_{REG}细胞的水平是受试者的身体内,例如在癌症微环境中相关位置中的Treg细 胞的水平。

[0280] 在实施方案中,该方法还包括在单采血液成分术前减少受试者中的T_{REG}特征。在实施方 案中,该方法进一步包括例如通过向受试者施用环磷酰胺,抗GITR抗体或两者来减少受试者 中的T_{REG}特征。在实施方案中,该方法包括在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前用 环磷酰胺,抗GITR抗体或二者预治疗受试者。在实施方案中,该方法还包括从受试者获得样 品,其中所述样品包含细胞级分(例如其包含血液),组织级分,单采血液成分术样品或骨 髓样品。

[0281] 在实施方案中,细胞表达抑制性分子,其包含第一多肽,其包含与包含来自细胞内信号 传导结构域的阳性信号的第二多肽结合的至少一部分抑制分子。在实施方案中,抑制分子包 含含有至少一部分PD1的第一多肽和包含共刺激结构域和主要信号传导结构域的第二多肽。

[0282] 在实施方案中,该方法包括测定指示细胞治疗的受试者是否可能复发或已复发的基因特 征。在实施方案中,所述方法包括在输注到受试者之前测定细胞中的基因特征。在实施方案 中,该方法还包括降低包含转导的细胞的细胞群体的T_{REG}特征。在实施方案中,减少T_{REG}特 征包括对细胞群进行CD25消耗。

[0283] 在实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。

[0284] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员 通常理解的相同的含义。尽管与本文所述类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或 测试中,但是在下面描述合适的方法和材料。本文提及的所有出版物,专利申请,专利和其 它参考文献(例如序列数据库参考号)通过引用整体并入。例如,本文引用的所有GenBank, Unigene和Entrez序列(例如在本文的任何表中)都通过引用并入本文。除非另有说明,本文指 定的序列登录号(包括本文的任何表中)是指截至2015年4月8日当前的数据库条目。当一个 基因或蛋白质引用多个序列登录号时,包含所有序列变体。

[0285] 另外,材料,方法和实施例仅仅是说明性的而不是限制性的。

[0286] 标题,子标题或编号或字母元素,例如(a),(b),(i)等仅仅是为了便于阅读而呈现。在本文档中使用标题或编号或字母元素不要求以字母顺序执行步骤或元素,或者步骤或 元素必须彼此离散。

[0287] 本发明的其它特征,目的和优点将从说明书和附图以及权利要求书中变得显而易见。

[0288] 附图简述

[0289] 图1A和1B是代表性CAR的示意图。

[0290] 图2包含显示存在于肿瘤中的CD19表达细胞的霍奇金淋巴瘤的免疫组织化学分析图像。左侧小图为1倍放大倍数,右侧小图为20倍放大倍数。

[0291] 图3是用于评估CART19治疗在霍奇金淋巴瘤患者中的治疗功效的研究的实验设置的示 意图。

[0292] 图4A,4B,4C和4D显示了在T细胞上PD1和CAR19表达的流式细胞术分析。图4A和4B是代表性的流式细胞术谱图,证明了来自作为CART疗法的完全应答者(CR)或非应答者(NR)的受试者的CD4+T细胞上的PD-1和CAR19表达的分布。图4C是显示来自具有对CART疗法的不同反应的受试者组的CD4+T细胞群体中PD1细胞百分比的图。图4D是显示具有对CART疗法的不同反应的受试者组的CD8+T细胞群体中PD1细胞百分比的图。

[0293] 图5A和5B显示了来自对CART疗法具有不同反应的受试者组的CD4和CAR19表达细胞 (图5A)或CD8和CAR19表达细胞(图5B)中PD1表达的分布。

[0294] 图6显示了来自作为对CART疗法的完全应答者(CR)或非应答者(NR)的受试者的T细胞上的PD1,CAR19,LAG3和TIM3表达的流式细胞术分析。

[0295] 图7A和7B显示来自对CART疗法不同反应的受试者组的PD1和LAG3表达(图7A)或PD1 和TIM3表达(图7B)的分布。

[0296] 图8显示了接受CART19的骨髓瘤患者的浆细胞IgA免疫表型分析,证实了对CART19疗法 的反应。

[0297] 图9A和9B显示在癌细胞系和CART细胞上的IL-7受体(CD127)表达。通过流式细胞术 分析测定在三种癌细胞系:RL(套细胞淋巴瘤),JEKO(也称为Jeko-1,套细胞淋巴瘤)和Nalm-6(B-ALL)中CD127的表达(图9A)。通过流式细胞仪分析测定在NSG小鼠中输注和 循环的CD3阳性(CART)细胞上的CD127表达(图9B)。

[0298] 图10A,10B和10C显示了CART19处理和随后的IL-7处理后的抗肿瘤反应。在第6天用不 同剂量的CART19细胞处理在第0天用表达萤光素酶的套细胞淋巴瘤细胞系(RL-luc)移植的 NSG小鼠,并监测肿瘤负荷。将小鼠分成4组,不接受CART19细胞,接受0.5x10^6个CART19 细胞(CART19 0.5E6),接受1x10^6个CART19细胞(CART19 1E6)或接受2x10^6个CART19细胞(CART19 2E6)。通过检测生物发光(平均BLI)测量CART治疗后的肿瘤负担(图10A)。 将接受0.5x10^6个CART19细胞(CART19 0.5E6)或1x10^6个CART19细胞(CART19 1E6)的小 鼠随机分配以接受或不接受重组人IL-7(rhIL-7)。对来自图10A的三只小鼠(#3827,#3829 和#3815,接受指定的初始CART19剂量)监测由平均生物发光(BLI)表示的肿瘤负担,所 述小鼠从第85天开始用IL-7治疗(图10B)。IL-7通过IP注射每周3次给药。在第85天(PRE) 之前和第115天(POST)后平均生物发光(BLI)表示的肿瘤负荷在未接受IL-7(CTRL)的 小鼠和接受IL-7治疗的小鼠(IL-7)之间进行比较(图10C)。

[0299] 图11A和11B显示IL-7治疗后的T细胞动力学。对接受IL-7的每只小鼠或对照小鼠监测血液 中检测到的人T细胞的水平(图11A)。在IL-7治疗开始之前(PRE)和14天后(第14天)测 量在血液中检测到的CART19细胞(CD3+细胞)的水平(图11B)。

[0300] 图12描绘了两个示例性RCAR构型的结构。抗原结合成员包括抗原结合结构域,跨膜结 构域和开关结构域。细胞内结合成员包括开关结构域,共刺激信号传导结构域和主要

信号传 导结构域。这两个构型证明本文所述的第一和第二开关结构域可以相对于抗原结合成员和细 胞内结合成员处于不同的取向。本文进一步描述了其他RCAR构型。

[0301] 图13描述了具有抗C22和抗CD19结合结构域的双特异性CAR的两种构建体。“4G4S”表示 接头序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1311)。

[0302] 图14是描述NFAT测定中双特异性CD19/CD22 CAR构建体的活性的图。

[0303] 图15A,15B,15C是显示存在各种肿瘤靶细胞系时CART细胞活化程度(通过相对发光 测定)的图。图15A显示在存在表达CD20的靶细胞系Daudi的情况下的CAR T细胞活化。图15B 显示在表达CD20的靶细胞系Raji存在下的CAR T细胞活化。图15C显示存在非CD20表达阴性 对照K562时的CAR T细胞活化。

[0304] 图16是说明基因特征分析的概述的示例性示意图。简而言之,对于每个基因集,应用2 组统计模型来确定CRs,PRs和NRs之间的元基因是否在统计学上是不同的。CR更像是静息的 T_{EFF}细胞,而NR更像是活化的T_{EFF}细胞。在活化的和静息的T_{EFF}细胞中上调的基因也在NRs 中上调。

[0305] 图17描绘了示例性结果(p=0.000215),其示出了与不复发的完全应答者(CR)相比变 成复发者的完全应答者(R)的儿科患者的样品中T_{REG}基因具有高表达水平。x轴是应答组的 样品,其中CR=没有复发的完全应答者,R=复发者。y轴是归一化的元基因表达得分。

[0306] 图18A,18B和18C是在肿瘤靶细胞系存在下显示CAR T细胞活化的图。在图18A,将表 达CAR的JNL细胞与Daudi CD22表达靶细胞系以指示的E:T比混合。在图18B,将表达CAR的JNL细胞与Raji CD22表达靶细胞系以指定的E:T比混合。在图18C,将表达CAR的JNL细胞与阴性对照K562细胞系以指定的E:T比混合。

[0307] 图19是表示细胞表面上的嵌合抗原受体的原代T细胞表达的图。蛋白-L-生物素/SA-PE(图 19-1和图19-2)和rhCD22-Fc/抗-Fc488(图19-3和19-4)用于测定CAR表面表达水平。没有CAR 的细胞被用作阴性对照。

[0308] 图20A,20B,20C,20D,20E和20F是显示原代T细胞肿瘤靶标杀伤试验的图。用CD22 CAR 活化和转导的原代T细胞以指示的比例与稳定表达萤光素酶的靶细胞系混合,并测量靶细胞杀 伤。杀伤百分比被归一化为hCD22-8(28.8%转导)。与阳性对照CD22 CAR m971(m971-HL), 阴性对照CAR m971-LH和作为阴性对照的未转导的T细胞相比,使用CD22-表达细胞系Raji (图20A),SEM(图20B),K562-hCD22(图20C),Daudi(图20D)和Nalm6(图20E) 来测试功能CD22 CAR克隆。K562细胞系不表达CD22,并且用作阴性对照(图20F)。

[0309] 图21A,21B,21C,21D,21E和21F是显示由CD22 CAR克隆诱导显著促炎细胞因子应答的图。原代T细胞杀伤试验用于确定CD22 CAR克隆产生促炎细胞因子IFN-g,IL-2和TNFa的能力。将效应细胞与归一化至28.8%转导的每种不同的靶细胞系共培养20小时。上清液取 自不同培养物,从表达Raji CD22的靶细胞(图21A),表达Nalm6 CD22的靶细胞(图21B),表达Daudi CD22的靶细胞(图21C),表达SEM CD22的靶细胞(图21D),表达K562-hCD22 CD22的靶细胞(图21E),和K562非CD22表达细胞(阴性对照)(图21F)具有2.5:1和10:1 的不同的E:T比例。

[0310] 图22是描绘了通过流式细胞术检测的复发的ALL中各种B细胞抗原的表达的图。来自16 个r/r患者的样品通过多参数流式细胞术筛选以下标记:CD19(16pts),CD22(16pts),CD123 (16pts),FLT-3(9pts),ROR-1(3pts),CD79b(15pts),CD179b(8pts),CD79a(16pts),

CD10(16 pts),CD34(16pts),和CD20(16pts)。CD22和CD123在r/r ALL患者的母细胞中高水平(> 60%)并同质表达(条线表示中位数%表达,分别为99.50%,98.80%,95.70%,72.00%, 47.00%,15.00%,13.45%,4.200%,98.00%,87.65%,和7.00%)。对于每个患者,表达所示标记 的细胞的百分比显示为单个数据点。

[0311] 图23是一组图,其显示了在CART19治疗之前(基线)和之后(CD19-阴性复发),6名CD19阴性白血病复发的患者中CD22和CD123的表达。在所有分析中,感兴趣的群体基于正向和侧向散射特征进行门控,然后进行单峰门控,并使用Live Dead Aqua(Invitrogen)门控活 细胞。时间门控被纳入质量控制。门控策略包括:时间门控→SSC低→单峰→活的 →CD45dim→CD10+。

[0312] 图24是一组图,其显示了在CART19治疗(临床试验UPCC04409/CHP959,在方框中表示 患者UPN)后CD19阴性疾病复发患者的胚细胞中CD22的表达。顶行显示CART19治疗前的胚 细胞中CD19和CD22表达,而底行显示复发时的疾病表型。当CD19表达丧失时,CD22表达也 在复发时保持。

[0313] 图25是一组图,显示在CART19治疗后(临床试验UPCC04409/CHP959,在方框中表示患 者UPN)CD19阴性疾病复发患者的胚细胞中CD123的表达。顶行显示CART19治疗前的胚细胞中CD19和CD123表达,而底行显示复发时的疾病表型。当CD19表达丧失时,CD123表达在复发时在多数患者中保持。

[0314] 图26是显示CD19阴性疾病复发患者中CART19治疗前后CD19,CD22和CD123的中值表 达图。CD19表达在复发时丧失(94.25%对0%,p=0.0009),而CD22(99.20%对97.30%,p=ns)和CD123(63.00%对48.75%,p=ns)仍然表达。对于每个患者,表达所述标记的细胞的百分比显示为单个数据点。

[0315] 图27A和27B是一系列图,其显示了在用CART19疗法治疗后,来自16位r/r患者和4名患有 CD19阴性疾病复发的患者的样品中CD22表达。通过多参数流式细胞术对B细胞标记CD22筛 选样品。CD22在11/15r/r ALL患者的母细胞中高水平(>60%)并且同质表达(图27A)。在 CART19治疗(基线)之前和之后(CD19阴性复发)(显示为2pts)的CD19阴性白血病复发 的4/4患者中,CD22为阳性(图27B)。门控策略:SSC低→单峰→活的→CD45dim。

[0316] 图28A,28B和28C是显示CD22 CART对CD19和CD22表达的影响的一系列图。示出了使 用不同链取向(H至L和L至H)产生的两种CAR22构建体的方案(图28A)。抗CD22 scFv(m971) 经密码子优化并克隆到含有CD8铰链,41-BB共刺激和CD3ζ信号传导结构域的鼠CAR19载体 中(图28A)。NALM6 ALL细胞系上CD19,CD22和同种型对照的表达显示为平均荧光强度 (MFI)(图28B)和抗体结合能力(ABC)(图28C)。在NALM-6中,CD19的表达高于CD22。然而,在大多数原代ALL样品中,CD19和CD22表达是相似的(参见图27A)。

[0317] 图29A,29B和29C是显示用于产生CART22和CART19(连同UTD细胞)的正常供体T细胞扩增的一系列图。群体倍增(PD)相对于培养天数:扩增结束时(第11天),CART22和对 照T细胞达到约4.5PD,与CART19或UTD细胞相比无显著性差异(图29A)。T细胞体积(fl) 相对于培养天数:在第6天存在峰值体积(约450μl),而在随后的日子中,当细胞被收获并冷 冻时,体积减小至300fl。观察到与CART19或UTD细胞无显著差异(图29B)。扩增第11天 的CD4阳性和CD8阳性T细胞上的CAR表达如图29C所示。CAR表达的门控是基于UTD。门控 策略:FSS对SSC淋巴细胞→单峰→活的→CD3+。

[0318] 图30是显示具有细胞质细胞因子产生的CD107a脱颗粒测定的一系列图。CART19，CART22HtoL和LtoH与不同的靶(单独的，PMA/IONOMYCIN，MOLM-14和NALM-6)共 培养。当与ALL细胞系(NALM-6)共培养但不是与阴性对照共培养时，CART19和CART22 HtoL显示出高水平的CD107a脱粒，IL-2，IFNg和TNFa产生。UTD和CART22 LtoH没有显示 脱粒或细胞因子产生。门控策略:FSS对SSC淋巴细胞→单峰→活的→CD3+。

[0319] 图31是显示基于萤光素酶的杀伤试验的图。CART22和CART19 HtoL但不是UTD细胞在 共培养24小时时能够裂解NALM-6细胞。观察到细胞毒活性与E:T比率之间存在直接相关性，E:T比例2:1时具有更好的抗白血病效果(CART19和CART22为78％和75％杀死)。

[0320] 图32A和32B是显示基于CFSE的增殖测定的一系列图。CART22和CART19与ALL细胞系 NALM-6共培养5天导致显著的T细胞增殖(分别为94％和92.9％)。还显示了对照(TCM＝单独培养基，P-I＝PMA/离子霉素，MOLM-14)(图32A)。在显示CART19和CART22中CFSE 稀释动力学的柱状图中，大多数T细胞经历多次增殖循环(图32B)。门控策略:FSS对SSC淋 巴细胞→单峰→活的→CD3+。

[0321] 图33是显示细胞因子产生的一系列图。将CART22，CART19和UTD与不同的辐射靶(单 独的，PMA/离子霉素，MOLM-14和NALM-6)温育24小时。当与ALL细胞系NALM-6共培养时，仅CART22和CART19HtoL能够释放多种细胞因子(这里显示IFNg，IL-2，GM-CSF，TNFa 和MIP1b)。结果显示为平均强度荧光(MFI)。

[0322] 图34A和34B是一系列显示具有原代ALL胚细胞的T细胞脱粒的图。将CART22，CART19 和UTD细胞与来自基线时的ALL患者(CHP-959-101)和在患者复发CD19阴性疾病时进行 CART19治疗后的胚细胞共同温育4小时。CART19和CART22都能够在基线时脱粒(当胚细胞 是CD19+和CD22+时)，但是在复发时，仅CART22脱粒(当疾病为CD19-neg时)(图34A)。在复发时与CHP101样品温育后，CD8-pos和CD8-neg CART19和CART22效应物中的CD107a 脱粒的点图显示CD8和CD4T细胞中仅CART22显示脱粒(图34B)。门控策略:FSS对SSC淋巴 细胞→单峰→活的→CD3+。

[0323] 图35A，35B，35C和35D是显示针对NALM-6的体内CART22效力的一系列图。A.实验方案:1百万个NALM-6萤光素酶+细胞/小鼠静脉内注射在NSG小鼠中。6天后，通过生物发光评估肿瘤植入。然后将小鼠随机分配以接受未转导的T细胞或不同剂量的CART22(1.25至5百万 总细胞/小鼠，具有75％CAR表达)。然后监测小鼠的肿瘤负荷，PB T细胞扩增和存活(图35A)。 通过生物发光(BLI)的肿瘤负荷检测到剂量相关的抗白血病反应。接受$5e^6$ CART22细胞的 小鼠显示更好的肿瘤控制(图35B)。与用UTD细胞治疗的小鼠相比，CART22治疗的小鼠显 示统计学显著的更好的总体存活(OS)。对于OS，较高剂量的CART22与较好的OS之间存在 显著的相关性(图35C)。每周通过眶后取血监测T细胞体内扩增。T细胞输注后一周，接受较高剂量CART22的小鼠显示更好的CART扩增(中位数为12T细胞/μl)(图35D)。

[0324] 图36A和36B是显示针对NALM-6的CART22和CART19之间的体内比较的一系列图。实验 方案:在NSG小鼠中静脉内注射1百万个NALM-6萤光素酶+细胞/小鼠。6天后，通过生物发光 评估肿瘤植入。然后小鼠随机接受未转导的T细胞，CART19或CART22(500万总细胞，75％CAR表达)。然后监测小鼠的肿瘤负荷，PB T细胞扩增和存活(图36A)。通过生物发光(BLI)检测的肿瘤负荷在CART22和CART19治疗的小鼠中表现出抗白血病反应，而UTD小鼠快速进展(图36B)。与CART22相比，CART19治疗的小鼠显示出更好的总生存期(OS)，可能是 由于

NALM-6中不同的靶标表达(CD19>>CD22)(图36C)。

[0325] 图37A和37B是一系列图,其显示了在原发ALL的模型中CART22和CART19之间的体内 比较。原发性ALL患者(JH331)的胚细胞在体内传代并用萤光素酶转导以追踪肿瘤负担。实 验方案:1百万个JH331萤光素酶+细胞/小鼠静脉内注射在NSG小鼠中。14天后,通过生物发光 评估肿瘤植入。然后将小鼠随机化以接受未转导的T细胞,CART19或CART22(500万总细胞, 75%CAR表达)。然后监测小鼠的肿瘤负荷,PBT细胞扩增和存活(图37A)。通过生物发光 (BLI)监测的肿瘤负担在CART22和CART19治疗的小鼠中检测到抗白血病反应,而UTD小鼠快速进展(图37B)。

[0326] 图38A,38B和38C是通过免疫组织化学染色显示28个人正常组织上CD22表达的组织微阵 列的一系列图像。淋巴器官对CD22表达(扁桃体,淋巴结,脾脏和胸腺)呈阳性(图38A)。 非淋巴器官未显示CD22的表达(图38B)。在多个组织中观察到CD22-阳性驻留B细胞(图38C)。*=非特异性染色。

[0327] 图39是显示来自GeneAtlas U133A的CD22 RNA表达数据的图。在B细胞,扁桃体和淋巴 结中观察到高水平CD22表达。B淋巴母细胞和白血病/淋巴瘤细胞系也是高度阳性的。

[0328] 图40是显示CART22毒性的51-铬释放测定的一系列图。CART22和CART19但不是UTD细 胞都触发ALL细胞系NALM-6的裂解。在任何正常组织(CD34+,人神经元祖细胞或神经元和角质形成细胞)或对照(K562细胞系)中均未观察到CART22的细胞毒性作用。

[0329] 图41显示了通过FACS评估的用抗CD123 CAR构建体转导的JNL细胞中CAR表达的图示, 并报告为使用蛋白L作为检测试剂,在未转导(CAR阴性)细胞中显示高于信号水平的信号 的细胞的百分比。

[0330] 图42A,42B和42C示出了JNL细胞中CD123 CAR活性的图示。使用含有由NFAT启动子(称 为JNL细胞)驱动的萤光素酶报告基因的Jurkat细胞系评估抗CD123 CAR构建体的活性。CAR 活性被测量为这个NFAT驱动的报告基因的激活。

[0331] 图43A和43B显示CD123表达和活性。图43A显示了原代T细胞中CD123 CAR表达的图示。 使用蛋白L作为检测试剂,在BD LSRFortessa或BD-FACSCano上通过流式细胞术分析测定转 导细胞的百分比(细胞表面上表达抗CD123 CAR)及其相对荧光强度。来自该FACS的高于 未染色细胞的信号的相对荧光强度的门控直方图显示了转导的T细胞的百分比。转导导致CAR阳性细胞范围为12-42%。图43B显示了CD123-CART介导的细胞杀伤的图示。T细胞杀伤 针对稳定表达萤光素酶的表达CD123的MOLM13急性骨髓性白血病细胞。使用未转导的T细胞 来确定非特异性背景杀伤水平。在效应细胞:靶细胞比例为4:1和T细胞向下2倍稀释的范围内 测量CART-CD123的细胞溶解活性,其中效应细胞定义为表达抗CD123嵌合受体的T细胞。通 过将适当数目的T细胞与恒定数目的靶细胞混合来启动测定。20小时后,使用EnVision仪器上 的Bright-Glo™萤光素酶测定法测量萤光素酶信号。

[0332] 图44A和44B显示了使用CD123-CAR的T细胞的转导效率。图44A显示使用1172和1176的T 细胞的转导效率。图44B显示了使用CD123 CAR 2-4的T细胞的转导效率。

[0333] 图45显示了CD123 CAR2-4和1172和1176的流式细胞术,以确定CD4:CD8比例。

[0334] 图46显示CD123 CAR2-4和1172和1176在暴露于CD123+肿瘤细胞时的脱粒。

[0335] 图47显示了用于评估CART细胞(NVS 2-4,1172和1176克隆)对肿瘤靶细胞(MOLM14) 的细胞毒性的萤光素酶测定的图示。

[0336] 图48显示了在D6(CART注射前)和第13天(注射NVS 2-4,1172或1176克隆后6天)或第 20天注射了表达萤光素酶的MOLM14细胞的NSG小鼠中肿瘤负荷的比较。

[0337] 图49A,49B,49C,49D,49E和49F显示CD123在CART19治疗后发生的CD19-neg B细胞急性淋巴性白血病复发中高水平表达。图49A显示在42例复发/难治ALL样品中CD123与CD19相比的表达。图49B显示了B-ALL胚细胞中CD123和CD19共表达。在胚细胞上门控(SSC低，单峰,活的,CD45dim)。图49C显示了白血病干细胞(LSC)的门控策略。CD123在该子集 中高表达。图49D显示CD123和CD19共表达和FISH分析的结果。图49E和49F显示在基线或复 发后CD19和CD123表达的比较。

[0338] 图50A,50B,50C,50D,50E和50F显示了使用表达CD19 CAR(CAR19)或CD123 CAR(CAR123)的T细胞的各种体外测定的结果。图50A显示CD19和CD123表达;图50B显示 CD107a脱粒测定;图50C显示靶向细胞杀伤的能力;图50D和50E显示增殖能力;图50F显示所示 细胞因子的细胞因子产生。

[0339] 图51A,51B和51C显示,表达CD19 CAR(CAR19)或CD123 CAR(CAR123)的CART 细胞在体内小鼠模型中具有抗肿瘤作用。图51A显示由生物发光成像表示的肿瘤负荷;图51B 显示接受CART疗法的小鼠的总生存曲线;和图51C显示外周血中CART123细胞的扩增。

[0340] 图52A,52B,52C,52D,52E和52F表明CART123在抗原缺失复发的体内小鼠模型 中是有活性的。图52A显示了实验方案;图52B显示了相对于CD19表达(顶部图)和响应 于CART19疗法治疗(底部图)在基线和复发疾病中通过生物发光成像表示的疾病进展;图 52C显示施用未转导的T细胞或CART19细胞的小鼠的生物发光图像;图52D显示用CART19 或CART123进行治疗的实验方案;图52E显示疾病进展;和图52F显示了治疗的小鼠的总体存活。

[0341] 图53A,53B和53C显示异种移植小鼠的颅骨骨髓中的ALL-CART相互作用。图53A 显示了实验方案;图53B显示了CART19细胞和CART123细胞与ALL肿瘤相互作用的代表 性多光子XY平面图像,所述ALL肿瘤被工程化以表达CD19和CD123或仅CD123(活动 细胞以虚线圆圈表示,非活动细胞用箭头表示);和图53C是显微镜图像的图形表示。

[0342] 图54A,54B和54C显示了使用CART19和CART123预防CD19-neg复发。图54A显 示了实验方案;图54B显示用未转导的T细胞(顶图),CART19(中图)或CART19和CART123 的组合(底图)处理的小鼠的疾病进展(由BLI表示的肿瘤负荷);和图54C显示了该实验的 总生存期。

[0343] 图55A和55B显示表达CAR19和CAR123(图55A)的T细胞和脱粒测定的结果(图55B)。

[0344] 图56A和56B显示了ALL胚细胞的特征。图56A显示各种标记CD19,CD123,CD10,CD34和CD20的表达;和图56B显示了分选CD19-CD123+细胞的门控策略。

[0345] 图57A,57B,57C和57D显示CART123的抗白血病活性。图57A显示了NALM6细胞 上CD19和CD123的表达;图57B显示了响应于CART19或CART123疗法的肿瘤负荷(由 BLI表示);图57C显示施用CART19或CART123的小鼠的总生存期;和图57D显示了施用 不同剂量CART123的小鼠的总生存期。

[0346] 图58A和58B显示了抗原缺失复发的体内模型的表征。图58A表示CD123阴性复发疾病中CD123的表达;和图58B显示了在体外与基线或复发细胞培养时CART19或CART123 细胞

的脱粒测定。

[0347] 图59显示,在细胞培养系统中,低剂量的RAD001增强了表达CAR的转导的T细胞的增殖。在不同浓度的RAD001(nM)存在下,将CART与NALM6(Nalm-6)细胞共培养。在共培养4天 后评估CAR阳性CD3阳性T细胞(黑色)和总T细胞(白色)的数量。

[0348] 图60描绘了在0.3,1,3和10mg/kg(mpk)的每日RAD001给药或载体给药的NALM6-luc 细胞的肿瘤生长测量。圆圈表示载体;方块表示10mg/kg剂量的RAD001;三角形表示3mg/kg 剂量的RAD001,倒三角形表示1mg/kg剂量的RAD001;菱形表示0.3mg/kg剂量的RAD001。

[0349] 图61A和61B显示了药代动力学曲线,显示具有NALM6肿瘤的NSG小鼠的血液中RAD001的量。图61A显示RAD001的第一剂量后第0天PK。图61B显示最终RAD001剂 量后第14天PK。菱形表示10mg/kg剂量的RAD001;方块表示1mg/kg剂量的RAD001;三 角形表示3mg/kg剂量的RAD001;x表示10mg/kg剂量的RAD001。

[0350] 图62A和62B显示了使用和不使用RAD001给药的人源化CD19 CART细胞的体内增殖。低剂量的RAD001(0.003mg/kg)每天导致CAR T细胞增殖的增强,高于huCAR19增殖的正常 水平。图62A显示CD4+CAR T细胞;图62B显示CD8+CAR T细胞。圆圈表示PBS;正方 形表示huCTL019;三角形表示具有3mg/kg RAD001的huCTL019;倒三角形表示具有 0.3mg/kg RAD001的huCTL019;菱形表示具有0.03mg/kg RAD001的huCTL019;圆圈表示具 有0.003mg/kg RAD001的huCTL019。

[0351] 图63显示了多路FIHC AQUA分析,显示了原发和继发人DLBCL患者样品中 CD3+/PD-1+细胞群体之间的显著差异。

[0352] 图64显示了在DLBCL样品的原发和继发位点显示各种水平的CD19(下图)和PD-L1(上图)的AQUA分析。将40个人类DLBCL患者样品,25个原发和15个继发位点进行多 路FIHC,随后进行AQUA分析以鉴定CD19和PD-L1蛋白的表达水平。

[0353] 图65显示了CAR表达细胞的两个群体的示意图。在左边的群体(合并的)中,每个细胞表示一种类型的CAR。在右边的群体(双顺式CAR)中,每个细胞都表达两种类型的CAR。

[0354] 图66显示了双顺式CARs图。上方CAR具有由P2A蛋白酶切割位点分开的CD19 CAR和CD22 CAR。下方CAR具有由P2A蛋白酶切割位点分开的CD19 CAR和CD123 CAR。

[0355] 图67显示来自双顺反子载体的CD19和CD22 CAR的共表达。

[0356] 图68,顶图显示来自双顺反子载体的CD19和CD123 CAR的共表达。图68,底图,显示这些细胞的抗白血病作用。

[0357] 图69显示用UTD对照CART19或CART22处理后携带CD19阴性B-ALL异种移植物 的小鼠中的肿瘤负荷。

[0358] 图70显示来自五个CR患者,一个未分类患者和六个PD患者的淋巴结和骨髓样品中PD-L1,PD1,LAG3和TIM3(在每组四个条形中从左到右)的表达。

[0359] 图71是显示在存在和不存在m971竞争者的情况下几种CD22 CAR构建体的活化(在RLU中)的图。

[0360] 图72是显示另外的CD22 CAR构建体的激活(在RLU中)的图。

[0361] 图73显示了在IFN-γ测定中指示CD22 CAR活性的三个条形图。

[0362] 图74显示CD22-64和CD22-65 CAR的结合活性。

[0363] 图75是映射由各种CD22 scFv结合的表位的图。

[0364] 详述

[0365] 定义

[0366] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术术语和科技术语具有与如本发明所属领域的 普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0367] 术语“一个(一种)”是指冠词的一个(一种)或多于一个(一种)(即,至少一个(一种))的语法宾 语。例如,“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0368] 当涉及可测量值比如量、暂时持续时间等时,术语"约”是指包括指定值的±20%,或在某 些情况下±10%,或在某些情况下±5%,或在某些情况下±1%,或在某些情况下±0.1%的变化, 因此这样的变化适于进行所公开的方法。

[0369] 本文所用的术语“单采血液成分术”是指本领域公认的体外方法,通过该方法,供体或患 者的血液从供体或患者中移出并穿过分离出所选择的特定成分的装置并返回剩余部分到供体 或患者的循环系统,例如通过再输血。因此,“单采血液成分术样品”是指使用单采血液成分 术获得的样品。

[0370] 术语“生物等同的”是指产生与参考剂量或参考量的参考化合物(例如RAD001)产生的效 果等同的效果所需的参考化合物(例如RAD001)以外的活性剂的量。在一个实施方案中,效 果是mTOR抑制的水平,例如通过P70 S6激酶抑制测量,例如,如在体内或体外测定中评估, 例如通过本文所述的测定法,例如Boulay测定法测量,或通过western印迹测量磷酸化的S6水 平。在一个实施方案中,效果是通过细胞分选测量的PD-1阳性/PD-1阴性T细胞的比例的改变。 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的生物等同量或剂量是实现参考剂量或参考量的参考化合 物相同水平的P70 S6激酶抑制的量或剂量。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的生物等同量或 剂量是与参考剂量或参考量的参考化合物实现PD-1阳性/PD-1阴性T细胞比例相同水平的改变 的量或剂量。

[0371] 术语“抑制”或“抑制剂”包括给定分子例如CD20,CD10,CD19,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的某些参数例如活性的降低。例如,抑制活性,例 如抑制CD20,CD10,CD19,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的 活性至少5%,10%,20%,30%,40%或以上被这个术语包括。因此,抑制不必是100%。可以如 本文所述或通过本领域已知的测定法来测定抑制剂的活性。“B细胞抑制剂”是分子,例如小分子,抗体,CAR或包含CAR的细胞,其导致某种参数,例如活性,例如B细胞的生长或增殖 的降低,或其导致某种参数,例如与B细胞相关的分子的活性的降低。与B细胞相关的分子的 非限制性实例包括在B细胞表面上表达的蛋白质,例如CD20,CD10,CD19,CD22,CD34, CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a。

[0372] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指一组多肽,在最简单的实施方案中通常有两种,其当 在免疫效应细胞中时,提供细胞对靶细胞(通常为癌细胞)的特异性,并产生细胞内信号。在 一些实施方案中,CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和胞质信号传导结 构域(本文中也称为“细胞内信号传导结构域”),其包含衍生自如下所定义的刺激分子和/或 共刺激分子的功能性信号传导结构域。在一些实施方案中,该组多肽在相同的多肽链中,例 如包含嵌合融合蛋白。在一些实施方案中,该组多肽彼此不连续,例如在不同的多肽链中。 在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,其在二聚化分子的存在下可

将多肽彼此偶联，例如可将抗原结合结构域偶联至细胞内信号传导结构域。一方面，CAR的刺激分子是与T细 胞受体复合物(例如CD3ζ)结合的ζ链。在一个方面，细胞质传导结构域包含主要信号传导 结构域(例如，CD3-ζ的主要信号传导结构域)。在一个方面，细胞质信号传导结构域还包含 一个或多个衍生自如下定义的至少一种共刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面，共刺 激分子选自本文所述的共刺激分子，例如4-1BB(即CD137)，CD27和/或CD28。一方面， CAR包含嵌合融合蛋白，其包含细胞外抗原结合结构域，跨膜结构域和包含衍生自刺激分子 的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。一方面，CAR包含嵌合融合蛋白，其包 含细胞外抗原结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，细胞内信号传导结构域包 含衍生自共刺激分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。 一方面，CAR包含嵌合融合蛋白，其包含细胞外抗原结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号 传导结构域，细胞内信号传导结构域包含衍生自一个或多个共刺激分子的两个功能性信号传 导结构域和衍生自刺激分子的功能性信号传导结构域。一方面，CAR包含嵌合融合蛋白，其 包含细胞外抗原结合结构域，跨膜结构域和细胞内信号传导结构域，细胞内信号传导结构域 包含衍生自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号传导结构域和衍生自刺激性的功能 性信号传导结构域。在一个方面，CAR包含CAR融合蛋白的氨基末端(N-ter)上任选的前导 序列。在一个方面，CAR还包含在细胞外抗原结合结构域的N末端处的前导序列，其中前导 序列任选地在细胞加工过程中从抗原结合结构域(例如，scFv)切割并将CAR定位于细胞膜。

[0373] 本文所用的短语“与CD20表达相关的疾病”包括但不限于与CD20(例如，野生型或突变 型CD20)表达相关的疾病或与表达或在任何时间表达的CD20(例如，野生型或突变型CD20) 相关的病症，包括例如，增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良，骨髓增 生异常综合征或白血病前期；或与表达CD20(例如野生型或突变型CD20)的细胞相关的非癌 症相关的适应证。为了避免疑问，与CD20表达相关的疾病可以包括与目前不表达CD20但是 曾经表达CD20的细胞相关的病症，例如，因为CD20表达已被下调，例如由于用靶向CD20的 分子，例如，CD20 CAR治疗。一方面，与CD20表达相关的癌症是血液癌症。一方面，血液 癌症包括但不限于AML，骨髓增生异常综合征，ALL，毛细胞白血病，幼淋巴细胞白血病， 慢性髓性白血病，霍奇金淋巴瘤，母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤等。与CD20表达表达相 关的其他疾病包括但不限于例如与CD20表达相关的非典型和/或非经典癌症，恶性肿瘤，癌 前病症或增殖性疾病。也可以包括与CD20表达相关的非癌症相关适应证。在一些实施方案中， CD20表达细胞表达或在任何时间表达CD20 mRNA。在一个实施方案中，表达CD20的细胞产 生CD20蛋白(例如野生型或突变型)，CD20蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在一 个实施方案中，CD20表达细胞在一个点产生可检测水平的CD20蛋白，并且随后基本上不产 生可检测的CD20蛋白。

[0374] 本文所用的短语“与CD22表达相关的疾病”包括但不限于与CD22(例如，野生型或突变 型CD22)表达相关的疾病或与表达或在任何时间表达的CD22(例如，野生型或突变型CD22) 相关的病症，包括例如，增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良，骨髓增 生异常综合征或白血病前期；或与表达CD22(例如野生型或突变体CD22)的细胞相关的非癌 症相关的适应证。为了避免疑问，与CD22表达相关的疾病可以包括与目前不表达CD22但是 曾经表达CD22的细胞相关的病症，例如，因为CD22表达已被下调，例如由于用靶

向CD22的 分子,例如,CD22 CAR治疗。一方面,与CD22表达相关的癌症是血液癌症。一方面,血液 癌症包括但不限于AML,骨髓增生异常综合征,ALL,毛细胞白血病,幼淋巴细胞白血病, 慢性髓性白血病,霍奇金淋巴瘤,母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤等。与CD22表达表达相 关的其他疾病包括但不限于例如与CD22表达相关的非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌 前病症或增殖性疾病。也可以包括与CD22表达相关的非癌症相关适应证。在一些实施方案中, CD22表达细胞表达或在任何时间表达CD22 mRNA。在一个实施方案中,表达CD22的细胞产 生CD22蛋白(例如野生型或突变型),CD22蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在一 个实施方案中,CD22表达细胞在一个点产生可检测水平的CD22蛋白,并且随后基本上不产 生可检测的CD22蛋白。

[0375] 如本文所用,除非另有说明,术语“预防”,“防止”和“阻止”是指在受试者开始患有病症 或病症复发之前发生的作用。预防不需要完全预防病症;这一术语包括部分预防或减轻病症或 病症的症状,或降低发生病症的风险。

[0376] 如本文所用,“组合”施用是指在受试者患有疾病的过程中将两种(或更多种)不同的治 疗递送给受试者,例如,在诊断出受试者患有病症之后和在该病症已被治愈或消除之前,或 由于其他原因治疗已经停止之前递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,当第二种治疗 的递送开始时,一种治疗的递送仍然发生,使得在施用方面存在重叠。这在本文中有时被称 为“同时”或“同时递送”。在其他实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前 结束。在任一情况的一些实施方案中,由于联合施用,治疗更有效。例如,第二种治疗更有 效,例如,与如果第二种治疗是在不进行第一种治疗的情况下施用的,或者与第一种治疗看 到的相似的情况相比,比较少的第二种治疗可以看到相同的效果,或第二种治疗可以更大程 度的减轻症状。在一些实施方案中,递送使得症状或与病症相关的其它参数的减轻大于在不 存在另一种治疗的情况下递送的一种治疗时观察到的症状的减轻。两种治疗的效果可以是部 分累加的,完全累加的或大于累加的。递送可以使得当第二种治疗递送时仍然可以检测到递 送的第一种治疗的效果。在一个实施方案中,以本文所述的剂量和/或给药方案施用CAR表达 细胞,并且以本文所述的剂量和/或剂量方案施用增强CD19 CAR表达细胞活性的B细胞抑制剂 或活性剂。

[0377] 本文使用的术语“衍生自”表示第一和第二分子之间的关系。它通常是指第一分子和第二 分子之间的结构相似性,并不意味着或包括衍生自第二分子的第一分子的方法或来源限制。 例如,在衍生自CD3ζ分子的细胞内信号传导结构域的情况下,细胞内信号传导结构域保留足 够的CD3ζ结构,使其具有所需的功能,即在适当条件下产生信号的能力。它不意味着或包括 限制产生细胞内信号传导结构域的特定方法,例如,这并不意味着提供细胞内信号传导结构 域,必须从CD3ζ序列开始并删除不需要的序列,或者施加突变,以达到细胞内信号传导结构 域。

[0378] 术语“信号传导结构域”是指通过在细胞内传递信息而起作用的蛋白质的功能性部分,用 来通过产生第二信使或通过响应这样的信使起效应物作用经由确定的信号传导途径调节细胞 的活性。

[0379] 如本文所用,术语“CD19”是指分化抗原簇19蛋白质,其是在白血病前体细胞上可检测的 抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot 中找到。例如,人CD19的氨基酸序列可以以UniProt/Swiss-Prot登录号

P15391找到,编码人CD19 的核苷酸序列可以在登录号NM_001178098中找到。如本文所用,“CD19”包括包含突变的蛋 白质,例如全长野生型CD19的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。CD19在大多数B谱系 癌中表达,包括例如急性淋巴细胞白血病,慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤。下面在“与 CD19表达相关的疾病”的定义中提供了表达CD19的其他细胞。它也是B细胞祖细胞的早期标 志物。参见,例如,Nicholson et al.Mol.Immun.34(16-17):1157-1165(1997)。一方面,CART 的抗原结合部分识别并结合CD19蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD19蛋白在癌细 胞上表达。

[0380] 正如本文中使用的那样,术语“抗体”是指源于特异性地结合抗原的免疫球蛋白分子的蛋 白质或多肽序列。抗体可以为多克隆的或单克隆的、多链或单链、或完整的免疫球蛋白,并 且可以来源于天然来源或重组来源。抗体可以为免疫球蛋白分子的四聚体。

[0381] 术语“抗体片段”是指保留与抗原的表位特异性地相互作用(例如,通过结合、空间位阻、 稳定化/去稳定化、空间分布)的能力的抗体的至少一部分。抗体片段的实例包括,但不限于 Fab,Fab’、F(ab’)2、Fv片段、scFv抗体片段、二硫键-连接的Fvs(sdFv)、由VH和CH1结构域 组成的Fd片段、线性抗体、单域抗体比如sdAb(VL或VH)、camelid VHH结构域、由抗体片段 (例如包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段)形成的多特异性抗体和抗体 的分离的CDR或其它表位结合片段。抗原结合片段也可以被掺入单域抗体、最大抗体、微小 抗体、纳米抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv(参见,例如Hollinger 和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1136,2005)。抗原结合片段也可以接枝到基于多肽 的支架,比如III型纤连蛋白(Fn3)(参见美国专利号:6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽微小抗 体)。

[0382] 术语“scFv”是指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区 的抗体片段的融合蛋白,其中所述轻链和重链可变区经由例如合成接头,例如短的柔性多肽 接头是邻接的,并且能够以单链多肽形式表达,且其中所述scFv保留其所来源的完整抗体的 特异性。除非指定,否则如正如本文中使用的那样,scFv可以以任一顺序(例如相对于多肽的 N-末端和C末端)具有所述的VL和VH可变区,scFv可以包括VL-接头-VH或可以包括VH-接头 -VL。

[0383] 本文所用的术语“互补决定区”或“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可 变区内的氨基酸序列。例如,一般来说,在每个重链可变区中有三个CDR(例如HCDR1,HCDR2和HCDR3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR(LCDR1,LCDR2和LCDR3)。给定的CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的方案的任一一种确定,所述示方 案包括那些由Kabat et al.(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed. Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案), Al-Lazikani et al.,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)描述的那些或其组合。根 据Kabat编号方案,在一些实施方案中,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1),50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸 残基编号为24-34(LCDR1),50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。根据Chothia编号方案,在 一些实施方案中,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1),52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3);VL中的CDR氨基酸残基编号为26-32(LCDR1),50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。在组合的Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施方案中,CDR对应于 作为Kabat CDR,

Chothia CDR或两者的一部分的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,CDR 对应于VH(例如哺乳动物VH,例如人VH)中的氨基酸残基26-35(HCDR1),50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3);和VL(例如哺乳动物VL,例如人VL)中的氨基酸残基24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。

[0384] 如本文所用,术语“结合结构域”或“抗体分子”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域 序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。术语“结合结构域”或“抗体分子”包括抗体和抗 体片段。在一个实施方案中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如其包含多个免疫球蛋白可 变结构域序列,其中所述多个的第一免疫球蛋白可变结构域序列对第一表位具有结合特异性, 所述多个的第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在一个实施方案中, 多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两种抗原具有特异性。双特 异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对 第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。

[0385] 包含抗体或其抗体片段的本发明的CAR的部分可以以多种形式存在,其中抗原结合结构 域表达为连续多肽链的一部分,包括例如单结构域抗体片段(sdAb),单链抗体(scFv),人源 化抗体或双特异性抗体(Harlow et al.,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow et al.,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor,New York;Houston et al.,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883; Bird et al.,1988,Science 242:423-426)。在一个方面,本发明的CAR组合物的抗原结合结构域 包含抗体片段。在另一方面,CAR包含包含scFv的抗体片段。

[0386] 术语“抗体重链”是指以其天然存在的构型存在于抗体分子中且通常决定抗体所属类型的 两种多肽链中较大者。

[0387] 术语“抗体轻链”是指以其天然存在构型存在于抗体分子中的两种多肽链的较小者。κ(k) 和λ(l)轻链是指两种主要的抗体轻链的同种型。

[0388] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,比如例如由噬菌体或酵母菌表达系 统表达的抗体。该术语也应当解释为指已经通过合成编码抗体的DNA分子(且其中DNA分子 表达抗体蛋白质)或指定抗体的氨基酸序列产生的抗体,其中所述DNA或氨基酸序列已经使用 重组DNA或本领域可获得且熟知的氨基酸序列技术获得。

[0389] 术语“抗原”或“Ag”是指引起免疫应答的分子。该免疫应答可以涉及抗体产生或有特异性 免疫能力的细胞的活化或两者。本领域技术人员应当理解包括实际上所有蛋白质或肽的任一 大分子都可以充当抗原。此外,抗原可以来源于重组或基因组DNA。当在本文中使用该术语 时,本领域技术人员应当理解包括编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序 列的任一DNA,因此编码“抗原”。此外,本领域技术人员应当理解抗原无需仅通过基因的全 长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用超过一个基因的部分核苷酸序 列,并且这些核苷酸序列以不同组合排列以编码引发期望免疫应答的多肽。而且,本领域技 术人员应当理解抗原根本无需由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以合成产生,或者可以 来源于生物样品,或者可以是除了多肽之外的大分子。这样的生物样品可以包括,但不限于 组织样品、肿瘤样品、具有其它生物组分的细胞或液体。

[0390] 术语“竞争”或“交叉竞争”在本文中可互换使用来指抗体分子干扰抗体分子(例如本文提 供的抗CD20或CD22抗体分子)与靶标(例如,人CD20或CD22)的结合的能力。结合的干扰可以是直接的或间接的(例如,通过抗体分子或靶标的变构调节)。抗体分子能够干扰另一种抗体分子与靶标结合的程度,因此可以说是否竞争的程度可以使用例如如本文所述的 竞争结合测定法来确定。在一些实施方案中,竞争结合测定法是定量竞争测定法。在一些实 施方案中,当在竞争结合测定法(例如,本文所述的竞争测定法)中第一抗体分子与靶标的 结合降低10%或以上,例如20%或以上,30%或以上,40%或以上,50%或以上,55%或以 上,60%或以上,65%或以上,70%或以上,75%或以上,80%或以上,85%或以上,90% 或以上,95%或以上,98%或以上,99%或以上时,称第一抗体分子与第二抗体分子竞争结 合靶标。

[0391] 如本文所用,术语“表位”是指与抗体分子特异性相互作用的抗原(例如人CD20或CD22) 的部分。这些在本文中称为表位决定簇的部分通常包含元件或作为元件的一部分如氨基酸侧 链或糖侧链。可以例如通过本领域已知的方法或本文公开的方法,例如通过晶体学或通过氢 氘交换来定义表位决定簇。抗体分子上与表位决定簇特异性相互作用的至少一个或一些部分 通常位于CDR中。通常,表位具有特定的三维结构特征。通常,表位具有特定的电荷特征。一些表位是线性表位,而其他表位是构象表位。

[0392] 术语“抗癌作用”是指可以通过多种手段表现的生物作用,包括但不限于,例如,肿瘤体 积的减少,癌细胞数目的减少,转移灶数目的减少,期望寿命的增加,癌细胞增殖的减少, 癌细胞存活的减少或与癌性病症相关的各种生理症状的改善。“抗癌作用”还可以通过本文所 述的肽,多核苷酸,细胞和抗体首先在预防癌症发生中的能力来表现。术语“抗肿瘤效应”是 指可以通过多种手段表现的生物效应,包括但不限于,例如,肿瘤体积的减少,肿瘤细胞数 目的减少,肿瘤细胞增殖的减少,或肿瘤细胞存活的减少。

[0393] 术语“自体的”是指衍生自相同个体的任一材料,其随后被重新引入个体中。

[0394] 术语“同种异体的”是指来源于与将导入物质的个体相同物种的不同动物的任一物质。当 一个或更多个基因座的基因不相同时,两个或多个个体被认为是彼此同种异体的。在某些方 面,来自相同物种的个体的同种异体物质可以在遗传上是足够不同的而以在抗原性上相互作 用。

[0395] 术语“异种的”是指移植物来源于不同种类的动物。

[0396] 术语“癌症”是指特征为异常细胞的不受控制生长的疾病。癌细胞可以局部扩散或穿 过血流和淋巴系统至身体的其他部分。各种癌症的实例是本文描述的,包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、 淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中可互换使用,例如,这两个术 语包括实体和液体,例如,弥散性或循环肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括 恶化前,以及恶性癌症和肿瘤。

[0397] 术语“与癌症相关的抗原”或“肿瘤抗原”或“增殖性病症抗原”或“与增殖性病症相关的抗 原”可互换地是指与正常细胞相比全部地或以片段形式(例如MHC/肽)优选在癌细胞表面上 被表达的分子(通常为蛋白质、碳水化合物或脂质),并且其用于将药理学活性剂优先靶向癌 细胞。在一些实施方案中,肿瘤抗原为由正常细胞和癌细胞表达的标志,例如谱系标志例如 在B细胞上的CD19。在某些方面,本发明的肿瘤抗原来源于癌症,包括但不限

于原发性或 转移性黑素瘤,胸腺瘤,淋巴瘤,肉瘤,肺癌,肝癌,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,白 血病,子宫癌,宫颈癌,膀胱癌,肾癌,和腺癌如乳腺癌,前列腺癌,卵巢癌,胰腺癌等等。在一些实施方案中,肿瘤抗原是特异性增殖性病症共有的抗原。在一些实施方案中,与癌症 相关的抗原为在癌细胞中与正常细胞相比过表达的细胞表面分子,例如与正常细胞相比1倍 过表达、2倍过表达、3倍或以上过表达。在一些实施方案中,与癌症相关的抗原为癌细胞中 被不适当地合成的细胞表面分子,例如,与正常细胞上被表达的分子相比含有缺失、添加或 突变的分子。在一些实施方案中,与癌症相关的抗原应当全部或以片段形式(例如,MHC/肽) 被专一性地表达在癌细胞的细胞表面上,而不是在正常细胞的表面上合成或表达。在一些实 施方案中,本发明的CAR包括包含结合MHC呈递肽的抗原结合结构域(例如,抗体或抗体 片段)的CAR。通常,来源于内源蛋白质的肽填充主要组织相容性复合体(MHC)的I类分子的 口袋,并且被CD8+T淋巴细胞上的T细胞受体(TCRs)识别。I类MHC复合体由全部有核细 胞组成型表达。在癌症中,病毒特异性和/或肿瘤特异性肽/MHC复合体代表免疫疗法的独特 类型的细胞表面靶点。已经描述了在人类白细胞抗原(HLA)-A1或HLA-A2的情形中来源于病 毒或肿瘤抗原的TCR-样抗体靶向肽(参见,例如Sastry等人,J Virol.2011 85(5):1935-1942; Sergeeva等人,Blood,2011 117(16):4262-4272;Verma等人,J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen等人,Gene Ther 2001 8(21):1601-1608;Dao等人,Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33;Tassev等人,Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100)。例如,TCR-样抗体可以 从筛选库比如人scFv噬菌体展示文库鉴别。

[0398] 短语“与CD19表达相关的疾病”包括但不限于与CD19(例如,野生型或突变型CD19)表达 相关的疾病或与表达或在任何时间表达CD19(例如,野生型或突变型CD19)的细胞相关的病 症,包括,例如增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症例如骨髓发育不良,骨髓增生异常 综合征或白血病前期;或与表达CD19的细胞相关的非癌症相关适应证。为了避免疑问,与CD19 表达相关的疾病可以包括与目前不表达CD19的细胞相关的病症,例如因为CD19表达已被下 调,例如由于用靶向CD19的分子例如,CD19 CAR治疗,但从前表达CD19。一方面,与CD19 的表达相关的癌症是血液癌症。一方面,血液癌症是白血病或淋巴瘤。一方面,与CD19的表 达相关的癌症包括癌症和恶性肿瘤,包括但不限于例如一种或多种急性白血病,包括但不限 于例如B细胞急性淋巴性白血病(BALL),T细胞急性淋巴性白血病(TALL),急性淋巴性白血 病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性髓性白血病(CML)和慢性淋巴细胞 性白血病(CLL)。与CD19表达相关的附加癌症或血液病症包括但不限于例如B细胞幼淋巴 细胞白血病,母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤,伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤 泡淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞滤泡淋巴瘤,恶性淋巴细胞增生症,MALT淋巴 瘤,套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓发育不良和骨髓增生异常 综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆母细胞淋巴瘤,浆细胞样树突细胞瘤,瓦尔登 斯特伦巨球蛋白血症,以及“白血病前期”,其是由无效产生(或发育异常)髓血细胞联合的一组 不同的血液学状况,等等。与CD19表达相关的其它疾病包括但不限于例如与CD19表达相关 的非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病症或增殖性疾病。与CD19表达相关的非癌症 相关适应证包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮),炎症性疾病(变态反应和哮喘) 和移植。在一些实施方案中,CD19表达细胞表达或在任何时间表达了CD19 mRNA。在一个 实施方案中,表达CD19的细胞产生CD19蛋白(例如野生型或突变

型),并且CD19蛋白可以 以正常水平或降低的水平存在。在一个实施方案中,表达CD19的细胞在一点产生可检测水平 的CD19蛋白质,随后基本上不产生可检测的CD19蛋白。

[0399] 术语“保守的序列修饰”是指不会显著地影响或改变含有该氨基酸序列的抗体或抗体 片段的结合特征的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。修饰可 以通过本领域已知的标准技术(比如定点诱变和PCR-介导的诱变)引入到本发明的抗体或 抗体片段中。保守的氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代的 取代。在本领域中已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天门冬氨酸、谷氨酸)、不带 电的极性侧链(例如,甘氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱 氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯 丙氨酸、甲硫氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,在本发明的CAR之内的一个或更 多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的氨基酸残基替代,并且可以使用本文所述的 功能性测定来测试改变的CAR。

[0400] 术语“刺激”是指通过将刺激性分子(例如,TCR/CD3复合物或CAR)与其同源配体(或 CAR的情况下的肿瘤抗原)结合诱导的初步应答,从而介导信号转导事件,例如但不限于通 过TCR/CD3复合物的信号转导或通过适当的NK受体或CAR的信号传导结构域的信号转导。刺 激可以介导某些分子的改变的表达。

[0401] 术语“刺激分子”是指由免疫细胞(例如T细胞,NK细胞或B细胞)表达的分子,其提供对 于免疫细胞信号途径的至少一些方面以刺激方式调节免疫细胞活化的细胞质信号序列。在一 个方面,该信号是由例如TCR/CD3复合物与加载肽的MHC分子的结合引发,并导致T细胞应 答的介导的主要信号,所述应答包括但不限于,增殖,活化,分化等。以刺激方式起作用的 主要细胞质信号传导序列(也称为“主要信号传导结构域”)可以含有称为基于免疫受体酪氨 酸的激活基序或ITAM的信号基序。在本发明中特别使用的含有ITAM的细胞质信号传导序列 的实例包括但不限于衍生自CD3ζ,共同FcRγ(FCER1G),FcγRIIa,FcRβ(FcεR1b),CD3 γ,CD3δ,CD3ε,CD79a,CD79b,DAP10和DAP12的那些。在本发明的特异性CAR中,在本发明的任一个或更多个CAR中的胞内信号传导结构域包括细胞内信号传导序列,例如CD3-ζ的初级信号传导序列。在本发明的特异性CAR中,CD3-ζ的初级信号传导序列是如SEQ ID NO:17中提供的序列或来自非人类种类例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等同残基。在本发明的特异性CAR中,CD3-ζ的初级信号传导序列是如SEQ ID NO:43中提供的序列或来自非人类种类例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等同残基。

[0402] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指其表面上呈递与主要组织相容性复合体(MHC的)复合 的外来抗原的免疫系统细胞,比如辅助细胞(例如,B-细胞、树突细胞等)。T-细胞可以使用其 T-细胞受体(TCR)识别这些复合体。APC加工抗原且将其呈递给T-细胞。

[0403] 本文使用的术语“免疫效应细胞”是指参与免疫应答,例如参与促进免疫效应应答的细胞。 免疫效应细胞的实例包括T细胞,例如α/βT细胞和γ/δT细胞,B细胞,天然杀伤(NK)细胞, 天然杀伤T(NK-T)细胞,肥大细胞和骨髓来源的吞噬细胞。

[0404] 如本文所用的术语“免疫效应功能或免疫效应应答”是指例如增强或促进靶细胞的免疫攻 击的免疫效应细胞的功能或应答。例如,免疫效应功能或应答是指促进靶细胞杀

死或抑制其 生长或增殖的T细胞或NK细胞的特性。在T细胞的情况下,主要刺激和共刺激是免疫效应功 能或应答的实例。

[0405] 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溶解活性或辅 助活性,包括细胞因子的分泌。

[0406] 如本文所用的术语“细胞内信号传导结构域”是指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结 构域可以产生促进含CAR细胞例如CART细胞的免疫效应功能的信号。例如在CART细胞中免 疫效应功能的实例包括溶细胞活性和辅助活性,包括细胞因子的分泌。在实施方案中,细胞 内信号结构域是蛋白质的部分,其转导效应功能信号并引导细胞进行特化功能。虽然可以使 用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下,不必使用整个链。就使用胞内信号传导结构 域的截短部分而言,此类截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。术 语胞内信号传导结构域因此意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任一 截短部分。

[0407] 在一个实施方案中,胞内信号传导结构域可以包括主要胞内信号传导结构域。示例性的 主要胞内信号传导结构域包括来源于负责初次刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些。在一个 实施方案中,胞内信号传导结构域可以包括共刺激细胞内结构域。示例性的共刺激胞内信号 传导结构域包括来源于负责共刺激信号或抗原独立的刺激的分子的那些。例如,在CART的 情况下,主要胞内信号传导结构域可以包含T细胞受体的细胞质序列,并且共刺激胞内信号传 导结构域可以包含来自共同受体或共刺激性分子的细胞质序列。

[0408] 主要胞内信号传导结构域可以包括被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信 号传导基序。含有ITAM的主要细胞质信号传导序列的实例包括,但不限于来源于下述的那 些:CD3ζ、FcRγ、共同FcRγ(FCER1G),FcγRIIa,FcRβ(FcεR1b),CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD22, CD79a,CD79b,CD278(“ICOS”),FcεRI,CD66d、CD32,DAP10和DAP12。

[0409] 术语“ζ”或备选地“ζ链”、“CD3-ζ”或“TCRζ”定义为如GenBan Acc.No.BAG36664.1提供的 蛋白质或来自非人类种类(例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等)的等同残基,且“ζ刺激结构域” 或备选地“CD3-ζ刺激结构域”或“TCR-ζ刺激结构域”定义为来自ζ链或其功能衍生物的细胞质 结构域的氨基酸残基,其足以在功能上传递T细胞活化所需的起始信号。在一个方面,ζ的细 胞质结构域包括GenBank Acc.No.BAG36664.1的残基52至164或作为其功能性同源物的来自 非人类种类(例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等)的等同残基。在一个方面,“ζ刺激结构域” 或“CD3-ζ刺激结构域”是如SEQ IDNO:17提供的序列。在一个方面,“ζ刺激结构域”或“CD3-ζ 刺激结构域”为如SEQ IDNO:43提供的序列。

[0410] 术语“共刺激性分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其特异性地结合共刺激配体, 从而介导T细胞的共刺激反应,比如但不限于增殖。共刺激性分子为除了抗原受体或其配 体之外的细胞表面分子,其促进有效的免疫应答。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子,TNF受体蛋白,免疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号淋巴细胞活化 分子(SLAM蛋白),激活NK细胞受体,BTLA,Toll配体受体,OX40,CD2,CD7,CD27, CD28,CD30,CD40,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),4-1BB(CD137),B7-H3,CDS, ICAM-1,ICOS(CD278),GITR,BAFFR,LIGHT,HVEM(LIGHTR),KIRDS2,SLAMF7, NKp80(KLRF1),NKp44,NKp30,NKp46,CD19,CD4,CD8α,CD8β,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα, ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d, ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1,ITGAM,CD11b,

ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29, ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,NKG2D,NKG2C,TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1 (CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69,SLAMF6(NTB-A,Ly108), SLAM(SLAMF1,CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,LAT, GADS,SLP-76,PAG/Cbp,CD19a,和与CD83特异性结合的配体。

[0411] 共刺激胞内信号传导结构域是指共刺激分子的细胞内部分。胞内信号传导结构域可 以包括分子的全部细胞内部分或全部天然胞内信号传导结构域、或其功能片段或衍生物。

[0412] 术语“4-1BB”是指具有如GenBank Acc.No.AAA62478.2提供的氨基酸序列的TNFR超家 族的成员,或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基;并且“4-1BB 共刺激结构域”被定义为GenBank Acc.No..AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人类 物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。在一个方面,“4-1BB共刺激结构域” 为如SEQ ID NO:16提供的序列或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同 残基。

[0413] 术语“编码”是指多核苷酸比如基因、cDNA、或mRNA中的核苷酸的特异性序列在生物学 过程中作为合成其它聚合物和大分子的模板的固有特性,该聚合物以及大分子具有确定的核 苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列及由其得到的生物学特性。因此, 如果与所述基因对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则基因、cDNA或RNA编码蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常被提供在序列表中的编码链 和用作转录基因或cDNA的模板的非编码链这两者都可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白 或其他产物。

[0414] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括作为彼此的简并形式且编码相 同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可包括内含子,其 达到编码蛋白质的核苷酸序列可以在一些形式中含有内含子的程度。

[0415] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换地使用,并且是指如本文中所述有效地实 现特定生物学结果的化合物、制剂、物质或组合物的量。

[0416] 术语“内源的”是指来自或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任一物质。

[0417] 术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任一物质。

[0418] 术语“表达”是指由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0419] 术语“转移载体”是指包括分离的核酸且可用于将所分离的核酸递送至细胞内部的物质组 合物。大量载体是本领域已知的,包括,但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物有 关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也 应当被解释为进一步包括非质粒和促进核酸转移到细胞中的非病毒化合物,比如例如聚赖氨 酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的实例包括,但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、 逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0420] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,其包含有效连接要表达的核苷酸序列的 表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由 宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些,包括被掺入重组 多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、

逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0421] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒家族的种类。慢病毒在逆转录病毒中是独特的,因为其能 够感染非分裂细胞;它们可以将大量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,从而它们是基因 递送载体的最有效方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。

[0422] 术语“慢病毒载体”是指来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,特别地包括自我灭活 性慢病毒载体,如Milone等人,Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)中提供的。可用于临床中的 慢病毒载体的其它实例包括,但不限于例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR®基因递 送技术,来自Lentigen的LENTIMAX®载体系统等。慢病毒载体的非临床种类也是可获得的, 并且将是本领域技术人员已知的。

[0423] 术语“同源的”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子之间比如两个DNA 分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的亚基位 点被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中的每个的位置被腺嘌呤占据时,则 它们在该位置是同源的或同一的。两个序列之间的同源性为匹配或同源位置的数量的直接函 数;例如,如果两个序列中的一半位点(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)为同 源的,则这两个序列是50%同源;如果90%的位点(例如10个中的9个)是匹配的或同源的,则 这两个序列是90%同源的。

[0424] 非人(例如,鼠科动物)抗体“人源化的”的形式是含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的 嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(比如Fv、Fab、Fab’、F(ab’)2或抗体的其它抗原结 合子序列)。对于大部分,人源化的抗体和其抗体片段是人免疫球蛋白(接受者抗体或抗体片 段),其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望特异性、亲和性和能力的比 如小鼠、大鼠或兔子的非人类物种(供体抗体)的CDR的残基替代。在某些情况下,人免疫球 蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应非人类残基替代。此外,人源化抗体/抗体片段可以包括既没 有在接受者抗体中发现,也没有在所引入的CDR或构架序列中发现的残基。这些修饰可以进 一步改进和优化抗体或抗体片段性能。通常,人源化抗体或其抗体片段将包含至少一个且典 型地两个可变结构域的基本上全部,其中所有的或基本上所有的CDR区域对应于非人免疫球 蛋白的那些,并且所有或重要部分的FR区域为人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体或抗体 片段也可以包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地为人免疫球蛋白的那些。关于 进一步的细节,参见Jones等人,Nature,321:522-525,1986;Reichmann等人,Nature,332: 323-329,1988;Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596,1992。

[0425] “完全人类”是指比如抗体或抗体片段的免疫球蛋白,其中整体分子具有人类来源或由与 抗体或免疫球蛋白的人类形式相同的氨基酸序列组成。

[0426] 术语“分离的”是指从天然状态改变或除去。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是 “分离的”,但是与其天然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸或肽为“分离的”。分离 的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境比如例如宿主细 胞中。

[0427] 在本发明的上下文中,使用下述通常存在的核酸碱基的缩写。“A”是指腺苷、“C”是指胞 嘧啶、“G”是指鸟苷、“T”是指胸苷、和“U”是指尿苷。

[0428] 术语“有效连接”或“转录控制”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接,

其导致 异源核酸序列的表达。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能性关系时，第一核酸 序列与第二核酸序列有效连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子有 效连接编码序列。有效连接的DNA序列可以彼此邻接，并且例如在结合两个蛋白编码区时必 需在同一读码框中。

[0429] 术语免疫原性的组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或 胸骨内注射、瘤内或输注技术。

[0430] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA) 及其聚合物。术语“核酸”包括基因，cDNA或mRNA。在一个实施方案中，核酸分子是合成的 (例如化学合成的)或重组的。除非明确地限定，否则该术语包括含有天然核苷酸的类似物 或衍生物的核酸，所述类似物或衍生物具有与参考核酸类似的结合性质，并且以与天然存在 核苷酸类似的方式代谢。除非另有说明，否则特定的核酸序列也隐含地包括其保守修饰的变 体(例如，简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指定的序列。特别地，简并密码子取代可以通过产生序列而实现，所述序列中一个或更多个所选择的(或所 有的)密码子的三个位置被混合碱基和/或去氧肌苷残基取代(Batzer等人，Nucleic Acid Res. 19:5081(1991)；Ohtsuka等人，J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985)；和Rossolini等人，Mol.Cell. Probes 8:91-98(1994))。

[0431] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用，并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组 成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸，并且对于可以包括蛋白质或肽的序列的 氨基酸的最大数量没限制。多肽包括含有彼此通过肽键结合的两个或多个氨基酸的任一肽或 蛋白质。正如本文中使用的那样，该术语是指短链(其在本领域通常也称为例如肽、寡肽和寡 聚物)以及较长链(其在本领域通常也称为蛋白质，其存在多种类型)。“多肽”包括例如生物学 活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同型二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、 衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0432] 术语“启动子”是指被细胞的合成机构识别的、或被引入了合成机构、启动多核苷酸序列 的特异性转录所需要的DNA序列。

[0433] 术语“启动子/调节序列”是指有效连接启动子/调节序列的基因产物的表达所需的核酸序 列。在某些情况下，该序列可以是核心启动子序列，并且在其它情况下，该序列也可包括增 强子序列及表达基因产物所需的其它调控元件。启动子/调节序列可以例如是以组织特异性方 式表达基因产物的序列。

[0434] 术语“组成型”启动子是指有效连接编码或指定基因产物的多核苷酸时，在细胞的大多数 或全部生理条件下引起基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0435] 术语“可诱导的”启动子是指当有效连接编码或指定基因产物的多核苷酸时，基本上仅当 细胞中存在对应于启动子的诱导物时，才引起基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0436] 术语“组织特异性的”启动子是指当有效连接编码或指定基因的多核苷酸时，基本上仅当 细胞为对应于启动子的组织类型的细胞时才引起基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0437] 如在scFv的上下文中使用的那样，术语“柔性的多肽接头”或“接头”是指由比如单独或联 合使用的甘氨酸和/或丝氨酸残基的氨基酸组成的肽接头，其将可变的重链和可变

的轻链区域 连接在一起。在一个实施方案中，柔性的多肽接头为Gly/Ser接头且包含氨基酸序列 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$，其中n为等于或大于1的正整数。例如，n＝1、n＝2、n＝3.n＝4、n＝5,n＝6、n＝7、 n＝8、n＝9和n＝10(SEQ ID NO:105)。在一个实施方案中，柔性的多肽接头包括但不限于$(Gly_4\ Ser)_4$(SEQ ID NO:106)或$(Gly_4\ Ser)_3$(SEQ ID NO:107)。在另一个实施方案中，接头包括多个 重复的(Gly_2Ser)、(GlySer)或(Gly_3Ser)(SEQ ID NO:108)。在本发明的范围内也包括被描述在 WO2012/138475中的接头，将其并入本文作为参考。

[0438] 正如本文中使用的那样，5'帽(也称为RNA帽，RNA7-甲基鸟苷帽或RNA m^7G帽)是一种 修饰的鸟嘌呤核苷酸，其在开始转录后不久已经被添加到真核信使RNA的“前面”或5'端。所 述5'帽由与第一个转录的核苷酸连接的端基组成。其存在对于被核糖体识别和保护免遭RNA 酶很重要。帽加入与转录偶联，并且以辅助转录方式进行，使得彼此影响。在转录开始后不 久，合成的mRNA的5'端被与RNA聚合酶缔合的帽合成复合体结合。该酶复合体催化mRNA 加帽所需的化学反应。合成以多步生化反应方式进行。加帽部分可以经修饰以调节mRNA的 功能性，比如其翻译稳定性或效率。

[0439] 正如本文中使用的那样，“体外转录的RNA”是指已经体外合成的RNA，例如，mRNA。通常，体外转录的RNA是由体外转录载体产生的。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0440] 如本文所用，“聚(A)”是通过聚腺苷酸化连接到mRNA的一系列腺苷。在瞬时表达的构 建体的一些实施方案中，聚A在50和5000之间(SEQ ID NO:28)，例如大于64，例如大于100， 例如大于300或400。聚(A)序列可以通过化学或酶修饰来调节mRNA功能，如定位，稳定性或翻译效率。

[0441] 正如本文中使用的那样，“聚腺苷酸化”是指聚腺苷部分或其修饰的变体与信使RNA分子 的共价连接。在真核生物中，大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端被聚腺苷酸化。3'聚(A) 尾部为通过酶聚腺苷酸聚合酶的作用添加到前-mRNA的腺嘌呤核苷酸(通常几百)的长序列。 在较高等的真核生物中，聚(A)尾部被添加到含有特异性序列(聚腺苷酸化信号)的转录物上。 聚(A)尾及结合其的蛋白质有助于保护mRNA免于被外切核酸酶降解。聚腺苷酸化对于转录终 止、mRNA从细胞核输出和翻译也很重要。聚腺苷酸化在DNA转录成RNA之后立即出现在细 胞核中，但是另外也可更迟地出现在细胞质中。在转录已经终止之后，通过与RNA聚合酶结 合的核酸内切酶复合体的作用，mRNA链被切割下来。切割位点通常的特征在于在切割位点 附近存在碱基序列AAUAAA。在mRNA已经被切割下来之后，将腺苷残基添加到切割位点的 游离3'末端。

[0442] 正如本文中使用的那样，“短暂”是指表达非整合的转基因数小时、数天或数个星期的时 间段，其中如果整合到基因组中或含在宿主细胞中的稳定质粒复制子之内，则该表达的时间 段小于基因的表达时间段。

[0443] 术语“信号转导途径”是指在将信号从细胞的一个部分转导到细胞的另一个部分中起作用 的多种信号转导分子之间的生化关系。短语“细胞表面受体”包括能够跨越细胞膜接受信号和 传递信号的分子和分子复合体。

[0444] 术语“受试者”是指包括其中可以引出免疫应答的活生物体(例如，哺乳动物、人类)。

[0445] 术语“基本上纯化的”细胞是指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细

胞是指 其已经与其天然存在状态中通常有关的其它细胞类型分离的细胞。在某些情况下，基本上纯 化的细胞群是指细胞的同源群体。在其它的情况下，该术语仅指在其天然状态下与其天然有 关的细胞分离的细胞。在某些方面中，所述细胞是体外培养的。在其它方面中，所述细胞不 是体外培养的。

[0446] 正如本文中使用的那样，术语“治疗”是指治疗。治疗效果是通过减轻、抑制、缓解或根 除疾病状态获得的。

[0447] 正如本文中使用的那样，术语“预防”是指预防性或保护性治疗疾病或疾病状态。

[0448] 在本发明上下文中，“肿瘤抗原”或“过度增生性病症抗原”或“与过度增生性病症相关抗 原”指的是特定过度增生性疾病共同的抗原。在某些方面，本发明的过度增生性病症抗原源自 癌症，包括但不限于原发性或转移性黑素瘤，胸腺瘤，淋巴瘤，肉瘤，肺癌，肝癌，非霍奇 金淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤，白血病，子宫癌，子宫颈癌，膀胱癌，肾癌和腺癌如乳腺癌，前 列腺癌，卵巢癌，胰腺癌等。

[0449] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指外源性核酸通过其转移或引入到宿主细胞中的 过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原发性受试者细胞及其后代。

[0450] 如果受试者中的癌症参数(例如，血液癌症，例如癌细胞生长，增殖和/或存活)被延迟 或减少可检测的量，例如约5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％或更多(如通 过任何适当的测量，例如质量，细胞计数或体积测定)，则受试者“应答”治疗。在一个实例 中，如果受试者经历预期寿命比不施用治疗的预期寿命延长约5％，10％，20％，30％，40％，50％ 或更高，则受试者应答治疗。在另一个实例中，如果受试者具有增加的无病生存期，总生存 期或增加的进展时间，则受试者应答治疗。可以使用几种方法来确定患者是否应答治疗，包 括例如NCCN肿瘤学临床实践指南(NCCN Guidelines®)提供的标准。例如，在B-ALL的上下文 中，完整的应答或完全应答者可能涉及以下一种或多种:<5％BM胚细胞，>1000个嗜中性粒 细胞/ANC(/μL)，>10万血小板(/μL)，无循环胚细胞或髓外疾病(无淋巴结病，脾肿大， 皮肤/牙龈浸润/睾丸质量/CNS连累)，三线造血，无复发4周。部分应答者可能涉及BM胚细 胞>50％减少，>1000个嗜中性粒细胞/ANC(/μL)，>100,000血小板(/μL)的一种或多种。非应答者可以显示疾病进展，例如BM胚细胞中>25％。

[0451] 本文所用的“难治性”是指对治疗无应答的疾病，例如癌症。在实施方案中，难治性癌症 可以在治疗开始之前或开始时耐受治疗。在其他实施方案中，难治性癌症在治疗期间可变得 抗性。难治性癌症也被称为耐药性癌症。

[0452] 本文所用的术语“复发”是指在初始应答期(例如，完全应答或部分应答)之后，再次出现癌 症。初始应答期可能涉及癌细胞水平低于某一阈值，例如低于20％，1％，10％，5％，4％，3％，2％， 或1％。再次出现可能涉及癌细胞升高到一定阈值以上的水平，例如高于20％，1％，10％，5％，4％， 3％，2％，或1％。例如，在B-ALL的上下文中，再次出现可能涉及例如在完全应答之后血液， 骨髓(>5％)或任何髓外部位中的胚细胞的再次出现。在这种情况下，完全应答可能涉及<5％ 的BM胚细胞。更一般地，在一个实施方案中，应答(例如，完全应答或部分应答)可以涉及不 存在可检测的MRD(最小残留疾病)。在一个实施方案中，初始应答期持续至少1,2,3,4,5或6天； 至少1,2,3或4周;至少1,2,3,4,6,8,10或12个月;或至少1,2,3,4或5年。

[0453] 在一些实施方案中,包括CD19抑制剂(例如CD19 CAR疗法)的疗法可能复发或对治疗顽 固。复发或抗性可以由CD19损失(例如,抗原损失突变)或降低CD19水平的其它CD19改变引 起(例如由CD19阴性克隆的克隆选择引起)。携带这种CD19损失或改变的癌症在本文被称为 “CD19阴性癌症”或“CD19阴性复发癌症”)。应当理解,CD19阴性癌症不需要100%的CD19损 失,而是足够减少CD19疗法的有效性,使得癌症复发或变得难治。在一些实施方案中,CD19 阴性癌症来自CD19 CA疗法。

[0454] 术语“特异性结合”是指识别和结合存在于样品中的结合配偶体(例如,刺激性肿瘤抗原) 的抗体或配体,但所述抗体或配体基本上不识别或结合样品中的其他分子。

[0455] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断的范围内适合用于与受试 者的组织接触而没有不适当的毒性,刺激,过敏反应等,并且与合理的利益/风险比相称的那 些盐。药学上可接受的盐是本领域公知的。例如,Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences(1977) 66:1-19详细描述了药学上可接受的盐。

[0456] 在本文中使用的术语“可调节的嵌合抗原受体(RCAR)”是指一组多肽,在最简单的实施 方案中通常是两种多肽,当在RCARX细胞中时,所述多肽为RCARX细胞提供对靶细胞,典 型地癌细胞的特异性,并且具有可调节的细胞内信号产生或增殖,其可以优化RCARX细胞的 免疫效应子性质。RCARX细胞至少部分地依赖于抗原结合结构域,以对包含由抗原结合结构 域结合的抗原的靶细胞提供特异性。在一个实施方案中,RCAR包括二聚化开关,其在二聚 化分子的存在下可将细胞内信号传导结构域偶联至抗原结合结构域。

[0457] 正如本文中使用的那样,术语“膜锚”或“膜系链结构域(membrane tethering domain)”是 指足够将细胞外或细胞内结构域锚固于质膜的多肽或部分例如肉豆蔻基基团。

[0458] 正如本文中使用的那样,术语“开关结构域”,例如当涉及RCAR时,是指在二聚化分子 存在下与另一个开关结构域缔合的实体,通常为基于多肽的实体。该缔合导致与第一开关结 构域连接(例如融合)的第一实体和与第二开关结构域连接(例如融合)的第二实体的功能性偶 联。第一和第二开关结构域一起被称为二聚化开关。在实施方案中,第一和第二开关结构域 是彼此相同的,例如它们是具有相同一级氨基酸序列的多肽,并且一起被称为均二聚化开关。 在实施方案中,第一和第二开关结构域是彼此不同的,例如它们是具有不同的一级氨基酸序 列的多肽,并且一起被称为异源二聚化开关。在实施方案中,所述开关在细胞内。在实施方 案中,所述开关在细胞外。在实施方案中,所述开关结构域是基于多肽的实体,例如基于FKBP 或FRB,并且所述二聚化分子是小分子,例如雷帕系物。在实施方案,开关结构域是基于多 肽的实体,例如结合myc肽的scFv,并且二聚化分子为多肽、其片段或多肽的多聚体,例如 结合一个或更多个myc scFvs的myc配体或myc配体的多聚体。在实施方案中,开关结构域是 基于多肽的实体,例如myc受体,并且二聚化分子是抗体或其片段,例如myc抗体。

[0459] 正如本文中使用的那样,术语“二聚化分子”,例如当涉及RCAR时,是指促进第一开关结 构域与第二开关结构域结合的分子。在实施方案中,二聚化分子并没有天然存在于受试者中, 或者没有以导致显著二聚化的浓度存在。在实施方案中,二聚化分子为小分子,例如雷帕霉 素或雷帕系物,例如,RAD001。

[0460] 当与mTOR抑制剂(例如变构mTOR抑制剂,例如RAD001或雷帕霉素或催化性mTOR抑

制 剂)联合使用时,术语“低的免疫增强剂量”是指部分但不是完全抑制mTOR活性的mTOR抑制 剂的剂量,例如,通过抑制P70 S6激酶活性所测量。用于评估mTOR活性的方法(例如通过抑 制P70 S6激酶)在本文中讨论。剂量不足以导致完全免疫抑制,但足以增强免疫应答。在一 个实施方案中,mTOR抑制剂的低的免疫增强剂量导致PD-1阳性T细胞数量的减少和/或PD-1 阴性T细胞数量的增加或PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞比率的增加。在一个实施方案中,低 的增强免疫的剂量的mTOR抑制剂导致幼稚T细胞的数量增加。在一个实施方案中,低的增强 免疫的剂量的mTOR抑制剂导致下述中的一个或更多个:

[0461] 例如在记忆T细胞例如记忆T细胞前体上一个或更多个下述标记物的表达增加:$CD62L^{高}$, $CD127^{高}$,$CD27^{+}$和BCL2,;

[0462] 例如在记忆T细胞例如记忆T细胞前体上KLRG1的表达减少;和

[0463] 记忆T细胞前体的数量增加,例如具有下述特征中的任一个或组合的细胞:$CD62L^{高}$增加, $CD127^{高}$增加,$CD27^{+}$增加,KLRG1降低和BCL2增加;

[0464] 其中例如与非治疗的受试者相比,上述存在的变化中任一个例如至少短暂出现。

[0465] 范围:在整个公开中,本发明的各个方面都可以以范围形式存在。应当理解,范围形式 的描述仅仅为方便和简洁起见,而不应当被看作是对本发明的范围不可改变的限制。因此, 范围的描述应当被认为特别地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,范 围的描述比如从1至6就应当被认为具体地公开了子范围比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、 3至6等,以及该范围内的单独数值,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3、和6。作为另一个实例, 范围比如95-99%的同一性包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的范围,并且包括子 范围比如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%和98-99%的同一性。不考虑范围的宽 度,这均适用。

[0466] 描述

[0467] CD19抑制剂和结合结构域

[0468] 本文提供了使用CD19嵌合抗原受体(CAR)治疗诸如癌症的疾病的物质组合物和使用方 法。所述方法尤其包括组合施用本文所述的CD19 CAR与另一种活性剂如B细胞抑制剂。所述 方法还包括例如施用本文所述的CD19 CAR以治疗淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤。

[0469] 一方面,本发明提供了许多嵌合抗原受体(CAR),其包含用于特异性结合CD19蛋白的 工程化的抗体或抗体片段。一方面,本发明提供了工程化以表达CAR的细胞(例如,T细胞), 其中CAR T细胞(“CART”)显示出抗癌性质。在一个方面,用CAR转化细胞,并且在细胞表 面上表达CAR。在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)用编码CAR的病毒载体转导。在 一些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在一些这样的实施方案中,细胞可以稳定地表达CAR。在另一个实施方案中,用编码CAR的核酸例如mRNA,cDNA,DNA转染细胞(例如,T细胞)。在一些这样的实施方案中,细胞 可以瞬时表达CAR。

[0470] 一方面,CAR的抗CD19蛋白结合部分是scFv抗体片段。在一个方面,这样的抗体片段是 功能性的,因为它们保留等同的结合亲和力,例如它们以与衍生其的IgG抗体相当的亲和力结 合相同的抗原。在一个方面,这样的抗体片段是功能性的,因为它们提供生物学应答,其可 以包括但不限于免疫应答的激活,来自其靶抗原的信号转导的抑制,激酶活性的抑制等,如 本领域技术人员将理解的。一方面,CAR的抗CD19抗原结合结构域是与其源自

的scFv的鼠序 列相比较人源化的scFv抗体片段。一方面，亲本鼠scFv序列是PCT公开WO2012/079000中提供 的CAR19构建体，并且在本文中作为SEQ ID NO:59提供。在一个实施方案中，抗CD19结合结 构域是WO2012/079000中描述的并且在SEQ ID NO:59中提供的scFv或与其有至少95％，例如 95-99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗CD19结合结构域是PCT公开WO2012/079000 中提供的CAR构建体的一部分，并且在本文提供为SEQ ID NO:58，或与其有至少95％，例如 95％-99％同一性的序列。在一个实施方案中，抗CD19结合结构域包含选自表4和/或表5的至 少一个(例如2,3,4,5或6个)CDR。

[0471] 在一些方面，将本发明的抗体掺入到嵌合抗原受体(CAR)中。一方面，CAR包括在PCT 公开WO2012/079000中作为SEQ ID NO:12提供并在本文中作为SEQ ID NO:58提供的多肽序 列，其中scFv结构域被一个或多个选自SEQ ID NOS:1-12的序列取代。一方面，SEQ ID NO:1-12的scFv结构域是SEQ ID NO:59的scFv结构域的人源化变体，其是特异性结合人CD19 的鼠来源的scFv片段。这种小鼠scFv的人源化对于临床环境可能是期望的，其中小鼠特异性 残基可以在接受CART19治疗(例如用以CAR19构建体转导的T细胞的治疗)的患者中诱导人 抗小鼠抗原(HAMA)应答。

[0472] 在一个方面，本发明的CAR的抗-CD19结合结构域，例如人源化scFv部分由转基因编码， 该转基因的序列对于在哺乳动物细胞中表达已经进行了密码子优化。在一个方面，本发明的 整个CAR构建体是由已经针对在哺乳动物细胞中的表达对全部序列进行了密码子优化的转基 因编码的。密码子优化是指编码DNA中的同义密码子(即，编码相同氨基酸的密码子)的出现 频度在不同物种中有偏差的发现。这样的密码子简并允许相同的多肽由多种核苷酸序列编码。 多种密码子优化方法是本领域已知的，包括例如在至少US专利号5,786,464和6,114,148中公开 的方法。

[0473] 一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:1中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包 含SEQ ID NO:2中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:3中提供的scFv部 分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:4中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包 含SEQ ID NO:5中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:6中提供的scFv部 分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:7中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包 含SEQ ID NO:8中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:9中提供的scFv部 分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:10中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包 含SEQ ID NO:11中提供的scFv部分。一方面，人源化CAR19包含SEQ ID NO:12中提供的scFv 部分。

[0474] 一方面，本发明的CAR将特异性抗体的抗原结合结构域与细胞内信号传导分子组合。例 如，在一些方面，细胞内信号传导分子包括但不限于CD3-ζ链，4-1BB和CD28信号传导模块 及其组合。一方面，CD19 CAR包含选自SEQ ID NO:31-42中的一个或多个中提供的序列的 CAR。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:31中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:32中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:33中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:34中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:35中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:36中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:37中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:38中提供的序列。一方面，CD19 CAR 包含SEQ ID NO:39中提供的序列。一方面，CD19 CAR包含SEQ ID NO:40中提供的序列。一 方面，

CD19 CAR包含SEQ ID NO:41中提供的序列。一方面,CD19 CAR包含SEQ ID NO:42 中提供的序列。

[0475] 因此,一方面,抗原结合结构域包含人源化抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源 化抗CD19结合结构域包含本文所述的鼠或人源化抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全 部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区 3(LC CDR3),和/或本文所述的鼠或人源化抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三 个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个例如,全部三个HC CDR 的人源化抗CD19结合结构域。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含本文所述 的鼠或人源化抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如人源化抗 CD19结合结构域具有两个可变重链区,每个可变重链区包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2 和HC CDR3。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含本文所述的人源化轻链可变 区(例如,在表2中)和/或本文所述的人源化重链可变区(例如,在表2中)。在一个实施方 案中,人源化抗CD19结合结构域包含本文所述的人源化重链可变区(例如,在表2中),例 如本文所述的至少两个人源化重链可变区(例如,在表2中)。在一个实施方案中,抗CD19 结合结构域是包含表2的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗CD19结合 结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表2中提供的轻链可变区的氨基酸序列 的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基 酸序列,或与表2的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表2 中提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20 或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与表2的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。 在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,和SEQ ID NO:12的序列,或其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,编码人源化抗CD19结合结构域的核酸序列包含选自SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:64,SEQ ID NO:65,SEQ ID NO:66,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:70,SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的序列,或其具有95-99%同一性的序 列。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域是scFv,并且包含例如在表2中的本文所 述的氨基酸序列的轻链可变区通过接头,例如本文所述的接头连接到包含例如在表2中的本文 所述的氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,人源化抗CD19结合结构域包含 $(Gly_4\text{-}Ser)n$接头,其中n为1,2,3,4,5或6,例如3或4(SEQ ID NO:53)。scFv的轻链可变区和重 链可变区可以是例如以下取向中的任一个:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头- 轻链可变区。

[0476] 一方面,抗原结合结构域部分包含一个或多个选自SEQ ID NO:1-12的序列。一方面,人 源化CAR选自一个或多个选自SEQ ID NO:31-42的序列。在一些方面,非人抗体是人源化的, 其中抗体的特定序列或区域被修饰以增加与人中天然产生的抗体或其片段的相似性。

[0477] 在一个实施方案中,CAR分子包含抗CD19结合结构域,其包含本文描述的抗CD19结

合 结构域的一个或多个(例如全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和本文描述的抗CD19结合结构域的一个或多个(例 如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR,以及一个或多个,例如 全部三个HC CDR的抗CD19结合结构域。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域包含本文 描述的抗CD19结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1), 重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如抗CD19结合结构域 具有两个可变重链区,每个包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。

[0478] 在一个方面,抗CD19结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特性。例 如,在一个方面,本发明的CAR组合物的包含抗原结合结构域的部分特异性结合人CD19。一 方面,本发明涉及包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域,其中所述抗体结合结构域特异性 结合CD19蛋白或其片段,其中所述抗体或抗体片段包含可变轻链和/或可变重链,其包含SEQ ID NO:1-12或SEQ ID NO:59的氨基酸序列。一方面,抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:1-12 或SEQ ID NO:59的scFv的氨基酸序列。在某些方面,scFv与前导序列相邻并且在相同的可读 框中。一方面,前导序列是如SEQ ID NO:13所提供的多肽序列。

[0479] 一方面,包含抗原结合结构域的CAR部分包含靶向CD19的抗原结合结构域。一方面,抗 原结合结构域靶向人CD19。一方面,CAR的抗原结合结构域具有与Nicholson et al.Mol.Immun. 34(16-17):1157-1165(1997)描述的FMC63 scFv片段相同或相似的结合特异性,或包括FMC63 scFv片段。在一个方面,包含抗原结合结构域的CAR部分包含靶向B细胞抗原例如人B细胞抗 原的抗原结合结构域。CD19抗体分子可以是例如WO2014/153270(其全部内容通过引用并入 本文)中描述的抗体分子(例如人源化抗CD19抗体分子)。WO2014/153270还描述了测定各 种CART构建体的结合和功效的方法。

[0480] 在一个实施方案中,抗CD19结合结构域包含本文所述的鼠轻链可变区(例如,在表3中) 和/或本文所述的鼠重链可变区(例如,在表3中)。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域 是包含表3的氨基酸序列的鼠轻链和鼠重链的scFv。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域 (例如scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表3中提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一 个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列, 或与表3的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表3中提供的 重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修 饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与表3的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个 实施方案中,抗CD19结合结构域包含SEQ ID NO:59的序列或其具有95-99%的同一性的序列。 在一个实施方案中,抗CD19结合结构域是scFv,并且包含本文所述(例如,表3中)的氨基 酸序列的轻链可变区通过接头,例如本文所述的接头连接到包含本文所述(例如,表3中)的 氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,抗原结合结构域包括$(Gly_4$-Ser)n接头,其中 n为1,2,3,4,5或6,例如3或4(SEQ ID NO:53)。scFv的轻链可变区和重链可变区可以是例如以 下取向中的任一个:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0481] 此外,本发明提供(尤其是)CD19 CAR组合物,任选地与B细胞抑制剂组合,以及它们 在药物中的用途或治疗涉及表达CD19的细胞或组织的癌症或任何恶性肿瘤或自身免疫

性疾 病等的方法。

[0482] 一方面，本发明的CAR可用于根除表达CD19的正常细胞，从而可应用作为细胞移植前的 细胞调节疗法。一方面，表达CD19的正常细胞是表达CD19的正常干细胞，细胞移植是干细 胞移植。

[0483] 一方面，本发明提供了工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞(例如，T细胞)，其中CAR表达细胞，例如CAR T细胞(“CART”)表现出抗癌特性。合适的抗原是CD19。一 方面，CAR的抗原结合结构域包含部分人源化抗CD19抗体片段。一方面，CAR的抗原结合结 构域包含部分人源化抗CD19抗体片段，其包含scFv。因此，本发明提供(包括)包含人源化 抗CD19结合结构域并被工程化成免疫效应细胞例如T细胞或NK细胞的CD19-CAR及其用于 过继疗法的方法。

[0484] 一方面，CAR例如CD19-CAR包含至少一个选自CD137(4-1BB)信号传导结构域，CD28信号传导结构域，CD3ζ信号结构域及其任何组合的细胞内结构域。在一个方面，CAR例如CD19-CAR包含至少一个细胞内信号传导结构域，其来自除CD137(4-1BB)或CD28之外的 一种或多种共刺激分子。

[0485] 本发明包括但不限于包含编码CAR的序列的重组DNA构建体，其中CAR包含与CD19，CD10，CD20，CD22，CD34，CD123，FLT-3，或ROR1，例如人CD19，CD10，CD20，CD22， CD34，CD123，FLT-3或ROR1特异性结合的抗体或抗体片段，其中抗体片段的序列与编码细胞 内信号传导结构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框中。细胞内信号传导结构域可以包含 共刺激信号传导结构域和/或主要信号传导结构域，例如ζ链。共刺激信号传导结构域是指包 含共刺激分子的细胞内结构域的至少一部分的CAR的一部分。在一个实施方案中，抗原结合 结构域是本文所述的鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中，抗原结合结构域是人源化抗体或抗体片段。

[0486] 在具体方面，本发明的CAR构建体包含选自SEQ ID NO:1-12的scFv结构域或SEQ ID NO:59的scFV结构域，其中所述scFv之前可以是任选的前导序列，例如如SEQ ID NO:13提供， 然后是任选的铰链序列，例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提供，如在SEQ ID NO:15中提供的跨膜区，包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细 胞内信号传导结构域和包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的CD3ζ序列，其中所述结构域相邻 并且在相同的可读框中形成单个融合蛋白。还包括在本发明中(尤其是)的是编码选自SEQ IS NO:1，SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，SEQ IS NO:6，SEQ ID NO:7， SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:9，SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:59 的每个scFv片段的多肽的核苷酸序列。还包括在本发明中(尤其是)的是编码选自SEQ IS NO:1， SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，SEQ IS NO:6，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:9，SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:59的每个 scFv片段的多肽，以及SEQ ID NO:13-17的每个结构域，加上本发明的编码的CD19 CAR融合 蛋白的核苷酸序列。在一个方面，示例性CD19 CAR构建体包含任选的前导序列，细胞外抗 原结合结构域，铰链，跨膜结构域和细胞内刺激结构域。一方面，示例性CD19 CAR构建体 包含任选的前导序列，细胞外抗原结合结构域，铰链，跨膜结构域，细胞内共刺激结构域和 细胞内刺激结构域。在一些实施方案中，含有本发明的人源化scFv结构域的特异性CD19 CAR 构建体提供为SEQ ID NO:31-42或如SEQ ID NO:59所提供

的鼠scFv结构域。

[0487] 本文还提供了全长CAR序列为SEQ ID NO:31-42和58,如表2和表3所示。

[0488] 示例性的前导序列作为SEQ ID NO:13提供。示例性的铰链/间隔序列提供为SEQ ID NO:14 或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49。示例性跨膜结构域序列提供为SEQ ID NO:15。4-1BB蛋白的细胞内信号传导结构域的示例性序列提供为SEQ ID NO:16。CD27的细 胞内信号传导结构域的示例性序列如SEQ ID NO:51提供。示例性的CD3ζ结构域序列提供为 SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43。这些序列可以例如与识别CD19,CD10,CD20,CD22,CD34, CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的scFv组合使用。

[0489] 本文提供了各种scFv片段和其他CAR组分的示例性序列。应注意,在本文中也提供了没 有前导序列(例如,没有SEQ ID NO:13的氨基酸序列或SEQ ID NO:54的核苷酸序列)的这些 CAR组分(例如,SEQ ID NO:121,或表2,3,6,11A,11B,16或25的序列)。

[0490] 在实施方案中,本文描述的CAR序列含有源自CD3ζ链的共刺激结构域的信号结构域中的 Q/K残基变化。

[0491] 一方面,本发明包括包含编码CAR的核酸分子的重组核酸构建体,其中所述核酸分子包 含编码例如本文所述的抗CD19结合结构域的核酸序列,其与编码细胞内信号传导结构域的核 酸序列相邻并且在相同的可读框中。在一个方面,抗CD19结合结构域选自SEQ ID NO:1-12和 58中的一个或多个。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:61-72和97中的一个或多个中 提供的序列的核苷酸残基64至813编码。一个方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:61的核 苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:62的核苷酸残基64至813 编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:63的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗 CD19结合结构域由SEQ ID NO:64的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由 SEQ ID NO:65的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:66的核 苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:67的核苷酸残基64至813 编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:68的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗 CD19结合结构域由SEQ ID NO:69的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由 SEQ ID NO:70的核苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:71的核 苷酸残基64至813编码。一方面,抗CD19结合结构域由SEQ ID NO:72的核苷酸残基64至813 编码。

[0492] 本文提供CD19抑制剂和组合疗法。在一些实施方案中,CD19抑制剂(例如,细胞疗法 或抗体)与B细胞抑制剂,例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1 的一种或多种组合施用。CD19抑制剂包括但不限于CD19 CAR表达细胞,例如CD19 CART细 胞或抗CD19抗体(例如抗CD19单特异性或双特异性抗体)或其片段或缀合物。在一个实施 方案中,CD19抑制剂与B细胞抑制剂(例如本文所述的CAR表达细胞)组合施用。

[0493] 在本公开中描述了许多CD19 CAR表达细胞。例如,在一些实施方案中,CD19抑制剂包 括抗CD19 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD19 CAR构建体的细胞,所述抗CD19 CAR构建体如表2中所述或由包含表2,4或5中所述的scFv,CDRs或VH和VL链的CD19结合 CAR编码。例如,抗CD19 CAR表达细胞(例如CART)是通过工程化CD19-CAR(其包含CD19 结合结构域)入细胞(例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细 胞组合施用。本文还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0494] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含来自本文(例如表2,4或5)所列抗体的一个,两个、三个(例如全部三个)重链CDR:HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3,和/或来自本文(例如表2,4 或5)列出的抗体的一个,两个,三个(例如,全部三个)轻链CDR:LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在一个实施方案中,抗原结合结构域包含上文列出或描述的抗体的重链可变区和/或 可变轻链区。

[0495] 在一个实施方案中,CD19结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表2 中提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20 或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与表2的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列; 和/或重链可变区,其包含具有表2中提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三 个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与表2的氨 基酸序列具有95-99%同一性的序列。在实施方案中,CD19结合结构域包含表4或表5的一个 或多个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3的每一个)或具有一个或多个CDR的一个,二个,三个,四个,五个或六个修饰(例如,取代) 的CDR。

[0496] 示例性抗CD19抗体或其片段或缀合物包括但不限于:blinatumomab,SAR3419(Sanofi), MEDI-551(MedImmune LLC),Combotox,DT2219ARL(Masonic Cancer Center),MOR-208 (也称为XmAb-5574;MorphoSys),XmAb-5871(Xencor),MDX-1342(Bristol-Myers Squibb), SGN-CD19A(Seattle Genetics)和AFM11(Affimed Therapeutics)。参见例如Hammer.MAbs. 4.5(2012):571-77。Blinatomomab是一种双特异性抗体,其由两个scFv组成——一个结合 CD19,另一个结合CD3。Blinatomomab指导T细胞攻击癌细胞。参见例如Hammer等人;临床试 验标识号NCT00274742和NCT01209286。MEDI-551是人源化的抗CD19抗体,其具有工程化 以具有增强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的Fc。参见例如Hammer等人;和临床 试验标识号NCT01957579。Combotox是结合CD19和CD22的免疫毒素的混合物。免疫毒素由 与去糖基化的蓖麻毒蛋白A链融合的scFv抗体片段组成。参见例如Hammer等人;和Herrera等J. Pediatr.Hematol.Oncol.31.12(2009):936-41;Schindler et al.Br.J.Haematol.154.4(2011):471-6。DT2219ARL是靶向CD19和CD22的双特异性免疫毒素,其包含两种scFv和截短的白喉毒素。 参见例如Hammer等人;和临床试验标识号NCT00889408。SGN-CD19A是由与合成细胞毒性细 胞杀伤剂单甲氧基auristatin F(MMAF)连接的抗CD19人源化单克隆抗体组成的抗体-药物缀 合物(ADC)。参见例如Hammer等人;和临床试验标识号NCT01786096和NCT01786135。 SAR3419是一种抗CD19抗体-药物缀合物(ADC),其包含通过可切割接头与美登素衍生物 缀合的抗CD19人源化单克隆抗体。参见例如Younes等人J.Clin.Oncol.30.2(2012): 2776-82;Hammer等人;临床试验标识号NCT00549185;和Blanc et al.Clin Cancer Res. 2011;17:6448-58。XmAb-5871是一种Fc工程化的人源化抗CD19抗体。参见例如Hammer等人。MDX-1342是具有增强的ADCC的人Fc工程化抗CD19抗体。参见例如Hammer等人。在实施方 案中,抗体分子是双特异性抗CD19和抗CD3分子。例如,AFM11是靶向CD19和CD3的双特 异性抗体。参见例如Hammer等人;和临床试验标识号NCT02106091。在一些实施方案中,本 文所述的抗CD19抗体缀合或以其它方式结合到治疗剂,例如化学治疗剂,肽疫苗(例如在 Izumoto等人2008J Neurosurg 108:963-971中所述的那些),免疫抑制剂或免疫烧蚀剂,例如 环孢菌素,硫唑嘌呤,甲氨蝶呤,霉酚

酸酯,FK506,CAMPATH,抗CD3抗体,细胞毒素, 氟达拉滨,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228或细胞因子

[0497] 示例性抗CD19抗体分子(包括抗体或其片段或缀合物)可以包括表2,4,或5中描述的scFv, CDRs或VH和VL链。在一个实施方案中,CD19结合抗体分子包含:轻链可变区,其包含具有 表2提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20 或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表2的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/ 或重链可变区,其包含具有表2提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰 (例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表2的氨基酸序列 具有95-99%同一性的序列。在实施方案中,CD19结合抗体分子包含表4或表5的一个或多个 CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3各一个), 或者具有一个或多个CDR的一个,二个,三个,四个,五个或六个修饰(例如,取代)的CDR。抗体分子可以是例如分离的抗体分子。

[0498] 在一个实施方案中,针对CD19的抗原结合结构域是本文表中描述的抗原结合结构域的抗 原结合部分,例如CDR。在一个实施方案中,CD19抗原结合结构域可以来自任何CD19 CAR, 例如LG-740;美国专利号8,399,645;美国专利号7,446,190;Xu et al.,Leuk Lymphoma.2013 54(2):255-260(2012);Cruz et al.,Blood 122(17):2965-2973(2013);Brentjens et al.,Blood, 118(18):4817-4828(2011);Kochenderfer et al.,Blood 116(20):4099-102(2010);Kochenderfer et al.,Blood 122(25):4129-39(2013);和16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther(ASGCT)(May 15-18,Salt Lake City)2013,Abst 10,其全部内容通过引用并入本文。

[0499] 在一个实施方案中,特异性结合CD19的CAR T细胞具有USAN名称TISAGENLECLEUCEL-T。CTL019是通过T细胞的基因修饰来制备的,其通过用EF-1α启动子 控制的含有CTL019转基因的自灭活复制缺陷型慢病毒(LV)载体通过转导稳定插入而介导。CTL019可以是转基因阳性和阴性T细胞的混合物,所述细胞基于转基因阳性T细胞的百分比递 送给受试者。

[0500] 在一个方面,本发明的CAR构建体的核酸序列选自SEQ ID NO:85-96中的一个或多个。一 方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:85。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:86。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:87。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:88。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:89。一方面,CAR构建体的 核酸序列是SEQ ID NO:90。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:91。一方面,CAR 构建体的核酸序列是SEQ ID NO:92。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:93。一方 面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:94。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:95。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:96。一方面,CAR构建体的核酸序列 是SEQ ID NO:97。一方面,CAR构建体的核酸序列是SEQ ID NO:98。一方面,CAR构建体的 核酸序列是SEQ ID NO:99。

[0501] CD20抑制剂和结合结构域

[0502] 如本文所用,术语“CD20”是指已知在B细胞上可检测的抗原决定簇。人类CD20也被称为 跨膜4结构域,亚家族A,成员1(MS4A1)。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库中 找到,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot。例如,人CD20的氨基酸序列可以在登录号

NP_690605.1和NP_068769.2中找到,并且编码人CD20的转录物变体1和3的核苷酸序列可以分 别在登录号NM_152866.2和NM_021950.3中找到。如本文所用,“CD20”包括包含突变的蛋白 质,例如全长野生型CD20的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的抗原结合部分识别并结合CD20蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD20蛋白在癌细胞上表达。

[0503] 在一些方面,本公开提供了CD20抑制剂或结合结构域,例如本文所述的CD20抑制剂或 结合结构域。本公开还提供编码CD20结合结构域或包含CD20结合结构域的CAR的核酸。CD20抑制剂包括但不限于CD20 CAR表达细胞,例如CD20 CART细胞或抗-CD20抗体(例如抗-CD20单或双特异性抗体)或其片段。组合物还可以包含第二活性剂,例如抗CD19 CAR表达细胞或CD19结合结构域。活性剂可以是例如由单个核酸或不同核酸编码的。

[0504] 在一些方面,作为单一疗法施用CD20抑制剂或结合结构域。在一些方面,CD20抑制剂 或结合结构域与第二活性剂如抗CD19 CAR表达细胞组合施用。在一个实施方案中,CD20抑 制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达细胞,例如表达包含鼠、人类或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0505] CD20 CAR表达细胞,例如CART

[0506] 在一个实施方案中,CD20抗体分子包含:轻链可变区,其包含具有表15A或15B中提供的 轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修 饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表15A或15B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/ 或重链可变区,其包含具有表14A或14B中提供的重链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个 或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表14A 或14B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,CD20抗体分子包含本文 描述的CD20结合结构域的一个或多个(例如两个或全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1), 轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)和/或本文描述的CD20结合 结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和 一个或多个,例如全部三个HC CDR的CD20结合结构域。这些CDR可以是例如表12A,12B 和/或表13的CDR,或者与其基本相同的序列。在一个实施方案中,CD20抗体分子包含一个 或多个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2或LC CDR3), 其包含表12A,12B和/或表13的氨基酸序列的一个,两个,三个,四个,五个或六个修饰(例 如取代)。抗体分子可以是例如分离的抗体分子。

[0507] 在一些实施方案中,CD20抑制剂包括抗CD20 CAR表达细胞,例如CART,例如表11A或 11B中所述的抗CD20 CAR构建体的细胞,或与其基本相同的序列,或由CD20结合CAR编码, 其包含表11A-15B中描述的scFv,CDRs或VH和VL链,或其基本相同的序列。例如,抗CD20 CAR表达细胞,例如CART,是通过将CD20-CAR(其包含CD20结合结构域)工程化成细胞 (例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如,用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。本文 还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0508] 在一个实施方案中,CD20结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表15A 或15B中提供的轻链可变区的氨基酸序列至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过 30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表15A或15B的氨基酸序列具有

95-99％同 一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表14A或14B中提供的重链可变区的氨基酸序列的 至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸 序列或与表14A或14B的氨基酸序列具有95-99％同一性的序列。

[0509] 在一个实施方案中,CD20结合结构域包含本文描述的CD20结合结构域的一个或多个(例 如两个或全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链 互补决定区3(LC CDR3)和/或本文描述的CD20结合结构域的一个或多个(例如全部三个) 重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3), 例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个,例如全部三个HC CDR的CD20 结合结构域。这些CDR可以是例如表12A,12B和/或表13的那些CDR,或者与其基本相同的 序列。在一个实施方案中,CD20结合结构域(例如,scFv)包含一个或多个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2或LC CDR3),其包含具有表12A,12B 和/或表13的氨基酸序列的一个,两个,三个,四个,五个或六个修饰(例如取代)的氨基酸 序列。

[0510] 在一些实施方案中,CAR包含抗体或抗体片段,其包括CD20结合结构域,跨膜结构域和 细胞内信号传导结构域。CD20结合结构域可以包含表13,15A或15B中列出的任何CD20轻链结 合结构域的轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定 区3(LC CDR3)中的一个或多个,和表12A,12B,14A或14B中列出的任何CD20重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链 互补决定区3(HC CDR3)中的一个或多个。

[0511] 在一个实施方案中,CD20结合结构域包含CAR20-1,CAR20-2,CAR20-3,CAR20-4,CAR20-5,CAR20-6,CAR20-7,CAR20-8,CAR20-9,CAR20-10,CAR20-11,CAR20-12, CAR20-13,CAR20-14,CAR20-15,或CAR20-16的任一个的6个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2,和LC CDR3中各一个),或与其基本相同的序列。 在一个实施方案中,CD20结合结构域包含CAR20-1,CAR20-2,CAR20-3,CAR20-4,CAR20-5, CAR20-6,CAR20-7,CAR20-8,CAR20-9,CAR20-10,CAR20-11,CAR20-12,CAR20-13, CAR20-14,CAR20-15,或CAR20-16中任一个的三个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3各一个,或LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3中各一个),或与其基本相同的序列。

[0512] 在一个实施方案中,CD20结合结构域包含本文所述的轻链可变区(例如,在表15A或15B 中)和/或本文所述的重链可变区(例如,在表14A或14B中)或与其基本相同的序列。在一 个实施方案中,CD20结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表15A或15B 中提供的轻链可变区的氨基酸序列至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或 10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表15A或15B的氨基酸序列具有95-99％同一性的 序列;和/或重链可变区,其包含具有表14A或14B中提供的重链可变区的氨基酸序列至少一个, 两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表 14A或14B的氨基酸序列具有95-99％同一性的序列。

[0513] 其它实施方案包括编码本节所述多肽的核苷酸序列。例如,另外的实施方案包括编码表 11A-15B中任一个的多肽的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可以包含表11A或11B的CAR构建 体或scFv。核苷酸可以编码表14A或14B的VH,表15A或15B的VL或两者。核苷酸可以编码表 12A或12B的VH CDR1,VH CDR2或VH CDR3中的一个或多个(例如,两个或三个)和/或该 核苷酸可以编码表13的VL CDR1,VL CDR2或VL CDR3中的一个或多个(例如,两个或三

个)。核苷酸序列还可以包括SEQ ID NOS:13,14,15,16,17,和51中的一个或多个,例如所有的结 构域。

[0514] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和 CD20 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达CD20 CAR的第二细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包括例 如表达包含主要细胞内信号传导结构域的CAR(例如,CD19 CAR,ROR1 CAR,CD20 CAR 或CD22 CAR)的第一细胞,以及表达包含次要信号传导结构域的CAR(例如,CD19 CAR, ROR1 CAR,CD20 CAR或CD22 CAR)的第二细胞。

[0515] CD20 CAR还可以包含一个或多个跨膜结构域,例如本文所述的跨膜结构域,细胞内信 号传导结构域,例如本文所述的细胞内信号传导结构域,共刺激结构域,例如本文所述的共 刺激结构域,前导序列,例如如本文所述的前导序列,或铰链,例如,如本文所述的铰链。

[0516] 示例性的抗-CD20抗体包括但不限于利妥昔单抗,奥法木单抗,奥瑞珠单抗,veltuzumab, obinutuzumab,TRU-015(Trubion Pharmaceuticals),ocaratuzumab和Pro131921(Genentech)。参见,例如,Lim et al.Haematologica.95.1(2010):135-43。

[0517] 在一些实施方案中,抗CD20抗体包含利妥昔单抗。利妥昔单抗是结合CD20并引起CD20 表达细胞的细胞溶解的嵌合小鼠/人单克隆抗体IgG1κ,例如,如www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf中所述。在一些实施方案 中,利妥昔单抗可用于治疗B细胞恶性肿瘤,例如非霍奇金淋巴瘤(NHL)(例如滤泡性NHL, 弥漫性大B细胞淋巴瘤)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。在其他实施方案中,利妥昔单抗 可用于治疗自身免疫疾病,例如类风湿性关节炎,多发性硬化症,系统性红斑狼疮,慢性炎 性脱髓鞘性多发性神经病,自身免疫性贫血,自身免疫性溶血性贫血,纯红细胞再生障碍, 特发性血小板减少性紫癜(ITP),埃文斯综合征,血管炎,大疱性皮肤病,1型糖尿病,干 燥综合征,抗NMDA受体脑炎和德维克病,格雷夫斯眼病和自身免疫性胰腺炎。在一些实施 方案中,利妥昔单抗可用于治疗移植排斥反应。

[0518] 在一些实施方案中,利妥昔单抗静脉内给药,例如,作为静脉输注。例如,每次输注提 供约500-2000mg(例如,约500-550,550-600,600-650,650-700,700-750,750-800,800-850, 850-900,900-950,950-1000,1000-1100,1100-1200,1200-1300,1300-1400,1400-1500, 1500-1600,1600-1700,1700-1800,1800-1900,或1900-2000mg)利妥昔单抗。

[0519] 在一些实施方案中,利妥昔单抗以150mg/m^2到750mg/m^2,例如,约150-175mg/m^2,175-200mg/m^2,200-225mg/m^2,225-250mg/m^2,250-300mg/m^2,300-325mg/m^2,325-350mg/m^2,350-375mg/m^2,375-400mg/m^2,400-425mg/m^2,425-450mg/m^2,450-475mg/m^2,475-500mg/m^2,500-525mg/m^2,525-550mg/m^2,550-575mg/m^2,575-600mg/m^2,600-625mg/m^2,625-650mg/m^2,650-675mg/m^2,或675-700mg/m^2的剂量施用,其中m^2表示受试者的体表面积。

[0520] 在一些实施方案中,利妥昔单抗以至少4天,例如,4,7,14,21,28,35天,或更长的给药 间隔给药。例如,利妥昔单抗以至少0.5周,例如,0.5,1,2,3,4,5,6,7,8或更长的给药间隔 施用。

[0521] 在一些实施方案中,利妥昔单抗以本文中所描述的剂量和给药间隔施用,例如,至少2 周,例如,至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20周,或更长。例

如，利妥昔单抗以本文中所描述的剂量和给药间隔施用，每治疗周期共至少4次剂量(例如，每个 治疗周期至少4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,或更多剂量)。

[0522] 在一些方面，所述抗CD20抗体包含奥法木单抗。奥法木单抗是具有约149kDa的分子量 的抗CD20IgG1κ人单克隆抗体。例如，使用转基因小鼠和杂交瘤技术产生奥法木单抗并从重 组鼠细胞系(NS0)表达并纯化。见，例如，www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf；和临床试验标识符编号 NCT01363128,NCT01515176,NCT01626352,和NCT01397591。

[0523] 奥法木单抗可用于治疗诸如CLL，非霍奇金淋巴瘤(NHL)(例如滤泡性NHL和DLBCL)，B细胞幼淋巴细胞性白血病，急性淋巴性白血病(ALL)，套细胞淋巴瘤，类风湿性关节炎和 多发性硬化的疾病。

[0524] 在一些实施方案中，奥法木单抗作为静脉内输注施用。例如，每次输注提供约150-3000mg (例如，约150-200,200-250,250-300,300-350,350-400,400-450,450-500,500-550,550-600, 600-650,650-700,700-750,750-800,800-850,850-900,900-950,950-1000,1000-1200, 1200-1400,1400-1600,1600-1800,1800-2000,2000-2200,2200-2400,2400-2600,2600-2800,或 2800-3000mg)奥法木单抗。

[0525] 在一些实施方案中，奥法木单抗以至少4天，例如4,7,14,21,28,35天或更长时间的给药间 隔施用。例如，奥法木单抗的给药间隔至少为1周，例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26, 28,20,22,24,26,28,30周或以上。

[0526] 在一些实施方案中，奥法木单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间，例如至少1 周，例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24,26,28,30,40,50, 60周或更长，或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或更长，或1,2,3,4,5年或更长。例如，奥法木单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用，每个治疗周期总共至少2个剂量(例如，每 个治疗周期至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20，或更多的剂量)。

[0527] 在一些方面，抗CD20抗体包含奥瑞珠单抗。奥瑞珠单抗是一种人源化的抗CD20单克隆 抗体，例如临床试验识别号NCT00077870,NCT01412333,NCT00779220,NCT00673920,NCT01194570,和Kappos et al.Lancet.19.378(2011):1779-87。例如，奥瑞珠单抗可用于治疗 诸如类风湿性关节炎，多发性硬化症和狼疮的疾病。

[0528] 在一些实施方案中，奥瑞珠单抗作为静脉内输注施用。例如，每次输注提供约50-2000mg (例如，约50-100,100-150,150-200,200-250,250-300,300-350,350-400,400-450,450-500, 500-550,550-600,600-650,650-700,700-750,750-800,800-850,850-900,900-950,950-1000, 1000-1100,1100-1200,1200-1300,1300-1400,1400-1500,1500-1600,1600-1700,1700-1800, 1800-1900,或1900-2000mg)的奥瑞珠单抗。

[0529] 在一些实施方案中，奥瑞珠单抗以至少7天，例如7,14,21,28,35天或更长时间的给药 间隔施用。例如，奥瑞珠单抗以至少1周，例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26,28,20,22, 24,26,28,30周或更长的给药间隔施用。

[0530] 在一些实施方案中，奥瑞珠单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间，例如至少2 周，例如至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24,26,28,30,40,50, 60周或更长，或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或更长，或1,2,3,4,5年

或更长。例如，奥瑞珠单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用，每个治疗周期总共至少4个剂量(例如，每个 治疗周期至少4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20或更多剂量)。

[0531] 在一些方面，抗CD20抗体包含veltuzumab。veltuzumab是针对CD20的人源化单克隆抗体。参见例如临床试验标识号NCT00547066,NCT00546793,NCT01101581,和Goldenberg et al. Leuk Lymphoma.51(5)(2010):747-55。例如，veltuzumab可用于治疗NHL(例如，DLBCL，滤 泡淋巴瘤)，CLL和自身免疫性疾病例如免疫性血小板减少性紫癜(ITP)。

[0532] 在一些实施方案中，veltuzumab皮下或静脉内施用，例如作为静脉内输注。在一些实施 方案中，veltuzumab以50-800mg/m^2的剂量，例如约50-60,60-70,70-80,80-90,90-100,100-110, 110-120,120-130,130-140,140-150,150-160,160-170,170-180,180-190,190-200,200-225, 225-250,250-275,275-300,300-325,325-350,350-375,375-400,400-425,425-450,450-475, 475-500,500-525,525-550,550-575,575-600,600-625,625-650,650-675,675-700,700-725, 725-750,750-775,或775-800mg/m^2施用。在一些实施方案中，施用50-400mg，例如50,75,100, 125,150,175,200,225,250,275,300,325,350,375,或400mg的剂量。

[0533] 在一些实施方案中，veltuzumab以至少7天，例如7,14,21,28,35天或更长时间的给药间隔 施用。例如，veltuzumab以至少1周，例如，1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26,28,20,22,24, 26,28,30周或更长的给药间隔施用。

[0534] 在一些实施方案中，veltuzumab以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间，例如至少 2周，例如至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24,26,28,30,40, 50,60周或更长时间，或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或更长，或1,2,3,4,5年或更长。例如，veltuzumab以本文所述的剂量和给药间隔施用，每个治疗周期总共至少4个剂量(例如，每个治疗周期至少4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20或更多剂量)。

[0535] 在一些方面，抗CD20抗体包含GA101。GA101(也称为obinutuzumab或RO5072759)是人源化和糖工程化的抗CD20单克隆抗体。例如，GA101可用于治疗诸如B细胞淋巴样恶性肿瘤，例如CLL，非霍奇金淋巴瘤(NHL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的疾病。参见， 例如，Robak.Curr.Opin.Investig.Drugs.10.6(2009):588-96;临床试验识别号:NCT01995669,NCT01889797,NCT02229422,和NCT01414205;和www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf。

[0536] 在一些实施方案中，GA101静脉内施用，例如作为静脉内输注。例如，每次输注提供约 100-3000mg(例如，约100-150,150-200,200-250,250-500,300-350,350-400,400-450,450-500, 500-550,550-600,600-650,650-700,700-750,750-800,800-850,850-900,900-950,950-1000, 1000-1200,1200-1400,1400-1600,1600-1800,1800-2000,2000-2200,2200-2400,2400-2600, 2600-2800,或2800-3000mg)GA101。

[0537] 在一些实施方案中，GA101以至少7天，例如7,14,21,28,35天或更长时间的给药间隔施用。例如，GA101是在至少1周，例如，1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26,28,20,22,24,26,28, 30周或更长的给药间隔给药。例如，GA101以至少1个月，例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, 或更多个月的给药间隔施用。在一些实施方案中，GA101以1,2,3,4,5,6,7,8,

9,10,11,12,13, 或14天的给药间隔施用。

[0538] 在一些实施方案中,GA101以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间,例如至少1周, 例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24,26,28,30,40,50,60 周或更长,或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或更长,或1,2,3,4,5年或更长。例如, GA101以本文所述的剂量和给药间隔施用,每个治疗周期总共至少2个剂量(例如,每个治疗 周期至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20或更多的剂量)。

[0539] 在一些方面,抗CD20抗体包含AME-133v。AME-133v(也称为LY2469298或ocaratuzumab) 是针对CD20的人源化IgG1单克隆抗体,与利妥昔单抗相比,对FcγRIIIa受体的亲和力增加并 且抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性增强。参见,例如,Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25.。在一些实施方案中,AME-133v可用于治疗诸如NHL的癌症,例如滤泡性 淋巴瘤。参见例如Forero-Torres et al.Clin Cancer Res.18.5(2012):1395-403。

[0540] 在一些方面,抗CD20抗体包含PRO131921。PRO131921是一种人源化抗CD20单克隆抗 体,与利妥昔单抗相比,具有更好的结合FcγRIIIa和增强的ADCC。参见,例如,Robak等人 BioDrugs 25.1(2011):13-25;和Casulo等人Clin Immunol.154.1(2014):37-46。在一些实施方 案中,PRO131921可用于治疗NHL。参见例如临床试验标识号NCT00452127。在一些实施方 案中,PRO131921静脉内施用,例如作为静脉内输注。在一些实施方案中,PRO131921以 15mg/m^2至1000mg/m^2的剂量施用,例如约15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、 50-55、55-60、60-65、65-70、70-75、75-80、80-85、85-90、90-95、95-100、100-125、125-150、 150-175、175-200、200-2-2、225-250、250-300、300-325、325-350、350-375、375-400、400-425、 425-450、450-475、475-500、500-525、525-550、550-575、575-600、600-625、625-650、 650-675、675-700、700-725、725-750、750-775、775-800、800-825、825-850、850-875、875-900、900-925、925-950、950-975或975-1000mg/m^2,其中m^2表示受试者的体表面积。

[0541] 在一些方面,抗CD20抗体包含PRO131921。PRO131921是一种人源化抗CD20单克隆抗 体,与利妥昔单抗相比,更好的结合FcγRIIIa和增强的ADCC。参见,例如,Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25;和Casulo et al.Clin Immunol.154.1(2014):37-46。在一些实施方案中,PRO131921可用于治疗NHL。参见例如临床试验标识号NCT00452127。在一些实施方案中, PRO131921静脉内施用,例如作为静脉内输注。在一些实施方案中,PRO131921以15mg/m^2至1000mg/m^2的剂量施用,例如约15-20,20-25,25-30,30-35,35-40,40-45,45-50,50-55,55-60, 60-65,65-70,70-75,75-80,80-85,85-90,90-95,95-100,100-125,125-150,150-175,175-200, 200-226,225-250,250-300,300-325,325-350,350-375,375-400,400-425,425-450,450-475, 475-500,500-525,525-550,550-575,575-600,600-625,625-650,650-675,675-700,700-725, 725-750,750-775,775-800,800-825,825-850,850-875,875-900,900-925,925-950,950-975,或 975-1000mg/m^2,其中m^2表示受试者的体表面积。

[0542] 在一些方面,抗CD20抗体包含TRU-015。TRU-015是衍生自抗CD20抗体的结构域的抗 CD20融合蛋白。TRU-015小于单克隆抗体,但保留Fc介导的效应子功能。参见,例如,Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25。TRU-015含有与人IgG1铰链,CH2和CH3结构域连接但不含 CH1和CL结构域的抗CD20单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,TRU-015可

用于治疗 B细胞淋巴瘤和类风湿性关节炎。在一些情况下,TRU-015静脉内施用,例如作为静脉内输注。 在一些实施方案中,TRU-015以0.01-30mg/kg,例如0.01-0.015,0.015-0.05,0.05-0.15,0.15-0.5, 0.5-1,1-1.5,1.5-2.5,2.5-5,5-10,10-15,15-20,20-25或25-30mg/kg体重的剂量施用。在一些实施 方案中,TRU-015以至少1天,例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,或14天的给药间隔施用。 参见例如Burge et al.Clin Ther.30.10(2008):1806-16。

[0543] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD20抗体缀合或以其他方式结合到治疗剂,例如本文 所述的化学治疗剂(例如,环磷酰胺制剂,氟达拉滨,组蛋白脱乙酰酶抑制剂,去甲基化剂, 肽疫苗,抗肿瘤抗生素,酪氨酸激酶抑制剂,烷化剂,抗微管或抗有丝分裂剂,CD20抗体或 本文所述的CD20抗体药物缀合物),抗过敏剂,抗恶心剂(或抗呕吐药),止痛剂或细胞保 护剂。

[0544] CD22抑制剂和结合结构域

[0545] 如本文所用,术语“CD22”是指已知在白血病前体细胞上可检测的抗原决定簇。人和鼠氨 基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot中找到。例如,同种 型1-5人CD22的氨基酸序列可以分别见于登录号NP 001762.2,NP 001172028.1,NP 001172029.1,NP 001172030.1和NP 001265346.1,编码人CD22的变体1-5的核苷酸序列可以分 别在登录号NM 001771.3,NM 001185099.1,NM 001185100.1,NM 001185101.1,和NM 001278417.1中找到。如本文所用,“CD22”包括包含突变的蛋白质,例如全长野生型CD22的 点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的抗原结合部分识别并结合CD22 蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD22蛋白在癌细胞上表达。

[0546] 在一些方面,本公开提供了本文所述的CD22抑制剂或结合结构域,例如CD22抑制剂或 结合结构域。本公开还提供编码CD22结合结构域或包含CD22结合结构域的CAR的核酸。 CD22抑制剂包括但不限于CD22 CAR表达细胞,例如CD22 CART细胞或抗-CD22抗体(例如 抗CD22单或双特异性抗体)或其片段。组合物还可以包含第二活性剂,例如抗CD19 CAR表 达细胞或CD19结合结构域。活性剂可以是例如由单个核酸或不同核酸编码的。

[0547] 在一些方面,CD22抑制剂或结合结构域作为单一疗法施用。在一些方面,CD22抑制剂 或结合结构域与第二活性剂如抗CD19 CAR表达细胞组合施用。在一个实施方案中,CD22抑 制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达细胞,例如表达包含为鼠、人的或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0548] CD22 CAR表达细胞,例如CART

[0549] 在一个实施方案中,CD22抑制剂是CD22 CAR表达细胞,例如包含CD22结合结构域并被 工程化到细胞(例如,T细胞或NK细胞)的CD22-CAR,用于与CD19 CAR-表达细胞,例如CART组合施用,以及它们用于过继疗法的方法。

[0550] 在另一方面,本发明提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR 和CD22 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD22 CAR的第二细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包 括例如表达CAR(例如,CD19 CAR或CD22 CAR)的第一细胞,其包含主要细胞内信号传导 结构域,以及表达CAR(例如,CD19 CAR或CD22 CAR)的第二细胞,其包括次要信号传导 结构。

[0551] 在一个方面,CD22-CAR包含任选的前导序列(例如,本文所述的任选的前导序列),

细胞外抗原结合结构域,铰链(例如本文所述的铰链),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如,本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个方面,示例 性CD22 CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细胞外抗原结合 结构域,铰链,跨膜结构域,细胞内共刺激结构域(例如本文所述的细胞内共刺激结构域) 和细胞内刺激结构域。

[0552] 一方面,CAR22结合结构域包含SEQ ID NO:200-428中任一个提供的氨基酸序列(或由核 苷酸序列编码)的scFv部分。在一个方面,所述CAR22结合结构域包含在SEQ ID NOs:203,209, 215,221,227,232,238,244,250,256,262,268,274,280,286,292,298,304,310,316,322,328, 334,340,346,352,358,364,370,376,382,388,394,400,406,412,418,或423任一个提供的 scFv部分。

[0553] 在具体方面,本发明的CAR构建体包含scFv结构域,所述结构域选自SEQ ID NOS:203, 209,215,221,227,232,238,244,250,256,262,268,274,280,286,292,298,304,310,316,322, 328,334,340,346,352,358,364,370,376,382,388,394,400,406,412,418,或423,其中scFv 之前可以是任选的前导序列,例如SEQ ID NO:13中所提供的前导序列,然后是任选的铰链序 列,例如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49中提供的铰链序列, 如SEQ ID NO:15中提供的跨膜区,包括SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞内信号传导结构 域和包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的CD3ζ序列,例如,其中所述结构域相邻并且在相同 可读框内以形成单个融合蛋白。在一些实施方案中,所述scFv结构域是选自SEQ ID NOS:203, 209,215,221,227,232,238,244,250,256,262,268,274,280,286,292,298,304,310,316,322, 328,334,340,346,352,358,364,370,376,382,388,394,400,406,412,418,或423的人scFv结 构域。

[0554] 本发明还包括编码选自SEQ ID NO:203,209,215,221,227,232,238,244,250,256,262, 268,274,280,286,292,298,304,310,316,322,328,334,340,346,352,358,364,370,376,382, 388,394,400,406,412,418,或423的每个scFv片段的多肽的核苷酸序列。本发明还包括编码 选自SEQ ID NO:203,209,215,221,227,232,238,244,250,256,262,268,274,280,286,292, 298,304,310,316,322,328,334,340,346,352,358,364,370,376,382,388,394,400,406,412, 418,或423的每个scFv片段的多肽,和SEQ ID NO:13-17的每个结构域,加上本发明的编码的 CD22 CAR的核苷酸序列。

[0555] 在一些实施方案中,本文还提供全长CD22 CAR序列为SEQ ID NOS:207,213,219,225, 230,236,242,248,254,260,266,272,278,284,290,296,302,308,314,320,326,332,338,344, 350,356,362,368,374,380,386,392,398,404,410,416,422,或427,如表6A或6B所示。

[0556] 一方面,本发明包括重组核酸构建体,其包含编码CAR的核酸分子,其中所述核酸分子 包含编码例如本文所述的CD22结合结构域的核酸序列,例如,其与编码细胞内信号传导结构 域的核酸序列相邻并且在相同的可读框中。一方面,CD22结合结构域选自SEQ ID NOS:203, 209,215,221,227,232,238,244,250,256,262,268,274,280,286,292,298,304,310,316,322, 328,334,340,346,352,358,364,370,376,382,388,394,400,406,412,418,或423中的一个 或多个。在一个方面,本发明包括包含编码CAR的核酸分子的重组核酸构建体,其中所述核 酸分子包含编码CD22结合结构域的核酸序列,例如,其中所述序列与编码

细胞内信号传导结 构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框内。可以在CAR中使用的示例性细胞内信号传导结 构域包括但不限于例如CD3-ζ,CD28,4-1BB等的一个或多个胞内信号传导结构域。在一些情 况下,CAR可以包含CD3-ζ,CD28,4-1BB等的任何组合。

[0557] 一方面,本发明的CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NOS:200,208,214,220,226,231, 237,243,249,255,261,267,273,279,285,291,297,303,309,315,321,327,333,339,345,351, 357,363,369,375,381,387,393,399,405,411,417,422,或428的一个或多个的CAR构建体。在一个方面,本发明的CAR构建体的核酸序列包含SEQ ID NOs:204,210,216,222,116,233, 239,245,251,257,263,269,275,281,287,293,299,305,311,317,323,329,335,341,347,353, 359,365,371,377,383,389,395,401,407,413,117,或424中的一个或多个的scFv编码序列。

[0558] 在某些情况下,有利的是抗原结合结构域来源于CAR将最终用于其中的相同物种。例如, 对于在人类中使用,对于CAR的抗原结合结构域可能是有益的包含抗体或抗体片段的抗原结 合结构域的人或人源化残基。因此,一方面,抗原结合结构域包含人抗体或抗体片段。在一 个实施方案中,人CD22结合结构域包含本文描述的人CD22结合结构域的一个或多个(例如, 全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定 区3(LC CDR3),和/或本文描述的人CD22结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链 互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个,例如全部三个HC CDR的人CD22结合结构域。在一个实施方案中,人CD22结合结构域包含本文描述的人CD22结合结构域的一个或多个(例如全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如人CD22结合结构域具有两个可变重链区,每个可变 重链区包含本文所述的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人CD22结合 结构域包含本文所述的人轻链可变区(例如,在表6A,6B,10A或10B中)和/或本文所述的 人重链可变区(例如,在表6A,6B,9A或9B中)。在一个实施方案中,人CD22结合结构域 包含本文所述的人重链可变区(例如,在表6A,6B,9A或9B中),例如本文所述的至少两 个人重链可变区(例如,在表6A,8B,9A或9B中)。在一个实施方案中,CD22结合结构域 是包含表6A,6B,9A,9B,10A或10B的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案 中,CD22结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有表6A,6B,10A或10B中 提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或 10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列或与表6A,6B,10A或10B的氨基酸序列具有95-99% 同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有表6A,6B,9A或9B中提供的重链可变区的氨基 酸序列的至少一个,两个或三个修饰(例如取代)但不超过30,20或10个修饰(例如,取代) 的氨基酸序列,或与表6A,6B,9A或9B的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实 施方案中,人CD22结合结构域包含选自SEQ ID NO:203,209,215,221,227,232,238,244,250, 256,262,268,274,280,286,292,298,304,310,316,322,328,334,340,346,352,358,364,370, 376,382,388,394,400,406,412,418,或423的序列,或者其具有95-99%同一性的序列。在一 个实施方案中,人CD22结合结构域是scFv,并且包含本文,例如表6A,6B,10A或10B所述 的氨基酸序列的轻链可变区通过接头,例如本文所述的接头连接到包含本文所述的,例如表 6A,6B,9A或9B中氨基酸序列的重链可变区。在一个实施方案中,人CD22结合结构域包括 $(Gly_4\text{-}Ser)n$接头,

其中n为1,2,3,4,5或6,例如3或4(SEQ ID NO:53)。scFv的轻链可变区和重 链可变区可以是例如以下取向中的任一个:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头- 轻链可变区。

[0559] 在一个方面,CD22结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特性。例如, 一方面,本发明的CAR组合物的包含抗原结合结构域的部分特异性结合人CD22或其片段。一 方面,本发明涉及包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域,其中所述抗体结合结构域特异性 结合CD22蛋白或其片段,其中所述抗体或抗体片段包含可变重链,其包括SEQ ID NO:s 700, 701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720, 721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,或738任一 个的氨基酸序列,和/或可变轻链,其包括SEQ ID NOs 739,740,741,742,743,744,745,746, 747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766, 767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,或777任一个的氨基酸序列。在某些方面,scFv 与前导序列相邻并且在相同的可读框内。一方面,前导序列是如SEQ ID NO:13所提供的多肽 序列。

[0560] 在实施方案中,CAR包含抗体或抗体片段,其包含CD22结合结构域,跨膜结构域和细胞 内信号传导结构域。在实施方案中,CD22结合结构域包含表8A,8B,10A或10B中列出的任 何CD22轻链结合结构域氨基酸序列的轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)中的一个或多个和表7A,7B,7C,9A或9B中列出 的任何CD22重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)中的一个或多个。

[0561] 在一个方面,CD22结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个方面,CD22 结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野生型或增强的亲 和力结合CD22蛋白或其片段。

[0562] 在某些情况下,人类scFv可以来源于展示文库。

[0563] 在一个实施方案中,CD22结合结构域例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋予 CART22构建体改善的稳定性。在另一个实施方案中,CD22结合结构域例如scFv包含例如从 人源化过程引起的至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个突变,使得突变的scFv赋予CART22构建体改善的 稳定性。

[0564] 在一个方面,本发明考虑了产生功能等同分子的起始抗体或片段(例如,scFv)氨基酸 序列的修饰。例如,包含在CAR中的CD22结合结构域(例如scFv)的VH或VL可被修饰以保 留CD22结合结构域,例如scFv的起始VH或VL构架区的至少约70%,71%.72%.73%,74%,75%, 76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%, 93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。本发明考虑到整个CAR构建体的修饰,例如CAR 构建体的各个结构域的一个或多个氨基酸序列的修饰,以便产生功能上等同的分子。可以修 饰CAR构建体以保留起始CAR构建体的至少约70%,71%.72%,73%,74%,75%,76%,77%, 78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%, 95%,96%,97%,98%,99%同一性。

[0565] 在一个实施方案中,CD22结合结构域包含CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3,CAR22-4,

CAR22-5,CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11,CAR22-12, CAR22-13, CAR22-14,CAR22-15,or CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19,CAR22-20, CAR22-21, CAR22-22,CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27,CAR22-28, CAR22-29, CAR22-30,CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35,CAR22-36, CAR22-37,或CAR22-38(例如,如表7A,7B,7C,8A和/或8B中所述)中任一个的6个CDR (例如HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3中的每一个)或 与其基本相同的序列。在一个实施方案中,CD22结合结构域包含CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3, CAR22-4,CAR22-5,CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11, CAR22-12,CAR22-13,CAR22-14, CAR22-15,or CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19, CAR22-20,CAR22-21,CAR22-22, CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27, CAR22-28,CAR22-29,CAR22-30, CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35, CAR22-36,CAR22-37,或CAR22-38(例如,如表7A,7B,7C,8A和/或8B所述)中任一个 的三个CDR(例如HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3各一个,或LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3 各一个)或与其基本相同的序列。

[0566] 其它实施方案包括编码本节所述多肽的核苷酸序列。例如,另外的实施方案包括编码表 6A-10B中任一个的多肽的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可以包含表6A或6B的CAR构建体 或scFv。核苷酸可以编码表9A或9B的VH,表10A或10B的VL或两者。核苷酸可以编码表7A, 7B或7C的VH CDR1,VH CDR2或VH CDR3中的一个或多个(例如,两个或三个)和/或该核 苷酸可以编码表8A或8B的VL CDR1,VL CDR2或VL CDR3的一个或多个(例如,两个或多个)。核苷酸序列还可以包括SEQ ID NOS:13,14,15,16,17,和51中的一个或多个,例如所有的结构域。

[0567] CD22 CAR还可以包含一个或多个跨膜结构域,例如本文所述的跨膜结构域,细胞内信 号传导结构域,例如本文所述的细胞内信号传导结构域,共刺激结构域,例如本文所述的共 刺激结构域,前导序列,例如如本文所述的前导序列,或铰链,例如,如本文所述的铰链。

[0568] 在一个实施方案中,CD22抑制剂是本文所述的CD22抑制剂。CD22抑制剂可以是例如抗 CD22抗体(例如,抗-CD22单或双特异性抗体),小分子或CD22 CART。在一些实施方案中, 抗CD22抗体与治疗剂缀合或以其他方式结合。示例性治疗剂包括例如微管破坏剂(例如单甲 基auristatin E)和毒素(例如白喉毒素或假单胞菌外毒素-A,蓖麻毒蛋白)。在一个实施方案 中,CD22抑制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达细胞, 例如表达包含鼠、人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0569] 在一个实施方案中,抗CD22抗体选自抗CD19/CD22双特异性配体定向毒素(例如,识别 与白喉毒素(DT)的前389个氨基酸DT 390连接的人CD19和CD22的两个scFv配体,例如DT2219ARL);抗CD22单克隆抗体-MMAE缀合物(例如DCDT2980S);融合到假单胞菌外毒 素-A的片段的抗CD22抗体RFB4的scFv(例如BL22);去糖基化的蓖麻毒蛋白A链缀合的抗 CD19/抗CD22(例如Combotox);人源化抗CD22单克隆抗体(例如,依帕珠单抗);或共价融 合到假单胞菌外毒素-A的38KDa片段的抗-CD22抗体的Fv部分(例如,moxetumomab pasudotox)。

[0570] 在一个实施方案中,抗CD22抗体是抗CD19/CD22双特异性配体定向毒素(例如DT2219ARL),抗CD19/CD22双特异性配体定向毒素以约1μg/kg,2μg/kg,3μg/kg,4μg/kg,5 μg/kg,6μg/kg,7μg/kg,8μg/kg,9μg/kg,10μg/kg,11μg/kg,12μg/kg,13μg/kg,14μg/kg,15 μ

g/kg,20μg/kg,25μg/kg,30μg/kg,40μg/kg,60μg/kg,80μg/kg,100μg/kg,120μg/kg,140 μg/kg,160μg/kg,180μg/kg,200μg/kg,220μg/kg,250μg/kg,300μg/kg,350μg/kg,400μg/kg,450μg/kg,500μg/kg,600μg/kg,700μg/kg,800μg/kg,900μg/kg,1mg.kg(例如30μg/kg，60μg/kg或80μg/kg)的剂量施用一段时间,例如每1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多天。在一些实施方案中,通过静脉内输注来施用抗CD19/CD22双特异性配体定向毒素。

[0571] 在一个实施方案中,抗CD22抗体是BL22,BL22以约1μg/kg,2μg/kg,3μg/kg,4μg/kg,5 μg/kg,6μg/kg,7μg/kg,8μg/kg,9μg/kg,10μg/kg,11μg/kg,12μg/kg,13μg/kg,14μg/kg,15 μg/kg,20μg/kg,25μg/kg,30μg/kg,40μg/kg,60μg/kg,80μg/kg,100μg/kg,120μg/kg,140 μg/kg,160μg/kg,180μg/kg,200μg/kg,220μg/kg,250μg/kg,300μg/kg,350μg/kg,400μg/kg, 450μg/kg,500μg/kg,600μg/kg,700μg/kg,800μg/kg,900μg/kg,1mg.kg(例如3μg/kg，30μg/kg,40μg/kg或50μg/kg)的剂量施用一段时间,例如每1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或 更多天。在一些实施方案中,BL22每天,每隔一天,每三天,或每四天施用一段时间,例如 4天周期,6天周期,8天周期,10天周期,12天周期或14天周期。在一个实施方案中,施用 BL22的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。在一些实施方案中,通过静脉内输注 施用BL22。

[0572] 在一个实施方案中,抗CD22抗体是去糖基化的蓖麻毒蛋白A链缀合的抗CD19/抗CD22 (例如,Combotox),并且去糖基化的蓖麻毒蛋白A链缀合的抗CD19/抗-CD22以约500μg/m^2, 600μg/m^2,700μg/m^2,800μg/m^2,900μg/m^2,1mg/m^2,2mg/m^2,3mg/m^2,4mg/m^2,5mg/m^2,6mg/m^2,或7mg/m^2的剂量施用一段时间,例如每1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,或12或更多 天。在一些实施方案中,去糖基化的蓖麻毒蛋白A链缀合的抗CD19/抗CD22每天,每隔一天， 每三天,或每四天施用一段时间,例如4天周期,6天周期,8天周期,10天周期,12天周期或 14天周期(例如,每隔一天持续6天)。在一个实施方案中,施用去糖基化的蓖麻毒蛋白A链 缀合的抗CD19/抗-CD22的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。在一些实施方案中,通过静脉内输注施用去糖基化的蓖麻毒蛋白A链缀合的抗CD19/抗-CD22。

[0573] 在一个实施方案中,抗CD22抗体是人源化抗-CD22单克隆抗体(例如,依帕珠单抗)， 并且以约10mg/m^2/周,20mg/m^2/周,50mg/m^2/周,100mg/m^2/周,120mg/m^2/周,140mg/m^2/周, 160mg/m^2/周,180mg/m^2/周,200mg/m^2/周,220mg/m^2/周,250mg/m^2/周,260mg/m^2/周,270mg/m^2/周,280mg/m^2/周,290mg/m^2/周,300mg/m^2/周,305mg/m^2/周,310mg/m^2/周,320mg/m^2/周,325mg/m^2/周,330mg/m^2/周,335mg/m^2/周,340mg/m^2/周,345mg/m^2/周,350mg/m^2/周,355mg/m^2/周,360mg/m^2/周,365mg/m^2/周,370mg/m^2/周,375mg/m^2/周,380mg/m^2/周,385 mg/m^2/周,390mg/m^2/周,400mg/m^2/周,410mg/m^2/周,420mg/m^2/周,430mg/m^2/周,440mg/m^2/ 周,450mg/m^2/周,460mg/m^2/周,470mg/m^2/周,480mg/m^2/周,490mg/m^2/周,500mg/m^2/周, 600mg/m^2/周,700mg/m^2/周,800mg/m^2/周,900mg/m^2/周,1g/m^2/周,或2g/m^2/周(例如,360 mg/m^2/周或480mg/m^2/周)的剂量施用人源化抗-CD22单克隆抗体持续一段时间,例如每1,2, 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多周。在一些实施方案中,第一剂量低于随后的剂量(例如, 360mg/m^2/周的第一剂量,随后的剂量为370mg/m^2/周)。在一些实施方案中,通过静脉内输 注来施用人源化抗-CD22单克隆抗体。

[0574] 在一个实施方案中,抗-CD22抗体是moxetumomab pasudotox,并且moxetumomab pasudotox以约1μg/kg,2μg/kg,3μg/kg,4μg/kg,5μg/kg,6μg/kg,7μg/kg,8μg/kg,9μg/kg,

10 μg/kg,11μg/kg,12μg/kg,13μg/kg,14μg/kg,15μg/kg,20μg/kg,25μg/kg,30μg/kg,40μg/kg, 60μg/kg,80μg/kg,100μg/kg,120μg/kg,140μg/kg,160μg/kg,180μg/kg,200μg/kg,220μg/kg, 250μg/kg,300μg/kg,350μg/kg,400μg/kg,450μg/kg,500μg/kg(例如,5μg/kg,10μg/kg,20 μg/kg,30μg/kg,40μg/kg,或50μg/kg)的剂量施用一段时间,例如每1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12或更多天。在一些实施方案中,每天一次,每隔一天,每三天,或每四天施用 moxetumomab pasudotox一段时间,例如4天周期,6天周期,8天周期,10天周期,12天周期 或14天周期(例如,每隔一天持续6天)。在一个实施方案中,施用了1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12或更多个周期的moxetumomab pasudotox。在一些实施方案中,通过静脉内输注来施用 moxetumomab pasudotox。

[0575] 在一个实施方案中,CD22抗体分子包含CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3,CAR22-4,CAR22-5,CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11,CAR22-12, CAR22-13,CAR22-14,CAR22-15,or CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19,CAR22-20, CAR22-21,CAR22-22,CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27,CAR22-28, CAR22-29,CAR22-30,CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35,CAR22-36, CAR22-37,或CAR22-38(例如,如表7A,7B,7C,8A和/或8B中所述)中任一个的6个CDR (例如HC CDR1,HC CDR2,HC CDR3,LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3的各一个)或与 其基本相同的序列。在一个实施方案中,CD22抗体分子包含CAR22-1,CAR22-2,CAR22-3, CAR22-4,CAR22-5,CAR22-6,CAR22-7,CAR22-8,CAR22-9,CAR22-10,CAR22-11, CAR22-12,CAR22-13,CAR22-14,CAR22-15,or CAR22-16,CAR22-17,CAR22-18,CAR22-19, CAR22-20,CAR22-21,CAR22-22,CAR22-23,CAR22-24,CAR22-25,CAR22-26,CAR22-27, CAR22-28,CAR22-29,CAR22-30,CAR22-31,CAR22-32,CAR22-33,CAR22-34,CAR22-35, CAR22-36,CAR22-37,或CAR22-38(例如,如表7A,7B,7C,8A和/或8B中所述)中任一 个的三个CDR(例如,HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3各一个,或LC CDR1,LC CDR2和 LC CDR3各一个),或与其基本相同的序列。在一个实施方案中,CD22抗体分子包含如表6A 或6B所述的重链可变区,轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者或scFv,或与其基本相 同的序列。在实施方案中,CD22抗体分子是分离的抗体分子。

[0576] ROR1抑制剂

[0577] 如本文所用,术语“ROR1”是指已知在白血病前体细胞上可检测的抗原决定簇。人和鼠氨 基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot中找到。例如,人ROR1 的异构体1和2前体的氨基酸序列分别可以在登录号NP_005003.2和NP_001077061.1中找到,编 码它们的mRNA序列可以在登录号NM_005012.3和NM_001083592.1中找到。如本文所用, “ROR1”包括包含突变的蛋白质,例如全长野生型ROR1的点突变,片段,插入,缺失和剪接 变体。一方面,CAR的抗原结合部分识别并结合ROR1蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面, ROR1蛋白在癌细胞上表达。

[0578] 本文还提供了ROR1抑制剂和组合疗法。ROR1抑制剂包括但不限于抗ROR1 CAR表达细 胞,例如,CART和抗ROR抗体(例如,抗ROR1单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施 方案中,抗ROR1抑制剂可用于治疗B细胞恶性肿瘤(例如,白血病,例如CLL和B细胞淋巴 瘤,例如套细胞淋巴瘤;ALL;小淋巴细胞淋巴瘤;边缘细胞B细胞淋巴瘤;和伯基特淋巴瘤)或 上皮癌(例如,乳腺癌,肾细胞癌,肺癌,结肠直肠癌,卵巢癌和黑素瘤)。在一个实施方 案中,CD20抑制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达细胞, 例如表

达包含为鼠,人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0579] Hudecek,et al.Clin.Cancer Res.19.12(2013):3153-64(通过引用并入本文)中描述了一种示 例性的抗ROR1抑制剂。例如,抗ROR1抑制剂包括Hudecek等描述的抗ROR1 CART(例如, 如Hudecek等人在第3155页,第一个完整段落(通过引用并入本文)所述生成的)。在其它实 例中,抗ROR1抑制剂包括抗体或其片段,其包含Hudecek等在跨3154-55页的段落;Baskar et al.MAbs 4(2012):349-61;和Yang et al.PLoS ONE 6(2011):e21018(通过引用并入本文)描述 的2A2和R12抗ROR1单克隆抗体的VH和/或VL序列。

[0580] 在其它实施方案中,ROR1抑制剂包括靶向ROR1的抗体或其片段(例如,单链可变片段 (scFv)),其包括在US 2013/0101607中描述的那些,例如US 2013/0101607(通过引用并入 本文)的SEQ ID NOs:1或2。在一些实施方案中,抗ROR1抗体片段(例如,scFv)与生物活性分子缀合或融合,例如,以形成嵌合抗原受体(CAR),其指导免疫细胞例如T细胞应答ROR1表达细胞。

[0581] 在一些实施方案中,示例性ROR1抑制剂包括称为UC-961(Cirmtuzumab)的抗ROR1单 克隆抗体。参见例如临床试验标识号NCT02222688。Cirmtuzumab可用于治疗癌症,如慢性淋 巴细胞白血病(CLL),卵巢癌和黑色素瘤。参见,例如,Hojjat-Farsangi et al.PLoS One.8(4): e61167;和NCT02222688。

[0582] 在一些实施方案中,静脉内施用cirmtuzumab,例如作为静脉内输注。例如,每次输注提 供约700-7000μg(例如700-750,750-800,800-850,850-900,900-950,950-1000,1000-1500, 1500-2000,2000-2500,2500-3000,3000-3500,3500-4000,4000-4500,4500-5000,5000-5500, 5500-6000,6000-6500,或6500-7000μg)的cirmtuzumab。在其他实施方案中,cirmtuzumab以 10-100μg/kg体重,例如10-15,15-20,20-25,25-30,30-35,35-40,40-45,45-50,50-55,55-60, 60-65,65-70,70-75,75-80,80-85,85-90,90-95或95-100μg/kg体重的剂量施用。在一个实施方案 中,cirmtuzumab以15μg/kg体重的起始剂量施用。

[0583] 在一些实施方案中,cirmtuzumab以至少7天,例如7,14,21,28,35天或更长时间的给药间 隔施用。例如,cirmtuzumab以至少1周,例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26,28,20,22, 24,26,28,30周或更多的给药间隔施用。

[0584] 在一些实施方案中,cirmtuzumab以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间,例如至 少1周,例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24,26,28,30,40, 50,60周或更大,或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或更长,或1,2,3,4,5年或更长。例 如,在本文所述的剂量和给药间隔施用cirmtuzumab,每个治疗周期总共至少2个剂量(例如, 每个治疗周期至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20或更多个剂量)。

[0585] 在一些实施方案中,抗ROR1抗体与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0586] 在一些实施方案中,ROR1抑制剂包括抗ROR1 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗ROR1 CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的ROR1结合CAR编码。例如,抗 ROR1 CAR表达细胞,例如CART是通过将ROR1-CAR(其包含ROR1结合结构域)工程化到 细胞(例如T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。本文 还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0587] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR

和 ROR1 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达ROR1 CAR的第二细胞。

[0588] CD123抑制剂

[0589] CD123也称为白细胞介素-3受体(IL-3RA)的α链。IL-3受体(IL-3R)是由α和β链组成 的异源二聚体。IL-3R是膜受体。IL-3Rα链是360个氨基酸残基的糖蛋白。在一些白血病病症 中常常观察到CD123的异常。CD123在多种血液恶性肿瘤例如急性骨髓和B淋巴样白血病,母 细胞性浆细胞样树突状细胞瘤(BPDCN)和毛细胞白血病中过表达。

[0590] 如本文所用,术语“CD123”是指已知在某些恶性血液癌细胞例如白血病细胞上可检测的 抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot 中找到。例如,人CD123的氨基酸序列可以在登录号NP_002174.1(同种型1前体); NP_001254642.1(同种型2前体)找到,编码它们的mRNA序列可以在登录号NM_002183.3(变 体1);NM_001267713.1(变体2)找到。如本文所用,“CD123”包括包含突变的蛋白质,例 如全长野生型CD123的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。一方面,CAR的抗原结合部 分识别并结合CD123蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD123蛋白在癌细胞上表达。

[0591] 本文提供CD123抑制剂和组合疗法。CD123抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 CD123 CAR表达细胞,例如,CART和抗CD123抗体(例如抗CD123单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD123抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD123抑制剂与CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如本文所述的CAR 表达细胞,例如表达包含鼠、人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0592] 在一个实施方案中,CD123抑制剂是重组蛋白,例如包含CD123受体的天然配体(或片 段)。例如,重组蛋白是SL-401(也称为DT388IL3;德克萨斯大学西南医学中心),其是包含 与截短的白喉毒素融合的人IL-3的融合蛋白质。参见例如Testa et al.Biomark Res.2014;2:4; 和临床试验标识号NCT00397579。

[0593] 在另一个实施方案中,CD123抑制剂是抗CD123抗体或其片段。在一个实施方案中,抗 CD123抗体或其片段包含单克隆抗体,例如单特异性或双特异性抗体或其片段。例如,抗CD123抗体或其片段包含CSL360(CSL Limited)。CSL360是结合CD123的重组嵌合单克隆 抗体。在一些实施方案中,例如通过静脉内输注,静脉内施用CSL360。例如,CSL360以 0.1-10mg/kg,例如0.1-0.5mg/kg,0.5-1mg/kg,1-5mg/kg,或5-10mg/kg的剂量施用。参见例 如临床试验标识号NCT01632852;和Testa等人。

[0594] 在另一个实施方案中,CD123抗体或其片段包含CSL362(CSL Limited)。CSL362是靶 向CD123的人源化单克隆抗体,并针对抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的增强的激活进行了优化。在一些实施方案中,例如通过静脉内输注静脉内施用CSL362。在一些实例中,CSL362以0.1-12mg/kg,例如0.1-0.2mg/kg,0.2-0.5mg/kg,0.5-1mg/kg,1-6mg/kg,或6-12 mg/kg的剂量施用。参见例如临床试验标识号NCT01632852。

[0595] 在一个实施方案中,CD123抗体或其片段包含双特异性抗体,例如MGD006(MacroGenics)。MGD006是靶向CD123和CD3的双特异性抗体。参见例如临床试验标识号NCT02152956。

[0596] 在一些实施方案中,CD123抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0597] 在一些实施方案中,CD123抑制剂包括抗CD123 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD123 CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD123结合CAR编码。例如, 抗CD123 CAR表达细胞,例如CART是通过将CD123-CAR(其包含CD123结合结构域)工程 化到细胞(例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。 在一个实施方案中,抗CD123 CAR构建体包含scFv序列,例如US 2014/0322212 A1(其通过引 用并入本文)中提供的scFv序列。在一个实施方案中,抗CD123结合结构域是US 2014/0322212 A1中描述的scFv。在一个实施方案中,抗CD123结合结构域是在US 2014/0322212 A1中提供的CAR构建体的一部分。本文还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0598] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和 CD123 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达CD123 CAR的第二细胞。

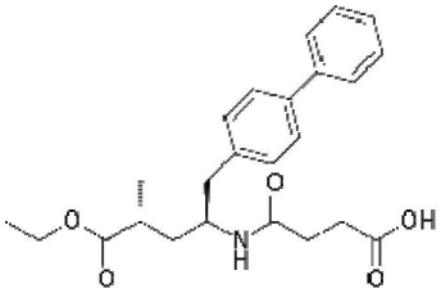
[0599] CD10抑制剂

[0600] 分化抗原簇10(CD10)也称为中性溶酶,膜金属内肽酶(MME),中性内肽酶(NEP) 和常见的急性淋巴细胞白血病抗原(CALLA)。CD10是由膜金属内肽酶(MME)基因编码 的酶。CD10在前B型表型的白血病细胞上表达,是常见的急性淋巴细胞白血病抗原。

[0601] 如本文所用,术语“CD10”是指已知在白血病细胞上可检测的抗原决定簇。人和鼠氨基酸 和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot中找到。例如,人CD10 的氨基酸序列可以在登录号NP_009218.2;NP_000893.2;NP_009219.2;NP_009220.2中找到; 编码它们的mRNA序列可以在登录号NM_007287.2(变体1bis);NM_000902.3(变体1); NM_007288.2(变体2a);NM_007289.2(变体2b)中找到。如本文所用,“CD10”包括包含突 变的蛋白质,例如全长野生型CD10的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面, CAR的抗原结合部分识别并结合CD10蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD10蛋白在 癌细胞上表达。

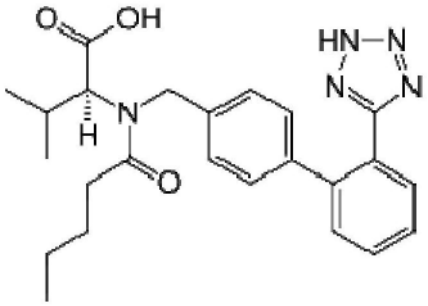
[0602] 本文还提供CD10抑制剂和组合疗法。CD10抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 CD10 CAR表达细胞,例如,CART和抗CD10抗体(例如抗CD10单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD10抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD10抑制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达细胞,例如表达包含鼠,人或人源化的抗体结合域的CAR的细胞组合施用。

[0603] 在一个实施方案中,CD10抑制剂包括sacubitril(AHU-377;Novartis)(4-{[(2S,4R)-1- (4-联苯基)-5-乙氧基-4-甲基-5-氧代-2-戊基]氨基}-4-氧代丁酸)或其药学上可接受的盐或 衍生物。sacubitril的结构如下所示。

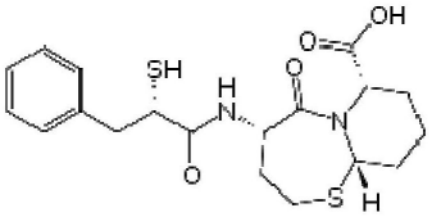
[0604] 

[0605] 在另一个实施方案中,CD10抑制剂包含缬沙坦/sacubritril(LCZ696;Novartis)或其药学 上可接受的盐或衍生物。缬沙坦/sacubritril是一种组合药物,其包含缬沙坦和

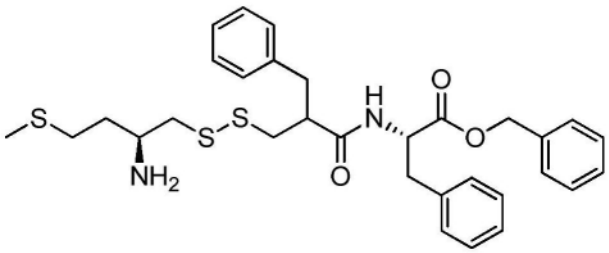
sacubitril的1:1混 合物。缬沙坦((S)-3-甲基-2-(N-{[2'-(2H-1,2,3,4-四唑-5-基)联苯基-4-基]甲基}戊酰胺 基)丁酸)如下所示。

[0606] 

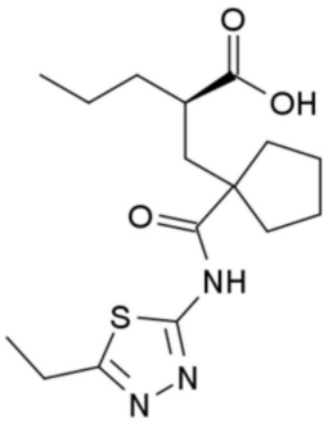
[0607] 在一个实施方案中,CD10抑制剂包含奥马曲拉(Bristol-Myers Squibb)((4S,7S,10aS)-5- 氧代-4-{[(2S)-3-苯基-2-硫烷基丙酰基]氨基}-2,3,4,7,8,9,10,10a-八氢吡啶并[6,1-b][1,3]硫杂 氮杂䓬7-羧酸)或其药学上可接受的盐或衍生物。奥马曲拉的结构如下所示。

[0608] 

[0609] 在一个实施方案中,CD10抑制剂包括RB-101(N-(3-{[(2S)-2-氨基-4-(甲硫基)丁基]二硫 代}-2-苄基丙酰基)-L-苯丙氨酸苄酯)或其药学上可接受的盐或衍生物。RB-101的结构如下 所示。

[0610] 

[0611] 在一个实施方案中,CD10抑制剂包含UK-414,495(Pfizer)((R)-2-({1-[(5-乙基-1,3,4-噻二唑 -2-基)氨甲酰基]环戊基}甲基)戊酸)或其药学上可接受的盐或衍生物。UK-414,495的结构 如下所示。

[0612] 

[0613] 在一些实施方案中,CD10抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0614] 在一些实施方案中,CD10抑制剂包括抗CD10 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD10 CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD10结合CAR编码。例如,抗 CD10 CAR表达细胞,例如CART是通过将CD10-CAR(其包含CD10结合结构域)工程化到细 胞(例如T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。本文还 提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0615] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR 和 CD10 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达CD10 CAR的第二细胞。

[0616] CD34抑制剂

[0617] 分化抗原簇34(CD34)也称为造血祖细胞抗原CD34,是细胞表面糖蛋白,起着细胞－ 细胞粘附因子的功能。CD34有时在某些癌症/肿瘤上表达,例如软组织腺泡状肉瘤,preB-ALL, AML,AML-M7,隆凸性皮肤纤维肉瘤,胃肠道间质瘤,巨细胞成纤维细胞瘤,粒细胞肉瘤, 卡波西肉瘤,脂肪肉瘤,恶性纤维组织细胞瘤,恶性外周神经鞘瘤,孟加拉尔血管外皮细胞 瘤(mengingeal hemangiopericytomas),脑膜瘤,神经纤维瘤,神经鞘瘤和乳头状甲状腺癌。

[0618] 如本文所用,术语“CD34”是指已知在造血干细胞和一些癌细胞上可检测的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot中找到。例 如,人CD34的氨基酸序列可以在登录号NP_001020280.1(同工型a前体);NP_001764.1(同 工型b前体)找到,编码它们的mRNA序列可以在登录号NM_001025109.1(变体1); NM_001773.2(变体2)中找到。如本文所用,“CD34”包括包含突变的蛋白质,例如全长野生 型CD34的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的抗原结合部分识别并结合CD34蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD34蛋白在癌细胞上表达。

[0619] 本文还提供CD34抑制剂和组合疗法。CD34抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 CD34 CAR表达细胞,例如,CART和抗CD34抗体(例如抗CD34单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD34抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD34抑制剂与CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如本文所述的CAR表达 细胞,例如,表达包含为鼠、人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0620] 在一个实施方案中,CD34抑制剂包含抗体或其片段,例如My-10单克隆抗体或包含My-10 单克隆抗体的免疫脂质体,如Mercadal et al.Biochim.Biophys.Acta.1371.1(1998):17-23中所 述。在其它实施方案中,CD34抑制剂包含含有靶向CD34表达细胞的癌症药物(例如多柔比 星)的免疫脂质体,如Carrion et al.Life Sci.75.3(2004):313-28所述。在一个实施方案中,CD34 抑制剂包含针对CD34的单克隆抗体,如Maleki et al.Hum.Antibodies.22(2013):1-8所述。在另 一个实施方案中,CD34抑制剂包含靶向CD34的单克隆抗体,如Maleki et al.Cell J. 16.3(2014):361-66所述。

[0621] 在一些实施方案中,CD34抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0622] 在一些实施方案中,CD34抑制剂包括抗CD34 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD34 CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD34结合CAR编码。例如,抗 CD34 CAR表达细胞,例如CART是通过将CD34-CAR(其包含CD34结合结构域)工程化到细 胞(例如,

T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。本文 还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0623] 在另一方面,本文提供了CAR表达细胞,例如CART细胞群体,其包含表达CD19 CAR和 CD34 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达CD34 CAR的第二细胞。

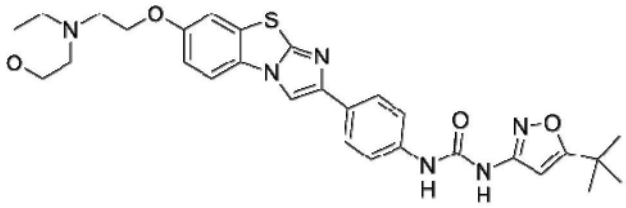
[0624] FLT-3抑制剂

[0625] Fms样酪氨酸激酶3(FLT-3)也称为分化抗原簇135(CD135),受体型酪氨酸蛋白激酶 FLT3或胎儿肝激酶-2(Flk2),是一种受体酪氨酸激酶。FLT-3是配体,细胞因子Flt3配体(FLT3L)的细胞因子受体。FLT-3在许多造血祖细胞的表面上表达,对于淋巴细胞发育是重要的。FLT3基因通常在白血病,例如急性骨髓性白血病(AML)中突变。

[0626] 如本文所用,术语“FLT-3”是指已知在造血祖细胞和一些癌细胞例如白血病细胞上可检测 的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和 Swiss-Prot中找到。例如,人FLT-3的氨基酸序列可以在登录号NP_004110.2中找到,编码它们 的mRNA序列可以在登录号NM_004119.2中找到。如本文所用,“FLT-3”包括包含突变的蛋白 质,例如全长野生型FLT-3的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的 抗原结合部分识别并结合FLT-3蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,FLT-3蛋白在癌细胞 上表达。

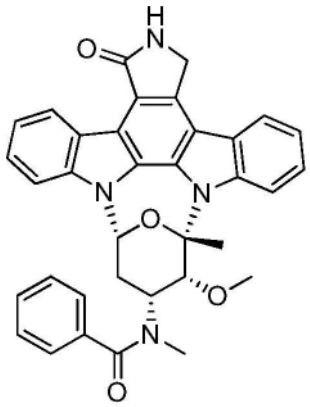
[0627] 本文还提供FLT-3抑制剂和组合疗法。FLT-3抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 FLT-3 CAR表达细胞,例如,CART和抗FLT-3抗体(例如抗FLT-3单或双特异性抗体)及其 片段。在一些实施方案中,抗FLT-3抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实 施方案中,FLT-3抑制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表 达细胞,例如表达包含为鼠,人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0628] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包含quizartinib(AC220;Ambit Biosciences)或其药学 上可接受的盐或衍生物。quizartinib是一种小分子受体酪氨酸激酶抑制剂。quizartinib(1-(5- (叔丁基)异噁唑-3-基)-3-(4-(7-(2-吗啉代乙氧基)苯并[d]咪唑并[2,1-b]噻唑-2-基)苯 基)脲)的结构如下所示。

[0629] 

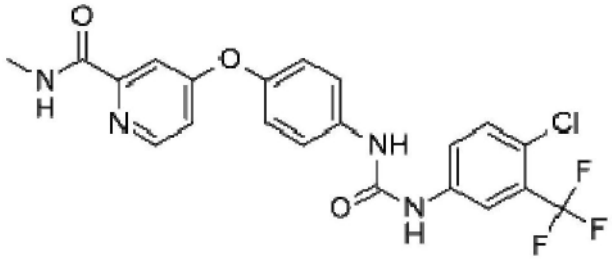
[0630] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包含米哚妥林(PKC412;Technische Universität Dresden) 或其药学上可接受的盐或衍生物。米哚妥林是一种蛋白激酶抑制剂,它是星形孢菌素的半合 成衍生物,星孢菌素是来自细菌棍孢链霉菌(streptomyces staurosporeus)的生物碱。

[0631] 米哚妥林((9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-六氢-10-甲氧基-9-甲基-11-(甲基氨基)-9,13- 环氧-1H,9H-二吲哚并[1,2,3-gh:3’,2’,1’-lm]吡咯并[3,4-j][1,7]benzodiamzonine-1-酮)的结构如下 所示。

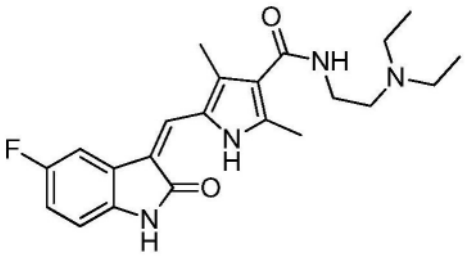
[0632] 

[0633] 在一些实施方案中,经口施用米哚妥林,例如以约25-200mg,例如约25-50mg,50-100mg,100-150mg或150-200mg的剂量经口施用。例如,米哚妥林例如以约25-200mg的剂量每天两次, 例如约25-50mg,50-100mg,100-150mg,或150-200mg每天两次经口施用。参见例如临床试 验标识号NCT01830361。

[0634] 在一个实施方案中,FLT-3抑制剂包括索拉非尼(Bayer和Onyx Pharmaceuticals)或其药 学上可接受的盐或衍生物。索拉非尼是多种酪氨酸蛋白激酶(例如VEGFR和PDGFR),Raf 激酶(例如C-Raf和B-Raf)和一些细胞内丝氨酸/苏氨酸激酶(例如C-Raf,野生型B-Raf和突 变体B-Raf)的小分子抑制剂。参见,例如 labeling.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Nexavar_PI.pdf。索拉非尼(4-[4-[[4-氯-3-(三氟 甲基)苯基]氨甲酰氨基]苯氧基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺的结构如下所示。

[0635] 

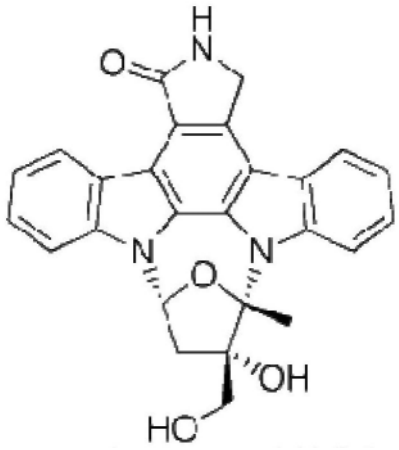
[0636] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包含舒尼替尼(以前称为SU11248;辉瑞)或其药学上 可接受的盐或衍生物。舒尼替尼是一种小分子口服药物,其可以抑制多种受体酪氨酸激酶, 包括FLT3。舒尼替尼已被食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗肾细胞癌(RCC)和伊马 替尼耐药性胃肠道间质瘤(GIST)。舒尼替尼(N-(2-二乙基氨基乙基)-5-[(Z)-(5-(5-氟-2- 氧代-1H-吲哚-3-亚基)甲基]-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-甲酰胺)的结构如下所示。

[0637] 

[0638] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包含lestaurtinib(CEP-701;Cephalon)或其药学上可接 受的盐或衍生物。Lestaurtinib是与星形孢菌素结构相关的酪氨酸激酶抑制剂。

[0639] lestaurtinib((9S,10S,12R)-2,3,9,10,11,12-六氢-10-羟基-10-(羟甲基)-9-甲基-9,12-环氧-1H-二吲 哚[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3,4-i][1,6]

benzodiazocin-1-酮)的结构如下所示。

[0640] 

[0641] 在一些实施方案中,经口,例如,以约40-100mg的剂量每天两次,例如约40-60mg,50-70mg,60-80mg,70-90mg或80-100mg每天两次施用lestaurtinib。参见例如临床试验标识 号NCT00079482;或NCT00030186。

[0642] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0643] 在一些实施方案中,FLT-3抑制剂包括抗FLT-3 CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗 FLT-3 CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的FLT-3结合CAR编码。例如,抗FLT-3 CAR表达细胞,例如CART是通过将FLT-3-CAR(包括FLT-3结合结构域)工程化到细 胞(例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。本文 还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0644] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞,其包含表达CD19 CAR和 FLT-3 CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达CD19 CAR 的第一细胞和表达FLT-3 CAR的第二细胞。

[0645] 在一个实施方案中,抗原结合结构域CAR(例如CD19,ROR1,CD20,CD22,CD123,CD10,CD34或FLT-3抗原结合结构域)包含scFv部分,例如人scFv部分。scFv之前可以是任选的前导序列,例如SEQ ID NO:13中提供,然后是任选的铰链序列,如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ SEQ ID NO:49提供,如SEQ ID NO:15提供的跨膜区,包括SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的细胞内信号传导结构域和包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO: NO:43的CD3ζ序列,例如,其中结构域相邻并且在相同可读框中以形成单个融合蛋白。

[0646] 在一些实施方案中,本公开涵盖包含编码CAR(例如CD19 CAR,ROR1 CAR,CD20 CAR, CD22 CAR,CD123 CAR,CD10 CAR,CD34 CAR或FLT-3 CAR)的核酸分子的重组核酸构建体,其中所述核酸分子包含编码例如本文所述抗原结合结构域的核酸序列,例如,其与编码细胞内信号传导结构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框中。可以在CAR中使用的示例 性细胞内信号传导结构域包括但不限于例如CD3-ζ,CD28,4-1BB等的一个或多个胞内信号传 导结构域。在一些情况下,CAR可以包含CD3-ζ,CD28,4-1BB等的任何组合。

[0647] 在一个实施方案中,抗原结合结构域(例如CD19,ROR1,CD20,CD22,CD123,CD10,CD34或FLT-3抗原结合结构域)的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或特性。例如,在一个实施方案中,本发明的CAR组合物的包含抗原结合结构域的部分特异性结合人B细胞抗原(例如CD19,ROR1,CD20,CD22,CD123,CD10,CD34或FLT-3)或其片段。在某 些实施方案

中,scFv与前导序列相邻并且在相同的可读框中。一方面,前导序列是如SEQ ID NO:13所提供的多肽序列。

[0648] 在一个实施方案中,抗原结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个实施 方案中,抗原结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野生型 或增强的亲和力结合B细胞蛋白或其片段。在某些情况下,人类scFv可以来源于展示文库。

[0649] 在一个实施方案中,抗原结合结构域例如scFv包含至少一个突变,使得突变的scFv赋予 CAR构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,抗原结合结构域例如scFv包含至少 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10个突变,其由例如人源化过程引起,使得突变的scFv赋予CAR构建体的改 善的稳定性。

[0650] 在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包括例如表达包括主要细胞内信号传导结构域 的CAR(例如,CD19 CAR,ROR1 CAR,CD20 CAR,CD22 CAR,CD123 CAR,CD10 CAR,CD34 CAR或FLT-3 CAR)的第一细胞,和表达包括次要细胞内信号传导结构域的CAR(例 如CD19 CAR,ROR1 CAR,CD20 CAR,CD22 CAR,CD123 CAR,CD10 CAR,CD34 CAR 或FLT-3 CAR))的第二细胞。

[0651] CD79b抑制剂

[0652] 如本文所用,术语“CD79b”是指已知在某些恶性血液癌细胞例如白血病细胞上可检测的 抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot 中找到。例如,人CD79b的氨基酸序列可以在登录号NP_000617.1(同工型1前体),NP_067613.1 (同工型2前体)或NP_001035022.1(同工型3前体)找到,编码它们的mRNA序列可以在登 录号NM_000626.2(转录物变体1),NM_021602.2(转录物变体2)或NM_001039933.1(转 录物变体3)中找到。如本文所用,“CD79b”包括包含突变的蛋白质,例如全长野生型CD79b 的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的抗原结合部分识别并结合CD79b 蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD79b蛋白在癌细胞上表达。在实施方案中,CD79b 蛋白是野生型CD79b蛋白;在其它实施方案中,CD79b蛋白是突变型CD79b蛋白。

[0653] CD79b也称为免疫球蛋白相关β,其是B淋巴细胞抗原受体多聚复合物的组分。CD79b与 称为CD79a(免疫球蛋白相关α)的另一种辅助蛋白质形成异二聚体,并且该异二聚体与B细 胞上的表面免疫球蛋白复合。CD79b对于B淋巴细胞抗原受体的组装和表达表达是重要的。 CD79b和CD79a对于前B细胞和B细胞的发育是重要的。在许多B-CLL细胞中发生突变和异常 的CD79b表达,并且可能与B-CLL中B淋巴细胞抗原受体的表面表达的丧失和/或缺陷信号传 导相关。参见例如Thompson et al.Blood 90.4(1997):1387-94。在某些情况下,CD79b的突变形 式或剪接变体的过表达已经与B-CLL和其他淋巴样恶性肿瘤中的减少的B淋巴细胞抗原受体 相关。参见,例如,Cragg et al.Blood 100.9(2002):3068-76。

[0654] 本文提供CD79b抑制剂和组合疗法。CD79b抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 CD79b CAR表达细胞,例如CART和抗CD79b抗体(例如抗CD79b单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD79b抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD79b抑制剂与CD19抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如本文所述的CAR 表

达细胞,例如表达包含鼠、人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0655] 在一个实施方案中,CD79b抑制剂是抗CD79b抗体或其片段。在一个实施方案中,抗79b 抗体或其片段包含单克隆抗体,例如单特异性或双特异性抗体或其片段。例如,抗CD79b抗 体或其片段包含抗CD79b抗体药物缀合物,例如polatuzumab vedotin(Roche)。在实施方案 中,polatuzumab vedotin用于治疗癌症,例如NHL,例如滤泡性淋巴瘤或DLBCL,例如复发 性或难治性滤泡性淋巴瘤或DLBCL。参见例如NCT02257567。在实施方案中,抗CD79b抗体 或其片段是包含结合CD32B和D79B的组分的双特异性抗体,例如MGD010(MacroGenics)。参见例如NCT02376036。

[0656] 在一些实施方案中,CD79b抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0657] 在一些实施方案中,CD79b抑制剂包括抗CD79b CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD79b CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD79b结合CAR编码。例如, 抗CD79b CAR表达细胞,例如CART是通过将CD79b-CAR(其包含CD79b结合结构域)工程 化到细胞(例如,T细胞或NK细胞)而产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施 用。本文还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0658] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的NK细胞,其包含表达CD19 CAR和CD79b CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,CAR表达细 胞的群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD79b CAR的第二细胞。

[0659] C179b抑制剂

[0660] 如本文所用,术语“CD179b”是指已知在一些恶性血液癌细胞例如白血病细胞上可检测的 抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot 中找到。例如,人CD179b的氨基酸序列可以在登录号NP_064455.1(同工型a前体)或 NP_690594.1(同工型b前体)中找到,编码它们的mRNA序列可以在登录号NM_020070.3(转 录物变体1)或NM_152855.2(转录物变体2)找到。如本文所用,“CD179b”包括包含突变的 蛋白质,例如全长野生型CD179b的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。一方面,CAR的 抗原结合部分识别并结合CD179b蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD179b蛋白在癌 细胞上表达。在实施方案中,CD179b蛋白是野生型CD179b蛋白;在其它实施方案中,CD179b 蛋白是突变CD179b蛋白。

[0661] CD179b也称为免疫球蛋白λ样多肽1(IGLL1)。CD179b是与膜结合的Ig mu重链复合的 异二聚体轻链的亚基。轻链和重链共同形成前B细胞受体。CD179b中的突变已经与B细胞缺 乏和丙种球蛋白缺乏血症相关。CD179b在一些癌细胞,例如前体B细胞淋巴母细胞淋巴瘤细 胞中表达。

[0662] 本文提供CD179b抑制剂和组合疗法。CD179b抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白, 抗CD179b CAR表达细胞,例如CART和抗CD179b抗体(例如抗CD179b单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD179b抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD179b抑制剂与CD20抑制剂,例如表达CD19 CAR的细胞,例如本文所述的CAR表达细胞,例如,表达包含鼠、人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0663] 在一个实施方案中,CD179b抑制剂是抗CD179b抗体或其片段。在一个实施方案中,抗 -179b抗体或其片段包含单克隆抗体,例如单特异性或双特异性抗体或其片段。

[0664] 在一些实施方案中,CD179b抑制剂与治疗剂缀合或以其他方式结合。

[0665] 在一些实施方案中,CD179b抑制剂包括抗CD179b CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗CD179b CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD179b结合CAR编码。例如,抗CD179b CAR表达细胞例如CART是通过将CD179b-CAR(其包含CD179b结合结构域) 工程化到细胞(例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合 施用。本文还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0666] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的NK细胞,其包含表达CD19 CAR和CD179b CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CAR表达细胞 的群体可以包括表达CD19 CAR的第一细胞和表达CD179b CAR的第二细胞。

[0667] CD79a抑制剂

[0668] 如本文所用,术语“CD79a”是指已知在一些恶性血液癌细胞例如白血病细胞上可检测的 抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库,例如GenBank,UniProt和Swiss-Prot 中找到。例如,人CD79a的氨基酸序列可以在登录号NP_001774.1(同工型1前体)或 NP_067612.1(同工型2前体)找到,编码它们的mRNA序列可以在登录号NM_001783.3(转 录物变体1)或NM_021601.3(转录物变体2)中找到。如本文所用,“CD79a”包括包含突变的 蛋白质,例如全长野生型CD79a的点突变,片段,插入,缺失和剪接变体。在一个方面,CAR的抗原结合部分识别并结合CD79a蛋白的细胞外结构域内的抗原。一方面,CD79a蛋白在癌细胞上表达。在实施方案中,CD79a蛋白是野生型CD79a蛋白;在其它实施方案中,CD79a蛋白是突变型CD79a蛋白。

[0669] CD79a也称为免疫球蛋白相关α。CD79a与CD79b异二聚化以形成B淋巴细胞抗原受体多 聚体复合物的组分。CD79a在许多血液癌症,例如急性白血病(例如AML),B细胞淋巴瘤和骨髓瘤中表达。

[0670] 本文提供CD79a抑制剂和组合疗法。CD79a抑制剂包括但不限于小分子,重组蛋白,抗 CD79a CAR表达细胞,例如CART和抗CD79a抗体(例如抗CD79a单或双特异性抗体)及其片段。在一些实施方案中,抗CD79a抑制剂可用于治疗本文所述的B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,CD79a抑制剂与CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,例如本文所述的CAR表达 细胞,例如表达包含鼠,人或人源化的抗体结合结构域的CAR的细胞组合施用。

[0671] 在一个实施方案中,CD79a抑制剂是抗CD79a抗体或其片段。在一个实施方案中,抗CD79a 抗体或其片段包含单克隆抗体,例如单特异性或双特异性抗体或其片段。例如,抗CD79a抗 体或其片段包含Polson et al.Blood 110.2(2007):616-23(通过引用并入本文)描述的抗CD79a抗 体或其片段(例如,可变区或CDR)。例如,抗CD79a抗体或其片段包含Polson等人描述的 7H7,15E4或16C11抗体或其片段(例如可变区或CDR)。见Id。

[0672] 在一些实施方案中,CD79a抑制剂与治疗剂缀合或以其它方式结合。

[0673] 在一些实施方案中,CD79a抑制剂包括抗CD79a CAR表达细胞,例如CART,例如表达抗 CD79a CAR构建体的细胞或由包含scFv,CDR或VH和VL链的CD79a结合CAR编码。例如, 抗CD79a CAR表达细胞,例如CART是通过将CD79a-CAR(其包含CD79a结合结构域)工程 化到细胞(例如,T细胞或NK细胞)产生的,例如用于与本文所述的CAR表达细胞组合施用。 本文还提供了本文所述的CAR表达细胞用于过继疗法的方法。

[0674] 在另一方面,本文提供了一群CAR表达细胞,例如CART细胞或表达CAR的NK细胞,其包含表达CD19 CAR和CD79a CAR的细胞混合物。例如,在一个实施方案中,CAR表达细胞 的

群体可以包括表达CD20 CAR的第一细胞和表达CD79a CAR的第二细胞。

[0675] CAR疗法

[0676] 本文中的抑制剂,例如针对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a的表达CAR的细胞可以包含一种或多种本文所述的组分,例如跨膜结构域,细胞内信号传导结构域,共刺激结构域,前导序列或铰链。

[0677] 一方面,本发明包括包含编码CAR的转基因的重组核酸构建体。在一些实施方案中,核 酸分子包含编码选自SEQ ID NO:61-72中的一个或多个的抗CD19结合结构域的核酸序列,其 中所述序列与编码细胞内信号传导结构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框内。可以在 CAR中使用的示例性细胞内信号传导结构域包括但不限于例如CD3-ζ,CD28,4-1BB等的一个 或多个胞内信号传导结构域。在一些情况下,CAR可以包含CD3-ζ,CD28,4-1BB等的任何 组合。

[0678] 在一个方面,本发明考虑了产生功能等同分子的起始抗体或片段(例如,scFv)氨基酸 序列的修饰。例如,包含在CAR中的抗原结合结构域(例如scFv)的VH或VL可被修饰以保 留抗原结合结构域例如scFv的起始VH或VL构架区的至少约70%,71%.72%.73%,74%,75%, 76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%, 93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。本发明考虑到整个CAR构建体的修饰,例如CAR 构建体的各个结构域的一个或多个氨基酸序列的修饰,以便产生功能上等同的分子。可以修 饰CAR构建体以保留起始CAR构建体的至少约70%,71%,72%.73%,74%,75%,76%,77%, 78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%, 95%,96%,97%,98%,99%同一性。本发明还考虑了CDR的修饰,例如CAR构建体的一个或 多个CDR的一个或多个氨基酸序列的修饰,以产生功能上等同的分子。例如,相对于本文提 供的CDR序列,CDR可以具有例如至多并且包括1,2,3,4,5或6个改变(例如,取代)。

[0679] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过从表达该基因 的细胞中筛选文库,通过从已知包含该基因的载体得到该基因,或通过使用标准技术直接从 含有该基因的细胞和组织中分离。或者,感兴趣的核酸可以合成产生,而不是克隆。

[0680] 本发明尤其包括表达可直接转导入细胞的CAR的逆转录病毒和慢病毒载体构建体。

[0681] 本发明还包括可直接转染入细胞的RNA构建体。用于产生用于转染的mRNA的方法涉及 用特别设计的引物对模板的体外转录(IVT),随后加入多聚A以产生构建体,该构建体含有 3'和5'非翻译序列("UTR"),5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES),待表达的核酸和通常 长度为50-2000个碱基(SEQ ID NO:118)的多聚A尾。如此生产的RNA可以有效地转染不同 种类的细胞。在一个实施方案中,模板包括CAR的序列。在一个实施方案中,通过电穿孔将 RNA CAR载体转导入T细胞。

[0682] 抗原结合结构域

[0683] 在一个方面,本发明的CAR包含另外称为抗原结合结构域的靶特异性结合元件。部分的 选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数目。例如,可以选择抗原结合结构域以识别作 为与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。因此,可以作为本发

明的CAR 中的抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒,细菌和寄生虫感染,自身 免疫疾病和癌细胞相关的那些。抗原结合结构域可结合例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34, CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种。

[0684] 在一个方面,可以通过将特异性结合所需抗原的抗原结合结构域工程化到CAR中将CAR 介导的T细胞应答导向目的抗原。

[0685] 抗原结合结构域(例如,结合CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一个或多个的抗原结合结构域)可以是结合抗原的任何结构域,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,重组抗体,鼠抗体,人抗体,人源化抗体及其功能片段,包括但不限于单结构域抗体如重链可变结构域(VH),轻链可变结构域(VL)和骆 驼衍生的纳米抗体的可变结构域(VHH),以及本领域已知的用作抗原结合结构域的备选支 架,例如重组纤连蛋白结构域,等等。

[0686] 在某些情况下,抗原结合结构域来源于CAR最终将被用于其中的相同物种是有益的。例 如,对于在人中使用,有益的是CAR的抗原结合结构域(例如,结合CD10,CD19,CD20,CD22, CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一种或多种的抗原结合结构域) 包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基。

[0687] 人源化抗体可以使用多种本领域已知的技术产生,包括但不限于CDR-接枝(参见,例如, 欧洲专利号EP 239,400;国际公开号WO 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089,其各自通过整体引用并入本文),贴面或镶面(参见,例如,欧洲专利号EP 592,106 和EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994, Protein Engineering,7(6):805-814;和Roguska等人,1994,PNAS,91:969-973,其各通过整 体引用并入本文),链改组(参见,例如,美国专利号5,565,332,其通过整体引用并入本文), 以及公开于下述文献的技术,例如,美国专利申请公开号US2005/0042664,美国专利申请公 开号US2005/0048617,美国专利号No.6,407,213,美国专利号No.5,766,886,国际公开号WO 9317105,Tan et al.,J.Immunol.,169:1119-25(2002),Caldas et al.,Protein Eng.,13(5):353-60 (2000),Morea et al.,Methods,20(3):267-79(2000),Baca et al.,J.Biol.Chem.,272(16):10678-84 (1997),Roguska et al.,Protein Eng.,9(10):895-904(1996),Couto et al.,Cancer Res.,55(23 Supp):5973s-5977s(1995),Couto et al.,Cancer Res.,55(8):1717-22(1995),Sandhu J S,Gene, 150(2):409-10(1994),和Pedersen et al.,J.Mol.Biol.,235(3):959-73(1994),其各通过整体引用 被并入本文。通常,构架区中的构架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代以改变,例 如改善抗原结合。这些构架取代通过本领域众所周知的方法鉴定,例如通过建模CDR和构架 残基的相互作用,以鉴定对抗原结合重要的构架残基和序列比较,以识别在特定位置的异常 构架残基。(参见,例如,Queen等人,美国专利号No.5,585,089;和Riechmann等人,1988, Nature,332:323,其通过整体引用并入本文)。

[0688] 人源化抗体或抗体片段具有非人来源剩余的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残 基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变结构域。如本文提供的,人源化抗体或抗 体片段包含非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和构架区,其中包含构架的氨基酸残基完 全或多数来自人种系。多种抗体或抗体片段的人源化技术是本领域中公知的,并且可以基本 上按照Winter及其同事的方法(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);

Riechmann等人,Nature, 332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988)),通过用啮齿类CDR或CDR 序列取代人抗体的相应序列,即,CDR接枝来进行(EP 239,400;PCT公开号WO 91/09967;和 美国专利号4,816,567;6,331,415;5,225,539;5,530,101;5,585,089;6548640,其内容在此通 过整体引用并入本文)。在这样的抗体和抗体片段中,基本上小于完整的人可变结构域已经被 来自非人物种的相应序列所取代。人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些构架(FR) 残基被来自啮齿类抗体中类似位点的残基取代的人抗体。抗体和抗体片段的人源化还可以通 过贴面或镶面(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498; Studnicka等人,Protein Engineering,7(6):805-814(1994);和Roguska等人,PNAS,91:969-973 (1994))或链改组(美国专利号5,565,332)实现,其内容在此通过整体引用并入本文。

[0689] 待用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链)的选择是为了降低抗原性。根据所 谓的“最佳拟合”方法,用啮齿类抗体的可变结构域的序列针对已知人可变结构域序列的整个 文库进行筛选。最接近于啮齿动物的序列的人序列然后被接受作为人源化抗体的人类构架 (FR)(Sims et al.,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia et al.,J.Mol.Biol.,196:901(1987),其内 容在此通过引用的方式整体并入)。另一种方法使用源自轻链或重链特定亚组的所有人抗体的 共有序列的特定构架。同一构架可用于数种不同的人源化抗体(参见,例如,Nicholson et al.Mol. Immun.34(16-17):1157-1165(1997);Carter et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992); Presta et al.,J.Immunol.,151:2623(1993),其内容在此通过引用的方式整体并入)。在一些实施 方案中,重链可变区的构架区,例如,所有的四个构架区从VH4_4-59种系序列衍生。在一个 实施方案中,构架区可以包含一个,两个,三个,四个或五个修饰,例如,取代,例如,从 在相应的鼠序列(例如SEQ ID NO:59)的氨基酸取代。在一个实施方案中,构架区,例如,轻 链可变区的所有四个构架区是从VK3_1.25种系序列衍生的。在一个实施方案中,构架区可以 包含一个,两个,三个,四个或五个修饰,例如,取代例如,从在相应的鼠序列(例如SEQ ID NO:59)的氨基酸的取代。

[0690] 在一些方面,包含抗体片段的本发明的CAR组合物的部分是人源化的,保留对靶抗原的 高亲和力以及其它有利的生物学特性。根据本发明的一个方面,人源化抗体和抗体片段是通 过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法制备的。三维免疫球蛋白模型通常是可获得并且是本领域技术人员熟悉的。计算机程序是可获得的, 其阐明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。检查这些显示图像容许分析残 基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用,例如,分析影响候选免疫球蛋白结合靶 抗原的能力的残基。以这种方式,FR残基可以从受体和输入序列中选择并组合,从而实现所 需抗体或抗体片段的特性,如对靶抗原的增加的亲和力。一般而言,CDR残基直接且最实质 地参与影响抗原结合。

[0691] 人源化抗体或抗体片段可以保留与例如本发明中原始抗体相似的抗原特异性,保留结合 人CD19,CD20,或CD22的能力。在一些实施方案中,人源化抗体或抗体片段可以具有改善 的结合到人CD19,CD20,或CD22的亲和力和/或特异性。

[0692] 一方面,结合结构域(例如,结合CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一个或多个的抗原结合结构域)是片段,例如,单链可变片段

(scFv)。一方面,结合结构域是Fv,Fab,(Fab')2或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例 如,Lanzavecchia et al.,Eur.J.Immunol.17,105(1987))。一方面,本发明的抗体及其片段以野 生型或增强的亲和力结合CD19,CD20或CD22蛋白。

[0693] 在某些情况下,可以根据本领域已知的方法(参见例如,Bird等人,(1988)Science 242:423-426和Huston等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)制备scFvs。可以 通过使用柔性的多肽接头将VH和VL连接在一起来制备ScFv分子。scFv分子包含具有优化长 度和/或氨基酸组成的接头(例如,Ser-Gly接头)。接头长度可以极大地影响scFv可变区如何折 叠和相互作用。实际上,如果使用短多肽接头(例如,5-10个氨基酸),则防止链内折叠。也需 要链间折叠使两个可变区一起形成功能性表位结合位点。对于接头方向和尺寸的实例,参见 例如Hollinger等人1993Proc Natl Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448,美国专利申请公开号 2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794和PCT公开号WO2006/020258和WO2007/024715, 被并入本文作为参考。

[0694] scFv可以在其VL和VH区域之间包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、 13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个或以上的氨基酸残基的接头。所述的接头序列可以包含天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨 酸和丝氨酸。在另一个实施方案中,接头序列包含甘氨酸和丝氨酸重复的集合,比如 $(Gly_4Ser)_n$,其中n为等于或大于1的正整数。(SEQ ID NO:18)在一个实施方案中,接头可以为 $(Gly_4Ser)_4$(SEQ ID NO:106)或$(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO:107)。接头长度的变化可以保持或提高 活性,在活性研究中产生优良的功效。

[0695] 在一些实施方案中,抗原结合结构域的氨基酸序列(例如,结合CD10,CD19,CD20, CD22, CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD179a的一个或多个的抗原结合结构域,或其 他部分或整个CAR)可以被修饰,例如,本文所述的氨基酸序列可以被修饰,例如通过保守 取代修饰。已经在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(如赖 氨酸,精氨酸,组氨酸),酸性侧链(如天冬氨酸,谷氨酸),不带电极性侧链(例如,甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸),非极性侧链(例如丙 氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸,色氨酸),β-支链侧链 (例如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。

[0696] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中的同一性百分比是指两个或更多个相同的序 列。当为了最大对应性比较和比对在比较窗口或使用以下序列比较算法之一测量的指定区域, 或通过手动对准和目视检查时,如果两个序列具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸 (例如在指定的区域或者当没有指定时,在整个序列上60%同一性,任选70%,71%.72%.73%, 74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%, 91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%的同一性),那么两个序列“基本相同”。任 选地,同一性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或在长度100至500 个或1000个或更多个核苷酸(或20,50,200或更多个氨基酸)的区域上。

[0697] 对于序列比较,通常一个序列作为测试序列与之比较的参考序列。当使用序列比较算法 时,将测试和参考序列输入到计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并且指定序列算法程 序参数。可以使用默认的程序参数,也可以指定备选参数。然后,序列比较算法基于

程序参 数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。用于比较的序列的比对方法是本领域 公知的。可以例如通过Smith和Waterman(1970)Adv.Appl.Math.2:482c的局部同源性算法，通过Needleman和Wunsch,(1970)J.Mol.Biol.48:443的同源性比对算法,通过Pearson and Lipman,(1988)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444的相似性搜索方法,通过这些算法的计算机 化实现(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr., Madison,WI中的GAP,BESTFIT,FASTA和TFASTA),或通过手动比对和目视检查(见， 例如,Brent et al.,(2003)Current Protocols in Molecular Biology)进行用于比较的序列的最佳比 对。

[0698] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算 法,其在Altschul et al.,(1977)Nuc.Acids Res.25:3389-3402;和Altschul et al.,(1990)J.Mol. Biol.215:403-410中描述。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获 得。

[0699] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性也可以使用已被并入ALIGN程序(2.0版)中的E. Meyers and W.Miller,(1988)Comput.Appl.Biosci.4:11-17)的算法确定,使用PAM120权重残 基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使 用已经被并入GCG软件包(可从www.gcg.com获得)中的Needleman and Wunsch(1970)J.Mol. Biol.48:444-453)算法确定,使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,并且空位权重16,14,12,10, 8,6或4,长度权重为1,2,3,4,5或6。

[0700] 在一个方面,本发明考虑了产生功能等同分子的起始抗体或片段(例如,scFv)氨基酸 序列的修饰。例如,包括在CAR中的结合结构域(例如,结合CD10,CD19,CD20,CD22,CD34, CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b,或CD79a中的一个或多个的抗原结合结构域)(例如, scFv)的VH或VL可以被修饰以保留抗CD19结合结构域例如scFv的起始VH或VL构架区的至 少约70%,71%,72%.73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%, 86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。更广泛地 说,包含在CAR中的CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1的B细胞抗原结合结 构域(例如scFv)的VH或VL可被修饰以保留抗原结合结构域(例如scFv)的起始VH或VL构 架区的至少约70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%, 85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。本发 明考虑到整个CAR构建体的修饰,例如CAR构建体的各个结构域的一个或多个氨基酸序列的 修饰,以便产生功能上等同的分子。CAR构建体可以被修饰以保留起始CAR构建体的至少约 70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%, 87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。

[0701] 双特异性CAR

[0702] 在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两 种抗原具有特异性。双特异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球 蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。在一 个实施方案中,第一和第二表位在相同的抗原上,例如相同的蛋白质(或多聚体蛋白质的亚 基)。在一个实施方案中,第一和第二表位重叠。在一个实施方案中,第一

和第二表位不重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位在不同的抗原上,例如不同的蛋白质(或多聚体蛋白质的 不同亚基)上。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的重链 可变结构域序列和轻链可变结构域序列,以及对第二表位具有结合特异性的重链可变结构域 序列和轻链可变结构域序列表位。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具 有结合特异性的半抗体和对第二表位具有结合特异性的半抗体。在一个实施方案中,双特异 性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段,以及对第二表位具有结合特 异性的半抗体或其片段。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特 异性的scFv或其片段,以及对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。在一个实施方案 中,第一表位位于CD19上,第二表位位于CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或 ROR1上。

[0703] 在某些实施方案中,抗体分子是多特异性(例如,双特异性或三特异性)抗体分子。用于 产生双特异性或异二聚体抗体分子的方案是本领域已知的;包括但不限于例如在US 5731168 中描述的“孔中的旋钮”方法;例如WO 09/089004,WO 06/106905和WO 2010/129304中所述的 静电转向Fc配对;如WO 07/110205中所述的链交换工程化结构域(SEED)异二聚体形成;Fab臂 交换,如例如WO 08/119353,WO 2011/131746和WO 2013/060867中所述;双抗体缀合物,例 如使用具有胺反应性基团和巯基反应性基团的异双官能试剂通过抗体交联以产生双特异性结 构,如例如US 4433059中所述;如在US 4444878中描述的通过两个重链之间的二硫键的还原和 氧化循环通过重组来自不同抗体的半抗体(重链-轻链对或Fab)产生的双特异性抗体决定簇;三 功能抗体,例如,通过巯基反应性基团交联的三个Fab'片段,如例如US5273743中所述;生物 合成结合蛋白,例如通过C末端尾部优选通过二硫化物或胺反应性化学交联交联的一对scFv, 如例如US5534254中所述;双功能抗体,例如具有通过亮氨酸拉链(例如c-fos和c-jun)二聚化的 不同结合特异性的Fab片段,所述亮氨酸拉替换了恒定结构域,如例如US5582996中所述;双 特异性和寡特异性单价和寡价受体,例如通过一个抗体的CH1区与通常具有相关轻链的另一 抗体的VH区之间的多肽间隔区连接的两个抗体(两个Fab片段)的VH-CH1区,如描述于例如 US5591828;双特异性DNA-抗体缀合物,例如,通过双链DNA片段交联抗体或Fab片段,如 例如US5635602中所述;双特异性融合蛋白,例如含有两个scFv的表达构建体,其中两个scFv 间具有亲水性螺旋肽接头和完全恒定区,如US5637481中所述;多价和多特异性结合蛋白,例 如具有具Ig重链可变区的结合区的第一结构域以及具有Ig轻链可变区的结合区的第二结构域 的多肽的二聚体,通常称为双抗体(更高级结构也包括创建双特异性,三特异性或四特异性分 子,如在例如US5837242中所述);具有连接的VL和VH链的微型抗体构建体,其进一步用肽接 头连接至抗体铰链区和CH3区,其可以二聚化以形成双特异性/多价分子,如在例如US5837821 中描述;与短肽接头(例如5或10个氨基酸)连接或在任一方向上根本没有接头的VH和VL结构 域,其可以形成二聚体以形成双特异性双抗体;三聚体和四聚体,如,例如US5844094中所述; VH结构域(或家族成员中的VL结构域)的串,其通过在与V L结构域相关的C末端处的可交联基团的肽键连接以形成一系列FV(或scFv),如例如,US5864019中所述;并且具有通过肽接头 连接的VH和VL结构域的单链结合多肽通过非共价或化学交联组合成多价结构,以形成例如 同二价,异二价,三价和四价结构,使用scFV或双抗体类型形式,如例如US5869620中所述。 另外的示例性多特异性和双特异性分子及其制备方法见于例如US5910573,

US5932448, US5959083,US5989830,US6005079,US6239259,US6294353,US6333396, US6476198, US6511663,US6670453,US6743896,US6809185,US6833441,US7129330, US7183076, US7521056,US7527787,US7534866,US7612181,US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1,US2003207346A1,US2003211078A1,US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1,US2005003403A1,US2005004352A1,US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1,US2005136049A1,US2005136051A1,US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1,US2006120960A1,US2006204493A1,US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1,US2007128150A1,US2007141049A1,US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1,US2008069820A1,US2008152645A1,US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1,US2008260738A1,US2009130106A1,US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1,US2009162360A1,US2009175851A1,US2009175867A1, US2009232811A1, US2009234105A1,US2009263392A1,US2009274649A1,EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2,WO04081051A1,WO06020258A2,WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2,WO2008119353A1,WO2009021754A2,WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1,WO9409131A1,WO9412625A2,WO9509917A1,WO9637621A2, WO9964460A1。上述申请的内容通过引用整体并入本文。

[0704] 在双特异性抗体分子的每个抗体或抗体片段(例如scFv)中,VH可以是VL的上游或下游。在一些实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如scFv)以其VH(VH_1)在其VL(VL_1)上游排列,下 游抗体或抗体片段(例如scFv)以其VL(VL_2)在其VH(VH_2)的上游排列,使得整个双特异性抗体 分子具有排列VH_1-VL_1-VL_2-VH_2。在其它实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如scFv)以其 VL(VL_1)在其VH(VH_1)上游排列,下游抗体或抗体片段(例如scFv)以其VH(VH_2)在其VL(VL_2) 的上游排列,使得总双特异性抗体分子具有排列VL_1-VH_1-VH_2-VL_2。任选地,如果构建体排 列为VH_1-VL_1-VL_2-VH_2,则接头置于两个抗体或抗体片段(例如scFv)之间,例如VL_1和VL_2之 间,或者如果构建体排列为VH_1-VL_2-VH_2,则接头在VH_1和VH_2之间。接头可以是本文所述的 接头,例如(Gly_4-Ser)n接头,其中n为1,2,3,4,5或6,例如4(SEQ ID NO:53)。通常,两个scFv 之间的接头应该足够长以避免两个scFv的结构域之间的错配。任选地,接头位于第一scFv的 VL和VH之间。任选地,接头位于第二scFv的VL和VH之间。在具有多个接头的构建体中,任 一两个或更多个接头可以相同或不同。因此,在一些实施方案中,双特异性CAR包含如本文 所述的排列中的VL,VH和任选的一个或多个接头。

[0705] 在某些实施方案中,抗体分子是对于第一B细胞表位具有第一结合特异性且对另一B细胞 抗原具有第二结合特异性的双特异性抗体分子。例如,在一些实施方案中,双特异性抗体分 子对CD19具有第一结合特异性,对CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1, CD79b, CD179b或CD79a中的一种或多种具有第二结合特异性。在一些实施方案中,双特异性抗体分 子对CD19具有第一结合特异性,对CD22具有第二结合特异性。

[0706] 嵌合TCR

[0707] 一方面,本文公开的抗体和抗体片段(例如针对CD10,CD19,CD20,CD22,CD34, CD123, FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a的那些抗体)可以移植到T细胞受体(“TCR”)链,例如TCRα或TCRβ链的一个或多个恒定结构域,以产生与癌症相关抗原特异性结合的嵌合TCR。不受理论的束缚,据信嵌合TCR将在抗原结合后通过TCR复合物发出信号。例如, 本文

公开的scFv可以移植到TCR链例如TCRα链和/或TCRβ链的恒定结构域,例如,细胞 外恒定结构域,跨膜结构域和胞质结构域的至少一部分。作为另一个实例,抗体片段,例如 本文所述的VL结构域可以移植到TCRα链的恒定结构域上,并且抗体片段,例如本文所述 的VH结构域可以移植到TCRβ链的恒定结构域(或者,VL结构域可以移植到TCRβ链的恒 定结构域,并且VH结构域可以被移植到TCRα链上)。作为另一个实例,抗体或抗体片段 的CDR,例如本文任何表中所述的抗体或抗体片段的CDR可以移植到TCRα和/或β链中以 产生与癌症相关抗原特异性结合的嵌合TCR。例如,本文公开的LC CDR可以移植到TCRα 链的可变结构域中,并且本文公开的HC CDR可以移植到TCRβ链的可变结构域,反之亦然。这样的嵌合TCR可以通过任何适当的方法产生(例如,Willemsen RA et al,Gene Therapy 2000; 7:1369-1377; Zhang T et al,Cancer Gene Ther 2004;11:487-496;Aggen et al,Gene Ther.2012 Apr;19(4):365-74)。

[0708] 非抗体支架

[0709] 在实施方案中,抗原结合结构域包含非抗体支架,例如纤连蛋白,锚蛋白,结构域抗体, 脂质运载蛋白,小模块免疫药物,maxybody,蛋白A或affilin。非抗体支架具有结合细胞上 的靶抗原的能力。在实施方案中,抗原结合结构域是在细胞上表达的天然存在的蛋白质的多 肽或其片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含非抗体支架。可以使用多种非抗体支 架,只要得到的多肽包含至少一个特异性结合靶细胞上的靶抗原的结合区即可。

[0710] 非抗体支架包括:纤连蛋白(Novartis,MA),锚蛋白(Molecular Partners AG,苏黎世, 瑞士),结构域抗体(Domantis,Ltd.,Cambridge,MA和Ablynx nv,Zwijnaarde, Belgium), 脂笼蛋白(Pieris Proteolab AG,Freising,Germany),小模块化免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc.,Seattle,WA),maxybodies(Avidia,Inc.,Mountain View,CA),蛋白A(Affibody AG,Sweden)和affilin(γ-晶状体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH,Halle,Germany)

[0711] 纤连蛋白支架可以基于纤连蛋白III型结构域(例如,纤连蛋白III型(^{10}Fn3结构域)的 第十个模块))。纤连蛋白III型结构域具有7或8个β链,其分布在两个β片层之间,它们 本身彼此堆叠以形成蛋白质的核心,并且还包含将β链彼此连接的环(类似于CDR)并且是 溶剂暴露的。在β片层夹心的每个边缘处存在至少三个这样的环,其中边缘是垂直于β链的 方向的蛋白质的边界(参见US 6,818,418)。由于这种结构,这种非抗体支架模拟了与抗体 的性质和亲和性相似的抗原结合性质。这些支架可用于体外环随机化和改组策略,其类似于 体内抗体的亲和力成熟过程。

[0712] 锚蛋白技术基于使用具有锚蛋白衍生的重复模块的蛋白质作为承载可用于结合不同靶标 的可变区的支架。锚蛋白重复模块是由两个反平行α-螺旋和β-转角组成的33个氨基酸的多 肽。可变区的结合大多通过使用核糖体展示来优化。

[0713] Avimers衍生自含有天然A结构域的蛋白质,如HER3。这些结构域自然地用于蛋白质- 蛋白质相互作用,而在人类中超过250种蛋白质在结构上是基于A结构域的。Avimers由许 多通过氨基酸接头连接的不同的“A-结构域”单体(2-10)组成。可以使用例如美国专利申请 公开号20040175756;20050053973;20050048512;和20060008844中描述的方法产生可以与 靶抗原结合的Avimers。

[0714] Affibody亲和配体是基于蛋白A的IgG结合结构域之一的支架的由三螺旋束组成的小的 简单蛋白质。蛋白A是来自细菌金黄色葡萄球菌的表面蛋白质。该支架结构域由58个氨基 酸组成,其中13个被随机化以产生具有大量配体变体的affibody文库(参见例如US 5,831,012)。Affibody分子模拟抗体,它们的分子量为6kDa,相比,抗体的分子量为150kDa。尽管其小体积,affibody分子的结合位点与抗体的结合位点相似。

[0715] 蛋白质表位模拟物(PEM)是模拟蛋白质的β-发夹二级结构(参与蛋白质-蛋白质相互作 用的主要二级结构)的中等大小,环状,肽样分子(MW 1-2kDa)。抗原结合结构域,例如包含scFv,单结构域抗体或骆驼抗体的那些,可以被引导到本文所述的任何靶受体/配体,例 如PD1受体,PD-L1或PD-L2。

[0716] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含结合靶细胞表面上的反配体的分子的细胞外结 构域或其反配体结合片段。

[0717] 抗原结合结构域可以包含抑制性受体的细胞外结构域。与共抑制性分子的反配体的衔接 被重定向到免疫效应物应答的优化。

[0718] 抗原结合结构域可以包含称为共刺激ECD结构域的共刺激分子的细胞外结构域,与共刺 激分子的反配体的衔接导致免疫效应物应答的优化。

[0719] 跨膜结构域

[0720] 在多种实施方案中,关于跨膜结构域,CAR可以被设计成包括连接至CAR的胞外结构域 的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括一个或更多个邻接跨膜区域的另外氨基酸,例如一个或 更多个与所述跨膜所源自的蛋白质的胞外区域相关联的氨基酸(例如,胞外区域的1、2、3、4、 5、6、7、8、9、10直至15个氨基酸)和/或与所述跨膜蛋白所源自的蛋白质的胞外区域相关联 的一个或更多个另外的氨基酸(例如,胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个 氨基酸)。在一个方面,跨膜结构域是与CAR的其它结构域这一结合的跨膜结构域,例如,在 一个实施方案中,跨膜结构域可以与信号传导结构域,共刺激结构域或铰链结构域来自相同 的蛋白质。另一方面,跨膜结构域与CAR的任何其他结构域不是来自相同的蛋白质。在某些 情况下,跨膜结构域可以被选择或通过氨基酸取代修饰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,例如以使与受体复合体的其它成员的相互作用最小化。在一个 方面,跨膜结构域能够与表达CAR的细胞的细胞表面上的另一个CAR同型二聚化。在一个不 同的方面,跨膜结构域的氨基酸序列可以被修饰或取代,以便使与存在于表达相同CAR的细 胞中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。

[0721] 跨膜结构域可以来源于天然或重组来源。当所述来源是天然的时,所述结构域可以来源 于任一膜结合的蛋白质或跨膜蛋白质。在一个方面,跨膜结构域能够向胞内结构域传导信号, 无论何时所述CAR与靶结合。在本发明中特别使用的跨膜结构域可以包括至少以下的跨膜结 构域:例如,T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22, CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154。在一些实施方案中,跨膜结构域可 以包括至少一个跨膜区,例如KIRDS2,OX40,CD2,CD27,LFA-1(CD11a,CD18),ICOS(CD278),4-1BB(CD137),GITR,CD40,BAFFR,HVEM(LIGHTR),SLAMF7,NKp80(KLRF1), NKp44,NKp30,NKp46,CD160,CD19,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα,ITGA1,VLA1,CD49a,ITGA4, IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1, ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,TNFR2, DNAM1(CD226),SLAMF4

(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9 (CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM (SLAMF1,CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,PAG/Cbp,NKG2D, NKG2C,或CD19的跨膜区。

[0722] 在某些情况下,跨膜结构域可以经由铰链(例如,来自人蛋白质的铰链)连接至CAR的胞 外区域,例如CAR的抗原结合结构域。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋 白)铰链,例如,IgG4铰链、IgD铰链、GS接头(例如,本文所述的GS接头)、KIR2DS2或CD8a铰链。在一个实施方案中,铰链或间隔区包含(例如,组成为)SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一个方面,跨膜结构域包含(例如,组成为)SEQ ID NO:15的跨膜结构域。

[0723] 在一个方面,铰链或间隔区包含IgG4铰链。例如,在一个实施方案中,铰链或间隔区包 含如下氨基酸序列的铰链

[0724] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM(SEQ ID NO:45)。在 一些实施方案中,铰链或间隔区包含如下核苷酸序列编码的铰链

[0725] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACC CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCC GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGT TCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCT AGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCT ACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGAC CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG(SEQ ID NO:46).

[0726] 在一个方面,铰链或间隔区包含IgD铰链。例如,在一个实施方案中,铰链或间隔区包含 如下氨基酸序列的铰链:

[0727] RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKT PECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEE GLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLN LLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSV LRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH(SEQ ID NO:47)。在一些实施方 案中,铰链或间隔区包含如下核苷酸序列编码的铰链:

[0728] AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGG CAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCG TGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAG ACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCC CGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCT CTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTACCCACAGGGGG GGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGA CTCACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCA TCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAG

GCACCA GTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCT CTTATGCGA AGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACC AGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTT CGCTCCAGCCCGGCCCCCACCCCAGCCGGGTTC TACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACC ACCTAGCCCCCAGCCA GCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAG GAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT(SEQ ID NO:48).

[0729] 在一个方面,跨膜结构域可以是重组的,在这样情况下,其将会主要包含疏水性残基,比如亮氨酸和缬氨酸。在一个方面,在重组跨膜结构域的每个末端可以发现苯丙氨酸、色氨 酸和缬氨酸的三联体。

[0730] 任选地,长度在2至10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以在CAR的跨膜结构域与细 胞质区之间形成键。甘氨酸-丝氨酸二联体提供一种特别合适的接头。例如,在一个方面,接 头包含如下氨基酸序列:GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,接头由如下核 苷酸序列编码:GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC(SEQ ID NO:50)。

[0731] 在一个方面,铰链或间隔区包含KIR2DS2铰链。

[0732] 细胞质结构域

[0733] CAR的细胞质结构域或区域包括胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域通常负责其 中已经引入CAR的免疫细胞的正常效应子功能中至少一个的活化。

[0734] 用于本发明的CAR的胞内信号传导结构域的实例包括共同作用以在抗原受体衔接之后引 发信号转导的T细胞受体(TCR)和共同受体的细胞质序列,以及这些序列的任一衍生物或变体 和具有相同功能性能力的任一重组序列。

[0735] 众所周知通过单独的TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,并且也需要次要和/或共刺 激信号。因此,T细胞活化可以被称为是由两个不同种类的细胞质信号传导序列介导的:通过 TCR引发抗原依赖性主要活化的那些(主要胞内信号传导结构域)以及以抗原独立方式起作用 以提供次要或共刺激信号的那些(二级细胞质结构域,例如共刺激结构域)。

[0736] 主要信号传导结构域以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合体的主要活化。以刺激方式 起作用的主要胞内信号传导结构域可以含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的 活化基序或ITAM。

[0737] 在本发明中特别使用的含有主要细胞内信号传导结构域的ITAM的实例包括CD3ζ,常见 FcRγ(FCER1G),FcγRIIa,FcRβ(FcεR1bb),CD3γ,CD3δ,CD3ε,CD79a,CD79b, CD278(也称为"ICOS"),FcεRI,DAP10,DAP12和CD66d。在一个实施方案中,本发明的 CAR包含胞内信号传导结构域,例如CD3-ζ的主要信号传导结构域。

[0738] 在一个实施方案中,主要信号传导结构域包含修饰的ITAM结构域,例如与天然ITAM结 构域相比具有改变的(例如,增强或降低的)活性的突变ITAM结构域。在一个实施方案中,主 要信号传导结构域包含含有修饰的ITAM的主要胞内信号传导结构域,例如含有优化的和/或 截短的ITAM的主要胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,主要信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0739] 含有在本发明中特别有用的主要胞内信号传导结构域的分子的其它实例包括DAP10, DAP12和CD32的那些。

[0740] 共刺激信号传导结构域

[0741] CAR的胞内信号传导结构域可以包含CD3-ζ信号传导结构域本身,或者其可以与用

于本 发明的CAR的上下文中的任一其它期望的胞内信号传导结构域组合。例如,CAR的胞内信号 传导结构域可以包括CD3ζ链部分和共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域是指包括 共刺激性分子的胞内结构域的CAR的部分。在一个实施方案中,细胞内结构域被设计为包含 CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在一个方面,细胞内结构域被设计为包 含CD3-ζ的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域。

[0742] 共刺激分子可以是除抗原受体以外的细胞表面分子或其对淋巴细胞对抗原的有效反应所 需的配体。这些分子的实例包括CD27,CD28,4-1BB(CD137),OX40,CD30,CD40,PD1, ICOS,,淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1),CD2,CD7,LIGHT,NKG2C,B7-H3,以及与CD83特异性结合的配体等。例如,CD27共刺激已被证明可以增强体外人类CART细胞的扩增,效应功能和存活,并增强体内人T细胞的持久性和抗肿瘤活性(Song et al.Blood.2012; 119(3):696-706)。这样的共刺激分子的其他实例包括MHC I类分子,TNF受体蛋白,免疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白),激活NK细胞受体,BTLA,Toll配体受体,OX40,CD2,CD7,CD27,CD28,CD30,CD40,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),4-1BB(CD137),B7-H3,CDS,ICAM-1,ICOS(CD278),GITR,BAFFR,LIGHT, HVEM(LIGHTR),KIRDS2,SLAMF7,NKp80(KLRF1),NKp44,NKp30,NKp46,CD19,CD4, CD8α,CD8β,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα,ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6, VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1,ITGAM,CD11b, ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,NKG2D,NKG2C,TNFR2, TRANCE/RANKL,DNAM1(CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile), CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69, SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1,CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG (CD162),LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp,CD19a,与CD83特异性结合的配体等。

[0743] 以使本发明的CAR的细胞质部分之内的胞内信号传导序列以随机或指定顺序彼此连接。任选地,例如长度在2和10个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)之间的短 的寡肽或多肽接头可以在胞内信号传导序列之间形成连接。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨 酸二联体可用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸例如丙氨酸、甘氨酸可用作合 适的接头。

[0744] 在一个方面,胞内信号传导结构域被设计成包含两个或多个,例如2、3、4、5个或多个 共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,两个或多个,例如2、3、4、5个或多个共刺激信号传导结构域被接头(例如本文所述的接头)分子分开。在一个实施方案中,胞内信号传导 结构域包含两个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,接头分子为甘氨酸残基。在一 些实施方案中,接头为丙氨酸残基。

[0745] 在一个方面,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信 号传导结构域。一方面,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和 4-1BB的信号传导结构域。一方面,4-1BB的信号传导结构域是SEQ ID NO:16的信号传导结构 域。一方面,CD3-ζ的信号传导结构域是SEQ ID NO:17的信号传导结构域。

[0746] 一方面,细胞内信号传导结构域被设计为包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD27的信号传 导结构域。在一个方面,CD27的信号传导结构域包含氨基酸序列

[0747] QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP(SEQ ID NO:51)。在一

个方面,CD27的信号传导结构域由核酸序列

[0748] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC CCGGGCCCA CCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTA TCGCTCC(SEQ ID NO:52)编码。

[0749] 天然杀伤细胞受体(NKR)CAR

[0750] 在一个实施方案中,本文所述的CAR分子包含天然杀伤细胞受体(NKR)的一种或多种组分,从而形成NKR-CAR。NKR组分可以是以下任何天然杀伤细胞受体的跨膜结构域,铰链结构域或胞质结构域:杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),例如KIR2DL1,KIR2DL2/L3,KIR2DL4,KIR2DL5A,KIR2DL5B,KIR2DS1,KIR2DS2,KIR2DS3,KIR2DS4,DIR2DS5, KIR3DL1/S1,KIR3DL2,KIR3DL3,KIR2DP1,和KIR3DP1;天然细胞毒性受体(NCR),例如 NKp30,NKp44,NKp46;免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族,例如 CD48,CD229,2B4,CD84,NTB-A,CRACC,BLAME,和CD2F-10;Fc受体(FcR),例如CD16 和CD64;和Ly49受体,例如LY49A,LY49C。本文所述的NKR-CAR分子可与衔接子分子 或细胞内信号传导结构域例如DAP12相互作用。包含NKR组分的CAR分子的示例性构型 和序列描述于国际公开号WO2014/145252中,其内容通过引用并入本文。

[0751] 调节嵌合抗原受体的策略

[0752] 在一些实施方案中,可以控制CAR活性的可调节CAR(RCAR)是期望的,以优化CAR疗法的安全性和功效。有多种方式可以调节CAR活性。例如,使用例如与二聚化结构域融合的胱天蛋白酶诱导细胞凋亡(参见例如Di et al.,N Engl.J.Med.2011Nov.3;365(18):1673-1683) 可以在本发明的CAR疗法中用作安全开关。在一个实施方案中,表达本发明的CAR的细胞(例 如,T细胞或NK细胞)还包含可诱导的凋亡开关,其中人胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶9)或修饰 形式融合到人类FKB蛋白的修饰形式,其允许条件二聚化。在小分子如rapalog(例如AP 1903, AP20187)的存在下,可诱导的胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶9)被激活并导致表达本发明的CAR 的细胞(例如,T细胞或NK细胞)的快速凋亡和死亡。基于胱天蛋白酶的可诱导凋亡开关(或这 种开关的一个或多个方面)的实例已经在例如US2004040047;US20110286980; US20140255360;WO1997031899;WO2014151960;WO2014164348;WO2014197638; WO2014197638中进行了描述;所有这些文献都通过引用并入本文。

[0753] 在另一个实例中,CAR表达细胞还可以表达诱导型胱天蛋白酶-9(iCaspase-9)分子,其在 施用二聚体药物(例如,rimiducid(也称为AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)或AP20187(Ariad)) 时导致胱天蛋白酶-9的激活和细胞凋亡。iCaspase-9分子含有在CID存在下介导二聚化的二 聚化(CID)结合结构域的化学诱导剂。这导致CAR表达细胞的可诱导和选择性消耗。在一些 情况下,iCaspase-9分子由与CAR编码载体分开的核酸分子编码,在一些情况下,iCaspase-9 分子由与CAR编码载体相同的核酸分子编码。iCaspase-9可以提供安全开关,以避免CAR 表达细胞的任何毒性。参见例如Song et al.Cancer Gene Ther.2008;15(10):667-75;Clinical Trial Id.No.NCT02107963;和Di Stasi et al.N.Engl.J.Med.2011;365:1673-83。

[0754] 用于调节本发明的CAR疗法的备选策略包括利用失活或关闭CAR活性的小分子或抗体, 例如,通过缺失CAR表达细胞,例如通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。例 如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达由能够诱导细胞死亡,例如ADCC或补体

诱导的 细胞死亡的分子识别的抗原。例如,本文所述的CAR表达细胞也可以表达能够被抗体或抗体 片段靶向的受体。这些受体的实例包括EpCAM,VEGFR,整联蛋白(例如整联蛋白αvβ3,α4, αI3/4β3,α4β7,α5β1,αvβ3,αv),TNF受体超家族成员(例如TRAIL-R1,TRAIL-R2),PDGF 受体,干扰素受体,叶酸受体,GPNMB,ICAM-1,HLA-DR,CEA,CA-125,MUC1,TAG-72, IL-6受体,5T4,GD2,GD3,CD2,CD3,CD4,CD5,CD1 1,CD1 1a/LFA-1,CD15,CD18/ITGB2, CD19,CD20,CD22,CD23/lgE受体,CD25,CD28,CD30,CD33,CD38,CD40,CD41,CD44, CD51,CD52,CD62L,CD74,CD80,CD125,CD147/basigin,CD152/CTLA-4,CD154/CD40L, CD195/CCR5,CD319/SLAMF7,和EGFR及其截短形式(例如,保留一个或多个细胞外表位但 缺少胞质结构域内一个或多个区域的形式)。

[0755] 例如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达截短的表皮生长因子受体(EGFR),其缺少 信号传导能力,但保留由能够诱导ADCC的分子(例如西妥昔单抗(ERBITUX®))识别的表 位,使得施用西妥昔单抗诱导ADCC并随后消耗CAR表达细胞(参见例如WO2011/056894和Jonnalagadda et al.,Gene Ther.2013;20(8)853-860)。另一个策略包括表达高度紧密的标记/ 自杀基因,该基因将结合利妥昔单抗的本文描述的CAR表达细胞中的CD32和CD20抗原的 靶表位组合,导致CAR表达细胞的选择性消耗,例如通过ADCC(参见例如Philip et al.,Blood. 2014;124(8)1277-1287)。用于消耗本文所述的CAR表达细胞的其它方法包括施用 CAMPATH,其是单克隆抗CD52抗体,该抗体选择性结合并靶向成熟淋巴细胞例如CAR表达细胞,例如通过诱导ADCC进行破坏。在其它实施方案中,可以使用CAR配体例如抗独 特型抗体选择性靶向CAR表达细胞。在一些实施方案中,抗独特型抗体可以引起效应细胞活 性,例如ADCC或ADC活性,从而减少CAR表达细胞的数量。在其它实施方案中,CAR 配体,例如抗独特型抗体可以偶联至诱导细胞杀伤的试剂,例如毒素,从而减少CAR表达细 胞的数量。或者,CAR分子本身可以被配置为使得可以调节活性,例如开启和关闭活性,如 下所述。

[0756] 在其它实施方案中,本文所述的CAR表达细胞还可以表达由T细胞消耗剂识别的靶蛋 白。在一个实施方案中,靶蛋白是CD20,T细胞消耗剂是抗CD20抗体,例如利妥昔单抗。在这样的实施方案中,一旦需要减少或消除CAR表达细胞,例如减轻CAR诱导的毒性,则 施用T细胞消耗剂。在其它实施方案中,T细胞消耗剂是抗CD52抗体,例如阿仑珠单抗。

[0757] 在一方面,RCAR包括一组多肽,其最简单的实施方案中通常为两种多肽,其中本文所 述的标准CAR的组分,例如抗原结合结构域和细胞内信号传导结构域在不同的多肽或成员上 分配。在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,其在二聚化分子的存在下可将多肽彼 此偶联,例如可将抗原结合结构域偶联至细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,本发 明的CAR利用二聚化开关,如在例如WO2014127261中所描述的,其通过引用并入本文。本 文和国际公开号WO 2015/090229(其全部内容通过引用并入本文)中提供了这种可调节CAR 的附加描述和示例性构型。

[0758] 在一些实施方案中,RCAR涉及如SEQ ID NO:122所示的开关结构域,例如FKBP开关结 构域,或包含具有与FRB结合的能力的FKBP片段,例如如SEQ ID NO:123中给出。在一些实 施方案中,RCAR涉及包含FRB序列的的开关结构域,例如SEQ ID NO:124所示或突变型FRB 序列,例如SEQ ID NO:125-130任一个所示。

[0759] D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K

Q E V I R G W E E G VA Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S Y(SEQ ID NO:122)

[0760] V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S(SEQ ID NO:123)

[0761] ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK(SEQ ID NO:124)

[0762] 表1.具有对二聚化分子增加的亲和力的示例性突变FRB。

[0763]

FRB 突变体	氨基酸序列	SEQ ID NO:
E2032I 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWD LYYHVFRRISKTS	125
E2032L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAW DLYYHVFRRISKTS	126
T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAW DLYYHVFRRISKTS	127
E2032, T2098 突变体	ILWHEMWHEGLXEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAW DLYYHVFRRISKTS	128
E2032I, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGP QTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWD LYYHVFRRISKTS	129
E2032L, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAW DLYYHVFRRISKTS	130

[0764] 分裂CAR

[0765] 在一些实施方案中,CAR表达细胞使用分裂CAR。分裂CAR方法在出版物WO2014/055442和WO2014/055657中有更详细的描述,其通过引用并入本文。简而言之,分 裂CAR系统包括表达具有第一抗原结合结构域和共刺激结构域(例如41BB)的第一CAR的细 胞,并且该细胞还表达具有第二抗原结合结构域和胞内信号传导结构域(例如,CD3ζ)的第二 CAR。当细胞遇到第一抗原时,共刺激结构域被激活,并且细胞增殖。当细胞遇到第二抗原 时,胞内信号传导结构域被激活,细胞杀伤活性开始。因此,CAR表达细胞仅在两种抗原存 在下完全活化。

[0766] RNA转染

[0767] 本文公开了用于产生体外转录的RNA CAR的方法。本发明还包括(其中包括)可直接转 染入细胞的CAR编码RNA构建体。用于产生用于转染的mRNA的方法可以涉及具有特别

设计 的引物的模板的体外转录(IVT),然后是多聚A添加,以产生构建体,其含有3'和5'非翻译 序列("UTR"),5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES),待表达的核酸和通常长度为50-2000 个碱基的多聚A尾(SEQ ID NO:118)。如此生产的RNA可以有效地转染不同种类的细胞。在 一个方面,模板包括CAR的序列。

[0768] 在一个方面,CAR由信使RNA(mRNA)编码。一方面,将编码CAR的mRNA引入免疫 效应细胞,例如T细胞或NK细胞,用于产生CAR表达细胞,例如CART细胞或CAR NK细胞。

[0769] 在一个实施方案中,体外转录的RNA CAR可以作为瞬时转染的形式引入细胞。通过使用 聚合酶链反应(PCR)产生的模板通过体外转录产生RNA。使用合适的引物和RNA聚合酶, 来自任何来源的目标DNA可以通过PCR直接转化成用于体外mRNA合成的模板。DNA的来源 可以是例如基因组DNA,质粒DNA,噬菌体DNA,cDNA,合成DNA序列或任何其它合适的 DNA来源。用于体外转录的所需模板是本发明的CAR。例如,RNA CAR的模板包含含有抗肿 瘤抗体的单链可变结构域的细胞外区域;铰链区,跨膜结构域(例如CD8a的跨膜结构域);以 及包括细胞内信号传导结构域的细胞质区域,例如包含CD3-ζ的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域的细胞质区域。

[0770] 在一个实施方案中,用于PCR的DNA包含可读框。DNA可以来自生物体的基因组的天然 存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可以包括5'和/或3'非翻译区(UTR)中的一些或 全部。核酸可以包括外显子和内含子。在一个实施方案中,用于PCR的DNA是人核酸序列。在另一个实施方案中,待用于PCR的DNA是包含5'和3'UTR的人核酸序列。DNA可备选地是通常不在天然存在的生物体中表达的人造DNA序列。示例性人造DNA序列是包含基因的部分的序列,所述部分连接在一起以形成编码融合蛋白的可读框。连接在一起的DNA的部分可以来自单个生物体或来自多于一个的生物体。

[0771] PCR用于产生用于转染的mRNA的体外转录的模板。进行PCR的方法是本领域公知的。 用于PCR的引物设计为具有与用作PCR模板的DNA区域基本上互补的区域。本文使用的"基本 互补"是指核苷酸序列,其中引物序列中的大部分或全部碱基互补或一个或多个碱基不互补或 不匹配的。基本上互补的序列能够在用于PCR的退火条件下与预期的DNA靶退火或杂交。引 物可以被设计为与DNA模板的任何部分基本互补。例如,可以设计引物以扩增通常在细胞(可 读框)中转录的核酸部分,包括5'和3'UTR。也可以设计引物以扩增编码感兴趣的特定结构域 的一部分核酸。在一个实施方案中,设计引物以扩增人cDNA的编码区,包括全部或部分5' 和3'UTR。可用于PCR的引物可以通过本领域熟知的合成方法产生。"正向引物"是包含与DNA 模板上的核苷酸基本上互补的核苷酸区域的引物,所述DNA模板上的核苷酸在待扩增的DNA 序列的上游。"上游"在本文中用于指相对于编码链待扩增的DNA序列的位置5'。"反向引物" 是含有与待扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本互补的核苷酸区域的引物。"下游"在本 文中用于指相对于编码链待扩增的DNA序列的位置3'。

[0772] 可用于PCR的任何DNA聚合酶均可用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可从许多来源 商购获得。

[0773] 还可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。在一些实施方案中,RNA 具有5'和3'UTR。在一个实施方案中,5'UTR长度在1至3000个核苷酸之间。可以通过不同的方 法改变待加入编码区的5'和3'UTR序列的长度,所述方法包括但不限于设计用于与UTR不同区 域退火的PCR引物。使用这种方法,本领域普通技术人员可以修改在转录的

RNA转染后实现 最佳翻译效率所需的5'和3'UTR长度。

[0774] 5'和3'UTR可以是目的核酸的天然存在的内源5'和3'UTR。或者,可以通过将UTR序列掺 入正向和反向引物或通过模板的任何其它修饰来加入对于目的核酸不是内源的UTR序列。对 目的核酸不是内源的UTR序列的使用可用于修饰RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知在 3'UTR序列中富含AU的元件可以降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域熟知的UTR的 特性,选择或设计3'UTR以提高转录的RNA的稳定性。

[0775] 在一个实施方案中,5'UTR可以含有内源核酸的Kozak序列。或者,当如上所述通过PCR 加入目的核酸的非内源性的5'UTR时,可以通过加入5'UTR序列重新设计共有的Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但似乎并不是所有的RNA需要的以实现有 效的翻译。对于许多mRNA的Kozak序列的要求是本领域已知的。在其他实施方案中,5'UTR 可以是RNA病毒的5'UTR,所述RNA病毒的RNA基因组在细胞中是稳定的。在其它实施方案 中,可以在3'或5'UTR中使用各种核苷酸类似物来阻碍mRNA的外切核酸酶降解。

[0776] 为了能够从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,转录启动子应连接到待转录序列上游 的DNA模板。当将作为RNA聚合酶的启动子的序列加入到正向引物的5'末端时,RNA聚合酶 启动子被掺入待转录的可读框上游的PCR产物中。在一个实施方案中,启动子是T7聚合酶启 动子,如本文别处所述。其他有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。T7, T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0777] 在一个实施方案中,mRNA具有5'端的帽和3'多聚(A)尾,其确定细胞中mRNA的核糖体结合,翻译起始和稳定性。在环状DNA模板上,例如质粒DNA,RNA聚合酶产生不适合在 真核细胞中表达的长的多联体产物。在3'UTR末端线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,其即使在转录后被多聚腺苷酸化的,在真核转染中也是无效的。

[0778] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以将转录物的3'末端延伸超出模板的最后一 个碱基(Schenborn and Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva and Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003)。

[0779] 多聚A/T序列整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的多 聚A/T序列可能导致质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞获得的质粒DNA模板常常被缺失 和其他畸变高度污染的原因。这使得克隆程序不仅费时费力,而且经常不可靠。这就是为什 么非常需要不用克隆而允许用多聚A/T 3'序列构建DNA模板的方法。

[0780] 可以通过使用含有多聚T尾的反向引物,如100T尾(SEQ ID NO:29)(大小可以为50-5000T (SEQ ID NO:30))在PCR期间或在PCR后通过任何其他方法产生转录DNA模板的多聚A/T 片段,所述方法包括但不限于DNA连接或体外重组。多聚(A)尾也可提供RNA的稳定性并 降低其降解。通常,多聚(A)尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,多聚(A)尾为100至5000个腺苷之间(SEQ ID NO:57)。

[0781] 使用多聚(A)聚合酶如大肠杆菌多聚A聚合酶(E-PAP)进行体外转录后,RNA的多聚(A)尾可以进一步延长。在一个实施方案中,将聚(A)尾长度从100个核苷酸增加到300 至400个核苷酸(SEQ ID NO:104)的长度导致RNA的翻译效率增加约2倍。另外,不同化学 基团连接到3'末端可以增加mRNA的稳定性。这种连接可以含有修饰的/人造核苷酸,适体和 其他化合物。例如,可以使用聚(A)聚合酶将ATP类似物掺入聚(A)尾。ATP类似物可进 一步提高RNA的稳定性。

[0782] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在一个实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包 括5'帽。使用本领域已知并在此描述的技术提供5'帽(Cougot,et al.,Trends in Biochem.Sci., 29:436-444(2001);Stepinski,et al.,RNA,7:1468-95(2001);Elango,et al.,Biochim.Biophys.Res. Commun.,330:958-966(2005))。

[0783] 通过本文公开的方法产生的RNA还可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES 序列可以是启动帽独立的核糖体与mRNA结合并有助于翻译起始的任何病毒,染色体或人工 设计的序列。可以包括适于细胞电穿孔的任何溶质,所述溶质可以含有促进细胞通透性和活 力的因子,例如糖,肽,脂质,蛋白质,抗氧化剂和表面活性剂。

[0784] 可以使用许多不同方法中的任何一种将RNA引入靶细胞,所述方法为例如可商购的方法, 包括但不限于电穿孔((Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems,Cologne,Germany)),(ECM 830(BTX)(Harvard Instruments,Boston,Mass.)或Gene Pulser II(BioRad,Denver,Colo.), Multiporator(Eppendort,Hamburg Germany),使用脂转染的阳离子脂质体介导的转染,聚合物 包封,肽介导的转染或生物射弹颗粒递送系统如"基因枪"(参见,例如,Nishikawa,et al.Hum Gene Ther.,12(8):861-70(2001)。

[0785] 非病毒递送方法

[0786] 在一些方面,非病毒方法可用于将编码本文描述的CAR的核酸递送至细胞或组织或受试 者。

[0787] 在一些实施方案中,非病毒方法包括使用转座子(也称为可转座元件)。在一些实施方 案中,转座子是可以将其自身插入到基因组中的位置的DNA片段,例如,能够自我复制并将 其拷贝插入基因组的DNA片段,或可以从更长的核酸中剪接并插入到基因组中的另一个位置 的DNA片段。例如,转座子包含由用于转座的倒置重复侧翼基因组成的DNA序列。

[0788] 使用转座子的核酸递送的示例性方法包括睡美人转座子系统(SBTS)和piggyBac(PB) 转座子系统。例如,参见Aronovich et al.Hum.Mol.Genet.20.R1(2011):R14-20;Singh et al. Cancer Res.15(2008):2961-2971;Huang et al.Mol.Ther.16(2008):580-589;Grabundzija et al. Mol.Ther.18(2010):1200-1209;Kebriaei et al.Blood.122.21(2013):166;Williams.Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16;Bell et al.Nat.Protoc.2.12(2007):3153-65;和Ding et al.Cell. 122.3(2005):473-83,所有这些都通过引用并入本文。

[0789] SBTS包括两个组成部分:1)含有转基因的转座子和2)转座酶的来源。转座酶可以将转 座子从载体质粒(或其他供体DNA)转座到靶DNA,如宿主细胞染色体/基因组。例如,转座 酶与载体质粒/供体DNA结合,从质粒切割转座子(包括转基因),并将其插入宿主细胞的基 因组中。参见例如Aronovich等人。

[0790] 示例性转座子包括基于pT2的转座子。参见,例如,Grabundzija et al.Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47;和Singh et al.Cancer Res.68.8(2008):2961-2971,,所有这些都通过引用 并入本文。示例性的转座酶包括Tc1/水手型转座酶,例如SB10转座酶或SB11转座酶(例如可 以从巨细胞病毒启动子表达的高活性转座酶)。参见例如Aronovich et al.;Kebriaei et al.;和 Grabundzija et al.,,所有这些都通过引用并入本文。

[0791] SBTS的使用允许有效整合和表达转基因,例如编码本文所述的CAR的核酸。本文提供了 例如使用转座子系统例如SBTS,产生稳定表达本文所述的CAR的细胞,例如T细胞或NK

细胞 的方法。

[0792] 根据本文描述的方法,在一些实施方案中,将含有SBTS组分的一种或多种核酸例如质粒 递送至细胞(例如T细胞或NK细胞)。例如,通过核酸(例如,质粒DNA)递送的标准方法, 例如本文所述的方法,例如电穿孔,转染或脂质转染递送核酸。在一些实施方案中,核酸含 有转座子,其包含转基因,例如编码本文所述的CAR的核酸。在一些实施方案中,核酸含有 转座子,其包含转基因(例如编码本文所述的CAR的核酸)以及编码转座酶的核酸序列。在 其它实施方案中,提供了具有两个核酸的系统,例如双质粒系统,例如其中第一质粒含有包 含转基因的转座子,第二质粒含有编码转座酶的核酸序列。例如,第一和第二核酸被共同递 送到宿主细胞中。

[0793] 在一些实施方案中,通过使用使用SBTS进行基因插入和使用核酸酶(例如,锌指核酸酶 (ZFN),转录激活子-样效应核酸酶(TALENs),CRISPR/Cas系统或工程化的大范围核酸酶再工程化的归巢内切核酸酶)进行遗传编辑的组合,产生表达本文所述的CAR的细胞,例如T细胞或NK细胞。

[0794] 在一些实施方案中,使用非病毒递送方法允许细胞,例如T或NK细胞的重新编程,并将 细胞直接注入受试者。非病毒载体的优点包括但不限于容易和相对低成本地产生满足患者群 体所需的足够量,储存期间的稳定性和缺乏免疫原性。

[0795] 编码CAR,例如CD19 CAR,CD20 CAR或CD22 CAR的核酸构建体

[0796] 本发明还提供编码本文所述的一种或多种CAR构建体,例如CD19 CAR,CD20 CAR或CD22 CAR的核酸分子。一方面,提供核酸分子作为信使RNA转录物。在一个方面,提供核酸分子作为DNA构建体。

[0797] 因此,一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,其中CAR包含结合结构域(例如,结合CD19,CD20或CD22),跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的CAR,所述细胞内信号传导结构域包含刺激结构域,例如共刺激信号传导结构域和/或主要信 号传导结构域,例如ζ链。

[0798] 在一个实施方案中,结合结构域是本文所述的抗CD19结合结构域,例如抗CD19结合结构 域,其包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:59的序列,或其具有95-99%同一性的序列。

[0799] 在一个实施方案中,核酸包含表6A所示编码CD22的核酸或其具有95-99%同一性的序列。 在一个实施方案中,核酸是编码表6A-10B中任一个所示的氨基酸序列的核酸或其具有95-99% 同一性的序列。

[0800] 在一个实施方案中,核酸包含表11A中所示的CD20编码核酸或其具有95-99%同一性的序 列。在一个实施方案中,核酸是编码表11A-15B中任一个所示氨基酸序列的核酸或其具有 95-99%同一性的序列。

[0801] 在一个实施方案中,跨膜结构域是选自T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4, CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154的蛋 白质的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列或其具有95-99% 同一性的序列。在一个实施方案中,抗CD19结合结构域通过铰链区(例如本文所述的铰链) 连接到跨膜结构域。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45

或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49,或其具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,分离的核酸分 子还包含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是选自OX40,CD27, CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)的蛋白质的功能 信号传导结构域。在一个实施方案中,共刺激结构域是选自MHC I类分子,TNF受体蛋白,免 疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白),激 活NK细胞受体,BTLA,Toll配体受体,OX40,CD2,CD7,CD27,CD28,CD30,CD40,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),4-1BB(CD137),B7-H3,CDS,ICAM-1,ICOS(CD278),GITR,BAFFR,LIGHT,HVEM(LIGHTR),KIRDS2,SLAMF7,NKp80(KLRF1),NKp44,NKp30, NKp46,CD19,CD4,CD8α,CD8β,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα,ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4, CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1, ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,NKG2D,NKG2C, TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1(CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile), CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69,SLAMF6 (NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1,CD150,IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162), LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp,CD19a和与CD83特异性结合的配体的蛋白质的功能性 信号传导结构域。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列或其具有95-99% 同一性的序列。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含4-1BB的功能性信号传导结构 域和CD3ζ的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:51的序列,或其具有95-99%同一性的序列,以及SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列或其具有95-99%同一性的序列,其中包含细胞内信号传导结构域的序列在相同 的框架中和作为单个多肽链表达。

[0802] 另一方面,本发明涉及编码CAR构建体的分离的核酸分子,所述CAR构建体包含SEQ ID NO:13的前导序列,具有选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12,和SEQ ID NO:59(或其具有95-99%同一性的序列)的序列的scFv结构域,SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49(或其具有95-99%同一性的序列) 的铰链区,具有SEQ ID NO:15的序列(或其具有95-99%同一性的序列)的跨膜结构域,具有 SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:51的序列(或其具有95-99% 同一性的序列)的CD27共刺激结构域和具有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列(或其具有 95-99%同一性的序列)的CD3ζ刺激结构域。

[0803] 另一方面,本发明涉及由核酸分子编码的分离的多肽分子。在一个实施方案中,分离的多 肽分子包含选自SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:59或其具有95-99%同一性的序列组成的序列。

[0804] 另一方面,本发明涉及编码嵌合抗原受体(CAR)分子的核酸分子,其包含抗CD19结合 结构域,跨膜结构域和包含刺激结构域的细胞内信号传导结构域,并且其中所述抗CD19结合 域包含选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:59的序列,或其具有95-99%同一性的序列。

[0805] 在一个实施方案中,编码的CAR分子(例如,CD19 CAR,CD20 CAR或CD22 CAR)还 包

含编码共刺激结构域的序列。在一个实施方案中,共刺激结构域是选自OX40,CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18)和4-1BB(CD137)的蛋白质的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,共刺激结构域包含SEQ ID NO:16的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域是选自T细胞受体的α,β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154的蛋白质的跨膜结构域。在一个实施方案 中,所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:15的序列。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域 包含4-1BB的功能性信号传导结构域和ζ的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:16的序列和SEQ ID NO:17的序列,其中包含细胞内信号传 导结构域的序列在相同的框架中并且作为单个多肽链表达。在一个实施方案中,抗CD19结合 结构域通过铰链区连接到跨膜结构域。在一个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:14。在一 个实施方案中,铰链区包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49。

[0806] 另一方面,本发明涉及编码的CAR分子,其包含SEQ ID NO:13的前导序列,具有选自SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,和SEQ ID NO:59 的序列,或其具有95-99%同一性的序列的scFv结构域,SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47或SEQ ID NO 49的铰链区,具有SEQ ID NO:15的序列的跨膜结构域,具有SEQ ID NO:16的序列的4-1BB共刺激结构域或具有SEQ ID NO:51的序列的CD27共刺激结构域,以及具 有SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:43的序列的CD3ζ刺激结构域。在一个实施方案中,编码的CAR 分子包含选自SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36,SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38,SEQ ID NO:39,SEQ ID NO:40,SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42,和SEQ ID NO:59的序列,或其具有95-99%同一性的序列。

[0807] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过从表达该基因的 细胞中筛选文库,通过从已知包含该基因的载体衍生出该基因,或通过从含有该基因的细胞和 组织中使用标准技术直接分离获得。或者,目的基因可以合成,而不是克隆产生。

[0808] 本发明还提供了其中插入本发明的DNA的载体。衍生自逆转录病毒如慢病毒的载体是实 现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的增殖。慢 病毒载体相对于衍生自癌－逆转录病毒例如鼠白血病病毒的载体具有附加优点,因为它们可以 转导非增殖细胞,例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的附加优点。逆转录病毒载体也可以是 例如γ逆转录病毒载体。γ逆转录病毒载体可以包括例如启动子,包装信号(ψ),引物结合位 点(PBS),一个或多个(例如两个)长末端重复序列(LTR)和目的转基因,例如编码CAR 的基因。γ逆转录病毒载体可能缺乏病毒结构基因,如gag,pol和env。示例性的γ逆转录病毒 载体包括鼠白血病病毒(MLV),形成脾脏病灶病毒(SFFV)和骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV) 以及由其衍生的载体。其它γ逆转录病毒载体描述于例如Tobias Maetzig et al.,“Gammaretroviral Vectors:Biology,Technology and Application”Viruses.2011Jun;3(6):677-713。

[0809] 在另一个实施方案中,包含编码本发明所需CAR的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,编码CAR的核酸的表达可以使用转座子如睡美人,crispr,CAS9

和锌指 核酸酶来完成。参见June et al.2009Nature Reviews Immunology 9.10:704-716,其通过引用并入 本文。

[0810] 载体还可以包括例如促进分泌的信号序列,聚腺苷酸化信号和转录终止子(例如,来自牛 生长激素(BGH)基因)),允许附加复制和在原核生物中复制的元件(例如SV40原点和ColE1 或本领域已知的其他元件)和/或允许选择的元件(例如,氨苄青霉素抗性基因和/或zeocin标 记)。

[0811] 简而言之,编码CAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸 有效连接至启动子,并将构建体掺入表达载体中来实现。载体可以适用于复制和整合真核生物。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子,起始序列和可用于调节所需核酸序列表达的启动子。

[0812] 在一些方面,本发明的表达构建体也可以用于使用标准基因递送方案进行的核酸免疫和基 因疗法。用于基因递送的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,399,346,5,580,859, 5,589,466,,其全部内容通过引用并入本文。在另一个实施方案中,本发明提供了基因治疗载 体。

[0813] 核酸可以克隆到多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,包括但不限于质粒, 噬菌粒,噬菌体衍生物,动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体,复制载体,探针 产生载体和测序载体。

[0814] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是众所周知 的,并且描述于例如Sambrook et al.,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,volumes 1-4,Cold Spring Harbor Press,NY),和其它病毒学和分子生物学手册。作 为载体有用的病毒包括但不限于逆转录病毒,腺病毒,腺伴随病毒,疱疹病毒和慢病毒。通常, 合适的载体包含在至少一个生物体中起作用的复制起点,启动子序列,方便的限制性内切核酸 酶位点和一个或多个可选择标记(例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0815] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为 基因递送系统提供了便利的平台。可以使用本领域已知的技术将所选择的基因插入载体并包装 在逆转录病毒颗粒中。然后可以在体内或离体分离重组病毒并将其递送至受试者的细胞。许多 逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本 领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0816] 另外的启动子元件,例如增强子调节转录起始的频率。通常,它们位于起始位点上游 30-110bp的区域,尽管许多启动子也显示在起始位点的下游含有功能元件。启动子元件之间的 间距通常是柔性的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能被保留。在胸苷激酶(tk) 启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间距可以增加到50bp。取决于启动子,似 乎单独的元件可以协同地或独立地起作用以激活转录。示例性启动子包括CMV IE基因,EF-1α, 泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在一个实施方案中,启动子是PGK启动子,例如如本 文所述的截短的PGK启动子。

[0817] 能够在哺乳动物T细胞中表达CAR转基因的启动子的实例是EF1a启动子。天然的EF1a启动 子驱动延伸因子-1复合体的α亚基的表达,其负责将氨酰基tRNA酶促递送到核糖体。EF1a启动 子已经广泛用于哺乳动物表达质粒,已被证明有效驱动克隆到慢病毒载体中

的转基因的CAR 表达。参见,例如,Milone et al.,Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)。一方面,EF1a启动子包 含如SEQ ID NO:100提供的序列

[0818] 启动子的另一个例子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够 驱动与其有效连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。然而,也可以使 用其它组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子,小鼠乳腺肿瘤病 毒(MMTV),人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子,MoMuLV启动子,禽白血病病毒启动子,EB病毒立即早期启动子,劳斯肉瘤病毒启动子,以及人基因启动子,例如但不限于肌动蛋白启动子,肌球蛋白启动子,延伸因子-1α启动子,血红蛋白启动子和肌酸激 酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。也可以考虑诱导型启动子作为本发明的 一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,当期望这种表达时,所述分子开关能够打开其 有效连接的多核苷酸序列的表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但 不限于金属硫蛋白启动子,糖皮质激素启动子,孕酮启动子和四环素启动子。

[0819] 启动子的另一个例子是磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。在实施方案中,截短的PGK启动 子(例如,当与野生型PGK启动子序列比较时,具有一个或多个,例如1,2,5,10,100,200,300 或400个核苷酸缺失的PGK启动子)可能是想要的。示例性PGK启动子的核苷酸序列在下面提 供。

[0820] WT PGK启动子:

[0821] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG GCCTCCGAACG TCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGG GTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAA GGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGAC TCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT AACGAGGGACCGC GACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTG CGG CGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCC CGGGTGTTCCCATCGCCGC TTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACG CTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTT GGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGG GACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCAT AAGCT (SEQ ID NO:1323)

[0822] 示例性截短的PGK启动子:

[0823] PGK100:

[0824] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG GCCTCCGAACG TCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGG GTG(SEQ ID NO:1324)

[0825] PGK200:

[0826] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG GCCTCCGAACG TCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGG GTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAA GGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGAC TCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT AACG(SEQ ID NO:1325)

[0827] PGK300:

[0828] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG GCCTCCGAACG TCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGG GTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAA GGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGAC TCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT

AACGAGGGACCGC GACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTG CGG CGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCG(SEQ ID NO:1326)

[0829] PGK400:

[0830] ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG GCCTCCGAACG TCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGG GTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAA GGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGAC TCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGT AACGAGGGACCGC GACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTG CGG CGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCC CGGGTGTTCCCATCGCCGC TTCTAGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACG CTCTGGGTCCCAGCCG(SEQ ID NO:1327)

[0831] 载体还可以包括例如促进分泌的信号序列,聚腺苷酸化信号和转录终止子(例如,来自牛 生长激素(BGH)基因)),允许附加复制和在原核生物中进行复制的元件(例如SV40原点 和ColE1或本领域已知的其他元件)和/或允许选择的元件(例如,氨苄青霉素抗性基因和/或 zeocin标记)。

[0832] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,待引入细胞的表达载体还可含有选择性标记基因或 报道基因或两者,以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,选择性标记可以携带在单独的DNA片段上并在共转染程序中使用。两个选择性 标记和报告基因都可以在侧翼为适当的调控序列以使得能够在宿主细胞中表达。有用的选择性 标记包括例如抗生素抗性基因,例如neo等。

[0833] 报告基因用于鉴定潜在的转染细胞和评估调控序列的功能性。通常,报告基因是不存在于 受体生物或组织中或不由受体生物体或组织表达的基因,并且编码多肽,该多肽的表达由一些 易于检测的性质(例如酶活性)表现出来。在DNA被引入受体细胞后的合适时间,测定报告 基因的表达。合适的报告基因可以包括编码萤光素酶,β-半乳糖苷酶,氯霉素乙酰转移酶,分 泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如,Ui-Tei et al., 2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的,并且可以使用已知技术或商业获得制备。通常,具有显示报告基因 表达最高水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区域可以与报告基因连 接,并用于评估调节启动子驱动的转录能力的活性剂。

[0834] 在实施方案中,载体可以包含编码CAR的两种或更多种核酸序列,例如结合CD19的第一 CAR和第二CAR,例如抑制性CAR或特异性结合第二抗原(例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a)的CAR。在这样的实施方案中,编码CAR的 两个或多个核酸序列由相同框架中的单个核酸分子并且作为单个多肽链编码。在这方面,两 个或更多个CAR可以例如被一个或多个肽切割位点分开。(例如,自切割位点或细胞内蛋白 酶的底物)。肽切割位点的实例包括以下,其中GSG残基是任选的:

[0835] T2A:(GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP(SEQ ID NO:1328)

[0836] P2A:(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:1329)

[0837] E2A:(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP(SEQ ID NO:1330)

[0838] F2A:(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(SEQ ID NO:1331)

[0839] 将基因导入细胞并在细胞中表达的方法是本领域已知的。在表达载体的上下文中,可以通 过本领域任何方法将载体容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物,细菌,酵母或昆

虫细胞。例如，表达载体可以通过物理,化学或生物手段转移到宿主细胞中。

[0840] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀,脂转染,粒子轰击,显微注射,电 穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。参见例如Sambrook et al.,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,volumes 1-4,Cold Spring Harbor Press,NY)。将多核苷酸引入宿主细胞的合适方法是磷酸钙转染。

[0841] 将目的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别 是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入到哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其他 病毒载体可衍生自慢病毒,痘病毒,单纯疱疹病毒I,腺病毒和腺伴随病毒等。参见例如美国 专利号5,350,674和5,585,362。

[0842] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,例如大分子复合物,纳米 胶囊,微球体,珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液,胶束,混合胶束和脂质体。在体 外和体内用作递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如,人造膜囊泡)。核酸的现有的靶 向递送的其他方法是可利用的,例如用靶向纳米颗粒递送多核苷酸或其它合适的亚微米尺寸 的递送系统。

[0843] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送载体是脂质体。预期使用脂质制剂将核酸 引入宿主细胞(体外,离体或体内)。在另一方面,核酸可以与脂质结合。与脂质结合的核 酸可以包封在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸相 关联的连接分子连接到脂质体上,截留在脂质体中,与脂质体复合,分散在含脂质的溶液中， 与脂质混合,与脂质组合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或以其 它方式与脂质结合。脂质,脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定 结构。例如,它们可以存在于双层结构中,作为胶束或具有“塌陷”结构。它们也可以简单地 散布在溶液中,可能形成在尺寸或形状上不均匀的聚集体。脂质是可能是天然存在的或合成 的脂质的脂肪物质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪小滴,以及含有长链脂族烃 的化合物类及其衍生物,如脂肪酸,醇,胺,氨基醇和醛。

[0844] 可以从商业来源获得适合使用的脂质。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以 从Sigma,St.Louis,MO获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可从K&K Laboratories(Plainview,NY) 获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和 其他脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,AL.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的 储备溶液可以在约-20℃下储存。使用氯仿作为唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂 质体”是包含通过产生封闭的脂质双层或聚集体形成的多种单层和多层脂质载体的通用术语。 脂质体可以表征为具有磷脂双层膜和内水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过水性介质 分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。脂质组分在闭合结构 形成之前经历自我重排,并将水和溶解的溶质夹在脂质双层之间(Ghosh et al.,1991 Glycobiology 5:505-10)。然而,也包括在溶液中具有与正常水泡结构不同的结构的组合物。 例如,脂质可以呈现胶束结构,或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了 lipofectamine-核酸复合物。

[0845] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法， 为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以进行多种测定法。这样的测定法包括例如本 领域技术人员公知的“分子生物学”测定法,例如Southern和Northern印迹,RT-

PCR和PCR;“生 物化学”测定法,例如通过免疫学方法(ELISA和Western印迹)检测特定肽的存在或不存在，或通过本文所述的测定法来鉴定落入本发明范围内的活性剂。

[0846] 本发明还提供了包含CAR编码核酸分子的载体。一方面,CAR载体可以直接转导入细胞，例如T细胞。一方面,载体是克隆或表达载体,例如载体,包括但不限于一种或多种质粒(例 如表达质粒,克隆载体,微环,微载体、双微小染色体),逆转录病毒和慢病毒载体构建体。一方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达CAR构建体。一方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0847] 表达CAR的免疫效应细胞

[0848] 另一方面,本发明提供了一群CAR表达细胞。在一些实施方案中,CAR表达细胞的群体 包含表达本文所述的一种或多种CAR的细胞。在一些实施方案中,CAR表达细胞的群体包含 表达不同CAR的细胞的混合物。

[0849] 例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可以包括表达具有本文所述的肿瘤抗原(例 如CD19)的抗原结合结构域的CAR的第一细胞,以及表达具有不同抗原结合结构域的CAR 的第二细胞,所述不同抗原结合结构域为例如,针对本文所述的不同肿瘤抗原的抗原结合结 构域,例如本文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域,所述肿瘤抗原不同于由第一细胞表达的 CAR的抗原结合结构域结合的肿瘤抗原,例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3, ROR1,CD79b,CD179b或CD79a。

[0850] 作为另一个实例,CAR表达细胞的群体可以包括表达包含本文所述的肿瘤抗原的抗原结 合结构域的CAR的第一细胞,以及表达包括针对与如本文所述的肿瘤抗原不同的靶标的抗原 结合结构域的CAR的第二细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞的群体包括例如表达包含 主要细胞内信号传导结构域的CAR的第一细胞,和表达包括次要信号传导结构域的CAR的第 二细胞。CAR表达细胞中的一种或两种可以具有与编码CAR的核酸有效连接的截短的PGK启 动子,例如如本文所述。

[0851] 在另一方面,本发明提供了一种细胞群体,其中群体中的至少一个细胞表达具有针对本 文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域的CAR,以及表达另一种活性剂,例如增强CAR表达细 胞的活性的活性剂的第二细胞。群体的CAR表达细胞可以具有如本文所述的截短的PGK启动 子,其有效连接于编码CAR的核酸。在一个实施方案中,所述活性剂可以是抑制抑制性分子 的活性剂。在一些实施方案中,抑制性分子,例如PD-1,可以降低CAR表达细胞产生免疫效 应应答的能力。抑制性分子的实例包括PD-1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(CEACAM-1,CEACAM-3,and/or CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160, 2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR, A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9,腺苷和TGFR(例如TGFRβ)。在一个实施方案中,抑制 抑制性分子的活性剂包含与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例如,本文所述的细胞内信号 传导结构域)结合的第一多肽,例如抑制性分子。在一个实施方案中,该活性剂包含第一多 肽,例如抑制性分子如PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如,CEACAM-1,CEACAM-3, 和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4或TGFRβ,或这些任何一 种的片段的第一多肽,以及作为本文所述细胞内信号传导结构域的第二多肽(例如,包含共 刺激结构域(例如,41BB,CD27,OX40或CD28,例如,如本文所述)和/或主要信号传导 结构域(例如,本文所述的CD3ζ信号传导结构域)。在一个实施方案中,该活性剂包含PD-1 的第一多肽或其片段,和本文描

述的细胞内信号传导结构域的第二多肽(例如本文所述的 CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3ζ信号传导结构域)。

[0852] CAR与其他分子或活性剂的共表达

[0853] 共表达第二个CAR

[0854] 一方面,本文所述的CAR表达细胞可以进一步包含第二CAR,例如第二CAR,其包括不 同的抗原结合结构域,例如针对相同的靶标(CD19)或不同的靶标(例如CD10,CD20, CD22, CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a)的抗原结合结构域。在一个实施方案 中,第二CAR包括急性骨髓性白血病细胞上表达的靶标例如CD20,CD22,ROR1,CD10, CD33,CLL-1,CD34,CD123,FLT3,CD79b,CD179b,和CD79a的抗原结合结构域。在一个实 施方案中,CAR表达细胞包含靶向第一抗原的第一CAR,并且包括具有共刺激信号传导结构 域但不是主要信号传导结构域的细胞内信号传导结构域,以及靶向第二种不同抗原的第二CAR,并且包括具有主要信号传导结构域但不是共刺激信号传导结构域的细胞内信号传导结 构域。虽然不希望被理论束缚,但是将共刺激信号传导结构域(例如4-1BB,CD28,CD27或OX-40)放置在第一CAR上和主要信号传导结构域(例如CD3ζ)放置在第二CAR上可以将CAR活性限制于表达两个靶标的细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CD19 CAR,其包括CD19结合结构域,跨膜结构域和共刺激结构域和靶向除CD19之外的抗原(例 如,在AML细胞上表达的抗原,例如,CD22,CD20,ROR1,CD10,CD33,CLL-1,CD34,CD123, FLT3, CD79b,CD179b或CD79a),并且包括抗原结合结构域,跨膜结构域和主要信号传导结 构域的第二CAR。在另一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CD19 CAR,其包括CD19结 合结构域,跨膜结构域和主要信号传导结构域,以及靶向除CD19之外的抗原(例如,在AML 细胞上表达的抗原,例如,CD22,CD20,ROR1,CD10,CD33,CD123,CLL-1,CD34,FLT3, CD79b,CD179b或CD79a),并且包括针对抗原的抗原结合结构域,跨膜结构域和共刺激信号 传导结构域的第二CAR。

[0855] 一方面,本文所述的CAR表达细胞可进一步包含第二CAR,例如包含不同抗原结合结构 域,例如针对相同靶标(例如CD19)或不同靶标(例如,CD19以外的靶标,例如,CD10, CD20, CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a)的抗原结合结构域的第二CAR。 在一个实施方案中,CAR表达细胞包含靶向第一抗原并且包括具有共刺激信号传导结构域但 不是主要信号传导结构域的细胞内信号传导结构域的第一CAR,以及靶向第二种不同抗原并 且包括具有主要信号传导结构域但不是共刺激信号传导结构域的细胞内信号传导结构域的第 二CAR。将共刺激信号传导结构域(例如4-1BB,CD28,CD27或OX-40)放置在第一CAR上 和主要信号传导结构域(例如CD3ζ)放置在第二CAR上可以将CAR活性限制在表达两个靶标 的细胞。在一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CAR和第二CAR,第一CAR包括抗原结 合结构域,跨膜结构域和共刺激结构域,第二CAR靶向另一抗原并且包括抗原结合结构域, 跨膜结构域和主要信号传导结构域。在另一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CAR和第 二CAR,第一CAR包括抗原结合结构域,跨膜结构域和主要信号传导结构域,第二CAR靶 向另一抗原并且包括针对抗原的抗原结合结构域,跨膜结构域和共刺激信号传导结构域。

[0856] 在一个实施方案中,CAR表达细胞包含本文所述的XCAR(例如CD19 CAR,CD20 CAR或CD22 CAR)和抑制性CAR。在一个实施方案中,CAR表达细胞包含本文所述的CD19 CAR 和

抑制性CAR。在一个实施方案中，抑制性CAR包含结合在正常细胞上但不是癌细胞(例如 也表达CD19的正常细胞)上发现的抗原的抗原结合结构域。在一个实施方案中，抑制性CAR 包含抑制性分子的抗原结合结构域，跨膜结构域和细胞内结构域。例如，抑制性CAR的细胞 内结构域可以是细胞内结构域PD-1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(CEACAM-1, CEACAM-3,和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD80, CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC, II类MHC,GAL9,腺苷和TGFR(例如,TGFRβ)。

[0857] 在一个实施方案中，当CAR表达细胞包含两种或更多种不同的CAR时，不同CAR的抗原 结合结构域可以使得抗原结合结构域彼此不相互作用。例如，表达第一和第二CAR的细胞可 以具有第一CAR的抗原结合结构域，例如，作为片段，例如scFv，其不与第二CAR的抗原结 合结构域形成结合，例如，第二CAR的抗原结合结构域是VHH。

[0858] 共表达增强CAR活性的活性剂

[0859] 另一方面，本文所述的CAR表达细胞可进一步表达另一种活性剂，例如增强CAR表达细 胞的活性或适应性的活性剂。

[0860] 例如，在一个实施方案中，活性剂可以是抑制调节或调控例如抑制T细胞功能的分子的活 性剂。在一些实施方案中，调节或调控T细胞功能的分子是抑制性分子。在一些实施方案中， 抑制性分子，例如PD1，可以降低CAR表达细胞引发免疫效应应答的能力。抑制分子的实例 包括PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如,CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD160,2B4,CD80,CD86, B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II类 MHC,GAL9,腺苷和TGFR(例如TGFRβ)。

[0861] 在一个实施方案中，抑制性核酸，例如抑制性核酸，例如dsRNA，例如siRNA或shRNA， 簇状的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)，转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)， 或锌指内切核酸酶(ZFN)，例如，如本文所述，可用于抑制调节或调控，例如抑制CAR表 达细胞中T细胞功能的分子的表达。在一个实施方案中，该活性剂是shRNA，例如本文所述的 shRNA。在一个实施方案中，调节或调控，例如抑制T细胞功能的活性剂在CAR表达细胞内 被抑制。例如，抑制调节或调控例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子与编码CAR的 组分(例如所有组分)的核酸连接。

[0862] 在一个实施方案中，抑制抑制性分子的活性剂包含第一多肽，例如抑制性分子的活性剂， 其与向细胞提供正信号的第二多肽缔合，例如本文所述胞内信号传导结构域。在一个实施方 案中，活性剂包括例如抑制性分子的第一多肽，比如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、 CEACAM(例如，CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、 TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD160、2B4、CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1), HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9,腺苷,或TGFR(例如 TGFRβ)或这些中任一个的片段(例如，这些中任一个的胞外结构域的至少一部分)，和作为本 文中描述的胞内信号传导结构域的第二多肽(例如，包括共刺激结构域(例如，如本文中所述 的41BB、CD27或CD28)和/或主要信号传导结构域(例如，本文中所述的CD3ζ信号传导结构 域)。在一个实施方案中，活性剂包含PD1的第一多肽或其片段(例如，PD1的胞外结构域的至 少一部分)，和作为本文所述的胞内信号传导结构域的第二多肽(例如，本文中所述CD28信号 传导结构域和/

或CD3ζ信号传导结构域)。PD1为受体的CD28家族的抑制性成员,也包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞上被表达(Agata等人1996 Int.Immunol 8:765-75)。PD1、Pd-L1和PD-L2的两个配体已显示在结合PD1时下调T细胞的活 化(Freeman等人.2000J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人2001Nat Immunol 2:261-8; Carter等人2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中大量存在(Dong等人2003J Mol Med 81:281-7;Blank等人2005Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人2004Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用来逆转。

[0863] 在一个实施方案中,所述活性剂包含抑制性分子(例如程序性死亡1(PD1))的胞外结构域 (ECD),可以融合到跨膜结构域和胞内信号传导结构域(比如41BB和CD3ζ)(本文也称为PD1 CAR)。在一个实施方案中,当与本文所述CD19 CAR联合使用时,PD1 CAR提高T细胞的持 久性。在一个实施方案中,CAR是PD1 CAR,其包含在SEQ ID NO:121中以下划线指示的PD1 的胞外结构域。在一个实施方案中,PD1 CAR包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

[0864] Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasq plslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrv kfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgly qglstatkdtydalhmqalppr(SEQ ID NO:121).

[0865] 在一个实施方案中,PD1 CAR包含下文提供的氨基酸序列(SEQ ID NO:119)。

[0866] pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaagg avhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr(SEQ ID NO:119).

[0867] 在一个实施方案中,活性剂包含编码PD1 CAR,例如本文所述的PD1 CAR的核酸序列。在一个实施方案中,PD1 CAR的核酸序列如下所示,其中PD1 ECD在SEQ ID NO:120中 加下划线。

[0868] atggccctccctgtcactgccctgcttctcccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgtgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgaccgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgcggggcagtttcagaccctggtcacgaccactccggcgccgcgcccaccgactccggccccaactat cgcgagccagcccctgtcgctgaggccggaagcatgccgcccctgccgccggaggtgctgtgcatacccggggattggacttcgcatgcgac atctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcgtgctccttctgtccctggtcatcaccctgtactgcaagcggggtcggaaaaagcttctgt acat

tttcaagcagcccttcatgaggcccgtgcaaaccacccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagag gaagaaggaggt tgcgagctgcgcgtgaagttctcccggagcgccgacgcccccgcctataagcagggccagaac cagctgtacaacgaactgaacctgggac ggcgggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccgggacccc gaaatgggcgggaagcctagaagaaagaaccctcaggaagg cctgtataacgagctgcagaaggacaagatggcc gaggcctactccgaaattgggatgaagggagagcggcggaggggaaaggggcacg acggcctgtaccaaggactg tccaccgccaccaaggacacatacgatgccctgcacatgcaggcccttcccccctcgc(SEQ ID NO: 120).

[0869] 在另一个实例中,在一个实施方案中,增强CAR表达细胞活性的活性剂可以是共刺激分 子或共刺激分子配体。共刺激分子的实例包括MHC I类分子,BTLA和Toll配体受体,以及OX40, CD27,CD28,CDS,ICAM-1,LFA-1(CD11a/CD18),ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)。此类共 刺激分子的其它实例包括CDS,ICAM-1,GITR,BAFFR,HVEM(LIGHTR),SLAMF7,NKp80(KLRF1),NKp44,NKp30,NKp46,CD160,CD19,CD4,CD8α,CD8β,IL2Rβ,IL2Rγ,IL7Rα, ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE, CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1,ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18, LFA-1,ITGB7,NKG2D,NKG2C,TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1(CD226),SLAMF4 (CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55), PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69,SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1,CD150,IPO-3), BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp,CD19a和与 CD83特异性结合的配体,例如,如本文所述。共刺激分子配体的实例包括CD80,CD86, CD40L,ICOSL,CD70,OX40L,4-1BBL,GITRL和LIGHT。在实施方案中,共刺激分子配体是 不同于CAR的共刺激分子结构域的共刺激分子的配体。在实施方案中,共刺激分子配体是与 CAR的共刺激分子结构域相同的共刺激分子的配体。在一个实施方案中,共刺激分子配体是 4-1BBL。在一个实施方案中,共刺激配体是CD80或CD86。在一个实施方案中,共刺激分子 配体是CD70。在实施方案中,本文所述的表达CAR的免疫效应细胞可进一步工程化以表达一 种或多种另外的共刺激分子或共刺激分子配体。

[0870] CAR与趋化因子受体的共同表达

[0871] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞进一步包含趋化因子受体分子。趋化因子受体 CCR2b或CXCR2在T细胞中的转基因表达增强了对分泌CCL2-或CXCL1的实体瘤(包括黑素瘤 和神经母细胞瘤)的运输(Craddock et al.,J Immunother.2010Oct;33(8):780-8和Kershaw et al.,Hum Gene Ther.2002Nov 1;13(16):1971-80)。因此,不希望受理论束缚,认为在CAR表达 细胞中表达的识别由肿瘤例如实体瘤分泌的趋化因子的趋化因子受体,可以改善CAR表达细 胞归巢到肿瘤中,促进CAR表达细胞浸润到肿瘤,并增强CAR表达细胞的抗肿瘤功效。趋化 因子受体分子可以包含天然存在的或重组的趋化因子受体或其趋化因子结合片段。适于在本 文所述的CAR表达细胞中表达的趋化因子受体分子包括CXC趋化因子受体(例如CXCR1, CXCR2,CXCR3,CXCR4,CXCR5,CXCR6,或CXCR7),CC趋化因子受体(例如CCR1,CCR2, CCR3,CCR4,CCR5,CCR6,CCR7,CCR8,CCR9,CCR10,或CCR11),CX3C趋化因子受体(例如 CX3CR1),XC趋化因子受体(例如XCR1)或其趋化因子结合片段。在一个实施方案中,基于 肿瘤分泌的趋化因子选择要用本文所述的CAR表达的趋化因子受体分子。在一个实施方案中, 本文所述的CAR表达细胞进一步包含,例如表达CCR2b受体或CXCR2受体。在一个实施方案 中,本文所述的CAR和趋化因子受体分子在相同的载体上或在两个不同的载体上。在本文所 述的CAR和趋化因子受体分子在相同载体上的实施方案中,CAR和趋化因子受体

分子各自由 两种不同的启动子控制,或者在同一启动子的控制下。

[0872] 免疫应答增强剂的条件表达

[0873] 本文还提供了条件表达增强本文所述的CAR表达细胞的免疫应答或活性的活性剂的组 合物和方法。

[0874] 在一个方面,本公开描述了被工程化以组成型表达CAR(本文也称为非条件CAR)的免 疫效应细胞。在一个实施方案中,如本文所述的非条件CAR包含结合癌相关抗原例如CD19, CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的抗原结合结构域。在实施方案中,非条件CAR表达免疫效应细胞还包含增强CAR表达免疫效应细胞的治疗功效(例如免疫应答) 的条件表达的活性剂。在这样的实施方案中,条件表达的活性剂的表达在非条件CAR表达免疫效应细胞的激活时发生,例如,当非条件CAR分子与其靶标(例如癌相关抗原,例如CD19,CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1)结合时。

[0875] 如本文所述的免疫应答增强剂可以通过以下一种或多种来表征:1)靶向或结合不同于非 条件CAR靶向的癌症相关抗原;2)抑制免疫检查点或抑制性分子的表达或活性;和/或3)激 活增强免疫应答或免疫效应细胞活化的组分的表达和/或分泌。免疫应答增强剂可以是多肽或 核酸,例如编码增强免疫应答的多肽的核酸。增强免疫应答的条件表达的活性剂的实例包括 但不限于额外的CAR(称为条件CAR);基于TCR的分子(例如TCR-CAR);免疫检查点或 抑制性分子的抑制剂;和/或细胞因子。在实施方案中,条件CAR结合不同于非条件CAR靶 向的癌症相关抗原。在实施方案中,本文所述的免疫检查点或抑制性分子的抑制剂是抗体或 其抗原结合片段,抑制性核酸(例如,siRNA或shRNA)或抑制或降低免疫检查点或抑制性 分子的活性的小分子,所述免疫检查点或抑制性分子选自PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT, LAIR1,CD160,2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或 CD270),KIR,A2aR,MHC I类,MHC II类,GAL9,腺苷或TGFRβ。在实施方案中,细 胞因子包含IL-2,IL-7,IL-15或IL-21或其功能片段或衍生物。

[0876] 在实施方案中,免疫效应细胞包含非条件CAR和一种或多种条件CAR,其中条件CAR结合不同于非条件CAR靶向的癌症相关抗原。举例来说,在一个实施方案中,免疫效应细胞包含结合CD19的非条件CAR和结合CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1或 其组合的一种或多种条件CAR。在另一个实施方案中,免疫效应细胞包含结合CD10,CD20, CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的非条件CAR和结合CD19的条件CAR。

[0877] 通过将活化条件控制区有效连接到增强免疫应答的活性剂(例如,编码这种活性剂的核 酸序列)来实现在激活表达CAR的免疫效应细胞时增强免疫应答的活性剂的条件表达。在一 个实施方案中,活化条件控制区包含在免疫效应细胞激活时启动有效连接的免疫应答增强剂 的表达,例如转录的启动子序列。在一个实施方案中,活化条件控制区包含促进免疫效应细 胞激活时启动表达的一个或多个调节序列(例如,转录因子结合序列或位点)。在实施方案 中,活化条件控制区包含启动子序列和/或来自基因的启动子或调节序列的一个或多个转录因 子结合序列,所述基因在以下一个或多个时被上调:免疫效应细胞(例如,T细胞)激活,T 细胞分化,T细胞极化或辅助T细胞发育。这些基因的实例包括但不限于NFAT(活化的T 细胞的核因子),ATF2(激活转录因子2),NF-κB(核因子-B),IL-2,IL-2受体(IL-2R), IL-3,GM-CSF,IL-4,IL-10和IFN-γ。

[0878] 在一个实施方案中,活化条件控制区包含一个或多个,例如1,2,3,4,5,6或更多个NFAT 结合序列或位点。在实施方案中,启动子中的NFAT结合序列包含(5′-GGAAA-3′)(SEQ ID NO: 1312),任选地位于5’(A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N 3’(SEQ ID NO:1313)的更长的共有序列 中。在实施方案中,NFAT结合序列是κb样序列,例如GGGACT(SEQ ID NO:1314)。(参见Gibson et al.,The Journal of Immunology,2007,179:3831-3840.)。

[0879] 在一个实施方案中,活化条件控制区还包含IL-2启动子(或最小IL-2启动子),IL-2R 启动子,ATF2启动子或NF-κB启动子,或其任何功能片段或衍生物。在一个实施方案中,活化条件控制区包含一个或多个NFAT结合序列,例如3或6个NFAT结合序列,以及IL-2 启动子,例如IL-2最小启动子。在一个实施方案中,活化条件控制区包含以下序列

[0880] AGCTTGGATCCAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTAAGAGGAAAATT TGTTTCATACAG AAGGCGTTAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTCAAGCT TGTCGAC(SEQ ID NO:1315)。

[0881] 细胞来源

[0882] 在扩增和遗传修饰或其他修饰之前,可以从受试者获得细胞,例如T细胞或天然杀伤(NK) 细胞来源。受试者的实例包括人类、猴子、黑猩猩、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T 细胞可以从大量来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、 来自感染部位的组织、腹水、胸膜积液、脾组织和肿瘤。

[0883] 在本公开的某些方面,免疫效应细胞,例如,T细胞可以使用本领域技术人员已知的多种 技术的任一种(比如Ficoll™分离)从受试者收集的血液单位获得。在一个方面,通过单采血液 成分术,从个体的正在循环的血液获得细胞。单采血液成分术的产物通常含有淋巴细胞,包 括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个方面,可 以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆级分,并任选地,将细胞置于适合的缓冲 液或培养基中用于后续加工步骤。在一个实施方案中,用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一 个备选实施方案中,洗涤溶液不含钙,且可以不含镁或可以不含许多(即使不是全部)二价阳 离子。

[0884] 在不存在钙下的初始活化步骤可以导致放大的活化。如本领域普通技术人员应当容易地 理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法完成,比如通过根据制造商的说明使 用半自动化的“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate、或Haemonetics Cell Saver 5)。在洗涤之后,可以将细胞再悬浮在多种生物相容性缓冲液中,比如例如不含Ca、不 含Mg PBS、PlasmaLyte A、或含或不含缓冲剂的其它盐溶液。备选地,可以除去单采血液成 分术样品的不期望组分,并将细胞直接再悬浮在培养基中。

[0885] 认识到本申请的方法可以利用包含5%或更少,例如2%的人AB血清的培养基条件,并采 用公知的培养基条件和组合物,例如在Smith et al.,“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell SerumReplacement” Clinical&Translational Immunology(2015)4,e31;doi:10.1038/cti.2014.31中所述。

[0886] 在一个方面,通过裂解红细胞和消耗单核细胞,例如通过PERCOLLTM梯度离心或通过 对流离心洗脱法从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0887] 本文描述的方法可以包括例如使用例如本文描述的阴性选择技术来选择免疫效应细胞 的特定亚群,例如作为T调节细胞消耗群体的T细胞,CD25+消耗细胞。在一些实施方

案中，T调节性消耗细胞的群体含有小于30％,25％,20％,15％,10％,5％,4％,3％,2％,1％的CD25+细 胞。

[0888] 在一个实施方案中,使用抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体IL-2从群体中除去T调节 细胞,例如CD25+T细胞。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体与基质 (例如珠)缀合,或者另外涂覆在基质(例如珠)上。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其 片段缀合到本文所述的基质。

[0889] 在一个实施方案中,使用来自Miltenyi™的CD25消耗试剂从群体中除去T调节细胞,例 如CD25+T细胞。在一个实施方案中,细胞与CD25消耗试剂的比例为1e7细胞比20uL,或1e7 细胞比15μL,或1e7细胞比10uL,或1e7细胞比5uL,或1e7细胞比2.5uL,或1e7细胞比1.25uL。 在一个实施方案中,例如,对于T调节细胞,例如CD25+消耗,使用大于5亿个细胞/ml。另一 方面,使用6、7、8或9亿个细胞/ml的细胞浓度。

[0890] 在一个实施方案中,要消耗的免疫效应细胞群体包括约$6x10^9$个CD25+T细胞。在其他方面,要消耗的免疫效应细胞群体包括约$1x10^9$至$1x10^{10}$个CD25+T细胞,以及其间的任何整数值。在一个实施方案中,所得的T调节性消耗细胞群体具有$2x10^9$个T调节细胞,例如CD25+细胞或更少(例如,$1x10^9$,$5x10^8$,$1x10^8$,$5x10^7$,$1x10^7$,或较少的CD25+细胞)。

[0891] 在一个实施方案中,使用具有消耗管组(例如管道162-01)的CliniMAC系统从群体中除 去T调节细胞,例如CD25+细胞。在一个实施方案中,CliniMAC系统在诸如例如DEPLETION2.1 的消耗设置上运行。

[0892] 不希望受到特定理论的束缚,在单采血液成分术前或制备CAR表达细胞产物过程中,降低 受试者中免疫细胞的负调节物的水平(例如,减少不需要的免疫细胞数量,例如T_{REG}细胞数) 显著降低受试者复发的风险。例如,消耗T_{REG}细胞的方法是本领域已知的。降低T_{REG}细 胞的方法包括但不限于环磷酰胺,抗GITR抗体(本文所述的抗GITR抗体),CD25-消耗，mTOR抑制剂及其组合。

[0893] 在一些实施方案中,制备方法包括在制备表达CAR的细胞之前减少(例如,消耗)T_{REG}细胞的数目。例如,制造方法包括制造CAR表达细胞(例如,T细胞,NK细胞)产物前,使 样品(例如,单采血液成分术样品)与抗GITR抗体和/或抗-CD25抗体(或其片段,或CD25 结合配体)接触,例如,以消耗T_{REG}细胞。

[0894] 不希望受到特定理论的束缚,在单采血液成分术前或制备CAR表达细胞产品期间,降低 受试者中免疫细胞的负调节物的水平(例如,减少不需要的免疫细胞,例如T_{REG}细胞数量) 可以降低T_{REG}复发的风险。在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之 前,用一种或多种减少T_{REG}细胞的疗法对受试者进行预治疗,从而降低受试者对表达CAR的 细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,减少T_{REG}细胞的方法包括但不限于向受试者施用 环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25-消耗或其组合中的一种或多种。在一个实施方案中,减少T_{REG}细胞的方法包括但不限于向受试者施用环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25-消耗,mTOR抑制剂 或其组合中的一种或多种。施用环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25消耗或其组合中的一种或多 种可以在表达CAR的细胞产物的输注之前,期间或之后发生。施用环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25消耗,mTOR抑制剂或其组合中的一种或多种可以在表达CAR的细胞产物的输注之前，期间或之后发生。

[0895] 在一些实施方案中,制造方法包括在制备表达CAR的细胞之前减少(例如,消耗)

T_{REG}细胞的数目。例如,制造方法包括在制造CAR表达细胞(例如,T细胞,NK细胞)产物前, 使样品(例如,单采血液成分术样品)与抗GITR抗体和/或抗-CD25抗体(或其片段,或CD25 结合配体)接触,例如,以消耗T_{REG}细胞。

[0896] 在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,用一种或多种减少 T_{REG}细胞的疗法对受试者进行预治疗,从而降低受试者对表达CAR的细胞治疗复发的风险。 在一个实施方案中,减少T_{REG}细胞的方法包括但不限于向受试者施用环磷酰胺,抗GITR抗体, CD25-消耗或其组合中的一种或多种。施用环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25消耗或其组合中的 一种或多种可以在表达CAR的细胞产物的输注之前,期间或之后发生。

[0897] 在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,将受试者用环磷酰 胺预治疗,从而降低受试者对CAR表达细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,在收集用 于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,用抗GITR抗体预治疗受试者,从而降低受试者对CAR 表达细胞治疗复发的风险。

[0898] 在一个实施方案中,要除去的细胞群体既不是调节性T细胞也不是肿瘤细胞,而是另外也 不利地影响CART细胞的扩增和/或功能的细胞,例如表达CD14,CD11b,CD33,CD15或潜 在免疫抑制细胞表达的其他标志物的细胞。在一个实施方案中,设想这样的细胞与调节性T 细胞和/或肿瘤细胞被同时去除,或者按照所述消耗或以其它顺序除去。

[0899] 本文描述的方法可以包括多于一个选择步骤,例如多于一个消耗步骤。可以通过阴性选 择来富集T细胞群体,例如,使用针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体的组合。一种方法 是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对存在于负选择的细 胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择来富集CD4+细胞, 单克隆抗体混合物可以包括针对CD14,CD20,CD11b,CD16,HLA-DR和CD8的抗体。

[0900] 本文描述的方法还可以包括从表达肿瘤抗原(例如不包含CD25,例如CD19,CD30,CD38, CD123,CD20,CD14或CD11b的肿瘤抗原)的群体中移除细胞,从而提供T调节消耗的,例如 CD25+消耗的群体,以及适合于表达CAR,例如本文所述的CAR的肿瘤抗原消耗细胞。在一 个实施方案中,肿瘤抗原表达细胞与T调节的,例如CD25+细胞同时除去。例如,可以将抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段连接到相同的基质,例如可用于除去细胞或抗 CD25抗体或其片段的珠粒,或抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接到分离的珠粒上,其混合物 可用于除去细胞。在其他实施方案中,T调节细胞例如CD25+细胞的去除以及肿瘤抗原表达细 胞的去除是顺序的,并且可以以任何顺序发生。

[0901] 还提供了包括从表达检查点抑制剂,例如本文所述的检查点抑制剂的群体除去细胞,例 如PD1+细胞,LAG3+细胞和TIM3+细胞中的一种或多种的方法,从而提供T调节性消耗的, 例如CD25+消耗的细胞,以及检查点抑制剂消耗的细胞,例如PD1+,LAG3+和/或TIM3+消耗 的细胞群体。示例性的检查点抑制剂包括PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160, 2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR, A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9,腺苷和TGFR(例如TGFRβ),例如,如本文所述。在 一个实施方案中,与T调节性,例如CD25+细胞同时除去检查点抑制剂表达细胞。例如,可以 将抗CD25抗体或其片段和抗检测点抑制剂抗体或其片段连接到可用于除去细胞的相同珠粒 上,或抗CD25抗体,或其片段

和抗检查点抑制剂抗体或其片段可以连接到分离的珠粒上,其 混合物可用于除去细胞。在其它实施方案中,T调节细胞(例如CD25+细胞)的去除以及检查 点抑制剂表达细胞的去除是顺序的,并且可以例如以任一顺序发生。

[0902] 本文描述的方法可以包括阳性选择步骤。例如,可以通过与抗-CD3/抗-CD28(例如3×28) 缀合的珠粒,例如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T温育足以阳性选择所需的T细胞的时间 段来分离T细胞。在一个方面,时间段为约30分钟。在另一方面,时间范围为30分钟至36小时 或更长,以及其间的所有整数值。在另一方面,所述时间段为至少1,2,3,4,5或6小时。在另一 个方面,所述时间段为10至24小时。在一个方面,温育时间段为24小时。在与其它细胞类型 相比较少的T细胞的任一情况下,例如从肿瘤组织或从免疫受损个体分离肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)的情况下,可以使用更长的温育时间来分离T细胞。此外,使用更长的温育时间可以提 高捕获CD8+T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长时间,允许T细胞结合CD3/CD28珠 和/或通过增加或减少珠与T细胞的比例(如本文进一步描述),可以为了或针对在培养开始时或 在过程中的其它时间点优先选择T细胞亚群。

[0903] 另外,通过增加或降低珠或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比例,可以为了或针 对在培养开始或在其它所需时间点优选地选择T细胞亚群。

[0904] 在一个实施方案中,可以选择表达下述的一种或多种的T细胞群:IFN-γ、TNFα、IL-17A、 IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔蛋白或其它适合的分子例如其它细 胞因子。用于筛选细胞表达的方法可以例如通过PCT公开号WO 2013/126712中描述的方法确 定。

[0905] 对于通过正选择或负选择分离期望的细胞群,细胞的浓度和表面(例如,粒子,比如珠) 可以变化。在某些方面,可能期望显著地降低其中珠和细胞混合在一起的体积(例如,提高细 胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,一方面,使用约100亿细胞/ml,90亿/ml,80 亿/ml,70亿/ml,60亿/ml或50亿/ml的浓度。一方面,使用10亿个细胞/ml的浓度。一方面, 使用7500万,8000万,8500万,9000万,9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在另外的方面,可以 使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。

[0906] 使用高浓度可以引起细胞产率提高、细胞活化和细胞扩增。进一步,使用高细胞浓度能 够更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,比如CD28-阴性T细胞,或者从其中存在许多 肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)更有效地捕获细胞。这样的细胞群可以具 有治疗价值,并且将是期望得到的。例如,使用高浓度的细胞能够更有效地选择通常具有较 弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0907] 在一个相关的方面,可能期望使用较低的细胞浓度。通过显著地稀释T细胞和表面(例如, 粒子比如珠)的混合物,使粒子和细胞之间的相互作用最小化。这选择表达大量的期望结合粒 子的抗原的细胞。例如,CD4+T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀浓度中比CD8+T细胞更 有效地被捕获。在一个方面,使用的细胞浓度为6×10e6/ml。在其它方面,使用的浓度可以为 约1×10^5/ml至1×10^6/ml及其中任一整数值。

[0908] 在其它方面,可以在2-10℃或在室温下在旋转器中以可变速率培养细胞可变的时间长度。

[0909] 也可以在洗涤步骤之后冷冻用于刺激的T细胞。不希望受到理论的束缚,冷冻和随后的解 冻步骤通过在细胞群中除去粒细胞及在一定程度上除去单核细胞来提供更均匀的

产物。在除 去血浆和血小板的洗涤步骤之后，将细胞悬浮在冷冻液中。虽然许多冷冻液和参数是本领域 已知的且将适用于该情形，但是一种方法包括使用含有20％DMSO和8％人血清白蛋白的PBS， 或含有10％葡聚糖和5％葡萄糖、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO、或31.25％Plasmalyte-A、 31.25％葡萄糖5％、0.45％NaCl、10％葡聚糖40和5％葡萄糖、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO 的培养基，或含有例如Hespan和PlasmaLyte的其它合适的细胞冷冻培养基，然后将细胞以1°/ 分钟的速率冷冻至-80℃并贮存在液氮贮槽的汽相中。可以使用控制冷冻的其它方法以及在 -20℃下或在液氮中立即不受控制的冷冻。

[0910] 在某些方面，将冷藏保存的细胞解冻并如本文所述洗涤，并且允许在室温下静置1小时， 之后使用本发明的方法活化。

[0911] 本发明的上下文中还涉及在可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间从受试者收集血 样或单采血液成分术产物。因而，要扩增的细胞来源可以在任一必须的时间点收集，并且分 离和冷冻期望的细胞比如T细胞用于随后用于许多将受益于免疫效应细胞疗法的疾病或病症 (如本文所述那些)的免疫效应细胞疗法中。在一个方面，血样或单采血液成分术是从一般健 康受试者采集的。在某些方面，血样或单采血液成分术是从处于发展为疾病的风险中但还没 有发展为疾病的一般健康受试者采集的，并且分离和冷冻目的细胞用于随后使用。在某些方 面，T细胞可以扩增、冷冻和在随后时间使用。在某些方面，可以在诊断如本文所述的特定疾 病之后不久但在任一治疗之前，从患者采集样品。在一个进一步的方面，在许多相关的治疗 模式之前，从受试者的血样或单采血液成分术分离细胞，所述治疗模式包括但不限于用如下 活性剂治疗:比如那他珠单抗(natalizumab)、艾法珠单抗(efalizumab)、抗病毒剂、化疗、放射、 免疫抑制剂比如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酯和FK506、抗体、或其它免疫烧 蚀剂(immunoablative agents)比如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、 FK506、雷帕霉素、麦考酚酸、类固醇、FR901228和照射。

[0912] 在本发明的一个进一步的方面，在给受试者留下功能性T细胞的治疗之后直接从患者获得 T细胞。在这点上，已经观察到在一些癌症治疗之后，特别地用损害免疫系统的药物治疗之后， 在患者通常从治疗恢复期间的治疗后不久，获得的T细胞的质量可能是最佳的或对其在离体扩 增的能力有所改善。同样地，在使用本文所述方法离体处理之后，这些细胞可以对于增强移 植和体内扩增处于优选的状态。因此，在本发明的上下文之内预期在该恢复期收集血细胞， 包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其它细胞。进一步，在某些方面，可以使用转移(例如， 用GM-CSF转移)和调节方案产生受试者中的条件，其中特别地在治疗之后的定义时间窗期间， 特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增是有利的。示例性的细胞类型包括T细胞、B 细胞、树突细胞及免疫系统的其它细胞。

[0913] 在一个实施方案中，表达CAR分子，例如，本文所述的CAR分子的免疫效应细胞，是从 已接受了低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂的受试者获得的。在一个实施方案中，免疫效应 细胞，例如，T细胞的群体被工程化以表达CAR，在足够的时间之后被收获，或低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂的足够给药后被收获，以使得受试者中或从受试者收获的PD1阴性免疫 效应细胞，例如，T细胞的水平，或PD1阴性免疫效应细胞(例如，T细胞)/PD1阳性免疫效应 细胞(例如，T细胞)的比率至少暂时增加了。

[0914] 在其他实施方案中，已经或将被工程化以表达CAR的免疫效应细胞，例如，T细胞

群，可以通过用一定量的mTOR抑制剂接触离体处理，所述mTOR抑制剂增加PD1阴性免疫效应细 胞，例如，T细胞的数目，或增加PD1阴性免疫效应细胞(例如，T细胞)/PD1阳性免疫效应细 胞(例如，T细胞)的比率。

[0915] 在一个实施方案中，T细胞群体是二酰基甘油激酶(DGK)缺陷的。DGK缺陷型细胞包括不 表达DGK RNA或蛋白质，或具有降低的或抑制的DGK活性的细胞。可通过遗传方法来生成 DGK缺陷的细胞，例如，施用RNA干扰剂，例如，siRNA，shRNA，miRNA，以减少或防止 DGK表达。备选地，可通过用本文所述DGK抑制剂处理来产生DGK缺陷型细胞。

[0916] 在一个实施方案中，T细胞群体是Ikaros缺陷的。Ikaros缺陷型细胞包括不表达Ikaros RNA 或蛋白质的细胞，或具有降低的或抑制的Ikaros活性的细胞，可通过遗传方法来生成Ikaros缺 陷的细胞，例如，施用RNA干扰剂，例如，siRNA，shRNA，miRNA，以减少或防止Ikaros表达。 备选地，可以通过用Ikaros抑制剂，例如，来那度胺处理来产生Ikaros缺陷的细胞。

[0917] 在实施方案中，T细胞群体是DGK缺陷和Ikaros缺陷的，例如，不表达DGK和Ikaros，或 具有降低或抑制的DGK和Ikaros活性。此类DGK和Ikaros缺陷的细胞可通过任一本文所述的 方法产生。

[0918] 在一个实施方案中，所述NK细胞得自受试者。在另一实施方案中，NK细胞是NK细胞系， 例如，NK-92细胞系(Conkwest)。

[0919] 同种异体的CAR

[0920] 在本文所述的实施方案中，免疫效应细胞可以是同种异体的免疫效应细胞，例如T细胞或 NK细胞。例如，细胞可以是同种异体T细胞，例如功能性T细胞受体(TCR)和/或人类白细胞抗 原(HLA)(例如I类HLA和/或II类HLA)表达不足的同种异体T细胞。

[0921] 缺乏功能性TCR的T细胞可以例如工程化以使得其在其表面上不表达任一功能性TCR， 工程化以使其不表达包括功能性TCR的一个或更多个亚基(例如，被工程化使得它不表达(或 显示出减少的表达)TCRα、TCRβ、TCRγ、TCRδ、TCRε、和/或TCRζ)，或工程化以使得其在 其表面产生非常少的功能性TCR(例如，工程化以使得其不表达(或显示出减少的表达)TCRα、 TCRβ、TCRγ、TCRδ、TCRε、和/或TCRζ。备选地，T细胞可以表达基本上受损的TCR，例 如通过表达突变或截短的形式的一个或更多个TCR的亚基。术语“基本上受损的TCR”是指该 TCR不会在宿主中引发不利的免疫反应。

[0922] 本文所述的T细胞可以例如工程化以使得其在表面上不表达功能性HLA。例如，本文所 述的T细胞可以工程化以使得细胞表面表达HLA(例如1类HLA和/或II类HLA)下调。在一些实 施方案中，HLA的下调可以通过减少或消除β-2微球蛋白(B2M)的表达来实现。在一些实施方 案中，T细胞可缺少功能性TCR和功能性HLA，例如HLA I类和/或HLA II类。

[0923] 缺乏功能性TCR和/或HLA表达的修饰的T细胞可以通过任一合适的方法获得，包括一 个或更多个TCR或HLA的亚基的基因敲除(knock out)或基因敲减(knock down)。例如，T细 胞可以包括使用siRNA、shRNA、簇状的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)、转录活化因 子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN)的TCR和/或HLA的基因敲减。

[0924] 在一些实施方案中，同种异体细胞可以是不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞，例 如通过本文所述任一方法工程化的细胞。例如，细胞可以是不表达或以低水平表达抑制性分 子的细胞，例如可以降低表达CAR的细胞建立免疫效应物应答的能力。抑制性分

子的实例包 括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、I类MHC、II类MHC、 GAL9、腺苷、和TGFR(例如,TGFRβ)。抑制性分子的抑制,例如通过在DNA、RNA或蛋 白水平的抑制,可以优化表达CAR的细胞性能。在实施方案中,可以使用如本文所述的抑制 性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA例如siRNA或shRNA,簇状的规则间隔的短回文重复 序列(CRISPR)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN)。

[0925] siRNA和shRNA以抑制TCR或HLA

[0926] 在一些实施方案中,可以使用靶向编码本文所述的TCR和/或HLA和/或抑制性分子(例 如PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如,CEACAM-1,CEACAM-3和/或 CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9,腺苷 和TGFRβ)的核酸的siRNA或shRNA来抑制TCR表达和/或HLA表达。可以使用任一常规 表达系统,例如比如慢病毒表达系统获得siRNA和shRNAs在T细胞中的表达。

[0927] 用于siRNA和shRNA以及示例性shRNA的表达系统描述于例如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第649和650段,其全部内容通过引用并入本文。

[0928] 抑制TCR或HLA的CRISPR

[0929] 如本文中使用的“CRISPR”或“TCR和/或HLA的CRISPR”或“抑制TCR和/或HLA的CRISPR”是指簇状的规则间隔的短回文重复序列组或包括该重复序列组的系统。正如本文中 使用的那样,“Cas”是指CRISPR-相关的蛋白。“CRISPR/Cas”系统指来源于CRISPR和Cas的系统,其可用于沉默或突变TCR和/或HLA基因,和/或本文所述的抑制性分子(例如PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5), LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4 (VTCN1),HVEM,HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9, 腺苷和TGFRβ)。

[0930] CRISPR/Cas系统及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675 的第651-658段中,其全部内容通过引用并入本文。

[0931] 抑制TCR和/或HLA的TALEN

[0932] “TALEN”或“HLA和/或TCR的TALEN”或“抑制HLA和/或TCR的TALEN”是指转录活 化剂样效应物核酸酶,一种可用于编辑HLA和/或TCR基因的人工核酸酶,和/或本文所述的 抑制性分子(例如PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1, CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD80, CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC, II类MHC,GAL9,腺苷和TGFRβ)。

[0933] TALEN、TALE及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第659-665段,其全部内容通过引用并入本文。

[0934] 锌指核酸酶抑制HLA和/或TCR

[0935] “ZFN”或“锌指核酸酶”或“HLA和/或TCR的ZFN”或“抑制HLA和/或TCR的ZFN”是指锌指核酸酶,一种可用于编辑HLA和/或TCR基因的人工核酸酶,和/或本文所述的抑制性分子(例如PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3 和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4,CD80,CD86, B7-H3(CD276),B7-H4

(VTCN1),HVEM(TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II 类MHC,GAL9,腺苷和TGFRβ)。

[0936] ZFN及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第666-671 段,其全部内容通过引用并入本文。

[0937] 端粒酶表达

[0938] 虽然不希望受任一特定理论的束缚,在一些实施方案中,由于在T细胞端粒缩短,治疗性 T细胞具有在患者中短期持久性;相应地,用端粒酶基因转染能延长T细胞的端粒和改善患者 中T细胞的持久性。见Carl June,"Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic",Journal of Clinical Investigation,117:1466-1476(2007)。因此,在一个实施方案中,免疫效应细胞,例如, T细胞,异位表达端粒酶亚基,例如,端粒酶催化亚基,例如,TERT,例如,hTERT。在一 些方面,本公开内容提供了生产CAR表达细胞的方法,其包括将细胞与编码端粒酶亚基,例 如,端粒酶催化亚基,例如,TERT,例如,hTERT的核酸接触。该细胞可以在与编码CAR 的构建体接触之前,同时或之后与所述核酸接触。

[0939] 在一个方面,本公开内容描述了制备免疫效应细胞(例如,T细胞,或NK细胞)群的方法。在一个实施方案中,该方法包括:提供免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)群,将免疫效应 细胞群与编码CAR的核酸接触;和将免疫效应细胞群与编码端粒酶亚基例如,hTERT的核酸在 允许CAR和端粒酶表达的条件下接触。

[0940] 在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸是DNA。在一个实施方案中,编码端粒酶亚 基的核酸包含能够驱动端粒酶亚基的表达的启动子。

[0941] 在实施方案中,hTERT具有GenBank蛋白质ID AAC51724.1的氨基酸序列((Meyerson et al., "hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization"Cell Volume 90,Issue 4,22August 1997,Pages 785-795)如下:

[0942] MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPP PAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGS GAWGLLLR RVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERA WNHSVREAGVPLGLP APGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFC VVSPARPAEEATSLEGALSGT RHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQL RPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLG SRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKT HCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEED TDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWG SRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGC AWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWL MSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQH LKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLT SRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNY ERARRPGLLGASVLGLDDIHR AWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVR RYAVVQKAAHGHVRK AFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHA VRIRGKSYVQ CQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVP EYGCV VNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKA GRNMRRKLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVI SDTAS LCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSR KLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD(SEQ ID NO:1332)

[0943] 在一个实施方案中,hTERT具有与SEQ ID NO:1332的序列有至少80%,85%,90%,

95％, 96％,97％,98％,或99％同一性的序列。在一个实施例中,hTERT具有SEQ ID NO:1332的序 列。在一个实施方案中,hTERT包含N末端、C-末端、或两端的缺失(例如,不超过5,10, 15,20,或30个氨基酸的缺失)。在一个实施方案中,hTERT包含N末端、C-末端、或两端的转基因氨基酸序列(例如,不超过5,10,15,20,或30个氨基酸)。

[0944] 在一个实施方案中,hTERT由GenBank登录号AF018167的核酸序列编码(Meyerson et al.,"hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization"Cell Volume 90,Issue 4,22August 1997,Pages 785-795):

[0945]
1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc
121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg
181 gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg
241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg
301 cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
361 cgctgctgga cggggccccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
421 acctgcccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgccgtc tttgtgctgg
541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca
601 ctcaggcccg gccccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tcccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga
721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg
781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga
841 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagaccc gccgaagaag
901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc
961 agcaccacgc gggccccccca tccacatcgc ggccaccacg tcctgggac acgccttgtc
1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc
1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg
1141 agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc
1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc
1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgct gcgagctgcg gtcaccccag
1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg
1381 acacagaccc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt
1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg ggctccaggc
1501 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcca
1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca
1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg
1681 ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg tccagactcc
1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gcccaggacc
2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc
2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctcctccctg aatgaggcca
2461 gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg
2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc
2641 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa

2701 ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga

2761 agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga

2821 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg

2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc

2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt

3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct

3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc

3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc

3181 tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg

3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc

3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gcccagacgc

[0946] 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg

3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg

3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc

3541 ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct

3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc

3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc

3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc

3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc

3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt

3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg

3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa

4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 1333)

[0947] 在一个实施方案中,hTERT由具有与SEQ ID NO:1333的序列有至少80%,85%,90%, 95%,96%,97%,98%,或99%同一性的序列的核酸编码。在一个实施方案中,hTERT是 由SEQ ID NO:1333的核酸编码。

[0948] 免疫效应细胞(例如,T细胞)的活化和扩增

[0949] 通常可以使用例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358; 6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223; 6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利公开号20060121005中所述的方法进行免疫效 应细胞T细胞的活化和扩增。

[0950] 造血干细胞和祖细胞的离体扩增方法描述于美国专利号5,199,942(通过引用并入本文), 可以应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞离体扩 增的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增可以包括:(1)从哺乳动物外周血收获 物或骨髓外植体收集CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩增这些细胞。除了美国专利 号5,199,942描述的细胞生长因子之外,其他因子如flt3-L,IL-1,IL-3和c-kit配体可用于培养和 扩增细胞。

[0951] 通常,免疫效应细胞群体可以通过与连接有刺激CD3/TCR复合体相关的信号的活性剂和 刺激T细胞表面上的共刺激性分子的配体的表面接触进行扩增。特别地,可以如本文所述的刺 激T细胞群,比如通过与抗-CD3抗体或其抗原结合片段、或固定在表面上的抗-CD2抗体接触, 或通过与钙离子载体协同与蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)接触。为了共刺激T细胞表面上 的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适于刺激T细胞增

殖的条件下,使T细 胞群与抗-CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,可以使 用抗-CD3抗体和抗-CD28抗体。可以如本领域已知的其它常用方法那样使用抗-CD28抗体的 实例,包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone,Besançon,France)(Berg等人,Transplant Proc. 30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人,J. Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0952] 在一些实施方案中,通过将细胞与抗CD3抗体和IL-2中的一种或两种接触来扩增和刺激 免疫效应细胞(例如PBMC或T细胞)。在实施方案中,细胞在没有抗CD3或抗CD28珠的情 况下扩增。

[0953] 在某些方面,可以通过不同的方案提供用于T细胞的初次刺激信号和共刺激信号。例如, 提供每种信号的活性剂可以在溶液中或被偶联至表面。当与表面偶联时,可以把所述活性剂 偶联到相同的表面(即,“顺式”形式)或单独的表面(即,“反式”形式)。备选地,可以把一种活 性剂偶联到表面,且另一种活性剂可以在溶液中。在一个方面,提供共刺激信号的活性剂与 细胞表面结合,且提供主要活化信号的活性剂在溶液中或被偶联至表面。在某些方面,两种 活性剂都可以在溶液中。在一个方面,活性剂可以呈可溶性形式,然后被交联至表面,比如 表达将会与该活性剂结合的Fc受体或抗体或其它结合剂的细胞。在这点上,关于人工抗原呈 递细胞(aAPCs),参见例如美国专利申请公开号:20040101519和20060034810,考虑其在本发 明中用于活化和扩增T细胞。

[0954] 在一个方面,把两种活性剂都固定在珠上,在相同的珠上,即“顺式”,或在不同的珠上, 即“反式”。例如,提供主要活化信号的活性剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且提供共 刺激信号的活性剂是抗-CD28抗体或其抗原结合片段;并且两种活性剂以等同的分子数量被 共同固定在相同珠上。在一个方面,使用与所述珠结合的每种抗体的1:1的比率,用于CD4+T 细胞扩增和T细胞生长。在某些方面,使用与所述珠结合的抗CD3:CD28抗体的比率,使得与 使用1:1的比率观察的扩增相比,观察到T细胞扩增的增加。在一个特别的方面,与使用1:1的 比率观察的扩增相比,观察到约1至约3倍的增加。在一个方面,与所述珠结合的CD3:CD28 抗体的比率范围为100:1至1:100及其中所有整数值。在一个方面,与粒子结合的抗-CD28抗体 比抗CD3抗体多,即CD3:CD28的比率小于1。在某些方面,与珠结合的抗CD28抗体与抗CD3 抗体的比率大于2:1。在一个特别的方面,使用1:100的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在 一个方面,使用1:75的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在一个进一步的方面,使用1:50的 与珠结合的抗体CD3:CD28比率。在一个方面,使用1:30的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。 在一个方面,使用1:10的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在一个方面,使用的与珠结合的 抗体的1:3 CD3:CD28比率。在还有一个方面中,使用3:1的与珠结合的抗体CD3:CD28比率。

[0955] 可以使用1:500至500:1及其间任一整数值的粒子与细胞的比率来刺激T细胞或其它靶细 胞。正如本领域普通技术人员可以容易地理解的那样,粒子与细胞的比率可以取决于相对于 靶细胞的粒子尺寸。例如,小尺寸珠可能仅结合少数细胞,而较大珠可结合许多细胞。在某 些方面,细胞与粒子的比率范围为1:100至100:1及其中任一整数值,并且在进一步的方面,也 可以使用包括1:9至9:1的及其中任一整数值的比率来刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗-CD3- 和抗-CD28偶联的粒子与T细胞的比率可以如上所述变化,然而某些合适值包括1:100、1:50、 1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:

1、3:1、4:1、5:1、 6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1，一个合适的比率为至少1:1的粒子/T细胞。在一个方面，使 用1:1或更小的粒子与细胞的比率。在一个特别的方面，合适的粒子:细胞比率为1:5。在进一 步的方面，粒子与细胞的比率可以根据刺激的天数变化。例如，在一个方面，在第一天，粒 子与细胞的比率为1:1至10:1，并且此后每天或每隔一天向细胞中加入另外的粒子，直到10天， 最终比率为1:1至1:10(基于加入当天的细胞计数)。在一个特别的方面，在刺激的第一天，粒 子与细胞的比率为1:1，并在刺激的第三天和第五天调节为1:5。在一个方面，以每日或每隔一 天为基准加入粒子至刺激的第一天最终比为1:1，且在刺激的第三天和第五天为1:5。在一个特 别的方面，在刺激的第一天，粒子与细胞的比率为2:1，并在刺激的第三天和第五天调节为1:10。 在一个方面，以每日或每隔一天为基准加入粒子至刺激的第一天最终比为1:1，且在刺激的第 三天和第五天为1:10。本领域技术人员应当理解多种其它比率都可以适用于本发明。特别地， 比率将根据粒径及细胞尺寸和类型而变化。在一个方面，在第一天，最典型的使用比率为约 1:1、2:1和3:1左右。

[0956] 在本发明进一步的方面，将细胞比如T细胞与活性剂包被的珠混合，接着分离珠和细胞， 然后培养细胞。在备选的方面，在培养之前，活性剂-包被的珠和细胞没有分离，而是一起培 养。在一个进一步的方面，首先通过施加力(比如磁力)浓缩珠和细胞，导致细胞表面标记物 的连接增加，从而诱导细胞刺激。

[0957] 例如，可以通过允许附着了抗-CD3和抗-CD28的顺磁性的珠(3x28珠)与T细胞接触来连接 细胞表面蛋白。在一个方面，将细胞(例如10^4至10^9个T细胞)和珠(例如，比率1:1的DYNABEADS®M-CD3/CD28T顺磁性的珠)在缓冲液中混合，缓冲液例如为PBS(不含二价阳离子，比如钙和镁)。此外，本领域普通技术人员可以容易地理解可以使用任一细胞浓度。例如，样品中靶细胞可能非常少，且仅占样品的0.01％，或全部样品(即，100％)可以包含目的靶 细胞。因此，任一细胞数量都在本发明的上下文之内。在某些方面，可能期望显著减少其中 粒子和细胞混合在一起的体积(即，增加细胞浓度)，以确保细胞和粒子的最大接触。例如， 在一个方面，使用约100亿个细胞/ml、90亿/ml、80亿n/ml、70亿/ml、60亿/ml、50亿/ml、或 20亿个细胞/ml的浓度。在一个方面，使用大于1亿个细胞/ml的浓度。在一个方面，使用1.0、 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0千万个细胞/ml的浓度。在仍然一个方面，使用从7.5、 8、8.5、9、9.5或10千万个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的方面，可以使用1.25亿或1.50亿个 细胞/ml的浓度。使用高浓度可以引起细胞产率提高、细胞活化和细胞扩增。进一步，使用高 细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞，比如CD28-阴性T细胞。这样的细 胞群可以具有治疗价值，并且在某些方面将是期望得到的。例如，使用高浓度的细胞能够更 有效地选择通常具有弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0958] 在一个实施方案中，通过例如本文所述的方法扩增用编码CAR，例如，本文所述的CAR 的核酸转导的细胞。在一个实施方案中，将细胞在培养中扩增几个小时(例如，约2，3，4，5， 6，7，8，9，10，15，18，21小时)到约14天(例如，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11， 12，13或14天)。在一个实施方案中，细胞被扩增4至9天。在一个实施方案中，细胞被扩增8 天或更短，例如，7，6或5天。在一个实施方案中，所述细胞，例如，本文所述的CAR细胞在 培养中扩增5天，所得细胞比相同的培养条件下培养扩增9天的相同的细胞更有效。效力可以 通过例如，由不同的T细胞的功能，例如增殖，靶细胞杀伤，细胞因子的产生，活化，迁移， 或它们的组合来定义。在一个实施方案中，相比于在相同培养条件下扩增9天的相同细胞，扩 增了5天

的细胞，例如，本文所述的CD19 CAR细胞显示细胞倍增的至少1、2、3或4倍增加。在一个实施方案中，所述细胞，例如，表达本文所述的CAR的细胞培养扩增了5天，并且相 比于在相同培养条件下扩增9天的相同细胞，所得的细胞显示出更高的促炎细胞因子产生，例 如，IFN-γ和/或GM-CSF的水平。在一个实施方案中，相比于在相同培养条件下扩增9天的相 同细胞，扩增了5天的细胞，例如，本文所述的CAR细胞显示出促炎细胞因子产生，例如， IFN-γ和/或GM-CSF的水平以pg/ml计至少1、2、3、4、5、10倍或更多倍的增加。

[0959] 在本发明的一个方面，混合物可以培养几小时(约3小时)至约14天或其间的任一每小时整 数值。在一个方面，可以将混合物培养21天。在本发明的一个方面，将珠和T细胞一起培养约 8天。在一个方面，将珠和T细胞一起培养2-3天。

[0960] 也可能需要几个刺激循环，使得T细胞的培养时间可以为60天或以上。适于T细胞培养的 条件包括合适的培养基(例如，极限必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15，(Lonza))，其 可以含有增殖和生存所必需的因子，包括血清(例如胎牛血清或人血清)、白介素-1(IL-2)、胰 岛素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ和TNF-α或本领域技术人员 已知用于细胞生长的任一其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括，但不限于表面活性 剂、plasmanate和还原剂比如N-乙酰基半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、 AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer，具有加入的氨 基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或补充有适合量的血清(或血浆)或定义的激素组、和/或足 以使T细胞生长和扩增的量的细胞因子。抗生素，例如青霉素和链霉素，仅包括在实验培养物 中，而不在输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞保持在载体生长必需的条件下，例如适 合的温度(例如37℃)和气氛(例如，空气加5％CO_2)。

[0961] 在一个实施方案中，将细胞在合适的培养基(如，本文中所描述的培养基)中扩增，所述 培养基包括导致细胞在14天的扩增期间增加至少200倍(例如，200倍，250倍，300倍，350倍) 的一种或多种白介素，例如，如通过本文所述的方法如流式细胞术测定。在一个实施方案中， 将细胞在IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)存在下扩增。

[0962] 在一些实施方案中，在制造CAR表达细胞期间，本文所述的CAR表达细胞(例如T细胞如CD4+T细胞或CD8+T细胞)与包含白介素-15(IL-15)多肽，白介素15受体α(IL-15Ra) 多肽，或IL-15多肽和IL-15Ra多肽例如，hetIL-15的组合的组合物例如，离体接触。在实施 方案中，本文所述的CAR表达细胞与包含IL-15多肽的组合物在制造CAR表达细胞期间例 如，离体接触。在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与包含IL-15多肽和IL-15Ra多肽 的组合的组合物在制造CAR表达细胞期间，例如，离体接触。在实施方案中，本文所述的 CAR表达细胞与包含hetIL-15的组合物在制造CAR表达细胞期间，例如，离体接触。

[0963] 在一个实施方案中，本文描述的CAR表达细胞(例如，T细胞或NK细胞)与包含hetIL-15 的组合物在离体扩增期间接触。在一个实施方案中，本文描述的CAR表达细胞与包含IL-15多 肽的组合物在离体扩增期间接触。在一个实施方案中，本文描述的CAR表达细胞与包含IL-15 多肽和IL-15Ra多肽的组合物在离体扩增期间接触。在一个实施方案中，接触导致淋巴细胞亚 群例如，CD8+T细胞的存活和增殖。

[0964] 在一个实施方案中，本文公开的制备方法进一步包括将免疫效应细胞(例如，T细胞或 NK细胞)群体与编码端粒酶亚基例如hTERT的核酸接触。编码端粒酶亚基的核酸可以是DNA。

[0965] 已经暴露于不同刺激时间的T细胞可以显示出不同的特征。例如,典型的血液或单采血液 成分术外周血单核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制T细胞群(TC,CD8+)的辅助T细胞群(TH, CD4+)。通过刺激CD3和CD28受体的离体T细胞扩增产生T细胞群,该细胞群在约第8-9天前主 要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,T细胞群包括越来越大的TC细胞群。因此,根据治疗 的目的,向受试者输注主要包括TH细胞的T细胞群可能是有利的。类似地,如果已经分离了 TC细胞的抗原特异性亚组,则使该亚组在更大程度上扩增可能是有益的。

[0966] 进一步,除了CD4和CD8标记物之外,其它表型标记物显著变化,但大部分在细胞扩增 过程中可再重现。因此,这样的可重现性使能够针对特定目的裁剪活化的T细胞产物。

[0967] 一旦构建CAR,例如,CD19 CAR,则可以使用多种试验来评价分子的活性,比如但不限 于在抗原刺激后扩增T细胞的能力、在不存在再刺激下维持T细胞扩增和在适合的体外和动物 模型中的抗癌活性。用于评价CAR,例如,CD19 CAR的效应的试验在下文进一步详细描述。

[0968] 可以使用原代T细胞中CAR表达的Western印迹分析来检测单体和二聚体的存在,例如, 如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第695段所述,其通过引用整体并入 本文。

[0969] 可以通过流式细胞测量术测量抗原刺激后CAR+T细胞的体外扩增。例如,用αCD3/αCD28 珠刺激CD4+和CD8+T细胞的混合物,接着在要被分析的启动子的控制下用表达GFP的慢病毒 载体转导。示例性的启动子包括CMV IE基因、EF-1α、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在第6天,通过流式细胞测量术测量CD4+和/或CD8+T细胞亚组中培养物的GFP荧光。参见, 例如Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。备选地,在第0天,用αCD3/αCD28 包被的磁珠刺激CD4+和CD8+T细胞的混合物,并在第1天使用表达CAR的双顺反子慢病毒载 体用CAR转导以及使用2A核醣体跳跃序列用eGFP转导。洗涤后,在抗CD3和抗CD28抗体 (K562-BBL-3/28)的存在下,用$CD19^{+}$K562细胞(K562-CD19),野生型K562细胞(K562野 生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞再刺激培养物。每隔一天以100IU/ml将外源IL-2加 入到培养物中。使用基于珠的计数,通过流式细胞术计数GFP^{+}T细胞。参见例如Milone et al., Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。

[0970] 也可以测量在不存在再刺激下保持的CAR+T细胞扩增。参见,例如Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简而言之,在第0天用αCD3/αCD28包被的磁珠刺 激,并在第1天用指定的CAR转导,在培养的第8天,使用Coulter Multisizer粒子计数器、NexcelomCellometer Vision或Millipore Scepter测量平均T细胞体积(fl)。

[0971] 动物模型也可用于测量表达CAR的细胞活性,例如如2015年3月13日提交的国际申请 WO2015/142675的第698段所述,其全部内容通过引用并入本文。

[0972] 可以评估剂量依赖性CAR治疗反应,例如,如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第699段所述,其全部内容通过引用并入本文。之前已经描述了细胞增殖和 细胞因子产生的评估,例如如2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第700段所述, 其全部内容通过引用并入本文。细胞毒性可以通过标准的^{51}Cr释放测定来评估,例如,如2015 年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的第701段所述,其全部内容通过引用并入本文。成像技术可用于评估荷瘤动物模型中CAR的特异性运输和增殖,例如,如2015年3月13日提交 的国际申请WO2015/142675的第702段所述,其全部内容通过引用并入本

文。

[0973] 其他测定法,包括本文实施例部分所述的以及本领域已知的那些也可用于评价本文所述 的CAR。

[0974] 或者,或与本文公开的方法组合,公开了用于以下一种或多种的方法和组合物:CAR表达 细胞的检测和/或定量(例如,体外或体内(例如,临床监测));免疫细胞扩增和/或活化;和/或 CAR特异性选择,其涉及使用CAR配体。在一个示例性实施方案中,CAR配体是结合CAR分 子的抗体,例如结合CAR的细胞外抗原结合结构域的抗体(例如结合抗原结合结构域的抗体, 例如抗独特型抗体;或结合细胞外结合结构域的恒定区的抗体)。在其他实施方案中,CAR配 体是CAR抗原分子(例如,如本文所述的CAR抗原分子)。

[0975] 在一个方面,公开了用于检测和/或定量CAR表达细胞的方法。例如,CAR配体可以用于 体外或体内检测和/或定量CAR表达细胞(例如,临床监测患者中的CAR表达细胞或给予患者 剂量)。该方法包括:

[0976] 提供CAR配体(任选地,标记的CAR配体,例如包括标签,珠,放射性或荧光标记的CAR 配体);

[0977] 获得CAR表达细胞(例如,获取含有CAR表达细胞的样品,例如制造样品或临床样品);

[0978] 在结合发生的条件下使CAR表达细胞与CAR配体接触,从而检测存在的CAR表达细胞的 水平(例如,量)。可以使用标准技术例如FACS,ELISA等检测CAR表达细胞与CAR配体的结 合。

[0979] 在另一方面,公开了扩增和/或激活细胞(例如,免疫效应细胞)的方法。该方法包括:

[0980] 提供CAR表达细胞(例如,第一CAR表达细胞或瞬时表达CAR的细胞);

[0981] 在发生免疫细胞扩增和/或增殖的条件下,使所述CAR表达细胞与CAR配体(例如本文所 述的CAR配体)接触,从而产生活化和/或扩增的细胞群体。

[0982] 在某些实施方案中,CAR配体存在于(例如,固定化或附着于基质,例如非天然存在的基 质)上。在一些实施方案中,基质是非细胞基质。非细胞基质可以是选自例如板(例如,微量 滴定板),膜(例如,硝酸纤维素膜),基质,芯片或珠的固相支持体。在实施方案中,CAR配 体存在于基质中(例如,在基质表面上)。CAR配体可以与基质共价或非共价(例如交联)固定化, 连接或缔合。在一个实施方案中,CAR配体与珠连接(例如共价连接)。在上述实施方案中, 免疫细胞群体可以在体外或离体扩增。该方法还可以包括在CAR分子的配体存在下,例如使 用本文所述的任一方法培养免疫细胞群。

[0983] 在其它实施方案中,扩增和/或活化细胞的方法还包括加入第二刺激分子,例如CD28。例如,CAR配体和第二刺激分子可以固定到基质,例如一个或多个珠子上,从而提供增加的 细胞扩增和/或活化。

[0984] 在其他实施方案中,提供了用于选择或富集CAR表达细胞的方法。该方法包括使CAR表 达细胞与如本文所述的CAR配体接触;并基于CAR配体的结合选择细胞。

[0985] 在其他实施方案中,提供了用于消耗(例如,减少和/或杀死)CAR表达细胞的方法。该 方法包括使CAR表达细胞与如本文所述的CAR配体接触;并基于CAR配体的结合靶向细胞, 从而减少CAR表达细胞的数量和/或杀死CAR表达细胞。在一个实施方案中,CAR配体与

毒性 剂(例如,毒素或细胞消融药物)偶联。在另一个实施方案中,抗独特型抗体可以引起效应细 胞活性,例如ADCC或ADC活性。

[0986] 可用于本文所公开的方法中的示例性抗CAR抗体描述于例如WO 2014/190273和Jena et al.,"Chimeric Antigen Receptor(CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials",PLOS March 2013 8:3e57838,其内容通过引用并入本文。在一些方面 和实施方案中,本文的组合物和方法针对T细胞的特定亚组优化,例如,如在2015年7月31日 提交的PCT/US2015/043219中所述,其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,与 对照T细胞,例如,表达相同构建体的不同类型(例如,$CD8^+$或$CD4^+$)的T细胞相比,T细胞的 优化亚组显示增强的持久性。在一些实施方案中,$CD4^+$T细胞包含本文所述的CAR,所述CAR 包含适合于(例如,优化用于例如导致增强的持久性)$CD4^+$T细胞的胞内信号传导结构域,例如 ICOS结构域。在一些实施方案中,$CD8^+$T细胞包含本文所述的CAR,所述CAR包含适合于(例 如,优化用于例如导致增强的持久性)$CD8^+$T细胞的胞内信号传导结构域,例如4-1BB结构域, CD28结构域或除ICOS结构域之外的另一共刺激结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR 包含本文所述的抗原结合结构域,例如包含抗原结合结构域的CAR。

[0987] 在一个方面,本文描述了治疗受试者,例如患有癌症的受试者的方法。该方法包括给予 所述受试者有效量的:

[0988] 1)包含CAR(CAR^{CD4+})的$CD4^+$T细胞,其包含:

[0989] 抗原结合结构域,例如本文所述的抗原结合结构域;

[0990] 跨膜结构域;和

[0991] 胞内信号传导结构域,例如第一共刺激结构域,例如ICOS结构域;和

[0992] 2)包含CAR(CAR^{CD8+})的$CD8^+$T细胞,其包含:

[0993] 抗原结合结构域,例如本文所述的抗原结合结构域;

[0994] 跨膜结构域;和

[0995] 胞内信号传导结构域,例如第二共刺激结构域,例如4-1BB结构域,CD28结构域或除 ICOS结构域之外的另一共刺激结构域;

[0996] 其中CAR^{CD4+}和CAR^{CD8+}彼此不同。

[0997] 任选地,该方法还包括施用:

[0998] 3)包含CAR(第二CARCD8+)的第二$CD8^+$T细胞,其包含:

[0999] 抗原结合结构域,例如本文所述的抗原结合结构域;

[1000] 跨膜结构域;和

[1001] 胞内信号传导结构域,其中第二CAR^{CD8+}包含不存在于CAR^{CD8+}上的胞内信号传导结构 域,例如共刺激信号传导结构域,并且任选地不包含ICOS信号传导结构域。

[1002] 制造/生产方法

[1003] 在一些实施方案中,本文公开的方法进一步包括在用细胞(例如,本文所述的免疫效应 细胞,例如表达由截短的PGK1启动子驱动的CAR的免疫效应细胞)治疗之后施用T细胞消耗 剂,从而减少(例如,消耗)CAR表达细胞(例如CD19 CAR表达细胞)。这种T细胞消耗剂可用于有效地消耗CAR表达细胞(例如表达CD19 CAR的细胞)以减轻毒性。在一些实施方 案中,根据本文的方法制备CAR表达细胞,例如根据本文方法测定(例如,在转染或转导之 前

或之后)。

[1004] 在一些实施方案中,T细胞消耗剂在施用细胞,例如本文所述的免疫效应细胞群后1,2, 3,4或5周施用。

[1005] 在一个实施方案中,T细胞消耗剂是例如通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)和/或补体诱导的细胞死亡而消耗CAR表达细胞的活性剂。例如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达由能够诱导细胞死亡,例如ADCC或补体诱导的细胞死亡的分子识别的抗原(例如,靶抗原)。例如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达能够被抗体或抗体片段 靶向的靶蛋白(例如受体)。这些靶蛋白的实例包括但不限于EpCAM,VEGFR,整联蛋白 (例如整联蛋白αvβ3,α4,αI3/4β3,α4β7,α5β1,αvβ3,αv),TNF受体超家族的成员(例如TRAIL- R1, TRAIL-R2),PDGF受体,干扰素受体,叶酸受体,GGPNMB,ICAM-1,HLA-DR,CEA, CA-125,MUC1, TAG-72,IL-6受体,5T4,GD2,GD3,CD2,CD3,CD4,CD5,CD11, CD11a/LFA-1,CD15,CD18/ITGB2,CD19,CD20,CD22,CD23/lgE受体,CD25,CD28,CD30, CD33,CD38,CD40,CD41,CD44, CD51,CD52,CD62L,CD74,CD80,CD125,CD147/basigin, CD152/CTLA-4,CD154/CD40L, CD195/CCR5,CD319/SLAMF7和EGFR及其截短形式(例如, 保留一个或多个胞外表位但是缺乏细胞质结构域内的一个或多个区域的形式)。

[1006] 在一些实施方案中,CAR表达细胞共表达CAR和靶蛋白,例如天然表达靶蛋白或被工 程化以表达靶蛋白。例如,细胞,例如免疫效应细胞群体可以包括包含CAR核酸(例如本文 所述的CAR核酸)和编码靶蛋白的核酸的核酸(例如,载体)。

[1007] 在一个实施方案中,T细胞消耗剂是CD52抑制剂,例如抗CD52抗体分子,例如阿仑单 抗。

[1008] 在其他实施方案中,细胞,例如免疫效应细胞群体,表达如本文所述的CAR分子(例如 CD19CAR)和由T细胞消耗剂识别的靶蛋白。在一个实施方案中,靶蛋白是CD20。在靶蛋白是CD20的实施方案中,T细胞消耗剂是抗CD20抗体,例如利妥昔单抗。

[1009] 在任何上述方法的进一步实施方案中,所述方法还包括将细胞例如造血干细胞或骨髓移 植到哺乳动物中。

[1010] 在另一方面,本发明的特征在于在细胞移植前对哺乳动物进行调节的方法。该方法包括 向哺乳动物施用有效量的包含CAR核酸或多肽例如CD19 CAR核酸或多肽的细胞。在一些 实施方案中,细胞移植是干细胞移植,例如造血干细胞移植或骨髓移植。在其他实施方案中, 在细胞移植之前调节受试者包括减少受试者中靶标表达细胞,例如表达CD19的正常细胞或 表达CD19的癌细胞的数目。

[1011] 生物聚合物递送方法

[1012] 在一些实施方案中,本文公开的一种或多种CAR表达细胞可以通过生物聚合物支架例如 生物聚合物植入物施用或递送至受试者。生物聚合物支架可以支持或增强本文所述的CAR表 达细胞的递送,扩增和/或分散。生物聚合物支架包含生物相容性(例如,基本上不诱导炎症 或免疫应答)和/或可天然存在或合成的可生物降解的聚合物。示例性生物聚合物描述于例如 在2015年3月13日提交的国际申请WO2015/142675的段落1004-1006中,其全部内容通过 引用并入本文。

[1013] 治疗应用

[1014] CD19相关疾病和/或病症

[1015] 一方面，本发明提供了治疗与CD19表达相关的疾病的方法。一方面，本发明提供了治 疗疾病的方法，其中部分癌症对CD19是阴性的，并且部分癌症对于CD19是阳性的。例如，本发明的方法和组合物可用于治疗经历了与CD19表达相关疾病的治疗的受试者，其中经历了与CD19表达相关的治疗(例如用CD19 CAR治疗)的受试者表现出与CD19表达相关的 疾病。

[1016] 另一方面，本发明提供了治疗与B细胞抗原例如CD10，CD20，CD22，CD34，CD123，FLT-3，或ROR1中的一种或多种相关的疾病的方法。一方面，本发明提供了治疗疾病的方法，其中 部分肿瘤对B细胞抗原呈阴性，部分肿瘤对B细胞抗原呈阳性。例如，本发明的组合物和方 法可用于治疗与B细胞抗原表达相关的疾病进行治疗的受试者，其中经历与B细胞抗原表达 相关的治疗，例如用靶向B细胞抗原的CAR治疗的受试者显示与B细胞抗原表达相关的疾 病。在第三方面，本发明提供了治疗与B细胞抗原表达相关，例如与CD19和一种或多种其 他B细胞抗原的表达相关的疾病的方法。

[1017] 一方面，本发明涉及包含有效连接到启动子的CD19 CAR的载体，用于在哺乳动物细胞 例如T细胞或NK细胞中表达。一方面，本发明提供了表达CD19 CAR的重组细胞，例如T细胞或NK细胞，用于治疗表达CD19的癌症，其中表达CD19 CAR的重组T细胞被称为CD19 CART。在一个方面，本文所述的CD19 CART能够使癌细胞与其表面上表达的至少一种CD19 CAR接触，使得CART靶向癌细胞，并且癌的生长被抑制。

[1018] 一方面，本发明涉及CD22抑制剂，其是CD22 CART，例如T细胞，其表达CD22 CAR，用于与CD19 CARTS组合治疗表达CD22的肿瘤，其中表达CD22 CAR的重组T细胞称为 CD22 CART。在一个方面，本文所述的CD22 CART能够使肿瘤细胞与其表面上表达的至少 一种CD22 CAR接触，使得CD22 CART靶向肿瘤细胞，并且肿瘤的生长被抑制。

[1019] 一方面，本发明涉及一种抑制表达CD19的癌细胞生长的方法，包括使癌细胞与表达CD19 CAR的细胞，例如CD19 CART细胞，以及一种或多种如本文所述的其它CAR表达细胞接 触，使得CART响应于抗原而被激活并靶向癌细胞，其中癌症的生长被抑制。CD19 CAR表达细胞，例如T细胞与B细胞抑制剂，例如本文所述的B细胞抑制剂组合施用。

[1020] 在一些实施方案中，CD19抑制剂(例如，表达结合CD19的CAR分子，例如本文所述的结合CD19的CAR分子的一种或多种细胞)和B细胞抑制剂(例如，如本文所述CD10，CD19，CD20，CD22，CD34，CD123，FLT-3，或ROR1的一种或多种抑制剂)同时施用。在一些实施 方案中，CD19抑制剂和B细胞抑制剂同时输注入受试者，例如在相同的输注体积中混合。在其它实施方案中，同时施用包括CD19抑制剂和B细胞抑制剂的单独施用，例如每次施用 在预定的时间间隔(例如彼此之间15，30或45分钟内)开始。

[1021] 在一些实施方案中，CD19抑制剂递送的开始和B细胞抑制剂递送的开始在彼此1，2，3，4，6，12，18或24小时内，或在彼此1，2，3，4，5，10，15，20，25，30，35，40，60，80或100天。在一 些实施方案中，CD19抑制剂递送的结束和B细胞抑制剂递送的结束在彼此1，2，3，4，6，12，18 或24小时之内，或在彼此1，2，3，4，5，10，15，20，25，30，35，40，60，80或100天。在一些实施 方案中，在CD19抑制剂递送(例如，输注)和B细胞抑制剂递送(例如，输注)的结束之间施用期限的重叠是至少1，2，3，4，5，10，15，20，25，30或45分钟。

[1022] 在一些实施方案中，施用B细胞抑制剂，同时在受试者中存在(例如经历扩增)表达结 合CD19的CAR分子的一种或多种细胞。在一些实施方案中，施用CD19抑制剂，同时在受试

者中存在(例如,经历扩增)表达结合CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,ROR1,CD79b,CD179b或CD79a中的一种或多种的CAR分子的一种或多种细胞。

[1023] 本发明包括(其中包括)一种细胞疗法,其中T细胞被遗传修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR),并且将CAR T细胞注入有需要的受体。输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,CAR修饰的T细胞能够在体内复制,导致长期持续性,其可导致持续的肿瘤控制。在多个方面,施用于患者的T细胞或其后代在给予患者T细胞后在患者中持续至少四 个月,五个月,六个月,七个月,八个月,九个月,十个月,十一个月,十二个月,十三个月,十四个月,十五个月,十六个月,十七个月,十八个月,十九个月,二十个月,二十一 个月,二十二个月,二十三个月,两年,三年,四年,或五年。

[1024] 本发明还包括一种细胞疗法,其中免疫效应细胞例如NK细胞或T细胞被修饰(例如通过体 外转录的RNA)以瞬时表达嵌合抗原受体(CAR)并将CAR表达(例如,CAR T)细胞注入有 需要的受体。输注的细胞能够杀死受体中的癌细胞。因此,在多个方面,施用于患者的表达 CAR的细胞例如T细胞在CAR表达细胞例如T细胞,施用于患者后存在不到一个月,例如三周, 两周,一周。

[1025] 不希望受任何特定理论束缚,由CAR修饰的T细胞引起的抗癌免疫应答可能是主动或被 动免疫应答,或者备选地可能是由于直接与间接的免疫应答。一方面,CAR(例如,CD19-CAR) 转导的T细胞在应答表达靶抗原(例如CD19)的人类癌细胞中表现出特异性促炎细胞因子分 泌和有效的溶细胞活性,抵抗可溶性靶抗原抑制,介导旁观者杀伤并介导已确立的人类癌症 的消退。例如,靶抗原表达癌症的异质区域内的少抗原癌细胞可能容易受到先前与相邻的抗 原阳性癌细胞反应的靶抗原重定向的T细胞的间接破坏。

[1026] 一方面,本发明的CAR修饰的细胞,例如完全人类CAR T细胞,可以是用于哺乳动物中 的离体免疫和/或体内疗法的一种类型的疫苗。在一个方面,哺乳动物是人。

[1027] 关于离体免疫,在将细胞施用于哺乳动物之前,以下至少一种在体外发生:i)扩增细胞, ii)将编码CAR的核酸引入细胞,或iii)冷冻保存细胞。

[1028] 离体程序在本领域中是众所周知的,并且在下面更全面地讨论。简而言之,用表达本文 公开的CAR的载体从哺乳动物(例如人)中分离细胞并进行遗传修饰(即在体外转导或转染)。CAR修饰的细胞可以施用于哺乳动物受体以提供治疗益处。哺乳动物受体可以是人,并且CAR 修饰的细胞可以相对于受体是自体的。或者,相对于受体,细胞可以是同种异体的,同基因 的或异种的。

[1029] 造血干细胞和祖细胞的离体扩增方法描述于美国专利号5,199,942(通过引用并入本文), 可以应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞离体扩 增的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增可以包括:(1)从外周血收集物或骨髓 外植体收集哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩增这些细胞。除了美国专 利号5,199,942号描述的细胞生长因子外,其他因素如flt3-L,IL-1,IL-3和c-kit配体可用于培养 和扩增细胞。

[1030] 除了在体外免疫中使用基于细胞的疫苗之外,还包括在本文所述的方法中的是用于体内 免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

[1031] 通常,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫受损的个体中出现的疾病。特别地,本文所述的CAR表达细胞用于治疗与一种或多种B细胞抗原的表达相关的

疾病,病 症和状况。在某些方面,细胞用于治疗具有患与一种或多种B细胞抗原表达相关的疾病,病 症和状况的风险的患者。因此,本发明提供(尤其是)用于治疗或预防与B细胞抗原表达相 关的疾病,病症和状况的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文描述的CD19 CAR表达细胞与本文所述的一种或多种B细胞抑制剂的组合。

[1032] 本发明还提供了抑制增殖或减少表达CD19的细胞群体的方法,所述方法包括将包含 CD19表达细胞的细胞群与结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CAR表达细胞接触,并使 表达CD19的细胞群与本文所述的一种或多种B细胞抑制剂接触。在具体方面,本发明提供了 抑制表达CD19的癌细胞的增殖或减少其群体的方法,所述方法包括使表达CD19的癌细胞群 与结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CAR表达细胞接触,并使CD19表达细胞与本文所 述的一种或多种B细胞接触。一方面,本发明提供了抑制表达CD19的癌细胞的增殖或减少其 群体的方法,所述方法包括使表达CD19的癌细胞群与结合CD19表达细胞的本文所述的抗 CD19 CAR表达细胞接触,并使CD19表达细胞与本文所述的一种或多种B细胞接触。在某些 方面,本文所述的抗CD19 CAR表达细胞与本文所述的一种或多种B细胞的组合将在具有与 CD19表达细胞相关的血液癌症或另一种癌症的受试者或动物模型中细胞和/或癌细胞的量, 数目,数量或百分比相对于阴性对照降低至少25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少 65%,至少75%,至少85%,至少95%,或至少99%。在一方面,受试者是人类。

[1033] 本发明还提供抑制增殖或减少包含CD19表达细胞和表达第二B细胞抗原的细胞的细胞群 的方法。一方面,CD19和第二B细胞抗原由群体内相同的细胞表达。另一方面,CD19和第二 B细胞抗原由群体内不同的细胞亚组表达。在另一方面,CD19和第二B细胞抗原通过群体内 重叠的细胞亚组表达,使得一些细胞表达CD19和第二B细胞抗原,一些细胞表达CD19,一些 细胞表达第二B细胞抗原。

[1034] 本发明还提供了抑制表达CD19和第二B细胞抗原的细胞群增殖或减少该细胞群的方法, 所述方法包括(i)使包含CD19表达细胞的细胞群与结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CAR表达细胞接触,和(ii)使第二B细胞抗原表达细胞与结合第二B细胞抗原表达细胞的本 文所述的第二种CAR表达细胞接触。在具体方面,本发明提供了抑制表达CD19和第二B细胞 抗原的癌细胞群体的增殖或减少所述群体的方法,所述方法包括(i)使表达CD19的癌细胞 群与结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CAR表达细胞接触,和(ii)使第二B细胞抗原 表达细胞群与结合表达第二B细胞抗原的细胞的本文所述的第二种CAR表达细胞接触。一方 面,本发明提供了抑制表达CD19和/或第二B细胞抗原的癌细胞群体的增殖或减少所述群体的 方法,所述方法包括(i)使表达CD19的癌细胞群与结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CAR表达细胞接触,和(ii)使第二B细胞抗原表达细胞群体与结合表达第二B细胞抗原的细 胞的本文所述的第二种CAR表达细胞接触。在某些方面,本文所述的抗CD19 CAR表达细胞 和本文所述的第二种CAR表达细胞的组合将在具有与CD19和/或第二B细胞抗原表达细胞相 关的血液癌症或另一种癌症的受试者或动物模型中细胞和/或癌细胞的量,数目,数量或百分 比相对于阴性对照降低至少25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少65%,至少75%, 至少85%,至少95%,或至少99%。在一方面,受试者是人类。

[1035] 本发明还提供了用于预防,治疗和/或控制与CD19表达细胞相关的疾病(例如,表达CD19 的血液癌症或非典型癌症)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用结合CD19

表达细胞 的抗CD19 CAR-表达细胞,并施用本文所述的一种B细胞抑制剂。在一方面,受试者是人类。与表达CD19的细胞相关的病症的非限制性实例包括自身免疫性病症(例如狼疮),炎症性病 症(例如过敏和哮喘)和癌症(例如表达CD19的血液癌症或非典型癌症)。

[1036] 本发明还提供了用于预防,治疗和/或控制与CD19和/或第二B细胞抗原表达细胞相关疾病 (例如,表达CD19和/或第二B细胞抗原的血液癌症或非典型癌症)的方法,所述方法包括向 需要的受试者施用结合CD19表达细胞和B细胞抑制剂的抗CD19 CAR表达细胞。

[1037] 本发明还提供了用于预防,治疗和/或控制与CD19表达细胞相关的疾病的方法,所述方 法包括向需要的受试者施用结合CD19表达细胞的本发明的抗CD19 CART细胞。在一方面, 受试者是人类。

[1038] 本发明还提供了用于预防与表达CD19的细胞相关的癌症复发的方法,所述方法包括向需 要其的受试者施用与表达CD19的细胞结合的本发明的抗CD19 CART细胞。在一个方面,所 述方法包括向需要其的受试者施用有效量的结合CD19表达细胞的本文所述的抗CD19 CART 细胞与有效量的另一种疗法的组合。

[1039] 一方面,本发明涉及治疗受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用本文所述的 CD19 CAR表达细胞,例如T细胞与B细胞抑制剂的组合,使得在受试者中治疗癌症。可通过 本文所述方法治疗的癌症的实例是与CD19表达相关的癌症。在一个实施方案中,该疾病是实 体或液体肿瘤。在一个实施方案中,疾病是血液癌症,例如如本文所述。

[1040] 与CD19表达相关的非癌症相关适应证包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮), 炎症性病症(变态反应和哮喘)和移植。

[1041] 在一些实施方案中,可用本文所述的组合治疗的癌症是多发性骨髓瘤。多发性骨髓瘤是 血液中的癌症,其特征在于血浆细胞克隆在骨髓中的积聚。目前用于多发性骨髓瘤的疗法包 括但不限于用来那度胺治疗,其是沙利度胺的类似物。来那度胺具有包括抗肿瘤活性,血管 发生抑制和免疫调节的活性。在一些实施方案中,例如本文所述的CD19 CAR可用于靶向骨 髓瘤细胞。在一些实施方案中,本文所述的组合可以与一种或多种另外的疗法,例如来那度 胺治疗一起使用。

[1042] 本文所述的CAR表达细胞可以单独或作为与稀释剂和/或与其它成分如IL-2或其它细胞因 子或细胞群组合的药物组合物施用。

[1043] 血液癌症

[1044] 血液癌症状况是影响血液,骨髓和淋巴系统的癌症的类型,如白血病,淋巴瘤和恶性淋 巴细胞增生症。

[1045] 在一个实施方案中,血液癌症是白血病。在一个实施方案中,癌症选自一种或多种急性 白血病,包括但不限于B细胞急性淋巴性白血病(BALL),T细胞急性淋巴性白血病(TALL), 小淋巴细胞性白血病(SLL),急性淋巴性白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括 但不限于慢性髓性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL);附加的血液癌症或血液病症包括但不限于套细胞淋巴瘤(MCL),B细胞幼淋巴细胞白血病,母细胞性浆细胞样 树突状细胞瘤,伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡淋巴瘤,毛细胞白血病,小细 胞或大细胞滤泡淋巴瘤,恶性淋巴细胞增生症,MALT淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,多发性骨髓 瘤,骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆母细胞淋巴 瘤,浆细胞样树突细胞瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,以及“白血病前期”,其是由无效产 生(或

发育异常)髓血细胞联合的一组不同的血液学状况。与CD19,CD20或CD22表达相关的 疾病包括但不限于非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病症或表达CD19,CD20或CD22 的增殖性疾病;及其任何组合。

[1046] 白血病可分为急性白血病和慢性白血病。急性白血病可进一步分为急性骨髓性白血病 (AML)和急性淋巴性白血病(ALL)。慢性白血病包括慢性髓性白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。其他相关病症包括骨髓增生异常综合征(MDS,以前称为"白血病前期"),这是通过骨髓血细胞无效生产(或发育异常)和转化为AML的风险联合起来的血液 病症的多样化集合。

[1047] 淋巴瘤是从淋巴细胞发育出来的一组血细胞肿瘤。示例性淋巴瘤包括非霍奇金淋巴瘤和 霍奇金淋巴瘤。

[1048] 一方面,本发明涉及治疗具有霍奇金淋巴瘤的哺乳动物的方法,其包括向哺乳动物施用 有效量的表达CD19 CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR分子的细胞和B细胞抑制剂。

[1049] 一方面,本发明的组合物和CART细胞或表达CAR的NK细胞特别可用于治疗B细胞恶性 肿瘤,例如非霍奇金淋巴瘤,例如DLBCL,滤泡淋巴瘤或CLL。

[1050] 非霍奇金淋巴瘤(NHL)是由B或T细胞形成的一组淋巴细胞癌。NHL发生在任何年龄, 并且通常特征是比正常大的淋巴结,体重减轻和发烧。不同类型的NHL被分类为侵略性(快 速增长)和惰性(缓慢生长)类型。B细胞非霍奇金淋巴瘤包括伯基特淋巴瘤,慢性淋巴细 胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡淋巴瘤,免疫母细胞性大细胞淋巴瘤,前体B成淋巴细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。T细胞非霍奇金淋巴瘤的实例包括蕈样真菌病,间变性大细胞淋巴瘤和前体T成淋巴细胞淋巴瘤。在骨髓或 干细胞移植后发生的淋巴瘤通常是B细胞非霍奇金淋巴瘤。参见,例如,Maloney.NEJM.366.21 (2012):2008-16。

[1051] 弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)是一种从B细胞发育的NHL形式。DLBCL是可以在淋巴结或淋巴系统外部例如在胃肠道,睾丸,甲状腺,皮肤,乳腺,骨骼或脑中产生的侵袭性淋巴瘤。细胞形态的三个变型通常在DLBCL中观察到:中心母细胞的,免疫母细胞的和间变的。中心母细胞形态是最常见的,并且具有具最小细胞质的中大型淋巴细胞的外观。DLBCL有几 种亚型。例如,原发性中枢神经系统淋巴瘤是一种仅影响大脑的DLBCL,并且不同于影响大 脑外部区域的DLBCL进行治疗。另一种类型的DLBCL是原发性纵隔B细胞淋巴瘤,其通常发 生在年轻患者中并在胸部迅速生长。DLBCL的症状包括由淋巴结肿大引起的颈部,腋窝或腹 股沟中无痛快速肿胀。对于某些受试者,肿胀可能是痛苦的。DLBCL的其他症状包括盗汗, 无法解释的发烧和体重减轻。虽然大多数DLBCL患者是成年人,但这种疾病有时发生在儿童 中。DLBCL的治疗包括化学疗法(例如环磷酰胺,多柔比星,长春新碱,泼尼松,依托泊苷), 抗体(如Rituxan),放射或干细胞移植。

[1052] 滤泡性淋巴瘤是一种非霍奇金淋巴瘤,是卵泡中心B细胞(中心细胞和中心母细胞)的 淋巴瘤,其具有至少部分滤泡型。滤泡淋巴瘤细胞表达B细胞标志物CD10,CD19,CD20和 CD22。滤泡性淋巴瘤细胞对CD5通常是阴性的。在形态上,滤泡性淋巴瘤肿瘤由含有中心细 胞(也称为裂开的滤泡中心细胞或小细胞)和中心母细胞(也称为大的非裂开的中心细胞或 大细胞)的混合物的滤泡组成。滤泡被非恶性细胞,主要是T细胞包围。滤泡主要含有

中心细 胞,具有少量中心母细胞。世界卫生组织(WHO)在形态上对该疾病进行了如下分级:1级(每 个大功率场(hpf)<5个中心母细胞);2级(6-15个中心母细胞/hpf);3级(>15个中心母细 胞/hpf)。3级进一步细分为以下等级:3A级(仍然存在中心细胞);3B级(滤泡几乎完全由中 心母细胞组成)。滤泡淋巴瘤的治疗包括化疗,例如,烷基化剂,核苷类似物,含蒽环类药 物的方案,例如称为CHOP-环磷酰胺的组合疗法,多柔比星,长春新碱,强的松/泼尼松龙, 抗体(例如利妥昔单抗),放射免疫治疗和造血干细胞移植。

[1053] CLL是一种B细胞恶性肿瘤,其特征在于骨髓,血液,淋巴结和脾脏中的肿瘤细胞增殖和 积累。诊断CLL时的中位年龄约为65岁。目前的治疗包括化疗,放射治疗,生物治疗或骨髓 移植。有时,手术治疗症状(例如,脾切除术去除扩大的脾脏)或通过放射治疗(例如去膨 胀肿大的淋巴结)。用于治疗CLL的化学治疗剂包括例如氟达拉滨,2-氯脱氧腺苷(克拉屈 滨),苯丁酸氮芥,长春新碱,喷司他丁,环磷酰胺,阿仑单抗(Campath-1H),多柔比星 和泼尼松。CLL的生物疗法包括抗体,例如阿仑单抗,利妥昔单抗和奥法木单抗;以及酪氨酸激酶抑制剂疗法。可以使用许多标准来分类CLL的阶段,例如Rai或Binet系统。Rai系统描述了CLL有五个阶段:仅存在淋巴细胞增多的0期;存在淋巴结病的I期;II期,其中存在脾肿大,淋 巴结病或两者;III期,其中存在贫血,器官巨大症或两者(进展由体重减轻,疲劳,发烧,器 官巨大症和淋巴细胞计数快速增加定义);和IV期,其中存在贫血,血小板减少症,器官巨大 症或其组合。在Binet分期系统下,有三类:A期,其中存在淋巴细胞增多症和不到三个淋巴结 增大(这个阶段包括所有Rai 0期患者,一半Rai一期患者,三分之一的Rai II期患者);B期, 其中涉及三个或更多淋巴结;和C期,其中存在贫血或血小板减少症,或两者。这些分类系统 可以与免疫球蛋白基因的突变的测量相组合,以提供疾病状态的更准确的表征。突变的免疫 球蛋白基因的存在与改善的预后相关。

[1054] 在另一个实施方案中,本发明的CAR表达细胞用于治疗癌症或白血病,例如具有白血病 干细胞的白血病。例如,白血病干细胞是$CD34^+/CD38^-$白血病细胞。

[1055] CD20和CD22相关疾病和/或病症

[1056] 本发明尤其提供了用于治疗与CD20或CD22表达相关的疾病的组合物和方法或与表达CD20或CD22的细胞相关的病症,包括例如增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症;或与表 达CD20或CD22的细胞相关的非癌症相关适应证。一方面,与CD22表达相关的癌症是血液癌 症,例如本文所述的血液癌症。

[1057] 还可以包括与CD20或CD22表达相关的非癌症相关适应证。与CD20或CD22表达相关的非 癌症相关适应证包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮,类风湿性关节炎,多发性硬 化症,自身免疫性溶血性贫血,纯红细胞再生障碍,特发性血小板减少性紫癜,埃文斯综合 征,血管炎,大疱性皮肤病,1型糖尿病,干燥综合征,抗NMDA受体脑炎和德维克病,格雷 夫斯眼病和自身免疫性胰腺炎),炎症性病症(过敏和哮喘)和实体器官或造血细胞移植。

[1058] 本文公开的组合物和方法可用于治疗血液疾病,包括但不限于骨髓增生异常,贫血,阵 发性夜间血红蛋白尿,再生障碍性贫血,获得性纯红细胞性贫血,Diamon-Blackfan贫血,范 科尼贫血,血细胞减少,原核血小板减少症,骨髓增生性病症,真性红细胞增多症,原发性 血小板增多症,骨髓纤维化,血红蛋白病,镰状细胞病,β重型地中海贫血等。

[1059] 一方面,本发明提供了治疗与CD22表达相关的疾病的方法。一方面,本发明提供了

治疗 疾病的方法，其中部分肿瘤对于CD20或CD22是阴性的，并且部分肿瘤对于CD20或CD22是阳 性的。例如，本发明的CAR可用于治疗经历与CD20或CD22表达相关疾病的治疗的受试者， 其中经历与CD20或CD22表达相关的治疗的受试者表现出与CD20或CD22表达相关的疾病。

[1060] 一方面，本发明涉及抑制表达CD20或CD22的肿瘤细胞生长的方法，包括使肿瘤细胞与 本发明的CD20或CD22 CAR细胞(例如，T细胞或NK细胞)接触，使得CART响应于抗原被激活并靶向癌细胞，其中肿瘤的生长被抑制。

[1061] 一方面，本发明涉及治疗受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用本发明的CD20 或CD22 CAR表达细胞(例如T细胞或NK细胞)，使得治疗受试者中的癌症。可以通过本发 明的CD20或CD22 CAR表达细胞(例如，T细胞或NK细胞)治疗的癌症的实例是与CD20或CD22表达相关的癌症。可由本发明的CD20或CD22 CAR表达细胞(例如T细胞或NK细胞)治 疗的癌症的实例包括但不限于本文所述的血液癌症。

[1062] 本发明包括一种细胞疗法，其中细胞(例如，T细胞或NK细胞)被遗传修饰以表达嵌合 抗原受体(CAR)，并且CAR表达细胞(例如，T细胞或NK细胞)被输注到需要其的受体。 输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。与抗体治疗不同，CAR修饰的细胞(例如，T细胞 或NK细胞)能够在体内复制，导致长期持续性，其可导致持续的肿瘤控制。在各方面，向患 者施用的细胞(例如，T细胞或NK细胞)或其后代在T细胞施用于患者后在患者中持续至少 四个月，五个月，六个月，七个月，八个月，九个月，十个月，十一个月，十二个月，十三 个月，十四个月，十五个月，十六个月，十七个月，十八个月，十九个月，二十个月，二十 一个月，二十二个月，二十三个月，两年，三年，四年，或五年。

[1063] 本发明还包括一种细胞疗法，其中免疫效应细胞例如NK细胞或T细胞被修饰(例如通过体 外转录的RNA)以瞬时表达嵌合抗原受体(CAR)并将CAR表达(例如，CART或CAR表达NK 细胞)细胞输注入需要其的受体。输注的细胞能够杀死受体中的癌细胞。因此，在各方面， 向患者施用CAR表达细胞，例如T细胞或NK细胞，在对患者施用CAR表达细胞，例如T细胞或NK细胞后存在少于一个月，例如三周，两周，一周。

[1064] 不希望受任何特定理论的束缚，由CAR修饰的细胞(例如，T细胞或NK细胞)引起的抗 肿瘤免疫应答可能是活性或被动免疫应答，或者可能是由于直接对间接免疫应答。一方面， CAR转导的细胞(例如，T细胞或NK细胞)表现出特异性促炎细胞因子分泌和响应于表达CD20 或CD22的人类癌细胞的有效细胞溶解活性，抵抗可溶性CD20或CD22抑制，介导旁观者杀死 和介导已建立的人类肿瘤的消退。例如，CD20或CD22表达肿瘤的异质区域内的少抗原肿瘤 细胞可能容易受到先前针对相邻抗原阳性癌细胞反应的CD20或CD22重定向T细胞的间接破 坏。

[1065] 一方面，本发明的CAR修饰的细胞(例如，T细胞或NK细胞)，例如完全人类CAR表达细胞，可以是哺乳动物中离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。在一个方面，哺乳动物是人。

[1066] 关于离体免疫，在将细胞施用于哺乳动物之前，以下至少一种在体外发生:i)扩增细胞， ii)将编码CAR的核酸引入细胞，或iii)冷冻保存细胞。

[1067] 离体程序在本领域中是众所周知的，并且在下面更全面地讨论。简而言之，从哺乳动物 (例如人)中分离细胞并用表达本文公开的CAR的载体进行遗传修饰(即在体外转导或转染)。CAR修饰的细胞可以施用于哺乳动物受体以提供治疗益处。哺乳动物受体可以是

人,并且CAR 修饰的细胞可以相对于受体是自体的。或者,相对于受体,细胞可以是同种异体的,同基因 的或异种的。

[1068] 造血干细胞和祖细胞的离体扩增方法描述于美国专利号5,199,942,(通过引用并入本文) 可以应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞离体扩 增的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从哺乳动物外周血收集物或 骨髓外植体收集CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2)离体扩增这些细胞。除了美国专利号 5,199,942中描述的细胞生长因子,其他因子如flt3L,IL-1,IL-3和c-kit配体可用于细胞的培养 和扩增。

[1069] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗外,本发明还提供用于体内免疫以引发针对患 者抗原的免疫应答的组合物和方法。

[1070] 通常,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫受损的个体中出现的疾病。 特别地,本发明的CAR修饰的细胞(例如,T细胞或NK细胞)用于治疗与CD20或CD22表达 相关的疾病,病症和状况。在某些方面,本发明的细胞用于治疗具有患与CD20或CD22表达 相关的疾病,病症和状况的风险的患者。因此,本发明提供了治疗或预防与CD20或CD22表 达相关的疾病,病症和状况的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的 CAR-修饰的细胞(例如T细胞或NK细胞)。

[1071] 一方面,本发明的CAR表达细胞可用于治疗增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤,或者是癌前 病症。一方面,与CD20或CD22表达相关的癌症是血液癌症白血病前期,过度增殖性病症, 增生或发育不良,其特征在于细胞异常生长。

[1072] 本发明的CAR修饰的细胞可以单独施用,或可以作为与稀释剂和/或其它成分如IL-2或其 它细胞因子或细胞群组合的药物组合物施用。

[1073] 本发明还涉及抑制增殖或减少表达CD20或CD22的细胞群的方法,所述方法包括将包含 CD20或CD22表达细胞的细胞群与结合CD20或CD22表达细胞的本发明的表达CD20或CD22 CAR的细胞接触。在具体方面,本发明提供了抑制表达CD20或CD22的癌细胞的增殖或减少 其群体的方法,所述方法包括使表达CD20或CD22的癌细胞群体与结合CD20或CD22表达细胞 的本发明的CD20或CD22 CAR表达细胞接触。一方面,本发明提供了抑制表达CD20或CD22 的癌细胞群的增殖或减少该群的方法,所述方法包括使表达CD20或CD22的癌细胞群与结合 CD20或CD22表达细胞的本发明的CD20或CD22 CART接触。在某些方面,相对于阴性对照, 本发明的CD20或CD22 CAR表达细胞将具有B细胞恶性肿瘤或与CD20或CD22表达细胞相关 的另一种癌症的受试者或动物模型中细胞和/或癌细胞的数量,数目,量或百分比减少至少 25%,至少30%,至少40%,至少50%,至少65%,至少75%,至少85%,至少95%或至少 99%。在一方面,受试者是人类。

[1074] 本发明提供了预防与CD20或CD22表达细胞相关的癌症复发的方法,所述方法包括向有 需要的受试者施用结合CD20或CD22表达细胞的本发明的CD20或CD22 CAR表达细胞。在一 个方面,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的结合CD20或CD22表达细胞的本文所 述的CD20或CD22 CAR表达细胞与有效量的另一种疗法的组合。

[1075] 在一些实施方案中,CD22表达细胞表达CD19,CD123,FLT-3,ROR-1,CD79b,CD179b,CD79a,CD10,CD34和/或CD20。在某些实施方案中,CD22表达细胞表达CD19。在一些实施 方案中,CD22表达细胞不表达CD19。在一些实施方案中,CD20表达细胞表达CD19,CD123, FLT-

3,ROR-1,CD79b,CD179b,CD79a,CD10,CD34和/或CD22。在某些实施方案中,CD20 表达细胞表达CD19。在一些实施方案中,CD20表达细胞不表达CD19。

[1076] 在一些实施方案中,受试者是CD19 CAR疗法的非应答者。在一些实施方案中,受试者 是CD19 CAR疗法的部分应答者。在一些实施方案中,受试者是CD19 CAR疗法的完全应答者。 在一些实施方案中,受试者是CD19 CAR疗法的非复发者。在一些实施方案中,受试者是CD19 CAR疗法的部分复发者。在一些实施方案中,受试者是CD19 CAR疗法的完全复发者。

[1077] 在一些实施方案中,先前对CD19 CAR表达细胞治疗有反应的癌症或其他病症不表达 CD19。在一些实施方案中,相对于当癌症或其他病症对用CD19 CAR表达细胞治疗有反应时, 先前对CD19 CAR表达细胞治疗有反应的癌症或其他病症的CD19表达水平具有10%,20%, 30%,40%,50%或更多的降低。在一些实施方案中,先前对用CD19 CAR表达细胞治疗有 反应的癌症或其它病症表达CD20,CD22,CD123或其任何组合。

[1078] 在一些实施方案中,用CD19 CAR表达细胞治疗的癌症或其它病症复发后施用本发明的 CD20或CD22 CAR表达细胞。在一些实施方案中,如本文所述同时施用CD19 CAR表达细胞 和CD20或CD22 CAR表达细胞。

[1079] 骨髓消融

[1080] 一方面,本发明提供骨髓消融的组合物和方法。例如,在一个方面,本发明提供了用于 根除受试者中现有骨髓的至少一部分的组合物和方法。在本文中描述,在某些情况下,包含 本发明的CAR的CD19,C20或CD22 CAR表达细胞根除CD19,C20或CD22阳性骨髓髓细胞祖 细胞。

[1081] 一方面,本发明提供了一种骨髓消融的方法,其包括向需要骨髓消融的受试者施用本发 明的表达CD19,C20或CD22的CAR细胞(例如,T细胞或NK细胞)。例如,本方法可以用于 根除患有疾病或病症的受试者的部分或全部现有骨髓,其中骨髓移植或骨髓修复是有益的治 疗策略。在一个方面,本发明的骨髓消融方法包括在骨髓移植前在受试者中进行本文别处描 述的表达CD19,C20或CD22表达CAR细胞(例如T细胞或NK细胞)的施用。因此,一方面, 本发明的方法提供在骨髓或干细胞移植之前提供了细胞调节方案。一方面,骨髓移植包括移 植干细胞。骨髓移植可以包括自体或同种异体细胞的移植。

[1082] 本发明提供了治疗疾病或病症的方法,其包括施用本发明的表达CD19,C20或CD22的 CAR细胞(例如,T细胞或NK细胞)以根除现有骨髓的至少一部分。该方法可以用作用于治疗其中骨髓移植有益的任何疾病或病症的治疗方案的至少一部分。也就是说,本方法可以用 于需要骨髓移植的任何受试者。一方面,包括施用表达CD19,C20或CD22的CAR细胞(例如T细胞或NK细胞)的骨髓消融可用于治疗AML。在某些方面,通过本发明方法的骨髓消融可用于治疗血液癌,实体瘤,血液病,代谢紊乱,HIV,HTLV,溶酶体储存障碍和免疫缺陷。

[1083] 本文公开的组合物和方法可用于根除现有骨髓的至少一部分以治疗血液癌,包括但不限 于本文所述的癌症,例如白血病,淋巴瘤,骨髓瘤,ALL,AML,CLL,CML,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(例如DLBCL或滤泡淋巴瘤)和多发性骨髓瘤。

[1084] 一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,其包括骨髓调节,其中受试者的至少一部 分骨髓被本发明的CD22 CAR细胞(例如T细胞或NK细胞)根除。例如,在某些情况下,受试者的骨髓包含恶性前体细胞,其可通过C20或CD22 CAR细胞(例如T细胞或NK细胞)的活性靶向和消除。在一个方面,骨髓调节疗法包括在根除天然骨髓后对受试者施用骨髓或干

细 胞移植物。在一个方面，骨髓再调节疗法与一种或多种其它抗癌疗法组合，所述其它抗癌疗 法包括但不限于抗肿瘤CAR疗法，化学疗法，辐射等。

[1085] 一方面，在输注骨髓或干细胞移植之前，可能需要根除施用的CD19，CD20或CD22 CAR 表达细胞。可以使用任何合适的策略或治疗来实现CD19，CD20或CD22表达CAR细胞(例如， T细胞或NK细胞)的消除，包括但不限于使用自杀基因，使用RNA编码的CAR的有限CAR持久性，或抗T细胞模式，包括抗体或化疗。

[1086] 组合疗法

[1087] 本文所述的CAR的组合(例如，本文所述的表达CD20 CAR，CD22 CAR或CD19 CAR的细胞，例如和一种或多种B细胞抑制剂，例如本文所述)可以与其他已知的活性剂和疗法组合使用。

[1088] 可以同时，在相同或分开的组合物中，或顺序地施用本文所述的CAR表达细胞(例如CD20 CAR，CD22 CAR或CD19 CAR表达细胞)，任选地一种或多种B细胞抑制剂和/或至少一种另 外的治疗剂。对于顺序施用，可以首先施用本文所述的CAR表达细胞(例如CD20 CAR，CD22 CAR或CD19 CAR表达细胞)，并且可以其次施用另外的活性剂，或者施用的次序可以颠倒。

[1089] CAR的疗法和/或其它治疗剂(例如第二CAR疗法)，程序或形式可在活动病症的周期期 间或疾病缓解或更少活动疾病期间给药。CAR疗法可以在其它治疗之前，与其他治疗同时、治疗后或在病症的缓解期间给药。

[1090] 例如，在一些实施方案中，将CAR疗法施用于具有与CD19，CD20或CD22表达相关的疾 病(例如癌症)的受试者。可以测定受试者的应答性或复发指标。在一些实施方案中，当受 试者显示复发的一个或多个迹象时，例如CD19中的移码和/或过早终止密码子时，施用另外 的疗法。在实施方案中，另外的疗法是B细胞抑制剂。CD19疗法可以继续进行(例如，当在 受试者中仍然存在可检测的一些表达CD19的癌细胞时)或可能被停止(例如，当风险-收益分析有利于停止疗法时)。

[1091] 当组合给药时，CAR疗法和另外的活性剂(例如，第二或第三活性剂)，或全部，的给药 量或剂量高于、低于或等于各活性剂单独使用例如，作为单一疗法的量或剂量。在某些实施 方案中，CAR疗法、另外的活性剂(例如，第二或第三剂)或全部所施用的量或剂量低于(如， 至少20％，至少30％，至少40％，或至少50％)各活性剂单独使用例如，作为单一疗法的量或 剂量。在其他实施方案中，CAR疗法、另外的活性剂(例如，第二或第三剂)或全部导致所希 望的效果(例如，治疗癌症)的量或剂量低于(如，低至少20％，至少30％，至少40％，或至少50％) 各活性剂单独使用例如，作为单一疗法实现相同的治疗效果所需的量或剂量。

[1092] 在实施方案中，组合疗法中的一种或多种治疗剂是抗体分子。可以用单克隆抗体疗法靶 向癌症抗原。已经显示单克隆抗体(mAb)疗法通过多种机制发挥强大的抗肿瘤作用，包括 补体依赖性细胞毒性(CDC)，抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和对过表达靶标分子的肿瘤 细胞的直接细胞抑制或凋亡诱导作用。

[1093] 在另外的方面，本文所述的CAR表达细胞(例如，CD20 CAR，CD22 CAR或CD19 CAR表达细胞，任选地与一种或多种B细胞抑制剂组合)的组合可以与以下组合用于治疗方案中： 手术，化疗，放射，mTOR途径抑制剂，免疫抑制剂，如环孢菌素，硫唑嘌呤，甲氨蝶呤， 霉

酚酸酯和FK506,抗体或其他免疫消蚀剂如CAMPATH,抗CD3抗体或其他抗体疗法, cytoxin,氟达拉滨,环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228,细胞因子 和放射,肽疫苗,如Izumoto et al.2008J Neurosurg 108:963-971中所述。

[1094] 在一个实施方案中,本文所述的CD19,CD20或CD22 CAR表达细胞(例如和一种或多种 B细胞抑制剂)的组合可以与化学治疗剂组合使用。示例性的化学治疗剂包括蒽环类(例如, 多柔比星(例如,脂质体多柔比星))、长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱、长春地辛、长 春瑞滨)、烷化剂(例如,环磷酰胺、达可巴嗪、美法仑、异环磷酰胺、替莫唑胺)、免疫细胞 抗体(例如,alemtuzamab、吉姆单抗、利妥昔单抗(rituximab)、托西莫单抗(tositumomab))、抗 代谢药(包括,例如叶酸拮抗药、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如氟达拉 滨))、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉 霉素A、胶霉毒素或硼替佐米)、免疫调节剂比如沙立度胺或沙立度胺衍生物(例如来那度胺 (lenalidomide))。

[1095] 考虑用于组合疗法的一般化疗剂包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(bicalutamide) (Casodex®)、硫酸博来霉素盐(bleomycin sulfate)(Blenoxane®)、白消安(busulfan)(Myleran®)、白消安注射剂(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脱氧-5-氟胞嘧啶核苷、 卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈 滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖胞苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(Actinomycin D, Cosmegan)、柔红霉素盐酸盐(Cerubidine®)、柔红霉素柠檬酸盐脂质体注射剂(DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛(Taxotere®)、多柔比星盐酸盐(Adriamycin®, Rubex®)、依托泊苷 (Vepesid®)、氟达拉滨磷酸盐(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®, Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、 tezacitibine、吉西他滨(二氟脱氧胞嘧啶核苷(difluorodeoxycitidine))、羟基脲(Hydrea®)、伊达 比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、依立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶 (ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤 (Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、nab-紫杉醇 (Abraxane®), phoenix(Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生(polifeprosan)20与卡莫司 汀植入物(Gliadel®)、枸橼酸它莫西芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-硫代鸟嘌呤、 塞替派(thiotepa)、替拉扎明(tirapazamine)(Tirazone®)、用于注射的托泊替康盐酸盐 (Hycamptin®)、长春碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)。

[1096] 用本文所述的化学治疗剂和表达CAR分子的细胞的组合的治疗可用于治疗本文所述的血 液癌症,例如AML。在实施方案中,化学治疗剂和CAR表达细胞的组合可用于靶向(例如杀 死)例如在具有AML的受试者中的癌干细胞,例如白血病干细胞。在实施方案中,化学治疗 剂和CAR表达细胞的组合可用于治疗最小残留疾病(MRD)。MRD是指在治疗期间,例如化 疗或治疗后保留在受试者中的少数癌细胞。MRD通常是复发的主要原因。本发明提供了一种 治疗癌症,例如MRD的方法,其包括与例如本文所述的CAR表达细胞组合施用化学治疗

剂。

[1097] 在一个实施方案中,在施用表达CAR分子(例如本文所述的CAR分子)的细胞之前施用 化学治疗剂。在需要多于一次施用化学治疗剂的化疗方案中,化疗方案在施用表达CAR分子 (例如本文所述的CAR分子)的细胞之前开始或完成。在实施方案中,在施用表达CAR分子 的细胞之前至少1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13 天,14天,15天,20天,25天或30天施用化学治疗剂。在实施方案中,在施用表达CAR分子 的细胞之前至少1天,2天,3天,4天,5天,6天,7天,8天,9天,10天,11天,12天,13 天,14天,15天,20天,25天或30天开始或完成化疗方案。在实施方案中,化学治疗剂是例 如与正常细胞或非癌细胞上的表达相比,增加癌细胞例如肿瘤细胞上CD19,CD20或CD22表 达的化学治疗剂。表达可以通过例如免疫组织化学染色或流式细胞术分析来确定。例如,化 学治疗剂是阿糖胞苷(Ara-C)。

[1098] 与本发明化合物组合的特别感兴趣的抗癌剂包括:抗代谢物;抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷 酸酶或p70S6激酶(FK506)或抑制p70S6激酶的药物;烷基化剂;mTOR抑制剂;免疫调节剂; 蒽环类药物;长春花生物碱;蛋白质体抑制剂;GITR激动剂;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;CDK4 激酶抑制剂;BTK激酶抑制剂;MKN激酶抑制剂;DGK激酶抑制剂;或溶瘤病毒。

[1099] 示例性抗代谢物包括但不限于叶酸拮抗剂(本文中也称为抗叶酸剂),嘧啶类似物,嘌 呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤(Rheumatrex®, Trexall®),5-氟尿嘧啶(Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®),氟尿苷(FUDF®),阿糖胞苷(Cytosar-U®,Tarabine PFS),6-巯基嘌呤 (Puri-Nethol®)),6-硫鸟嘌呤(ThioguanineTabloid®),磷酸氟达拉滨(Fludara®),喷司他丁 (Nipent®),培美曲塞(Alimta®),雷替曲塞(Tomudex®),克拉屈滨(Leustatin®),氯法拉滨 (Clofarex®, Clolar®),巯嘌呤(Puri-Nethol®),卡培他滨(Xeloda®),奈拉滨(Arranon®),氮杂 胞苷(Vidaza®)和吉西他滨(Gemzar®)。优选的抗代谢物包括例如5-氟尿嘧啶(Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®),氟尿苷(FUDF®),卡培他滨(Xeloda®),培美曲塞(Alimta®),雷替曲 塞(Tomudex®)和吉西他滨(Gemzar®)。

[1100] 示例性的烷化剂包括,不限于:氮芥(nitrogen mustards)、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、 亚硝基脲和三氮烯):尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®,Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®)、氮芥(chlormethine)(Mustargen®)、环磷酰胺(Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™)、异环磷酰胺 (Mitoxana®),美法仑(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(pipobroman)(Amedel®, Vercyte®)、三乙撑三聚氰胺(triethylenemelamine)(Hemel®, Hexalen®, Hexastat®)、三乙撑硫 代磷酰胺(triethylenethiophosphoramine)、替莫唑胺(Temodar®)、塞替派(Thioplex®)、白消安 (Busilvex®, Myleran®)、卡莫司汀(BiCNU®)、洛莫司汀(CeeNU®)、链佐星(streptozocin) (Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。另外的示例性的烷化剂包括,不限于奥沙利铂 (Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和Temodal®);更生霉素(也称为放线菌素-D,Cosmegen®); 美法仑(也称为L-

PAM、L-溶肉瘤素和苯基丙氨酸氮芥，Alkeran®)；六甲蜜胺(也称为六甲蜜 胺(HMM)，Hexalen®)；卡莫司汀(BiCNU®)；苯达莫司汀(Bendamustine)(Treanda®)；白消安 (Busulfex®和Myleran®)；卡铂(Paraplatin®)；洛莫司汀(也称为CCNU，CeeNU®)；顺铂(也称为CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ)；苯丁酸氮芥(Leukeran®)；环磷酰胺(Cytoxan®和Neosar®)；达卡巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺、DTIC-Dome®)；六甲蜜胺(也称为六甲蜜胺(HMM)，Hexalen®)；异环磷酰胺(Ifex®)；Prednumustine；丙卡巴肼(Matulane®)；氮芥(Mechlorethamine)(也称为氮芥(nitrogen mustard)、氮芥(mustine)和甲氯乙胺(mechloroethamine) 盐酸盐、Mustargen®)；链佐星(Zanosar®)；塞替派(也称为硫代磷酰胺(thiophosphoamide)、 TESPA和TSPA，Thioplex®)；环磷酰胺(Endoxan®，Cytoxan®，Neosar®，Procytox®，Revimmune®)；和苯达莫司汀HCl (Treanda®)。

[1101] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与氟达拉滨，环磷酰胺，和/或利妥昔单抗组合 施用于受试者。在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与氟达拉滨，环磷酰胺，利妥昔单 抗(FCR)组合施用于受试者。在实施方案中，受试者患有CLL。例如，该受试者具有在第17 号染色体的短臂中的缺失(del(17p)，例如，在白血病细胞中)。在其它实例中，受试者不具有 del(17p)。在实施方案中，所述受试者包括包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中的突 变的白血病细胞。在其他实施方案中，受试者不包括包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基 因中的突变的白血病细胞。在实施方案中，氟达拉滨以约10-50mg/m^2(例如约10-15，15-20， 20-25，25-30，30-35，35-40，40-45，或45-50mg/m^2)的剂量例如，静脉内施用。在实施方案中， 环磷酰胺以约200-300mg/m^2例如，约200-225，225-250，250-275，或275-300mg/m^2)的剂量例 如，静脉内施用。在实施方案中，利妥昔单抗以约400-600mg/m^2(例如，400-450，450-500， 500-550，或550-600mg/m^2)的剂量例如，静脉内施用。

[1102] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与苯达莫司汀和利妥昔单抗组合施用给受试者。 在实施方案中，受试者患有CLL。例如，该受试者具有在第17号染色体的短臂中的缺失 (del(17p)，例如，在白血病细胞中)。在其它实例中，受试者不具有del(17p)。在实施方案中， 所述受试者包括包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中的突变的白血病细胞。在其他实 施方案中，受试者不包括包含在免疫球蛋白重链可变区(IgV_H)基因中的突变的白血病细胞。 在实施方案中，苯达莫司汀以约70-110mg/m2(例如，70-80，80-90，90-100，或100-110mg/m2) 的剂量例如，静脉内施用。在实施方案中，利妥昔单抗在约400-600mg/m2例如，400-450， 450-500，500-550，或550-600mg/m^2)的剂量例如，静脉内施用。

[1103] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与利妥昔单抗，环磷酰胺，多柔比星，长春新 碱和/或皮质类固醇(例如，泼尼松)组合施用于受试者。在实施方案中，本文所述的CAR表达 细胞与利妥昔单抗，环磷酰胺，多柔比星，长春新碱和泼尼松(R-CHOP)组合施用于受试者。 在实施方案中，受试者患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在实施方案中，受试者具有非笨 重限制阶段(nonbulky limited-stage)DLBCL(例如，包含具有小于7cm的尺寸/直径的肿瘤)。在 实施方案中，受试者用辐射与R-CHOP组合治疗。例如，向受试者施用R-CHOP(例如，1-6次 循环，例如，1，2，3，4，5，或6个周期的R-CHOP)，随后辐射。在某些情况下，给予受试 者R-CHOP(例如，1-6次循环，例如，1，2，3，4，5，或6个周期的R-CHOP)，接着辐射。

[1104] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与依托泊苷，泼尼松，长春新碱，环磷酰胺，阿霉素，和/或利妥昔单抗组合施用于受试者。在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与依 托泊苷，泼尼松，长春新碱，环磷酰胺，阿霉素，和利妥昔单抗(EPOCH-R)的组合施用于受 试者。在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与剂量调整的EPOCH-R(DA-EPOCH-R)组合施用于受试者。在实施方案中，受试者具有B细胞淋巴瘤，例如，Myc重排的侵袭性B细胞淋巴瘤。

[1105] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与利妥昔单抗和/或来那度胺组合施用于受试 者。来那度胺((RS)-3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-2H-异吲哚-2-基)哌啶-2,6-二酮)是一种免疫调节 剂。在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与利妥昔单抗和来那度胺组合施用于受试者。 在实施方案中，受试者具有滤泡性淋巴瘤(FL)或套细胞淋巴瘤(MCL)。在实施方案中，受试 者具有FL并且先前未用癌症疗法治疗。在实施方案中，来那度胺以约10-20毫克(例如，10-15 或15-20毫克)的剂量每天给药。在实施方案中，利妥昔单抗以约350-550mg/m^2(例如，350-375, 375-400，400-425，425-450，450-475，或475-500mg/m^2)的剂量例如，静脉内给药。

[1106] 示例性的mTOR抑制剂包括例如坦罗莫司；ridaforolimus(以前称作deferolimus，((1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18- 二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂 三环[30.3.1.$0^{4,9}$]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基次膦酸酯，也 称为AP23573和MK8669，并在PCT公开号WO 03/064383中描述)；依维莫司(Afinitor®或 RAD001)；雷帕霉素(AY22989，Sirolimus®)；simapimod(CAS 164301-51-3)；emsirolimus(5- (2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055)； 2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d] 嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502，CAS 1013101-36-4)；和N^2-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯 基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酰基甘氨酰-L-α-天冬氨酰L-丝氨 酸，内盐(SF1126，CAS 936487-67-1)(SEQ ID NO:1316)和XL765。

[1107] 示例性的免疫调节剂包括例如afutuzumab(可从Roche®购得)；培非司亭(Neulasta®)；来那度胺(CC-5013，Revlimid®)；沙利度胺(Thalomid®)，actimid(CC4047)；和IRX-2(包 括白细胞介素1，白细胞介素2和干扰素γ的人类细胞因子的混合物，CAS 951209-71-5，可得 自IRX Therapeutics)。

[1108] 示例性的蒽环类包括例如多柔比星(Adriamycin®和Rubex®)；博来霉素(lenoxane®)；柔红霉素(盐酸多柔比星，道诺霉素和柔红霉素盐酸盐，Cerubidine®)；柔红霉素脂质体(柔 红霉素柠檬酸脂质体，DaunoXome®)；米托蒽醌(DHAD，Novantrone®)；表柔比星(Ellence™)； 伊达比星(Idamycin®，IdamycinPFS®)；丝裂霉素C(Mutamycin®)；格尔德霉素；除莠霉素； ravidomycin；和去乙酰ravidomycin。

[1109] 示例性长春花生物碱包括例如酒石酸长春瑞滨(Navelbine®)，长春新碱(Oncovin®)，和 长春地辛(Eldisine®))；长春碱(也称硫酸长春碱，长春碱和VLB，

Alkaban-AQ®和Velban®)；和长春瑞滨(Navelbine®)。

[1110] 示例性的蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(Velcade®);carfilzomib(PX-171-007,(S)-4- 甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊-2-基)氨基)-1-氧代 -3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-吗啉代乙酰氨基)-4-苯基丁酰氨基)-戊酰胺);marizomib (NPI-0052);柠檬酸ixazomib(MLN-9708);delanzomib(CAN-18770);和O-甲基-N-[(2-甲 基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酰基-O-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯 基甲基)乙基]-L-丝氨酰胺(ONX-0912)。

[1111] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与brentuximab组合施用于受试者。Brentuximab是抗-CD30抗体和单甲基auristatin E的抗体-药物缀合物。在实施方案中,受试者 具有霍奇金淋巴瘤(HL),例如,复发性或难治性HL。在实施方案中,所述受试者包含CD30+HL。 在实施方案中,受试者已经经历了自体干细胞移植(ASCT)。在实施方案中,受试者没有经历 ASCT。在实施方案中,brentuximab以约1-3mg/kg(例如约1-1.5,1.5-2,2-2.5,或2.5-3mg/kg) 的剂量给药,例如,静脉内,例如,每3周。

[1112] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与brentuximab和达卡巴嗪或与brentuximab和苯 达莫司汀组合施用于受试者。达卡巴嗪是一种烷化剂,化学名称是5-(3,3-二甲基-1-三氮烯基) 咪唑-4-甲酰胺。苯达莫司汀是一种烷基化剂,化学名称是4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基苯 并咪唑-2-基]丁酸。在实施方案中,受试者具有霍奇金淋巴瘤(HL)。在实施方案中,受试者先 前未用癌症疗法治疗。在实施方案中,受试者是至少60岁,例如,60,65,70,75,80,85岁或更 老。在实施方案中,达卡巴嗪以约300-450mg/m^2(例如约300-325,325-350,350-375,375-400, 400-425,或425-450mg/m^2)的剂量例如,静脉内给药。在实施方案中,苯达莫司汀以约75-125 mg/m2(例如,75-100或100-125mg/m^2,例如,约90mg/m^2)的剂量例如,静脉内给药。在实施 方案中,brentuximab以约1-3mg/kg(例如,约1-1.5,1.5-2,2-2.5,或者2.5-3mg/kg)的剂量给药, 例如,静脉内,例如,每3周。

[1113] 在一些实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与CD20抑制剂,例如,抗CD20抗体(例如, 抗CD20单-或双特异性抗体)或其片段组合施用于受试者。示例性抗CD20抗体包括但不限于利 妥昔单抗,奥法木单抗,奥瑞珠单抗,veltuzumab,obinutuzumab,TRU-015(Trubion Pharmaceuticals),ocaratuzumab和Pro131921(Genentech)。见,例如,Lim et al.Haematologica. 95.1(2010):135-43。

[1114] 在一些实施方案中,所述抗CD20抗体包含利妥昔单抗。利妥昔单抗是嵌合小鼠/人单克 隆抗体IgG1κ,其结合CD20并且使CD20表达细胞溶解,如在www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf所述。在实施方案中,本 文所述的CAR表达细胞与利妥昔单抗组合施用于受试者。在实施方案中,受试者具有CLL或 SLL。

[1115] 在一些实施方案中,利妥昔单抗静脉内施用,例如作为静脉内输注。例如,每次输注提 供约500-2000mg(例如约5500-550,550-600,600-650,650-700,700-750,750-800,800-850, 850-900,900-950,950-1000,1000-1100,1100-1200,1200-1300,1300-1400,1400-1500, 1500-1600,1600-1700,1700-1800,1800-1900,或1900-2000mg)的利妥昔单抗。在一些实施 方案中,利妥昔单抗以150mg/m^2到750mg/m^2,例如,约150-175mg/m^2,175-200mg/m^2, 200-225mg/m^2,225-250mg/m^2,250-300mg/m^2,300-325mg/m^2,325-350mg/m^2,350-

375mg/m^2, 375-400mg/m^2,400-425mg/m^2,425-450mg/m^2,450-475mg/m^2,475-500mg/m^2,500-525mg/m^2, 525-550mg/m^2,550-575mg/m^2,575-600mg/m^2,600-625mg/m^2,625-650mg/m^2,650-675mg/m^2, 或675-700mg/m^2的剂量施用,其中m^2表示受试者的体表面积。在一些实施方案中,利妥昔 单抗以至少4天,例如4,7,14,21,28,35天或更长时间的给药间隔施用。例如,利妥昔单抗以 至少0.5周,例如0.5,1,2,3,4,5,6,7,8周或更长时间的给药间隔施用。在一些实施方案中, 利妥昔单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时间,例如至少2周,例如至少2,3,4,5,6, 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20周或更长。例如,利妥昔单抗以本文所述的剂量 和给药间隔施用,每个治疗周期总共至少4个剂量(例如,每个治疗周期至少4,5,6,7,8,9,10, 11,12,13,14,15,16或更多剂量)。

[1116] 在一些实施方案中,抗-CD20抗体包含奥法木单抗。奥法木单抗是分子量约149kDa的抗 CD20IgG1κ人单克隆抗体。例如,使用转基因小鼠和杂交瘤技术产生奥法木单抗,并从重组 鼠细胞系(NS0)中表达和纯化。参见例如 www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf;和临床试验标识号 NCT01363128,NCT01515176,NCT01626352和NCT01397591。在实施方案中,将本文所述 的CAR表达细胞与奥法木单抗组合施用于受试者。在实施方案中,受试者具有CLL或SLL。

[1117] 在一些实施方案中,奥法木单抗作为静脉内输注施用。例如,每次输注提供约150-3000mg (例如约150-200,200-250,250-300,300-350,350-400,400-450,450-500,500-550,550-600, 600-650,650-700,700-750,750-800,800-850,850-900,900-950,950-1000,1000-1200, 1200-1400,1400-1600,1600-1800,1800-2000,2000-2200,2200-2400,2400-2600,2600-2800,或 2800-3000mg)的奥法木单抗。在实施方案中,奥法木单抗以约300毫克的起始剂量施用,随 后2000毫克,例如,约11次剂量,例如,24周。在一些实施方案中,奥法木单抗以至少4天, 例如,4,7,14,21,28,35天,或更长的给药间隔给药。例如,奥法木单抗以至少1周,例如,1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,24,26,28,20,22,24,26,28,30周,或更长 的给药间隔施用。在一些实施方案中,奥法木单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用一段时 间,例如,至少1周,例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,24, 26,28,30,40,50,60周或更长,或1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12个月或以上,或1,2,3,4, 5年或以上。例如,奥法木单抗以本文所述的剂量和给药间隔施用,每个治疗周期共至少2个 剂量(例如,每个治疗周期至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,20或更多个剂 量)。

[1118] 在一些情况下,所述抗CD20抗体包含奥瑞珠单抗。奥瑞珠单抗是人源化抗CD20单克隆 抗体,例如,如在临床试验标识符号NCT00077870,NCT01412333,NCT00779220,NCT00673920,NCT01194570,和Kappos et al.Lancet.19.378(2011):1779-87所述。

[1119] 在一些情况下,抗CD20抗体包含veltuzumab。Veltuzumab是针对CD20的人源化单克隆 抗体。参见例如临床试验标识号NCT00547066,NCT00546793,NCT01101581和Goldenberg et al.Leuk Lymphoma.51(5)(2010):747-55。

[1120] 在一些情况下,所述抗CD20抗体包含GA101。GA101(也称为obinutuzumab或RO5072759)是人源化和糖工程化抗CD20单克隆抗体。见,例如,Robak.Curr.Opin.Investig. Drugs.10.6(2009):588-96;临床试验标识号:NCT01995669,NCT01889797,NCT02229422,和NCT01414205;和www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_

docs/label/2013/125486s000lbl.pdf。

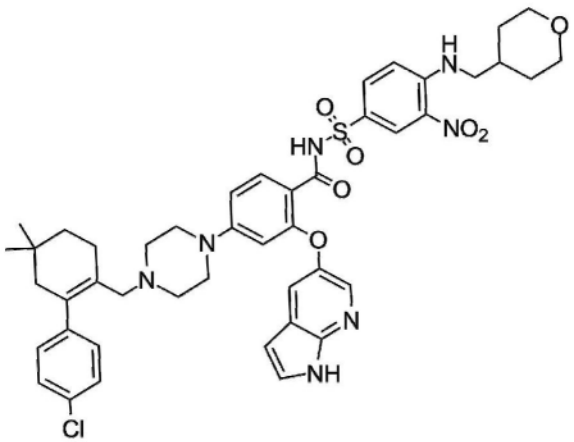
[1121] 在一些情况下,所述抗CD20抗体包含AME-133v。AME-133v(也称为LY2469298或ocaratuzumab)是针对CD20的人源化IgG1单克隆抗体,与利妥昔单抗相比,对Fcγ RIIIa受体具 有增加的亲和力和增强的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。见,例如,Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25;和Forero-Torres et al.Clin Cancer Res.18.5(2012):1395-403。

[1122] 在一些情况下,所述抗CD20抗体包含PRO131921。PRO131921是工程化成具有与利妥昔 单抗相比对Fcγ RIIIa的更好的结合和增强的ADCC的人源化抗CD20单克隆抗体。见,例如, Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25;and Casulo et al.Clin Immunol.154.1(2014):37-46;和临 床试验标识号NCT00452127。

[1123] 在一些情况下,抗-CD20抗体包含TRU-015。TRU-015是衍生自抗CD20的抗体的结构域的抗CD20融合蛋白。TRU-015小于单克隆抗体,但保留Fc介导的效应子功能。参见,例 如,Robak et al.BioDrugs 25.1(2011):13-25。TRU-015含有与人IgG1铰链,CH2和CH3结构 域连接但不含CH1和CL结构域的抗CD20单链可变片段(scFv)。

[1124] 在一些实施方案中,本文所述的抗CD20抗体与治疗剂缀合或以其他方式结合,所述治 疗剂为例如化学治疗剂(例如,环磷酰胺,氟达拉滨,组蛋白脱乙酰酶抑制剂,去甲基化剂, 肽疫苗,抗肿瘤抗生素,酪氨酸激酶抑制剂,烷化剂,抗微管或抗有丝分裂剂),抗过敏剂, 抗恶心剂(或抗呕吐药),止痛药或细胞保护剂。

[1125] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与B细胞淋巴瘤2(BCL-2)抑制剂(例如,venetoclax,也称为ABT-199或GDC-0199)和/或利妥昔单抗组合施用于受试者。在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与venetoclax和利妥昔单抗组合施用于受试者。Venetoclax是一种抑制抗细胞凋亡蛋白BCL-2的小分子。venetoclax(4-(4-{[2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1- 烯-1-基]甲基}哌嗪-1-基)-N-({3-硝基-4-[(四氢-2H-吡喃-4-基甲基)氨基]苯基}磺酰基)-2-(1H-吡 咯并[2,3-b]吡啶-5-基氧基)苯甲酰胺)的结构如下所示。

[1126] 

[1127] 在实施方案中,受试者患有CLL。在实施方案中,受试者患有复发的CLL,例如, 受试者先前已经施用了癌症疗法。在实施方案中,venetoclax以约15-600mg(例如,15-20,20-50,50-75,75-100,100-200,200-300,300-400,400-500,或500-600mg)的剂量例如,每天施 用。在实施方案中,利妥昔单抗以约350-550mg/m2(例如,350-375,375-400,400-425,425-450, 450-475,或475-500mg/m2)的剂量给药,例如,静脉注射,例如,每月。

[1128] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种CAR表达细胞与溶瘤病毒组合施用。在实施 方案中,溶瘤病毒能够选择性地复制并触发癌细胞的死亡或减缓癌细胞的生长。在一些情况 下,溶瘤病毒对非癌细胞没有作用或具有最小的作用。溶瘤病毒包括但不限于溶瘤腺病毒, 溶瘤单纯疱疹病毒,溶瘤性逆转录病毒,溶瘤性细小病毒,溶瘤痘苗病毒,溶瘤Sinbis病毒, 溶瘤流感病毒,或溶瘤性RNA病毒(例如,溶瘤呼肠孤病毒,溶瘤性新城疫病毒(NDV),溶瘤 性麻疹病毒或溶瘤性水泡性口炎病毒(VSV))。

[1129] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是US2010/0178684A1(其通过引用整体并入本文)中描述的 病毒,例如重组溶瘤病毒。在一些实施方案中,重组溶瘤病毒包含编码免疫或炎症反应抑制 剂的核酸序列(例如,异源核酸序列),例如US2010/0178684A1中所述,其通过引用整体并入 本文。在实施方案中,重组溶瘤病毒例如溶瘤性NDV包含促凋亡蛋白(例如凋亡蛋白),细胞 因子(例如GM-CSF,干扰素-γ,白细胞介素-2(IL-2),肿瘤坏死因子α),免疫球蛋白(例如针对 ED-B纤连蛋白的抗体),肿瘤相关抗原,双特异性接头蛋白(例如针对NDV HN蛋白的双特异 性抗体或抗体片段和T细胞共刺激受体,例如CD3或CD28;或人IL-2与针对NDV HN蛋白的单 链抗体之间的融合蛋白)。参见,例如,Zamarin et al.Future Microbiol.7.3(2012):347-67,通过 引用将其全部内容并入本文。在一些实施方案中,溶瘤病毒是US 8591881 B2,US 2012/0122185 A1,或US 2014/0271677 A1(其各自通过引用整体并入本文)中描述的嵌合性溶 瘤性NDV。

[1130] 在一些实施方案中,溶瘤病毒包含条件性复制型腺病毒(CRAd),其被设计为专门在癌细 胞中复制。参见,例如,Alemany et al.Nature Biotechnol.18(2000):723-27。在一些实施方案 中,溶瘤腺病毒包含Alemany等人(其全部内容通过引用并入本文)的第725页的表1中所述的腺 病毒。

[1131] 示例性溶瘤病毒包括但不限于以下:

[1132] B组溶瘤腺病毒(ColoAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(参见例如Clinical Trial Identifier:NCT02053220);

[1133] ONCOS-102(以前称为CGTG-102),其是包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的 腺病毒(Oncos Therapeutics)(参见例如Clinical Trial Identifier:NCT01598129);

[1134] VCN-01,其是编码人PH20透明质酸酶的遗传修饰的溶瘤人腺病毒(VCN Biosciences, S.L.)(参见例如Clinical Trial Identifiers:NCT02045602和NCT02045589);

[1135] 条件性复制型腺病毒ICOVIR-5,其是来源于野生型人腺病毒血清型5(Had5)的病毒,已 被修饰以在具有失调的成视网膜细胞瘤/E2F途径的癌细胞中选择性复制(Institut Català d'Oncologia)(见,例如临床试验标识符:NCT01864759);

[1136] Celyvir,其包含感染有溶瘤腺病毒ICOVIR5的骨髓衍生的自体间充质干细胞(MSC)(Hospital Infantil Universitario Niño Jesús,Madrid,Spain/Ramon Alemany)(参见例如临床 试验标识符:NCT01844661);

[1137] CG0070,其是条件性复制溶瘤血清型5腺病毒(Ad5),其中人E2F-1启动子驱动必需E1a 病毒基因的表达,从而限制病毒复制和对Rb途径缺陷型肿瘤细胞的细胞毒性((Cold Genesys, Inc.)(参见,例如,临床试验标识符:NCT02143804);或

[1138] DNX-2401(以前称为Delta-24-RGD),其是已经工程化以在视网膜母细胞瘤(Rb)-途径缺陷 型细胞中选择性复制并且更有效地感染表达某些RGD结合整联蛋白的细胞的腺病毒(Clinica Universidad de Navarra,Universidad de Navarra/DNAtrix,Inc.)(参见例如临床试验标识 符:NCT01956734)。

[1139] 在一些实施方案中,本文所述的溶瘤病毒通过注射,例如皮下,动脉内,静脉内,肌内, 鞘内或腹膜内注射施用。在实施方案中,本文所述的溶瘤病毒通过肿瘤内,经皮,经粘膜, 口服,鼻内或经肺施用途径施用。

[1140] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与减少Treg细胞群的分子组合施用于受 试者。减少Treg细胞的数量(例如,消耗)的方法在本领域中是已知的,并且包括,例如,CD25 消耗,环磷酰胺给药,调节GITR功能。不希望受理论的束缚,但据信在单采血液成分术前或 施用所述的CAR表达细胞前,降低受试者中Treg细胞的数目减少了肿瘤微环境中不希望的免 疫细胞(例如,Treg细胞)的数目并降低了受试者复发的风险。

[1141] 在一个实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与减少Treg细胞群体的分子组合施用于 受试者。减少(例如,消耗)Treg细胞的数目的方法是本领域已知的,并且包括例如CD25消 耗,环磷酰胺施用和调节GITR功能。不希望受理论束缚,认为在单采血液成分术前或在施用 本文所述的表达CAR的细胞之前减少受试者中的Treg细胞的数目减少了肿瘤微环境中不想要 的免疫细胞(例如,Treg)的数目,并且降低受试者的复发风险。在一个实施方案中,本文 所述的CAR表达细胞与靶向GITR和/或调节GITR功能的分子,例如GITR激动剂和/或消耗调节 性T细胞(Treg)的GITR抗体组合施用于受试者。在一个实施方案中,本文所述的CAR表达 细胞与环磷酰胺组合施用于受试者。在一个实施方案中,在CAR表达细胞之前施用GITR结合 分子和/或调节GITR功能的分子(例如GITR激动剂和/或Treg消耗GITR抗体)。例如,在一个 实施方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。在实施方案中,在施用(例 如,输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血液成分术之前将环磷酰胺施用于受 试者。在实施方案中,在施用(例如,输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血 液成分术之前,将环磷酰胺和抗GITR抗体施用于受试者。在一个实施方案中,受试者具有癌 症(例如,实体癌症或诸如ALL或CLL的血液癌症)。在一个实施方案中,受试者具有CLL。 在实施方案中,受试者具有实体癌症,例如本文所述的实体癌症。

[1142] 在一个实施方案中,将本文所述的CD19 CAR表达细胞和本文所述的一种或多种B细胞抑 制剂的组合与本文所述的GITR激动剂,例如GITR激动剂组合施用于受试者。在一个实施方 案中,GITR激动剂在CAR表达细胞例如表达CD19 CAR的细胞之前施用。例如,在一个实施 方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。在一个实施方案中,受试者具 有CLL。

[1143] 在一个实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与GITR激动剂(例如本文所述的GITR 激动剂)组合施用于受试者。在一个实施方案中,在CAR表达细胞之前施用GITR激动剂。例 如,在一个实施方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。

[1144] 示例性的GITR激动剂包括例如GITR融合蛋白和抗-GITR抗体(例如,二价抗GITR抗体), 比如例如美国专利号:6,111,090、欧洲专利号:090505B1、美国专利号:8,586,023、PCT公开号: WO 2010/003118和2011/090754中描述的GITR融合蛋白,或例如在美国专利号:7,025,962、欧洲专利号:1947183B1、美国专利号:7,812,135、美国专利号:8,388,967、美

国专利 号:8,591,886、欧洲专利号:EP 1866339、PCT公开号:WO 2011/028683、PCT公开号:WO 2013/039954、PCT公开号:WO2005/007190、PCT公开号:WO 2007/133822、PCT公开 号:WO2005/055808、PCT公开号:WO 99/40196、PCT公开号:WO 2001/03720、PCT公开 号:WO99/20758、PCT公开号:WO2006/083289、PCT公开号:WO 2005/115451、美国专利号: 7,618,632和PCT公开号:WO 2011/051726中所述的抗GITR抗体。

[1145] 在一个实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如本文 所述的蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂)组合施用于受试者。在一个实施方案中,蛋白质酪氨酸磷 酸酶抑制剂是SHP-1抑制剂,例如本文所述的SHP-1抑制剂,例如葡萄糖酸锑钠。在一个实施 方案中,蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-2抑制剂,例如,本文所述的SHP-2抑制剂。

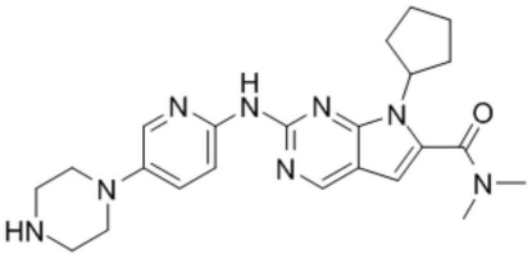
[1146] 在一个实施方案中,可以把任选地与一种或多种B细胞抑制剂组合的本文所述表达CAR 的细胞与激酶抑制剂联合使用。在一个实施方案中,激酶抑制剂为CDK4抑制剂,例如本文所 述CDK4抑制剂,例如CD4/6抑制剂,比如例如6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶 -2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐(也称为palbociclib或PD0332991)。在一个实施 方案中,激酶抑制剂为BTK抑制剂,例如本文所述BTK抑制剂,比如例如ibrutinib。在一个实 施方案中,激酶抑制剂为mTOR抑制剂,例如本文所述mTOR抑制剂,比如例如雷帕霉素、雷 帕霉素类似物、OSI-027。mTOR抑制剂可以为例如mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂,例 如本文所述mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂为MNK抑 制剂,例如本文所述MNK抑制剂,比如例如4-氨基-5-(4-氟苯氨基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶。MNK 抑制剂可以为例如MNK1a、MNK1b、MNK2a和/或MNK2b抑制剂。

[1147] 在一个实施方案中,激酶抑制剂为CDK4抑制剂,选自阿洛新A(aloisine A);夫拉平度 (flavopiridol)或HMR-1275,2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基4-哌啶基]-4-色酮 (chromenone);crizotinib(PF-02341066;2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟基甲基)-1-甲 基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃-4-酮盐酸盐(P276-00);1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2- 基]-4-吡啶基]氧基]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺(RAF265);indisulam(E7070); roscovitine(CYC202);palbociclib(PD0332991);dinaciclib(SCH727965);N-[5-[[(5-叔丁基噁唑 -2-基)甲基]硫代]噻唑-2-基]哌啶-4-甲酰胺(BMS 387032);4-[[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并氮杂䓬-2-基]氨基]-苯甲酸(MLN8054);5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2- 基)-1H-吲唑-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲胺(AG-024322);4-(2,6-二氯苯甲酰氨基)-1H-吡唑 -3-羧酸N-(哌啶-4-基)酰胺(AT7519);4-[2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基]-N-[4-(甲基磺酰 基)苯基]-2-嘧啶胺(AZD5438);和XL281(BMS908662)。

[1148] 在一个实施方案中,激酶抑制剂为CDK4抑制剂,例如palbociclib(PD0332991),并且 palbociclib以每日约50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、 115mg、120mg、125mg、130mg、135mg(例如,75mg、100mg或125mg)的剂量施用一段 时间,例如28天周期的第14-21天每日施用,或21天周期的第7-12天每日施用。在一个实施方 案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个周期的palbociclib。

[1149] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4或6抑

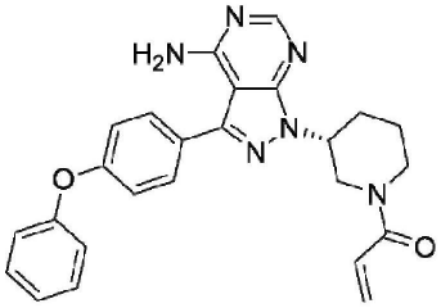
制剂，例如，本文所述的CDK4抑制剂或CDK6抑制剂组合施用于受试者。在实施方案中，本文所述 的CAR表达细胞与CDK4/6抑制剂(例如，靶向CDK4和CDK6的抑制剂)，例如，本文所述的CDK4/6抑制剂组合施用于受试者。在一个实施方案中，受试者具有MCL。MCL是一种侵入 性癌症，其对目前可用的治疗弱应答，即，基本上不可治愈的。在MCL的许多情况下，在MCL 细胞中表达细胞周期蛋白D1(CDK4/6的调节剂)(例如，由于涉及免疫球蛋白和细胞周期蛋白D1基因的染色体易位)。因此，不受理论的束缚，据认为，MCL细胞对CDK4/6抑制高度敏感，具有高特异性(即，对正常的免疫细胞的最小影响)。单独CDK4/6抑制剂在治疗MCL中已经有一定的效果，但只取得了部分缓解，复发率极高。示例性CDK4/6抑制剂是LEE011(也称为ribociclib)，其结构如下所示。

[1150] 

[1151] 不受理论的束缚，但据信本文所述的CAR表达细胞与CDK4/6抑制剂(例如，LEE011或本 文描述的其他CDK4/6抑制剂)的给药可以达到更高的反应性，例如，相比于单独的CDK4/6抑 制剂，具有更高的缓解率和/或较低的复发率。

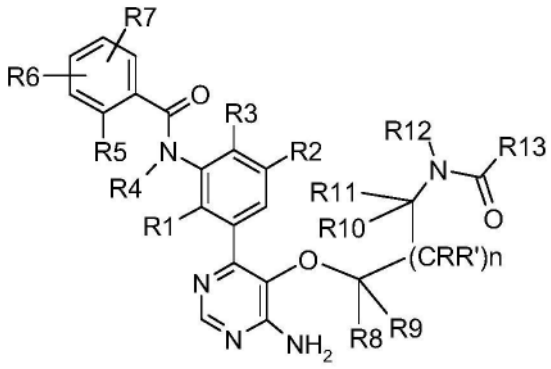
[1152] 在一个实施方案中，激酶抑制剂为BTK抑制剂，选自ibrutinib(PCI-32765)；GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059;CNX-774;和 LFM-A13。在一个实施方案中，BTK抑制剂不会降低或抑制白介素-2诱导的激酶(ITK))的激酶 活性，并且选自GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059; CNX-774;和LFM-A13。

[1153] 在一个实施方案中，激酶抑制剂为BTK抑制剂，例如ibrutinib(PCI-32765)。在实施方案 中，本文所述的CAR表达细胞与BTK抑制剂(例如，ibrutinib)组合施用于受试者。在实施方案 中，本文所述的CAR表达细胞与ibrutinib(也称为PCI-32765)组合施用于受试者。ibrutinib(1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑子基[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯 -1-酮)的结构如下所示。

[1154] 

[1155] 在实施方案中，受试者患有CLL，套细胞淋巴瘤(MCL)，或小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。例如，该受试者具有在第17号染色体的短臂中的缺失(del(17p)，例如，在白血病细胞)。在其 它实例中，受试者不具有del(17p)。在实施方案中，受试者已经复发CLL或SLL，例如，受试 者先前已经施用了癌症治疗(例如，先前已经施用1、2、3或4次现有癌症疗法)。在

实施方案 中,受试者患有难治性CLL或SLL。在其他实施方案中,受试者患有滤泡性淋巴瘤,例如, 复发或难治性滤泡性淋巴瘤。在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如ibrutinib (PCI-32765),并且ibrutinib每日以约250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、 460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg(例如,250mg、420 mg或560mg)的剂量施用一段时间,例如21天周期每日施用,或28天周期每日施用。在一个实 施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个周期的ibrutinib。在一 些实施方案中,ibrutinib与利妥昔单抗组合施用。参见,例如,Burger et al.(2013)Ibrutinib In Combination With Rituximab(iR)Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL):New,Updated Results Of a Phase II Trial In 40Patients,Abstract 675presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition,New Orleans,LA 7-10Dec.。不受理论的束缚,可以认为,加入ibrutinib增强了T细 胞的增殖反应,并且可以从T辅助细胞2(Th2)转移到T辅助细胞1(Th1)表型。Th1和Th2是辅助 性T细胞的表型,Th1相比Th2细胞定向不同的免疫应答途径。Th1表型与炎症反应相关,例如 用于杀死细胞,如细胞内病原体/病毒或癌性细胞,永久化自身免疫应答。Th2表型与嗜酸性 粒细胞的积累和抗炎应答有关。在本文的方法,用途和组合物的一些实施方案中,BTK抑制 剂是国际申请WO/2015/079417(其通过引用整体并入本文)中描述的BTK抑制剂。例如,在一 些实施方案中,BTK抑制剂是式(I)的化合物或其药学上可接受的盐;

[1156] 

(I)

[1157] 其中,

[1158] R1是氢,任选被羟基取代的C1-C6烷基;

[1159] R2是氢或卤素;

[1160] R3是氢或卤素;

[1161] R4是氢;

[1162] R5是氢或卤素;

[1163] 或者R4和R5彼此连接并代表键,-CH2-,-CH2-CH2-,-CH=CH-,-CH=CH-CH2-;-CH2-CH=CH-;或-CH2-CH2-CH2-;

[1164] R6和R7彼此独立地代表H,任选被羟基取代的C1-C6烷基,任选被卤素或羟基取代的 C3-C6环烷基或卤素;

[1165] R8,R9,R,R',R10和R11彼此独立地代表H或任选被C1-C6烷氧基取代的C1-C6烷基;或 R8,R9,R,R',R10和R11中的任意两个与它们所结合的碳原子一起可以形成3－6元饱和碳环;

[1166] R12是氢或任选被卤素或C1-C6烷氧基取代的C1-C6烷基；

[1167] 或R12和R8,R9,R,R',R10或R11中的任一个与它们所连接的原子一起可形成4,5,6或7元 氮杂环,该环可任选被卤素,氰基,羟基,C1-C6烷基或C1-C6烷氧基取代；

[1168] n为0或1;和

[1169] R13是任选被C1-C6烷基,C1-C6烷氧基或N,N-二-C1-C6烷基氨基取代的C2-C6烯基； 任选被C1-C6烷基或C1-C6烷氧基取代的C2-C6炔基;或任选被C1-C6烷基取代的C2-C6亚烷基氧化物(C2-C6 alkylenyl oxide)。

[1170] 在一些实施方案中,式I的BTK抑制剂选自:N-(3-(5-((1-丙烯酰基氮杂环丁烷-3-基)氧基)-6- 氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(E)-N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-烯酰 基)氮杂环丁烷-3-基)氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基 -5-((1-丙酰基氮杂环丁烷-3-基)氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺; N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-炔基)氮杂环丁烷-3-基)氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基 -2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4- 环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丙烯酰氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(E)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丁-2-烯酰氨基)乙氧基)嘧啶-4- 基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丙酰胺基)乙氧基)嘧 啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(E)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(4-甲氧基-N-甲基丁 -2-烯酰氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基 -5-(2-(N-甲基丁-2-炔酰氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺; N-(2-((4-氨基-6-(3-(4-环丙基-2-氟苯甲酰氨基)-5-氟-2-甲基苯基)嘧啶-5-基)氧基)乙基)-N-甲基 环氧乙烷-2-甲酰胺;N-(2-((4-氨基-6-(3-(6-环丙基-8-氟-1-氧代异喹啉-2(1H)-基)苯基)嘧啶-5- 基)氧基)乙基)-N-甲基丙烯酰胺;N-(3-(5-(2-丙烯酰氨基乙氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基 苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-乙基丙烯酰氨基)乙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟 -2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-(2-氟乙基)丙烯酰氨基)乙氧基)嘧 啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-((1-丙烯酰氨基环丙基)甲氧基)-6- 氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-(2-丙烯酰氨基丙氧 基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(丁-2- 炔酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基 -5-(2-(N-甲基丙烯酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-(2-(N-甲基丁-2-炔酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2- 氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(3-(N-甲基丙烯酰氨基)丙氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环 丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-((1-丙烯酰基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲 基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-((1-(丁-2-炔酰基)吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧 啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-2-(3-(5-((1-丙烯酰基吡咯烷-2-基)甲氧 基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟基甲基)苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;N-(2-((4-氨 基-

6-(3-(6-环丙基-1-氧代-3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)嘧啶-5-基)氧基)乙 基)-N-甲基丙烯酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰基-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶 -4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4R)-1-(丁-2-炔酰基)-4- 甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺; 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰基-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟甲基) 苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;N-(3-(5-(((2S,4S)-1-丙烯酰基-4-甲氧基吡咯烷-2-基) 甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基 -5-(((2S,4S)-1-(丁-2-炔基)-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-2-甲基苯基)-4-环丙基-2- 氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰基-4-氟吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2- 甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4R)-1-(丁-2-炔基)-4-氟吡咯烷-2-基) 甲氧基)嘧啶-4-基)-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4S)-1-丙烯酰基-4-甲氧 基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6- 氨基-5-(((2S,4S)-1-(丁-2-炔酰基)-4-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯 基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰基-4-氟吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧 啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(6-氨基-5-(((2S,4R)-1-(丁-2-炔酰 基)-4-氟吡咯烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(5-((1-丙烯酰基氮杂环丁烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙 基-2-氟苯甲酰胺;(S)-N-(3-(6-氨基-5-((1-丙炔酰基氮杂环丁烷-2-基)甲氧基)嘧啶-4-基)-5-氟-2- 甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;(S)-2-(3-(5-((1-丙烯酰基氮杂环丁烷-2-基)甲氧基)-6-氨基 嘧啶-4-基)-5-氟-2-(羟甲基)苯基)-6-环丙基-3,4-二氢异喹啉-1(2H)-酮;(R)-N-(3-(5-((1-丙烯酰基 氮杂环丁烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺; (R)-N-(3-(5-((1-丙烯酰基哌啶-3-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟 苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2R,3S)-1-丙烯酰基-3-甲氧基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;N-(3-(5-(((2S,4R)-1-丙烯酰基-4-氰基吡咯烷-2-基)甲氧 基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺;或N-(3-(5-(((2S,4S)-1-丙烯酰 基-4-氰基吡咯烷-2-基)甲氧基)-6-氨基嘧啶-4-基)-5-氟-2-甲基苯基)-4-环丙基-2-氟苯甲酰胺。

[1171] 除非另有规定,以上在描述式I的BTK抑制剂中使用的化学术语根据其在国际申请WO/2015/079417中所述的含义使用,所述国际申请WO/2015/079417以全文引用的方式并入本 文中。

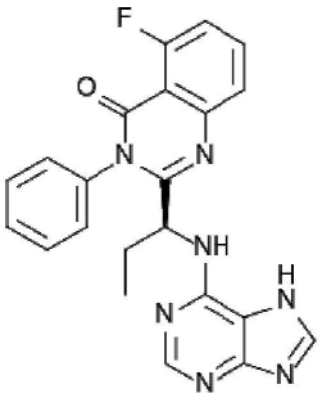
[1172] 在一个实施方案中,激酶抑制剂为mTOR抑制剂,选自坦罗莫司;雷达罗莫司 (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二 羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36-二氧杂-4-氮杂三环 [30.3.1.$0^{4,9}$]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基亚膦酸酯,也称 为AP23573和MK8669;依维莫司(RAD001);雷帕霉素(AY22989);simapimod(5-{2,4-双 [(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-

2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反 式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基3-吡啶基)-4-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮 (PF04691502);和N^2-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓-4-基]甲氧 基]丁基]-L-精氨酰基甘氨酰基-L-α-天冬氨酰基L-丝氨酸,内盐(SF1126)(SEQ ID NO:1316); 和XL765。

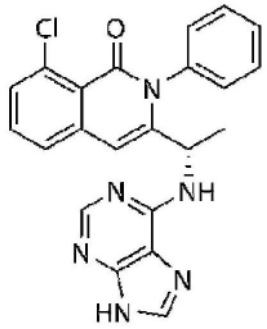
[1173] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如雷帕霉素,雷帕霉素以约3mg,4 mg,5mg,6mg,7mg,8mg,9mg,10mg(例如6mg)的日剂量施用一段时间,例如21天周期 每天施用,或28天周期每天施用。在一个实施方案中,施用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或 更多个周期的雷帕霉素。在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如依维莫司, 依维莫司以约2mg,2.5mg,3mg,4mg,5mg,6mg,7mg,8mg,9mg,10mg,11mg,12mg,13 mg,14mg,15mg(例如10mg)的日剂量施用一段时间,例如28天周期每天施用。在一个实施 方案中,施用依维莫司的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。

[1174] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自CGP052088;4-氨基-3-(对-氟苯基氨基)-吡唑并 [3,4-d]嘧啶(CGP57380);cercosporamide;ETC-1780445-2;和4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡唑并 [3,4-d]嘧啶的MNK抑制剂。

[1175] 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂(例如,本文所 述的PI3K抑制剂,例如,idelalisib或duvelisib)和/或利妥昔单抗组合施用于受试者。在实施方 案中,本文所述的CAR表达细胞与idelalisib和利妥昔单抗组合施用于受试者。在实施方案中, 本文所述的CAR表达细胞与duvelisib和利妥昔单抗组合施用于受试者。Idelalisib(也被称为 GS-1101或CAL-101;Gilead)是一种小分子,其阻断PI3K的δ同工型。idelalisib(5-氟-3-苯基 -2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹唑啉酮)的结构如下所示。

[1176] 

[1177] Duvelisib(也称为IPI-145;Infinity Pharmaceuticals and Abbvie)是阻断PI3K-δ,γ的小分 子。duvelisib(8-氯-2-苯基-3-[(1S)-1-(9H-嘌呤-6-基氨基)乙基]-1-(2H)-异喹啉酮)的结构如下所 示。

[1178] 

[1179] 在实施方案中,受试者患有CLL。在实施方案中,受试者具有复发的CLL,例如,受试者先前已经施用了癌症治疗(例如,先前已施用抗CD20抗体或先前已经施用ibrutinib)。例如, 该受试者具有在第17号染色体的短臂的缺失(del(17p),例如,在白血病细胞中)。在其它实例 中,受试者不具有del(17p)。在实施方案中,所述受试者包括包含在免疫球蛋白重链可变区 ((IgV$_H$)基因中突变的白血病细胞。在其他实施方案中,受试者不包括包含在免疫球蛋白重链 可变区(IgV$_H$)基因中突变的白血病细胞。在实施方案中,受试者具有在11号染色体长臂中的 缺失((del(11q))。在其他实施方案中,受试者不具有(del(11q)。在实施方案中,idelalisib以约 100-400mg(例如,100-125,125-150,150-175,175-200,200-225,225-250,250-275,275-300, 325-350,350-375,或375-400mg)的剂量施用,例如,BID。在实施方案中,duvelisib以约15-100 mg(例如,约15-25,25-50,50-75,或75-100mg)的剂量施用,例如每天两次。在实施方案中, 利妥昔单抗以约350-550mg/m^2(例如,350-375,375-400,400-425,425-450,450-475,或475-500 mg/m^2)的剂量,例如静脉内施用。

[1180] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是双磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),mTOR抑制剂选自2- 氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧 啶-7(8H)-酮(PF-04691502);N-[4-[[4-(二甲基氨基)-1-哌啶基]羰基]苯基]-N'-[4-(4,6- 二-4-吗啉基-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲(PF-05212384,PKI-587);2-甲基-2-{4-[3-甲基-2- 氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基}丙腈(BEZ-235);apitolisib (GDC-0980,RG7422);2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基} 苯磺酰胺(GSK2126458);8-(6-甲氧基吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-(哌嗪-1-基)-3-(三氟甲 基)苯基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-(3H)-酮马来酸(NVP-BGT226);3-[4-(4-吗啉基吡 啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基]苯酚(PI-103);5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤 -6-基)嘧啶-2-胺(VS-5584,SB2343);和N-[2-[(3,5-二甲氧基苯基)氨基]喹喔啉-3-基]4-[(4- 甲基-3-甲氧基苯基)羰基]氨基苯基磺酰胺(XL765)。

[1181] 在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂组合施 用于受试者。示例性的ALK激酶包括但不限于crizotinib(Pfizer),ceritinib(Novartis),alectinib (Chugai),brigatinib(也称为AP26113;Ariad),entrectinib(Ignyta),PF-06463922(Pfizer), TSR-011(Tesaro)(参见例如临床试验标识号NCT02048488),CEP-37440(Teva)和X-396 (Xcovery)。在一些实施方案中,受试者具有实体癌症,例如本文所述的实体癌症,例如肺 癌

[1182] crizotinib的化学名称是3-[(1R)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基吡唑 -4-基)吡啶-2-胺。ceritinib的化学名称是5-氯-N^2-[2-异丙氧基-5-甲基-4-

(4-哌啶基)苯基]-N^4- [2-(异丙基磺酰基)苯基]-2,4-嘧啶二胺。alectinib的化学名称是9-乙基-6,6-二甲基-8-(4-吗 啉代哌啶-1-基)-11-氧代-6,11-二氢-5H-苯并[b]咔唑-3-腈。brigatinib的化学名称是5-氯-N^2-{4- [4-(二甲基氨基)-1-哌啶基]-2-甲氧基苯基}-N^4-[2-(二甲基磷酰基)苯基]-2,4-嘧啶二胺。entrectinib的化学名称是N-(5-(3,5-二氟苄基)-1H-吲唑-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)-2- ((四氢-2H-吡喃-2-基)-4-基)氨基)苯甲酰胺。PF-06463922的化学名称是(10R)-7-氨 基-12-氟-2,10,16-三甲基-15-氧代-10,15,16,17-四氢-2H-8,4-(次甲基))吡唑子基[4,3-H][2,5,11] -苯并氧杂二氮杂环十四烯-3-腈。CEP-37440的化学结构为(S)-2-((5-氯-2-((6-(4- (2-羟乙基)哌嗪-1-基)-1-甲氧基-6,7,8,9-四氢-5H-苯并[7]轮烯-2-基)氨基)嘧啶-4-基)氨 基)-N-甲基苯甲酰胺。X-396的化学名称是(R)-6-氨基-5-(1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙氧基) -N-(4-(4-甲基哌嗪-1-羰基)苯基)哒嗪-3-甲酰胺。

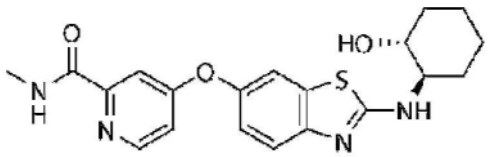
[1183] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自ibrutinib的ITK抑制剂;N-(5-(5-(4-乙酰基哌嗪 -1-羰基)-4-甲氧基-2-甲基苯硫基)噻唑-2-基)-4-((3,3-二甲基丁-2-基氨基)甲基)苯甲 酰胺(BMS-509744);7-苄基-1-(3-(哌啶-1-基)丙基)-2-(4-(吡啶-4-基)苯基)-1H-咪 唑并[4,5-G]喹喔啉-6(5H)-酮(CTA056);R)-3-(1-(1-丙烯酰基哌啶-3-基)-4-氨基-1H- 吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-N-(3-甲基-4-(1-甲基乙基))苯甲酰胺(PF-06465469)。

[1184] 也可以使用抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱 导的信号传导重要的p70S6激酶的药物(雷帕霉素)。(Liu et al.,Cell 66:807-815,1991;Henderson et al.,Immun.73:316-321,1991;Bierer et al.,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在 另一方面,本发明的细胞组合物可以与骨髓移植(例如,之前,同时或之后)联合施用于患 者。使用化疗剂如氟达拉滨,外部束辐射疗法(XRT),环磷酰胺和/或抗体如OKT3或 CAMPATH进行T细胞消融治疗。一方面,本发明的细胞组合物在B细胞消融治疗(例如与CD20 反应的药剂,例如Rituxan)后施用。例如,在一个实施方案中,受试者可以通过高剂量化学 疗法进行标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些实施方案中,在移植后,受试者接 受本发明的扩增的免疫细胞的输注。在另外的实施方案中,在手术之前或之后施用扩增的细 胞。

[1185] 在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂组合施 用于受试者。IDO是催化氨基酸L-色氨酸降解成犬尿氨酸的酶。许多癌症过表达IDO,例如前 列腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,子宫颈癌,胃癌,卵巢癌,头癌和肺癌。pDC,巨噬细胞和 树突细胞(DCs)可以表达IDO。不受理论的约束,认为L-色氨酸的减少(例如,由IDO催化)通过诱导T细胞无反应性和细胞凋亡导致免疫抑制环境。因此,不受理论的约束,认为IDO抑制剂可以增强本文所述的CAR表达细胞的功效,例如通过降低CAR表达免疫细胞的抑制或死亡。在实施方案中,受试者具有实体瘤,例如本文所述的实体瘤,例如前列腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,子宫颈癌,胃癌,卵巢癌,头癌或肺癌。IDO的示例性抑制剂包括但不限于1- 甲基-色氨酸,indoximod(NewLink Genetics)(参见例如临床实验识别号NCT01191216;NCT01792050)和INCB024360(Incyte Corp.)(参见例如临床实验识别号NCT01604889;NCT01685255)。

[1186] 在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的调节

剂 组合施用于受试者。MDSCs积聚在许多实体瘤的周边和肿瘤部位。这些细胞抑制T细胞反应，从而阻碍CAR表达细胞疗法的功效。不受理论的约束，认为施用MDSC调节剂增强本文所述 的CAR表达细胞的功效。在一个实施方案中，受试者具有实体瘤，例如本文所述的实体瘤，例如成胶质细胞瘤。MDSC的示例性调节剂包括但不限于MCS110和BLZ945。MCS110是针对 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的单克隆抗体(mAb)。参见例如临床试验标识号NCT00757757。BLZ945是集落刺激因子1受体(CSF1R)的小分子抑制剂。参见例如Pyonteck et al.Nat.Med.19(2013):1264-72。BLZ945的结构如下所示。

[1187] 

[1188] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞与CD19 CART细胞(例如，CTL019，例如，如在WO2012/079000中描述，其通过引用并入本文)组合施用于受试者。在实施方案中，受试者患有急性骨髓性白血病(AML)，例如CD19阳性AML或CD19阴性AML。在实施方案中，受试 者具有CD19+淋巴瘤，例如，CD19+非霍奇金淋巴瘤(NHL)，CD19+FL，或CD19+DLBCL。 在实施方案中，受试者具有复发或难治性CD19+淋巴瘤。在实施方案中，淋巴消耗化疗在CD19 CART细胞施用(例如，输注)于受试者之前，与其同时或之后给药。在一个实例中，淋巴消耗 化疗在CD19 CART细胞施用之前施用于受试者。例如，CD19 CART细胞输注前1-4天(例如， 1,2,3，或4天)淋巴消耗化疗结束。在实施方案中，多剂量的CD19 CART细胞被施用，例如， 如本文所述。例如，单次剂量包含约5x 10^8CD19 CART细胞。在实施方案中，淋巴消耗化疗 施用在本文所述的CAR表达细胞，例如非CD19 CAR-表达细胞施用(例如，输注)之前、同时 或之后施用给受试者。在实施方案中，CD19 CART在非CD19 CAR-表达细胞，例如本文所述 的非CD19 CAR表达细胞施用(例如，输注)之前、同时或之后施用给受试者。

[1189] 在一些实施方案中，将本文所述的CAR表达细胞与CD19 CAR表达细胞(例如如WO2012/079000中所述(通过引用并入本文)的CTL019)组合施用于受试者，用于治疗与CLL-1 的表达相关的疾病，例如本文所述的癌症。不受理论的束缚，据信，与CAR表达细胞组合施用CD19 CAR表达细胞通过靶向早期谱系癌细胞(例如癌干细胞)，调节免疫应答，消耗调 节性B细胞和/或改善肿瘤微环境来改善本文所述的CAR表达细胞的功效。例如，CD19 CAR 表达细胞靶向表达早期谱系标志物的癌细胞，例如癌干细胞和表达CD19的细胞，而本文所述的CAR表达细胞靶向表达晚期谱系标志物，例如CLL-1的癌细胞。该预处理方法可以改善本文所述的CAR表达细胞的功效。在这样的实施方案中，CD19 CAR表达细胞在施用(例如， 输注)本文所述的CAR表达细胞之前，同时或之后施用。

[1190] 在实施方案中，本文所述的CAR表达细胞还表达靶向CD19的CAR，例如CD19 CAR。在一个实施方案中，将表达本文所述的CAR和CD19 CAR的细胞施用于受试者以治疗本文所述的癌症，例如AML。在一个实施方案中，一个或两个CAR分子的构型包含主要细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导结构域。在另一个实施方案中，一个或两个CAR分子的构型包含主要细胞内信号传导结构域和两个或多个，例如2,3,4或5个或更多个共刺激信号传导结构域。 在这样的实施方案中，本文所述的CAR分子和CD19 CAR可以具有相同或不同的主要细胞内 信号传导结构域，相同或不同的共刺激信号传导结构域，或相同数目或不同数目的共

刺激信 号传导结构域。或者,本文描述的CAR和CD19 CAR被配置为分裂CAR,其中CAR分子之一 包含抗原结合结构域和共刺激结构域(例如4-1BB),而另一CAR分子包含抗原结合结构域 和主要细胞内信号传导结构域(例如,CD3ζ)。

[1191] 在一些实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与白细胞介素-15(IL-15)多肽,白细 胞介素-15受体α(IL-15Rα)多肽或IL-15多肽和IL-15Ra多肽的组合,例如hetIL-15(Admune Therapeutics,LLC)组合施用于受试者。hetIL-15是IL-15和IL-15Ra的异二聚非共价复合物。hetil-15描述于例如U.S.8,124,084,U.S.2012/0177598,U.S.2009/0082299,U.S.2012/0141413, 和U.S.2011/0081311中,将其引入本文作为参考。在实施方案中,皮下施用het-IL-15。在实 施方案中,受试者具有癌症,例如实体癌症,例如黑素瘤或结肠癌。在实施方案中,受试者 具有转移性癌症。

[1192] 在实施方案中,对具有本文所述的疾病,例如血液病症(例如AML或MDS)的受试者施 用本文所述的CAR表达细胞与活性剂(例如细胞毒性或化疗剂),生物疗法(例如,抗体,例如单克隆抗体或细胞疗法)或抑制剂(例如激酶抑制剂)。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与细胞毒性剂,例如CPX-351(Celator Pharmaceuticals),阿糖胞苷,柔红霉素, vosaroxin(Sunesis Pharmaceuticals),sapacitabine(Cyclacel Pharmaceuticals),伊达比星或 米托蒽醌组合施用于受试者。CPX-351是一种以5:1摩尔比含有阿糖胞苷和柔红霉素的脂质体 制剂。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与低甲基化剂(例如DNA甲基转移酶抑制 剂,例如氮杂胞苷或地西他滨)组合施用于受试者。在实施方案中,将本文所述的CAR表达 细胞与生物疗法(例如抗体或细胞疗法,例如225Ac-林妥珠单抗(Actimab-A;Actinium Pharmaceuticals),IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb),SGN-CD33A(Seattle Genetics)或吉姆单抗奥佐米星(Mylotarg;Pfizer)组合施用于受试者。SGN-CD33A是包含与 抗CD33抗体连接的吡咯并苯并二氮杂䓬二聚体的抗体-药物缀合物(ADC)。Actimab-A是用 锕标记的抗CD33抗体(林妥珠单抗)。IPH2102是靶向杀伤性免疫球蛋白样受体(KIRs)的 单克隆抗体。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与FLT3抑制剂(例如索拉非尼 (Bayer)),米哚妥林(Novartis),quizartinib(Daiichi Sankyo),crenolanib(Arog Pharmaceuticals),PLX3397(Daiichi Sankyo),AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)或ASP2215 (Astellas)组合施用于受试者。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与异柠檬酸脱氢 酶(IDH)抑制剂例如AG-221(Celgene/Agios)或AG-120(Agios/Celgene)组合施用于受试 者。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与细胞周期调节剂,例如polo样激酶1(Plk1) 的抑制剂,例如volasertib(Boehringer Ingelheim);或细胞周期蛋白依赖性激酶9(Cdk9)的 抑制剂,例如阿伏西地(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)组合施用于受试者。在实施 方案中,将本文所述的CAR表达细胞与B细胞受体信号传导网络抑制剂,例如B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2)的抑制剂(例如venetoclax(Abbvie/Roche));或Bruton酪氨酸激酶(Btk)的抑制 剂,例如ibrutinib(Pharmacyclics/Johnson&Johnson Janssen Pharmaceutical)组合施用于受试 者。在实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞与M1氨肽酶抑制剂(例如tosedostat(CTI BioPharma/Vernalis));组蛋白脱乙酰酶(HDAC)的抑制剂,例如pracinostat(MEI Pharma); 多激酶抑制剂,例如rigosertib(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio);或肽CXCR4反向激动 剂,例如BL-8040(BioLineRx)组合施用于受试者。

[1193] 在另一个实施方案中,受试者在细胞的移植前,例如同种异体干细胞移植前接受本发明 的CAR表达细胞,例如CD19 CAR表达细胞组合物的输注。在优选的实施方案中,CAR表达 细胞例如通过电穿孔mRNA CAR瞬时表达CAR,由此在输注供体干细胞之前终止由CAR靶向 的抗原(例如CD19)的表达以避免移植物植入失败。在一个实施方案中,可以对受试者施用 降低或改善与施用CAR表达细胞相关的副作用的活性剂。与施用CAR表达细胞相关的副作用 包括但不限于CRS和嗜血细胞淋巴组织细胞增多症(HLH),也称为巨噬细胞激活综合征 (MAS)。CRS的症状包括高热,恶心,短暂性低血压,缺氧等。因此,本文所述的方法可以包括向受试者施用本文所述的CAR表达细胞,并进一步施用活性剂以控制由用CAR表达细胞治疗而产生的可溶性因子的升高水平。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子是 IFN-γ,TNFα,IL-2和IL-6中的一种或多种。因此,用于治疗这种副作用的活性剂可以是中和 这些可溶性因子中的一种或多种的活性剂。这些活性剂的实例包括但不限于类固醇(例如皮 质类固醇),TNFα抑制剂和IL-6的抑制剂。TNFα抑制剂的一个实例是抗TNFα抗体分子,如 英夫利昔单抗,阿达木单抗,培舍珠单抗和戈利木单抗。TNFα抑制剂的另一个实例是融合蛋 白,如恩那西普(entanercept)。TNFα的小分子抑制剂包括但不限于黄嘌呤衍生物(例如己 酮可可碱)和安非他酮。IL-6抑制剂的一个实例是抗-IL-6抗体分子,例如托珠单抗(toc), sarilumab,elsilimomab,CNTO 328,ALD518/BMS-945429,CNTO 136,CPSI-2364, CDP6038, VX30,ARGX-109,FE301,和FM101。在一个实施方案中,抗IL-6抗体分子是托珠单抗。基 于IL-1R的抑制剂的实例是阿那白滞素。

[1194] 在实施方案中,例如在施用一种或多种表达本文所述的CAR的细胞之前对受试者进行淋 巴清除。在实施方案中,淋巴清除包括施用美法仑,环磷酰胺制剂(cytoxan),环磷酰胺 (cyclophosphamide)和氟达拉滨中的一种或多种。

[1195] 在实施方案中,在CAR细胞(例如本文所述的细胞)施用(例如,输注)之前,同时或之后向受试者施用淋巴清除化疗。在一个实例中,在施用CAR细胞之前,向受试者施用淋巴清除化疗。例如,在CAR细胞输注之前1-4天(例如,1,2,3或4天)结束淋巴清除化疗。在实 施方案中,施用多个剂量的CAR细胞,例如如本文所述。例如,单剂量包含约$5x10^8$个CAR 细胞。在实施方案中,在本文所述的表达CAR的细胞的施用(例如,输注)之前,同时或之 后向受试者施用淋巴清除化疗。

[1196] 在一些实施方案中,本文所述的CAR表达细胞与CD19 CAR表达细胞,例如CTL019(例如, 如WO2012/079000中所述,其通过引用并入本文)组合施用于受试者,用于治疗与癌抗原的表 达相关的疾病,例如本文所述的癌症。不受理论的束缚,据信,与另一CAR表达细胞组合施 用CD19 CAR表达细胞通过靶向早期谱系癌细胞(例如癌干细胞),调节免疫应答,消耗调 节性B细胞和/或改善肿瘤微环境来改善本文所述的CAR表达细胞的功效。例如,CD19 CAR 表达细胞靶向表达早期谱系标志物的癌细胞,例如癌干细胞和CD19表达细胞,而本文所述的 一些其它CAR表达细胞靶向表达晚期谱系标志物的癌细胞。该预处理方法可以改善本文所述 的CAR表达细胞的功效。在这样的实施方案中,CD19 CAR表达细胞在施用(例如,输注) 第二CAR表达细胞之前,同时或之后施用。

[1197] 在实施方案中,表达靶向除CD19之外的癌抗原的CAR的CAR表达细胞还表达靶向CD19 的CAR,例如CD19 CAR。在一个实施方案中,将表达非CD19 CAR和CD19 CAR的细胞施用于受试者以治疗本文所述的癌症,例如AML。在一个实施方案中,一个或两个CAR分子的构

型包含主要细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导结构域。在另一个实施方案中,一个或 两个CAR分子的构型包含主要细胞内信号传导结构域和两个或多个,例如2,3,4或5个或更多个 共刺激信号传导结构域。在这样的实施方案中,非CD19 CAR分子和CD19 CAR可以具有相同 或不同的主要细胞内信号传导结构域,相同或不同的共刺激信号传导结构域,或相同数目或 不同数目的共刺激信号传导结构域。或者,非CD19 CAR和CD19 CAR被配置为分裂CAR,其 中CAR分子之一包含抗原结合结构域和共刺激结构域(例如4-1BB),而另一CAR分子包含 抗原结合结构域和主要细胞内信号传导结构域(例如CD3ζ)。

[1198] 抑制性分子抑制剂/检查点抑制剂

[1199] 在一个实施方案中,受试者可以施用增强CAR表达细胞活性的活性剂。例如,在一个实 施方案中,所述活性剂可以是抑制抑制性分子的活性剂,例如该活性剂是检查点抑制剂。在 一些实施方案中,抑制性或检查点分子,例如程序性死亡1(PD1)可以降低CAR表达细胞装 载免疫效应物应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1,PD-L1,PD-L2,CTLA4,TIM3,CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5),LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT, LAIR1,CD160,2B4,CD160,2B4,CD80,CD86,B7-H3(CD276),B7-H4(VTCN1),HVEM (TNFRSF14或CD270),KIR,A2aR,I类MHC,II类MHC,GAL9,腺苷和TGFR(例如TGFRβ)。 在实施方案中,本文所述的CAR表达细胞包含开关共刺激受体,例如WO 2013/019615中所述, 其全部内容通过引用并入本文。

[1200] 本文描述的方法可以包括与检查点抑制剂组合施用CAR表达细胞。在一个实施方案中, 受试者是完全应答者。在另一个实施方案中,受试者是部分应答者或非应答者,并且例如在 一些实施方案中,检查点抑制剂在CAR表达细胞之前施用,例如施用CAR表达细胞前两周, 12天,10天,8天,一周,6天,5天,4天,3天,2天或1天前施用。在一些实施方案中,检查点抑制剂与CAR表达细胞同时施用。

[1201] 对抑制性分子的抑制,例如通过DNA,RNA或蛋白质水平上的抑制,可以优化CAR表达 细胞的性能。在实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA, 或聚簇规则间隔短回文重复(CRISPR),转录激活物样效应子核酸酶(TALEN),或锌指 内切核酸酶(ZFN)可以用于抑制CAR表达细胞中抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一个实施方案中,抑制性分子在CAR表达细胞内被抑制。在这些实施方案中,抑制抑制性分子表达的dsRNA分子与编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸连接。

[1202] 在一个实施方案中,编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA 分子的核酸分子有效连接到启动子,例如H1-或U6衍生的启动子,使得抑制调控或调节(例 如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子被表达,例如在表达CAR的细胞内表达。参见 例如Tiscornia G.,“Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA,” Chapter 3,in Gene Transfer:Delivery and Expression of DNA and RNA (eds.Friedmann and Rossi).Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA,2007;Brummelkamp TR,et al.(2002) Science 296:550-553;Miyagishi M,et al.(2002)Nat.Biotechnol.19:497-500。在一个实施方 案中,编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子存在 于相同的载体,例如慢病毒载体上,其包含编码CAR的组件,例如所有组件的核酸分子。在 这样的实施方案中,编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的 核酸分子位于载体,例

如慢病毒载体上,编码CAR的组件(例如所有组件)的核酸的5'-或3。编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子可以以与 CAR的组件(例如所有组件)的核酸相同或不同的方向进行转录。在一个实施方案中,编码 抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子存在于载体上, 该载体不同于包含编码CAR的组件(例如所有组件)的核酸分子的载体。在一个实施方案中, 编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子在表达CAR 的细胞内瞬时表达。在一个实施方案中,编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子 表达的dsRNA分子的核酸分子稳定地整合到CAR表达细胞的基因组中。在一个实施方案中, 编码抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子是PD-1。

[1203] 在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是例如结合抑制性分子的抗体或抗体片段。例如,该活性剂可以是与PD1,PD-L1,PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如,伊匹 木单抗(也称为MDX-010和MDX-101,并以Yervoy®上市,Bristol-Myers Squibb;Tremelimumab(可得自Pfizer的IgG2单克隆抗体,以前称为ticilimumab,CP-675,206))。在一个实施方案中,该活性剂是与TIM3结合的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,该活性剂是与LAG3结合的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,所述活性剂是结合CEACAM(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5)的抗体或抗体片段。在实施方案中,增强CAR 表达细胞(例如抑制性分子的抑制剂)的活性的活性剂与同种异体CAR,例如本文所述的同 种异体CAR(例如,在本文的同种异体CAR部分中描述)组合施用。

[1204] PD1是CD28受体家族的抑制成员,其还包括CD28,CTLA-4,ICOS和BTLA。PD1在活 化的B细胞,T细胞和骨髓细胞上表达(Agata et al.1996Int.Immunol 8:765-75)。已经显示PD1, PD-L1和PD-L2的两个配体在与PD1结合时下调T细胞活化(Freeman et a.2000J Exp Med 192:1027-34;Latchman et al.2001Nat Immunol 2:261-8;Carter et al.2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中是丰富的(Dong et al.2003J Mol Med 81:281-7;Blank et al. 2005Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi et al.2004Clin Cancer Res 10:5094)。通 过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制。

[1205] PD1,PD-L1和PD-L2的抗体,抗体片段和其他抑制剂在本领域是可获得的,并且可以与 本文所述的CD19 CAR组合使用。例如,nivolumab(也称为BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是完全人IgG4单克隆抗体,其特异性阻断PD1。在US 8,008,449和WO2006/121168中公开了Nivolumab(克隆5C4)和与PD1特异性结合的其它人单克隆抗体。Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)是结合PD1的人源化IgG1k单克隆抗体。Pidilizumab和其他 人源化抗PD1单克隆抗体公开在WO2009/101611中。Pembrolizumab(以前称为lambrolizumab, 也称为Keytruda,MK03475;Merck)是与PD1结合的人源化IgG4单克隆抗体。Pembrolizumab和 其他人源化抗PD1抗体公开在US 8,354,509和WO2009/114335中。MEDI4736(Medimmune) 是与PDL1结合并抑制配体与PD1相互作用的人单克隆抗体。MDPL3280A(Genentech/Roche) 是与PD-L1结合的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A和针对PD-L1的其他人单克隆抗 体公开在美国专利号7,943,743和美国公开号:20120039906中。其它抗PD-L1结合剂包括 YW243.55.S70(显示在WO2010/077634中的SEQ ID NO:20和21的重链和轻链可变区)和 MDX-1055(也称为BMS-936559,以及例如WO2007/

005874中公开的抗PD-L1结合剂)。AMP-224(B7-DCIg;Amplimmune;例如WO2010/027827和WO2011/066342中公开)是阻断PD1 和B7-H1之间的相互作用的PD-L2 Fc融合可溶性受体。其它抗PD1抗体包括AMP 514 (Amplimmune),其中包括例如US 8,609,089,US 2010028330和/或US 20120114649中公开 的抗PD1抗体。

[1206] 在一些实施方案中,本文所述的PD1抑制剂(例如PD1抗体,例如本文所述的PD1抗体) 与本文所述的CD19 CAR组合用于治疗与CD19表达相关的疾病。在一些实施方案中,本文所 述的PD-L1抑制剂(例如,PD-L1抗体,例如本文所述的PD-L1抗体)与本文所述的CD19 CAR 组合用于治疗与CD19的表达相关的疾病。该疾病可以是例如淋巴瘤,例如DLBCL,包括原 发性DLBCL或继发性DLBCL。在一些实施方案中,受试者具有或被鉴定为具有至少5%,6%, 7%,8%,9%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的癌细胞,例如DLBCL细胞, 其为CD3+/PD1+。在一些实施方案中,受试者在癌症例如癌症微环境中具有或被鉴定为具有 CD19+细胞和PD-L1+细胞的基本上不重叠的群体。例如,在一些实施方案中,癌症,例如癌 细胞微环境中小于20%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,或1%的细胞对于CD19和 PD-L1是双阳性的。

[1207] 在一些实施方案中,用CD19 CAR,PD1抑制剂和PD-L1抑制剂的组合治疗受试者。在一 些实施方案中,用CD19 CAR,PD1抑制剂和CD3抑制剂的组合治疗受试者。在一些实施方案 中,用CD19 CAR,PD1抑制剂,PD-L1抑制剂和CD3抑制剂的组合治疗受试者。

[1208] 在一些实施方案中,本文的方法包括测定生物样品,例如包含DLBCL细胞的样品中细胞的 CD3和/或PD-1(例如CD3和/或PD-1表达)的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括测定生 物样品(例如包含DLBCL细胞的样品)中细胞的CD19和/或PD-L1(例如CD19和/或PD-L1表 达)的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括例如提供包含癌细胞的样品并且例如通过免 疫组织化学检测CD3,PD-1,CD19或PD-L1中的一种或多种的检测步骤。所述方法可以包括 进一步的建议或施用治疗,例如包括CD19 CAR的治疗的步骤。

[1209] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体或其片段是US 2015/0210769(标题为“针对PD-1的抗体 分子及其用途”,其全部内容通过引用并入本文)中所述的抗PD-1抗体分子。在一个实施方案 中,抗PD-1抗体分子包含来自抗体的重链和轻链可变区的至少一个,二个,三个,四个,五 个或六个CDR(或统称为所有CDR),所述抗体选自以下的任何一种:BAP049-hum01,BAP049-hum02,BAP049-hum03,BAP049-hum04,BAP049-hum05,BAP049-hum06, BAP049-hum07,BAP049-hum08,BAP049-hum09,BAP049-hum10,BAP049-hum11, BAP049-hum12,BAP049-hum13,BAP049-hum14,BAP049-hum15,BAP049-hum16, BAP049-Clone-A,BAP049-Clone-B,BAP049-Clone-C,BAP049-Clone-D,或BAP049-Clone-E; 或如US 2015/0210769的表1所述,或由表1中的核苷酸序列编码,或与上述任何序列基本相同 的序列(例如,至少80%,85%,90%,92%,95%,97%,98%,99%或更高同一性);或密切相关的 CDR,例如相同或具有至少一个氨基酸改变但不超过两个,三个或四个改变(例如,取代, 缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[1210] 在另一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含来自本文所述抗体的至少一个,两个,三个 或四个可变区,所述抗体例如选自BAP049-hum01,BAP049-hum02,BAP049-hum03,BAP049-hum04,BAP049-hum05,BAP049-hum06,BAP049-hum07,BAP049-hum08, BAP049-hum09,BAP049-hum10,BAP049-hum11,BAP049-hum12,BAP049-hum13, BAP049-hum14,

BAP049-hum15,BAP049-hum16,BAP049-Clone-A,BAP049-Clone-B, BAP049-Clone-C, BAP049-Clone-D,或BAP049-Clone-E的任一种;或如US 2015/0210769的 表1所述,或由表1中的核苷酸序列编码,或与上述任何序列基本相同的序列(例如,至少80％, 85％,90％,92％,95％,97％,98％,99％或更高同一性)。

[1211] TIM3(T细胞免疫球蛋白-3)也负调节T细胞功能,特别是在IFN-g分泌的CD4+T辅助细 胞1和CD8+T细胞毒性1细胞中的T细胞功能,并在T细胞衰竭中发挥关键作用。抑制TIM3及其 配体如galectin-9(Gal9),磷脂酰丝氨酸(PS)和HMGB1之间的相互作用可增加免疫应答。TIM3及其配体的抗体,抗体片段和其他抑制剂在本领域是可获得的,并且可以与本文所述的 CD19 CAR组合使用。例如,靶向TIM3的抗体,抗体片段,小分子或肽抑制剂结合TIM3的IgV 结构域以抑制与其配体的相互作用。抑制TIM3的抗体和肽公开在WO2013/006490和US20100247521中。其他抗TIM3抗体包括RMT3-23(公开于Ngiow et al.,2011,Cancer Res,71:3540-3551)和克隆8B.2C12(公开在Monney et al.,2002,Nature,415:536-541)的人源化形 式。在US20130156774中公开了抑制TIM3和PD-1的双特异性抗体。

[1212] 在一个实施方案中,抗TIM3抗体或其片段是US 2015/0218274(标题为“针对TIM3的抗 体分子及其用途”,其全部内容通过引用并入本文)中所述的抗TIM3抗体分子。在一个实施 方案中,抗TIM3抗体分子包含来自抗体的重链和轻链可变区的至少一个,二个,三个,四个, 五个或六个CDR(或统称为所有CDR),所述抗体选自以下的任何一种:ABTIM3,ABTIM3-hum01,ABTIM3-hum02,ABTIM3-hum03,ABTIM3-hum04,ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06,ABTIM3-hum07,ABTIM3-hum08,ABTIM3-hum09,ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11,ABTIM3-hum12,ABTIM3-hum13,ABTIM3-hum14,ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16,ABTIM3-hum17,ABTIM3-hum18,ABTIM3-hum19,ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21,ABTIM3-hum22,ABTIM3-hum23;或如US 2015/0218274的表1-4所述,或由表 1-4中的核苷酸序列编码,或与上述任何序列基本相同的序列(例如,至少80％,85％,90％,92％, 95％,97％,98％,99％或更高同一性);或密切相关的CDR,例如相同或具有至少一个氨基酸改 变但不超过两个,三个或四个改变(例如,取代,缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[1213] 在另一个实施方案中,抗TIM3抗体分子包含来自本文所述抗体的至少一个,两个,三个 或四个可变区,所述抗体例如选自ABTIM3,ABTIM3-hum01,ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03,ABTIM3-hum04,ABTIM3-hum05,ABTIM3-hum06,ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08,ABTIM3-hum09,ABTIM3-hum10,ABTIM3-hum11,ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13,ABTIM3-hum14,ABTIM3-hum15,ABTIM3-hum16,ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18,ABTIM3-hum19,ABTIM3-hum20,ABTIM3-hum21,ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23的任一种;或如US 2015/0218274的表1-4所述,或由表1-4中的核苷酸序列编 码,或与上述任何序列基本相同的序列(例如,至少80％,85％,90％,92％,95％,97％,98％,99％ 或更高同一性)。

[1214] 在其它实施方案中,增强CAR表达细胞活性的活性剂是CEACAM抑制剂(例如CEACAM-1,CEACAM-3和/或CEACAM-5抑制剂)。在一个实施方案中,CEACAM的抑制 剂是抗CEACAM抗体分子。示例性抗CEACAM-1抗体描述于WO 2010/125571,WO 2013/082366,WO 2014/059251和WO 2014/022332中,例如单克隆抗体34B1,26H7和5F4;或 其重组形式,如例如US 2004/0047858,US 7,132,255和WO 99/052552中所述。在其它实施方 案中,抗CEACAM抗体结合CEACAM-5,如例如Zheng et al.PLoS One.2010Sep 2;5(9).pii: e12529(DOI:

10:1371/journal.pone.0021146)中所述,或与例如WO 2013/054331和US 2014/0271618中所述的CEACAM-1和CEACAM-5交叉反应。

[1215] 不希望受理论束缚,认为癌胚抗原细胞粘附分子(CEACAM),如CEACAM-1和CEACAM-5至少部分地介导抗肿瘤免疫应答的抑制(参见例如,Markel et al.J Immunol.2002 Mar 15;168(6):2803-10;Markel et al.J Immunol.2006Nov 1;177(9):6062-71;Markel et al. Immunology.2009Feb;126(2):186-200;Markel et al.Cancer Immunol Immunother.2010 Feb;59(2):215-30;Ortenberg et al.Mol Cancer Ther.2012Jun;11(6):1300-10;Stern et al.J Immunol.2005Jun 1;174(11):6692-701;Zheng et al.PLoS One.2010Sep 2;5(9).pii:e12529)。例 如,已经将CEACAM-1描述为TIM-3的异嗜性配体,并且在TIM-3介导的T细胞耐受和消耗中 起作用(参见例如WO 2014/022332;Huang,et al.(2014)Nature doi:10.1038/nature13848)。在实 施方案中,CEACAM-1和TIM-3的共同阻断已显示增强异种移植结肠直肠癌模型中的抗肿瘤 免疫应答(参见例如WO 2014/022332;Huang等人(2014),同上)。在其它实施方案中,CEACAM-1和PD-1的共同阻断降低了例如在WO 2014/059251中所述的T细胞耐受性。因此,CEACAM抑制剂可以与本文所述的其它免疫调节剂(例如抗PD-1和/或抗TIM-3抑制剂)一起 使用以增强针对癌症例如黑素瘤,肺癌(例如,NSCLC),膀胱癌,结肠癌,卵巢癌和本文 所述的其它癌症的免疫应答。

[1216] LAG3(淋巴细胞激活基因-3或CD223)是在活化的T细胞和B细胞上表达的细胞表面分子,其已被证明在CD8+T细胞衰竭中起作用。LAG3及其配体的抗体,抗体片段和其他抑制剂在本 领域是可获得的,并且可以与本文所述的CD19 CAR组合使用。例如,BMS-986016(Bristol-Myers Squib)是靶向LAG3的单克隆抗体。IMP701(Immutep)是拮抗剂LAG3抗体,IMP731(Immutep和GlaxoSmithKline)是消耗性LAG3抗体。其他LAG3抑制剂包括IMP321(Immutep),其是LAG3的可溶性部分和Ig的重组融合蛋白,其与MHC II类分子结合并激活抗原呈递细胞(APC)。例如在WO2010/019570公开了其它抗体。

[1217] 在一个实施方案中,抗LAG3抗体或其片段是如US 2015/0259420(标题为“针对LAG3的 抗体分子及其用途”,其全部内容通过引用并入本文)中所述的抗LAG3抗体分子。在一个实 施方案中,抗LAG3抗体分子包含来自选自BAP050-hum01,BAP050-hum02,BAP050-hum03, BAP050-hum04,BAP050-hum05,BAP050-hum06,BAP050-hum07,BAP050-hum08,BAP050-hum09,BAP050-hum10,BAP050-hum11,BAP050-hum12,BAP050-hum13, BAP050-hum14,BAP050-hum15,BAP050-hum16,BAP050-hum17,BAP050-hum18, BAP050-hum19,BAP050-hum20,huBAP050(Ser)(e.g.,BAP050-hum01-Ser,BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser,BAP050-hum04-Ser,BAP050-hum05-Ser,BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser,BAP050-hum08-Ser,BAP050-hum09-Ser,BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser,BAP050-hum12-Ser,BAP050-hum13-Ser,BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser,BAP050-hum18-Ser,BAP050-hum19-Ser,或BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clone-F,BAP050-Clone-G,BAP050-Clone-H,BAP050-Clone-I,或BAP050-Clone-J中 任一种的抗体的重链和轻链可变区的至少一个,二个,三个,四个,五个或六个CDR(或统 称为所有CDR);或如US 2015/0259420的表1所述;或由表1中的核苷酸序列编码;或与上述任 何序列基本相同(例如至80%,85%,90%,92%,95%,97%,98%,99%或更高同一性)的序列, 或密切相关的CDR,

例如,相同或具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个,三个或四个改 变(例如,取代,缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[1218] 在另一个实施方案中,抗LAG3抗体分子包含来自本文所述的抗体,例如选自BAP050-hum01,BAP050-hum02,BAP050-hum03,BAP050-hum04,BAP050-hum05, BAP050-hum06,BAP050-hum07,BAP050-hum08,BAP050-hum09,BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12,BAP050-hum13,BAP050-hum14,BAP050-hum15, BAP050-hum16,BAP050-hum17,BAP050-hum18,BAP050-hum19,BAP050-hum20, huBAP050(Ser)(例如,BAP050-hum01-Ser,BAP050-hum02-Ser,BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser,BAP050-hum05-Ser,BAP050-hum06-Ser,BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser,BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser,BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser,BAP050-hum13-Ser,BAP050-hum14-Ser,BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser,BAP050-hum19-Ser,或BAP050-hum20-Ser),BAP050-Clone-F, BAP050-Clone-G,BAP050-Clone-H,BAP050-Clone-I,或BAP050-Clone-J的抗体的至少一个, 两个,三个或四个可变区;或如US 2015/0259420的表1所述;或由表1中的核苷酸序列编码;或与 上述任何序列基本相同(例如,至少80%,85%,90%,92%,95%,97%,98%,99%或更高同一性) 的序列。

[1219] 虽然不希望被理论束缚,但是在一些实施方案中,由于由PD-L1+表达细胞或PD1+T细 胞在肿瘤内微环境中的存在所发挥的直接或间接抑制作用,肿瘤微环境不利于攻击癌细胞的 CART细胞。更具体地,肿瘤微环境可以包含肿瘤细胞(通常是CD19+),免疫效应细胞(其 可以是CD3+T细胞,并且可以是PD1+或PD1-,并且其可以是内源性细胞或CAR表达细胞), 和被激活的髓系细胞(通常为PD-L1+)。PD1+T细胞可以通过阻止CART细胞进入肿瘤而在肿瘤微环境周围产生“屏障”。根据本文的非限制性理论,PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂的预施用使肿瘤微环境更有利于CAR表达细胞进入肿瘤微环境并有效清除靶阳性癌细胞。本文,例如在实施例20和21中提供了支持该模型的数据。

[1220] 因此,在某些方面,本公开提供了组合疗法的方法,其包括向受试者施用表达结合CD19 的CAR分子,例如CD19 CAR的细胞,与PD1抑制剂,PD-L1抑制剂或两者的组合。在一 些实施方案中,在CAR疗法之前施用PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂。在其它实施方案中, PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂与CAR疗法同时或之后施用。在一些方面,受试者是具有与 CD19表达相关的疾病(例如血液恶性肿瘤,例如白血病或淋巴瘤,例如DLBCL,例如原发 性DLBCL)的受试者。在一些实施方案中,患者具有或被鉴定为具有升高的PD1,PDL1或 CD3的水平,或其任何组合。在一些实施方案中,患者具有或被鉴定为具有至少5%,6%,7%, 8%,9%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,或90%的对于CD3和PD1呈阳性的 DLBCL细胞。

[1221] 本文还提供了用于监测CAR疗法(例如CD19 CAR疗法)的功效的方法。可以将CAR表达细胞施用于患者的血液,意图是将细胞归巢于肿瘤细胞,例如渗透肿瘤。因此,在一些实施方案中,该方法包括测定肿瘤样品中CAR表达细胞的存在。在实施方案中,该方法包括检测肿瘤标志,例如CD19。在实施方案中,该方法包括检测CAR表达细胞的标志,例如CAR 构建体或编码CAR构建体的核酸。在实施方案中,所述方法还包括检测T细胞标志,例如 CD3。在一些方面,受试者是具有与CD19表达相关的疾病,例如血液恶性肿瘤,例如白血 病或淋巴瘤,例如DLBCL,例如原发性DLBCL的受试者。在一些实施方案中,如果CAR 表达细胞显示

出差的肿瘤浸润,则与具有良好的肿瘤浸润的受试者相比,受试者被鉴定为具 有升高的复发的风险。在一些实施方案中,如果CAR表达细胞显示差的肿瘤浸润,则对受试 者施用PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂,例如与第二剂量的CAR表达细胞组合。

[1222] 在一些实施方案中,增强CAR表达细胞活性的活性剂可以是例如包含第一结构域和第二 结构域的融合蛋白,其中第一结构域是抑制性分子或其片段,第二结构域是与阳性信号相关 的多肽,例如包含如本文所述的细胞内信号传导结构域的多肽。在一些实施方案中,与阳性 信号相关的多肽可以包括CD28,CD27,ICOS的共刺激结构域,例如CD28,CD27和/或ICOS 的细胞内信号传导结构域和/或例如,如本文所述的CD3ζ的主要信号传导结构域。在一个实施 方案中,融合蛋白由表达CAR的相同细胞表达。在另一个实施方案中,融合蛋白由细胞,例 如不表达抗CD19 CAR的T细胞表达。

[1223] 在一个实施方案中,增强本文所述CAR表达细胞活性的活性剂是miR-17-92。

[1224] 在一个实施方案中,增强本文所述CAR活性的活性剂是细胞因子。细胞因子具有与T细 胞扩增,分化,存活和内稳态相关的重要功能。可以向接受本文所述的CAR表达细胞的受试 者施用的细胞因子包括:IL-2,IL-4,IL-7,IL-9,IL-15,IL-18和IL-21,或其组合。在实施方 案中,施用的细胞因子是IL-7,IL-15或IL-21,或其组合。细胞因子可以每天一次或多于一次, 例如每天两次,每天三次,或每天四次施用。细胞因子可以施用超过一天,例如施用细胞因 子2天,3天,4天,5天,6天,1周,2周,3周或4周。例如,细胞因子每天施用一次,为期7 天。

[1225] 在实施方案中,细胞因子与CAR表达细胞组合施用。细胞因子可以与CAR表达细胞同时 或并发施用,例如在同一天施用。细胞因子可以与CAR表达细胞在相同的药物组合物中制备, 或者可以在单独的药物组合物中制备。或者,可以在施用CAR表达T细胞后不久施用细胞因 子,例如在施用CAR表达细胞后1天,2天,3天,4天,5天,6天或7天施用。在细胞因子以超 过一天发生的给药方案给药的实施方案中,细胞因子给药方案的第一天可以与用CAR表达细 胞施用在同一天或细胞因子给药方案的第一天可以在施用CAR表达T细胞后1天,2天,3天, 4天,5天,6天或7天。在一个实施方案中,在第一天,向受试者施用CAR表达细胞,并且在 第二天,在接下来的7天中每天一次施用细胞因子。在一个实施方案中,与CAR表达细胞组合 施用的细胞因子是IL-7,IL-15和/或IL-21。

[1226] 在其它实施方案中,在施用CAR表达细胞后足够的时间内,例如在施用CAR表达细胞后 至少2周,3周,4周,6周,8周,10周,12周,4个月,5个月,6个月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月,或1年或以上施用细胞因子。在一个实施方案中,在评估受试者对表达CAR的细胞的应答后施用细胞因子。例如,根据本文所述的剂量和方案,对受试者施用CAR表达细胞。在施用CAR表达细胞后2周,3周,4周,6周,8周,10周,12周,4个月,5个月,6个 月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月或1年或更长时间时,使用本文所述的任何方法, 包括肿瘤生长的抑制,循环肿瘤细胞的减少或肿瘤消退,评估受试者对CART治疗的应答。对 CART治疗没有表现出足够应答的受试者可以被施用细胞因子。对CART治疗具有次优应答的 受试者的细胞因子施用改善了CART功效和/或抗肿瘤活性。在一个实施方案中,在施用CAR 表达细胞后施用的细胞因子是IL-7。

[1227] 进一步的联合治疗可以包括抗过敏剂,止吐剂,止痛剂,辅助疗法。

[1228] 在给药期间或之后,一些患者可能对本文所述的治疗剂和/或其它抗癌剂产生过

敏反应；因此，通常施用抗过敏剂以最小化过敏反应的风险。合适的抗过敏剂包括皮质类固醇，例如 地塞米松(例如，Decadron®)，倍氯米松(例如Beclovent®)，氢化可的松(也称为可的松，氢化可的松琥珀酸钠，氢化可的松磷酸钠，并以商品名Ala-Cort ®，氢化可的松磷酸盐， Solu-Cortef®, HydrocortAcetate® 和 Lanacort® 出售)，泼尼松龙(以商品名Delta-Cortel®, Orapred®, Pediapred®和Prelone®出售)，泼尼松(以商品名Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten®和Orasone®出售)，甲基泼尼松龙(也称为6-甲基泼尼松龙，乙酸甲泼尼龙，甲 泼尼龙琥珀酸钠，以商品名Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® 和 Solu-Medrol® 销售)；抗组胺药，如苯海拉明(如Benadryl®)，羟嗪和赛庚啶；和支气管扩张剂，例如β-肾 上腺素能受体激动剂，沙丁胺醇(例如Proventil®)和特布他林(Brethine®) 。

[1229] 一些患者在施用本文所述的治疗剂和/或其它抗癌剂期间和之后可能会感到恶心；因此，止 吐药可用于预防恶心(上胃)和呕吐。合适的止吐药包括阿瑞匹坦(Emend®)，昂丹司琼 (Zofran®)，格拉司琼HCl(Kytril®)，劳拉西泮(Ativan®)，地塞米松(Decadron®)，丙 氯拉嗪(Compazine®)，casopitant(Rezonic®和Zunrisa®)，及其组合。

[1230] 缓解治疗期间经历的疼痛的药物通常被处方为使患者更舒适。通常使用常用的非处方镇 痛药，如Tylenol®。然而，阿片类镇痛药如氢可酮/扑热息痛或氢可酮/对乙酰氨基酚(例如，Vicodin®，吗啡(例如，Astramorph®或Avinza®)，羟考酮(例如，OxyContin® 或Percocet®)， 盐酸羟吗啡酮(Opana®) ，和芬太尼(如Duragesic®)也适用于中度或重度疼痛。

[1231] 在保护正常细胞免于治疗毒性，并限制器官毒性的努力中，细胞保护剂(如神经保护剂， 自由基清除剂，心脏保护剂，蒽环类外渗中和剂，营养物等)可被用作一种辅助疗法。合适 的细胞保护剂包括氨磷汀(Ethyol®)，谷氨酰胺，地美司钠(Tavocept®)，美司钠(Mesnex®)，右丙亚胺(Zinecard®或Totect®)，扎利罗登(Xaprila®) ，和亚叶酸(也称为甲酰四氢叶酸 钙，噬橙菌因子和亚叶酸)。

[1232] 通过代号，通用名称或商品名称确定的活性化合物的结构可以从标准简编“默克索引”的 实际版本中获取，或从数据库，例如，Patents International(如IMS World Publications)获取。

[1233] 可以与本发明化合物组合使用的上述化合物可以如本领域所述，例如上述文献所述制备 和施用。

[1234] 在一个实施方案中，本发明提供药物组合物，其包含至少一种本发明的化合物(例如本 发明的化合物)或其药学上可接受的盐以及适用于施用于人或动物受试者的药学上可接受的 载体一起，单独或与其他抗癌剂一起。

[1235] 在一个实施方案中，本发明提供了治疗患有诸如癌症的细胞增殖性疾病的人或动物受试 者的方法。本发明提供了治疗需要这种治疗的人或动物受试者的方法，包括向受试者单独或 与其他抗癌剂组合施用治疗有效量的本发明化合物(例如本发明化合物)或其药学上可接受 的盐。

[1236] 特别地,组合物将作为组合治疗剂配制在一起或分别施用。

[1237] 在组合治疗中,本发明的化合物和其它抗癌剂可以同时,并发或相继地施用,没有特定 时间限制,其中这种施用在患者体内提供治疗有效水平的两种化合物。

[1238] 在优选的实施方案中,本发明化合物和其它抗癌剂通常通过输注或口服以任何顺序依次 施用。给药方案可以根据疾病的阶段,患者的身体适应性,各种药物的安全性谱以及各种药 物的耐受性以及施用组合的主治医师和医师所熟知的其它标准而变化。根据用于治疗的特定 周期,本发明的化合物和其它抗癌剂可以在彼此分开的几分钟内,几小时,几天或甚至几周 内施用。此外,该周期可以包括在治疗周期期间施用一种药物比施用另一种药物更经常以及 每次药物施用以不同剂量施用。

[1239] 在本发明的另一方面,提供了包括一种或多种本发明化合物和本文公开的组合配偶体的 药盒。代表性的药盒包括(a)本发明的化合物或其药学上可接受的盐,(b)至少一种组合 配偶体,例如如上所述,其中该药盒可以包含包装插页或包括给药指导的其他标签。

[1240] 本发明的化合物也可以与已知的治疗过程例如,激素或特别是辐射的施用组合使用。本 发明的化合物可特别用作放射增敏剂,特别是用于治疗对放射疗法显示差的敏感性的肿瘤。

[1241] 与低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂组合

[1242] 在一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述的CAR分子的细胞与低的免疫增强剂 量的mTOR抑制剂组合施用。例如,在一个实施方案中,组合疗法包括:CD19 CAR表达细胞, B细胞抑制剂(CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一种或多种的抑制剂, 例如靶向CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种的CAR表达细 胞)和mTOR抑制剂。本文描述的方法使用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如变构mTOR 抑制剂,包括rapalogs如RAD001。施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,不足以完 全抑制免疫系统但足以改善免疫功能的剂量)可以优化受试者中免疫效应细胞(例如T细胞或 CAR表达细胞)的性能。用于测量mTOR抑制,剂量,治疗方案和合适的药物组合物的方法 描述于美国专利申请号2005/01240036中,其通过引用并入本文。

[1243] 在一个实施方案中,施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂可导致以下的一种或多种:

[1244] i)PD-1阳性免疫效应细胞数量的减少;

[1245] ii)PD-1阴性免疫效应细胞数量的增加;

[1246] iii)PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞比例的增加;

[1247] iv)初始T细胞数量的增加;

[1248] v)例如在记忆性T细胞,例如记忆性T细胞前体上一种或多种以下标志的表达的增加:$CD62L^{高}$,$CD127^{高}$,$CD27^{+}$,和BCL2;

[1249] vi)例如在记忆性T细胞,例如记忆性T细胞前体上KLRG1的表达的降低;或

[1250] vii)记忆T细胞前体的数量增加,例如具有以下特征的任何一种或组合的细胞:增加的$CD62L^{高}$,增加的$CD127^{高}$,增加的$CD27^{+}$,减少的KLRG1和增加的BCL2;

[1251] 并且其中前述任何一种,例如,i),ii),iii),iv),v),vi),或vii)例如至少例如短暂地 发生,例如与未治疗的受试者相比短暂地发生。

[1252] 在另一个实施方案中,例如与未处理的CAR-表达细胞或未经治疗的受试者相比,

例如在 培养物或受试者中，施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂导致CAR表达细胞的增殖或延长 的增殖或持续性。在实施方案中，增加的增殖或持续性与CAR表达细胞数量的增加相关。测 量增加的或延长的增殖的方法描述于实施例18和19中。在另一个实施方案中，施用低的免疫 增强剂量的mTOR抑制剂导致例如，在培养物或受试者中通过CAR表达细胞增加的癌细胞杀 伤，例如与未处理的CAR表达细胞或未处理的受试者相比。在实施方案中，癌细胞的增加的 杀伤与肿瘤体积的减少相关。

[1253] 在一个实施方案中，表达CAR分子(例如本文所述的CAR分子)的细胞与低的免疫增强剂 量的mTOR抑制剂(例如变构mTOR抑制剂，例如RAD001)或催化性mTOR抑制剂组合施用。例 如，施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂可以在施用本文所述的CAR表达细胞之前开始；在 施用本文所述的CAR-表达细胞之前完成；在施用本文所述的CAR-表达细胞的同时起始；与 施用本文所述的CAR-表达细胞重叠；或在施用本文所述的CAR表达细胞后继续。

[1254] 或者或另外，施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂可优化待工程化以表达本文所述的 CAR分子的免疫效应细胞。在这样的实施方案中，在从受试者收获待工程化以表达本文所述 的CAR分子的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)之前开始或完成施用低的免疫增强剂量的 mTOR抑制剂(例如变构抑制剂，例如RAD001)或催化性抑制剂。

[1255] 在另一个实施方案中，待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞(例如T细胞 或NK细胞)(例如在从受试者收获后)或表达CAR的免疫效应细胞，例如T细胞或NK细胞，例如 在施用于受试者之前，可以在低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂的存在下进行培养。

[1256] 在一个实施方案中，向受试者施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括例如每周一次， 例如以立即释放剂型施用0.1至20,0.5至10,2.5至7.5,3至6，或约5mg的RAD001，或其生物等效 剂量。在一个实施方案中，对受试者施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括例如每周一 次,例如以持续释放剂型施用0.3至60,1.5至30,7.5至22.5,9至18，或约15mg的RAD001，或其生 物等效剂量。

[1257] 在一个实施方案中，mTOR抑制剂的剂量与至少5％但不超过90％、至少10％但不超过90％、 至少15％但不超过90％、至少20％但不超过90％、至少30％但不超过90％、至少40％但不超过 90％、至少50％但不超过90％、至少60％但不超过90％，至少70％但不超过90％，至少5％但不 超过80％、至少10％但不超过80％、至少15％但不超过80％、至少20％但不超过80％、至少30％ 但不超过80％、至少40％但不超过80％、至少50％但不超过80％，至少60％但不超过80％，至 少5％但不超过70％、至少10％但不超过70％、至少15％但不超过70％、至少20％但不超过70％、 至少30％但不超过70％、至少40％但不超过70％，至少50％但不超过70％，至少5％但不超过 60％、至少10％但不超过60％、至少15％但不超过60％、至少20％但不超过60％、至少30％但 不超过60％，至少40％但不超过60％，至少5％但不超过50％、至少10％但不超过50％、至少15％ 但不超过50％、至少20％但不超过50％、至少30％但不超过50％，至少40％但不超过50％，至少5％ 但不超过40％、至少10％但不超过40％、至少15％但不超过40％、至少20％但不超过40％、至 少30％但不超过40％、至少35但不超过40％，至少5％但不超过30％、至少10％但不超过30％、 至少15％但不超过30％、至少20％但不超过30％或至少25％但不超过30％的mTOR抑制有关或 提供上述mTOR抑制。

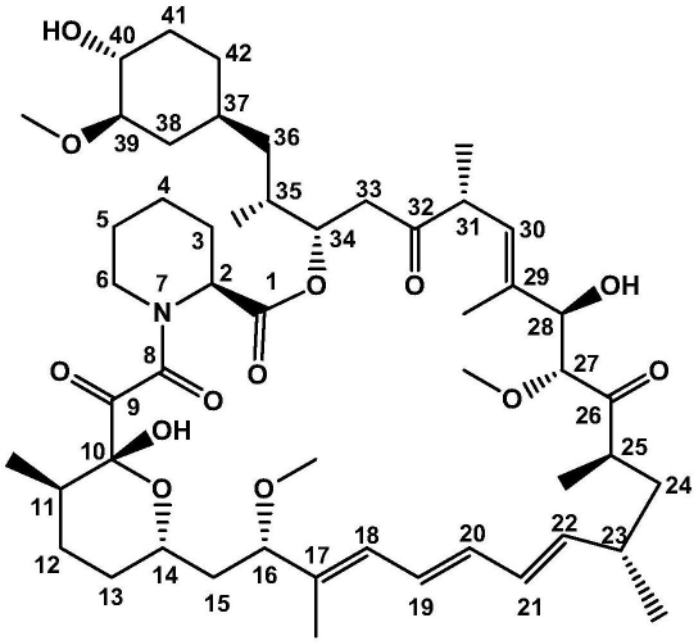
[1258] mTOR抑制的程度可以传达为或者对应于P70 S6激酶抑制的程度，例如，mTOR抑制

程度 可以通过P70 S6激酶活性的降低水平(例如P70 S6激酶底物磷酸化的降低)来确定。mTOR 抑制水平可以通过各种方法评价,例如通过Boulay测定法测量P70 S6激酶活性,如美国专利 申请号2005/01240036中所述,其通过引用并入本文,或如美国专利号7,727,950所述,通其过 引用并入本文;通过蛋白质印迹法测定磷酸化S6的水平;或评估PD1阴性免疫效应细胞与 PD1阳性免疫效应细胞的比例的变化。

[1259] 如本文所用,术语“mTOR抑制剂”是指抑制细胞中mTOR激酶的化合物或配体或其药学上 可接受的盐。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构抑制剂。变性mTOR抑制剂包括中性三 环化合物雷帕霉素(西罗莫司),雷帕霉素相关化合物,其是与雷帕霉素具有结构和功能相 似性的化合物,包括例如雷帕霉素衍生物,雷帕霉素类似物(也称为rapalog)和抑制mTOR 活性的其它大环内酯化合物。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化抑制剂。

[1260] 雷帕霉素是吸水链霉菌(Streptomyces hygroscopicus)生产的已知的大环内酯类抗生素, 具有式A所示结构。

[1261]



(A)

[1262] 参见,例如,McAlpine,J.B.等人,J.Antibiotics(1991)44:688;Schreiber,S.L.等人,J.Am. Chem.Soc.(1991)113:7433;U.S.Patent No.3,929,992。有许多种为雷帕霉素提出的编号方案。为了避免混乱,当本文中给具体的雷帕霉素类似物命名时,参考雷帕霉素,利用式A的编号 方案给出名称。

[1263] 可用于本发明中的雷帕霉素类似物例如是O-取代的类似物,其中雷帕霉素的环己基环上 的羟基被OR_1替代,其中R_1是羟基烷基、羟基烷氧基烷基、酰基氨基烷基或氨基烷基;例如 RAD001,也被称为依维莫司,如US 5,665,772和WO94/09010中描述,将其内容并入作为参 考。

[1264] 其它合适的雷帕霉素类似物包括在第26-或28-位取代的那些。所述的雷帕霉素类似物可 以是前面提到的类似物的差向异构体,特别是在第40,28或26位取代的并且可以任选地进一 步被氢化的类似物的差向异构体,例如如US 6,015,815、WO95/14023和WO99/15530中描述 的那样,将其内容并入作为参考,例如ABT578也被称为zotarolimus或在US

7,091,213、WO98/02441和WO01/14387中描述的雷帕霉素类似物,将其内容并入作为参考,例如 AP23573,也被称为ridaforolimus。

[1265] 适用于本发明中的来自US 5,665,772的雷帕霉素类似物的例子包括但不限于:40-O-苄基- 雷帕霉素,40-O-(4'-羟基甲基)苄基-雷帕霉素,40-O-[4'-(1,2-二羟基乙基)]苄基-雷帕霉素, 40-O-烯丙基-雷帕霉素,40-O-[3'-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4(S)-基)-丙-2'-烯-1'-基]-雷帕霉素, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-二羟基戊-2'-烯-1'-基)-雷帕霉素,40-O-(2-羟基)乙氧基羰基甲基-雷帕霉 素,40-O-(2-羟基)乙基-雷帕霉素,40-O-(3-羟基)丙基-雷帕霉素,40-O-(6-羟基)己基-雷帕霉素, 40-O-[2-(2-羟基)乙氧基]乙基-雷帕霉素,40-O-[(3S)-2,2-二甲基二氧戊环-3-基]甲基-雷帕霉素, 40-O-[(2S)-2,3-二羟基丙-1-基]-雷帕霉素,40-O-(2-乙酰氧基)乙基-雷帕霉素,40-O-(2-烟酰氧基) 乙基-雷帕霉素,40-O-[2-(N-吗啉代)乙酰氧基]乙基-雷帕霉素,40-O-(2-N-咪唑基乙酰氧基)乙 基-雷帕霉素,40-O-[2-(N-甲基-N'-哌嗪基)乙酰氧基]乙基-雷帕霉素,39-O-去甲基-39,40-O,O- 亚乙基-雷帕霉素,(26R)-26-二氢-40-O-(2-羟基)乙基-雷帕霉素,40-O-(2-氨基乙基)-雷帕霉素, 40-O-(2-乙酰氨基乙基)-雷帕霉素,40-O-(2-烟酰胺基乙基)-雷帕霉素,40-O-(2-(N-甲基-咪唑并 -2'-基乙氧甲酰氨基)乙基)-雷帕霉素,40-O-(2-乙氧基羰基氨基乙基)-雷帕霉素,40-O-(2-甲苯 磺酰氨基乙基)-雷帕霉素和40-O-[2-(4',5'-二乙氧羰基-1',2',3'-三唑-1'-基)-乙基]-雷帕霉素。

[1266] 可用于本发明中的其它雷帕霉素类似物是其中雷帕霉素的环己基环上的羟基和/或在第 28位的羟基被羟基酯基替代的类似物,例如,在US RE44,768中发现的雷帕霉素类似物,例如 坦罗莫司。

[1267] 可用于本发明中的其它雷帕霉素类似物包括其中在第16位的甲氧基被另一个取代基替 代的那些,例如,(任选地羟基取代的)炔基氧基,苄基,正甲氧基苄基或氯代苄基和/或其中在 第39位的甲氧基与所述的第39位的碳一起被缺失,使得雷帕霉素的环己基环变成缺少所述 的第39位的甲氧基的环戊基环的那些;例如如WO95/16691和WO96/41807中描述的那样, 将其内容并入作为参考。可以进一步修饰所述的类似物,使得雷帕霉素第40位的羟基被烷基 化和/或所述的第32位的羰基被还原。

[1268] 来自WO95/16691的雷帕霉素类似物包括但不限于:16-去甲氧基-16-(戊-2-炔基)氧基-雷 帕霉素,16-去甲氧基-16-(丁-2-炔基)氧基-雷帕霉素,16-去甲氧基-16-(炔丙基)氧基-雷帕霉素, 16-去甲氧基-16-(4-羟基-丁-2-炔基)氧基-雷帕霉素,16-去甲氧基-16-苄基氧基-40-O-(2-羟基乙 基)-雷帕霉素,16-去甲氧基-16-苄基氧基-雷帕霉素,16-去甲氧基-16-正-甲氧基苄基-雷帕霉素, 16-去甲氧基-40-O-(2-甲氧基乙基)-16-戊-2-炔基)氧基-雷帕霉素,39-去甲氧基-40-脱氧-39-甲 酰基-42-去甲-雷帕霉素,39-去甲氧基-40-脱氧-39-羟基甲基-42-去甲-雷帕霉素,39-去甲氧基 -40-脱氧-39-羧基-42-去甲-雷帕霉素,39-去甲氧基-40-脱氧-39-(4-甲基-哌嗪-1-基)羰基-42-去 甲-雷帕霉素,39-去甲氧基-40-脱氧-39-(吗啉-4-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素,39-去甲氧基-40-脱 氧-39-[N-甲基,N-(2-吡啶-2-基-乙基)]氨基甲酰基-42-去甲-雷帕霉素和39-去甲氧基-40-脱氧-39-(对-甲苯磺酰基亚肼基甲基)-42-去甲-雷帕霉素。

[1269] 来自WO96/41807的雷帕霉素类似物包括但不限于:32-脱氧-雷帕霉素,16-O-戊-2-炔基 -32-脱氧-雷帕霉素,16-O-戊-2-炔基-32-脱氧-40-O-(2-羟基-乙基)-雷帕霉素,

16-O-戊-2-炔基 -32-(S)-二氢-40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素,32(S)-二氢-40-O-(2-甲氧基)乙基-雷帕霉素和32(S)- 二氢-40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素。

[1270] 另一种合适的雷帕霉素类似物是如US2005/010162 4中描述的umirolimus,将该文献并入 本文作为参考。

[1271] RAD001,另外被称为依维莫司(Afinitor®),具有化学名称(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-二羟基 -12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟基乙氧基)-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基}-19,30-二甲氧基 -15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂-三环[30.3.1.04,9]三十六烷-16,24,26,28-四烯 -2,3,10,14,20-五酮,如在US 5,665,772和WO94/09010中描述,将其各自内容并入本文作文参考。

[1272] 别构的mTOR抑制剂的另外的例子包括西罗莫司(雷帕霉素,AY-22989),40-[3-羟基 -2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸酯]-雷帕霉素(也被称为坦罗莫司或CCI-779)和ridaforolimus (AP-23573/MK-8669)。其它别构的mTOR抑制剂的例子包括zotarolimus (ABT578)和 umirolimus。

[1273] 备选地或此外,已经发现了催化性的、ATP-竞争性的mTOR抑制剂直接靶向所述的mTOR激酶结构域并且靶向mTORC1和mTORC2两者。这些也是比诸如雷帕霉素的别构的 mTOR抑制剂更加有效的mTORC1的抑制剂,因为它们调控雷帕霉素抗性的mTORC1输出, 例如4EBP1-T37/46磷酸化和帽依赖性翻译。

[1274] 催化性抑制剂包括:BEZ235或2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基-2,3-二氢-咪唑 并[4,5-c]喹啉-1-基)-苯基]-丙腈,或单甲苯磺酸盐形式。(BEZ235的合成被描述在 WO2006/122806中);CCG168(另外被称为AZD-8055,Chresta,C.M.等人,Cancer Res, 2010, 70(1),288-298),它具有化学名称{5-[2,4-双-((S)-3-甲基-吗啉-4-基)-吡啶并[2,3d]嘧啶-7-基]-2- 甲氧基-苯基}-甲醇;3-[2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N-甲基苯甲酰 胺(WO09104019);3-(2-氨基苯并[d]噁唑-5-基)-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (WO10051043和WO2013023184);N-(3-(N-(3-((3,5-二甲氧基苯基)氨基)喹喔啉-2-基)氨磺酰 基)苯基)-3-甲氧基-4-甲基苯甲酰胺(WO07044729和WO12006552);PKI-587(Venkatesan, A.M.,J.Med.Chem.,2010,53,2636-2645),它具有化学名称1-[4-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-羰基] 苯基]-3-[4-(4,6-二吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲;GSK-2126458(ACS Med.Chem.Lett.,2010, 1,39-43),它具有化学名称2,4-二氟-N-{2-甲氧基-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰 胺;5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺(WO10114484);和(E)-N-(8-(6-氨基-5-(三氟甲基)吡啶-3-基)-1-(6-(2-氰基丙烷-2-基)吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉 -2(3H)-亚基)氰胺(WO12007926)。

[1275] 催化性的mTOR抑制剂的进一步例子包括8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基 -3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮(WO2006/122806)和Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM等人,BiochemJ.,2009,421(1),29-42。Ku-0063794是哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR)的特异性的抑制剂)。WYE-354是催化性的mTOR抑制剂的另一个例子(Yu K等人 (2009).Biochemical,Cellular,and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of

Rapamycin.Cancer Res.69(15):6232-6240)。

[1276] 根据本发明有用的mTOR抑制剂还包括前述任一一种的前药、衍生物、药学上可接受的 盐或其类似物。可以基于本领域中成熟的方法,基于本文中描述的特定剂量,配制mTOR抑制 剂,例如RAD001用于递送。特别地,美国专利号6,004,973(并入本文作为参考)提供了可以 与本文中描述的mTOR抑制剂一起使用的制剂的例子。

[1277] 评估CAR有效性或样品适用性的方法和生物标志物

[1278] 本公开尤其提供了指示用CAR疗法治疗的癌症患者是否可能复发或已经复发的基因特 征。不希望受理论束缚,实施例12中列出了该基因特征的实验基础。

[1279] 在一个实施方案中,本文所述的新的转录基因特征(例如,在实施例12中的表29中)用 于使制造的产品改进,从而降低患者复发的可能性。在一个实施方案中,本文所述的基因特 征用于修饰制成品的治疗应用,从而降低患者复发的可能性。

[1280] 在一个实施方案中,本文所述的基因特征(例如,在实施例12中的表29中)在用CAR表 达细胞治疗,例如CART治疗(例如,CART19治疗,例如CTL019疗法)前在受试者中鉴定,所述基因特征表达预测对CAR治疗的复发。在一个实施方案中,本文所述的基因特征在单采血液成分术样品或骨髓样品中鉴定。在一个实施方案中,本文所述的基因特征在输注前在制 备的CAR表达细胞产品例如CART产品(例如CART19产品,例如CTL019)中鉴定。

[1281] 本公开还例如在实施例12中提供了证据:(不希望受理论束缚)在单采血液成分术前或在 制备CART产品期间降低患者中的T_{REG}特征降低了患者复发的风险。

[1282] 在一个实施方案中,患者在用于CAR产品制造(例如CART产品制造)的细胞收集之前 用一种或多种减少T_{REG}细胞的疗法进行预治疗,从而降低患者对CAR表达细胞治疗(例如, CTL019治疗)复发的风险。减少T_{REG}细胞的方法包括但不限于环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25- 消耗及其组合。

[1283] 在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,将患者用环磷酰胺 或抗GITR抗体预治疗,从而降低患者对表达CAR的细胞治疗(例如CTL019治疗)复发的风 险。

[1284] 在一个实施方案中,修饰CAR表达细胞的制备方法以在制备表达CAR的细胞产物(例如 CTL019产品)之前消耗T_{REG}细胞。在一个实施方案中,在制备表达CAR的细胞产品(例如, CTL019产品)之前,使用CD25消耗来消耗T_{REG}细胞。

[1285] 在一个实施方案中,在用减少T_{REG}细胞的治疗来治疗患者或CAR表达细胞产物后,用组 合疗法治疗患者。组合疗法可以包括例如CD19抑制剂,例如CD19 CAR表达细胞,以及一种 或多种B细胞抑制剂,例如本文所述的B细胞抑制剂。

[1286] 在一个实施方案中,测定患者在患者样品中的T_{REG}细胞的水平,例如包含癌细胞的样品 和/或代表肿瘤微环境的样品。在一个实施方案中,该信息用于确定患者的治疗过程。例如, 在一个实施方案中,如果与对照相比,将患者鉴定为具有升高水平的T_{REG}细胞,则该疗法包 括施用除了表达CAR的细胞以外的治疗。例如,疗法可以包括施用抗体分子,施用小分子治 疗剂,手术或放射治疗,或其任何组合。该疗法可靶向一种或多种B细胞抗原。

[1287] 在一个实施方案中,复发者是具有或被鉴定为与非复发者相比具有以下基因中的一种或 多种(例如,2,3,4或全部)的增加的表达水平(例如,RNA水平的增加):MIR199A1,MIR1203, uc021ovp,ITM2C和HLA-DQB1和/或与非复发者相比具有以下基因中的一种或多

种(例如，2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,或全部)的降低的表达水平(例如,RNA水平的降低):PPIAL4D，TTTY10,TXLNG2P,MIR4650-1,KDM5D,USP9Y,PRKY,RPS4Y2,RPS4Y1,NCRNA00185,SULT1E1,和EIF1AY的患者。

[1288] 在另一方面,本发明的特征在于评估或监测受试者(例如,患有癌症的受试者)中的CAR 表达细胞疗法的有效性的方法,或样品(例如,单采血液成分样品)用于CAR疗法,例如包括 施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂的疗法的适合性。该方法包括获得对CAR疗法的有 效性或样品适合性值,其中所述值指示CAR表达细胞疗法的有效性或适合性。

[1289] 在实施方案中,对CAR疗法的有效性或样品适合性的值包括以下的一,二,三,四,五，六个或更多(所有)的量度:

[1290] (i)在样品(例如,单采血液成分样品或制造的CAR-表达细胞产物样品)中静息T_{EFF}细胞，静息T_{REG}细胞,年轻T细胞(例如,年轻CD4或CD8细胞或γ/δT细胞)或早期记忆T细胞或 其组合的一种,两种,三种或更多种(例如全部)的水平或活性;

[1291] (ii)在样品(例如,单采血液成分样品或制造的CAR-表达细胞产物样品)中活化的T_{EFF}细 胞,活化的T_{REG}细胞,较老的T细胞(例如,较老的CD4或CD8细胞)或晚期记忆T细胞或其组合的一种,两种,三种或更多种(例如全部)的水平或活性;

[1292] (iii)在样品(例如,单采血液成分样品或制造的CAR-表达细胞产物样品)中免疫细胞衰竭 标记物,例如一种,两种或更多种免疫检查点抑制剂(例如,PD-1,PD-L1,TIM-3和/或LAG-3) 的水平或活性。在一个实施方案中,免疫细胞具有消耗的表型,例如共表达至少两种消耗标 记物,例如共表达PD-1和TIM-3。在其他实施方案中,免疫细胞具有消耗的表型,例如共表 达至少两种消耗标记物,例如共表达PD-1和LAG-3;

[1293] (iv)在样品(例如,单采血液成分样品或制造的CAR-表达细胞产物样品)中的CD27和/或 CD45RO-(例如CD27+CD45RO-)免疫效应细胞(例如在CD4+或$CD8^+$T细胞群体中)的水平或 活性;

[1294] (v)选自CCL20,IL-17a和/或IL-6,PD-1,PD-L1,LAG-3,TIM-3,CD57,CD27,CD122,CD62L,KLRG1的一种,两种,三种,四种,五种,十种,十二种或更多种生物标记的水平 或活性;

[1295] (vi)在表达CAR的细胞产物样品中的细胞因子水平或活性(例如,细胞因子的质量);或

[1296] (vii)在制造的CAR表达细胞产物样品中的CAR表达细胞的转导效率。

[1297] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,CAR表达细胞疗法包含多个(例如,群体)表 达CAR的免疫效应细胞,例如多个(例如,群体)T细胞或NK细胞,或其组合。在一个实施 方案中,CAR表达细胞疗法包括施用低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂。

[1298] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,(i)-(vii)中的一种或多种的测量从获自受试者 的单采血液成分样品获得。可以在输注或重新输注之前评价单采血液成分样品。

[1299] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,(i)-(vii)中的一种或多种的量度获自制造的 CAR表达细胞产物样品。可以在输注或重新输注之前评估制造的CAR-表达细胞产物。

[1300] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,在接受CAR-表达细胞治疗之前,期间

或之后 评估受试者。

[1301] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，(i)-(vii)中的一种或多种的量度评估基因表达，流式细胞术或蛋白质表达中的一种或多种的谱。

[1302] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，所述方法还包括基于(i)-(vii)中的一个或多个 的测量，将受试者鉴定为应答者，非应答者，复发者或非复发者。

[1303] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，应答者(例如完全应答者)具有或被鉴定为与 非反应者相比具有GZMK，PPF1BP2或幼稚T细胞的一种，两种或更多种(全部)的更高水平 或活性。

[1304] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，非应答者具有或被鉴定为与应答者相比具有 IL22，IL-2RA，IL-21，IRF8，IL8，CCL17，CCL22，效应T细胞或调节性T细胞一种，两种，三种，四种，五种，六种，七种或更多种(例如全部)的更高的水平或活性。

[1305] 在一个实施方案中，与非复发者相比，复发者是具有或者被鉴定为与非复发者相比具有 下述基因中的一个或多个(例如，2，3，4或全部)的表达水平增加:MIR199A1，MIR1203，uc021ovp， ITM2C，和/或与非复发者相比具有下述基因中的一个或多个(例如，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11， 或全部)的表达水平降低的患者:PIAL4D，TTTY10，TXLNG2P，MIR4650-1，KDM5D，USP9Y， PRKY，RPS4Y2，RPS4Y1，NCRNA00185，SULT1E1，和EIF1AY。

[1306] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，与参考值相比，例如，与非应答者$CD8^+$ T细 胞百分比相比，完全应答者具有或被鉴定为具有更大的，例如统计学上显著更大的$CD8^+$T细 胞百分比。

[1307] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，与参考值，例如CD27+CD45RO-免疫效应细胞 的非应答者数目相比，完全应答者具有或者被鉴定为具有更高百分比的CD27+CD45RO-免疫 效应细胞，例如在CD8+群体中。

[1308] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，与参考值例如，$CD4^+$T细胞的非应答者百分 比相比，完全应答者或部分应答者具有或者被鉴定为具有更大的，例如统计学上显著更大的 $CD4^+$T细胞百分比。

[1309] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，与参考值(例如静息T_{EFF}细胞，静息T_{REG}细 胞，年轻T细胞(例如，年轻CD4或CD8细胞)或早期记忆T细胞的非应答者数目相比，完 全应答者具有或被鉴定为具有静息T_{EFF}细胞，静息T_{REG}细胞，年轻T细胞(例如，年轻CD4 或CD8细胞或γ/δT细胞)，或早期记忆T细胞，或其组合的一种，两种，三种或更多种(例如 全部)的更大百分比。

[1310] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，与参考值例如，活化的T_{EFF}细胞，活化的T_{REG}细胞，较老的T细胞(例如，较老的CD4或CD8细胞)，或晚期记忆T细胞的应答者数目相比，非应答者具有或被鉴定为具有活化的T_{EFF}细胞，活化的T_{REG}细胞，较老的T细胞(例如， 较老的CD4或CD8细胞)，或晚期记忆T细胞或其组合的一种，两种，三种或更多种(例如全 部)的更大百分比。

[1311] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中，非应答者具有或被鉴定为具有较大百分比的 免疫细胞耗竭标记物，例如一种，两种或更多种免疫检查点抑制剂(例如，PD-1，PD-L1，TIM-3 和/或LAG-3)。在一个实施方案中，与来自应答者的表达PD-1或LAG-3的免疫效应细胞的 百分比相比，非应答者具有或被鉴定为具有较高百分比的表达PD-1，PD-L1或LAG-3

的免 疫效应细胞(例如CD4$^+$T细胞和/或CD8$^+$T细胞)(例如表达CAR的CD4+细胞和/或CD8$^+$T细胞)。

[1312] 在一个实施方案中,非应答者具有或被鉴定为具有较高百分比的具有消耗表型的免疫细 胞,例如共表达至少两种耗竭标记物,例如共表达PD-1,PD-L1和/或TIM-3的免疫细胞。在其他实施方案中,非应答者具有或被鉴定为具有较高百分比的具有消耗表型的免疫细胞, 例如共表达至少两种耗竭标记物,例如共表达PD-1和LAG-3的免疫细胞。

[1313] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,与对CAR表达细胞治疗的应答者(例如,完 全应答者)相比,非应答者在CAR表达细胞群体中具有或被鉴定为具有更大百分比的PD-1/PD-L1+/LAG-3+细胞。

[1314] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,部分应答者在CAR表达细胞群中具有或被鉴 定为具有比应答者更高百分比的PD-1/PD-L1+/LAG-3+细胞。

[1315] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,非应答者在CAR表达细胞群体中具有或被鉴 定为具有PD1/PD-L1+CAR+的耗竭表型和LAG3的共表达。

[1316] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,与应答者(例如,完全应答者)相比较,非应 答者在CAR表达细胞群体中具有或被鉴定为具有更高百分比的PD-1/PD-L1+/TIM-3+细胞。

[1317] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,部分应答者在CAR表达细胞群体中具有或被 鉴定为具有比应答者更高百分比的PD-1/PD-L1+/TIM-3+细胞。

[1318] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,单采血液样品中CD8+CD27+CD45RO-T细胞 的存在是受试者对CAR表达细胞疗法的应答的阳性预测物。

[1319] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,单采血液样品中高百分比的PD1+CAR+和 LAG3+或TIM3+T细胞是受试者对CAR表达细胞疗法的应答的不良预后预测因子。

[1320] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,应答者(例如,完全或部分应答者)具有以下 特征中的一个,两个,三个或更多(或全部):

[1321] (i)与参考值(例如CD27+免疫效应细胞非应答者数目)相比具有更大数目的CD27+免疫 效应细胞;

[1322] (ii)与参考值(例如CD8$^+$T细胞非应答者数目)相比具有更大数目的CD8$^+$T细胞;

[1323] (iii)与参考值(例如,表达一种或多种检查点抑制剂的非应答者数目)相比,具有较低数目 的表达一种或多种检查点抑制剂(例如选自PD-1,PD-L1,LAG-3,TIM-3或KLRG-1或组合) 的免疫细胞;或

[1324] (iv)与参考值,例如静息T_{EFF}细胞,静息T_{REG}细胞,幼稚CD4细胞,未刺激的记忆细胞或早期记忆性T细胞的非应答者数目相比,具有更多数目的静息T_{EFF}细胞,静息T_{REG}细胞, 幼稚CD4细胞,未刺激的记忆细胞或早期记忆性T细胞的一种、两种、三种、四种或更多种 (全部)或其组合。

[1325] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,(vi)的细胞因子水平或活性选自细胞因子 CCL20/MIP3a,IL17A,IL6,GM-CSF,IFNγ,IL10,IL13,IL2,IL21,IL4,IL5,IL9或TNFα或其组 合的一,二,三,四,五,六,七,八或更多种(或全部)。细胞因子可以选自L-17a,CCL20, IL2,IL6,或TNFa中的一种,两种,三种,四种或更多种(全部)。在一个实施方案中,选自 IL-17a和CCL20中的一种或两种的细胞因子的水平或活性增加指示增加的应答性或

减少的复 发。

[1326] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,(vii)中15%或更高的转导效率指示增加的应 答性或减少的复发。

[1327] 在本文公开的任一方法的一些实施方案中,(vii)中小于15%的转导效率指示降低的反应 性或增加的复发。

[1328] 在实施方案中,可以根据临床标准进一步评价由本文的方法鉴定的应答者,非应答者, 复发者或非复发者。例如,完全应答者具有或被鉴定为患有疾病(例如癌症)的受试者,其展 现对治疗的完全应答,例如完全缓解。可以例如使用如本文所述的NCCN Guidelines®(其全部 内容通过引用并入本文)鉴定完全应答。部分应答者具有或被鉴定为患有疾病(例如癌症)的受 试者,其展现对治疗的部分应答,例如部分缓解。可以例如使用如本文所述的NCCN Guidelines®来鉴定部分应答。非应答者具有或被鉴定为患有疾病(例如癌症)的受试者,其不表 现出对治疗的应答,例如患者具有稳定的疾病或进行性疾病。可以例如使用如本文所述的 NCCNGuidelines®来鉴定非应答者。

[1329] 或者,或与本文公开的方法组合,响应于所述值,执行以下中的一个,两个,三个,四 个或更多:

[1330] 对例如,应答者或非复发者施用CAR-表达细胞疗法;

[1331] 施用改变剂量的CAR表达细胞疗法;

[1332] 改变CAR表达细胞疗法的时间表或时间进程;

[1333] 向例如非应答者或部分应答者施用与CAR表达细胞疗法组合的另外的药剂,例如,检查 点抑制剂,例如本文所述的检查点抑制剂;

[1334] 在用CAR表达细胞疗法治疗之前,向非应答者或部分应答者施用增加受试者中较年轻T 细胞数量的疗法;

[1335] 改变CAR表达细胞疗法的制造过程,例如在引入编码CAR的核酸之前富集较年轻的T 细胞,或例如对于鉴定为非应答者或部分应答者的受试者增加转导效率;

[1336] 施用替代疗法,例如用于非应答者或部分应答者或复发者;或

[1337] 如果受试者是或被鉴定为非应答者或复发者,则减少T_{REG}细胞群体和/或T_{REG}基因特征, 例如通过一种或多种CD25消耗,施用环磷酰胺,抗GITR抗体或其组合。

[1338] 在某些实施方案中,用抗GITR抗体预处理受试者。在某些实施方案中,在输注或再输 注之前用抗GITR抗体治疗受试者。

[1339] 在本文描述的方法的一些实施方案中,对已经用CAR疗法治疗的受试者进行使用FDG-PET/CT(PET/CT)的成像。该测量可以预测对疗法的应答。例如,在实施方案中,测量 代谢活性肿瘤体积(MTV)和/或[11F]-2-氟-2-脱氧-D-葡萄糖(FDG)摄取。在实施方案中, MTV的减少指示应答,例如CR(完全应答)或PR(部分应答),例如,约0的治疗后MTV值 指示CR,而MTV的增加指示PD(进行性疾病)。在实施方案中,FDG摄取的降低指示应答, 例如CR或PR,而FDG摄取的增加指示PD。在实施方案中,在施用CAR疗法之后进行成像, 例如在施用CAR疗法后约1周,2周,3周,4周,1个月,2个月,3个月,4个月,5个月或6个 月后进行成像。在实施方案中,对没有CRS(细胞因子释放综合征)症状的受试者进行成像, 例如患有CRS的患者,并且在成像之前解决其症状。在实施方案中,对具有CRS症状的受试 者进行成像。在实施方案中,在CAR疗法之前进行成像,并且将治疗前图像与治疗后图像进 行比较。在实施方案中,

受试者具有癌症，例如淋巴瘤，例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) 或滤泡性淋巴瘤(FL)。在一些实施方案中，CAR疗法包含表达CAR19的细胞，例如CTL019。在一些实施方案中，CAR疗法包含本文所述的CAR疗法，例如表达CAR20的细胞，表达CAR22 的细胞或表达CAR19的细胞，任选与B细胞疗法组合。

[1340] 个性化药品(治疗诊断学)

[1341] CD19特征，例如突变

[1342] 不希望受理论束缚，一些癌症患者对CD19抑制剂如CD19 CAR表达细胞显示初步的应答，然后复发。在一些实施方案中，复发由癌细胞中的CD19中的移码和/或过早终止密码子或CD19 的表达(包括表达水平)的其他变化(至少部分地)引起，所述变化降低CD19 CAR表达细 胞靶向癌细胞的能力。这种突变可以降低CD19疗法的有效性，并有助于患者的复发。因此，在一些实施方案中，当用针对第二种不同靶标(例如，在B细胞中表达的靶标，例如CD10, CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1中的一种或多种)的疗法来补充或替换CD19疗法时 可能是有益的。本文公开了这种类型的各种示例性组合疗法。

[1343] 本申请尤其公开了用于治疗患有癌症的受试者的方法，其包括以下一个或多个:(1)确 定受试者在CD19的特征相对于参考特征是否具有差异，例如统计学显著性差异，以及(2) 如果所确定的特征和参考特征之间存在差异，则向受试者施用治疗有效剂量的CAR疗法，例 如CART，从而治疗受试者。患者可以是例如用CD19抑制剂例如CD19 CAR表达细胞治疗后 复发的患者。患者可能是接受或正在接受CD19 CAR疗法并有复发风险的患者。患者可能是CD19 CAR疗法的非应答者。

[1344] 特征可以是例如CD19序列，例如蛋白质或核酸序列。可以例如如实施例中所述，通过高 通量核酸测序或通过蛋白质的质谱法来测定序列。如本文实施例所述，由于CD19，例如CD19 的外显子2中的突变，例如在CD19中导致移码和过早终止密码子的突变，CD19 CART疗法后 患者可能复发。在实施方案中，插入或缺失不会引起移码和过早终止密码子之一或两者。突 变可以是例如插入，缺失，取代，易位或任何前述的组合。插入，缺失或取代可以包括例如 至少1,2,3,4,5,10,15,20,20或50个核苷酸。插入，缺失或取代可以包括例如至多2,3,4,5,10, 15,20,20,50或100个核苷酸。在某些情况下，细胞群将包含多于一个突变。在这种情况下，突变可以在细胞的重叠或非重叠的亚群中。

[1345] 在某些情况下，患者被鉴定为具有降低CD19与CD19抑制剂例如CD19 CAR表达细胞接合 的能力的CD19特征。这种特征可以是例如移码突变，过早终止密码子，核酸序列的改变或原 始mRNA转录物的结构的改变。该特征可能是例如偏离早于剪接发生的CD19的正常生产。该 特征可以是例如外显子跳跃之外的特征。可以用另一靶标的抑制剂例如B细胞抑制剂(例如 针对另一表位，例如CD10,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1的一个或多种内的表位 的CAR表达细胞)治疗此类患者。

[1346] 在某些情况下，患者被鉴定为具有降低CD19与CD19抑制剂例如CD19 CAR表达细胞接合 的能力，但不降低或消除CD19与第二CD19抑制剂(例如结合CD19上的不同区域的CD19抑制 剂)接合的能力的CD19特征。这种特征可以是例如不引起移码突变或过早终止密码子之一或 两者的突变。这样的特征可以是例如核酸序列的改变或原始mRNA转录物的结构的改变，与 剪接之前发生的CD19的正常产生的偏离，或除了外显子跳跃之外的特征。可以用CD19抑制 剂，例如针对CD19的完整区域例如CD19的野生型部分的B细胞抑制剂治疗这样的

患者。例如，如果在外显子2中存在突变，则第二CD19抑制剂可结合外显子2之外的外显子或缺乏突变的外 显子2的一部分。第二CD19抑制剂可以是例如本文所述的CD19抑制剂。

[1347] T_{EFF}和T_{REG}特征

[1348] 本文的方法可以包括确定例如在患者或细胞例如免疫细胞群体中T_{REG}特征或确定T_{EFF}细 胞或T_{REG}细胞的水平的步骤。本文的方法还可以包括在患者或细胞群中降低T_{REG}细胞水平或 降低T_{REG}特征的步骤。在一些实施方案中，T_{EFF}是具有一个或多个(例如，至少10,20,30,40, 50,60,70,80或全部)以下基因的上调表达的细胞:AIM2,ALAS1,B4GALT5,BATF,C3orf26, C4orf43,CCL3,CCL4,CCT3,CCT7,CD40LG,CHAC2,CSF2,CTNNA1,EBNA1BP2,EDARADD,EEF1E1,EIF2B3,EIF2S1,FABP5,FAM40B,FKBP4,FOSL1,GFOD1,GLRX2, HSPD1,HSPE1,IFNG,IL15RA,IL21,IL2RA,IL3,KCNK5,KIAA0020,LARP4,LRP8,LTA, MANF,MIR1182,MIR155,MIR155HG,MTCH2,MYOF,NDUFAF1,NLN,NME1, NME1-NME2,OTUD7B,PAM,PDIA6,PEA15,PFKM,PGAM1,PGAM4,PPIL1,PRDX4, PRSS23,PSMD1,PSMD11,PSMD14,PTRH2,PUS7,RBBP8,RPF2,RPP25,SFXN1,SLC27A2, SLC39A14,SLC43A3,SORD,SPR,SRXN1,STIP1,STT3A,TBX21,TMCC2,TMEM165, TNFRSF9,TXN,TXNDC5,UCK2,VDR,WDR12,YWHAG,和ZDHHC16。在一些实施方案中，T_{REG}细胞是具有以下基因中的一个或多个(例如，至少10,20,30,40,50,60,70或全部)的上 调表达的细胞:AIM2,ALAS1,BATF,C5orf32,CCL17,CD40LG,CHAC2,CSF1,CTSL1, EBNA1BP2,EDARADD,EMP1,EPAS1,FABP5,FAM40B,FKBP4,FOSL1,GCLM,GK, GPR56,HMOX1,HSPD1,HSPE1,IKBIP,IL10,IL13,IL15RA,IL1RN,IL2RA,IL3,IL4,IL5, IL9,KCNK5,LTA,MANF,MIR1182,MIR155,MIR155HG,MYOF,NDUFAF1,NLN,NME1, NME1-NME2,PANX2,PDIA6,PGAM4,PPIL1,PPPDE2,PRDX4,PRKAR1B,PSMD1, PSMD11,PUS7,RBBP8,SLC27A2,SLC39A14,SLC43A3,SRXN1,STIP1,STT3A,TBX21, TNFRSF11A,TNFRSF1B,TNFRSF8,TNFRSF9,TXN,UCK2,VDR,VTRNA1-3,WDR12, YWHAG,ZDHHC16和ZNF282。上调的表达可以例如在刺激16小时后测量。可以例如通过测 量所指定的基因的RNA水平来确定上调的表达。

[1349] 药物组合物和治疗

[1350] 本发明的药物组合物可以在某些方面包含与一种或多种药学上可接受的或生理上可接受 的载体、稀释剂或赋形剂组合的表达CAR的细胞，例如，许多表达CAR的细胞(正如本文中描述 的那样)。这样的组合物可以包含缓冲液例如中性的缓冲盐水、磷酸缓冲盐水以及诸如此类;碳 水化合物例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗 氧化剂;螯合剂例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。在一个方面中，把 本发明的组合物配制成用于静脉内施用。

[1351] 可以以合适的方式把本发明的药物组合物施用到将要被治疗(或预防)的疾病。施用的数 量和频度将由这样的因素决定，如患者的状况以及患者的疾病类型和严重程度，然而合适的 剂量可以由临床试验来确定。

[1352] 在一个实施方案中，所述的药物组合物基本上不含有污染物，例如，没有可检测到的水平 的污染物，例如，该污染物选自由下列组成的组:内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒 (RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被的珠、小鼠抗体、汇合的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、包装载体的细胞或质粒组件、细菌和真菌。在 一个实施方案中，所述的细菌是选自由下列组成的组的至少一种:粪产碱菌(Alcaligenes faecalis)，白念珠菌(Candida albicans)，大肠杆菌(Escherichia coli)，流感嗜血杆菌

(Haemophilus influenza),脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitides),绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa),金 黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus),肺炎链球菌(Streptococcus pneumonia),和酿脓链球菌A 群(Streptococcus pyogenes group A)。

[1353] 当指示“免疫学上有效量”,“抗肿瘤有效量”,“抑制肿瘤有效量”或“治疗有效量”时,将 要被施用的本发明的组合物的精确数量可以由医师在考虑个体在年龄、体重、肿瘤大小、感 染或转移的程度以及患者(受试者)的状况的情况下确定。在一些实施方案中,可以以10^4至10^9个细胞/kg体重(在一些实例中10^5至10^6个细胞/kg体重,包括这些范围内所有的整数值)的剂量, 施用包含细胞,本文中描述的T细胞的药物组合物。在一些实施方案中,本文所述的细胞,例 如T细胞可以以$3x10^4$,$1x10^6$,$3x10^6$,或$1x10^7$细胞/kg体重施用。也可以以这些剂量多次施用所 述的T细胞组合物。可以通过免疫疗法中通常已知的输注技术来施用所述的细胞(参见,例如, Rosenberg等人,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)。

[1354] 在一些实施方案中,CAR细胞(例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞)的剂量包含约$1x10^5$,$2x10^5$,$5x10^5$,$1x10^6$,$1.1x10^6$,$2x10^6$,$3.6x10^6$,$5\ x10^6$,$1x10^7$,$1.8x10^7$,$2x10^7$,$5x10^7$,$1x10^8$,$2x10^8$,或$5x10^8$个细胞/kg。在一些实施方 案中,CAR细胞(例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3,或ROR1 CAR细胞) 的剂量包含至少约$1x10^5$,$2x10^5$,$5x10^5$,$1x10^6$,$1.1x10^6$,$2x10^6$,$3.6x10^6$,$5x10^6$,$1x10^7$, $1.8x10^7$,$2x10^7$,$5x10^7$,$1x10^8$,$2x10^8$,或$5x10^8$个细胞/kg。在一些实施方案中,CAR细 胞(例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞)的剂量包含高 达约$1x10^5$,$2x10^5$,$5x10^5$,$1x10^6$,$1.1x10^6$,$2x10^6$,$3.6x10^6$,$5x10^6$,$1x10^7$,$1.8x10^7$,$2x\ 10^7$,$5x10^7$,$1x10^8$,$2x10^8$,或$5x10^8$个细胞/kg。在一些实施方案中,CAR细胞(例如CD10, CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞)的剂量包含约$1.1x10^6$-$1.8x\ 10^7$个细胞/kg或约$8x10^5$-$1.5x10^6$个细胞/kg。在一些实施方案中,CAR细胞(例如CD10,CD19, CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞)的剂量包含约$1x10^7$,$2x10^7$,$5x10^7$, $1x10^8$,$2x10^8$,$5x10^8$,$1x10^9$,$2x10^9$,或$5x10^9$个细胞。在一些实施方案中,CAR细胞(例 如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞)的剂量包含至少约$1x\ 10^7$,$2x10^7$,$5x10^7$,$1x10^8$,$2x10^8$,$5x10^8$,$1x10^9$,$2x10^9$,或$5x10^9$个细胞。在一些实施方 案中,CAR细胞(例如CD10,CD19,CD20,CD22,CD34,CD123,FLT-3或ROR1 CAR细胞) 的剂量包含高达约$1x10^7$,$2x10^7$,$5x10^7$,$1x10^8$,$2x10^8$,$5x10^8$,$1x10^9$,$2x10^9$,或$5x10^9$个细胞。

[1355] 在某些方面中,可能希望的是:给受试者施用活化的细胞,例如,T细胞或NK细胞,然后 随后再次抽血(或者进行单采血液成分术),按照本发明活化从中得到的细胞,并且再给所述 的患者输注这些活化的并且扩增的细胞。每隔几个星期可以进行这种方法多次。在某些方面 中,可以从10cc至400cc的抽血中活化细胞,例如,T细胞或NK细胞。在某些方面中,从20cc, 30cc,40cc,50cc,60cc,70cc,80cc,90cc,或100cc的抽血中活化细胞,例如,T细胞或NK细胞。

[1356] 所述主题组合物的施用可以以常规方式进行,包括通过气雾剂吸入、注射、摄入、输液、植入或移植。可以以下列方式给患者施用本文中描述的组合物:经动脉方式,皮下方式,皮内 方式,肿瘤内方式,节内方式,髓内,肌肉内方式,通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内方式。在一 个方面中,通过皮内或皮下注射给患者施用本发明所述的细胞组合物,例如,T细胞或NK细 胞组合物。在一个方面中,通过静脉内注射施用本发明所述的细胞组合物,例

如T细胞或NK 细胞组合物。可以把所述的细胞,T细胞或NK细胞组合物直接注射到肿瘤、淋巴结或感染位 点。

[1357] 在特定的示例性方面,受试者可以进行白细胞分离术,其中离体收集,富集或消耗白细 胞,以选择和/或分离感兴趣的细胞,例如T细胞。可以通过本领域已知的方法扩增这些细胞 分离物,例如T细胞或NK细胞分离物,并进行处理,使得可以引入本发明的一种或多种CAR 构建体,从而产生CAR表达细胞,例如本发明的CAR T细胞。有需要的受试者随后可以用高 剂量化疗进行标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些方面,随着或与移植同时,受 试者接受本发明的扩增的CAR表达细胞的输注。在另一方面,在手术之前或之后施用扩增的 细胞。

[1358] 要施用于患者的上述治疗的剂量将随待治疗的病症的确切性质和治疗的接受者而变化。用于人体施用的剂量的缩放可以根据本领域公认的实践进行。治疗剂,例如抗体,例如 CAMPATH的剂量,对于成人患者可以是例如1至约100mg,例如每天施用1至30天的时间。合适的日剂量是每天1-10mg,但是在某些情况下,可以使用每天高达40mg的较大剂量(美国 专利号6,120,766中所述)。

[1359] 在一个实施方案中,将CAR引入细胞,例如T细胞或NK细胞,例如使用体外转录,并且 受试者(例如,人)接受初始施用CAR表达细胞,例如本发明的CAR T细胞,以及CAR表达细胞(例如本发明的CART细胞)的一个或多个后续施用,其中所述一次或多次后续施用少于15天,例如前次施用后14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3或2天。在一个实施方案中,将CAR表达细胞,例如本发明的CART细胞的多于一次施用每周施用于受试者(例如,人),例如 每周施用2,3或4次CAR表达细胞,例如本发明的CAR T细胞。在一个实施方案中,受试者(例如,人受试者)每周接受多于一次的CAR表达细胞,例如CAR T细胞的施用(例如每周2,3或 4次施用)(本文也称为周期),然后是一周没有CAR表达细胞,例如CAR T细胞施用,然后 一次或多次额外施用CAR表达细胞,例如CAR T细胞(例如,每周多于一次施用CAR表达细 胞,例如CAR T细胞)施用于受试者。在另一个实施方案中,受试者(例如,人受试者)接 收多于一个周期的CAR表达细胞,例如CAR T细胞,并且每个周期之间的时间小于10,9,8,7, 6,5,4,或3天。在一个实施方案中,CAR表达细胞,例如CAR T细胞每隔一天施用,每周施 用3次。在一个实施方案中,表达CAR的细胞,例如本发明的CART细胞被施用至少两个,三 个,四个,五个,六个,七个,八个或更多个周。

[1360] 在一些实施方案中,受试者可以是成年受试者(即18岁及以上)。在某些实施方案中, 受试者可以在1至30岁之间。在一些实施方案中,受试者为16岁或以上。在某些实施方案中, 受试者在16至30岁之间。在一些实施方案中,受试者是儿童受试者(即1至18岁之间)。

[1361] 一方面,使用慢病毒病毒载体如慢病毒产生CAR表达细胞,例如CART。CAR表达细胞, 例如以这种方式产生的CART将具有稳定的CAR表达。

[1362] 在一个方面,使用病毒载体例如γ逆转录病毒载体,例如本文所述的γ逆转录病毒载体产 生CAR表达细胞,例如CART。使用这些载体产生的CART可以具有稳定的CAR表达。

[1363] 一方面,CAR表达细胞,例如CART在转导后4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15天瞬时 表达CAR载体。CAR的瞬时表达可以通过RNA CAR载体递送来实现。一方面,通过电穿孔将CAR RNA转导入细胞,例如NK细胞或T细胞。

[1364] 在使用瞬时表达CAR T细胞(特别是用携带小鼠ScFv的CART)治疗的患者中可能出现的 潜在问题是多次治疗后的过敏反应。

[1365] 不受这一理论的束缚,认为这种过敏反应可能是由发生体液抗CAR应答(即具有抗IgE 同种型的抗CAR抗体)的患者引起的。据认为,当暴露于抗原存在十到十四天的中断时,患 者的产生抗体的细胞经历从IgG同种型(不引起过敏反应)到IgE同种型的类别转换。

[1366] 如果患者在瞬时CAR疗法过程中(如通过RNA转导产生的那些)具有产生抗CAR抗体应 答的高风险,那么CART输注中断不能持续超过十到十四天。

[1367] CD19抗体和CARs

[1368] 鼠抗CD19抗体的人源化

[1369] 鼠CD19抗体的人源化对于临床背景是期望的,其中小鼠特异性残基可以在接受CART19 治疗(即用CAR19构建体转导的T细胞治疗)的患者中诱导人抗小鼠抗原(HAMA)应答。人源化CD19 CAR序列的生产,表征和功效描述在国际申请WO2014/153270中,其通过引用整 体并入本文,包括实施例1-5(第115-159页),例如表3,4,和5(第125-147页)。

[1370] CAR构建体,例如CD19 CAR构建体

[1371] 在国际申请WO2014/153270中描述的CD19 CAR构建体中,本文再现了某些序列。据了解, 本节中的序列也可以用于其他CAR,例如CD10 CARs,CD20 CARs,CD22 CARs,CD34 CARs, CD123 CARs,FLT-3 CARs,ROR1 CARs,CD79b CARs,CD179b CARs,或CD79a CAR的上下 文中。

[1372] 人源化scFv片段的序列(SEQ ID NO:1-12)在下表2中提供。使用SEQ ID NO:1-12与如下 所示附加序列SEQ ID NO:13-17,产生完整CAR构建体以产生具有SEQ ID NO:31-42的完整 CAR构建体。

[1373] • 前导序列(氨基酸序列)(SEQ ID NO:13)

[1374] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[1375] • 前导序列(核酸序列)(SEQ ID NO:54)

[1376] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGC TAGACCC

[1377] • CD8铰链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:14)

[1378] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[1379] • CD8铰链(核酸序列)(SEQ ID NO:55)

[1380] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGC CCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAG GGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[1381] • CD8跨膜(氨基酸序列)(SEQ ID NO:15)

[1382] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[1383] • 跨膜(核酸序列)(SEQ ID NO:56)

[1384] ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC

[1385] • 4-1BB胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:16)

[1386] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[1387] • 4-1BB胞内结构域(核酸序列)(SEQ ID NO:60)

[1388] AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAG TACAAACTACTC

AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG GAGGATGTGAACTG

[1389] • CD3ζ结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:17)

[1390] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1391] • CD3ζ(核酸序列)(SEQ ID NO:101)

[1392] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAAC CAGCTCTATAACG AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGA GACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGA TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACC AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1393] • CD3ζ结构域(氨基酸序列;NCBI参考序列NM_000734.3)(SEQ ID NO:43)

[1394] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1395] • CD3ζ(核酸序列;NCBI参考序列NM_000734.3);(SEQ ID NO:44)

[1396] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG AACCAGCTCTATAACG AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA AGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG AGGCCTACAGT GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1397] CD28结构域(氨基酸序列,SEQ ID NO:1317)

[1398] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[1399] CD28结构域(核苷酸序列,SEQ ID NO:1318)

[1400] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC GCCCCGGGCCCA CCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGC CTATCGCTCC

[1401] 野生型ICOS结构域(氨基酸序列,SEQ ID NO:1319)

[1402] TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[1403] 野生型ICOS结构域(核苷酸序列,SEQ ID NO:1320)

[1404] ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCA TGAGAGCAGTGA ACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

[1405] Y到F突变ICOS结构域(氨基酸序列,SEQ ID NO:1321)

[1406] TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[1407] IgG4铰链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:102)

[1408] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGKM

[1409] IgG4铰链(核苷酸序列)(SEQ ID NO:103)

[1410] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGG ACCCAGCGTGT TCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACG

TGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCCGGGAGGAGC AGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAAC GGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGA GAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCC CCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGCCTGGTGAAGGGCT TCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACT ACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCT GACCGTGGACAAGAGCC GGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

[1411] 这些克隆全都含有从4-1BB衍生的共刺激结构域的信号结构域中的Q/K残基变化。

[1412] 表2:人源化CD19 CAR构建体

[1413]

名称	SEQ ID	序列
CAR 1		
CAR1 scFv 结构域	1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQA PRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC QQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI WGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
103101 CAR1 可溶性 scFv- nt	61	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttg tgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgt cttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagacta cttactactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcac tgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggc gggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagccaccaccatcat caccatcaccat
103101 CAR1 可溶性 scFv- aa	73	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgtlvtvsshhhhhhhh
104875 CAR 1 – 完全- nt	85	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttg tgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgt cttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagacta cttactactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcac tgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggc gggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccc agcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacat ttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgc ggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagg aggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaatt cagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaat cttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatg gcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgga ctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcc gcctcgg

[1414]

104875 CAR 1 – 完全- aa	31	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgtlvtvssttpaprppptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 2		
CAR2 scFv 结构域	2	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgs gtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpg lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
103102 CAR2-可溶性 scFv-nt	62	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttg tgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgt cttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagacta cttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtca ctgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatgg cgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagccaccaccatc atcaccatcaccat
103102 CAR2-可溶性 scFv-aa	74	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgtlvtvsshhhhhhhh
104876 CAR 2 -完全- nt	86	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttg tgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgt cttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagacta cttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtca ctgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatgg cgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccc cagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagc gcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaaga ggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactc aatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatg ggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataag

[1415]

		atggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccct gccgcctcgg
104876 CAR 2 -完全- aa	32	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgtlvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 3		
CAR3 scFv 结构域	3	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslks rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgi parfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR 3 -可溶性 scFv-nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcacc atttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccg ccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggg aactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtggc tccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcccttctcccggggaacgggctacccttt cttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccc ctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctgga agcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgcc agcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccac catcatcaccatcac
103104 CAR 3 -可溶性 scFv-aa	75	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhy yyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasq diskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgtkleikhhhhhhhh
104877 CAR 3 – 完全- nt	87	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcacc atttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccg ccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggg aactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtggc tccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcccttctcccggggaacgggctacccttt cttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccc ctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctgga agcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgcc agcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactact cccgctccaaggccacccaccctgccccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccgga ggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga

[1416]

		aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
104877 CAR 3 – 完全- aa	33	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhy yyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasq diskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 4		
CAR4 scFv 结构域	4	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslks rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgi parfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
103106 CAR4 – 可溶性 scFv-nt	64	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcac catttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacacc gccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagg gaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtgg ctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctt tcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccc ctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctgga agcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgcc agcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccac catcatcaccatcac
103106 CAR4 – 可溶性 scFv -aa	76	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscras qdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgnt lpytfgqgtkleikhhhhhhhh
104878 CAR 4 – 完全- nt	88	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcac catttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacacc gccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagg gaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtgg ctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctt tcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccc ctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctgga agcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgcc agcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactact cccgctccaaggccacccaccccctgccccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccgga ggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta

[1417]

		catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
104878 CAR 4 – 完全- aa	34	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscras qdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgnt lpytfgqgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplag tcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 5		
CAR5 scFv 结构域	5	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgs gtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlq esgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtisk dnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR5-可溶性 scFv-nt	65	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagat cgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcacccggcgagagggcaacccctttcatgcag ggccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgcct gctgatctaccacaccagccgcctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctgg aaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagg ggaatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcggaggatca ggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaa tcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgtaccgtgtccggtgtgagcc tccccgactacggagtctcttggattcgccagcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgat ttggggatcagagactacttactactcttcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataata gcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattgtgc caaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctggtgactgtct ctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5-可溶性 scFv -aa	77	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh
104879 CAR 5 – 完全- nt	89	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggcggaggcgggagccaggtccaactccaaga aagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctc tccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtg atttggggctctgagactacttactactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg

			ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgt gtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctc tgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgact tcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
	104879 CAR 5 – 完全- aa	35	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
	CAR 6		
	CAR6 scFv 结构域	6	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgs gtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlq esgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtisk dnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
[1418]	99790 CAR6- 可溶性 scFv-nt	66	atggccctcccagtgaccgctctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagat cgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcacccggcgagagggcaacccttcatgcag ggccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgcct gctgatctaccacaccagccgcctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctgg aaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagg ggaatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcggaggatca ggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaa tcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgtaccgtgtccggtgtgagcc tccccgactacggagtctcttggattcgccagcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgat ttggggatcagagactacttactaccagtcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataata gcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattgtgc caaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctggtgactgtct ctagccatcaccatcaccaccatcatcac
	99790 CAR6- 可溶性 scFv-aa	78	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh
	104880 CAR6 – 完全- nt	90	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaatacctaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggaggggagccaggtccaactccaaga aagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctc

		tccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtg atttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaa ctctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgc gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccg tgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctcccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104880 CAR6 – 完全– aa	36	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 7		
CAR7 scFv 结构域	7	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslks rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhts rlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100796 CAR7 -可溶性 scFv-nt	67	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgccaggccccaag tccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgagactctctcactgacttgtaccgt cagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtcatggatccgccaacctcccgggaaagggcttg aatggattggtgtcatctggggttctgaaaccacctactactcatcttccctgaagtccagggtgacc atcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccg ccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagg gcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggaggatccggtggtggtgg gtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtcaccagccacccttctctttcacccgg cgagagagcaaccctgagctgtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagca aaaaccggggcaggcccctcgcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgct cggtttagcggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaagattt cgcagtgtatttctgccagcagggcaataccttccttacaccttcggtcagggaaccaagctcgaa atcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796 CAR7 -可溶性 scFv-aa	79	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhy yyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratl scrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh
104881 CAR 7 完全- nt	91	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcacc atttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccg

[1419]

[1420]

		ccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggg aactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtggc tccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtccctttctcccgg ggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacaga agccgggacaggcccctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcac gctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggactt cgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttga gatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccacccctgccccgaccatcgcctctcagccgct ttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgactt cgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
104881 CAR 7 完全- aa	37	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhy yyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratl scrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiw aplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsr sadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkm aeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 8		
CAR8 scFv 结构域	8	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslks rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhts rlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100798 CAR8 -可溶性 scFv-nt	68	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgccaggccccaag tccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgagactctctcactgacttgtaccgt cagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtcatggatccgccaacctcccgggaaagggcttg aatggattggtgtcatctggggttctgaaaccacctactaccagtcttccctgaagtccagggtgacc atcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccg ccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagg gcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggaggatccggtggtggtgg gtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtcaccagccacccttctctttcacccgg cgagagagcaaccctgagctgtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagca aaaaccggggcaggcccctcgcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgct cggtttagcggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaagattt cgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctccttacaccttcggtcagggaaccaagctcgaa atcaagcaccatcaccatcatcatcaccac
100798 CAR8 -可溶性 scFv-aa	80	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgerat lscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh
104882 CAR 8 –	92	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg

[1421]

完全- nt		agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcac catttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacacc gccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagg gaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtgg ctccggaggcggtgggtcagaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtccctttctcccgg ggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacaga agccgggacaggcccctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcac gctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggactt cgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttga gatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccacccctgccccgaccatcgcctctcagccgct ttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgactt cgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
104882 CAR 8 – 完全- aa	38	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv swirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgerat lscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiw aplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsr sadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkm aeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 9		
CAR9 scFv 结构域	9	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgs gtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlq esgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtisk dnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR9 - 可溶性 scFv-nt	69	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgctcggcctgagat cgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcacccggcgagagggcaacccttttcatgcag ggccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgcct gctgatctaccacaccagccgcctccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctgg aaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagg ggaatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcggaggatca ggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaagaa tcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgtaccgtgtccggtgtgagcc tccccgactacggagtctcttggattcgccagcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgat ttggggatcagagactacttactacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataata gcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattgtgc caaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacaggggaccctggtgactgtct ctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR9 - 可溶性	81	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg

	scFv-aa		gsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh
	105974 CAR 9 – 完全- nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaatacttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggtgggagccaggtccaactccaagaa agcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctct ccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtga tttggggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgt gtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctc tgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgact tcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
[1422]	105974 CAR 9 – 完全- aa	39	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswir qppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
	CAR10		
	CAR10 scFv 结构域	10	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslks rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhts rlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
	100796 CAR10 -可溶性 scFv-nt	70	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgccaggccccaag tccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgagactctctcactgacttgtaccgt cagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtcatggatccgccaacctcccgggaaagggcttg aatggattggtgtcatctggggttctgaaaccacctactacaactcttccctgaagtccagggtgacc atcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccg ccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagg gcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggaggatccggtggtggtgg gtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtcaccagccacccttctctttcacccgg cgagagagcaaccctgagctgtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagca aaaaccggggcaggcccctcgcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgct cggtttagcggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaagattt cgcagtgtatttctgccagcagggcaataccttccttacaccttcggtcagggaaccaagctcgaa atcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
	100796	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygv

[1423]

CAR10 -可溶性 scFv-aa		swirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakh yyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgerat lscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgstdytltisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh
105975 CAR 10 完全- nt	94	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaa ttgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcag agcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcctt ctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggtgggagccaggtccaactccaagaa agcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctct ccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtga tttggggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcg ctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgt gtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctc tgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccccggggtcttgact tcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctg cgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag ctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 完全- aa	40	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC RASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR11		
CAR11 scFv 结构域	11	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgs gtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpg lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
103101 CAR11 -可溶性 scFv-nt	71	Atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa attgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgca gagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcct tctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctggg accgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg

[1424]

		gaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcg gaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttg tgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgt cttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagacta cttactacaattcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtca ctgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatgg cgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagccaccaccatc atcaccatcaccat
103101 CAR11 -可溶性 scFv-aa	83	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyln wyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgk glewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgtlvtvsshhhhhhhh
105976 CAR 11 完全- nt	95	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaag tccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtg agcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactgg agtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcac catttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacacc gccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagg gaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtgg ctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcccttttctcccg gggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacag aagccgggacaggccctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgca cgctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggac ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttg agatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccaccctgccccgaccatcgcctctcagccg ctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgac ttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtga tcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 完全- aa	41	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKS RVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLP YTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR12		

[1425]

CAR12 scFv 结构域	12	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR12 -可溶性 scFv-nt	72	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtagcgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 -可溶性 scFv -aa	84	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh
105977 CAR 12 – 完全- nt	96	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105977 CAR 12 – 完全- aa	42	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNS

[1426]

		KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR

[1427] 表3:鼠CD19 CAR构建体

CTL019		
CTL019 – 可溶性 scFv-Histag-nt	97	Atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgctctgcttcttcatgcagcaaggccggaca tccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctcttggagacagggtgaccatttcttgtcgc gccagccaggacatcagcaagtatctgaactggtatcagcagaagccggacggaaccgtgaagc tcctgatctaccatacctctcgcctgcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcagg aaccgattattctctcactatttcaaatcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcagggt aataccctgccctacaccttcggaggagggaccaagctcgaaatcaccggtggaggaggcagcg gcggtggagggtctggtggaggtggttctgaggtgaagctgcaagaatcaggccctggacttgtg gccccttcacagtccctgagcgtgacttgcaccgtgtccggagtctccctgcccgactacggagtgt catggatcagacaacctccacggaaaggactggaatggctcggtgtcatctggggtagcgaaact acttactacaattcagccctcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaagtctt tcttaagatgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactactactacg gaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcactgtctcttcacaccatcatcac catcaccatcac
CTL019 – 可溶性 scFv-Histag-aa	98	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtk leitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkgl ewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamd ywgqgtsvtvsshhhhhhhh
CTL019 完全的- nt	99	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccggac atccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgca gggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactc ctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaa cagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggta atacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcggtggctcggg cggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtg gcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaa gctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaacc acatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttt cttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacgg tggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgcc agcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccaga ggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggggctggacttcgcctgtgatat ctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttttactg caaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactact caagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagt gaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacga gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgaga tgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagata

[1429]

		agatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcac gatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcc ctgccccctcgc
CTL019 完全的- aa	58	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtk leitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkgl ewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamd ywgqgtsvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CTL019 scFv 结构域	59	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgs gtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpgl vapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksq vflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss
mCAR1 scFv	109	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTGGGSGGG SGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSKDLADYFCQYNRYPYTSFFFTKLEIKRRS
mCAR1 完全的- aa	110	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTGGGSGGG SGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSKDLADYFCQYNRYPYTSFFFTKLEIKRRSKIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
mCAR2 scFv	111	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSE
mCAR2 CAR-aa	112	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPRL
mCAR2	113	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL

[1430]

完全的-aa		EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFE EEEGGCELRV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR LEGGGEGRGS LLTCGDVEEN PGPRMLLLVT SLLLCELPHP AFLLIPRKVC NGIGIGEFKD SLSINATNIK HFKNCTSISG DLHILPVAFR GDSFTHTPPL DPQELDILKT VKEITGFLLI QAWPENRTDL HAFENLEIIR GRTKQHGQFS LAVVSLNITS LGLRSLKEIS DGDVIISGNK NLCYANTINW KKLFGTSGQK TKIISNRGEN SCKATGQVCH ALCSPEGCWG PEPRDCVSCR NVSRGRECVD KCNLLEGEPR EFVENSECIQ CHPECLPQAM NITCTGRGPD NCIQCAHYID GPHCVKTCPA GVMGENNTLV WKYADAGHVC HLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMVGALLLL LVVALGIGLF M
mCAR3 scFv	114	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
mCAR3 完全的-aa	115	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1431] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表2中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列 的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表2所列的任何轻链结合结构 域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1432] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表2中列出的任何轻链结合结构域氨基酸序列 的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表2中列出的任何重链结合结 构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3。

[1433] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1434] 对于重链可变结构域,scFv结构域的人源化CDR序列的序列示于表4中,关于轻链可 变结构域的序列在表5所示。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1435] 表4.重链可变结构域CDR(Kabat)

[1436]

候选者	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
murine_CART19		GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYYNSALKS	20	HYYYGGSYAMDY	24
humanized_CART19a	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYY*S*S*S*LKS	21	HYYYGGSYAMDY	24
humanized_CART19b	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYY*Q*S*S*LKS	22	HYYYGGSYAMDY	24
humanized_CART19c	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYYNS*S*LKS	23	HYYYGGSYAMDY	24

[1437] 表5.轻链可变结构域CDR

[1438]

候选者	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
murine_CART19		RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanized_CART19a	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanized_CART19b	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanized_CART19c	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27

[1439] 然后将CAR scFv片段克隆到慢病毒载体中以在单个编码框中产生全长CAR构建体,并使 用EF1α启动子进行表达(SEQ ID NO:100)。

[1440] EF1α启动子

[1441] CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGA GAAGTTGGGGGG AGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGT AAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCC CTT GCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTC GGGTTGGAAGTGGGTGGG AGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCC GCCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTT GATGACCT GCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATT TCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA TGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGA GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTC AAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCG TGTATCGCCCCGCCCTGG GCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTG AGTCACCCACACAAAGGA AAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCC ACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATT AGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTC GTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTG AGTGGGTG GAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTT GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCC ATTTCAGGTGTCGTGA(SEQ ID NO:100).

[1442] CAR22构建体:设计和功能

[1443] 分离完全人抗CD22单链可变片段。将抗CD22 ScFv克隆到具有CD3ζ链和4-1BB共刺激分 子的慢病毒CAR表达载体中。在STBL3细胞中通过细菌转化扩增含CAR的质粒,随后使用不 含内毒素的Qiagen质粒Maki试剂盒进行Maxiprep。使用标准技术在293T细胞中产生慢病毒上 清液。

[1444] 下面在表6A和6B中提供人CAR的序列。

[1445] 这些克隆都含有从CD3ζ链衍生的共刺激结构域的信号结构域中的Q/K残基变化。

[1446] 表6A:人类CD22 CAR构建体

[1447]

名称	SEQ ID	序列
m971 NT	200	gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccga agaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcc gggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtca cagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtg ataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgca caacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaa cgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcg aactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggacc acttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggt ctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgac ggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaa gcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaa ggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactga gcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgct tgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttt ccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttag gccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggct gctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcg cagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacacc gaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcgg acaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggga aacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctc gtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttg ctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttga gtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagc ggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggc acgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactc attaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataac aatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcgcgcaattaaccctcactaaaggg aacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaac

[1448]

gatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaa
ggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactg
aattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttaga
ccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttg
ccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccc
ttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaac
cagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggc
ggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcga
gagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggg
gaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagtta
atcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagga
tagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagac
caccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggag
aagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaag
agaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttcttggga
gcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtc
tggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactc
acagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatca
acagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgcta
gttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaa
ttaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaa
caagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggt
atataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatagt
gaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacc
cgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgatt
agtgaacggatctcgacggtatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacat
ttagaaggaaaagttatcttggtagcagttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattcc
agcagagacagggcaagaaacagcatacttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaa
cagtacatacagacaatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcgg
gatcaagcaggaatttggcattccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataa
agaattaaagaaaattataggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaat
ggcagtattcatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgcaggggaaaga
atagtagacataatagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaa
attttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtg
cccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggca
attgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctc
cgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcg
caacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttac
gggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagctt
cgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttga
gttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtct
cgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaaga
tagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgac
ggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgag
aatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtat
cgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggcc
gcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgg
gtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccactga
gtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttggagtacgtcgtctttaggttggg
gggagggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagctt

[1449]

		ggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcaga cagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagctctagagccaccatggccctgcc tgtgacagccctgctgctgcctctggctctgctgctgcatgccgctagacccggatcccaggtgca gctgcagcagtctggacccggcctcgtgaagcctagccagaccctgtctctgacctgcgccatcag cggcgatagcgtgtccagcaatagcgccgcctggaactggatcagacagagccctagcagaggc ctggaatggctgggccggacctactaccggtccaagtggtacaacgactacgccgtgtccgtgaa gtcccggatcaccatcaaccccgacaccagcaagaaccagttctccctgcagctgaacagcgtga cccccgaggataccgccgtgtactactgcgccagagaagtgaccggcgacctggaagatgccttc gacatctggggccagggcacaatggtcaccgtgtctagcggaggcggaggatctggcggcgga ggaagtggcggaggggatctgggggaggcggaagcgatatccagatgacccagagccccag ctccctgtctgccagcgtgggcgacagagtgaccatcacctgtagggccagccagaccatctggt cctacctgaactggtatcagcagcggcctggcaaggcccccaacctgctgatctatgccgccagct ctctgcagtccggcgtgcccagcagattttccggcagaggctccggcaccgacttcaccctgacaa tcagttccctgcaggccgaggacttcgccacctactactgccagcagagctacagcatcccccaga ccttcggccaggggaccaagctggaaatcaagtccggaaccacgacgccagcgccgcgaccac caacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccag cggcgggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcc cttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacggggcagaa agaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggc tgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggag cgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacga agagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccg agaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagg gtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa gtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttt acgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcct ccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggt gtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccg ggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctgg acaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccat ggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctc aatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcg ccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaa gaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaag ggctaattcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagat ctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttga gtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagt cagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaat gaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatca caaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttat catgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctga ctaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgagga ggcttttttggaggcctaggcttttgcgtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacg cgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcg ccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttc ccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcg ggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctt tcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagg gttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgg gccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactcttgt

[1450]

		tccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcg gcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgctta caatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaa atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatga gtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaa acgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg
m971 VH	201	qvqlqqsgpg lvkpsqtlsl tcaisgdsvs snsaawnwir qspsrglewl grtyyrskwy ndyavsvksr itinpdtskn qfslqlnsvt pedtavyyca revtgdleda fdiwgqgtmv tvssastkgp svfplapssk stsggtaalg clvkdyfpep vtvswnsgal tsgvhtfpav lqssglysls svvtvpsssl gtqtyicnvs hkpsntkvdk kvepkscdkt sgqag
m971 VL	202	diqmtqspss lsasvgdrvt itcrasqtiw sylnwyqqrp gkapnlliya asslqsgvps rfsgrgsgtd ftltisslqa edfatyycqq sysipqtfgq gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec
CAR22-1 scFv AA	203	qvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkglewvsviysggstyyadsv kgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycasqstpydssgyysgdafdiwgqgtmvtvssg gggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpgtapklliy rnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgyvfgtgtkltvl
CAR22-1 scFv NT	204	caagtgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcatgtg ccgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaaagggc ctggaatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaaggggcgg ttcaccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactgagggccgaa gataccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgggtactactccggg gacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcgggaggaggggcagcgg gcggcggaggaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgacccagccgccgagcgcctccg ggactccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatccaacatcggttcgaattatgtg tactggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatctaccggaacaaccagcgcccgt ctggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcaccagcgcctccctggctatctccggg ctgagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgtgggacgacagcctgtcgggatacgt gtttggaaccggaaccaagctcaccgtgctg
CAR22-1 可溶性 scFV NT	205	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcatgtgccgc tagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaaagggcctgg aatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaaggggcggttca ccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactgagggccgaagata ccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgggtactactccggggac gccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcgggaggaggggcagcggc ggcggaggaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgacccagccgccgagcgcctccggg actccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatccaacatcggttcgaattatgtgta ctggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatctaccggaacaaccagcgcccgtct ggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcaccagcgcctccctggctatctccgggct gagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgtgggacgacagcctgtcgggatacgtgt ttggaaccggaaccaagctcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-1 可溶性 scFV AA	206	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkgl ewvsviysggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycasqstpydssgyys gdafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigs nyvywyqqlpgtapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawdds lsgyvfgtgtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-1	207	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkgl ewvsviysggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycasqstpydssgyys

[1451]

完整 AA		gdafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigs nyvywyqqlpgtapkllIyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawdds lsgyvfgtgtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-1 完整 NT 慢病毒	208	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aag tgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcatgtgccgc tagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaaagggcctgg aatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaaggggcggttca ccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactgagggccgaagata ccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgggtactactccggggac gccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcgggaggaggggcagcggc ggcggaggaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgacccagccgccgagcgcctccggg actccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatccaacatcggttcgaattatgtgta ctggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatctaccggaacaaccagcgcccgtct ggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcaccagcgcctccctggctatctccgggct gagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgtgggacgacagcctgtcgggatacgtgt ttggaaccggaaccaagctcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggc tcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggc cgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcg gggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatct ttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccc agaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagc ctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgac gtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcc ccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggta tgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgcc accaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-2 scFv AA	209	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrglewlgrtyyrskwyndya vsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavagtfdywgqgtlvtvssgggg sggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiy dvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssslnhvfgtgtkvtvl
CAR22-2 scFv NT	210	gaagtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacgtg tgcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcgccgtc gagagggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtc cgtgaagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgcaactgaactcg gtgacccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggatcgctgtcgccgg caccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtggaggagggagcgga gggggcggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcctgctagcgtgtccgggt cgcccggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgacgtgggcggctacaactac gtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgatgatctacgacgtgtccaagcg cccttcgggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggcaacactgcctccctgaccattagc ggactgcaggccgaagatgaggccgactattactgctcatcctacacctcctcctcactgaaccatg tgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctc
CAR22-2 可溶性 scFV NT	211	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacgtgtgcg atcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcgccgtcgaga gggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtccgtg aagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgcaactgaactcggtga cccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggatcgctgtcgccggcacct

[1452]

		tcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtggaggagggagcggaggggg cggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcctgctagcgtgtccgggtcgccc ggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgacgtgggcggctacaactacgtgtca tggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgatgatctacgacgtgtccaagcgcccttc gggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggcaacactgcctccctgaccattagcggact gcaggccgaagatgaggccgactattactgctcatcctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcg gcaccggaaccaaggtcacagtcctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-2 可溶性 scFV AA	212	Malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsr glewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavag tfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggyny vswyqqhpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssl nhvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-2 完整 AA	213	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavagt fdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyv swyqqhpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssln hvfgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtc gvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapa ykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-2 完整 NT 慢病毒	214	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacgtgtgcg atcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcgccgtcgaga gggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtccgtg aagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgcaactgaactcggtga cccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggatcgctgtcgccggcacct tcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtggaggagggagcggaggggg cggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcctgctagcgtgtccgggtcgccc ggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgacgtgggcggctacaactacgtgtca tggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgatgatctacgacgtgtccaagcgcccttc gggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggcaacactgcctccctgaccattagcggact gcaggccgaagatgaggccgactattactgctcatcctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcg gcaccggaaccaaggtcacagtcctcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcc taccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgt gcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggg tcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaa gcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccaga ggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagccta caagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatga aaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-3 scFv AA	215	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyas svrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssg gggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstpyvfgtgtqltvl
CAR22-3 scFv NT	216	gaagtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacctgt gcgatctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcaccctcc cggggcctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgccagctc agtgcgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagttgaacg

[1453]

		ctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcaggacggaaactc ctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcatccggcggtggcg gttcgggcggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgactcagccagcttcagtc tccggctcgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagctccgatgtcgggggtat aactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtcc aatcgccctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtccgggaacaccgcgtccctgaca atcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactactgctcgagctacaccagctcgtccac gccgtacgtgttcggaactgggacccagctgaccgtgctg
CAR22-3 可溶性 scFV NT	217	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacctgtgcgat ctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcaccctcccgggg cctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgccagctcagtgcg cggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagttgaacgctgtgac cccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcaggacggaaactcctggtcc gatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcatccggcggtggcggttcggg cggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgactcagccagcttcagtctccggct cgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagctccgatgtcgggggtataactacg tgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaatcgcc ctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtccgggaacaccgcgtccctgacaatcagcg gactgcaggccgaggacgaagccgactactactgctcgagctacaccagctcgtccacgccgtac gtgttcggaactgggacccagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-3 可溶性 scFV AA	218	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts sstpyvfgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-3 完整 AA	219	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts sstpyvfgtgtqltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-3 完整 NT 慢病毒	220	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacctgtgcgat ctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcaccctcccgggg cctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgccagctcagtgcg cggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagttgaacgctgtgac cccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcaggacggaaactcctggtcc gatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcatccggcggtggcggttcggg cggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgactcagccagcttcagtctccggct cgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagctccgatgtcgggggtataactacg tgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaatcgcc ctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtccgggaacaccgcgtccctgacaatcagcg gactgcaggccgaggacgaagccgactactactgctcgagctacaccagctcgtccacgccgtac gtgttcggaactgggacccagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccc cggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtg gggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtact tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgta catctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgg

[1454]

		ttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctc cagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaag aatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagat tggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcac cgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-4 scFv AA	221	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdaldiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygknnr psgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwvfgggtkltvl
CAR22-4 scFv NT	222	gaagtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgtgt gcggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaaaggg cctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcggtcaagg gaaggttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaacagcctgcgcg ccgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttcacgacgcacttg atatctggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctcagggggaggaggg aagcgggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgtccgtggcgctggga caaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacgcctcgtggtaccagcag aagcccggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaaccgcccgagcggaattccaga ccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcaccatcacgggggcccaggcggag gacgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggcaatcacctctgggtgttcgggggc ggaaccaagctgactgtgctg
CAR22-4 可溶性 scFV NT	223	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgtgtgcgg cctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaaagggcctg gagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcggtcaagggaag gttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaacagcctgcgcgccga ggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttcacgacgcacttgatatct ggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctcaggggaggaggaagcg ggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgtccgtggcgctgggacaaac cgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacgcctcgtggtaccagcagaagcc cggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaaccgcccgagcggaattccagaccggt tctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcaccatcacgggggcccaggcggaggacga agcagattactactgcaactcgcgggattccagcggcaatcacctctgggtgttcgggggcggaac caagctgactgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-4 可溶性 scFV AA	224	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgl ewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdal diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswy qqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwv fgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-4 完整 AA	225	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgl ewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdal diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswy qqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwv fgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-4 完整 NT	226	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgtgtgcgg cctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaaagggcctg

	慢病毒		gagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcggtcaagggaag gttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaacagcctgcgcgccga ggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttcacgacgcacttgatatct ggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctcaggggggaggaggaagcg ggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgtccgtggcgctgggacaaac cgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacgcctcgtggtaccagcagaagcc cggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaaccgcccgagcggaattccagaccggt tctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcaccatcacgggggcccaggcggaggacga agcagattactactgcaactcgcgggattccagcggcaatcacctctgggtgttcgggggcggaac caagctgactgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcct cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgg ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttt cactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttca tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta tgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	CAR22-5 scFv AA	227	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfwsgsdywgqgtlvtvssgg ggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygk nnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwvfgggtkltvl
[1455]	CAR22-5 scFv NT	116	gaagtgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcatgtg cagcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccggggaagggc ctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgtgaaagga cgcttcacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactccctgcgggcc gaggataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacgacttctggagcgg aagcgactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcggaggggggctccggcgg cggtggtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggaccccgcagtgtccgtcgcc ctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcctactacgcgtcctggtat cagcagaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaagaacaataggcccagcggga atccctgaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcctccctgaccatcacgggcgcgcag gccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattccagcggatgggtgttcggaggag gaaccaagctcactgtgctc
	CAR22-5 可 溶 性 scFV NT	228	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcatgtgcagc ctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccggggaagggcctcg aatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgtgaaaggacgctt cacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactccctgcgggccgagg ataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacgacttctggagcggaagc gactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcggaggggggctccggcggcggtg gtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggaccccgcagtgtccgtcgccctggg gcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcctactacgcgtcctggtatcagca gaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaagaacaataggcccagcggaatccct gaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcctccctgaccatcacgggcgcgcaggccga ggacgaagccgattactactgcaactcacgggattccagcggatgggtgttcggaggaggaacca agctcactgtgctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
	CAR22-5 可 溶 性	229	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgl ewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfw

[1456]

scFV AA		sgsdywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwv fgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-5 完整 AA	230	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgl ewvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfw sgsdywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwv fgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-5 完整 NT 慢病毒	231	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcatgtgcagc ctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccggggaagggcctcg aatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgtgaaaggacgctt cacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactccctgcgggccgagg ataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacgacttctggagcggaagc gactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcggaggggggctccggcggcggtg gtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggaccccgcagtgtccgtcgccctggg gcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcctactacgcgtcctggtatcagca gaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaagaacaataggcccagcggaatccct gaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcctccctgaccatcacgggcgcgcaggccga ggacgaagccgattactactgcaactcacgggattccagcggatgggtgttcggaggaggaacca agctcactgtgctcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccgggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttc actcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcat gaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-6 scFv AA	232	evqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrglewlgrtyyrstwyndyavs vksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyaywgqgtlvtvssggggsggggs ggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrps gvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgtkvtvl
CAR22-6 scFv NT	233	gaagtgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttgtgc tatctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccgtcacg gggcctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgctgtgtccgt gaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaactgaactccgt gaccctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttcctactacgcctactg gggacagggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcggaggaggatctgg tggcggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggctcaccgggccagtcta tcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagc agcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaaccggcccagcggggtgtc gaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctgaccattagcggactgcaggccg aggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcctcgactctctacgtgtttggcaccgga actaaggtcaccgtgctg
CAR22-6	234	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag

	可溶性 scFV NT		tgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttgtgctatct cgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccgtcacggggc ctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgctgtgtccgtgaag tcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaactgaactccgtgaccc ctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttcctactacgcctactggggac agggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcggaggaggatctggtggcg gaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggctcaccgggccagtctatcacc attagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagca ccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaaccggcccagcggggtgtcgaatc gcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctgaccattagcggactgcaggccgaggat gaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcctcgactctctacgtgtttggcaccggaactaa ggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
	CAR22-6 可溶性 scFV AA	235	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrgl ewlgrtyyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyayw gqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyq qhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtg tkvtvlgshhhhhhhhh
	CAR22-6 完整 AA	236	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrgl ewlgrtyyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyayw gqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyq qhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtg tkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllsl vitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
[1457]	CAR22-6 完整 NT 慢病毒	237	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttgtgctatct cgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccgtcacggggc ctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgctgtgtccgtgaag tcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaactgaactccgtgaccc ctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttcctactacgcctactggggac agggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcggaggaggatctggtggcg gaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggctcaccgggccagtctatcacc attagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagca ccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaaccggcccagcggggtgtcgaatc gcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctgaccattagcggactgcaggccgaggat gaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcctcgactctctacgtgtttggcaccggaactaa ggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctccc agcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggt cttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcac tcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggag aggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatga cgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	CAR22-7 scFv AA	238	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtn yaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyygsgtldywgqgtlvtvssg gggsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkli

[1458]

		iydvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyagsntlvfgtgtkvtvl
CAR22-7 scFv NT	239	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcctg caaagcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccggacaag gattggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccag ggacgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagccggcttag atcagacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacggaagcggaaccc tcgactactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggaggcggctccggcggagg gggttccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggtcggtgtccggctcacctg gccaatccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtg gtaccagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctacgatgtgtcgtcccggccgagcg gagtgtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatactgcctcgctgacaattagcgggctg caggctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgcgggctctaacaccctggtgttcggca ccgggaccaaggtcaccgtgctg
CAR22-7 可溶性 scFV NT	240	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcctgcaaa gcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccggacaaggatt ggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccaggga cgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagccggcttagatca gacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacggaagcggaaccctcga ctactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggaggcggctccggcggaggggt tccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggtcggtgtccggctcacctggcca atccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtac cagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctacgatgtgtcgtcccggccgagcggagt gtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatactgcctcgctgacaattagcgggctgcagg ctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgcgggctctaacaccctggtgttcggcaccgg gaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-7 可溶性 scFV AA	241	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapg qglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyy gsgtldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyag sntlvfgtgtkvtvlgshhhhhhhhh
CAR22-7 完整 AA	242	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapg qglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyy gsgtldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyag sntlvfgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-7 完整 NT 慢病毒	243	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcctgcaaa gcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccggacaaggatt ggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccaggga cgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagccggcttagatca gacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacggaagcggaaccctcga ctactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggaggcggctccggcggaggggt tccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggtcggtgtccggctcacctggcca atccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtac cagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctacgatgtgtcgtcccggccgagcggagt gtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatactgcctcgctgacaattagcgggctgcagg ctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgcgggctctaacaccctggtgttcggcaccgg

[1459]

		gaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatc gcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatac ccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacc cttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-8 scFv AA	244	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqglewmgwisayngntnya qklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyvpyyyygmdvwgqgttvt vssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssgsiasnyvqwyqqrpgssp ttviyednqrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycqsydssnpwvfgggtkltvl
CAR22-8 scFv NT	245	caagtccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgtcct gcaaagccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccggccaag gactggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccagaagctgcag gggagagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgcagccttag gtccgacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactcgaactacgtgcc ctactactactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtgtcctccgggggtg gaggctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatgctgacccagcctcactc ggtgtcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcggagctcgggctccattgcgtc aaactacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaaccaccgtgatctacgaggaca accaacgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctccatcgattcctcttccaactccgcttcc ctgaccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgactactactgccagtcctacgactcaagc aatccgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccgtgctc
CAR22-8 可 溶 性 scFV NT	246	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgtcctgcaa agccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccggccaaggact ggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccagaagctgcagggga gagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgcagccttaggtcc gacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactcgaactacgtgccctact actactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtgtcctccgggggtggagg ctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatgctgacccagcctcactcggtg tcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcggagctcgggctccattgcgtcaaac tacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaaccaccgtgatctacgaggacaacca acgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctccatcgattcctcttccaactccgcttcctga ccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgactactactgccagtcctacgactcaagcaatc cgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccgtgctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatc ac
CAR22-8 可 溶 性 scFV AA	247	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqg lewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyv pyyyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssg siasnyvqwyqqrpgssptviyednqrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycq sydssnpwvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-8 完整 AA	248	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqg lewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyv pyyyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssg siasnyvqwyqqrpgssptviyednqrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycq sydssnpwvfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi

[1460]

		waplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-8 完整 NT 慢病毒	249	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgtcctgcaa agccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccggccaaggact ggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccagaagctgcagggga gagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgcagccttaggtcc gacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactcgaactacgtgccctact actactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtgtcctccgggggtggagg ctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatgctgacccagcctcactcggtg tcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcggagctcgggctccattgcgtcaaac tacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaaccaccgtgatctacgaggacaacca acgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctccatcgattcctcttccaactccgcttccctga ccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgactactactgccagtcctacgactcaagcaatc cgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccgtgctcaccactaccccagcaccgaggccaccc accccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagct ggtggggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctg gtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctg ctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcaga tgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagagg agtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcaga aagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcg agattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactca gcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-9 scFv AA	250	evqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgkglewvgriksktdggtady aapvkgrftisrddsknmylqmnslktedtgvyycitgatdvwgqgttvtvssggggsggggs ggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpgtapklliyrnnqrpsgv pdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgggtkltvl
CAR22-9 scFv NT	251	gaagtgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcctg cgtggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaaggg acttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgccgcaccc gtgaagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccagatgaactcg ctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtctggggacaggg aactaccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggcagcgggggcggggg gatcatcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggccagcgcgtgaccatttc atgctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtaccagcagctgcccggtac tgccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcggagtgccggacagattctccg ggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctgaggagcgaggacgaggcaga ctactattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgtgtttggaggcggcacgaagttgacc gtgctg
CAR22-9 可 溶 性 scFV NT	252	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcctgcgtg gcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaagggactt gaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgccgcacccgtg aagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccagatgaactcgctc aagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtctggggacagggaac taccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggcagcgggggcgggggat catcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggccagcgcgtgaccatttcatg ctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtaccagcagctgcccggtactgc

[1461]

		ccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcggagtgccggacagattctccggg tccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctgaggagcgaggacgaggcagacta ctattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgtgtttggaggcggcacgaagttgaccgt gctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-9 可溶性 scFV AA	253	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgk glewvgriksktdggtadyaapvkgrftisrddskntmylqmnslktedtgvyycitgatdvw gqgttvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyq qlpgtapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgg gtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-9 完整 AA	254	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgk glewvgriksktdggtadyaapvkgrftisrddskntmylqmnslktedtgvyycitgatdvw gqgttvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyq qlpgtapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgg gtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-9 完整 NT 慢病毒	255	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcctgcgtg gcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaagggactt gaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgccgcacccgtg aagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccagatgaactcgctc aagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtctggggacagggaac taccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggcagcgggggcgggggat catcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggccagcgcgtgaccatttcatg ctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtaccagcagctgcccggtactgc ccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcggagtgccggacagattctccggg tccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctgaggagcgaggacgaggcagacta ctattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgtgtttggaggcggcacgaagttgaccgt gctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgt ccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttc gcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagc tctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacg ggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagct ccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttc acatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-10 scFv AA	256	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyas svrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssg gggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvyvfgtgtkvtvl
CAR22-10 scFv NT	257	gaagtgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttgcg cgatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccccttccc gcggactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgccagctccg tgagaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctccaactcaatgctgt gaccccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcaggacggaaactcatgg agcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtccagcggtggaggaggct ccggcggtggaggttcgggggggaggagggagccaatcggctctgacccaaccggcctcagtca

[1462]

		gcggttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctccagcgacgtgggcggctac aactatgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtcc aatcggcctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaagtccggcaacactgcatcactgaca atcagcggactgcaagccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacctcctcctccactc tcgtctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcaccgtgctg
CAR22-10 可溶性 scFV NT	258	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttgcgcgat cagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccccttcccgcg gactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgccagctccgtga gaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctccaactcaatgctgtgac cccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcaggacggaaactcatggagc gacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtccagcggtggaggaggctccg gcggtggaggttcgggggggaggagggagccaatcggctctgacccaaccggcctcagtcagcg gttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctccagcgacgtgggcggctacaact atgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaatc ggccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaagtccggcaacactgcatcactgacaatca gcggactgcaagccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacctcctcctccactctcgt ctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatca c
CAR22-10 可溶性 scFV AA	259	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts sstlvyvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-10 完整 AA	260	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts sstlvyvfgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsa dapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-10 完整 NT 慢病毒	261	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttgcgcgat cagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccccttcccgcg gactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgccagctccgtga gaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctccaactcaatgctgtgac cccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcaggacggaaactcatggagc gacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtccagcggtggaggaggctccg gcggtggaggttcgggggggaggagggagccaatcggctctgacccaaccggcctcagtcagcg gttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctccagcgacgtgggcggctacaact atgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaatc ggccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaagtccggcaacactgcatcactgacaatca gcggactgcaagccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacctcctcctccactctcgt ctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccaccca ccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctg gtggggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggt acttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgct gtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgc cggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagat gctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagagg

[1463]

		agtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcaga aagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcg agattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactca gcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-11 scFv AA	262	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrglewlgrtyyrskwyndya vsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwyegnwfdpwgqgtlvtvssg gggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviyg knhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgnhlfgggtkltvl
CAR22-11 scFv NT	263	gaagtgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttgtg ctattagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccctcccg gggactggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtccg tgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaactcaactccgtc acccctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggttggtacgaagg aaactggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcgggaggaggggcagc ggtggcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcacccaggacccggcggtgtc agtggccctgggccaaacggtccgcatcacatgccaggggattccctgaggtcatactacgcga gctggtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatctacgggaagaaccacaggcc gagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagacactgacagcctcaccatcaccg gcgcgcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcccgggactcgagcgggaaccacctt ttcggtggcggaaccaagctgaccgtgctg
CAR22-11 可 溶 性 scFV NT	264	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttgtgctatt agcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccctcccgggg actggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtccgtgaa gtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaactcaactccgtcaccc ctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggttggtacgaaggaaact ggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcgggaggaggggcagcggtg gcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcacccaggacccggcggtgtcagtg gccctgggccaaacggtccgcatcacatgccaggggattccctgaggtcatactacgcgagctg gtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatctacgggaagaaccacaggccgagc ggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagacactgacagcctcaccatcaccggcgc gcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcccgggactcgagcgggaaccacctttcg gtggcggaaccaagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-11 可 溶 性 scFV AA	265	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwye gnwfdpwgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyya swyqqkpgqapvlviygknhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgnh lfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-11 完整 AA	266	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwye gnwfdpwgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyya swyqqkpgqapvlviygknhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgnh lfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-11 完整 NT 慢病毒	267	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttgtgctatt agcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccctcccgggg actggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgtccgtgaa gtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaactcaactccgtcaccc

[1464]

		ctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggttggtacgaaggaaact ggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcgggaggaggggcagcggtg gcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcacccaggacccggcggtgtcagtg gccctgggccaaacggtccgcatcacatgccagggggattccctgaggtcatactacgcgagctg gtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatctacgggaagaaccacaggccgagc ggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagacactgacagcctcaccatcaccggcgc gcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcccgggactcgagcgggaaccacctttcg gtggcggaaccaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcc taccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgt gcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggg tcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaa gcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccaga ggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagccta caagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatga aaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-12 scFv AA	268	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyas svrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssg gggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgtqltvl
CAR22-12 scFv NT	269	gaagtgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcacttg cgcgatctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagcccatc gaggggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactacgcgagct cagtgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttgcaactgaac gccgtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcaggacggaaaca gctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcctcgggtggcggg gggtccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgacgcagccggcttcc gcttccgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttccagcgatgtcggcgg gtacaactacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgt gtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaagtcgggcaatactgcctcgct gactatcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattactgctcctcctacacctcgtcctcc acactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgctt
CAR22-12 可溶性 scFV NT	270	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcacttgcgcg atctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagcccatcgag gggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactacgcgagctcag tgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttgcaactgaacgcc gtgaccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcaggacggaaacagctg gtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcctcgggtggcgggggt ccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgacgcagccggcttccgcttc cgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttccagcgatgtcggcgggtaca actacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtcaa accggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaagtcgggcaatactgcctcgctgacta tcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattactgctcctcctacacctcgtcctccacact ctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-12 可溶性 scFV AA	271	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts

[1465]

		sstlyvfgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-12 完整 AA	272	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyts sstlyvfgtgtqltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeay seigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-12 完整 NT 慢病毒	273	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcacttgcgcg atctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagcccatcgag gggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactacgcgagctcag tgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttgcaactgaacgcc gtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcaggacggaaacagctg gtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcctcgggtggcgggggct ccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgacgcagccggcttccgcttc cgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttccagcgatgtcggcgggtaca actacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtcaa accggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaagtcgggcaatactgcctcgctgacta tcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattactgctcctcctacacctcgtcctccacact ctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgcttaccactaccccagcaccgaggccacccac cccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctgg tggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgt acatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgct ccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaa gaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-13 scFv AA	274	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsisssyywgwirqppgkglewigsiyysgstyynpsl ksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiwgqgtmvtvssgdggsggg gsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwyqqrpgsapatviyednqrp sgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvfgggtkltvl
CAR22-13 scFv NT	275	caagtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttgta ccgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctcccgga aagggactggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcactgaagt cccgcgtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctccgtgactgc cgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatggctcagatttggg gacagggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcggaggatctggtgg cgggggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagcccaggaaagaccgtca ccatcccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgcagtggtaccagcaaagac ccggcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcggccgtccggcgtgccggaccg cttcagcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctgacgatttccggtctgaaaaccgag gacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgccacttgggtgtttggaggaggcaccaa gctgaccgtgctg
CAR22-13 可溶性 scFV NT	276	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttgtaccgtg tccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctcccggaaaggg

[1466]

		actggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcactgaagtcccgc gtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctccgtgactgccgcc gacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatggctcagatttggggaca gggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcggaggatctggtggcggg gggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagcccaggaaagaccgtcaccat cccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgcagtggtaccagcaaagacccg gcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcggccgtccggcgtgccggaccgcttc agcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctgacgatttccggtctgaaaaccgaggac gaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgccacttgggtgtttggaggaggcaccaagctg accgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-13 可溶性 scFV AA	277	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsisssyywgwirqppgk glewigsiyysgstyynpslksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiw gqgtmvtvssgdggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwy qqrpgsapatviyednqrpsgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvf gggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-13 完整 AA	278	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsisssyywgwirqppgk glewigsiyysgstyynpslksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiw gqgtmvtvssgdggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwy qqrpgsapatviyednqrpsgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvf gggtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvl llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-13 完整 NT	279	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttgtaccgtg tccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctcccggaaaggg actggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcactgaagtcccgc gtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctccgtgactgccgcc gacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatggctcagatttggggaca gggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcggaggatctggtggcggg gggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagcccaggaaagaccgtcaccat cccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgcagtggtaccagcaaagacccg gcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcggccgtccggcgtgccggaccgcttc agcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctgacgatttccggtctgaaaaccgaggac gaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgccacttgggtgtttggaggaggcaccaagctg accgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcc tctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-14 scFv AA	280	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiwgqgtmvtvssggggsggg gsggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvswyqqypgkapklmiydvnn rpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffgagtkvtvl
CAR22-14	281	caagtgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcct

[1467]

scFv NT		gcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctggacaag gcctggaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccagaagtttcag ggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcctccctgcgg tcggaggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggacatttggggacag gcaccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggaggttcaggggcgg gggctcccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccgggacagagcattacc atctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcctggtaccagcagtacc ccggaaaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgcccttctggggtgtcctctcggtt ctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcgggactccaagctgaggatgaa gccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctcttcttcggtgccggaactaaggtcaca gtgttg
CAR22-14 可溶性 scFV NT	282	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcctgcaa agcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctggacaaggcctg gaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccagaagtttcagggaag agtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcctccctgcggtcgga ggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggacatttggggacagggca ccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggaggttcaggggcgggggct cccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccgggacagagcattaccatctcg tgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcctggtaccagcagtaccccgga aaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgcccttctggggtgtcctctcggttctccg ggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcgggactccaagctgaggatgaagccga ctactactgttcgagctacacctcctcctccactctcttcttcggtgccggaactaaggtcacagtgttg ggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-14 可溶性 scFV AA	283	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiw gqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvswy qqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffgag tkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-14 完整 AA	284	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiw gqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvswy qqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffgag tkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllsl vitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-14 完整 NT	285	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcctgcaa agcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctggacaaggcctg gaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccagaagtttcagggaag agtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcctccctgcggtcgga ggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggacatttggggacagggca ccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggaggttcaggggcgggggct cccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccgggacagagcattaccatctcg tgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcctggtaccagcagtaccccgga aaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgcccttctggggtgtcctctcggttctccg ggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcgggactccaagctgaggatgaagccga ctactactgttcgagctacacctcctcctccactctcttcttcggtgccggaactaaggtcacagtgttg accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccct gcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcct

			gcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctcta caacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggga cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcca aaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg
	CAR22-15 scFv AA	286	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgleyvsaissnggstyyansv kdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpgpndywgqgtlvtvssggg gsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatwyqqkpgqapvlvfydenn rpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpscvfgggtkltvl
	CAR22-15 scFv NT	287	gaagtgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgtgt gcggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaagga ctcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtgaaggat cggttcaccatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtccctgagggca gaggacatggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccaccctggaccgaa cgattactggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggtggtggaagcggcggcgga ggatcgggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgccgtgtccgtggctctgg gtcagactgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattacgcgacctggtaccagca gaagccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaacaaccggccatccgggattccc gaccggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctgaccatcaccgggacccaggccga ggacgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctccggcaacccctcctgcgtgttcggcgg tggaaccaagctgactgtcctc
[1468]	CAR22-15 可 溶 性 scFV NT	288	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgtgtgcgg cctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaaggactcga atacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtgaaggatcggttc accatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtccctgagggcagagga catggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccaccctggaccgaacgatta ctggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggggtggtggaagcggcggcggaggatc gggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgccgtgtccgtggctctgggtcag actgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattacgcgacctggtaccagcagaag ccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaacaaccggccatccgggattcccgacc ggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctgaccatcaccgggacccaggccgagga cgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctccggcaaccctcctgcgtgttcggcggtgg aaccaagctgactgtcctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
	CAR22-15 可 溶 性 scFV AA	289	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgl eyvsaissnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpg pndywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatw yqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpscv fgggtkltvlgshhhhhhhh
	CAR22-15 完整 AA	290	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgl eyvsaissnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpg pndywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatw yqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpscv fgggtkltvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

[1469]

CAR22-15 完整 NT	291	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgtgtgcgg cctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaaggactcga atacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtgaaggatcggttc accatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtccctgagggcagagga catggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccaccctggaccgaacgatta ctggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggggtggtggaagcggcggcggaggatc gggggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgccgtgtccgtggctctgggtcag actgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattacgcgacctggtaccagcagaag ccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaacaaccggccatccgggattcccgacc ggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctgaccatcaccgggacccaggccgagga cgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctccggcaaccccctcctgcgtgttcggcggtgg aaccaagctgactgtcctcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcg cctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacc cggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacc cttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-16 scFv AA	292	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvs nrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstwvfgggtkltvl
CAR22-16 scFv NT	293	gaagtgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcctg taaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccgggacaggga ctggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaagttccaggg cagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtcatcactgaggt ccgaggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccgtcgactactgggg acagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggggagggtcgggggg cggaggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgcccggacagtccatca ccatttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactacgtgtcatggtaccagcagc atcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcggccgtcgggcgtcagcaac cggttctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgaccattagcgggctgcaggccgagg acgaagcggattactactgctcctcctacacttcctcctcgacctgggtgtttggtggaggcaccaag ttgactgtgctg
CAR22-16 可 溶 性 scFV NT	294	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcctgtaaa gcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccgggacagggactgg aatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaagttccagggcaga gtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtcatcactgaggtccga ggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccgtcgactactggggacag gcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggggagggtcgggggcgg aggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgcccggacagtccatcaccat ttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactacgtgtcatggtaccagcagcatcc cggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcggccgtcgggcgtcagcaaccggt tctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgaccattagcgggctgcaggccgaggacga agcggattactactgctcctcctacacttcctcctcgacctgggtgtttggtggaggcaccaagttga

[1470]

		ctgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-16 可溶性 scFV AA	295	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstwvf gggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-16 完整 AA	296	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstwvf gggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvl llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-16 完整 NT	297	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcctgtaaa gcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccgggacagggactgg aatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaagttccagggcaga gtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtcatcactgaggtccga ggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccgtcgactactggggacag ggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggggagggtcgggggcgg aggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgcccggacagtccatcaccat ttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactacgtgtcatggtaccagcagcatcc cggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcggccgtcgggcgtcagcaaccggt tctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgaccattagcgggctgcaggccgaggacga agcggattactactgctcctcctacacttcctcctcgacctgggtgtttggtggaggcaccaagttga ctgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-17 scFv AA	298	qvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyads vkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycakeplfgvveedvdywgqgtlvtvssggggs ggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagnghnyldwylqkpgqspqlliy lgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqnpltfgggtkleikr
CAR22-17 scFv NT	299	caagtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctcatg tgctgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctggaaaggg actggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactccgtgaagg gccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactctctgcgggcc gaggacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtggaggaagatgtgg actactggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatcgggaggcggagg cagcgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccctgcccgtgacccctg gggaaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctggaaacggacacaattacc ttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatctacctcggaagcaaccggg cgtccggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcaccgacttcaccctgaaaatctcg

[1471]

		agggtggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcaggcgcttcagaacccactcactttc ggggggcggtactaagctggaaatcaagcgc
CAR22-17 可溶性 scFV NT	300	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctcatgtgct gcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctggaaagggact ggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactccgtgaagggcc gctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactctctgcgggccgag gacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtggaggaagatgtggacta ctggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatcgggaggcggaggcag cgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccctgcccgtgaccctgggg aaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctggaaacggacacaattaccttga ttggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatctacctcggaagcaaccgggcgtc cggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcaccgacttcaccctgaaaatctcgaggg tggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcaggcgcttcagaacccactcactttcgggg gcggtactaagctggaaatcaagcgcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-17 可溶性 scFV AA	301	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyycakeplfgvveedv dywgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagngh nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqn pltfgggtkleikrgshhhhhhhh
CAR22-17 完整 AA	302	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyycakeplfgvveedv dywgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagngh nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqn pltfgggtkleikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-17 完整 NT	303	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctcatgtgct gcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctggaaagggact ggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactccgtgaagggcc gctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactctctgcgggccgag gacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtggaggaagatgtggacta ctggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatcgggaggcggaggcag cgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccctgcccgtgaccctgggg aaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctggaaacggacacaattaccttga ttggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatctacctcggaagcaaccgggcgtc cggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcaccgacttcaccctgaaaatctcgaggg tggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcaggcgcttcagaacccactcactttcgggg gcggtactaagctggaaatcaagcgcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcc taccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgt gcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggg tcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaa gcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccaga ggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagccta caagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatga aaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

[1472]

CAR22-18 scFv AA	304	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdafdiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyvswyqqhpgkapklmiye vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtkvtvl
CAR22-18 scFv NT	305	caagtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcctg caaggcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtcaagg actggaatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagttccaggg cagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccagcctgaggtc tgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgccttcgacatctg gggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtggaggaggttcagg cggaggaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctccccgggacagtcc attaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaactacgtgtcgtggtatcagc agcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaatcggccgtccggggtgtcg aaccggttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgaccatcagcgggctgcaggccg aggacgaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctcaaccctggtgttcggcactggaac taaggtcaccgtgctt
CAR22-18 可溶性 scFV NT	306	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcctgcaag gcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtcaaggactgg aatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagttccagggcagag tgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccagcctgaggtctgagg acactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgccttcgacatctggggcc agggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtggaggaggttcaggcggag gaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctccccgggacagtccattacc atctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaactacgtgtcgtggtatcagcagcac ccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaatcggccgtccggggtgtcgaaccg gttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgaccatcagcgggctgcaggccgaggac gaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctcaaccctggtgttcggcactggaactaagg tcaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-18 可溶性 scFV AA	307	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-18 完整 AA	308	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-18 完整 NT	309	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcctgcaag gcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtcaaggactgg aatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagttccagggcagag tgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccagcctgaggtctgagg acactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgccttcgacatctggggcc agggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtggaggaggttcaggcggag gaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctccccgggacagtccattacc atctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaactacgtgtcgtggtatcagcagcac

[1473]

		ccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaatcggccgtccggggtgtcgaaccg gttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgaccatcagcgggctgcaggccgaggac gaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctcaaccctggtgttcggcactggaactaagg tcaccgtgcttaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccag cctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtctt gacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactc gtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgag gcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaa cgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-19 scFv AA	310	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsgafdiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyd vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyassstlvfgggtkvtvl
CAR22-19 scFv NT	311	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctg caaggcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccggacagg gactggagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaagttccagg gaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtctagcttgcggtc cgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccggggcctttgacat ctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagcggaggaggaggttc gggaggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtgtccgggagcccgggcc agagcatcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtacaattacgtgtcatggtat caacagcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtgtcgaaccgccctagcggag tgtccaaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcgagcctgaccattagcggactccag gccgaggatgaagccgactactactgctcctcctacgcttcatcgtccaccctggtgttcggtggtg gcaccaaggtcaccgtgctt
CAR22-19 可溶性 scFV NT	312	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgcaag gcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccggacagggactg gagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaagttccagggaag agtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtctagcttgcggtccgag gacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccggggcctttgacatctggg gccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagcggaggaggaggttcggga ggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtgtccgggagcccgggccagag catcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtacaattacgtgtcatggtatcaac agcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtgtcgaaccgccctagcggagtgtc caaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcgagcctgaccattagcggactccaggccg aggatgaagccgactactactgctcctcctacgcttcatcgtccaccctggtgttcggtggtggcacc aaggtcaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-19 可溶性 scFV AA	313	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsga fdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggyny vswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyassst lvfgggtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-19 完整 AA	314	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsga fdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggyny

[1474]

		vswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyassst lvfgggtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtc gvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapa ykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-19 完整 NT	315	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgcaag gcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccggacagggactg gagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaagttccagggaag agtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtctagcttgcggtccgag gacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccggggcctttgacatctggg gccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagcggaggaggaggttcggga ggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtgtccgggagcccgggccagag catcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtacaattacgtgtcatggtatcaac agcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtgtcgaaccgccctagcggagtgtc caaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcgagcctgaccattagcggactccaggccg aggatgaagccgactactactgctcctcctacgcttcatcgtccaccctggtgttcggtggtggcacc aaggtcaccgtgcttaccactaccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctc ccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttc actcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcat gaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-20 scFv AA	316	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggscldywgqgtlvtvssgggg sggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgrynyvswyqqhpgkapklmiy evsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsstldfgtgtkvtvl
CAR22-20 scFv NT	317	gaagtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagct gcaaggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggccagg gactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaagttccagg gaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagctccctgagg agcgaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagcgggggtcctgtc tcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtggtagcggaggag ggggatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcgtacgtgtctggatcacc cggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgggccgctacaactacgtgtc atggtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatctacgaggtgtcctatcggcctag cggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactgcttcccttaccatttccgggttgc aagccgaggacgaggccgattactactgttcctcctataccacttcatccaccctggactttggaacc ggcaccaaggtcaccgtgctg
CAR22-20 可 溶 性 scFV NT	318	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagctgcaa ggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggccagggact ggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaagttccagggaa gagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagctccctgaggagc gaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagcgggggtcctgtctcg attactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtggtagcggaggagggg

[1475]

		gatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcgtacgtgtctggatcacccgg acagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgggccgctacaactacgtgtcatg gtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatctacgaggtgtcctatcggcctagcg gtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactgcttcccttaccatttccgggttgcaa gccgaggacgaggccgattactactgttcctcctataccacttcatccaccctggactttggaaccg gcaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-20 可 溶 性 scFV AA	319	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggsc ldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgrynyv swyqqhpgkapklmiyevsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsstld fgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-20 完整 AA	320	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggsc ldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgrynyv swyqqhpgkapklmiyevsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsstld fgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-20 完整 NT	321	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagctgcaa ggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggccagggact ggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaagttccagggaa gagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagctccctgaggagc gaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagcgggggtcctgtctcg attactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtggtagcggaggagggg gatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcgtacgtgtctggatcacccgg acagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgggccgctacaactacgtgtcatg gtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatctacgaggtgtcctatcggcctagcg gtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactgcttcccttaccatttccgggttgcaa gccgaggacgaggccgattactactgttcctcctataccacttcatccaccctggactttggaaccg gcaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccat cgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcata cccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggag gaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgga caagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-21 scFv AA	322	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygdafdiwgqgttvtvssggggs ggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyvswyqqhpgkapklmiyd vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgggtkltvl
CAR22-21 scFv NT	323	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctg caaggcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccgggccagg gacttgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaaagtttcagg ggagagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtcaagcttgcgct ccgaggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggcgacgctttcgata

		tctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggctcgggcggaggaggct caggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgtgagcggtagccctgggca gtctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctataagtacgtcagctggtac caacagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgacgtcagcaaccggccctccggggt gtcaaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgcctccctgaccattagcgggctgcagg ccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttcatcgtccactctcgtgttcgggggagga actaagctcaccgtgctg
CAR22-21 可溶性 scFV NT	324	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgcaag gcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccgggccagggact tgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaaagtttcagggga gagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtcaagcttgcgctccg aggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggcgacgctttcgatatct ggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggctcgggcggaggaggctca ggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgtgagcggtagccctgggcagt ctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctataagtacgtcagctggtacca acagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgacgtcagcaaccggccctccggggtgt caaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgcctccctgaccattagcgggctgcaggcc gaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttcatcgtccactctcgtgttcgggggaggaac taagctcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-21 可溶性 scFV AA	325	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygd afdiwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyv swyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssttlv fgggtkltvlgshhhhhhhh
[1476] CAR22-21 完整 AA	326	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygd afdiwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyv swyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssttlv fgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-21 完整 NT	327	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgcaag gcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccgggccagggact tgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaaagtttcagggga gagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtcaagcttgcgctccg aggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggcgacgctttcgatatct ggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggctcgggcggaggaggctca ggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgtgagcggtagccctgggcagt ctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctataagtacgtcagctggtacca acagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgacgtcagcaaccggccctccggggtgt caaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgcctccctgaccattagcgggctgcaggcc gaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttcatcgtccactctcgtgttcgggggaggaac taagctcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcct cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgg ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttt cactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccettca tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg

[1477]

		cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta tgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-22 scFv AA	328	evqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqglewmggiipifgtanyaq kfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywgqgtlvtvssggggsgggg sggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpekgprylmkvnsdgslsk gdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifgggtkltvl
CAR22-22 scFv NT	329	gaagtgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcct gcaaggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccgggacag ggcctggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaagtttcag ggacgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcctccctgcgg agcgaggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttcggatactgggg acagggaacccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcggaggggttccggggg aggcggatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctctctgggagccagcgtga agctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttggcaccagcagcagccgg agaaggggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctgagcaagggcgacggcat cccggatcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagatacctcacaatctcctcgctccaatc cgaggacgaggctgactactactgccagacctggggtagcggcatggcgattttcgggggtggaa ctaagctgaccgtgctg
CAR22-22 可溶性 scFV NT	330	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcctgcaa ggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccgggacagggcct ggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaagtttcagggacg cgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcctccctgcggagcga ggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttcggatactggggacagg gaaccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcggaggggttccggggaggcg gatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctctctgggagccagcgtgaagctca cctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttggcaccagcagcagccggagaag gggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctgagcaagggcgacggcatcccgg atcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagatacctcacaatctcctcgctccaatccgagg acgaggctgactactactgccagacctggggtagcggcatggcgattttcgggggtggaactaag ctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-22 可溶性 scFV AA	331	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqg lewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywg qgtlvtvssggggsggggsggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpe kgprylmkvnsdgslskgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifggg tkltvlgshhhhhhhh
CAR22-22 完整 AA	332	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqg lewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywg qgtlvtvssggggsggggsggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpe kgprylmkvnsdgslskgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifggg tkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllsl vitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-22 完整 NT	333	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcctgcaa ggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccgggacagggcct ggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaagtttcagggacg

[1478]

		cgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcctccctgcggagcga ggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttcggatactggggacagg gaacccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcggaggggttccgggggaggcg gatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctctctgggagccagcgtgaagctca cctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttggcaccagcagcagccggagaag gggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctgagcaagggcgacggcatcccgg atcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagatacctcacaatctcctcgctccaatccgagg acgaggctgactactactgccagacctggggtagcggcatggcgattttcgggggtggaactaag ctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctccca gcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtc ttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcact cgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggag aggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtaca acgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatga cgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-23 scFv AA	334	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdvwgkgttvtvssggggsggg gsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyevsk rpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfgggtkltvl
CAR22-23 scFv NT	335	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggacaaggc ctggagtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaagttccagg gacgcgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcctcactccggtc ggaagataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtctggggaaagggca ccaccgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaagcggtggcgggggga agccagtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggccagagcgtgaccattt cgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcctggtaccagcagcaccctg gaaaggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatccggcgtgccggaccggttt tcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcgggcttcaggctgaggacgaag cggattactactgctcctcctatacttcatccggcaccttggtgttcggcggagggactaagctgact gtgctc
CAR22-23 可溶性 scFV NT	336	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagccccggacaaggcctgg agtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaagttccagggacg cgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcctcactccggtcggaa gataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtctggggaaagggcaccac cgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaagcggtggcgggggaagcc agtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggccagagcgtgaccatttcgtg caccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcctggtaccagcagcaccctggaaa ggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatccggcgtgccggaccggttttcgg gatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcgggcttcaggctgaggacgaagcgg attactactgctcctcctatacttcatccggcaccttggtgttcggcggagggactaagctgactgtgc tcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-23 可溶性 scFV AA	337	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdv wgkgttvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw

[1479]

		yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfg ggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-23 完整 AA	338	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdv wgkgttvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfg ggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlll slvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-23 完整 NT	339	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggacaaggcctgg agtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaagttccagggacg cgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcctcactccggtcggaa gataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtctggggaaagggcaccac cgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaagcggtggcgggggaagcc agtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggccagagcgtgaccatttcgtg caccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcctggtaccagcagcaccctggaaa ggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatccggcgtgccggaccggttttcgg gatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcgggcttcaggctgaggacgaagcgg attactactgctcctcctatacttcatccggcaccttggtgttcggcggagggactaagctgactgtgc tcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccc tgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcct gcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctcta caacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggga cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcca aaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaa ggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg
CAR22-24 scFv AA	340	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsyissssstiyyadsv kgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskafdiwgqgtmvtvssgggg sggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygknn rpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyvfgtgtkvtvl
CAR22-24 scFv NT	341	gaagtgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcatgc gccgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggcccccggaaagggc ctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtgaaggggc ggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctcagggcg gaagataccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgaccactccaaggcctt cgatatctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggcagcgggggggg cggaagcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgccgtgtccgtggctctg ggacagaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtactacgcctcctggtacca gcagaaaccgggccaggccccgtcctcgtgatctacggaaagaacaacaggccttcgggtatc ccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagcctcactattaccggggcccagg ctgaggacgaggccgactactaccggaactcccgcgactcctcgggcaatccgtacgtctttggta ctgggaccaaggtcaccgtgctg
CAR22-24 可 溶 性	342	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcatgcgccg

scFV NT		cgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggcccccggaaagggcctgg aatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtgaaggggcggttc accattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctcagggcggaaga taccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgaccactccaaggccttcgata tctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggcagcgggggggggcgga agcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgccgtgtccgtggctctgggac agaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtactacgcctcctggtaccagcaga aaccgggccaggcccccgtcctcgtgatctacggaaagaacaacaggccttcgggtatcccagac cggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagcctcactattaccggggcccaggctgagg acgaggccgactactaccggaactcccgcgactcctcgggcaatccgtacgtctttggtactggga ccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-24 可 溶 性 scFV AA	343	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswy qqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyvfg tgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-24 完整 AA	344	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswy qqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyvfg tgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlll slvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-24 完整 NT	345	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcatgcgccg cgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggcccccggaaagggcctgg aatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtgaaggggcggttc accattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctcagggcggaaaga taccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgaccactccaaggccttcgata tctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggcagcgggggggggcgga agcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgccgtgtccgtggctctgggac agaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtactacgcctcctggtaccagcaga aaccgggccaggcccccgtcctcgtgatctacggaaagaacaacaggccttcgggtatcccagac cggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagcctcactattaccggggcccaggctgagg acgaggccgactactaccggaactcccgcgactcctcgggcaatccgtacgtctttggtactggga ccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgc ctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccc ggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctg ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccc ttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagga ggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggaca cctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-25 scFv AA	346	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgpdywgqgtlvtvsssggggsg gggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyev snrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtkltvl

[1480]

	CAR22-25 scFv NT	347	caagtgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggccaaggc ctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaagtttcaggg ccgcgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgcggctgagaag cgacgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccgggcctgattactggg gacaggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggcggaggttccggcg gaggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggatcaccgggccagagca tcaccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataactacgtgtcgtggtaccagca gcaccctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtccaatagacccagcggagtgtcga accggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttgaccatctctggactgcaagccgag gacgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctcaacccttgtgttcggaactggcactaag ctgaccgtgctc
	CAR22-25 可 溶 性 scFV NT	348	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgcaagg catccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggccaaggcctgg agtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaagtttcagggccg cgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgcggctgagaagcga cgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccgggcctgattactggggac aggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggcggaggttccggcggag ggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggatcaccgggccagagcatca ccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataactacgtgtcgtggtaccagcagc accctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtccaatagacccagcggagtgtcgaac cggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttgaccatctctggactgcaagccgagga cgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctcaacccttgtgttcggaactggcactaagct gaccgtgctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
[1481]	CAR22-25 可 溶 性 scFV AA	349	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgp dywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvf gtgtkltvlgshhhhhhhh
	CAR22-25 完整 AA	350	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgp dywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvf gtgtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
	CAR22-25 完整 NT	351	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgcaagg catccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggccaaggcctgg agtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaagtttcagggccg cgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgcggctgagaagcga cgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccgggcctgattactggggac aggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggcggaggttccggcggag ggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggatcaccgggccagagcatca ccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataactacgtgtcgtggtaccagcagc accctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtccaatagacccagcggagtgtcgaac cggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttgaccatctctggactgcaagccgagga cgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctcaacccttgtgttcggaactggcactaagct gaccgtgctcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagc

[1482]

		ctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttg acttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgt gatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaa gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacg ctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-26 scFv AA	352	evqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkglewmgiiypgdsdtrys psfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccgaldiwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspq lliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtppwtfgqgtkleikr
CAR22-26 scFv NT	353	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcgt gcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctggaaa gggtctggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccgagctttca gggccaggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagctcactgaa ggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagattgttgcggcgc ccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcggctccggcggag gagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagcccctgtccctgcccgtgact cctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtcccttctgcactccaacggctacaac tatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctgatctacctcggttcaaaca gagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcacagacttcacgctcaagattt cccgcgtggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaagcgctgcagaccccgccctg gactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcgg
CAR22-26 可 溶 性 scFV NT	354	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcgtgcaaa gggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctggaaagggtct ggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccgagctttcagggcca ggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagctcactgaaggcctcg gacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagattgttgcggcgcccttgata tctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcggctccggcggaggagggtc cgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagcccctgtccctgcccgtgactcctgggg agccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtcccttctgcactccaacggctacaactatctcga ttggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctgatctacctcggttcaaacagagcttcc ggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcacagacttcacgctcaagatttcccgcgt ggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaagcgctgcagaccccgccctggactttcg gacaaggaaccaagctggagattaagcggggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-26 可 溶 性 scFV AA	355	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkglewmgiiypgdsdtryspsfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccgaldiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtppwtfgqgtkleikrgshhhhhhhh
CAR22-26 完整 AA	356	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkglewmgiiypgdsdtryspsfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccgaldiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtppwtfgqgtkleikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkma

		eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
	CAR22-26 完整 NT	357	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcgtgcaaa gggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctggaaagggtct ggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccgagctttcagggcca ggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagctcactgaaggcctcg gacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagattgttgcggcgcccttgata tctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcggctccggcggaggagggtc cgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagccccctgtccctgcccgtgactcctgggg agccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtcccttctgcactccaacggctacaactatctcga ttggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctgatctacctcggttcaaacagagcttcc ggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcacagacttcacgctcaagatttcccgcgt ggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaagcgctgcagaccccgccctggactttcg gacaaggaaccaagctggagattaagcggaccactaccccagcaccgaggccacccaccccgg ctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtgggg ccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgc ggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat ctttaagcaaccccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttc ccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacg acgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaat ccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
[1483]	CAR22-27 scFv AA	358	qvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkglewiaftshsgnvkynpslt grvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiwglgtmvtvssggggsggg gsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsnr asgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgggtkvdikr
	CAR22-27 scFv NT	359	caagtgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcacttgct ccgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaagggg ctggagtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgaccggaaga gtgaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggtgaccgctgctg acaccgccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatgcgttcgaaatctg ggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtggaggaggcagcgg aggaggaggttccgagatcgtgctgacccagagccccctgtccctccccgtgaccctggagaac cggccagcatttcctgccggtcgagccagtccctgttgcattcaaatggctacaactacctggattgg tatctgcagaagcccggccagtcaccgcaactgctcatctacctgggaagcaaccgcgcctcggg tgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcactgacttcacactgaagatctccagggtgga ggccgaggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagaccccgcctctgaccttcggcgg tggaactaaggtcgacatcaagcgg
	CAR22-27 可 溶 性 scFV NT	360	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcacttgctccgtg agcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaaggggctgga gtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgaccggaagagtgac cattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggtgaccgctgctgacacc gccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatgcgttcgaaatctgggggc tcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtggaggaggcagcggaggag gaggttccgagatcgtgctgacccagagccccctgtccctccccgtgaccctggagaaccggcc agcatttcctgccggtcgagccagtccctgttgcattcaaatggctacaactacctggattggtatctg cagaagcccggccagtcaccgcaactgctcatctacctgggaagcaaccgcgcctcgggtgtccc ggaccgcttctccggctcggggtctggcactgacttcacactgaagatctccagggtggaggccg

[1484]

		aggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagaccccgcctctgaccttcggcggtggaa ctaaggtcgacatcaagcggggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-27 可溶性 scFV AA	361	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkgl ewiaftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiw glgtmvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldw ylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgg gtkvdikrgshhhhhhhh
CAR22-27 完整 AA	362	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkgl ewiaftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiw glgtmvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldw ylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgg gtkvdikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-27 完整 NT	363	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcacttgctccgtg agcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaaggggctgga gtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgaccggaagagtgac cattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggtgaccgctgctgacacc gccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatgcgttcgaaatctgggggc tcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtggaggaggcagcggaggag gaggttccgagatcgtgctgacccagagccccctgtccctccccgtgaccctggagaaccggcc agcatttcctgccggtcgagccagtccctgttgcattcaaatggctacaactacctggattggtatctg cagaagcccggccagtcaccgcaactgctcatctacctgggaagcaaccgcgcctcgggtgtccc ggaccgcttctccggctcggggtctggcactgacttcacactgaagatctccagggtggaggccg aggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagaccccgcctctgaccttcggcggtggaa ctaaggtcgacatcaagcggaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccat cgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcata cccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggag gaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgga caagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-28 scFv AA	364	evqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkglewvsyisssgstiyyadsv kgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdywgqgtlvtvssggggsggg gsggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvhwyqqkpgqapvlaiyyds drpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdhwvfgggtkltvl
CAR22-28 scFv NT	365	gaagtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttgc gcggcctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagggac tcgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaaggggcg gttcactatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgcgcgccgag gacaccgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggactactggggccag gggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcggttccgggggcgg cggctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgtgtccgtggccccg ggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaagaacgtccattggtacca gcagaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactccgaccgcccaagcggtatc

[1485]

		cctgaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactctgaccatctcaagagtggaggct ggcgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcctcggaccactgggtgtttgggggga ggcaccaagctgactgtcctg
CAR22-28 可溶性 scFV NT	366	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttgcgcgg cctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagggactcga atgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaaggggcggttc actatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgcgcgccgaggac accgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggactactggggccaggg gaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcggttccgggggcggcg gctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgtgtccgtggccccggg aaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaagaacgtccattggtaccagc agaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactccgaccgcccaagcggtatccct gaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactctgaccatctcaagagtggaggctgg cgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcctcggaccactgggtgtttgggggagg caccaagctgactgtcctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-28 可溶性 scFV NT	367	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkgl ewvsyisssgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdyw gqgtlvtvssggggsggggsggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvh wyqqkpgqapvlaiyydsdrpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdh wvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-28 完整 AA	368	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkgl ewvsyisssgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdyw gqgtlvtvssggggsggggsggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvh wyqqkpgqapvlaiyydsdrpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdh wvfgggtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-28 完整 NT	369	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttgcgcgg cctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagggactcga atgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaaggggcggttc actatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgcgcgccgaggac accgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggactactggggccaggg gaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcggttccgggggcggcg gctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgtgtccgtggccccggg aaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaagaacgtccattggtaccagc agaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactccgaccgcccaagcggtatccct gaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactctgaccatctcaagagtggaggctgg cgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcctcggaccactgggtgtttgggggagg caccaagctgactgtcctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcg cctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacc cggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacc cttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga

[1486]

		cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-29 scFv AA	370	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgytspfdywgqgtlvtvssgggg sggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnirsknvhwyqqkpgqapvlv isydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwdsdsdhyvfgtgtkvtvl
CAR22-29 scFv NT	371	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccaggg actggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaagtttcagg gacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagctcactgcgg tccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggtacacttcgcccttc gactattggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggaggaagcggaggaggcg gctccggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaactgacccagcctccgtccgt gtccgtggcccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggcacaatattcggagcaagaac gtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgctcgtgatctcctacgatggggacag gccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctccactgctaccctgaccatctcg cgcgtggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtctgggactccgacagcgatcact acgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgctt
CAR22-29 可溶性 scFv – nt	372	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccagggactg gaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaagtttcagggacg cgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagctcactgcggtccg aggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggtacacttcgcccttcgacta ttggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggaggaagcggaggaggcggctcc ggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaactgacccagcctccgtccgtgtccg tggcccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggcacaatattcggagcaagaacgtgca ttggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgctcgtgatctcctacgatggggacaggcctt ctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctccactgctaccctgaccatctcgcgcg tggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtctgggactccgacagcgatcactacgtg ttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-29 可溶性 scFv AA	373	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgyts pfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnir sknvhwyqqkpgqapvlvisydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwd sdsdhyvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-29 完整 AA	374	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgyts pfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnir sknvhwyqqkpgqapvlvisydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwd sdsdhyvfgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwa plagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrs adapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkma eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-29 完整 NT	375	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccagggactg gaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaagtttcagggacg cgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagctcactgcggtccg aggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggtacacttcgcccttcgacta ttggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggaggaagcggaggaggcggctcc ggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaactgacccagcctccgtccgtgtccg

[1487]

		tggcccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggcacaatattcggagcaagaacgtgca ttggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgctcgtgatctcctacgatggggacaggcctt ctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctccactgctaccctgaccatctcgcgcg tggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtctgggactccgacagcgatcactacgtg ttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggg ctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtgggg ccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgc ggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttc ccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacg acgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaat ccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-30 scFv AA	376	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtn yaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepassswygyyyymdvwgkgtlvt vssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsintylnwyqqkp gkppklliyaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycqqsyssllftfgggtkleik
CAR22-30 scFv NT	377	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgtcctg caaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccggacaagg actcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccagg gtagagtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcgagactgagg tccgacgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtcttggtacggatattacta ttacatggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggtggcggaggcagcggcg gtggagggtccggcggcggcggatcgggaggggggaggcagcgacatccagatgactcagtcc ccatcctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattacctgtcgggccagccaatccatc aacacctacctgaactggtaccagcagaagccggggaagcctccaaagctgctcatctacgcggc ctcaaatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggttccggttcggggacccacttcactctga ccattagctcactgcaaccggacgactttgccacctactactgccagcagagctactcctccctcctg accttcggcggaggaaccaagctcgagatcaag
CAR22-30 可溶性 scFv NT	378	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgtcctgcaag gcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccggacaaggactc gagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccagggtag agtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcgagactgaggtccg acgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtcttggtacggatattactattac atggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggtggcggaggcagcggcggtg gagggtccggcggcggcggatcgggaggggggaggcagcgacatccagatgactcagtccccat cctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattacctgtcgggccagccaatccatcaaca cctacctgaactggtaccagcagaagccggggaagcctccaaagctgctcatctacgcggcctca aatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggttccggttcggggacccacttcactctgaccat tagctcactgcaaccggacgactttgccacctactactgccagcagagctactcctccctcctgacct tcggcggaggaaccaagctcgagatcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-30 可溶性 scFv AA	379	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapg qglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepasssw ygyyyymdvwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtit crasqsintylnwyqqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycq qsyssllftfgggtkleikgshhhhhhhh
CAR22 -30 完整 AA	380	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapg qglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepasssw

[1488]

		ygyyyymdvwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtit crasqsintylnwyqqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycq qsyssllftgggtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwa plagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrs adapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkma eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-30 完整 NT	381	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaag tgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgtcctgcaag gcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccggacaaggactc gagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaagttccagggtag agtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcgagactgaggtccg acgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtcttggtacggatattactattac atggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggtggcggaggcagcggcggtg gagggtccggcggcggcggatcgggaggggggaggcagcgacatccagatgactcagtccccat cctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattacctgtcgggccagccaatccatcaaca cctacctgaactggtaccagcagaagccggggaagcctccaaagctgctcatctacgcggcctca aatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggttccggttcggggacccacttcactctgaccat tagctcactgcaaccggacgactttgccacctactactgccagcagagctactcctccctcctgacct tcggcggaggaaccaagctcgagatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccacccccgg ctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtgggg ccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgc ggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttc ccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctcca gcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacg acgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaat ccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-31 scFv AA	382	Qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqglewmgwmnpnsgntg yaqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnywsyygmdvwgqgtlvtvss ggggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhp geapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyccsyaggstwvfgggtkvt vl
CAR22-31 scFv NT	383	Caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctg caaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactgggcagg gactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaagtttcag ggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagcagcctgag gtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcctactacggaatg gacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcggttcagggggcggc ggaagcggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgactcaaccgagatcc gtgtccgggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccgggaccagctccgacgtgggag ggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggcgccaaagttgattatctacgac gccgataagcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaagtccggcaacactgcctcc ctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactactgctgttcatacgccggcgga tcgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgctg
CAR22-31 可溶性 scFv NT	384	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactgggcagggactgg aatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaagtttcagggacgc gtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagcagcctgaggtccga

[1489]

		ggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcctactacggaatggacgtg tggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcggttcaggggcggcggaag cggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgactcaaccgagatccgtgtcc gggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccgggaccagctccgacgtgggagggtaca actacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggcgccaaagttgattatctacgacgccgata agcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaagtccggcaacactgcctccctgacca tcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactactgctgttcatacgccggcggatcgacct gggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-31 可溶性 scFv AA	385	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqg lewmgwmnpnsgntgyaqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnyws yygmdvwgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyc csyaggstwvfgggtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-31 完整 AA	386	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqg lewmgwmnpnsgntgyaqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnyws yygmdvwgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyc csyaggstwvfgggtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiy iwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvk fsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-31 完整 NT	387	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactgggcagggactgg aatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaagtttcagggacgc gtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagcagcctgaggtccga ggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcctactacggaatggacgtg tggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcggttcaggggcggcggaag cggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgactcaaccgagatccgtgtcc gggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccgggaccagctccgacgtgggagggtaca actacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggcgccaaagttgattatctacgacgccgata agcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaagtccggcaacactgcctccctgacca tcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattactactgctgttcatacgccggcggatcgacct gggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccac cccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctgg tggggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgt acatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgct ccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaa gaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-32 scFv AA	388	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqglewmgwisayngntnya qklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydywgqgtlvtvssggggsggg gsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnlawyqqkpgqaprlliyaastra tgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfgggtkveikt
CAR22-32 scFv NT	389	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgc aaggcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggccaagg gctggagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccagaagctgcag

[1490]

		ggacgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagctcagatcactgcg ctccgacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactcctacgactactggggac aggggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcggaggcagcggtggag gcggttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtcccccgctaccctttccgtgagc ccgggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgtgacttcgaacctggcctggta ccagcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgccgcgagcaccagggcaaccgg aattcctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttcaccctgacaatcagctcaatgcagt ccgaggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacacctggcctcccctgacgttcggaggcgg aaccaaggtcgaaatcaagacc
CAR22-32 可溶性 scFv NT	390	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgcaag gcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggccaagggctg gagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccagaagctgcaggga cgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagctcagatcactgcgctcc gacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactcctacgactactggggacagg ggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcggaggcagcggtggaggcg gttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtcccccgctaccctttccgtgagcccg ggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgtgacttcgaacctggcctggtacca gcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgccgcgagcaccagggcaaccggaatt cctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttcaccctgacaatcagctcaatgcagtccg aggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacacctggcctcccctgacgttcggaggcggaac caaggtcgaaatcaagaccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-32 可溶性 scFv AA	391	Malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgq glewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnla wyqqkpgqaprlliyaastratgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfg ggtkveiktgshhhhhhhh
CAR22-32 完整 AA	392	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqg lewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnla wyqqkpgqaprlliyaastratgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfg ggtkveiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-32 完整 NT	393	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgcaag gcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggccaagggctg gagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccagaagctgcaggga cgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagctcagatcactgcgctcc gacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactcctacgactactggggacagg ggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcggaggcagcggtggaggcg gttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtcccccgctaccctttccgtgagcccg ggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgtgacttcgaacctggcctggtacca gcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgccgcgagcaccagggcaaccggaatt cctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttcaccctgacaatcagctcaatgcagtccg aggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacacctggcctcccctgacgttcggaggcggaac caaggtcgaaatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcct cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgg ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttt cactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttca

[1491]

		tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta tgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-33 scFv AA	394	qvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkalewlalidwdddkyystslrt rltiskdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyffdlwgqgtlvtvssgggg sggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlli ylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtpwtfgqgtkleik
CAR22-33 scFv NT	395	caagtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacctgta ccttctccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccgggaa aggccctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctcactccgca ctcgcctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgactaacatggac ccgatggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaaccaacactcagg ccccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgggcggaggaggctc cggtggagggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactcaatccccgctgtccttg cctgtgaccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagccagtccctcctgcactcgaa cggatacaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtccccacaactcctgatctacctg ggctctaatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttcgggctcgggtaccgacttcacg ctgaagatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgtactactgcatgcaggcgcttcagact ccatggacatttggacaggggaccaagctggagatcaag
CAR22-33 - 可溶性 scFv NT	396	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacctgtaccttc tccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccgggaaaggc cctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctcactccgcactcg cctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgactaacatggacccga tggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaaccaacactcaggcccc ctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgggcggaggaggctccggt ggaggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactcaatccccgctgtccttgcctgt gaccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagccagtccctcctgcactcgaacggat acaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtccccacaactcctgatctacctgggctc taatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttcgggctcgggtaccgacttcacgctgaa gatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgtactactgcatgcaggcgcttcagactccatg gacatttggacaggggaccaagctggagatcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-33 可溶性 scFv AA	397	malpvtalllplalllhaarpqvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkale wlalidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyf fdlwgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngy nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqt pwtfgqgtkleikgshhhhhhhh
CAR22-33 完整 AA	398	malpvtalllplalllhaarpqvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkale wlalidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyf fdlwgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngy nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqt pwtfgqgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplag tcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-33	399	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacctgtaccttc

	完整 NT		tccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccgggaaaggc cctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctcactccgcactcg cctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgactaacatggacccga tggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaaccaacactcaggcccc ctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgggcggaggaggctccggt ggaggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactcaatccccgctgtccttgcctgt gaccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagccagtccctcctgcactcgaacggat acaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtccccacaactcctgatctacctgggctc taatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttcgggctcgggtaccgacttcacgctgaa gatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgtactactgcatgcaggcgcttcagactccatg gacatttggacaggggaccaagctggagatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccacc ccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggt ggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgt acatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgct ccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagt acgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaa gaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	CAR22-34 scFv AA	400	qvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgkglewigqiyhsgtttynpsl gsrvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwgqgttvtvssggggsgg ggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllysdgynyldwylqkpgqspqlliylgsn rasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkleik
[1492]	CAR22-34 scFv NT	401	caagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacctgtg ccgtgtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccgggaaag ggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctgggctccc gcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccgtgaccgctg ccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtactacggaatggac gtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggggcggatcgggtggtggagga tcgggaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtcccccctgtcgctgcctgtgactcctggg gaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccgacggatacaactacctgg attggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatctacctgggttcaaacagggcct ccggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacagacttcaccctgcaaatcagcgg agtggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcaggcgttgcagacccagtcctttggaca aggcaccaagctcgaaatcaag
	CAR22-34 可溶性 scFv NT	402	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacctgtgccgt gtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccgggaaagggat tggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctgggctcccgcgt cactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccgtgaccgctgccga taccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtactacggaatggacgtctg gggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggggcggatcgggtggtggaggatcgg gaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtcccccctgtcgctgcctgtgactcctggggaa ccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccgacggatacaactacctggatt ggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatctacctgggttcaaacagggcctcc ggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacagacttcaccctgcaaatcagcggag tggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcaggcgttgcagacccagtcctttggacaag gcaccaagctcgaaatcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
	CAR22-34	403	Malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgk

[1493]

可溶性scFv AA		glewigqiyhsgtttynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqslllysdgynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkleikgshhhhhhhh
CAR22-34完整AA	404	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgkglewigqiyhsgtttynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqslllysdgynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-34完整NT	405	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacctgtgccgtgtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccgggaaagggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctgggctcccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccgtgaccgctgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtactacggaatggacgtctgggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggggcggatcgggtggtggaggatcgggaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtccccctgtcgctgcctgtgactcctggggaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccgacggatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatctacctgggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacagacttcaccctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcaggcgttgcagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-35scFv AA	406	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagnyyyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsyftswyhqkpgqapvlviygnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssgdhlvfgggtkltvl
CAR22-35scFv NT	407	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgcaaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccagggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaagtttcaggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcgtcactgcggtccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcggggaattactactactacggaatggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggtggtggaagcgggggaggaggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggaccctgcggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcctacttcacatcctggtatcatcagaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaaacaacaacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctccctgaccatcaccggcgcccaggccgaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagcagcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctg

[1494]

CAR22-35 可溶性 scFv NT	408	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgcaag gcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccagggactg gagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaagtttcaggggaga gtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcgtcactgcggtccgag gacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcggggaattactactactacggaat ggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggtggtggaagcgggggaggga ggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggaccctgcggtgtccgtggccctgg gacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcctacttcacatcctggtatcatc agaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaaacaacaacagaccgtccgggattcc cgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctccctgaccatcaccggcgcccaggcc gaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagcagcggcgatcacctcgtgttcgggg gagggactaagcttactgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-35 可溶性 scFv AA	409	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagny yyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsy ftswyhqkpgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssg dhlvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-35 完整 AA	410	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagny yyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsy ftswyhqkpgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssg dhlvfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplag tcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-35 完整 NT	411	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgcaag gcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccagggactg gagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaagtttcaggggaga gtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcgtcactgcggtccgag gacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcggggaattactactactacggaat ggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggtggtggaagcgggggaggga ggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggaccctgcggtgtccgtggccctgg gacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcctacttcacatcctggtatcatc agaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaaacaacaacagaccgtccgggattcc cgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctccctgaccatcaccggcgcccaggcc gaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagcagcggcgatcacctcgtgttcgggg gagggactaagcttactgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctacc atcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcat acccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcct gctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagca acccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagagga ggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaag caggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgg acaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaaga gggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag gacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-36 scFv AA	412	Qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsy aqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgsgafdiwgqgttvtvssggg

[1495]

		gsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygkn nrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhpvvfgggtkltvl
CAR22-36 scFv NT	413	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggccaggg cttggagtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaagttccagg gtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagctccctgcggt ccgaggataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctcgggggcattc gacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggatcgggtggcggag gaagcggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtgtcggtggccctggga cagactgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatgcctcctggtaccagcag aagcccggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaacagaccgtcagggattccag accggttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcactatcaccggagcccaggcggag gacgaggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggcaaccatcccgtggtgttcggagg gggcactaagctgaccgtgctg
CAR22-36 可溶性 scFv NT	414	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggccagggcttgg agtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaagttccagggtcgg gtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagctccctgcggtccgag gataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctcgggggcattcgacatc tggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggatcgggtggcggaggaagc ggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtgtcggtggccctgggacagac tgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatgcctcctggtaccagcagaagcc cggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaacagaccgtcagggattccagaccgg ttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcactatcaccggagcccaggcggaggacga ggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggcaaccatcccgtggtgttcggagggggca ctaagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-36 - 可溶性 scFv AA	415	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgs gafdiwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhp vvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-36 完整 AA	416	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgs gafdiwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhp vvfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtc gvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapa ykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-36 完整 NT	417	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggccagggcttgg agtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaagttccagggtcgg gtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagctccctgcggtccgag gataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctcgggggcattcgacatc tggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggatcgggtggcggaggaagc ggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtgtcggtggccctgggacagac tgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatgcctcctggtaccagcagaagcc cggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaacagaccgtcagggattccagaccgg ttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcactatcaccggagcccaggcggaggacga

[1496]

		ggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggcaaccatcccgtggtgttcggaggggca ctaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcc tcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccg gggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgct ttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagg ggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcc tgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac ctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-37 scFv AA	418	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyydssvldywgqgtlvtvssggg gsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykhvswyqhhpgkapklmi ydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyrnfnslvfgtgtkvtvl
CAR22-37 scFv NT	117	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggacaggg actggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagttccaggg aagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagcagcctgagga gcgaggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactacgattcctccgtgc tggattactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcggaagcgggggcg gagggtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtccgtgtccgggagccc tggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggcggatataagcacgtgtca tggtaccagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatctacgacgtgtcgaacagaccga gcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacactgcctcactcaccgtgtcgggcct ccaagcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctaccgcaacttcaactccttggtgttcggc accggcaccaaggtcaccgtcctg
CAR22-37 可 溶 性 scFv NT	419	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggacagggactgg aatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagttccagggaaga gtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagcagcctgaggagcga ggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactacgattcctccgtgctgga ttactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcggaagcgggggcggagg gtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtccgtgtccgggagccctggc cagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggcggatataagcacgtgtcatggt accagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatctacgacgtgtcgaacagaccgagcgg ggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacactgcctcactcaccgtgtcgggcctccaa gcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctaccgcaacttcaactccttggtgttcggcacc ggcaccaaggtcaccgtcctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-37 可 溶 性 scFv AA	420	Malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyyd ssvldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy khvswyqhhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyr nfnslvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-37 完整 AA	421	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyyd ssvldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy khvswyqhhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyr nfnslvfgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapl

[1497]

		agtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsad apaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaea yseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-37 完整 NT	422	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgcaagg cctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggacagggactgg aatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagttccagggaaga gtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagcagcctgaggagcga ggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactacgattcctccgtgctgga ttactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcggaagcgggggcggaggg gtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtccgtgtccgggagccctggc cagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggcggatataagcacgtgtcatggt accagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatctacgacgtgtcgaacagaccgagcgg ggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacactgcctcactcaccgtgtcgggcctccaa gcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctaccgcaacttcaactccttggtgttcggcacc ggcaccaaggtcaccgtcctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctacca tcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcata cccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaa cccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggag gaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgga caagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR22-38 scFv AA	423	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyldafdiwgqgttvtvssggggs ggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiye vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtqltvl
CAR22-38 scFv NT	424	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcctgc aaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggacaggg actggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccagaagtttcagg gccgcgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtccagcctgaga gccgaggatactgctgtgtactactgcgcccggggcggatacggagattatctggacgccttcgac atttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggggaggcggctcgggggcggcggat caggatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtgagcggttcgcccgggca gtccatcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctacaactacgtgtcgtggtacc agcaacatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggtgtccaaccggccgtccggggt gtcaaaccggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcctccctcaccatctcgggactgcagg ccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcctcatctaccctggtgttcgggactgg tacccagcttaccgtgctg
CAR22-38 可溶性 scFv NT	425	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcctgcaagg cgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggacagggactg gaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccagaagtttcagggccg cgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtccagcctgagagccg aggatactgctgtgtactactgcgcccggggcggatacggagattatctggacgccttcgacatttg gggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggggaggcggctcgggggcggcggatcag gatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtgagcggttcgcccgggcagtcc atcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctacaactacgtgtcgtggtaccagca

[1498]

		acatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggtgtccaaccggccgtccggggtgtcaa accggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcctccctcaccatctcgggactgcaggccga ggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcctcatctaccctggtgttcgggactggtaccc agcttaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR22-38 可溶性 scFv AA	426	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyld afdiwgqgttvtvssggggsggggsgsggsgsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-38 完整 AA	427	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapg qglewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyld afdiwgqgttvtvssggggsggggsgsggsgsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtqltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvl llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-38 完整 NT	428	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcctgcaagg cgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggacagggactg gaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccagaagtttcagggccg cgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtccagcctgagagccg aggatactgctgtgtactactgcgcccggggcggatacggagattatctggacgccttcgacatttg gggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggggaggcggctcgggggggcggcggatcag gatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtgagcggttcgccccgggcagtcc atcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctacaactacgtgtcgtggtaccagca acatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggtgtccaaccggccgtccggggtgtcaa accggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcctccctcaccatctcgggactgcaggccga ggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcctcatctaccctggtgttcgggactggtaccc agcttaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccgggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttc actcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcat gaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctat gacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

[1499] 产生几个额外的CD22 scFv序列,并在下表6B中描述。克隆CD22-64和CD22-65基于上述 克隆CD22-12的亲和力成熟。在一些实施方案中,CD22的亲和力成熟结合结构域的亲和力比 CD22-12对CD22的亲和力更强。在一些实施方案中,CD22的亲和力成熟结合结构域的结合率 (on-rate)快于CD22-12对CD22的结合率。

[1500] 表6B:人CD22 scFv序列

[1501]

名称	SEQ ID	序列
CAR22-53 scFv 结构域 AA	131	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGLEWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQGTMVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDV GGYNYVSWYQQHPGKAPKVIISEVNNRPSGVSHRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSGRTLYVFGTGSKVTVLG
CAR22-53 scFv NT	1108	GAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGC CCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGAC AGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCA GTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACT ACAGGTCCAAGTGGTATAGTGATTATGCAGTATCTGTGAAA AGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTT CTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCAAGAGATCCTTACGATTTTTGGAGTGGTT ATCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC ACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGCAGCGGCGGCGGCGGCTC TGGTGGTGGTGGATCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTC CGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCAC TGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTACAACTATGTCTCCT GGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAGGTCATAATT TCTGAGGTCAATAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTCATCGCTTC TCTGGGTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTC ATATACAAGTGGCAGGACTCTTTATGTCTTCGGAACTGGGA GCAAGGTCACCGTCCTAGGT
CAR22-53 完整 AA	1109	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSDYA VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFW SGYPDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVIIS EVNNRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTS GRTLYVFGTGSKVTVLGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR22-53 完整 NT (CD22-53 scFv+人 CD8α+41-BB+CD3ζ)	1110	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTACAGCTGCAGCAGTC AGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCA CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCT GCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGA GTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTG ATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCA GACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGT GACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATC CTTACGATTTTTGGAGTGGTTATCCTGATGCTTTTGATATCT GGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGT

[1502]

		GGCAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGTC TGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACA GTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTG GTGGTTACAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGC AAAGCCCCCAAGGTCATAATTTCTGAGGTCAATAATCGGCC CTCAGGGGTTTCTCATCGCTTCTCTGGGTCCAAGTCTGGCAA CACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACG AGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGTGGCAGGACT CTTTATGTCTTCGGAACTGGGAGCAAGGTCACCGTCCTAGG TACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTA GACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGAC TTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACT TGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGT AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCT GTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGA ACTGCGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCT ACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTT GGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAG GACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAA TCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAG ATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAAC GCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACT CAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGC AGGCCCTGCCGCCTCGG
	CAR 22-57	132	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAWNWIRQSP SRGLEWLGRTYHRSTWYNDYVGSVKSRITINPDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARETDYGDYGAFDIWGQGTTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYE SVSWYQQHPGNAPKLIIHGVNNRPSGVFDRFSVSQSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSHTTTSTLYVFGTGTKVTVLG
	CAR22-58	133	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTFYRSKWYNDYAVSVKGRITISPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCAGGDYYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVS WYQQHPGKAPKLMIYEVINRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTVLG
	CAR22-59	134	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDI GGFNYVSWYQQHAGEAPKLMIYEVTNRPSGVSDRFSGSKSDN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYASGSPLYVFGTGTKVTVLG
	CAR22-60	135	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITFSCTGTSSD IGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGTKSG

[1503]

		NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVLG
CAR22-61	136	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-62	137	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-63	138	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYIFGTGTKVTVLG
CAR22-64	139	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVS SGGGGSGGGGSGGGGPQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSS DVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-65	140	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSP SRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQ LNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSS DVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL

[1504] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表6A或6B中列出的任何重链结合结构域氨基 酸序列的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表6A或6B中列出的任 何轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1505] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表6A或6B中列出的任何轻链结合结构域氨基 酸序列的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及在表6A或6B中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。

[1506] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1507] CD22-64和CD22-65基于克隆CD22-12的亲和力成熟。测试所有三种构建体并且发现具 有活性(参见本文实施例25)。基于这些观察,设计了一个结构类,以包含工作实施例。因 此,在一些实施方案中,本文所述的CD22结合结构域包含具有序列:XRLQDGNSWSDAFDV(SEQ ID NO:141)的HCDR3。在一些实施方案中,X是任何氨基酸,任何规范氨基酸,非极 性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P,M,F,或W),无芳环的非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I, P,或M)

或酸性氨基酸(例如D或E)。

[1508] 此外,CAR22-53和CAR22-57至CAR22-65在其CDR中具有结构相似性。一个结构类被设计为包含这些工作实施例。因此,在一些实施方案中,本文所述的CD22结合结构域包含具有序列:TGX$_1$X$_2$X$_3$DX$_4$GX$_5$X$_6$X$_7$X$_8$VS(SEQ ID NO:__)的LCDR1。在一些实施方案中,X$_1$,X$_2$,X$_3$,X$_4$,X$_5$,X$_6$,X$_7$,或X$_8$或其任何组合各自独立地为任何氨基酸,例如任何规范氨基 酸。在一些实施方案中,X$_4$或X$_5$或两者各自独立地为非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P, M,F,或W)或无芳环的非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P或M)。在一些实施方案中, X$_6$是芳族氨基酸(例如F,Y或W)。在一些实施方案中,X$_1$是S或T;X$_2$是R或S;X$_3$为N 或S,X$_4$为V或I,X$_5$为A或G;X$_6$是Y或F;X$_7$是E或N;或X$_8$为S或Y,或其任何组合。 在一些实施方案中,X$_1$是S或T;X$_2$是R或S;X$_3$为N或S,X$_4$为V或I,X$_5$为A或G;X$_6$是Y或F;X$_7$是E或N;X$_8$为S或Y。

[1509] 类似地,在一些实施方案中,本文所述的CD22结合结构域包含具有序列:X$_1$VX$_2$NRPS(SEQ ID NO:__)的LCDR2。在一些实施方案中,X$_1$或X$_2$或两者各自独立地为任何氨基酸, 例如任何规范氨基酸。在一些实施方案中,X$_1$是酸性氨基酸(例如D或E),非极性氨基酸 (例如G,A,V,L,I,P,M,F,或W)或没有芳环的非极性氨基酸(例如,,G,A,V,L,I,P,或M)。 在实施方案中,X$_2$是非极性氨基酸(例如G,A,V,L,I,P,M,F,或W),不含芳环的非极性氨 基酸(例如,G,A,V,L,I,P,或M)或极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q)。在一 些实施方案中,X$_1$是E,G或D,和/或X$_2$是N,I,S或T。

[1510] 类似地,在一些实施方案中,本文所述的CD22结合结构域包含具有序 列:SSX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$(SEQ ID NO:__)的LCDR3。在一些实施方案中,X$_1$,X$_2$,X$_3$,X$_4$,X$_5$, X$_6$,X$_7$,或X$_8$,或其任何组合各自独立地为任何氨基酸,例如任何规范氨基酸。在一些实施方 案中,X$_1$是芳族氨基酸(例如F,Y或W)或带正电荷的氨基酸(例如K,R或H)。在一些实 施方案中,X$_2$是非极性氨基酸(例如G,A,V,L,I,P,M,F,或W),没有芳环的非极性氨基酸 (例如,G,A,V,L,I,P,或M)或极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q)。在一些实施 方案中,X$_3$是极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q)。在一些实施方案中,X$_4$是非极 性氨基酸(例如G,A,V,L,I,P,M,F或W),没有芳环的非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P, 或M)或极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q)。在一些实施方案中,X$_5$是极性带电荷 的氨基酸(例如,K,R,或H)或极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q)。在一些实施 方案中,X$_6$是极性不带电荷的氨基酸(例如S,T,N或Q),非极性氨基酸(例如G,A,V,L, I,P,M,F,或W),没有芳环的非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P或M)。在一些实施方案 中,X$_7$是非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P,M,F,或W),没有芳环的非极性氨基酸(例 如,G,A,V,L,I,P,或M)或芳族氨基酸(例如F,Y或W)。在一些实施方案中,X$_8$不存在或 是芳族氨基酸(例如F,Y或W)。在一些实施方案中,X$_9$是非极性氨基酸(例如,G,A,V,L, I,P,M,F或W),没有芳环的非极性氨基酸(例如,G,A,V,L,I,P或M)。在一些实施方案 中,X$_1$是Y或H,X$_2$是A或T,X$_3$是S或T;X$_4$是G,T或S,X$_5$是R或S,X$_6$是T或P,X$_7$是L或Y,X$_8$是Y或不存在,或X$_9$是V或I或其任何组合。在一些实施方案中,X$_1$是Y或H,X$_2$是A或T, X$_3$是S或T;X$_4$是G,T或S,X$_5$是R或S,X$_6$是T或P,X$_7$是L或Y,X$_8$是Y或不存在,X$_9$是V或I。 对于重链可变结构域,scFv结构域的人CDR序列的序列在表7A,7B或7C中显示,以及对于轻 链可变结构域在表8A或8B中显示。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1511] 表7A.CD22 CAR的重链可变结构域CDR。根据“组合的”定义鉴定CDR。

[1512]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
m971	GDSVSSNSAAWN	142	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	181	EVTGDLEDAFDI	449
CAR22-1	GFTVSSNYMS	143	VIYSGGSTYYADSVKG	182	QSTPYDSSGYYSGDAFDI	450
CAR22-2	GDSVSSNSAAWN	144	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	183	DLGWIAVAGTFDY	451
CAR22-3	GDSVLSNSDTWN	145	RTYHRSTWYDDYASSVRG	184	DRLQDGNSWSDAFDV	452
CAR22-4	GFTFDDYAMH	146	GISWNSGSIGYADSVKG	185	GLSSWHFHDALDI	453
CAR22-5	GFTFDDYAMH	147	GISWNSGSIGYADSVKG	186	DKGGGYYDFWSGSDY	454
CAR22-6	GDSVSSNSATWT	148	RTYYRSTWYNDYAVSVKS	187	EGSGSYYAY	455
CAR22-7	GYTFTGYYMH	149	WINPNSGGTNYAQKFQG	188	DYWGYYGSGTLDY	456
CAR22-8	GYTFTSYGIS	150	WISAYNGNTNYAQKLQG	189	AGLALYSNYVPYYYYGMDV	457
CAR22-9	GFTFSNAWMN	151	RIKSKTDGGTADYAAPVKG	190	GATDV	458
CAR22-10	GDSVLSNSDTWN	152	RTYHRSTWYDDYASSVRG	191	DRLQDGNSWSDAFDV	459
CAR22-11	GDSVSSNSAAWN	153	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	192	EESSSGWYEGNWFDP	460
CAR22-12	GDSVLSNSDTWN	154	RTYHRSTWYDDYASSVRG	193	DRLQDGNSWSDAFDV	461
CAR22-13	GGSISSSSYYWG	155	SIYYSGSTYYNPSLKS	194	GRMDTAMAQI	462
CAR22-14	GYTFTSYYMH	156	IINPSGGSTSYAQKFQG	195	DLDVSLDI	463
CAR22-15	GFTFSSYAMH	157	AISSNGGSTYYANSVKD	196	VHSSGYYHPGPNDY	464
CAR22-16	GYTFTSYYMH	158	IINPSGGSTSYAQKFQG	197	EAGVVAVDY	465
CAR22-17	GFTFSSYAMS	159	AISGSGGSTYYADSVKG	198	EPLFGVVEEDVDY	466

[1513]

CAR22-18	GYTFTSYYMH	160	IINPSGGSTSYAQKFQG	199	GSGSLGDAFDI	467
CAR22-19	GYTFTSYYMH	161	IINPSGGSTSYAQKFQG	429	DGFGELSGAFDI	468
CAR22-20	GYTFTSYYMH	162	IINPSGGSTSYAQKFQG	430	GPIGCSGGSCLDY	469
CAR22-21	GYTFTSYYMH	163	IINPSGGSTSYAQKFQG	431	GSYGDYGDAFDI	470
CAR22-22	GGTFSSYAIS	164	GIIPIFGTANYAQKFQG	432	DHKVVRFGY	471
CAR22-23	GYTFTSYYMH	165	IINPSGGSTSYAQKFQG	433	GDYYMDV	472
CAR22-24	GFTFSSYAMS	166	YISSSSSTIYYADSVKG	434	DGPIRYFDHSKAFDI	473
CAR22-25	GYTFTSYYMH	167	IINPSGGSTSYAQKFQG	435	EMDDSSGPDY	474
CAR22-26	GYSFTGSWIG	168	IIYPGDSDTRYSPSFQG	436	GFLRGGDCCGALDI	475
CAR22-27	GGSINSYYWS	169	FTSHSGNVKYNPSLTG	437	GLDPLFAYDAFEI	476
CAR22-28	GFTFSDYYMS	170	YISSSGSTIYYADSVKG	438	DDFWSGSVDY	477
CAR22-29	GYTFTSYYMH	171	IINPSGGSTSYAQKFQG	439	EDDSSGYTSPFDY	478
CAR22-30	GYTFTGYYMH	172	WINPNSGGTNYAQKFQG	440	EPASSSWYGYYYYMDV	479
CAR22-31	GYTFTSYDIN	173	WMNPNSGNTGYAQKFQG	441	GDSNYWSYYGMDV	480
CAR22-32	GYTFTSYGIS	174	WISAYNGNTNYAQKLQG	442	FSSSDSYDY	481
CAR22-33	GFSLNTFGMSVS	175	LIDWDDDKYYSTSLRT	443	IYGGDRTNTQAPYFFDL	482
CAR22-34	GASITSRHWWN	176	QIYHSGTTTYNPSLGS	444	DYLELATYYGMDV	483
CAR22-35	GYTFTSYYMH	177	IINPSGGSTSYAQKFQG	445	DLAAAGNYYYYGMDV	484
CAR22-36	GYTFTSYYMH	178	IINPSGGSTSYAQKFQG	446	DDDFWSGSGAFDI	485
CAR22-37	GYTFTSYYMH	179	IINPSGGSTSYAQKFQG	447	PEGVSYYDSSVLDY	486
CAR22-38	GYTFTSYYMH	180	IINPSGGSTSYAQKFQG	448	GGYGDYLDAFDI	487

[1514] 表7B.CD22 CAR的重链可变结构域CDR

[1515]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-53 Kabat	SNSAAWN	488	RTYYRSKWYSDYAVSVKS	499	DPYDFWSGYPDAFDI	510
CAR22-53 Chothia	GDSVSSNSA	489	YYRSKWY	500	DPYDFWSGYPDAFDI	511
CAR22-53 组合的 Kabat/Chothia	GDSVSSNSAAWN	1111	RTYYRSKWYSDYAVSVKS	1113	DPYDFWSGYPDAFDI	1115
CAR22-53 IMGT	GDSVSSNSAA	1112	TYYRSKWYS	1114	ARDPYDFWSGYPDAFDI	1116
CAR22-57 组合的	GDSVSNNNAAWN	490	RTYHRSTWYNDYVGSVKS	501	ETDYGDYGAFDI	512
CAR22-57 Kabat	NNNAAWN		RTYHRSTWYNDYVGSVKS		ETDYGDYGAFDI	
CAR22-58 组合的	GDSVSSNSAAWN	491	RTFYRSKWYNDYAVSVKG	502	GDYYYGLDV	513
CAR22-58 Kabat	SNSAAWN		RTFYRSKWYNDYAVSVKG		GDYYYGLDV	
CAR22-59 组合的	GDSVLSNSDTWN	492	RTYHRSTWYDDYASSVRG	503	DRLQDGNSWSDAFDV	514
CAR22-59 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-60 组合的	GDSVLSNSDTWN	493	RTYHRSTWYDDYASSVRG	504	DRLQDGNSWSDAFDV	515
CAR22-60 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-61 组合的	GDSVLSNSDTWN	494	RTYHRSTWYDDYASSVRG	505	DRLQDGNSWSDAFDV	516
CAR22-61 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-62 组合的	GDSVLSNSDTWN	495	RTYHRSTWYDDYASSVRG	506	DRLQDGNSWSDAFDV	517
CAR22-62 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-63 组合的	GDSVLSNSDTWN	496	RTYHRSTWYDDYASSVRG	507	DRLQDGNSWSDAFDV	518
CAR22-63 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-64 组合的	GDSVLSNSDTWN	497	RTYHRSTWYDDYASSVRG	508	VRLQDGNSWSDAFDV	519

[1516]

CAR22-64 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		VRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-65 组合的	GDSMLSNSDTWN	498	RTYHRSTWYDDYASSVRG	509	VRLQDGNSWSDAFDV	520
CAR22-65 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		VRLQDGNSWSDAFDV	

[1517] 表7C.CD22 CAR的重链可变结构域CDR。根据Kabat鉴定CDR。

[1518]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
m971	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EVTGDLEDAFDI	
CAR22-1	SNYMS		VIYSGGSTYYADSVKG		QSTPYDSSGYYSGDAFDI	
CAR22-2	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		DLGWIAVAGTFDY	
CAR22-3	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-4	DYAMH		GISWNSGSIGYADSVKG		GLSSWHFHDALDI	
CAR22-5	DYAMH		GISWNSGSIGYADSVKG		DKGGGYYDFWSGSDY	
CAR22-6	SNSATWT		RTYYRSTWYNDYAVSVKS		EGSGSYYAY	
CAR22-7	GYYMH		WINPNSGGTNYAQKFQG		DYWGYYGSGTLDY	
CAR22-8	SYGIS		WISAYNGNTNYAQKLQG		AGLALYSNYVPYYYYGMDV	
CAR22-9	NAWMN		RIKSKTDGGTADYAAPVKG		GATDV	
CAR22-10	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-11	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EESSSGWYEGNWFDP	
CAR22-12	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-13	SSSYYWG		SIYYSGSTYYNPSLKS		GRMDTAMAQI	
CAR22-14	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DLDVSLDI	
CAR22-15	SYAMH		AISSNGGSTYYANSVKD		VHSSGYYHPGPNDY	
CAR22-16	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EAGVVAVDY	
CAR22-17	SYAMS		AISGSGGSTYYADSVKG		EPLFGVVEEDVDY	
CAR22-18	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GSGSLGDAFDI	
CAR22-19	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DGFGELSGAFDI	

[1519]

CAR22-20	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GPIGCSGGSCLDY	
CAR22-21	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GSYGDYGDAFDI	
CAR22-22	SYAIS		GIIPIFGTANYAQKFQG		DHKVVRFGY	
CAR22-23	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GDYYMDV	
CAR22-24	SYAMS		YISSSSSTIYYADSVKG		DGPIRYFDHSKAFDI	
CAR22-25	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EMDDSSGPDY	
CAR22-26	GSWIG		IIYPGDSDTRYSPSFQG		GFLRGGDCCGALDI	
CAR22-27	SYYWS		FTSHSGNVKYNPSLTG		GLDPLFAYDAFEI	
CAR22-28	DYYMS		YISSSGSTIYYADSVKG		DDFWSGSVDY	
CAR22-29	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EDDSSGYTSPFDY	
CAR22-30	GYYMH		WINPNSGGTNYAQKFQG		EPASSSWYGYYYYMDV	
CAR22-31	SYDIN		WMNPNSGNTGYAQKFQG		GDSNYWSYYGMDV	
CAR22-32	SYGIS		WISAYNGNTNYAQKLQG		FSSSDSYDY	
CAR22-33	TFGMSVS		LIDWDDDKYYSTSLRT		IYGGDRTNTQAPYFFDL	
CAR22-34	TSRHWWN		QIYHSGTTTYNPSLGS		DYLELATYYGMDV	
CAR22-35	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DLAAAGNYYYYGMDV	
CAR22-36	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DDDFWSGSGAFDI	
CAR22-37	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		PEGVSYYDSSVLDY	
CAR22-38	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GGYGDYLDAFDI	

[1520] 表8A.CD22 CAR的轻链可变结构域CDR。该表中的LC CDR序列在Kabat或组合定义下具 有相同的序列。

[1521]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
m971	RASQTIWSYLN	521	AASSLQS	560	QQSYSIPQT	599
CAR22-1	SGSSSNIGSNYVY	522	RNNQRPS	561	AAWDDSLSGYV	600
CAR22-2	TGTSSDVGGYNYVS	523	DVSKRPS	562	SSYTSSSLNHV	601
CAR22-3	TGTSSDVGGYNYVS	524	DVSNRPS	563	SSYTSSSTPYV	602
CAR22-4	QGDSLRSYYAS	525	GKNNRPS	564	NSRDSSGNHLWV	603
CAR22-5	QGDSLRSYYAS	526	GKNNRPS	565	NSRDSSGWV	604

[1522]

CAR22-6	TGTSSDVGGYNYVS	527	DVSNRPS	566	SSYTSSSTLYV	605
CAR22-7	TGTSSDVGGYNYVS	528	DVSSRPS	567	SSYAGSNTLV	606
CAR22-8	TRSSGSIASNYVQ	529	EDNQRPS	568	QSYDSSNPWV	607
CAR22-9	SGSSSNIGSNYVY	530	RNNQRPS	569	AAWDDSLSGPV	608
CAR22-10	TGTSSDVGGYNYVS	531	DVSNRPS	570	SSYTSSSTLVYV	609
CAR22-11	QGDSLRSYYAS	532	GKNHRPS	571	HSRDSSGNHL	610
CAR22-12	TGTSSDVGGYNYVS	533	DVSNRPS	572	SSYTSSSTLYV	611
CAR22-13	TGSSGSFASSYVQ	534	EDNQRPS	573	QSYDGATWV	612
CAR22-14	SGTSSDVGGYNSVS	535	DVNNRPS	574	SSYTSSSTLF	613
CAR22-15	QGDSLRTYYAT	536	DENNRPS	575	SSRDSSGNPSCV	614
CAR22-16	TGTSSDVGGYNYVS	537	DVSNRPS	576	SSYTSSSTWV	615
CAR22-17	RSSQSLLAGNGHNYLD	538	LGSNRAS	577	MQALQNPLT	616
CAR22-18	TGSSSDVGGYNYVS	539	EVSNRPS	578	SSYTSSSTLV	617
CAR22-19	TGTSSDVGGYNYVS	540	DVSNRPS	579	SSYASSSTLV	618
CAR22-20	TGTNSDVGRYNYVS	541	EVSYRPS	580	SSYTTSSTLD	619
CAR22-21	TGTSSDVGGYKYVS	542	DVSNRPS	581	SSYTSSSTLV	620
CAR22-22	TLSSGHSSYAIA	543	VNSDGSLSKGD	582	QTWGSGMAI	621
CAR22-23	TGTSSDVGGYNYVS	544	EVSKRPS	583	SSYTSSGTLV	622
CAR22-24	QGDSLRSYYAS	545	GKNNRPS	584	NSRDSSGNPYV	623
CAR22-25	TGTSSDVGGYNYVS	546	EVSNRPS	585	SSYTSSSTLV	624
CAR22-26	RSSQSLLHSNGYNYLD	547	LGSNRAS	586	MQALQTPPWT	625
CAR22-27	RSSQSLLHSNGYNYLD	548	LGSNRAS	587	MQVLQTPPLT	626
CAR22-28	GGTNIGSKNVH	549	YDSDRPS	588	QVWDSSSDHWV	627
CAR22-29	GGHNIRSKNVH	550	YDGDRPS	589	QVWDSDSDHYV	628
CAR22-30	RASQSINTYLN	551	AASNLQS	590	QQSYSSLLT	629
CAR22-31	TGTSSDVGGYNYVS	552	DADKRPS	591	CSYAGGSTWV	630
CAR22-32	RASQSVTSNLA	553	AASTRAT	592	QQYHTWPPLT	631
CAR22-33	RSSQSLLHSNGYNYLD	554	LGSNRAS	593	MQALQTPWT	632
CAR22-34	RSSQSLLYSDGYNYLD	555	LGSNRAS	594	MQALQTQS	633
CAR22-35	QGDSLRSYFTS	556	GNNNRPS	595	DSRDSSGDHLV	634
CAR22-36	QGDSLRSYYAS	557	GKNNRPS	596	NSRDSSGNHPVV	635
CAR22-37	TGTSSDVGGYKHVS	558	DVSNRPS	597	VSYRNFNSLV	636
CAR22-38	TGTSSDVGGYNYVS	559	EVSNRPS	598	SSYTSSSTLV	637

[1523] 表8B.CD22 CAR的轻链可变结构域CDR。该表中的LC CDR序列在Kabat或组合定义下具 有相同的序列。

[1524]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-53 Kabat	TGTSSDVGGYNYVS	638	EVNNRPS	649	SSYTSGRTLYV	660
CAR22-53 Chothia	TSSDVGGYNY	639	EVN	650	YTSGRTLY	661
CAR22-53 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	1117	EVNNRPS	1119	SSYTSGRTLYV	1121
CAR22-53 IMGT	SSDVGGYNY	1118	EVN	1120	SSYTSGRTLYV	1122
CAR22-57 组合的	TGSRNDIGAYESVS	640	GVNNRPS	651	SSHTTTSTLYV	662
CAR22-58 组合的	TGSSSDVGGYNSVS	641	EVINRPS	652	SSYTSSSTYV	663
CAR22-59 组合的	TGSSSDIGGFNYVS	642	EVTNRPS	653	SSYASGSPLYV	664
CAR22-60 组合的	TGTSSDIGGYNYVS	643	EVSNRPS	654	SSYTSSSTLYV	665
CAR22-61 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	644	EVSNRPS	655	SSYTSSSTLYV	666
CAR22-62 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	645	DVSNRPS	656	SSYTSSSTLYV	667
CAR22-63 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	646	EVSNRPS	657	SSYTSSSTLYI	668
CAR22-64 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	647	DVSNRPS	658	SSYTSSSTLYV	669
CAR22-65 组合的	TGTSSDVGGYNYVS	648	DVSNRPS	659	SSYTSSSTLYV	670

[1525] 表9A.CD22抗体分子的重链可变区

[1526]

候选者	ID	重链可变区域
m971	700	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTV
CAR22-1	701	QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPG KGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCASQSTPYDSSGYYSGDAFDIWGQGTMVTV
CAR22-2	702	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGTFDYWGQGTLVTV
CAR22-3	703	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS

[1527]

		RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGAYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTV
CAR22-4	704	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKGLSSWHFHDALDIWGQGTMVTV
CAR22-5	705	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDKGGGYYDFWSGSDYWGQGTLVTV
CAR22-6	706	EVQLQQSGPGLVKPSLTLSLTCAISGDSVSSNSATWTWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSTWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCAREGSGSYYAYWGQGTLVTV
CAR22-7	707	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINP-NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARDYWGYYGSGTLDYWGQGTLVTV
CAR22-8	708	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARAGLALYSNYVPYYYYGMDVWGQGTTV TV
CAR22-9	709	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNAWMNWVRQAP GKGLEWVGRIKSKTDGGTADYAAPVKGRFTISRDDSKNTMYL QMNSLKTEDTGVYYCITGATDVWGQGTTVTV
CAR22-10	710	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTV
CAR22-11	711	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCAREESSSGWYEGNWFDPWGQGTLVTV
CAR22-12	712	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQL NAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTV
CAR22-13	713	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGRMDTAMAQIWGQGTMVTV
CAR22-14	714	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARDLDVSLDIWGQGTMVTV
CAR22-15	715	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEYVSAISSNGGSTYYANSVKDRFTISRDNSKNTLYLQMGS LRAEDMAVYYCARVHSSGYYHPGPNDYWGQGTLVTV
CAR22-16	716	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCAREAGVVAVDYWGQGTLVTV
CAR22-17	717	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKEPLFGVVEEDVDYWGQGTLVTV
CAR22-18	718	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARGSGSLGDAFDIWGQGTMVTV
CAR22-19	719	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS

[1528]

		SLRSEDTAVYYCARDGFGELSGAFDIWGQGTMVTV
CAR22-20	720	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARGPIGCSGGSCLDYWGQGTLVTV
CAR22-21	721	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARGSYGDYGDAFDIWGQGTTVTV
CAR22-22	722	EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARDHKVVRFGYWGQGTLVTV
CAR22-23	723	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARGDYYMDVWGKGTTVTV
CAR22-24	724	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGPIRYFDHSKAFDIWGQGTMVTV
CAR22-25	725	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAREMDDSSGPDYWGQGTLVTV
CAR22-26	726	EVQLVESGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTGSWIGWGRQMPG KGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARGFLRGGDCCGALDIWGQGTMVTV
CAR22-27	727	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSINSYYWSWIRQAPGK GLEWIAFTSHSGNVKYNPSLTGRVTIAVDTSKNQFYLEVTSVT AADTAVYFCARGLDPLFAYDAFEIWGLGTMVTV
CAR22-28	728	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDDFWSGSVDYWGQGTLVTV
CAR22-29	729	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCAREDDSSGYTSPFDYWGQGTLVTV
CAR22-30	730	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCAREPASSSWYGYYYYMDVWGKGTLVTV
CAR22-31	731	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATG QGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARG-DSNYWSYYGMDVWGQGTLVTV
CAR22-32	732	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCASFSSSDSYDYWGQGTLVTV
CAR22-33	733	QVNLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLNTFGMSVSWIRQPPG KALEWLALIDWDDDKYYSTSLRTRLTISKDTAKNQVVLRMTN MDPMDTATYYCARIYGGDRTNTQAPYFFDLWGQGTLVTV
CAR22-34	734	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGASITSRHWWNWVRHSP GKGLEWIGQIYHSGTTTYNPSLGSRVTISVDKSKNQISLELRSVT AADTATYYCVRDYLELATYYGMDVWGQGTTVTV
CAR22-35	735	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARDLAAAGNYYYYGMDVWGQGTTVTV
CAR22-36	736	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP

[1529]

		GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARDDDFWSGSGAFDIWGQGTTVTV
CAR22-37	737	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCARPEGVSYYDSSVLDYWGQGTLVTV
CAR22-38	738	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRAEDTAVYYCARGGYGDYLDAFDIWGQGTTVTV

[1530] 表9B.CD22抗体分子的重链可变区

[1531]

候选者	SEQ ID NO:	重链可变区
CAR22-53	671	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSV TPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQGTMVTVSS
CAR22-57	672	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYNDYVGSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNS VTPEDTAVYYCARETDYGDYGAFDIWGQGTTVTVSS
CAR22-58	673	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSR GLEWLGRTFYRSKWYNDYAVSVKGRITISPDTSKNQFSLQLNSV TPEDTAVYYCAGGDYYYGLDVWGQGTTVTVSS
CAR22-59	674	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-60	675	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-61	676	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-62	677	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-63	678	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-64	679	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSR GLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
CAR22-65	680	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPS RGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLN AVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS

[1532] 表10A.CD22抗体分子的轻链可变区

[1533]

候选者	ID	轻链可变区
m971	739	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPN LLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQS YSIPQTFGQGTKLEIK

[1534]

CAR22-1	740	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLSGYVFGTGTKLTVL
CAR22-2	741	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSLNHVFGTGTKVTVL
CAR22-3	742	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTPYVFGTGTQLTVL
CAR22-4	743	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR DSSGNHLWVFGGGTKLTVL
CAR22-5	744	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR DSSGWVFGGGTKLTVL
CAR22-6	745	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLYVFGTGTKVTVL
CAR22-7	746	QSALTQPGSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLIIYDVSSRPSGVSNRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDEADYSCSS YAGSNTLVFGTGTKVTVL
CAR22-8	747	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPT TVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQS YDSSNPWVFGGGTKLTVL
CAR22-9	748	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLSGPVFGGGTKLTVL
CAR22-10	749	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLVYVFGTGTKVTVL
CAR22-11	750	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNHRPSGIPDRFSGSSSGDTDSLTITGAQAEDEADYYCHSR DSSGNHLFGGGTKLTVL
CAR22-12	751	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-13	752	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIPCTGSSGSFASSYVQWYQQRPGSAP ATVIYEDNQRPSGVPDRFSGSVDSSSNSASLTISGLKTEDEAVYYC QSYDGATWVFGGGTKLTVL
CAR22-14	753	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKAP KLMIYDVNNRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLFFGAGTKVTVL
CAR22-15	754	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYATWYQQKPGQAPV LVFYDENNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGTQAEDEADYYCSSR DSSGNPSCVFGGGTKLTVL
CAR22-16	755	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTWVFGGGTKLTVL
CAR22-17	756	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLAGNGHNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY

[1535]

		YCMQALQNPLTFGGGTKLEIKR
CAR22-18	757	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLVFGTGTKVTVL
CAR22-19	758	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYASSSTLVFGGGTKVTVL
CAR22-20	759	QSALTQPAYVSGSPGQSITISCTGTNSDVGRYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYEVSYRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTTSSTLDFGTGTKVTVL
CAR22-21	760	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKYVSWYQQHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLVFGGGTKLTVL
CAR22-22	761	HVILTQPPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPRY LMKVNSDGSLSKGDGIPDRFSGSTSGAERYLTISSLQSEDEADYYC QTWGSGMAIFGGGTKLTVL
CAR22-23	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSGTLVFGGGTKLTVL
CAR22-24	763	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYRNSR DSSGNPYVFGTGTKVTVL
CAR22-25	764	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLVFGTGTKLTVL
CAR22-26	765	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQALQTPPWTFGQGTKLEIKR
CAR22-27	766	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQVLQTPPLTFGGGTKVDIKR
CAR22-28	767	SYVLTQPPSVSVAPGKTATITCGGTNIGSKNVHWYQQKPGQAPVL AIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYFCQVWD SSSDH-WVFGGGTKLTVL
CAR22-29	768	SYELTQPPSVSVAPGETASIACGGHNIRSKNVHWYQQKPGQAPVL VISYDGDRPSGIPERFSGSNLGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWD SDSDH-YVFGTGTKVTVL
CAR22-30	769	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTYLNWYQQKPGKPPKL LIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTHFTLTISSLQPDDFATYYCQQSYS SLLTFGGGTKLEIK
CAR22-31	770	QSVLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGEA PKLIIYDADKRPSGISNRFSSGKSGNTASLTISGLQVEDEADYYCCS YAGGSTWVFGGGTKVTVL
CAR22-32	771	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVTSNLAWYQQKPGQAPR LLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSMQSEDFAVYFCQQYH TWPPLTFGGGTKVEIKT
CAR22-33	772	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQALQTPWTFGQGTKLEIK
CAR22-34	773	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSDGYNYLDWYLQKPG

		QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLQISGVETEDVGVYY CMQALQTQSFGQGTKLEIK
CAR22-35	774	SSELTQDPAVSVALGQTARITCQGDSLRSYFTSWYHQKPGQAPVL VIYGNNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEGDYYCDSRD SSGDHLVFGGGTKLTVL
CAR22-36	775	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR DSSGNHPVVFGGGTKLTVL
CAR22-37	776	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKHVSWYQHHPGKA PKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEAHYYC VSYRNFNSLVFGTGTKVTVL
CAR22-38	777	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKA PKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS SYTSSSTLVFGTGTQLTVL

[1536]

[1537] 表10B.CD22抗体分子的轻链可变区

候选者	ID	轻链可变区
CAR22-53	681	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKVIISEVNNRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYF CSSYTSGRTLYVFGTGSKVTVLG
CAR22-57	682	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQHPGNA PKLIIHGVNNRPSGVFDRFSVSQSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSHTTTSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-58	683	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYEVINRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTYVFGTGTKVTVLG
CAR22-59	684	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQHAGEA PKLMIYEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYASGSPLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-60	685	QSALTQPASVSGSPGQSITFSCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGTKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVLG
CAR22-61	686	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-62	687	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-63	688	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYIFGTGTKVTVLG
CAR22-64	689	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-65	690	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL

[1538]

[1539] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表9A或9B中列出的任何重链结合结构域氨基 酸序列的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表10A或10B中列出的 任何轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1540] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表10A或10B中列出的任何轻链结合结构域氨 基酸序列的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表9A或9B中列出的

任何重链结合结构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。

[1541] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1542] VL和VH结构域出现在scFv中的顺序可以变化(即VL-VH或VH-VL方向),并且其 中"G4S"(SEQ ID NO:18)亚基的三个或四个拷贝可以连接可变结构域以产生整个scFv结构域,其中每个亚基包含序列GGGGS(SEQ ID NO:18)(例如,$(G4S)_3$(SEQ ID NO:107)或 $(G4S)_4$(SEQ ID NO:106))。或者,CAR构建体可以包括例如包含序列 GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:1322)的接头。

[1543] 这些克隆都含有来源于CD3ζ链的共刺激结构域的信号结构域中的Q/K残基变化。

[1544] CAR20构建体

[1545] 分离抗CD20单链可变片段。参见表11A和11B。将抗CD20 scFv克隆到具有CD3ζ链和4-1BB共刺激分子的慢病毒CAR表达载体中。在STBL3细胞中通过细菌转化扩增含CAR 的质粒,随后使用不含内毒素的Qiagen质粒Maki试剂盒进行Maxiprep。使用标准技术在293T细胞中产生慢病毒上清液。

[1546] CAR的顺序在下表11A和11B中提供。本文描述了CAR的另外的组分(例如,前导, 铰链,跨膜和信号传导结构域)。

[1547] 表11A:大鼠CD20 CAR构建体

名称	SEQ ID NO:	序列
CAR20-1 scFv 结构域	800	qiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseytftdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkpt yaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayygyrdwftywgqgtlvtvssg gggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknyla wyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfp pwtfgggtklelk
CAR20-1 scFv 结构域 nt	801	caaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctc ctgcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctgg gaaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgat gatttcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgcccggacagctaacctccaaatct ccaaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcggggagcctattacggttatc gcgactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggagg ctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgat gacccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaag agctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaag cccggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggcgtgcccgac cgctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgag

[1548]

[1549]

		gacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttcggcggtggaa cgaagctcgaactcaag
CAR20-1 可溶的 scFv- nt	802	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcct gcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctggg aaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatga tttcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgcccggacagctaacctccaaatctcc aaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgc gactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgatga cccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaagag ctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcc cggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggcgtgcccgacc gctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgagg acctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttcggcggtggaac gaagctcgaactcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-1 可溶的 scFv- aa	803	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseytftdyafhwvkqapg kglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayyg yrdwftywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt mscksqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltis svqaedlavyycqqyynfppwtfgggtklelkgshhhhhhhh
CAR20-1 完整– nt 慢病毒	804	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcct gcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctggg aaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatga tttcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgcccggacagctaacctccaaatctcc aaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgc gactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgatga cccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaagag ctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcc cggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggcgtgcccgacc gctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgagg acctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttcggcggtggaac gaagctcgaactcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatc gcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggg tcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctt taagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtt cccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgc tccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagag gagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgc gcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaag cctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgta ccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg
CAR20-1 – 完整- aa	805	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseytftdyafhwvkqapg kglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayyg yrdwftywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt mscksqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltis svqaedlavyycqqyynfppwtfgggtklelktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaa

[1550]

		ggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeed gcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpem ggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydal hmqalppr
CAR20-2 scFv 结构域	806	evqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapgkglewvasisstsiyiyyad tvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysywgqgvmvtvssggggsg gggsggggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegrsptt miyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggtkltv l
CAR20-2 scFv 结构域-nt	807	gaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgt cctgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcacccgg aaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgatac cgtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaacacccctttacttgcaaatgacc tccctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcct actggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggggggggcg gctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagt ccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacatt gggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctacc gggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgattcctcatct aactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccac tcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaagctgacagtgctg
CAR20-2-可溶的scFv-nt	808	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgtcc tgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcacccggaa aggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgataccg tcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaacacccctttacttgcaaatgacctc cctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcctac tggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggggggggcggc tcgggaggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagtcc gtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacattgg gtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctaccgg gacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgattcctcatctaac tcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccactcct acgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaagctgacagtgctgggatcgcacc accatcaccatcatcatcac
CAR20-2-可溶的scFv-aa	809	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapg kglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysy wgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgn igsyfihwyqqhegrsptmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyf chsydsginivfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR20-2-完整-nt	810	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgtcc tgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcacccggaa aggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgataccg tcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaacacccctttacttgcaaatgacctc cctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcctac tggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggggggggcggc tcgggaggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagtcc gtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacattgg gtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctaccgg gacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgattcctcatctaac

[1551]

		tcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccactcct acgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaagctgacagtgctgaccactaccc cagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcga tatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt actgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacc agctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggag aggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-2-完整-aa	811	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapg kglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysy wgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgn igsyfihwyqqhegrspttmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyf chsydsginivfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-3 scFv 结构域	812	evqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqapkkglewvasisyegnpyy gdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnnvdwfaywgqgtlvtvssg gggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknyla wyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpt fgsgtkleik
CAR20-3 scFv 结构域 nt	813	gaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtc atgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaa gaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaacccgtactacggagactcgg tgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaact ccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg gggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgcccgatcgcttc attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacct ggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctgga gatcaag
CAR20-3-可溶的scFv-nt	814	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtca tgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaag aaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaacccgtactacggagactcggt gaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaactc cctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg gggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgcccgatcgcttc attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacct

[1552]

		ggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctgga gatcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20- 3 - 可 溶 的 scFv-aa	815	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqap kkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnn vdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt mscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltiss vqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleikgshhhhhhhh
CAR20- 3 – 完整- nt	816	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtca tgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaag aaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaacccgtactacggagactcggt gaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaactc cctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg gggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgcccgatcgcttc attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacct ggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctgga gatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccag cctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgc tttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaac ccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagagg aggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagccta caagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgac gtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaaga atccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcga gattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 3 – 完整- aa	817	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqap kkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnn vdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt mscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltiss vqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaagga vhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcs crfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemgg kprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhm qalppr
CAR20-4 scFv 结构域	818	qvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgkglewladiwwdddkhyn pslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivtyvmdvwgqgasvtvssg gggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqkl gegprlliysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtklei k
CAR20-4 scFv 结构域 nt	819	caagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttact tgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagccca gcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaaccct agcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagat caccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaaccaccgatgg gatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcctccggcg

[1553]

		gtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccga cgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaa ctgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaag ggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagcg gatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggcca cctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggagat caag
CAR20-4 – 可溶的 scFv-nt	820	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttactt gcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagcccag cggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaaccta gcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagatc accaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaaccaccgatggg atcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcctccggcggt ggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgac gtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaact gcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaagg gccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagcgg atcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggccac ctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggagatc aagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-4 – 可溶的 scFv -aa	821	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgk glewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivt yvmdvwgqgasvtvssggggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavti nckasqninrylnwyqqklgegprlliysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvat yfclqhnswpltfgsgtkleikgshhhhhhhh
CAR20- 4 – 完整- nt	822	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttactt gcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcggcagcccag cggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaaccta gcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagatc accaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaaccaccgatggg atcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcctccggcggt ggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgac gtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaact gcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaagg gccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagcgg atcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggccac ctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggagatc aagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctct gtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttg acttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcac tcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttca tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagga ggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaag caggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgct ggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc caagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 4	823	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgk

[1554]

– 完整- aa		glewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivt yvmdvwgqgasvtvssggggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavti nckasqninrylnwyqqklgegprlliysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvat yfclqhnswpltfgsgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqe glynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-5 scFv 结构域	824	evqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapkkglewisgiyydsykksy adsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksayygykdyfdywgqgvmvtvs sggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqq kpgkaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgt klelk
CAR20-5 scFv 结构域 nt	825	gaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcag ctgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaag aagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattcc gtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaac tccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaag gactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatg acacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgt cccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaag
CAR20-5-可溶的 scFv-nt	826	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagc tgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaaga agggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccg tgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaact ccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaagg actacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctca gggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatga cacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgtc ccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaagggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-5-可溶的 scFv -aa	827	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksayygy kdyfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvti tcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdva syyclqyddlpytfgpgtklelkgshhhhhhhh
CAR20- 5 – 完整- nt	828	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagc tgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaaga agggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccg tgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaact ccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaagg actacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctca gggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatga

[1555]

		cacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgtc ccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaactcaagacca ctaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctg cgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgc ctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaa aggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgcca ccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 5 – 完整- aa	829	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnsknt lylemnslrsedtatyycaksayygy kdyfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvti tcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdva syyclqyddlpytfgpgtklelktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgld facdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeee eggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknp qeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-6 scFv 结构域	830	qvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsgkglewlaniwwdddky ynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspvvttvfdywgqgvmvtv ssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyq qklgeapklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtil eik
CAR20-6 scFv 结构域 nt	831	caagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtccctcact tgtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagccc tcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccggcggtg gaggctcaggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccc cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggccaccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaag
CAR20-6-可溶的 scFv-nt	832	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtccctcactt gtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagccct cgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccggcggtg gaggctcaggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccc

[1556]

		cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggccaccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaagg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-6-可溶的scFv-aa	833	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsg kglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvti nckasqninrylnwyqqklgeapklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvat yfclqhnsrpltfgsgtileikgshhhhhhhh
CAR20-6–完整-nt	834	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtcctcactt gtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagccct cgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccggcggtg gaggctcaggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccc cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggccaccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaaga ccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgactt cgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgt gatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag ggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgg acaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggta tgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-6–完整–aa	835	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsg kglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvti nckasqninrylnwyqqklgeapklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvat yfclqhnsrpltfgsgtileikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-7 scFv 结构域	836	qvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqpsgkslewlaaiawdgdkyy npslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgyyyfdfwgqgvmvtvssg gggsggggsggggsggggskivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgas pklliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklel k
CAR20-7 scFv 结构域 nt	837	caagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttaca tgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccga gcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaaccc gagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcggat cacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtggg

[1557]

		ctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcagggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaagattgtgct gacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgtctgg cgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgc tgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcgggaagcgg aaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgcca ccagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaag
CAR20-7 - 可溶的 scFv-nt	838	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacat gctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccgag cggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaacccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcggatc acctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtgggc tactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggct cagggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaagattgtgctg acccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgtctggc gtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgct gatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcgggaagcgga accagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccac cagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaagggatcgca ccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-7 - 可溶的 scFv-aa	839	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqps gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgy yyfdfwgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggskivltqsptitaaspgekvtitcl assrvsniywyqqksgaspkllivstsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyyc hqwssnpwtfgggtklelkgshhhhhhhh
CAR20-7 完整-nt	840	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacat gctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccgag cggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaacccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcggatc acctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtgggc tactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggct cagggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaagattgtgctg acccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgtctggc gtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgct gatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcgggaagcgga accagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccac cagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaagaccactac cccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-7	841	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqps

完整-aa		gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgy yyfdfwgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggskivltqsptitaaspgekvtitcl assrvsniywyqqksgaspkllivstsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyyc hqwssnpwtfgggtklelkttpaprpptptaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-8 scFv 结构域	842	qiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqapgkglkwmgwintysgk ptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstyygykdwfaywgqgtlvtv ssggggsggggsggggsggggsniqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqq klgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedvatyfccqynngntfgagtkl elk
CAR20-8 scFv 结构域 nt	843	caaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctc gtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccg ggaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgcc gatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatcttcaaat ctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggcta caaggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggag gctcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaacatcca actgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgc aagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggccc ccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatc agggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccaccta cttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaa
CAR20-8 - 可溶的 scFv-nt	844	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgt gcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccgg gaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgccga tgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatcttcaaatct ccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggctaca aggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaacatccaact gactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgcaag ggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggcccccaa gctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatcaggg tccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccacctacttctg ctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaaggatcgc accaccatcaccatcatcatcac
CAR20-8 - 可溶的 scFv-aa	845	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygykdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsniqltqspsrlsasvgdrvt lsckgsqninnylawyqqklgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedv atyfccqynngntfgagtklelkgshhhhhhhh
CAR20-8 – 完整-nt	846	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgt gcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccgg gaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgccga tgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatcttcaaatct ccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggctaca aggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaacatccaact

[1558]

[1559]

		gactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgcaag ggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggcccccaa gctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatcaggg tccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccacctacttctg ctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaaaccacta ccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgt ccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctg cgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcac tctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	CAR20- 8 – 完整- aa	847	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygykdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsniqltqspsrlsasvgdrvt lsckgsqninnylawyqqklgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedv atyfccqynngntfgagtklelktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgld facdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeee eggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknp qeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
	CAR20-9 scFv 结构域	848	divmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastr esgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleikggggsggggs ggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqapkkglewva sisyegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnnvdwfayw gqgtlvtvss
	CAR20-9 scFv 结构域 nt	849	gacatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacca tgtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggta ccagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccg gcgtgcccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgt ccaggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gccgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatg gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaacccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctcc
	CAR20-9 - 可溶的 scFv-nt	850	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccat gtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtac cagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccgg cgtgcccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtc caggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gccgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatg

[1560]

		gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaacccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-9 - 可溶的 scFv-aa	851	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfptfg sgtkleikggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyy mawvrqapkkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtaty ycarhdhnnvdwfaywgqgtlvtvssgshhhhhhhh
CAR20-9 – 完整-nt	852	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccat gtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtac cagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccgg cgtgcccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtc caggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gccgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatg gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaacccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtct tgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttc actcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaa gcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatc cccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagat tggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcag caccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-9 – 完整-aa	853	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfptfg sgtkleikggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyy mawvrqapkkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtaty ycarhdhnnvdwfaywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggav htrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscr fpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkp rrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqa lppr
CAR20-10 scFv 结构域	854	diqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsg sgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklelkggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwirqapkkglewisgiyydsyk ksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksayygykdyfdywgqgvm vtvss
CAR20-10 scFv 结构	855	gacatccaaatgacacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccatta cgtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaa ggccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcag

[1561]

域 nt		cggctccggcagcgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtgg ccagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgg aactcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggagg aggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagc ctgaagctcagctgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggc aggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcct acgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacc tcgagatgaactccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctcc
CAR20-10 - 可溶的 scFv-nt	856	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagc ggctccggcagcgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggc cagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgga actcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggagga ggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcc tgaagctcagctgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggca ggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtccta cgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacct cgagatgaactccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-10 - 可溶的 scFv-aa	857	malpvtalllplalllhaarpdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqkpg kaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklel kggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwir qapkkglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksa yygykdyfdywgqgvmvtvssgshhhhhhhh
194181 CAR20- 10 – 完整- nt	858	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacacagtcacccccttctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagc ggctccggcagcgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggc cagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgga actcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggagga ggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcc tgaagctcagctgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggca ggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtccta cgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacct cgagatgaactccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgc gtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac

[1562]

		caaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
194181 CAR20- 10 – 完整- aa	859	malpvtalllplalllhaarpdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqkpg kaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklel kggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwir qapkkglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksa yygykdyfdywgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpee eeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrkn pqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-11 scFv 结构域	860	divmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllliywastr esgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfppwtfgggtklelkggggsggg gsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseytftdyafhwvkqapgkglkw mgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayygyrdwft ywgqgtlvtvss
CAR20-11 scFv 结构域 nt	861	gatattgtgatgacccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccat gtcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtac cagcagaagcccggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctgg cgtgcccgaccgctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgt gcaggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggacttt cggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgg gaggggtggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagct gaagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgact acgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaa cacttactcggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgtttagcctggag gactccgcccggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgaccta cttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctcc
CAR20-11 - 可溶的 scFv-nt	862	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atattgtgatgacccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatg tcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtacc agcagaagcccggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggc gtgcccgaccgctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtg caggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttc ggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcagggggggcggctcggg aggggtggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagctg aagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgacta cgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaac acttactcggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgtttagcctggag gactccgcccggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgaccta cttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-11 - 可溶的 scFv-aa	863	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllliywastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpp wtfgggtklelkggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseyt ftdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlkn edtatyfcargayygyrdwftywgqgtlvtvssgshhhhhhhh
CAR20- 11 – 完整- nt	864	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atattgtgatgacccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatg tcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtacc agcagaagcccggacagtcccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggc gtgcccgaccgctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtg

[1563]

		caggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggactttc ggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcaggggggggcggctcggg aggggggtggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagctg aagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgacta cgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaac acttactcggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgtttagcctggag gactccgcccggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgaccta cttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctacca tcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtg catacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgg ggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcaga tgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagcc gcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcaga agcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggact gtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgc cgcctcgg
CAR20-11 – 完整- aa	865	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpp wtfgggtklelkggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkiscsktseyt ftdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlkn edtatyfcargayygyrdwftywgqgtlvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpa aggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpe mggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtyd alhmqalppr
CAR20-12 scFv 结构域	866	qvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegrspttmiyrddkrphgvpdr fsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggtkltvlggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapgkglewvasissts iyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysywgqgvmvtvss
CAR20-12 scFv 结构域 nt	867	caagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctca gctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaag gacggtcccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggaca gattctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagacc gaggacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcg ggactaagctgacagtgctgggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggt ggaagcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcag ccaggaagatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatga attggattcgccaggcacccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactag catctacatctactatgccgataccgtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaag aacacccttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgccc ggcacgactactcatcctactcctactggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctcc
CAR20-12 - 可溶的 scFv-nt	868	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcag ctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaagga cggtcccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagat tctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgag gacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcggga

[1564]

		ctaagctgacagtgctgggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtgga agcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagcca ggaagatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattg gattcgccaggcacccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatc tacatctactatgccgataccgtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaaca ccctttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggca cgactactcatcctactcctactggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggatcgca ccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-12 - 可溶的 scFv-aa	869	malpvtalllplalllhaarpqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegr sptmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggt kltvlggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmn wirqapgkglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarh dyssysywgqgvmvtvssgshhhhhhhh
CAR20- 12 – 完整- nt	870	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcag ctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaagga cggtccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagat tctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgag gacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcggga ctaagctgacagtgctgggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggtgga agcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagcca ggaagatccctgaagctgtcctgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattg gattcgccaggcacccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatc tacatctactatgccgataccgtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaaca ccctttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggca cgactactcatcctactcctactggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccaccactacc ccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 12 – 完整- aa	871	malpvtalllplalllhaarpqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegr sptmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggt kltvlggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmn wirqapgkglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarh dyssysywgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-13 scFv 结构域	872	dvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqklgegprlliysanslqtgipsrfs gsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtkleikggggsggggsggggsggg gsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgkglewladiwwdddkh ynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivtyvmdvwgqgasvtvs s
CAR20-13	873	gacgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatt

[1565]

scFv 结构域 nt		aactgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggaga agggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcag cggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggc cacctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggag atcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggag gaggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccct ctcgcttacttgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcg gcagcccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatt acaaccctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttc ctgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaacc accgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtc ctcc
CAR20-13-可溶的scFv-nt	874	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatta actgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaa gggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagc ggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggcc acctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggaga tcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggagg aggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctct cgcttacttgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcgg cagcccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatta caaccctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcc tgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaacca ccgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcct ccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-13-可溶的scFv-aa	875	malpvtalllplalllhaarpdvqmtqspslsasvgdavtinckasqninrylnwyqqklg egprlliysanslqtgipsrfsgsgsgadfltltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtkleik ggggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqp sgkglewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttd givtyvmdvwgqgasvtvssgshhhhhhhh
CAR20-13–完整 nt	876	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatta actgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaa gggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagc ggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagcccgaagatgtggcc acctacttctgcctccaacacaactcctggcccctgacctttggttcgggcaccaagctggaga tcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggagg aggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctct cgcttacttgcaccttcacccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcgg cagcccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatta caaccctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcc tgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaacca ccgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcct ccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctg tccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcact cgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcat gaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgct

[1566]

		ggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc caagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-13 – 完整 aa	877	malpvtalllplalllhaarpdvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqklg egprlliysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtkleik ggggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqp sgkglewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttd givtyvmdvwgqgasvtvsssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeee ggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpq eglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-14 scFv 结构域	878	diqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqklgeapklliynanslqtgipsrfs gsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtileikggggsggggsggggsggggs qvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsgkglewlaniwwdddky ynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspvvttvfdywgqgvmvtv ss
CAR20-14 scFv 结构域 nt	879	gacatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccatta actgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaa gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggagga ggctcccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caacccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggtt cccccgtcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctcc
CAR20-14 - 可溶的 scFv-nt	880	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaa gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggagga ggctcccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caacccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggtt cccccgtcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-14 - 可溶的 scFv-aa	881	malpvtalllplalllhaarpdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqklge apklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtileikgg ggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqps gkglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegsp vvttvfdywgqgvmvtvssgshhhhhhhh
CAR20-14 –	882	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaa

[1567]

完整 nt		gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaacccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggagga ggctcccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggcttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caacccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggtt cccccgtcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctcca ccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgactt cgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgt gatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgg acaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggta tgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-14 – 完整 aa	883	malpvtalllplalllhaarpdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqklge apklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtileikgg ggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqps gkglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegsp vvttvfdywgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqe glynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-15 scFv 结构域	884	kivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspklliystsslasgvpyrfsgsg sgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklelkggggsggggsggggsgggg gsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqpsgkslewlaaiawdgdk yynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgyyyfdfwgqgvmvtvs s
CAR20-15 scFv 结构域 nt	885	aagattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccat cacttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagc cccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctc gggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactt actactgccaccagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctca agggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggag gctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcc cttacatgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagaca gccgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactac aacccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttcctt cggatcacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgac gtgggctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctcc
CAR20-15 - 可溶的 scFv-nt	886	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca agattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatc acttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagcc ccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcg ggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactta

[1568]

		ctactgccaccagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaa gggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggagg ctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcct tacatgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagc cgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaa cccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcg gatcacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgt gggctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
CAR20-15 - 可溶的 scFv-aa	887	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspk lliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklelkg gggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirq psgkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydv gyyyfdfwgqgvmvtvssgshhhhhhhh
CAR20-15 – 完整 nt	888	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca agattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatc acttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagcc ccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcg ggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactta ctactgccaccagtggtcgagcaacccttggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaa gggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggagg ctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcct tacatgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagc cgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaa cccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcg gatcacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgt gggctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccaccactacc ccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-15 – 完整 aa	889	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspk lliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklelkg gggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirq psgkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydv gyyyfdfwgqgvmvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR20-16 scFv 结构域	890	niqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgeapklliyntnnlqtgipsrfsg sgsgtdytftisglqpedvatyfccqynngntfgagtklelkggggsggggsggggsgggg sqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqapgkglkwmgwintysg kptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstyygykdwfaywgqgtlvt vss

[1569]

CAR20-16 scFv 结构域 nt	891	aacatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacac tgagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctggga gaggcccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattct caggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtgg ccacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaac tcaaaggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggagggggtggaagcggaggagg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcc
CAR20-16 - 可溶的 scFv-nt	892	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca acatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacact gagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggag aggcccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctc aggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggc cacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaact caaaggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggagg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-16 - 可溶的 scFv-aa	893	malpvtalllplalllhaarpniqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedvatyfccqynngntfgagtklelkg gggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrq apgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygykdwfaywgqgtlvtvssgshhhhhhhh
CAR20-16 – 完整 nt	894	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca acatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacact gagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggag aggcccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctc aggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggc cacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaact caaaggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggagg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatggggtggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgc gtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag

[1570]

		cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac caaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-16 – 完整 aa	895	malpvtalllplalllhaarpniqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedvatyfccqynngntfgagtklelkg gggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrq apgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygykdwfaywgqgtlvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeee ggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpq eglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

[1571] 表11B.人源化CD20 CAR构建体

[1572]

名称	SEQ ID NO:	序列
CD20-3m scFv	691	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAP GKGLEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMSS LRAEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPVSMSCKSSQS LLYSENKKNYLAWYLQKPGQSPQLLIFWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3J scFv	692	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAP GQRLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNSASTLYMELSS LRSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQS LLYSENKKNYLAWYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3H5 k3 scFv	693	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPG KGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWSSL KASDTAMYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLL YSENKKNYLAWYQQKPGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDLAVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3H5 k1 scFv	694	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPG KGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWSSL KASDTAMYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSL LYSENKKNYLAWYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3H1 k3 scFv	695	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAP GQGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELS SLRSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQS LLYSENKKNYLAWYQQKPGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDLAVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3H1 k1 scFv	696	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAP GQGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELS SLRSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQS

[1573]

		LLYSENKKNYLAWYQQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

[1574] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表11A和11B中列出的任何重链结合结构域氨 基酸序列的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC

CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表11A和11B中列出的 任何轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1575] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表11A和11B中列出的任何轻链结合结构域氨基 酸序列的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表11A和11B中列出的任何 重链结合结构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。

[1576] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1577] 对于重链可变结构域,scFv结构域的人CDR序列的序列示于表12A或12B,对于轻链可变结构域,示于表13。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1578] 表12A.CD20 CAR的重链可变结构域CDR。根据“组合的”定义鉴定CDR。

[1579]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-1	EYTFTDYAFH	697	WINTYSGKPTYADDFKG	791	DWFTY	903
CAR20-2	GFTFSKYGMN	698	SISSTSIYIYYADTVKG	792	HDYSSYSY	904
CAR20-3	GFTFRDYYMA	699	SISYEGNPYYGDSVKG	793	HDHNNVDWFAY	905
CAR20-4	RFSLSTYGMSVG	778	DIWWDDDKHYNPSLKN	794	SSTTDGIVTYVMDV	906
CAR20-5	GFTFSSSGMQ	779	GIYYDSYKKSYADSVKG	795	SAYYGYKDYFDY	907
CAR20-6	GFSLNTHGMGVG	780	NIWWDDDKYYNPSLKN	796	IEGSPVVTTVFDY	908
CAR20-7	GFSLSTSGMVVS	781	AIAWDGDKYYNPSLKS	797	RDYDVGYYYFDF	909
CAR20-8	GNTVTGYAMH	782	WINTYSGKPTYADDFKG	798	DWFAY	910
CAR20-9	GFTFRDYYMA	783	SISYEGNPYYGDSVKG	799	HDHNNVDWFAY	911
CAR20-10	GFTFSSSGMQ	784	GIYYDSYKKSYADSVKG	896	SAYYGYKDYFDY	912
CAR20-11	EYTFTDYAFH	785	WINTYSGKPTYADDFKG	897	GAYYGYRDWFTY	913
CAR20-12	GFTFSKYGMN	786	SISSTSIYIYYADTVKG	898	HDYSSYSY	914
CAR20-13	RFSLSTYGMSVG	787	DIWWDDDKHYNPSLKN	899	SSTTDGIVTYVMDV	915
CAR20-14	GFSLNTHGMGVG	788	NIWWDDDKYYNPSLKN	900	IEGSPVVTTVFDY	916
CAR20-15	GFSLSTSGMVVS	789	AIAWDGDKYYNPSLKS	901	RDYDVGYYYFDF	917
CAR20-16	GNTVTGYAMH	790	WINTYSGKPTYADDFKG	902	STYYGYKDWFAY	918

[1580] 表12B.CD20 CAR的重链可变结构域CDR。根据Kabat鉴定CDR。

[1581]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-1	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-2	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-3	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-4	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	
CAR20-5	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-6	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPVVTTVFDY	
CAR20-7	TSGMVVS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-8	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAY	
CAR20-9	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-10	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-11	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-12	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-13	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	
CAR20-14	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPVVTTVFDY	
CAR20-15	TSGMVVS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-16	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAY	

[1582] 表13.CD20 CAR的轻链可变结构域CDR。该表中的LC CDR序列在Kabat或组合定义下具有相同的序列。

[1583]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-1	KSSQSLLYSENKKNYLA	919	WASTRES	935	QQYYNFPPWT	951
CAR20-2	KINSGNIGSYFIH	920	RDDKRPH	936	HSYDSGINIV	952
CAR20-3	KSSQSLLYSENKKNYLA	921	WASTRES	937	QQYYNFPT	953
CAR20-4	KASQNINRYLN	922	SANSLQT	938	LQHNSWPLT	954
CAR20-5	QASQNINKYIA	923	YTSTLES	939	LQYDDLPYT	955

[1584]

CAR20-6	KASQNINRYLN	924	NANSLQT	940	LQHNSRPLT	956
CAR20-7	LASSRVSNIY	925	STSSLAS	941	HQWSSNPWT	957
CAR20-8	KGSQNINNYLA	926	NTNNLQT	942	CQYNNGNT	958
CAR20-9	KSSQSLLYSENKKNYLA	927	WASTRES	943	QQYYNFPT	959
CAR20-10	QASQNINKYIA	928	YTSTLES	944	LQYDDLPYT	960
CAR20-11	KSSQSLLYSENKKNYLA	929	WASTRES	945	QQYYNFPPWT	961
CAR20-12	KINSGNIGSYFIH	930	RDDKRPH	946	HSYDSGINIV	962
CAR20-13	KASQNINRYLN	931	SANSLQT	947	LQHNSWPLT	963
CAR20-14	KASQNINRYLN	932	NANSLQT	948	LQHNSRPLT	964
CAR20-15	LASSRVSNIY	933	STSSLAS	949	HQWSSNPWT	965
CAR20-16	KGSQNINNYLA	934	NTNNLQT	950	CQYNNGNT	966

[1585] 表14A.CD20抗体分子的重链可变区

[1586]

候选者	SEQ ID NO:	重链可变区
CAR-1	967	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFTDYAFHWVKQAPGK GLKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISN LKNEDTATYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-2	968	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPG KGLEWVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRENAKNTLYLQMTSL RSEDTALYYCARHDYSSYSYWGQGVMVTV
CAR20-3	969	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPK KGLEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSL RSEDTATYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-4	970	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFTRFSLSTYGMSVGWIRQPSG KGLEWLADIWWDDDKHYNPSLKNRLTISKDTSKNQAFLKITN VDTADTATYYCARSSTTDGIVTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-5	971	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCVASGFTFSSSGMQWIRQAPKK GLEWISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSL RSEDTATYYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMVTV
CAR20-6	972	QVTLKESGPGLLQPSQTLSLTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPS GKGLEWLANIWWDDDKYYNPSLKNRLTMSKDTSNNQAFLKI TNVDTADTATYYCARIEGSPVVTTVFDYWGQGVMVTV
CAR20-7	973	QVTLKESGPGMLQPSKTLSLTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSG KSLEWLAAIAWDGDKYYNPSLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSV DIADTATYYCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMVTV
CAR20-8	974	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPG KGLKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQIS NLKNEDTATYFCARSTYYGYKDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-9	975	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPK KGLEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSL RSEDTATYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV

CAR20-10	976	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCVASGFTFSSSGMQWIRQAPKK GLEWISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSL RSEDTATYYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMVTV
CAR20-11	977	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFTDYAFHWVKQAPGK GLKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISN LKNEDTATYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-12	978	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPG KGLEWVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRENAKNTLYLQMTSL RSEDTALYYCARHDYSSYSYWGQGVMVTV
CAR20-13	979	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFTRFSLSTYGMSVGWIRQPSG KGLEWLADIWWDDDKHYNPSLKNRLTISKDTSKNQAFLKITN VDTADTATYYCARSSTTDGIVTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-14	980	QVTLKESGPGLLQPSQTLSLTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPS GKGLEWLANIWWDDDKYYNPSLKNRLTMSKDTSNNQAFLKI TNVDTADTATYYCARIEGSPVVTTVFDYWGQGVMVTV
CAR20-15	981	QVTLKESGPGMLQPSKTLSLTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSG KSLEWLAAIAWDGDKYYNPSLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSV DIADTATYYCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMVTV
CAR20-16	982	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPG KGLKWMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQIS NLKNEDTATYFCARSTYYGYKDWFAYWGQGTLVTV

[1587]

[1588] 表14B.人源化CD20抗体分子的重链可变区

候选者	SEQ ID NO:	重链可变区
CD20-3_VH1_1-46	983	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQA PGQGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYME LSSLRSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH5_5-51	984	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMP GKGLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWS SLKASDTAMYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH M	985	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQA PGKGLEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQM SSLRAEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3_VH J	986	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQA PGQRLEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNSASTLYMEL SSLRSEDTAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS

[1589]

[1590] 表15A.CD20抗体分子的轻链可变区

候选者	SEQ ID NO:	轻链可变区
CAR20-1	987	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCQQYYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-2	988	QVVLTQPKSVSTSLESTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSP TTMIYRDDKRPHGVPDRFSGSIDSSSNSAFLTINNVQTEDEAIYFC HSYDSGINIVFGGGTKLTVL
CAR20-3	989	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCQQYYNFPTFGSGTKLEIK

[1591]

CAR20-4	990	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEG PRLLIYSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQ HNSWPLTFGSGTKLEIK
CAR20-5	991	DIQMTQSPPSLSASLGDKVTITCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPR LLIRYTSTLESGTPSRFSGSGSGRDYSFSISNVESGDVASYYCLQY DDLPYTFGPGTKLELK
CAR20-6	992	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAP KLLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADVATYFCLQ HNSRPLTFGSGTILEIK
CAR20-7	993	KIVLTQSPTITAASPGEKVTITCLASSRVSNIYWYQQKSGASPKLL IYSTSSLASGVPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYYCHQWS SNPWTFGGGTKLELK
CAR20-8	994	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAP KLLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTFTISGLQPEDVATYFCCQ YNNGNTFGAGTKLELK
CAR20-9	995	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCQQYYNFPTFGSGTKLEIK
CAR20-10	996	DIQMTQSPPSLSASLGDKVTITCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPR LLIRYTSTLESGTPSRFSGSGSGRDYSFSISNVESGDVASYYCLQY DDLPYTFGPGTKLELK
CAR20-11	997	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCQQYYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-12	998	QVVLTQPKSVSTSLESTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSP TTMIYRDDKRPHGVPDRFSGSIDSSSNSAFLTINNVQTEDEAIYFC HSYDSGINIVFGGGTKLTVL
CAR20-13	999	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEG PRLLIYSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQ HNSWPLTFGSGTKLEIK
CAR20-14	1000	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAP KLLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADVATYFCLQ HNSRPLTFGSGTILEIK
CAR20-15	1001	KIVLTQSPTITAASPGEKVTITCLASSRVSNIYWYQQKSGASPKLL IYSTSSLASGVPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYYCHQWS SNPWTFGGGTKLELK
CAR20-16	1002	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAP KLLIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTFTISGLQPEDVATYFCCQ YNNGNTFGAGTKLELK

[1592]

[1593] 表15B.人源化CD20抗体分子的轻链可变区

候选者	SEQ ID NO:	轻链可变区
CD20-3_VK1_A20	1003	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDVATYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3_VK3_L25	1004	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDLAVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3_VL	1005	DIVMTQTPLSLSVTPGQPVSMSCKSSQSLLYSENKKNYLAW

[1594]

M 和 CD20-3_VL J		YLQKPGQSPQLLIFWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

[1595]

[1596] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表14A或14B中列出的任何重链结合结构域氨 基酸序列的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC

CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表15A或15B中列出的 任何轻链结合结构域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1597] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表15A或15B中列出的任何轻链结合结构域氨 基酸序列的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表14A或14B中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。

[1598] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1599] CAR123构建体

[1600] 分离抗CD123单链可变片段。将抗CD123 scFv克隆到具有CD3ζ链和4-1BB共刺激分子的 慢病毒CAR表达载体中。在STBL3细胞中通过细菌转化扩增含CAR的质粒,随后使用不含内 毒素的Qiagen质粒Maki试剂盒进行Maxiprep。使用标准技术在293T细胞中产生慢病毒上清液。

[1601] CAR的序列在下表16中提供。本文描述了CAR的其它组分(例如,前导,铰链,跨膜和信号传导结构域)。

[1602] VL和VH结构域出现在scFv中的顺序是变化的(即VL-VH或VH-VL方向),并且其中“G4S”(SEQ ID NO:18)亚基的三个或四个拷贝连接可变结构域以产生整个scFv结构域,其中每个亚基包含序列GGGGS(SEQ ID NO:18)(例如,$(G4S)_3$(SEQ ID NO:107)或$(G4S)_4$(SEQ ID NO:106))。

[1603] 人CAR的序列在下表16中提供。

[1604] 这些克隆都含有从CD3ζ链衍生的共刺激结构域的信号结构域中的Q/K残基变化。

[1605] 表16:人类CD123 CAR构建体

[1606]

名称	SEQ ID	序列
CAR123-1 NT	1123	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgtccagtcaggagcggaagtcaagaagcccggagcgtcagtcaaagtgtcatgcaaa gcctcgggctacactttcactgggtactacatgcactgggtgcgccaggctccaggacagggactg gaatggatgggatggatcaacccgaactccggtggcaccaattacgcccagaagttccagggga gggtgaccatgactcgcgacacgtcgatcagcaccgcatacatggagctgtcaagactccggtcc gacgatactgccgtgtactactgcgcacgggacatgaacattctggccaccgtgccttttgacatctg gggtcagggaactatggttaccgtgtcctctggtggaggcggctccggcgggggggggaagcgga ggcggtggaagcgacattcagatgacccagtcgccttcatccctttcggcgagcgtgggagatcg cgtcactatcacttgtcgggcctcgcagtccatctccacctacctcaattggtaccagcagaagcca ggaaaagcaccgaatctgctgatctacgccgcgttttccttgcaatcgggagtgccaagcagattca gcggatcgggatcaggcactgatttcaccctcaccatcaactcgctgcaaccggaggatttcgctac gtactattgccaacaaggagacagcgtgccgctcaccttcggcggagggactaagctggaaatca agaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgc

[1607]

		ctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaa ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctct acaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaa aggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
CAR123-1 AA	1124	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPNLLIYAAFS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQGDSVPLT FGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
CAR123-1 scFv	1125	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPNLLIYAAFS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQGDSVPLT FGGGTKLEIK
CAR123-1 VH	1126	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
CAR123-1 VL	1127	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAP NLLIYAAFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQ QGDSVPLTFGGGTKLEIK
CAR123-2 NT	1128	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tgcaactcgtccaaagcggagcggaagtcaagaaacccggagcgagcgtgaaagtgtcctgcaa agcctccggctacacctttacgggctactacatgcactgggtgcgccaggcaccaggacagggtc ttgaatggatgggatggatcaaccctaattcgggcggaactaactacgcacagaagttccagggga gagtgactctgactcgggatacctccatctcaactgtctacatggaactctcccgcttgcggtcagat gatacggcagtgtactactgcgcccgcgacatgaatatcctggctaccgtgccgttcgacatctggg gacaggggactatggttactgtctcatcgggcggtggaggttcaggaggaggcggctcgggagg cggaggttcggacattcagatgacccagtccccatcctctctgtcggccagcgtcggagatagggt gaccattacctgtcgggcctcgcaaagcatctcctcgtacctcaactggtatcagcaaaagccggg aaaggcgcctaagctgctgatctacgccgcttcgagcttgcaaagcggggtgccatccagattctc gggatcaggctcaggaaccgacttcaccctgaccgtgaacagcctccagccggaggactttgcca cttactactgccagcagggagactccgtgccgcttactttcgggggggtacccgcctggagatca agaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgc ctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaa

			ctgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctct acaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaa aggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
	CAR123-2 AA	1129	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTF GGGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
	CAR123-2 scFv	1130	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA QKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTF GGGTRLEIK
[1608]	CAR123-2 VH	1131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMEL SRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
	CAR123-2 VL	1132	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYC QQGDSVPLTFGGGTRLEIK
	CAR123-3 NT	1133	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactcgttcaatccggcgcagaagtcaagaagccaggagcatcagtgaaagtgtcctgcaaa gcctcaggctacatcttcacgggatactacatccactgggtgcgccaggctccgggccagggcctt gagtggatgggctggatcaaccctaactctgggggaaccaactacgctcagaagttccaggggag gtcactatgactcgcgatacctccatctccactgcgtacatggaactctcgggactgagatccgac gatcctgccgtgtactactgcgcccgggacatgaacatcttggcgaccgtgccgtttgacatttggg gacagggcaccctcgtcactgtgtcgagcggtggaggaggctcgggggtggcggatcaggag ggggaggaagcgacatccagctgactcagagcccatcgtcgttgtccgcgtcggtgggggatag agtgaccattacttgccgcgccagccagagcatctcatcatatctgaattggtaccagcagaagccc ggaaaggccccaaaactgctgatctacgctgcaagcagcctccaatcgggagtgccgtcacggtt ctccgggtccggttcgggaactgactttaccctgaccgtgaattcgctgcaaccggaggatttcgcc acgtactactgtcagcaaggagactccgtgccgctgaccttcggtggaggcaccaaggtcgaaat caagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgt ccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttc gcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagc tctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacg ggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagct

		ccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttc acatgcaggccctgccgcctcgg
CAR123-3 AA	1134	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDDPAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTFG GGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
CAR123-3 scFv	1135	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDDPAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQGDSVPLTFG GGTKVEIK
CAR123-3 VH	1136	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYYIHWVRQAPG QGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL SGLRSDDPAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTLVTVSS
CAR123-3 VL	1137	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYC QQGDSVPLTFGGGTKVEIK
CAR123-4 NT	1138	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaag tccaactccaacagtcaggcgcagaagtgaaaaagagcggtgcatcggtgaaagtgtcatgcaaa gcctcgggctacaccttcactgactactatatgcactggctgcggcaggcaccgggacagggactt gagtggatgggatggatcaacccgaattcaggggacactaactacgcgcagaagttccagggga gagtgaccctgacgagggacacctcaatttcgaccgtctacatggaattgtcgcgcctgagatcgg acgatactgctgtgtactactgtgcccgcgacatgaacatcctcgcgactgtgccttttgatatctggg gacaggggactatggtcaccgtttcctccgcttccggtggcggaggctcgggaggccgggcctcc ggtggaggaggcagcgacatccagatgactcagagcccttcctcgctgagcgcctcagtgggag atcgcgtgaccatcacttgccgggccagccagtccatttcgtcctacctcaattggtaccagcagaa gccgggaaaggcgcccaagctcttgatctacgctgcgagctccctgcaaagcggggtgccgagc cgattctcgggttccggctcgggaaccgacttcactctgaccatctcatccctgcaaccagaggact ttgccacctactactgccaacaaggagattctgtcccactgacgttcggcggaggaaccaaggtcg aaatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtg atcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacga gctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaga ggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg

[1609]

[1610]

CAR123-4 AA	1139	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVS CKASGYTFTDYYMHWLRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYA QKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTMVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDSVPL TFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
CAR123-4 scFv	1140	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVS CKASGYTFTDYYMHWLRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYA QKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILA TVPFDIWGQGTMVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDSVPL TFGGGTKVEIK
CAR123-4 VH	1141	QVQLQQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWLRQAP GQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMEL SRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
CAR123-4 VL	1142	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGDSVPLTFGGGTKVEIK

[1611] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表16中列出的任何重链结合结构域氨基酸序列 的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表16所列的任何轻链结合结构 域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1612] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表16中列出的任何轻链结合结构域氨基酸序列 的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表16中列出的任何重链结合结构 域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3。

[1613] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1614] 对于重链可变结构域,scFv结构域的人CDR序列的序列示于表17,对于轻链可变结构域, 在表18中示出。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1615] 表17.重链可变结构域CDR

[1616]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTDYYMH	1006	WINPNSGDTNYAQKFQG	1010	DMNILATVPFDI	1014
CAR123-2	GYTFTGYYMH	1007	WINPNSGGTNYAQKFQG	1011	DMNILATVPFDI	1015
CAR123-3	GYTFTGYYMH	1008	WINPNSGGTNYAQKFQG	1012	DMNILATVPFDI	1016
CAR123-4	GYIFTGYYIH	1009	WINPNSGGTNYAQKFQG	1013	DMNILATVPFDI	1017

[1617] 表18.轻链可变结构域CDR

[1618]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISSYLN	1018	AASSLQS	1022	QQGDSVPLT	1026
CAR123-2	RASQSISTYLN	1019	AAFSLQS	1023	QQGDSVPLT	1027
CAR123-3	RASQSISSYLN	1020	AASSLQS	1024	QQGDSVPLT	1028
CAR123-4	RASQSISSYLN	1021	AASSLQS	1025	QQGDSVPLT	1029

[1619] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD123 CAR,其包含包括CD123结合结构域的抗 体或抗体片段,其中所述CD123结合结构域包含表18列出的轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)氨基酸序列的一个或多个,以及表17中列出的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)的一个或多个。

[1620] 关于重链可变结构域,scFv结构域的额外CD123 CDR序列显示在表19,21和23中,对于轻 链可变结构域,显示在表20,22和24中。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1621] 表19和表20中提供的CDR是根据Kabat和Chothia编号方案的组合。

[1622] 表19.重链可变结构域CDR

[1623]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTDYYMH	1030	WINPNSGDTNYAQKFQG	1034	DMNILATVPFDI	1038
CAR123-2	GYTFTGYYMH	1031	WINPNSGGTNYAQKFQG	1035	DMNILATVPFDI	1039
CAR123-3	GYIFTGYYIH	1032	WINPNSGGTNYAQKFQG	1036	DMNILATVPFDI	1040
CAR123-4	GYTFTGYYMH	1033	WINPNSGGTNYAQKFQG	1037	DMNILATVPFDI	1041

[1624] 表20.轻链可变结构域CDR

[1625]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISTYLN	1042	AASSLQS	1046	QQGDSVPLT	1050
CAR123-2	RASQSISSYLN	1043	AAFSLQS	1047	QQGDSVPLT	1051
CAR123-3	RASQSISSYLN	1044	AASSLQS	1048	QQGDSVPLT	1052
CAR123-4	RASQSISSYLN	1045	AASSLQS	1049	QQGDSVPLT	1053

[1626] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD123 CAR,其包含包括CD123结合结构域的抗 体或抗体片段,其中所述CD123结合结构域包含表20中列出的轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)氨基酸序列的一个或多个,以及表19中列出的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)的一个或多个。

[1627] 表21.根据Kabat编号方案(Kabat et al.(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)的重链可变 结构域CDR

[1628]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYYMH	1054	WINPNSGGTNYAQKFQG	1058	DMNILATVPFDI	1062
CAR123-2	GYYMH	1055	WINPNSGGTNYAQKFQG	1059	DMNILATVPFDI	1063
CAR123-3	GYYIH	1056	WINPNSGGTNYAQKFQG	1060	DMNILATVPFDI	1064
CAR123-4	DYYMH	1057	WINPNSGDTNYAQKFQG	1061	DMNILATVPFDI	1065

[1629] 表22.根据Kabat编号方案(Kabat et al.(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)的轻链可变 结构域CDR

[1630]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISTYLN	1066	AAFSLQS	1070	QQGDSVPLT	1074
CAR123-2	RASQSISSYLN	1067	AASSLQS	1071	QQGDSVPLT	1075
CAR123-3	RASQSISSYLN	1068	AASSLQS	1072	QQGDSVPLT	1076
CAR123-4	RASQSISSYLN	1069	AASSLQS	1073	QQGDSVPLT	1077

[1631] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD123 CAR,其包含包括CD123结合结构域的抗 体或抗体片段,其中所述CD123结合结构域包含表22所列的一个或多个轻链互补决定区1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)氨基酸序列,以 及表21中列出的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[1632] 表23.根据Chothia编号方案的重链可变结构域CDR(Al-Lazikani et al.,(1997) JMB 273,927-948)

[1633]

候选者	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTGY	1078	NPNSGG	1082	DMNILATVPFDI	1086
CAR123-2	GYTFTGY	1079	NPNSGG	1083	DMNILATVPFDI	1087
CAR123-3	GYIFTGY	1080	NPNSGG	1084	DMNILATVPFDI	1088
CAR123-4	GYTFTDY	1081	NPNSGD	1085	DMNILATVPFDI	1089

[1634] 表24.根据Chothia编号方案的轻链可变结构域CDR(Al-Lazikani et al.,(1997) JMB 273,927-948)

[1635]

候选者	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	SQSISTY	1090	AAF	1094	GDSVPL	1098
CAR123-2	SQSISSY	1091	AAS	1095	GDSVPL	1099
CAR123-3	SQSISSY	1092	AAS	1096	GDSVPL	1100
CAR123-4	SQSISSY	1093	AAS	1097	GDSVPL	1101

[1636] 在一个实施方案中,B细胞抑制剂包含CD123 CAR,其包含包括CD123结合结构域的抗 体或抗体片段,其中所述CD123结合结构域包含表24所列的一个或多个轻链互补决定区

1(LC CDR1),轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)氨基酸序列,以 及表23中列出的任何CD123重链结合结构域氨基酸序列的一个或多个重链互补决定区1(HC CDR1),重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)。

[1637] 这些CD123 CAR的附加描述例如在PCT/CN2014/090508中提供,该申请的全部内容通过 引用并入本文。

[1638] 使用包含由NFAT启动子驱动的萤光素酶酶报告基因的Jurkat细胞系(称为JNL细胞)评 价人抗CD123 CAR构建体的活性。测量本文所述的四种人CAR构建体(CD123 CAR1-4)和 鼠CD123 CAR构建体1172和1176的CD123 CAR活性。测量CAR活性作为该NFAT驱动的报告子的活化。将含有CART构建体的慢病毒上清液加入到JNL细胞中用于转导。转导后4-6天,通过如下所述的FACS评价JNL细胞的CAR表达,或与靶-阳性(MOLM3,工程化以表达CD123 的K562细胞(CD123-K562))或靶-阴性(K562)细胞系以效应细胞系(JNL)与靶细胞系 (E:T)3:1的比例混合以触发激活(图41)。共温育20小时后,使用EnVision仪器上的 Bright-Glo™萤光素酶测定法测量萤光素酶信号,如图42所示。

[1639] 基于CD123 CAR转导的T细胞(“CART-CD123”或“CART-CD123 T细胞”)应答表达CD123 (CD123+)的靶标的效应T细胞应答的数量和质量来选择最佳抗CD123 CAR构建体。效应T 细胞应答包括但不限于细胞扩增,增殖,倍增,细胞因子产生和靶细胞杀伤或细胞溶解活性 (脱粒)。

[1640] CART-CD123的产生

[1641] 使用人scFv编码慢病毒转移载体产生包装到VSVg假型慢病毒颗粒中的基因组材料。将慢 病毒转移载体DNA与VSVg,gag/pol和rev的三个包装组分与lipofectamine试剂混合,以将它们 一起转染至Lenti-X 293T细胞(Clontech)中。

[1642] 30小时后,收集培养基,过滤并储存在-80℃。治疗性CART-CD123通过从来自正常的单 采血液成分术的供体的血液开始产生,所述供体的初始T细胞通过阴性选择T细胞,CD4+和 CD8+淋巴细胞获得。在含有10%热灭活胎牛血清(FCS),2mM L-谷氨酰胺,1×青霉素/链 霉素,100μM非必需氨基酸,1mM丙酮酸钠,10mM Hepes和55μM 2-巯基乙醇的RPMI 1640 中,37℃,5%CO_2下以1:3的比例通过CD3x28珠(Dynabeads®Human T-Expander CD3/CD28, Invitrogen)活化这些细胞。T细胞以24孔板的每个孔0.5mL培养基中1x10^6T细胞培养。24小时 后,T细胞出胚(blasting),加入0.5mL病毒上清液。然后,T细胞以对数生长模式开始分裂, 通过测量每毫升的细胞计数来监测T细胞,并且每两天将T细胞稀释在新鲜培养基中。随着T 细胞在大约10天后开始静息,对数生长减弱。生长速度减弱和T细胞大小接近~300fl的组合决 定了T细胞被冷冻保存以供以后分析的状态。

[1643] 在冷冻保存之前,使用蛋白L作为检测试剂,通过BD LSRFortessa或BD-FACSCanto上 的流式细胞术分析来测定转导的细胞百分比(在细胞表面上表达抗CD123 CAR)及其相对荧 光强度。来自FACS的高于未染色细胞的信号的相对荧光强度的门控直方图显示了转导的T细 胞的百分比。转导导致CART阳性细胞的范围为12-42%,如图42所示。

[1644] 评估CART-CD123重定向T细胞的细胞溶解活性

[1645] 为了评估CART-CD123 T细胞杀死靶标表达细胞的功能能力,将细胞解冻并使其过夜恢 复。

[1646] T细胞杀伤针对稳定表达萤光素酶的表达CD123的MOLM13急性骨髓性白血病细胞

系。使 用未转导的T细胞来确定非特异性背景杀伤水平。测量CART-CD123的细胞溶解活性，作为T 细胞的4:1的效应细胞:靶细胞比例和2倍向下稀释度的滴定，其中效应细胞被定义为表达抗 -CD123嵌合受体的T细胞。通过将适当数量的T细胞与恒定数目的靶细胞混合来启动测定。20 小时后，使用EnVision仪器上的Bright-Glo™荧光素酶测定法测量萤光素酶信号。随着 CD123-CART表达细胞对未转导的T细胞的比例的增加，CD123细胞的杀伤类似地增加。本文 提供的数据表明，表达CD123的那些细胞仅被表达CD123-CART的细胞而不是被未转导的T细 胞破坏。图43。

[1647] T细胞转导

[1648] 选择人抗CD123克隆NVS2(表达CAR123-2)，NVS3(表达CAR123-3)，NVS4(表达CAR123-4)进行进一步研究。这些克隆都与食蟹猴CD123交叉反应。将其活性与小鼠克隆1172 和1176进行比较，所述克隆包含轻至重取向的VH和VL结构域，具有CD8铰链结构域，CD8 跨膜结构域和41BB-共刺激结构域。1176也与食蟹猴CD123交叉反应，1172则否。

[1649] 将质粒转化为感受态细胞，在500cc肉汤中生长，通过maxiprep分离，并使用标准方法转 导入293T细胞。在24和48小时收集慢病毒上清液，用超速离心浓缩，冷冻。

[1650] 慢病毒在SupT1细胞上滴定，并且测定适当量的病毒用于以3的MOI转导原代T细胞。使 用抗CD3/CD28珠(Dynal，Invitrogen)和白细胞介素-2 100U/ml刺激原代正常供体CD4+CD8 细胞6天，然后脱珠并冷冻一次。T细胞细胞体积减少至<300fL(约10-12天后)。

[1651] 所有克隆的T细胞转导效率几乎为100％(图44A和44B)。NVS克隆中CD4:CD8比例约为 1:1，1172和1176克隆中的CD4:CD8比例为3:2(图45)。

[1652] 脱粒

[1653] 为了评估脱粒，将CART细胞(NVS 2-4，1172和1176克隆)解冻，在T细胞培养基中以$2e^6$细胞/ml的浓度静置过夜。然后计数细胞并在第二天以$1e^6$细胞/ml再悬浮。将肿瘤靶细胞(TCM， PMA/iono，MOLM14或JURKAT)以$5e^6$细胞/ml重悬浮。在48孔板中以$1e^5$T细胞:$5e^5$肿瘤细胞 的比例接种细胞，并在抗-CD107a PECy7，抗CD49d纯化抗体和抗CD28纯化抗体存在下温育2 小时。然后收获细胞，用抗CD3 APC染色，并使用BD LSR Fortessa获得(图46)。

[1654] T细胞脱粒在图46的每个图的右上象限中指示。本文呈现的结果表明CD123+靶标的相似 T细胞识别，在2小时体外测定期间通过相似的脱粒表现。与其他克隆中的约80％的脱粒率相 比，C1176具有65％的较差脱粒率。

[1655] 细胞毒性

[1656] 为了评估细胞毒性，将CART细胞(NVS 2-4，1172和1176克隆)解冻并在T细胞培养基中 以$2e^6$细胞/ml静置过夜。计数细胞并在第二天以$1e^6$细胞/ml重悬浮。肿瘤靶细胞(MOLM14) 以$1e^6$细胞/ml重悬浮。将细胞一式两份以如下所示的E:T比例降低的方式接种在黑色的平底96 孔板中(图47)。温育20小时后，加入萤光素，并对该板进行成像以确定光子通量作为残留 活细胞的量度。所有克隆之间的MOLM14细胞的杀伤是相等的，在20小时处于最多效应物: 靶标比例。

[1657] 体内小鼠模型

[1658] 在D0静脉内注射NSG小鼠$1e^6$个表达萤光素酶的MOLM14细胞。在D6成像小鼠(IVIS Spectrum)的肿瘤负荷，并随机分到治疗组。将肿瘤负荷最小的小鼠分配给对照组(未转导的T细胞，UTD)。在D7静脉内注射CART细胞(NVS 2-4，1172和1176克隆)或对照T细胞($1e_6$)。

D13进行的成像的数据如图48所示。注射后6天，所有抗CD123构建体均提供与体外数据一致的抗肿瘤效果。

[1659] 产生基于与食蟹猴CD123交叉反应的鼠1176的人源化抗CD123单链可变片段(scFv)，并将其克隆到慢病毒表达载体中，该载体具有胞内CD3ζ链和4-1BB的细胞内共刺激结构域。

[1660] VL和VH结构域出现在scFv中的顺序是变化的(即VL-VH或VH-VL方向)，并且其中“G4S”(SEQ ID NO:18)亚基的三个或四个拷贝连接可变结构域以产生整个scFv结构域，其中每个亚基包含序列GGGGS(SEQ ID NO:18)(例如，$(G4S)_3$(SEQ ID NO:107)或$(G4S)_4$(SEQ ID NO:106))，如表25所示。

[1661] 人源化CAR的序列在下表25中提供。

[1662] 这些克隆都含有从CD3ζ链衍生的共刺激结构域的信号结构域中的Q/K残基变化。

[1663] 表25:人源化CD123 CAR构建体

[1664]

名称	SEQ ID	序列
hzCAR123-1 NT	1143	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTC GGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAAGTG

[1665]

		TCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGG ATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGT CCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCG AGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGGAC GACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGC CCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATT ACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTG GTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCT ACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTC TCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTCC TCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACA GCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGG TCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-1 AA	1144	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYN QKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWD DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSP SFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPY TFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
hzCAR123-1 scFv	1145	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYN QKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWD DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSP SFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPY TFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 VH	1146	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-1	1147	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA

[1666]

VL		PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2 NT	1148	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTC GGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGG ATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGT CCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCG AGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGGAC GACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGCTGACCCAGTCGC CCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTCTTT CCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGG TACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTA CTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTT CCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGC TCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCA GCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGG TCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-2 AA	1149	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2	1150	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS

[1667]

scFv		CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2 VH	1151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-2 VL	1152	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 NT	1153	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTC GGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGG ATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGT CCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCG AGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGGAC GACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCAC CGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATT ACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCTG GTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATCT ACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTT AGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTCC TCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCA GCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAG TGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-3 AA	1154	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR

[1668]

		ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-3 scFv	1155	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 VH	1156	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-3 VL	1157	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-4 NT	1158	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTC GGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGG ATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGT CCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCG AGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGGAC GACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCC GGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCA ACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGG TACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTA CTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTC CGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTC GCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGC ACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTG GAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCC GGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGA ggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga

[1669]

		aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
hzCAR123-4 AA	1159	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-4 scFv	1160	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-4 VH	1161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-4 VL	1162	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-5 NT	1163	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGCAGCTCACCCAGTC GCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCAT CTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGT TCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCT CCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAA GGTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGC TAGCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCA

[1670]

		CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAG GGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGA CTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCC AGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCG GGGAAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTG ACCGTGTCAAGCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-5 AA	1164	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-5 scFv	1165	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-5 VH	1166	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-5 VL	1167	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-6	1168	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT

[1671]

NT		CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGGTGCTGACCCAGTC GCCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCC TGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGAT CTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGAT TTTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGC TAGCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAG GGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGA CTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCC AGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCG GGGAAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTG ACCGTGTCAAGCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-6 AA	1169	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-6 scFv	1170	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG

[1672]

		GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-6 VH	1171	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-6 VL	1172	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-7 NT	1173	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTCGTGATGACCCAGTC ACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCC TGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGAT CTACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGT TTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCT CCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAG CAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAA AGTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGC TAGCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAG GGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGA CTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCC AGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCG GGGAAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTG ACCGTGTCAAGCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-7 AA	1174	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL

[1673]

		SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-7 scFv	1175	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-7 VH	1176	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-7 VL	1177	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-8 NT	1178	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGGTCATGACTCAGTC CCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCC TGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGA TCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGT TCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTT CGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAA GGTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGC TAGCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAG GGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGA CTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCC AGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCG GGGAAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTG ACCGTGTCAAGCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg

[1674]

		ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-8 AA	1179	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-8 scFv	1180	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTV DKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-8 VH	1181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-8 VL	1182	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-9 NT	1183	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTC AGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGAT GAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGG ATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAA TCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGT CCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCG GAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGA TGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCG CCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCAT TACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATC TACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT

[1675]

		CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTC CTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAAC AGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-9 AA	1184	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-9 scFv	1185	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-9 VH	1186	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-10 VL	1187	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-10 NT	1188	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTC AGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGAT

[1676]

		GAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGG ATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAA TCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGT CCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCG GAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGA TGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGCTGACCCAGTCG CCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTCT TTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCT GGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATC TACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
hzCAR123-10 AA	1189	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-10 scFv	1190	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG

[1677]

		TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-10 VH	1191	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-10 VL	1192	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-11 NT	1193	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTC AGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGAT GAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGG ATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAA TCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGT CCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCG GAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGA TGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCA CCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGAT TACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCT GGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATC TACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTC CTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGC AGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAA GTGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-11 AA	1194	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC

[1678]

		SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-11 scFv	1195	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYL QISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-11 VH	1196	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-11 VL	1197	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-12 NT	1198	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTC AGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGAT GAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGG ATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAA TCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGT CCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCG GAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGA TGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCC CGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATC AACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTG GTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCT ACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCT CCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGT CGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAG CACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGT GGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGG Aggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatct acatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaa gcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtg aaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaac tcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg

[1679]

hzCAR123-12 AA	1199	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
hzCAR123-12 scFv	1200	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-12 VH	1201	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-12 VL	1202	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-13 NT	1203	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTG

[1680]

		ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-13 AA	1204	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-13 scFv	1205	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-13 VH	1206	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-13 VL	1207	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-14 NT	1208	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGGTGCTGACCCAGTC GCCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCC TGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGAT CTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGAT TTTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA

			GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGC CTCCGTCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAG GGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGA AACCCATTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCT CCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGC AGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCG CGGAAACTGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
[1681]	hzCAR123-14 AA	1209	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
	hzCAR123-14 scFv	1210	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
	hzCAR123-1	1211	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP

[1682]

4 VH		GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-1 4 VL	1212	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-1 5 NT	1213	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTCGTGATGACCCAGTC ACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCC TGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGAT CTACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGT TTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCT CCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAG CAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAA AGTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGC CTCCGTCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAG GGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGA AACCCATTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCT CCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGC AGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCG CGGAAACTGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-1 5 AA	1214	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD

[1683]

		GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-15 scFv	1215	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-15 VH	1216	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-15 VL	1217	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-16 NT	1218	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGGTCATGACTCAGTC CCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCC TGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGA TCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGT TCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTT CGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAA GGTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCCAAGTGC AGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGC CTCCGTCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCTGGACAG GGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGA AACCCATTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCT CCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAATTAGC AGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCG CGGAAACTGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-16 AA	1219	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA

[1684]

		VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-16 scFv	1220	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKP GASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSV DKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-16 VH	1221	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-16 VL	1222	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-17 NT	1223	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAG CGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATC AGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGT CCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCC TCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAACTGGGA TGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCG CCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCAT TACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATC TACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTC CTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAAC AGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat

[1685]

		atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-17 AA	1224	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-17 scFv	1225	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-17 VH	1226	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-17 VL	1227	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-18 NT	1228	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAG CGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATC AGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGT CCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCC TCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAACTGGGA TGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCG

[1686]

		GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGCTGACCCAGTCG CCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTCT TTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCT GGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATC TACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
	hzCAR123-18 AA	1229	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
	hzCAR123-18 scFv	1230	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
	hzCAR123-18 VH	1231	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
	hzCAR123-1	1232	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA

[1687]

8 VL		PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-19 NT	1233	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAG CGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATC AGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGT CCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCC TCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAACTGGGA TGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCA CCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGAT TACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCT GGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATC TACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTC CTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGC AGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAA GTGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-19 AA	1234	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-1	1235	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC

[1688]

9 scFv		KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-19 VH	1236	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-19 VL	1237	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-20 NT	1238	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAG CGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGGATC AGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGAT GAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCATTACAA CCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGT CCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCC TCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAACTGGGA TGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCG GGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGG CTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCC CGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATC AACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTG GTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCT ACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCT CCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGT CGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAG CACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGT GGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGG Aggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatct acatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaa gcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtg aaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaac tcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
hzCAR123-20 AA	1239	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR

[1689]

		ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-20 scFv	1240	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-20 VH	1241	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-20 VL	1242	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-21 NT	1243	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGCAGCTCACCCAGTC GCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCAT CTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGT TCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCT CCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAA GGTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAGGTGC AGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGA ATCCCTGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAA GGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCT CCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCA AGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACG CGGAAACTGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc

[1690]

		gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-21 AA	1244	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-21 scFv	1245	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-21 VH	1246	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-21 VL	1247	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-22 NT	1248	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGGTGCTGACCCAGTC GCCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCC TGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGAT CTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGAT TTTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAGGTGC AGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGA ATCCCTGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCA

[1691]

		CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAA GGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCT CCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCA AGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACG CGGAAACTGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-22 AA	1249	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-22 scFv	1250	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-22 VH	1251	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-22 VL	1252	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-2	1253	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT

[1692]

3 NT		CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTCGTGATGACCCAGTC ACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCC TGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGAT CTACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGT TTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCT CCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAG CAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAA AGTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAGGTGC AGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGA ATCCCTGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAA GGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCT CCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCA AGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACG CGGAAACTGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-2 3 AA	1254	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-2 3 scFv	1255	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG

[1693]

		GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-23 VH	1256	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-23 VL	1257	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-24 NT	1258	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGGTCATGACTCAGTC CCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCC TGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGA TCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGT TCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTT CGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAA GGTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAGGTGC AGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGA ATCCCTGAGGATCAGCTGCAAAGGCAGCGGGTATACCTTCA CCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCCGGAAAA GGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGA AACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCT CCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGTGGTCA AGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACG CGGAAACTGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTG ACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCAC CCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgat atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactact caagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagg ataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcca cgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
hzCAR123-24 AA	1259	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQP

[1694]

		LSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-24 scFv	1260	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISV DKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-24 VH	1261	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMP GKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-24 VL	1262	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-25 NT	1263	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAG CGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTG TCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATG AACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGG TGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAAT CAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGC CAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTG AGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGAT GATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGC CCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATT ACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTG GTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCT ACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTC TCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTCC TCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACA GCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGG TCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat

[1695]

		aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-25 AA	1264	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-25 scFv	1265	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQL TQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-25 VH	1266	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-25 VL	1267	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-26 NT	1268	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAG CGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTG TCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATG AACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGG TGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAAT CAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGC CAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTG AGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGAT GATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGGTGCTGACCCAGTCGC CCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTCTTT CCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGG TACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTA CTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTT

[1696]

		CCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGC TCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCA GCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGG TCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-26 AA	1269	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-26 scFv	1270	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVL TQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-26 VH	1271	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-26 VL	1272	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-27 NT	1273	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAG CGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTG TCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATG

[1697]

		AACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGG TGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAAT CAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGC CAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTG AGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGAT GATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCAC CGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGATT ACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCTG GTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATCT ACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTT AGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTCC TCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCA GCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAG TGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACC CCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
hzCAR123-27 AA	1274	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-27 scFv	1275	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSG

[1698]

		TDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-27 VH	1276	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-27 VL	1277	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-28 NT	1278	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAG CGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTG TCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATG AACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGG TGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAAT CAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGC CAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTG AGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGAT GATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGG GGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGC TCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCC GGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCA ACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGG TACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTA CTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTC CGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTC GCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGC ACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTG GAAATCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCC GGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGA ggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataa gatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacga cggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg
hzCAR123-28 AA	1279	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC

[1699]

		SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-28 scFv	1280	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVM TQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-28 VH	1281	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-28 VL	1282	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-29 NT	1283	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGCAGCTCACCCAGTC GCCCTCATTTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCAT CTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGT TCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCT CCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAA GGTCGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGC AGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGG AAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAG GGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGA AACCCATTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCT CCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAA CTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCC GGGGAAACTGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGT GACTGTGTCATCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg

[1700]

hzCAR123-29 AA	1284	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-29 scFv	1285	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-29 VH	1286	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-29 VL	1287	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-30 NT	1288	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGAAGTGGTGCTGACCCAGTC GCCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCC TGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGAT CTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGAT TTTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCACCTTGACCATTA GCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAG CAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAA GGTCGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGC AGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGG AAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAG GGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGA AACCCATTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCT CCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAA CTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCC GGGGAAACTGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGT

[1701]

		GACTGTGTCATCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
	hzCAR123-30 AA	1289	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
	hzCAR123-30 scFv	1290	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
	hzCAR123-30 VH	1291	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
	hzCAR123-30 VL	1292	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQA PRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QHNKYPYTFGGGTKVEIK
	hzCAR123-31 NT	1293	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTCGTGATGACCCAGTC ACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCC TGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGAT CTACTCGGGGTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGT TTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCT

			CCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAG CAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAA AGTGGAGATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGC AGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGG AAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAG GGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGA AACCCATTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCT CCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAA CTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCC GGGGAAACTGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGT GACTGTGTCATCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
[1702]	hzCAR123-31 AA	1294	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
	hzCAR123-31 scFv	1295	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
	hzCAR123-3	1296	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP

[1703]

1 VH		GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-3 1 VL	1297	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC QQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 2 NT	1298	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTT CTGCTCCACGCCGCTCGGCCCGACGTGGTCATGACTCAGTC CCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCA TCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCC TGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGA TCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGT TCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTT CGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAA CAGCACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAA GGTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGC TCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGAAGTGC AGCTCGTCGAGAGCGGAGGGGGACTGGTGCAGCCCGGAGG AAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCA CCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCTGGAAAG GGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGA AACCCATTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCT CCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAATGAA CTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCC GGGGAAACTGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGT GACTGTGTCATCCACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTC CGGAggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgc gcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
hzCAR123-3 2 AA	1299	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD

[1704]

		GLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-32 scFv	1300	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVD KAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-32 VH	1301	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAP GKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-32 VL	1302	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQP PKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

[1705] hzCD123 CAR 1-32的scFv结构域的人源化CDR序列的序列在表26中显示了重链可变结 构域,表27显示了轻链可变结构域。“ID”代表每个CDR各自的SEQ ID NO。

[1706] 表26.重链可变结构域CDR

[1707]

	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
hzCAR123	GYTFTSYWMN	1102	RIDPYDSETHYNQKFKD	1103	GNWDDY	1104

[1708] 表27.轻链可变结构域CDR

[1709]

	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
hzCAR123	RASKSISKDLA	1105	SGSTLQS	1106	QQHNKYPYT	1107

[1710] 在一些实施方案中,CAR123具有具序列YCARGNWDDY(SEQ ID NO:__)的HCDR3。

[1711] 然后将CAR scFv片段克隆到慢病毒载体中以在单个编码框中产生全长CAR构建体,并使 用EF1α启动子进行表达。

[1712] 双特异性CAR19/CAR22构建体及其功能

[1713] 本节描述双特异性CAR19/CAR22构建体的产生和功能。设计了两种双特异性scFv串联融 合:antiCD22(HL)4G4S-antiCD19(LH)和antiCD19-4G4S-antiCD22。名称(HL)表示重链可 变区位于所指示的scFv内的轻链区域的上游,并且名称(LH)表示轻链可变区位于所指示的 scFv内的重链区域的上游。抗CD22碱基分子是hCD22-2,并使用HL取向。抗CD19碱基分子 是人源化抗CD19序列,在本文作为表2的构建体ID 104876提供,其使用LH取向。在图13中示 意性地示出了所述构建体。

[1714] 两种双特异性构建体以及其scFv部分的核苷酸和氨基酸序列在下表28中给出。

[1715] 表28.双特异性CAR19/CAR22构建体

[1716]

名称	SEQ ID NO	序列
antiCD22-4G4S-antiCD19 scFv 氨基酸序列	1303	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGT FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLTGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGS ETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
antiCD22-CD19 CAR 氨基酸序列	1304	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGT FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLTGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGS ETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAV YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
antiCD22-4G4S-antiCD19 scFv 核酸序列	1305	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaaccctcagc cttacttgtgccatttccggggattccgtgtcgagcaattccgccgcctggaactggatc aggcagtccccgtcgcgcgggctcgaatggctgggacgcacttactaccggtccaa gtggtacaacgactacgccgtcagcgtgaagtcgcggatcaccattaaccccgacac ctccaagaaccagttcagcctccaactgaactccgtgacccctgaggataccgcggtc tactattgtgcccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgattactgggg ccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggaggggtggctcaggggtggtggat cgggtggtggcggctcccagtccgctctgactcagcccgcgtccgtgtccggttcccc gggacagtcgatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggcgggtacaa ctacgtgtcgtggtaccaacagcaccctggaaaagccccgaagctgatgatctacga

[1717]

		cgtgtccaagaggccaagcggagtgtcaaatcgcttttccggctcgaagtcgggaaa caccgccagcctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactact gctcgtcttacacctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaaggtcacc gtgctgactggaggggggaggctccggtggcggcggctctggaggaggagggtccg gcggaggaggatcggaaatcgtgatgacccagtcccccgcaaccctgtccctgagc ccgggcgaaagagctaccctgtcgtgccgggcgtcgcaggacatctccaagtacctg aactggtaccagcagaagcccggccaggcaccgagactgctgatctaccacactag ccgcctgcattccggtatccccgcacggttcagcggcagcgggagcggaaccgatta cacgctcactatttcctcactgcaacccgaggatttcgctgtgtacttctgccaacaagg aaacaccctgccttataccttcggacagggtacaaagctggagattaagggaggagg gggctccggcggcgggggcagcgggggcggcggaagccaggtccagctgcagg aatccggtccgggactcgtgaagccctccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtca ggggtgtccctgccggactacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaaggg actggagtggatcggagtgatctggggctccgaaactacctactaccagtcatcattga agtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactgtc cagcgtgaccgcggcggatactgccgtctactactgcgccaagcactattactacggc ggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttggtcactgtgtcctcc
antiCD22-CD19 CAR 核酸序列	1306	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaaccctcagc cttacttgtgccatttccggggattccgtgtcgagcaattccgccgcctggaactggatc aggcagtccccgtcgcgcgggctcgaatggctgggacgcacttactaccggtccaa gtggtacaacgactacgccgtcagcgtgaagtcgcggatcaccattaaccccgacac ctccaagaaccagttcagcctccaactgaactccgtgaccctgaggataccgcggtc tactattgtgcccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgattactgggg ccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggaggggtggctcaggggtggtggat cgggtggtggcggctcccagtccgctctgactcagcccgcgtccgtgtccggttcccc gggacagtcgatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggcgggtacaa ctacgtgtcgtggtaccaacagcaccctggaaaagccccgaagctgatgatctacga cgtgtccaagaggccaagcggagtgtcaaatcgcttttccggctcgaagtcgggaaa caccgccagcctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactact gctcgtcttacacctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaaggtcacc gtgctgactggaggggggaggctccggtggcggcggctctggaggaggagggtccg gcggaggaggatcggaaatcgtgatgacccagtcccccgcaaccctgtccctgagc ccgggcgaaagagctaccctgtcgtgccgggcgtcgcaggacatctccaagtacctg aactggtaccagcagaagcccggccaggcaccgagactgctgatctaccacactag ccgcctgcattccggtatccccgcacggttcagcggcagcgggagcggaaccgatta cacgctcactatttcctcactgcaacccgaggatttcgctgtgtacttctgccaacaagg aaacaccctgccttataccttcggacagggtacaaagctggagattaagggaggagg gggctccggcggcgggggcagcgggggcggcggaagccaggtccagctgcagg aatccggtccgggactcgtgaagccctccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtca ggggtgtccctgccggactacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaaggg actggagtggatcggagtgatctggggctccgaaactacctactaccagtcatcattga agtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactgtc cagcgtgaccgcggcggatactgccgtctactactgcgccaagcactattactacggc ggaagctatgcgatggactactggggacagggcaccttggtcactgtgtcctccacca ctaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgt ccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggt cttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatct ttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaa

[1718]

		tcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
antiCD19-4G 4S-antiCD22 scFv 氨基酸序列	1307	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGT FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLT
antiCD19-4G 4S-antiCD22 CAR 氨基酸序列	1308	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQ KPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTI SKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIN PDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGT FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQA EDEADYYCSSYTSSSLNHVFGTGTKVTVLTTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
antiCD19-4G 4S-antiCD22 scFv 核酸序列	1309	gaaatcgtgatgacccagtcccccgcaaccctgtccctgagcccgggcgaaagagct accctgtcgtgccgggcgtcgcaggacatctccaagtacctgaactggtaccagcag aagcccggccaggcaccgagactgctgatctaccacactagccgcctgcattccggt atccccgcacggttcagcggcagcgggagcggaaccgattacacgctcactatttcct cactgcaacccgaggatttcgctgtgtacttctgccaacaaggaaacaccctgccttat accttcggacagggtacaaagctggagattaagggaggaggggctccggcggcg ggggcagcgggggcggcggaagccaggtccagctgcaggaatccggtccgggac tcgtgaagccctccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccg gactacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggactggagtggatcgg agtgatctggggctccgaaactacctactaccagtcatcattgaagtcaagagtgacca tttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactgtccagcgtgaccgcgg cggatactgccgtctactactgcgccaagcactattactacggcggaagctatgcgat

[1719]

		ggactactggggacagggcaccttggtcactgtgtcctccggaggggggaggctccg gtggcggcggctctggaggaggagggtccggcggaggaggatcggaagtgcagc tccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaaccctcagccttacttgtgc catttccggggattccgtgtcgagcaattccgccgcctggaactggatcaggcagtcc ccgtcgcgcgggctcgaatggctgggacgcacttactaccggtccaagtggtacaac gactacgccgtcagcgtgaagtcgcggatcaccattaaccccgacacctccaagaac cagttcagcctccaactgaactccgtgacccctgaggataccgcggtctactattgtgc ccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgattactggggccagggaac tctcgtcaccgtgtcctcgggaggggggtggctcaggggggtggtggatcgggtggtgg cggctcccagtccgctctgactcagcccgcgtccgtgtccggttccccgggacagtc gatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggcgggtacaactacgtgtcg tggtaccaacagcaccctggaaaagccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaag aggccaagcggagtgtcaaatcgcttttccggctcgaagtcgggaaacaccgccagc ctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcgtcttaca cctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaaggtcaccgtgctgact
antiCD19-4G4S-antiCD22 CAR 核酸序列	1310	gaaatcgtgatgacccagtcccccgcaaccctgtccctgagcccgggcgaaagagct accctgtcgtgccgggcgtcgcaggacatctccaagtacctgaactggtaccagcag aagcccggccaggcaccgagactgctgatctaccacactagccgcctgcattccggt atccccgcacggttcagcggcagcgggagcggaaccgattacacgctcactatttcct cactgcaacccgaggatttcgctgtgtacttctgccaacaaggaaacaccctgccttat accttcggacagggtacaaagctggagattaagggaggaggggctccggcggcg ggggcagcgggggcggcggaagccaggtccagctgcaggaatccggtccgggac tcgtgaagccctccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccg gactacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggactggagtggatcgg agtgatctggggctccgaaactacctactaccagtcatcattgaagtcaagagtgacca tttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtcccttaaactgtccagcgtgaccgcgg cggatactgccgtctactactgcgccaagcactattactacggcggaagctatgcgat ggactactggggacagggcaccttggtcactgtgtcctccggaggggggaggctccg gtggcggcggctctggaggaggagggtccggcggaggaggatcggaagtgcagc tccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaaccctcagccttacttgtgc catttccggggattccgtgtcgagcaattccgccgcctggaactggatcaggcagtcc ccgtcgcgcgggctcgaatggctgggacgcacttactaccggtccaagtggtacaac gactacgccgtcagcgtgaagtcgcggatcaccattaaccccgacacctccaagaac cagttcagcctccaactgaactccgtgacccctgaggataccgcggtctactattgtgc ccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgattactggggccagggaac tctcgtcaccgtgtcctcgggaggggggtggctcaggggggtggtggatcgggtggtgg cggctcccagtccgctctgactcagcccgcgtccgtgtccggttccccgggacagtc gatcacaatcagctgcactggcacctcctccgacgtcggcgggtacaactacgtgtcg tggtaccaacagcaccctggaaaagccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaag aggccaagcggagtgtcaaatcgcttttccggctcgaagtcgggaaacaccgccagc ctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcgtcttaca cctcctcatccttgaaccacgtgttcggaaccggaaccaaggtcaccgtgctgactac cactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctct gtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcct gctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat ctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcat gccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccg cagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag

[1720]

		ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag gacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

[1721] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表28中列出的任何重链结合结构域氨基

酸序列 的HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域还包含LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在实施方案中,抗原结合结构域包含表28所列的任何轻链结合结构 域氨基酸序列的LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。

[1722] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含表28中列出的任何轻链结合结构域氨基酸序列 的一个,两个或全部LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3,以及表28中列出的任何重链结合结 构域氨基酸序列的一个,两个或全部HC CDR1,HC CDR2,和HC CDR3。

[1723] 在一些实施方案中,根据Kabat编号方案,Chothia编号方案或其组合来定义CDR。

[1724] 如下文实施例中所述,在NFAT测定中测试上述双特异性CD19-CD22和CD22-CD19构建体。作为对照,使用单独的抗CD19 CAR和单独的抗CD22 CAR。该测定的结果示于图14。数据表明,抗CD19和抗CD22 scFvs均对其靶标有活性。

实施例

[1725] 通过参考下列实验实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了举例说明 的目的,并不意图是限定性的,除非另有说明。因此,无论如何不应把本发明解释为限定到下 列实施例,而是应该把本发明解释成包括任一以及所有的变化,这些变化作为本文中所提供 的教导的结果而变成显而易见的。

[1726] 无需进一步描述,相信本领域普通技术人员可以使用前述说明和以下说明性实施例制备 和利用本发明的化合物并实施要求保护的方法。以下工作实施例具体指出了本发明的各个方 面,并且不应被解释为以任一方式限制本公开的其余部分。

[1727] 实施例1:用于治疗多发性骨髓瘤的CD19 CAR T细胞

[1728] 即使用目前的化疗方案靶向治疗和自体干细胞移植,骨髓瘤也被认为是不治之症。本实 施例描述了用具有嵌合抗原受体的针对CD19的自体T细胞(慢病毒/CD19:4-1BB:CD3zeta;也称 为"CART19"或CTL019)治疗多发性骨髓瘤(MM)。该实施例证明基于靶向骨髓瘤干细胞和/或 表达非常低(通过大多数方法检测不到)的CD19水平的肿瘤细胞,针对CD19的CAR疗法具有建 立深的长期持久缓解的潜力。

[1729] 在治疗具有攻击性继发性浆细胞白血病的患者中,我们发现在补救自体干细胞移植后两 天施用的CART19导致浆细胞白血病的快速清除,并且在经历多线化疗的患者中具有非常好 的部分反应。该患者在治疗前数个月是输血依赖性的;在治疗后两个月,她已经恢复了她的血 细胞计数(具有正常范围血小板计数和白细胞计数),并且没有要求输血,因为她由于治疗从 医院出院。

[1730] 因为骨髓瘤细胞不天然表达CD19,CART19治疗在该肿瘤中诱导快速和显著的肿瘤反应 的发现是令人惊讶的。不希望受特定理论的束缚,据推测CART19可用于治疗骨髓瘤,因为:(1) 虽然通过流式细胞术,骨髓瘤细胞通常被认为对于CD19表达是阴性的,但有数据表明骨髓瘤 细胞可能表达非常低水平的CD19,使得表达可通过RNA检测,但不能通过流式细胞术或免疫 组织化学检测;和(2)靶向克隆型B细胞的概念,其被认为是引起多发性骨髓瘤的癌性干细胞, 并且特别耐化疗。B细胞和骨髓瘤肿瘤细胞之间存在克隆关系,但是传统的骨髓瘤治疗针对 的是恶性浆细胞而不是B细胞。因此,用于治疗骨髓瘤的CART19靶向不同于大多数骨髓瘤疗 法的细胞群。

[1731] 在我们的单个患者经验中,患者具有循环浆细胞,并且我们能够测试她的肿瘤细

胞的 CD19表达。大约1-2％的其肿瘤细胞表达CD19抗原。因此，推测CART19可能对其肿瘤细胞 的非常小的群体有直接影响；非常好的部分应答，虽然基于仅靶向非常小群体的CD19+肿瘤细 胞本不会预测到。

[1732] 在这种情况下，在大剂量美法仑后自体干细胞移植挽救后施用CART19。虽然这是骨髓 瘤的标准疗法，但并不是治愈性的。此外，该患者先前已经进行了串联自体干细胞移植，并 在移植后早期(<6个月)复发。不希望受特定理论束缚，如本实施例所述使用CART19细胞， 当与补救自体干细胞移植组合时，可以在治疗骨髓瘤中具有不重叠的机制。

[1733] 在I期试验中，另有10例多发性骨髓瘤患者将接受CART19治疗，迄今至少有3例患者已经 接受治疗。

[1734] 剂量理论和风险/利益

[1735] 我们对于该方案选择了通过静脉内途径施用使用平剂量。该方案的主要目标是测试对多 发性骨髓瘤患者施用CART-19细胞的安全性和可行性。预期的主要毒性是(I)CAR遇到在恶 性或正常B细胞上其替代CD19抗原时的细胞因子释放；(2)正常B细胞的消耗，类似于利妥 昔单抗治疗；(3)类似于移植物抗宿主病的类固醇反应性皮肤和胃肠综合征，如以前当扩增 /共刺激的自体T细胞已经与ASCT结合用于MM时已经看到的。理论上的关注是CART-19 T细 胞的转化或不受控制的增殖是否可能响应于高水平的CD19而发生。与CLL患者的另一项研究 相比，这在本申请中较少受到关注，因为MM中的克隆型B-细胞的负担预期远低于在该研究 中治疗的难治性CLL患者中恶性B细胞的负担。

[1736] 剂量理论

[1737] 在前3名患者中，我们观察到在$1.4x10^7$到$1.1x10^9$CART-19细胞的剂量范围内的临床活 性。这一观察证明，至少在治疗的前3名患者中，没有明显的剂量反应关系。在用两个log倍 差异剂量施用的患者中观察到完全反应。因此，与被代谢的标准药物不同，CAR T细胞可以 具有宽的剂量反应范围。这很可能是因为CAR T细胞能够在患者中广泛增殖。因此，我们设 置用于输注的$1-5x10^8$CART-19细胞的剂量范围。在这种基于同情使用的单一患者研究中， 患者被提供高达$5x10^8$个CART19细胞，没有剂量下限。对于10个患者试验，将向患者提供 $1-5x10^7$个CART-19细胞。

[1738] 一般设计

[1739] 这是一个基于同情使用提供的单个病人研究；在I期研究后对其进行建模以确定转导以表 达CART-19的自体T细胞的输注是否是安全的。本研究的主要目的是确定在首次ASCT后早期 复发后接受抢救ASCT的患者中CART-19T细胞的安全性，耐受性和植入潜力。该协议由一 个开放标签试点研究组成。

[1740] 在进入时，受试者将接受骨髓活检和其MM的常规实验室和成像评估。合格的受试者将 经历稳态单采血液成分术以获得大量用于CART-19制造的外周血单核细胞(PBMC)。T细胞将 从PBMC中纯化，用TCRζ/4-1BB慢病毒载体转导，在体外扩增，然后冷冻用于未来的施用。将记录与具有成功制造的T细胞的患者的数量相比具有不足的T细胞收集，扩增或制造的患者 的数量；产品制造的可行性预计在这个患者群体中不是问题。

[1741] 受试者一般将具有从为其第一ASCT进行两次另外的ASCT的准备中进行的动员/收集中 保留的足够的外周血干细胞。那些没有足够外周血干细胞的受试者将在根据治疗医师偏好的 方案进行的稳态单采血液成分术之前或之后进行第二次动员/收集程序。在最初

的白细胞清除 术后大约两周,受试者将进入医院并接受高剂量美法仑(第-2天),随后在两天后(第0天)输注 自体干细胞,并且所有受试者将在十二至十四天后(第+12-14天)接受CART-19细胞的输注。最多可登记10名患者。

[1742] 所有受试者将进行血液测试以到研究的第4周以规律的间隔评估CART-19细胞的安全性 和移植和持续性。在第+42天和第+100天,受试者将接受骨髓抽吸物/活组织检查以评估骨髓 浆细胞负担和CART-19细胞向骨髓的运输。根据国际骨髓瘤工作组(IMWG)标准136,将在第 100天进行正式反应评估,并且根据多发性骨髓瘤患者的常规临床实践监测TTP。在本研究中 测量的主要功效结果将是在本研究的ASCT后在患者的初始ASCT至TTP之后TTP的比较。

[1743] 由于本研究的主要终点是CART-19细胞输注与ASCT的安全性和可行性,本研究将采用早 停止规则。简而言之,如果在接受治疗的前五个受试者中发生了不到2个严重的意想不到的不 利事件,那么研究将再次累积五个受试者,目标登记人数为10。我们将在CART-19输注后观 察治疗的受试者40天(即,通过第42天的第一次官方回应评估),然后再登记随后的受试者, 直到五个受试者被登记并被观察到。对于第二组五名患者的治疗,受试者之间不需要等待期。

[1744] 经过6个月的密集随访,受试者将至少季度评估为期两年,具有病史,身体检查和血液检 查。经该评估后,受试者将通过电话和问卷进行年度随访的滚动研究,最多可以追加十三年, 以评估长期健康问题的诊断,如新的恶性肿瘤的发展。

[1745] 初步研究终点

[1746] 该先导试验旨在测试在第一次ASCT后早期复发后经历MM的挽救ASCT的患者中用CD19TCRζ/4-1BB转导的自体T细胞的安全性和可行性。

[1747] 初步安全和可行性终点包括:

[1748] 研究相关不良事件的发生,定义为NCJ CTC 2:3级体征/症状,实验室毒性和临床事件, 其可能或绝对与从输液到第24周任何时间的研究治疗相关。这将包括输注毒性和可能与CART-19细胞相关的任何毒性,包括但不限于:

[1749] a.发烧

[1750] b.皮疹

[1751] c.中性白细胞减少症,血小板减少症,贫血,骨髓发育不良

[1752] d.肝功能障碍

[1753] e.肺部浸润或其他肺部毒性

[1754] f.影响胃肠道或皮肤的GVHD样综合征。

[1755] 从患者单采血液成分术产物制造CART-19细胞的可行性。将确定不满足载体转导效率, T细胞纯度,活力,无菌度和肿瘤污染的释放标准的制造产品的数目。

[1756] 将使用CART19的自体干细胞移植后的应答深度和持续时间与每个患者在标准自体干细 胞移植后最初实现的应答深度和持续时间进行比较。

[1757] 受试者选择和退出

[1758] 纳入标准

[1759] 受试者必须先前接受过MM的ASCT治疗,并在干细胞输注后365天内进展。作为计划的 串联ASCT巩固方案的一部分,经历了两个以前的ASCT的受试者是符合条件的。根据IMWG

进行性疾病标准定义进展,或对于初始ASCT后获得CR或sCR的患者,根据CR复发的标准定义进展(Durie et al.Leukemia 2006;20(9):1467-1473)。N.B:没有要求患者必须在先前ASCT的 365天内登记,并且在注册本研究之前,可以在先前ASCT后复发/进展后,用其他活性剂(包 括实验活性剂)治疗患者。

[1760] 受试者必须签署书面知情同意书。

[1761] 受试者必须具有足够的重要器官功能才能接受高剂量美法仑,如以下标准所定义:在美法 仑输注之前的12周内测量:a.血清肌酸酐≤2.5或估计肌酐清除率≥30ml/min,不依赖透析。b. SGOT≤3x正常和总胆红素的上限≤2.0mg/dl(高胆红素血症归因于吉伯特氏综合征的患者除 外)。c.左心室射血分数(LVEF)≥45%,或,如果LVEF<45%,由心脏病专家进行正式评 估,没有鉴定出临床上重要的心血管功能障碍。LVEF评估必须在登记六周内完成。d.充足 的肺功能,FEV1,FVC,TLC,DLCO(适当调整肺容积和血红蛋白浓度后)≥40%的预测值。肺功能检查必须在登记后6周内进行。

[1762] 受试者必须具有0-2的ECOG表现状态,除非更高的表现状态仅由骨痛引起。

[1763] 排除标准

[1764] 受试者不得:

[1765] 有任何活跃和不受控制的感染。

[1766] 有活跃的乙型肝炎,丙型肝炎或艾滋病毒感染。

[1767] 任何不受控制的医疗障碍,其将排除如所概述的参与。

[1768] 治疗方案

[1769] 复发/进展性多发性骨髓瘤的治疗

[1770] 在登记前,患者可以根据其治疗医生的偏好接受复发性/进行性多发性骨髓瘤的治疗。登 记后治疗可以继续。

[1771] 患者必须在单采血液成分术之前停止所有治疗两周,并在高剂量美法仑之前停止两周。如果预期在单采血液成分术和高剂量美法仑之间超过两周,患者可以根据其治疗医师的决定 在单采血液成分术后恢复治疗。

[1772] 高剂量美法仑(第-2天)

[1773] 患者将在第-3天或-2天进入医院,并由主治医师进行检查,并在治疗方案开始前进行常 规实验室检查,包括监测肿瘤溶解综合征的参数。如果在入院7天内没有抽取用于MM监测实 验室测试(SPEP,定量免疫球蛋白和无血清轻链分析)的血液,那么将在开始治疗前进行此类 血液抽取。

[1774] 高剂量治疗将由在第-2天在约20分钟静脉内施用的剂量为200mg/m^2的美法仑组成。对 于>70岁的患者或对于由治疗医生判断不能耐受200mg/m^2剂量的任一年龄的患者,美法仑的 剂量将减少至140mg/m^2。所有患者将接受标准抗催吐预防,其可以包括地塞米松,和标准抗 生素预防。

[1775] 干细胞再输注(第0天)

[1776] 干细胞输注将在施用高剂量美法仑后至少18小时第0天进行。根据标准制度实践,在术前 用药法后约20-60分钟静脉内输注干细胞。应输注至少2x10^6CD34+祖细胞/kg体重。此外,至 少1x10^6CD34+祖细胞/kg体重应当作为备用干细胞产物可用,以在延迟植入或晚期移植物衰 竭的情况下被输注。G-CSF应当在第+5天开始适量施用,根据标准制度实践给

药。其他支持 性护理措施如输血支持将根据标准制度指导方针进行。

[1777] CART19细胞输注(第+12-14日)

[1778] 将给予单剂量的CART-19转导的T细胞,其由高达$5x10^7$个CART-19细胞组成。在单一 患者方案中输注用CD19TCRζ4-1BB载体转导的细胞的最小可接受剂量为$1x10^7$。在干细胞输 注后第12-14天,将以单次剂量通过快速静脉内输注给予CART-19细胞。如果患者在12-14天 的窗口中不符合本文所述的任何纳入标准,那么CART-19输液可能延迟超过+12-14天,直到 满足标准。

[1779] 维持来那度胺

[1780] 在第一次ASCT后接受和耐受维持来那度胺的受试者将在大约第+100天重新开始来那度 胺维持治疗,假设在治疗医师的判断中没有禁忌症。起始剂量将为每天10mg,除非先前经验 指示特定患者的替代起始剂量。维持治疗将继续直到疾病进展或不耐受。

[1781] 研究药物的制备和施用

[1782] CART-19T细胞在CVPF中制备并且不会从CVPF释放,直到FDA批准的注射细胞释放标 准(例如,细胞剂量,细胞纯度,无菌度,载体/细胞的平均拷贝数等)被满足。释放后,将细胞带到床边进行给药。

[1783] 细胞解冻。冷冻细胞将在干冰中运送到受试者的床边。细胞将使用保持在36℃至38℃的 水浴在床边解冻。该袋将被轻轻按摩,直到细胞刚解冻。容器中不应有冷冻的团块。如果 CART-19细胞产品似乎有损坏或袋子泄漏,或以其他方式似乎受损,则不应将其输注,并应 按以下规定退回给CVPF。

[1784] 前驱用药。T细胞输注后的副作用包括短暂发热,发冷和/或恶心;回顾参见Cruz等(Cytotherapy 2010;12(6):743-749)。推荐在输注CART-19细胞之前,将受试者用对乙酰氨基酚 和盐酸苯海拉明预先给药。这些药物可以根据需要每六个小时重复一次。如果患者继续发热, 对乙酰氨基酚不能缓解,则可以开出非类固醇类抗炎药物处方。建议患者在任何时候不接受 系统性皮质类固醇,如氢化可的松,泼尼松,甲泼尼龙或地塞米松,除非有危及生命的紧急 情况,因为这可能对T细胞有不良影响。

[1785] 发烧反应。在不太可能的情况下,受试者在CAR T细胞输注后出现脓毒症或系统性菌血 症,应启动适当的培养和医疗管理。如果怀疑有污染的CART-19T细胞产品,则可以使用存 储在CVPF中的归档样品重新测试产品的无菌性。

[1786] 施用.输注将在Rhoads的隔离室中进行,对免疫抑制患者使用预防措施。转导的T细胞将 以大约10ml至20ml/分钟的流速通过具有3通旋塞阀的18号规格的无胶乳Y型血液套件通过快 速静脉内输注施用。输注的持续时间将基于待输注的总体积和推荐的输注速率。每个输液袋 将贴有包含以下内容的标签:“仅供自体使用”。此外,标签将至少具有两个唯一标识符,例如 受试者的首字母,出生日期和研究编号。在输注之前,两个个体将在受试者存在的情况下独 立地验证所有这些信息,因此确认信息与参与者正确匹配。

[1787] 如果受试者具有过敏反应或严重的低血压危象或任何其他对输注的反应,则在输注期间 将提供紧急医疗设备(即紧急推车)。输液前后采集生命体征(温度,呼吸频率,脉搏和血 压),然后每15分钟持续至少1小时,直到这些体征令人满意并且稳定。受试者将被要求不要 离开,直到医生认为他或/她离开是安全的。

[1788] 包装

[1789] 输注将由单剂量的1-5x10^7个CART19转导的细胞组成，具有最小可接受剂量的1x10^7 CART-19细胞用于输注。每个袋将包含等分试样(体积取决于剂量)的冻存物，所述冻存物含 有以下不熔级试剂(%v/v):31.25%plasmalyte-A,31.25%葡萄糖(5%),0.45%NaCl,至多 7.5%DMSO,1%葡聚糖40,5%人血清白蛋白。

[1790] 单采血液成分术

[1791] 在单采血液成分术中心进行大体积(12-15升或4-6血容量)单采血液成分术程序。在该程序 期间获得CART-19的PBMC。从单个白细胞采集物，目的是收获至少5x10^9个白细胞以制造 CART-19T细胞。还获得用于FDA回顾要求和用于研究的基线血液白细胞并冷冻保存。细胞产 物预期在大约2-4周后准备释放。流式细胞术淋巴细胞亚群定量，包括CD19和CD20 B细胞测 定。对人抗-VSV-G和抗鼠抗体(HAMA)进行基线评估。如果受试者先前已经根据当前的良好 生产规范(Good Manufacturing Practices)在临床细胞和疫苗生产设施进行了足够的单采血液成 分收集存储，那么这些细胞可以用作CART-19制造的细胞来源。使用存储的单采血液成分产 品将避免对于经历额外单采血液成分收集的受试者带来的费用，时间和风险。

[1792] 细胞减少性化疗

[1793] 淋巴细胞清除化疗将是如本文所述的高剂量美法仑。

[1794] CART-19输注

[1795] 输注将在干细胞回输后的第+12-14天开始。

[1796] 在第一次输注之前的第+12-14天，患者将具有差别的CBC，以及评估CD3，CD4和CD8计数，因为化学疗法部分地被给予以诱导淋巴细胞减少。

[1797] 第一剂量将使用单一剂量施用。细胞在患者的床边解冻。解冻的细胞将以可耐受的尽可 能快的输注速率给予，使得输注的持续时间为约10-15分钟。为了便于混合，使用Y-连接器同 时施用细胞。将如本文所述输注和预先给药受试者。将评估受试者的生命体征，并且在给药 之前，在输注结束时，以及之后每15分钟进行脉搏血氧测量，持续1小时，直到这些是稳定和 令人满意的。用于测定基线CART-19水平的血液样品在第一次输注之前的任一时间和每次输 注后20分钟至4小时获得(并且发送到TCSL)。

[1798] 经历与高剂量美法仑相关的毒性的患者将延迟其输液计划，直到这些毒性已经解决。确 保T细胞输注延迟的具体毒性包括:1)肺:补充氧气保持饱和度大于95%的要求或存在胸部x射 线放射进行性摄影异常;2)心脏:新的心律失常不受医疗管理控制;3)需要血管加压素支持 的低血压;4)主动感染:T细胞输注48小时内细菌，真菌或病毒的阳性血培养。

[1799] 毒性管理

[1800] 不受控制的T细胞增殖。与同种异体或自体T细胞输注相关的毒性已经通过药理学免疫抑 制过程进行了管理。据报道，T体相关毒性应答全身性皮质类固醇。如果发生不受控制的T细 胞增殖(3级或4级与CART-19细胞相关的毒性)，受试者可以用皮质类固醇治疗。受试者将 用脉冲甲泼尼龙治疗(2mg/kg i.v.分开q8小时×2天)，随后迅速缩小。

[1801] 此外，基于对另一种方案治疗的受试者的观察结果，对于巨噬细胞活化综合征(MAS) 有一些担忧，尽管骨髓瘤患者的CD19+肿瘤负荷预期比CLL患者低得多。这种毒性的治疗和 治疗时间选择将由患者的医师和研究调查员自行决定。建议的管理可能包括:如果受试者的发 烧大于101°F，持续超过2个连续日，并且没有感染证据(阴性血培养物，CXR或

其他来源)，可以考虑托珠单抗4mg/kg。皮质类固醇和抗TNF疗法的添加可以由医师酌情考虑。

[1802] B细胞消耗。可能发生B细胞消耗和低丙种球蛋白血症。这在抗CD20定向疗法中是常见 的。在临床显著的低丙种球蛋白血症(即全身感染)的情况下，通过建立的临床给药指南给 予受试者静脉内免疫球蛋白(IVIG)，以恢复血清免疫球蛋白水平的正常水平，如用利妥昔 单抗进行的。

[1803] 原发性移植物衰竭。与第一次ASCT相比，第二次ASCT后，原发性移植物衰竭(即非移 植物移入)可能更常见。合格标准规定，在原发性移植物衰竭的情况下，必须由治疗医师酌 情决定足够的干细胞用于救援再输注。

[1804] 结果

[1805] 在这个进行中的试验中，现在已经用CTL019治疗了三种难治的晚期多发性骨髓瘤患者。这些患者中的两个的结果显示，基于在三个月时间点的主要功效评价，两者都具有来自 CTL019治疗的实质性抗肿瘤效应。第三名患者尚未达到三个月的时间点。下面更详细地描述 两个患者的结果。

[1806] 第一名骨髓瘤患者完成了她的+100天的反应评估，她对CART19治疗有很好的反应。进 行以下测试，得到以下结果:

[1807] -SPEP/免疫固定:阴性

[1808] -尿免疫固定:在她的免疫固定上微弱的不可测量的κ轻链条带(也存在于第38天，所以不是 新的)

[1809] 否则，患者符合严格完全缓解的标准，包括:

[1810] -血清游离轻链比例:正常

[1811] -骨髓活检:阴性

[1812] -IgA免疫表型:IgA低于检测限

[1813] 除了来自尿免疫固定的微弱的不可测量的κ轻链结果之外，患者满足“严格的完全缓解”的所有标准。在3个时间点(第-2天，第+38天，第+103天)的血浆细胞免疫表型的总结显示在图 8中，并且证明了患者的IgA低于检测限。该总结显示在第-2天的重骨髓瘤负荷，在第+38和+103 天无法检测到，其通过流动分析将患者分类为“MRD阴性”。在第+103天，总结显示正常的多 克隆的CD19+浆细胞和B细胞的恢复。患者没有疾病或治疗的症状，并且机能像正常人一样。

[1814] 第二个接受治疗的患者尚未达到+100天的时间点。然而，在这个时间点，她做得很好，但是确定CTL019输注的效果还为时过早。

[1815] 实施例2:用于霍奇金淋巴瘤的CAR19 T细胞疗法

[1816] CAR19 T细胞疗法也可用于治疗霍奇金淋巴瘤(HL)。霍奇金淋巴瘤的特征在于来自克 隆生发中心B细胞的恶性霍奇金Reed-Sternberg(HRS)细胞的存在。有几个因素表明CAR19 T 细胞治疗对于HL的疗效。HL肿瘤的CD19染色显示肿瘤和肿瘤微环境内的CD19表达(CD19+) 细胞(图2)。一项研究表明，表达CD19的克隆B细胞群($CD20^{+}CD27^{+}ALDH^{+}$)负责霍奇金淋 巴瘤细胞系的产生和维持，并且也在大多数HL患者的血液中循环(Jones et al., Blood,2009, 113(23):5920-5926)。这种克隆B细胞群体也被认为是引起或有助于产生恶性HRS细胞。因此，CART19治疗将消耗有助于肿瘤细胞的肿瘤发生或维持的B细胞群体。另

一项研究表明,B细 胞消耗在多种鼠模型中延缓了实体瘤的生长(Kim et al.,J Immunotherapy,2008,31(5):446-57)。为了支持B细胞在HL肿瘤微环境中的消耗导致某种抗肿瘤效应的想法,现在正在临床测试目 前的疗法,如利妥昔单抗,用于靶向和消除HL中的肿瘤B细胞(Younes et al.,Blood,2012, 119(18):4123-8)。与慢性炎症相关的新生癌发生也已显示为B细胞依赖性的(de Visser,et al., Cancer Cell,2005,7(5):411-23)。这些研究的结果表明,通过减少或抑制疾病进展或肿瘤生长,B细胞群体,特别是在HL肿瘤微环境中的B细胞群体的靶向将可用于治疗HL。

[1817] 此外,正常的表达CD19的B细胞也浸润HL中的肿瘤微环境。以前在CLL和ALL中进行CART19治疗的研究(例如实施例4和5中所述)表明CART19暴露于CD19+靶标导致细胞因子产生和巨噬细胞产生。因此,可以通过输注CART19以与存在于HL中的正常CD19+B细胞相互作用来实现HL肿瘤微环境从促肿瘤微环境调节到抗肿瘤微环境。例如,CART19暴露于表达CD19的靶标导致细胞因子产生,例如炎性细胞因子,其通过扩增细胞毒性T细胞,巨噬细胞的活化以及募集具有抑制肿瘤生长的各种功能的其它免疫效应细胞(如白细胞,巨噬细胞和 抗原呈递细胞)来促进抗肿瘤活性。因为靶标CD19+B细胞可能不是恶性的(例如,正常循环 的B细胞),所以短暂而不是延长的CART19效应可能对于肿瘤微环境的调节是优选的。

[1818] 检查CART19治疗在HL患者的治疗效果的研究可以如下所述进行(图3)。该研究还将评 估CART19在HL受试者中的安全性和耐受性,并确定CART19细胞对HL肿瘤微环境的影响。

[1819] 本研究对8例经典HL患者进行了治疗。患者是各个年龄的,尽管针对儿科和成人患者可 以建立单独的药物递送方案。本研究中的患者没有潜在的治愈性治疗方案(如自体(ASCT) 或同种异体干细胞移植),或不适合这种治愈性治疗方案。例如,患者可以是以下任何一种: 在补救化疗后的PET+,经Brentuximab治疗后的PET+,或者在具有或不具有先前的brentuximab 暴露的ASCT之后的PET+。使用目前可用的疗法,患者将具有有限的预后(几个月至小于或 等于2年预期生存期)。最后,患者不会接受抗CD20抗体治疗。患者由于缺乏可行性而被排 除,例如,如果患者具有不足数量的T细胞用于6次输注CART19的话。

[1820] 通过体外转录产生mRNA CAR19。将CAR19 mRNA电穿孔到供体T细胞中,通过与CD3/CD28珠温育,使得到的细胞扩增并刺激。含有$1x10^8$-$5x10^8$个RNA电穿孔的CAR19T 细胞的剂量每周输送给患者三次,为期两周(例如,在第0,2,4,7,9和11天)。治疗后1个月通 过临床,CT和PET扫描评估总体应答率。第一次CART19输液(第0天)后的前6个月,然后 每3个月直到2年为止,每月监测应答和存活。监测技术包括肿瘤或淋巴结的活检(例如用于 免疫组织化学分析和/或用于基因表达谱的RNA)和在CART19治疗之前和之后的PET扫描。 例如,通过比较在治疗前和治疗后约一周(或治疗后适当的时间以允许改变细胞表型)对来 自选定患者的可及性淋巴结活检进行的基因表达谱分析的结果,分析CART19细胞对HL肿瘤 微环境的影响。为了评估CART19治疗的安全性和耐受性,报告了不良事件的频率和严重性,包括细胞因子释放综合征(CRS)和巨噬细胞活化综合征(MAS)的频率。

[1821] 化疗可与CART19治疗同时施用。CART19的第一剂之前可以是淋巴细胞消耗性化疗,例 如环磷酰胺。

[1822] 实施例3:CLL患者的非应答者子集表现出免疫检查点抑制剂分子的增加的表达

[1823] 在本研究中,评估了来自34名CLL患者临床制造的CART19细胞的免疫检查点抑制

剂分子 (如PD-1,LAG3和TIM3)的表达。该群组对CART19的应答是已知的,因此可以评估应答 和生物标志物表达模式之间的相关性。

[1824] 通过流式细胞术分析来自具有对CART疗法不同应答的CLL患者的制备的CART19细胞, 以测定CAR和免疫检测点抑制剂分子PD-1,LAG3和TIM3的表达。CART19细胞来自:健康供 体(HD)(n=2);应答CART治疗(CR)的CLL患者(n=5);部分应答CART治疗(PR) 的CLL患者(n=8);不应答CART治疗(NR)的CLL患者(n=21)。根据本领域已知的流 式细胞术分析的标准方法,用特异性识别CD3,CD4,CD8,CD27,CD45RO,CAR19分子 和免疫检查点分子PD-1,LAG3和TIM3的荧光标记的抗体染色细胞。通过流式细胞术分析软 件测定每个标记物例如CD4+,CD8+等的表达,进一步分析亚群(例如CD4+T细胞,CD8+T 细胞或表达CAR19的T细胞)的免疫检查点分子PD-1,LAG3和TIM3的表达。

[1825] 用于确定表面标志物表达的流式细胞图谱分析的实例示于图4A和4B。使用流式细胞术测 定表达CD4的T细胞,并进一步分析CAR19和PD-1表达,使得图谱的x轴表示CAR19表达(左 上(Q5)和左下(Q8)象限显示CAR19阴性CD4+细胞,而右上(Q6)和右下(Q7)象限显 示表达CAR19的CD4+细胞),y轴显示PD-1表达(左下(Q8)和右(Q7)象限显示PD-1阴 性CD4+细胞,左上(Q5)和右(Q6)象限显示表达PD-1的CD4+细胞)。在来自CART应答 者的CD4+群体中,44.7%的CD4+细胞总体表达PD-1,并且约22.3%的表达CAR19的细胞为 PD-1阳性,而27.2%的表达CAR19的细胞为PD-1阴性(图4A)。相比之下,在非应答者的CD4+ 群体中,总体CAR19表达细胞显著减少(与CR的49.5%相比约15.3%),14.7%的表达CAR19 的细胞是PD-1阳性的,而只有0.64%为PD-1阴性的(图4B)。图4A和图4B中的图谱之间的比 较显示,与CART应答者(约44.7%)相比,来自表达PD-1的非应答者的CD4+细胞百分比高 得多(约92.9%)。

[1826] 使用上述方法和分析,测定每个应答组中每个患者的CD4+群体和CD8+群体的PD-1表达 (PD-1+)细胞百分比。与应答CAR治疗(CR)的患者相比,非应答者在CD4+(图4C)和 CD8+(图4D)群体中具有更大百分比的PD-1+细胞。CD4+和CD8+群体平均PD-1百分比的增 加是统计学显著的。部分应答者(PR)在CD4+(图4C)和CD8+(图4D)群体中表现出比应 答者(CR)更高百分比的PD-1+细胞。

[1827] 接下来,针对每个应答组中的每个患者确定表达CAR19的CD4+群体和表达CAR19的CD8+群体的PD-1表达(PD-1+)细胞的百分比。进行如上所述的类似分析,并且分析用于CAR19表达的CD4+和CD8+细胞的额外步骤,并且在鉴定表达CAR19的细胞后,确定来自表 达CAR19的细胞群体中具有PD-1表达的细胞的百分比。对于表达CAR19的CD4+和CD8+群体, 观察到与CD4+和CD8+总体群体中相似的趋势:与应答CAR治疗(CR)的群体相比,非应答者 在CD4+(图5A)和CD8+(图5B)群体中显示更高百分比的PD-1+细胞;CD4+和CD8+群体的 平均PD-1百分比的增加是统计学上显著的。部分应答者(PR)在CD4+(图5A)和CD8+(图 5B)群体中表现出比应答者(CR)更高百分比的PD-1+细胞。

[1828] 进行进一步分析以确定来自对CAR治疗具有不同应答的患者的表达PD-1,LAG3和TIM3 的细胞的分布。CD4+群体中PD-1,LAG3和TIM3表达的代表性细胞谱分析如图6所示。首先 分析细胞群体的CD4+和CD8+表达。然后分析CD4+群体(或CD8+群体,未显示)的PD-1和CAR19表达(图6,左侧图谱)。如前所述,非应答者(NR)与CART应答者(CR)相比, 总体PD-1+细胞百分比显著增加(NRC约为92.9%PD-1阳性,而CR为44.7%PD-1阳性)。此 外,在非应答

者中,表达CAR19的细胞多数为PD-1阳性(14.7%为PD-1阳性且CAR+,相比, 0.64%为PD-1阴性且CAR+)。然后分析群体的PD-1和LAG3共表达(图6,中间图谱)。表达 PD-1和LAG3的细胞显示在右上象限(Q2)中。与CART应答者相比,非应答者具有显著增加 百分比的表达两种免疫检查点抑制剂PD-1和LAG3的细胞(67.3%相比7.31%)。还用TIM3 表达分析了PD-1表达。在图6,右侧图谱中,框指示表达PD-1和TIM3的细胞。与用PD-1和LAG3 获得的结果相似,与CART应答者相比,非应答者具有显著更高百分比的表达两种免疫检查 点抑制剂PD-1和TIM3的细胞(83.3%相比28.5%)。使用如上所述的流式细胞术分析,在每 个应答组中测定每个患者的PD-1表达细胞(PD1+),PD-1和LAG3表达细胞(PD1+LAG3+) 和PD-1和TIM3表达细胞(PD1+TIM3+)的百分比。与对于两种细胞群体统计学显著的CART 应答者相比,非应答者显示具有增加百分比的PD1+LAG3+细胞(图7A)和PD1+TIM3+细胞 (图7B)。与CART应答者相比,部分应答者也显示出两种细胞群体的百分比增加,与非应 答者相比,平均值下降。

[1829] 这些结果表明,与对CAR治疗应答或部分应答的患者相比,不应答CAR治疗的患者表现 出免疫检查点抑制剂(例如PD-1,LAG3和TIM3)增加的表达。因此,这些结果表明,抑制或降低免疫检查点抑制剂例如PD-1,LAG3或TIM3的表达的活性剂可用于施用于接受CAR治疗的患者,以通过免疫检查点途径(例如,通过PD-1,LAG3或TIM3介导的)预防免疫抑制, 从而增加CAR表达细胞的功效。

[1830] 实施例4:mTOR抑制对老年人免疫衰老的影响

[1831] mTOR抑制对免疫衰老的功效描述于例如国际申请WO/2015/073644的实施例1中,并且该 申请的全部内容通过引用并入本文。

[1832] 实施例5:增强对老年受试者中疫苗的免疫应答

[1833] mTOR抑制对增强免疫应答的功效描述于例如国际申请WO/2015/073644的实施例2中,并 且该申请的全部内容通过引用并入本文。

[1834] 实施例6:低剂量mTOR抑制增加能量和运动

[1835] 例如在国际申请WO/2015/073644的实施例3中描述了mTOR抑制对能量和运动的影响,并 且该申请的全部内容通过引用并入本文。

[1836] 实施例7:用RAD001抑制P70 S6激酶

[1837] mTOR抑制对P70 S6激酶抑制的影响描述于例如国际申请WO/2015/073644的实施例4中, 并且该申请的全部内容通过引用并入本文。

[1838] 实施例8:外源性IL-7增强CAR T细胞的功能

[1839] 在过继转移CAR T细胞后,一些患者经历了CAR T细胞有限的持续,这可能导致次优的 抗肿瘤活性水平。在该实施例中,小鼠异种移植模型中评估外源性人IL-7的给药效果,在该 模型中已经观察到对CAR T细胞的初始次优应答。

[1840] 首先在不同的癌细胞系和CAR表达细胞中评估IL-7受体CD127的表达。通过流式细胞术 分析两个外套细胞淋巴瘤细胞系(RL和Jeko-1)和一个B-ALL细胞系(Nalm-6)的CD127表 达。如图9A所示,在测试的三种癌细胞系中,RL显示出CD127的最高表达,其次是Jeko-1和 Nalm-6。将CART19细胞注入NSG小鼠,通过流式细胞术对循环CART19细胞评估CD127表达。 如图9B所示,CD127在所有循环CART19细胞上均匀表达。

[1841] 接下来,在淋巴瘤动物模型中评估外源性IL-7治疗对CART19细胞抗肿瘤活性的影响。在 第0天(D0),将NSG小鼠植入表达萤光素酶的外套细胞系(RL luc),随后在第6天处理

CART19 细胞。将NSG小鼠分成组，其中一组不接受CART19细胞，第二组接受0.5x10^6个CART19细 胞，第三组接受1x10^6个CART19细胞，第四组接受2x10^6个CART19细胞。通过测量移植肿瘤 的平均生物发光来监测肿瘤大小超过80天。只有接受2x10^6个CART19细胞的小鼠表现出肿瘤 的排斥和肿瘤生长的抑制(图10A)。来自接受0.5x10^6个CART19细胞或1x10^6个CART19细 胞的两组的小鼠显示为次优的抗肿瘤应答。然后将来自这两组的小鼠随机分配，其中三只小 鼠(接受0.5x10^6个CART19细胞的小鼠#3827和#3829以及接受1x10^6个CART19细胞的小 鼠#3815)从第85天开始通过腹膜内注射，每周三次，以200ng/小鼠的剂量接受外源重组人 IL-7，两只老鼠没有接受注射。如通过平均生物发光检测的，从第85-125天接受外源IL-7的小 鼠的肿瘤负荷示于图10B。接受IL-7的所有小鼠均显示出明显的应答，其肿瘤负荷减少了1-3 个log。最初接受较高剂量的CART19细胞的小鼠(接受1x10^6个CART19细胞的小鼠#3815) 显示出更明显的应答。IL-7治疗之前和之后，当比较接受IL-7治疗的小鼠与对照的肿瘤负荷时， 肿瘤负荷的肿瘤减少仅在接受IL-7治疗的小鼠中观察到(图10C)。

[1842] 还检查了淋巴瘤动物模型中IL-7治疗后的T细胞动力学。在IL-7治疗之前，在血液中不能 检测到人CART19细胞。在IL-7治疗时，治疗的小鼠中T细胞的数量有迅速但可变的增加(图 11A)。在接受IL-7的小鼠中观察到的T细胞扩增的程度也与肿瘤应答相关。在IL-7治疗(小 鼠#3815)期间在峰值膨胀时在血液中检测到的T细胞数最多的小鼠具有肿瘤负荷最稳健的降 低(参见图10B)。此外，峰值扩张时间与基线时注射的T细胞剂量相关。在IL-7治疗之前和 之后也测量血液中CD3表达细胞的数量/水平。在对照小鼠中，检测到非常少的CD3表达细胞， 而IL-7治疗的小鼠在IL-7治疗后显示CD3+细胞显著增加(图11B)。

[1843] 本实施例的结果一起证明外源性IL-7治疗增加了体内T细胞增殖和抗肿瘤活性，表明在 CAR治疗后具有次优结果的患者中IL-7的使用可以改善这些患者中的抗肿瘤应答。

[1844] 实施例9:评价CD22 CAR

[1845] 自动化Jurkat-NFAT-萤光素酶(JNL)细胞测定

[1846] 进行自动化测定以确定特异性CD22 CART克隆的反应性。将从NFAT启动子稳定表达萤 光素酶的3e^4个慢病毒转导的Jurkat细胞系细胞(JNL细胞)接种在具有表达CD22的靶细胞系 (Daudi，Raji)和非CD22表达细胞系(K562)的96孔板中作为阴性对照。第二天，将萤光 素底物加入到96孔板的每个孔中，并确定萤光素酶报告基因的相对发光。在该测定中，将CD22 CAR构建体与作为阳性对照的CD19 CAR构建体和CD22(m971衍生的)CAR构建体(m971-HL)进行比较。含有m971-HL的VH和VL链但为相反方向(L-H代替H-L)的m971-LH CAR构建体含有CAR，但是由于缺乏特异性而不能结合靶标，并且用作阴性对照。未转染的 不含CAR(Neg cnt)的T细胞也作为阴性对照。绘制来自Jurkat T细胞活化的萤光素酶活性。 本文提供的结果表明，几种CD-22转导的JNL克隆显示出以剂量依赖性方式增加的针对表达CD22的细胞系的特异反应性(图18A-18C)。

[1847] CD22 CAR在原代人T细胞中的表达

[1848] 在第0天，用抗CD3/抗CD28刺激珠激活原代人T细胞，随后在第1天用特异性CAR构建体 进行慢病毒转导。细胞在体外扩增至第10天，此时通过流式细胞术分析它们的CAR的表面表 达。利用两种不同的方法来确定CAR的表面表达:蛋白质-L-生物素然后是链霉抗生物素蛋白 -PE，和重组人CD22-Fc然后是抗-Fc-alexafluor488。结果示于图19。本文提供的结果表明，CD22 CAR克隆2(hCD22-2)，克隆5(hCD22-5)，克隆7(hCD22-7)，克隆8(hCD22-8)，

克 隆10(hCD22-10)，克隆12(hCD22-12)，克隆30(hCD22-30)和克隆31(hCD22-31)显 示阳性表达表达。CD22 CAR m971作为结合蛋白L和hrCD22-Fc的阳性对照，无特异性(抗-gH) 的同种型CAR作为蛋白L的阳性对照。不表达CAR的T细胞用作阴性对照。

[1849] 原发性T细胞肿瘤靶标杀伤测定

[1850] 将如上所述活化和转导的原代T细胞以指示的比例与稳定表达萤光素酶的靶细胞系混合 (图20A-20F)。靶细胞系Raji，SEM，K562-hCD22，Daudi和Nalm6均表达CD22靶，而K562 细胞系不表达CD22并用作阴性对照(图20A-20F)。本文提供的结果表明，几个CD22 CAR 克隆(例如，CD22 CAR克隆2,5,7,8,10,12,30和31)和阳性对照CD22 m971-HL CAR显示出剂 量依赖性靶细胞杀伤，杀伤程度取决于靶细胞类型而变。未转染的T细胞(UTD)缺乏杀死 靶细胞系的能力。

[1851] 原发性T细胞细胞因子珠阵列

[1852] 研究了CD22表达细胞系诱导从表达CD22的CART细胞的促炎细胞因子释放的能力。使用 细胞因子珠阵列试剂盒对取自原代T细胞杀伤试验的样品测定促炎细胞因子浓度。干扰素-g (IFN-g)，肿瘤坏死因子α(TNFa)和白细胞介素2(IL-2)均在2.5:1E:T和10:1E:T比例的 样品上测量。结果示于图21A-21F。本文提供的结果表明，多种CD22 CAR克隆比m971-LH CAR (阴性对照)或未转导的T细胞(UTD)诱导显著更多的IFN-g，TNFα和IL-2，细胞因子诱导 水平随靶细胞类型而变化。

[1853] 实施例10:CD22 CART治疗的剂量升高研究

[1854] 进行1期临床试验以确定在接受过或之前没有接受过CART治疗的ALL受试者中具有或不 具有CD19 CART的CD22 CART的最佳剂量。本研究的目的是确定产生符合既定释放标准的抗 CD22 CAR工程化T细胞的可行性，并评估在具有B细胞恶性肿瘤的儿童和年轻人中环磷酰胺/ 氟达拉滨淋巴结清除方案后，施用递增剂量的自体抗CD22 CAR工程化T细胞的安全性。

[1855] 受试者年龄在1至30岁之间，CD22+ALL体重至少15kg。疾病活动可通过骨髓分析或FDG-PET测量。允许最小残留疾病活性的受试者。允许中枢神经系统(CNS)状态为1或2的 受试者。受试者必须具有足够的器官功能和足够的CD3计数。

[1856] 用扩张群组进行1期剂量递增研究。受试者根据是否有或没有接受过CART治疗分层。给 予受试者四个剂量水平之一的四个剂量的自体抗CD22 CAR工程化T细胞:$3x10^5$细胞/kg体 重，$1x10^6$细胞/kg体重，$3x10^6$细胞/kg体重和$1x10^7$个细胞/kg体重。接受$3x10^6$个细胞/kg体重 剂量的受试者的子集也被给予抗CD19 CAR工程化T细胞。每个剂量水平的前2名患者是16岁 或以上。

[1857] 在确定合格后，进行单采血液成分术以分离T细胞。受试者经历准备性化疗。受试者每天 用25mg/m^2氟达拉滨治疗三天，给予单剂量的900mg/m^2的环磷酰胺。然后施用抗CD22 CAR 工程化T细胞，28天后评估应答和毒性。

[1858] 实施例11:利用CD20靶向嵌合抗原受体(CARS)治疗B细胞恶性肿瘤

[1859] 进行Jurkat-NFAT-萤光素酶(JNL)细胞测定以确定特异性CD20 CART克隆的反应性。从NFAT启动子稳定表达萤光素酶的Jurkat细胞(JNL细胞)用图15A-15C所示的CAR构建体进 行慢病毒转导。将表达CAR的JNL细胞(3e4)与表达CD20的靶细胞系Daudi(图15A)和Raji (图15B)和非表达CD20的阴性对照K562(图15C)以0.5:1，1:2，2:1和4:1在效应细胞:

靶细胞 (E:T)比混合。将慢病毒转导的JNL细胞接种在具有表达CD20的靶细胞系(Daudi，Raji) 和非CD20表达细胞系(K562)作为阴性对照的96孔板中。第二天，将萤光素底物加入到96 孔板的每个孔中，并确定萤光素酶报告分子(来自Jurkat T细胞活化)的相对发光。在该测定 中，将CD20 CAR构建体与作为阳性对照的CD10 CAR构建体和Haso et al.,Blood, 14Feb 2013, Vol.121,No.7中描述的CD22(m971衍生的)CAR构建体比较。含有CAR但由于缺乏特异性 而无法结合靶标的同种型CAR，以及不含CAR(Neg cnt)的未转导的T细胞作为阴性对照。结果示于图15A-15C。几种CD20转导的JNL克隆显示出以剂量依赖性方式增加的针对CD20表 达细胞系的特异性反应性。

[1860] 实施例12:预测B细胞急性淋巴性白血病(B-ALL)中受试者对CD19CART疗法复发的因 子的鉴定

[1861] 本实施例除其他之外还描述了根据本发明使用的用于预测B细胞急性淋巴性白血病 (B-ALL)中患者对CD19 CART疗法(例如CTL019疗法)复发的新的转录基因特征的鉴定。

[1862] 除此之外，本实施例描述了基于在CD19CART治疗(例如，CTL019)(单采血液成分术或骨髓)之前的患者中或再输注前制造的CD19 CART产品样品(例如，CTL019)中所选基 因的mRNA表达水平的新型基因特征。在一个实施方案中，本实施例描述了新的基因特征， 其将B-ALL中CTL019治疗的复发者与B-ALL中CTL019治疗的非复发者区分开。

[1863] 本实施例描述了用于本发明的发现新基因特征的无偏特征选择的方法，所述基因特征预 测B-ALL中对CD19 CART治疗(例如CTL019)的受试者复发。

[1864] 本实施例还描述了用于发现根据本发明使用的新基因特征的基因集分析方法。

[1865] 鉴定了在重新输注之前基于制备的CD19 CART产品样品中的mRNA表达水平的新基因 特征，其预测受试者在B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)中对CD19 CART治疗的复发。在包括7个B-ALL受试者样品的制备的产品样品的全基因组RNAseq研究中发现了鉴定的特 征。B-ALL受试者样品(共7个)分层如下:在CTL019治疗后4名未复发的受试者(“非复发者”) 和CTL019治疗后3名复发的受试者(“复发者”)取得生物样品。发现了在制造的产品样品中 区分应答者和非应答者，以及复发者和非复发者的几个基因特征，并在下面进一步描述。

[1866] 然后使用多种数据分析方法发现了新的基因特征:1)无偏特征选择;2)基因集分析;和3) 所选择的目的基因的差异表达分析。

[1867] 通过确定哪些基因在复发者与非复发者的2组比较(其将3例复发者与4例非复发者进行了 比较)之间差异表达，发现了从无偏特征选择导出的新基因特征。如果它们的差异表达在2 组比较中具有统计学显著性(FDR p值截止值为0.25)，则将基因定义为差异表达的。表29 中列出了用于复发者与非复发者比较(N＝17)的基因列表。应用2组统计模型，以确定元基 因在组间是否有统计学上的差异并且图32图解了产生该方法的示例性示意图。图32描绘了在 具有CLL的完全应答者(CR)，部分应答者(PR)和非应答者(NR)中在激活的T_{EFF}相对于 静息T_{EFF}细胞中上调的基因的示例性热图。

[1868] 不希望受到特定理论的约束，这些数据表明CD19 CART产品(例如CTL019)中T细胞的 分化状态与受试者应答(即CR，PR或NR)相关，并预测B-ALL中对CD19 CART治疗(例如CTL019治疗)的受试者复发。完全的应答者基因特征更像静息的T_{REG}和T_{EFF}细胞。除此之外，复发者的基因特征(例如，对CTL019治疗复发的完全应答者)含有在T_{REG}中相对于静息时的

T_{EFF}细胞上调的基因。不希望受特定理论的束缚，这些数据表明，B-ALL中的CART治疗(例 如CTL019)复发者与CART治疗(例如CTL019)非复发者相比具有更高水平的T_{REG}。图17描 绘了示例性结果，其示出了相对于非复发者，T_{REG}在复发者(R)中差异富集，例如，与完全 应答者(CR)(例如非复发者)相比，复发者表达高水平的T_{REG}基因。

[1869] 表29:预测患者对CTL019治疗复发的示例性基因

[1870]

基因	miRBase	Unigene	检索号	FDR
MIR199A1	MI0000242		NR_029586.1	2.11E-05
PPIAL4D		Hs.730589	NM_001164261.1	3.94E-05
MIR1203	MI0006335		NR_031607.1	4.63E-03
uc021ovp				6.73E-03
ITM2C		Hs.111577	NM_001012514.2 NM_001012516.2 NM_001287240.1 NM_001287241.1 NM_030926.5	1.17E-01
HLA-DQB1		Hs.409934 Hs.534322	NM_001243961.1 NM_001243962.1	1.17E-01

[1871]

基因	miRBase	Unigene	检索号	FDR
			NM_002123.4	
TTTY10		Hs.461175	NR_001542.1	1.25E-01
TXLNG2P		Hs.522863	NR_045128.1 NR_045129.1	2.27E-01
MIR4650-1	MI0017277		NR_039793.1	2.27E-01
KDM5D		Hs.80358	NM_001146705.1 NM_001146706.1 NM_004653.4	2.27E-01
USP9Y		Hs.598540	NM_004654.3	2.27E-01
PRKY		Hs.584730	NR_028062.1	2.27E-01
RPS4Y2		Hs.367761	NM_001039567.2	2.27E-01
RPS4Y1		Hs.282376	NM_001008.3	2.27E-01
NCRNA00185		Hs.138453 Hs.729534 Hs.734681	NR_001543.3 NR_125733.1 NR_125734.1 NR_125735.1 NR_125736.1 NR_125737.1	2.28E-01
SULT1E1		Hs.479898	NM_005420.2	2.33E-01
EIF1AY		Hs.461178	NM_001278612.1 NM_004681.3	2.38E-01

[1872] 以下基因在复发者中显示出升高的水平和在非复发者中降低的水平:MIR199A1，MIR1203，uc021ovp，ITM2C和HLA-DQB1。以下基因在非复发者中显示出降低的水平和在非复发者中升高的水平:PPIAL4D，TTTY10，TXLNG2P，MIR4650-1，KDM5D，USP9Y，PRKY， RPS4Y2，RPS4Y1，NCRNA00185，SULT1E1和EIF1AY。

[1873] 基因集分析产生了预测B-ALL中CTL019治疗的受试者复发的许多基因特征。

[1874] 除此之外，本实施例描述了基于基因集分析的新基因特征，其可预测在B-ALL中CD19 CART治疗(例如CTL019)的患者复发。对三个基因集进行基因集分析，即基因集来自(1) 另外的实验基于Szabo等人(以下描述)未发表的实验；(2)Abbas等人在Genome

Research 2005 发表的基因集;和(3)Gattinoni等人在Nature Medicine 2011发表的基因集。由Szabo,Abbs 和Gattinoni定义的基因集,并且在美国临时专利申请62/061553的实施例1中描述的分析中考 虑。

[1875] Szabo核心基因集包括在Teff细胞(16h v 0h)中上调的以下基因:AIM2,ALAS1,B4GALT5, BATF,C3orf26,C4orf43,CCL3,CCL4,CCT3,CCT7,CD40LG,CHAC2,CSF2,CTNNA1,EBNA1BP2,EDARADD,EEF1E1,EIF2B3,EIF2S1,FABP5,FAM40B,FKBP4,FOSL1,GFOD1, GLRX2,HSPD1,HSPE1,IFNG,IL15RA,IL21,IL2RA,IL3,KCNK5,KIAA0020,LARP4,LRP8, LTA,MANF,MIR1182,MIR155,MIR155HG,MTCH2,MYOF,NDUFAF1,NLN,NME1, NME1-NME2,OTUD7B,PAM,PDIA6,PEA15,PFKM,PGAM1,PGAM4,PPIL1,PRDX4, PRSS23,PSMD1,PSMD11,PSMD14,PTRH2,PUS7,RBBP8,RPF2,RPP25,SFXN1,SLC27A2, SLC39A14,SLC43A3,SORD,SPR,SRXN1,STIP1,STT3A,TBX21,TMCC2,TMEM165, TNFRSF9,TXN,TXNDC5,UCK2,VDR,WDR12,YWHAG,和ZDHHC16。Szabo核心基因集 还包括在Treg细胞(16hv 0h)中上调的以下基因:AIM2,ALAS1,BATF,C5orf32,CCL17, CD40LG,CHAC2,CSF1,CTSL1,EBNA1BP2,EDARADD,EMP1,EPAS1,FABP5,FAM40B, FKBP4,FOSL1,GCLM,GK,GPR56,HMOX1,HSPD1,HSPE1,IKBIP,IL10,IL13,IL15RA,IL1RN,IL2RA,IL3,IL4,IL5,IL9,KCNK5,LTA,MANF,MIR1182,MIR155,MIR155HG, MYOF,NDUFAF1,NLN,NME1,NME1-NME2,PANX2,PDIA6,PGAM4,PPIL1,PPPDE2, PRDX4,PRKAR1B,PSMD1,PSMD11,PUS7,RBBP8,SLC27A2,SLC39A14,SLC43A3, SRXN1,STIP1,STT3A,TBX21,TNFRSF11A,TNFRSF1B,TNFRSF8,TNFRSF9,TXN,UCK2, VDR,VTRNA1-3,WDR12,YWHAG,ZDHHC16,和ZNF282。

[1876] 评估各基因集(例如Szabo基因集,Abbas基因集和Gattinoni基因集),以下述方式确定 其与受试者应答(即,复发者或非复发者)的关联:计算每个受试者的元基因,其中受试者j 的元基因得分定义为

[1877] $$m_j = \sum_{i=G}^{1} {x_{ij} - \mu(x_j)} \Big/ {\sigma(x_j)}$$

[1878] 其中x_{ij}为对于给定基因集n＝1,..,G;,受试者j中基因i的表达值。μ($x_{.j}$)是受试者j中基 因1,…,G的平均值;并且σ($x_{.j}$)是受试者j中基因1,…,G的标准差。

[1879] 将两组统计模型应用于每个基因集,以确定元基因在所制备的复发者和非复发者的 CTL019产物之间是否在统计学上是不同的。说明该方法的示意图在图16中给出。在Szabo, Abbas和Gattinoni基因集中,存在一个在复发者和非复发者之间显著差异富集的基因集。该基 因集来自Szabo系列,并含有T_{REG}相对于T_{EFF}细胞在静息期间上调的基因,并与对CTL019治疗 复发的患者相关。具体来说,该基因集被发现在复发者中富集,表明复发者与非复发者相比 具有更高水平的T_{REGS}。例如,与T_{EFF}细胞相比,由T_{REG}上调的基因组成的基因集的元基因得 分与产品样品中的患者复发相关(参见图17)。图17描绘了阐明与非复发者,完全应答者(CR) 相比,T_{REG}基因在复发者(R)中具有高表达水平的示例性结果(p＝0.000215)。x轴是应答 组的样本,其中CR＝完全应答者,R＝复发者。y轴是归一化的元基因表达得分。

[1880] 不希望受特定理论的束缚,这些数据表明,在单采血液成分术前或在制造CART产品期 间减少患者的T_{REG}特征显著降低了患者复发的风险。

[1881] 实施例13:插入突变是对B细胞急性淋巴样白血病(B-ALL)中CTL019治疗的抗性机

制

[1882] 通过比较在基线和复发后取得的B-ALL患者样品的mRNA测序数据，发现了几种抗性机 制。某些抗性机制被称为“CD19-复发”，即患者的肿瘤细胞被表征为CD19-，因为它们不结合 CTL019中使用的FMC63表位，如通过流式细胞术测量的。已经发现了几种抗性机理，并在本 实施例中详细描述。

[1883] 进行mRNA测序(RNAseq)以比较CTL019治疗前和复发后B-ALL患者的转录谱。三名患者被考虑:一名患者(患者#29)，其复发时为CD19-，另外两名患者(患者#104和#105) 在复发时为CD19+。有关患者的列表，其分类和两个时间点的白血病百分比，请参见下表30。

[1884] 表30

[1885]

样品	复发类型	BM中白血病%,基线	BM中白血病%,复发
患者#29	CD19-	N/A	N/A
患者#104	CD19+	33%	98.5%
患者 #105	CD19+	46% 前-CART	65%

[1886] 对CD19基因的RNAseq数据的分析显示出几个值得注意的观察结果。

[1887] 在CD19的外显子2中发现三次插入。插入仅在患者#29的复发样本中发现。在其他两名 患者中，并且在患者#29的基线时，没有观察到支持任何三种插入或CD19外显子2中任何其 他插入的读数。基因组位置和实际插入列于下表31。

[1888] 表31.

[1889]

插入	位置	野生型	插入的序列
1	28943706	C	C→CA
2	28943707	A	A→AT
3	28943811	T	T→TTTGG

[1890] 三个插入的长度分别为1,1和4个碱基长度，并且可能是所有移码插入。所有三个插入导 致外显子2中的过早终止密码子(对于插入1和2，新的终止密码子发生在ch16:28943752和插 入3在ch16:28943887)。下面的表32列出了支持插入和野生型以及相关百分比的读数。最普 遍的插入是“插入3”，其为4碱基插入并发生∽30％。此外，在跨越多于一个插入的15个配对 读数中，配对读数中没有一个包含多于一个插入，表明插入是互斥的。

[1891] 表32.

[1892]

样品	Ins1(Ins,wt)	Ins2(Ins,wt)	Ins3(Ins,wt)
29B	0,62	0,62	0,50
29R	21,308	4,327	67,151
104B	0,69	0,69	0,79
104R	0,392	0,398	0,413
105B	0,42	0,42	0,63
105R	0,184	0,185	0,212

[1893] 在表中,“样品”列出了患者编号,接着是“B”表示基线样本,或“R”表示复发时取的样。标记为Ins1的列表示显示Ins1(左数)与该位置的野生型序列(右数)的读数数目;标记为Ins2 的列表示显示Ins2(左数)与该位置的野生型序列(右数)的读数数目;并且标记的Ins3表示 显示Ins3(左数)与该位置的野生型序列(右数)的读数数目。该表显示只有患者29显示这3 次插入,并且仅在复发时才观察到插入。这些结果表明CD19的外显子2中的插入导致一些患 者中的抗性。

[1894] 该工作确定了B-ALL中CTL019治疗的抗性机制,即CD19的外显子2中的插入,肿瘤细胞 通过该插入变成CD19-并且对CTL019治疗具有抗性。该观察结果支持CTL019与针对CD19以 外的靶,例如CD20,CD22和ROR1的CAR的组合策略。

[1895] 实施例14:复发性ALL癌症患者中B细胞抗原的表达

[1896] 在以前用CAR疗法以外的癌症疗法治疗,即未用任何CAR疗法治疗的复发性急性淋巴性 白血病(ALL)癌症患者中确定的各种B细胞抗原的表达。

[1897] 方法

[1898] 获得样品作为未鉴定的原发人ALL骨髓(BM)和外周血(PB)样本。抗人抗体购自Abcam, Biolegend,Invitrogen,eBioscience或Becton Dickinson。通过Ficoll分离分离单核细胞,在补充 有2%胎牛血清的PBS中洗涤一次,并在室温下染色15分钟。对于细胞数量定量,根据制造商 的说明书使用Countbright(Invitrogen)珠。在所有分析中,感兴趣的群体基于正向和侧向散 射特征门控,然后进行单峰门控,并使用Live Dead Aqua (Invitrogen)门控活的细胞。时间门 控被纳入质量控制。对于动物研究,加入鼠抗CD45抗体(Biolegend)以筛选出鼠白细胞。通 过用克隆HIB22(Biolegend)的抗CD22单克隆抗体染色检测CD22的表面表达。通过用来自克 隆6H6(ebioscience)的抗CD123单克隆抗体染色检测CD123的表面表达。通过用来自克隆 IM2234U(Beckman Coulter)的抗FLT3单克隆抗体染色检测FLT3的表面表达。通过用来自克 隆2H6(Abcam)的抗ROR1单克隆抗体染色检测ROR1的表面表达。通过用来自克隆CB3-1 (Biolegend)的抗CD79b单克隆抗体染色检测CD79b的表面表达。通过用来自克隆HM47(R &D Systems)的抗CD79a单克隆抗体染色检测CD79a的表面表达。通过用来自克隆 eBioCV-CALLA(ebioscience)的抗CD10单克隆抗体染色来检测CD10的表面表达。通过用克 来自隆561的抗CD34单克隆抗体(Biolegend)染色来检测CD34的表面表达。通过用来自克隆 L27(BD Biosciences)的抗CD20单克隆抗体染色来检测CD20的表面表达。根据标准程序 (http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf),使用QuantumTM SimplyCellular® (Bangs Lab.,Inc)进行抗体结合能力(ABC)单位中的细胞抗原表达的定量。在四激光 Fortessa-LSR细胞仪(Becton-Dickinson)上进行流式细胞术,并用FlowJo X 10.0.7r2(Tree Star) 进行分析。

[1899] 结果

[1900] 在复发的ALL患者中,表达了几种B细胞抗原,包括CD19,CD22,CD123,FLT-3,CD10和CD34。参见图22。

[1901] 为了鉴定潜在的额外的B细胞急性淋巴性白血病(B-ALL)靶标,通过多参数流式细胞术 筛选来自16r/r患者的样品的以下标记:CD19(16pts),CD22(16pts),CD123(16pts),FLT-3(9 pts),ROR-1(3pts),CD79b(15pts),CD179b(8pts),CD79a(16pts),CD10(16pts),CD34(16 pts),和CD20(16pts)。CD22和CD123在r/r ALL患者的母细胞中高水平(>60%)并

均匀表 达(条线表示中位数%表达,分别为99.50%,98.80%,95.70%,72.00%,47.00%,15.00%,13.45%, 4.200%,98.00%,87.65%,和7.00%)。(图22)。

[1902] 实施例15:B细胞抗原在复发性CD19阴性癌症患者中的表达

[1903] 在先前用CD19 CAR治疗并且具有CD19阴性肿瘤复发的患者中测定了多种B细胞抗原的 表达。根据实施例14的方法使用流式细胞术,使用图23所示的门控策略以确定抗原的表达。

[1904] 在CART19治疗之前(基线)和之后(CD19阴性复发),从6例复发CD19阴性白血病的患者的BM和PB样本中分析CD22和CD123的表达。在所有分析中,感兴趣的群体基于正向和侧向散射特征进行门控,然后进行单峰门控,并使用Live Dead Aqua(Invitrogen)门控活细胞。 时间门控被纳入质量控制。门控策略包括:时间门控→SSC低→单峰→活的→CD45dim →CD10+。

[1905] 结果

[1906] 几乎所有成为CD19阴性的患者仍然是CD22阳性和CD-123阳性的。参见图24和图25。结 果总结在图26中,并证明虽然CD19 CART治疗导致CD19表达的损失(如通过流式细胞术测 量),CD22和CD123表达仍然很高。

[1907] 实施例16:在难治性B细胞恶性肿瘤中用自体CD22重定向的CART细胞进行扩展获取治疗

[1908] 复发/难治(r/r)B细胞急性淋巴细胞性白血病(ALL)与儿科和成人患者的预后差相关。靶向白血病母细胞上CD19的新疗法,如抗CD19嵌合抗原受体T细胞(CART19,CTL019)或 双特异性抗CD19/CD3抗体(blinatumomab)在该群体中诱导显著的应答。然而,在CART19或blinatumomab治疗后5-10%的患者中报道了CD19阴性复发。

[1909] 方法

[1910] 细胞系和原代样品

[1911] 将ALL细胞系NALM-6的细胞用补充有10%胎牛血清,青霉素和链霉素的RPMI培养基保 持培养。对于一些实验,用萤光素酶/GFP+转导NALM-6细胞,然后分选以获得>99%的阳性 群体。急性骨髓性白血病细胞系MOLM-14或K562和T-ALL细胞系JURKAT被用作CD22阴性 对照。

[1912] 获得了在CART-19治疗后复发的两名患者的未确定的原代人ALL骨髓(BM)和外周血 (PB)样本和BM和PB样品。在基线(IR82,CART19治疗前)和复发(IR243)时收集用CART-19治疗且具有CD19阴性白血病复发的患者的全部母细胞。来自这两个时间点的原代母细胞在NSG小鼠体内扩增,并在几次传代后用萤光素酶/GFP转导(Barrett,D et al.(2011)Blood 118(15):e112-117)。对于所有功能研究,ALL细胞在分析前至少解冻12小时,并在37℃下静置。

[1913] CAR构建体和CAR T细胞的产生

[1914] 使用美国专利申请号2011/0020344A1中描述的抗CD22单链可变片段轻(L)和重(H) 链序列产生针对CD22的嵌合抗原受体(CAR),所述专利申请描述了抗-CD22全人单克隆抗体m971的产生(Xiao,X et al.(2009)MAbs.1(3):297-303)。序列被密码子优化,并且使用两 个不同的可变链取向(H至L和L至H)产生两种不同的CAR构建体。然后将这两种抗CD22 scFv 克隆到鼠CAR19骨架(CD8铰链,41BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域)中,随后在

pTRPE慢病毒载体中克隆。如前所述产生鼠CAR19(Milone,M et al.(2009)Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 17(8):1453-1464)。

[1915] 如前所述(Gill,S et al.(2014)Blood 123(15):2343-2354)进行CAR阳性T细胞的产生。正常 供体CD4阳性和CD8阳性T细胞以1e6/ml的浓度接种,CD4:CD8比为1:1,并在X-vivo 15培养基 (Lonza,04-418Q),人血清AB 5%(Gemini,100-512),青霉素/链霉素(Gibco,15070063) 和Glutamax(Gibco,35050061)中扩增,使用在培养第1天加入的抗CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies,11161D)并在第6天除去。T细胞用携带CAR22,CAR19或在第2天转染的模拟 物的慢病毒转导。将T细胞在培养物中扩增10-15天,当中值细胞体积低于300fl时收获。然后 将T细胞在FBS 10%DMSO中冷冻保存以用于将来的实验。在所有实验之前,将T细胞解冻并 在37℃下静置过夜

[1916] 多参数流式细胞术分析

[1917] 抗人抗体购自Biolegend,eBioscience或Becton Dickinson。从体外培养物或动物中分离细 胞,在补充有2%胎牛血清的PBS中洗涤一次,并在室温下染色15分钟。对于细胞数量定 量,根据制造商的说明书使用Countbright(Invitrogen)珠。在所有分析中,感兴趣的人群基 于正向和侧向散射特征门控,然后进行单峰门控,并使用Live Dead Aqua(Invitrogen)门控活 细胞。时间门控被纳入质量控制。对于动物研究,加入鼠抗CD45抗体(Biolegend)以筛选出 鼠白细胞。用CD22-His蛋白(11958-H08H-50)和抗-Ig-APC单克隆抗体(IC050A)染色检测 抗CD22 CAR的表面表达。如前所述检测CAR19(Kalos,M et al.(2011)Science translational medicine 3(95):95ra73)。根据标准程序(http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf),使 用QuantumTM SimplyCellular®(Bangs Lab.,Inc)在NALM-6和对照上进行抗体结合能力 (ABC)单位中CD19和CD22细胞抗原表达的定量。在四激光Fortessa-LSR细胞仪 (Becton-Dickinson)上进行流式细胞术,并用FlowJo X 10.0.7r2(Tree Star)进行分析。

[1918] 脱粒测定

[1919] 如前所述进行脱粒测定。T细胞与靶细胞以1:5的比例在T细胞培养基中一起温育。加入抗 CD107a-PECY7(Biolengend),抗CD28(BD Biosciences),抗CD49d(BD Biosciences)抗 体和莫能菌素(BD Biosciences),开始时间后共培养30分钟。4小时后,收获细胞并染色CAR 表达,CD3,CD8和Live Dead aqua染色(Invitrogen)。将细胞固定并透化(Invitrogen Fix/Perm 缓冲液),然后进行细胞内染色以检测多种细胞因子(IFN,TNFa,IL-2,GM-CSF,MIP1b)。

[1920] 增殖测定

[1921] 洗涤T细胞并以$1x10^7$/ml重悬于100μl PBS中,并在37℃下用100μl CFSE 2.5μM(Invitrogen)染色5分钟。然后将反应用冷培养基淬灭,并将细胞洗涤三次。以100Gy的剂量照射靶标。T细胞与照射的靶细胞以1:1的比例温育120小时,在24小时时加入培养基。然后收 集细胞,染色CD3,CAR和Live Dead aqua(Invitrogen),并加入Countbright珠(Invitrogen) 后进行流式细胞术分析进行绝对定量。

[1922] 细胞毒性测定

[1923] 萤光素酶/GFP+NALM-6细胞或原代ALL样品用于如前所述的细胞毒性测定。4靶标

以指 示的比例与效应T细胞一起培养4或16小时。通过在Xenogen IVIS-200Spectrum相机上的生物 发光成像或通过流式细胞术计算杀伤。对于后者,收获细胞,并在分析前加入Countbright珠 和7-AAD(Invitrogen)。残留活靶细胞为CFSE阳性7-AAD阴性。

[1924] 细胞因子测量

[1925] 将效应细胞和靶细胞以1:1的比例在T细胞培养基中共温育24小时。收集上清液并根据制 造商的方案(Invitrogen)(Kalos,M et al.(2011)),通过30路Luminex阵列(Luminex Corp, FLEXMAP 3D)进行分析。

[1926] 体内实验

[1927] 得到NOD-SCID-γ链-/-(NSG)小鼠。所有实验均经宾夕法尼亚大学机构动物护理和使 用委员会(IACUC)批准的方案进行。在结果部分详细讨论了所使用的异种移植模型的模式。 将细胞(NALM-6或T细胞)以200μl的PBS中指定的浓度注射到小鼠的尾静脉。使用Xenogen IVIS-200Spectrum相机进行生物发光成像,并使用LivingImage软件v.4.3.1(Caliper LifeSciences).进行分析。动物在实验结束时或需要时根据IACUC政策被安乐死。

[1928] 免疫组织化学

[1929] 进行28种人正常组织(脂肪,肾上腺,阑尾,小脑,子宫颈,结肠,子宫内膜,食道,脂肪,心脏,肾脏,肝脏,淋巴结,肺,肌肉,卵巢,胰腺,甲状旁腺,胎盘,前列腺,唾 液腺,脊髓,脾,胃,睾丸,胸腺,甲状腺,扁桃体)的组织微阵列(TMA),以评估CD22 (一式三份)的肿瘤外(off-tumor)表达。使用Bond Polymer Refine Detection System在Leica Bond-III仪器上进行福尔马林固定石蜡包埋组织的免疫组织化学(IHC)染色。未稀释使用抗 CD22抗体(克隆FPC1;Leica PA0249)。用ER2溶液(Leica Microsystems AR9640)进行热诱 导的表位提取20分钟。使用Aperio ScanScopeTM数字获取图像。

[1930] 基因表达谱

[1931] 使用BioGPS.org网站分析可公开获取的RNA表达数据库(GeneAtlas U133A,gc)的CD22 表达。报道了75种不同的人正常细胞类型和7种肿瘤细胞系的中值CD22 RNA表达(参见图 39)。

[1932] 51-铬释放测定

[1933] 为了评估可能的肿瘤外CART22毒性,使用作为靶标的正常人组织(CD34+,人神经元, 人神经元祖细胞,角质形成细胞)和K562或NALM-6作为对照进行铬释放测定。靶细胞与51Cr 50μCi/0.5e6细胞在37℃下温育1-2小时。洗涤细胞并以不同的E:T比率与效应细胞一式三份铺 板。温育4小时后,将来自每个孔的等分试样置于读数板中并干燥过夜。第二天,使用1450 Microbeta Plus液体闪烁计数器定量铬释放。

[1934] 结果

[1935] 表33:供体和对CART22评估进行的各项实验的总结。

[1936]

供体	扩增	Degran.+i.c. 细胞因子	Prolif.+Lumine x	杀伤	体内	毒性筛选
1	✓	✓ X2	✓ X2	✓ X2	✓	
2	✓	✓				
3	✓				✓	✓
4	✓					
5	✓				✓	

[1937] 为了鉴定潜在的B-ALL靶标,通过多参数流式细胞术筛选来自16位r/r患者和4名患有 CD19阴性疾病的CART19治疗后复发患者的样品的B细胞标记物CD22。CD22在11/15r/r ALL 患者的母细胞中高水平(>60%)并均匀表达(图27A)。CD22在CD19阴性白血病复发的4/4 例患者中在CART19治疗前(基线)和治疗后(CD19-阴性复发)(显示2pts)均为阳性(图27B)。(门控策略:SSC低→单峰→活的→CD45dim)。

[1938] 使用不同链方向(H至L和L至H)生成的CAR22构建体的方案如图28A所示。抗CD22 scFv (m971)经密码子优化并克隆在含有CD8铰链,41-BB共刺激和CD3ζ信号传导结构域的鼠 CAR19载体中。NALM6 ALL细胞系上CD19,CD22和同种型对照的表达显示为平均荧光强度(MFI)(图28B)和抗体结合能力(ABC)(图28C)。本文提出的结果表明,在NALM-6 细胞中,CD19的表达高于CD22。然而,在大多数原代ALL样品中,CD19和CD22表达是相似 的(参见图28A)。

[1939] 进行用于产生CART22和CART19(连同未转导细胞(UTD))的正常供体T细胞扩增。相对于培养天数测量群体倍增时间和T细胞体积。在扩增结束时(培养第11天),CART22和对照T细胞达到约4.5群体倍增(PD),与CART19或UTD细胞相比没有显著性差异(图29A)。 在培养的第6天,峰值体积约为450fl,而在随后的天数中,当收获细胞并冷冻时,体积下降至300fl(图29B)。观察到与CART19或UTD无显著差异。通过流式细胞术在扩增的第11天观察到在CD4阳性和CD8阳性T细胞上的CAR表达(图29C)。CAR表达的门控是基于UTD。(门 控策略:FSS vs SSC淋巴细胞→单峰→活的→CD3+)。

[1940] 用细胞质内细胞因子产生进行CD107a脱粒测定。CART19,CART22HtoL和LtoH与不同 的靶标(单独的,PMA/IONOMYCIN,MOLM-14和NALM-6)共培养。当与ALL细胞系 (NALM-6)共培养,但不与阴性对照共培养时,CART19和CART22 HtoL显示出高水平的CD107a脱粒,IL-2,IFNg和TNFa产生(图30)。UTD和CART22 LtoH不显示脱粒或细胞因子 产生(图30)。(门控策略:FSS vs SSC淋巴细胞→单峰→活的→CD3+)。

[1941] 在基于萤光素酶的杀伤测定中,共培养24小时时,CART22和CART19 HtoL但不是UTD能 裂解NALM-6细胞(图31)。观察到细胞毒性活性与E:T比例之间的直接相关性,在2:1:E:T 比例下具有更好的抗白血病作用(CART19和CART22为78%和75%的杀伤率)。

[1942] 在基于CFSE的增殖测定中,CART22和CART19与ALL细胞系NALM-6共培养5天导致显著的T细胞增殖(分别为94%和92.9%)。还显示了对照(TCM=仅培养基,P-I=PMA/离子 霉素,MOLM-14)(图32A)。显示CART19和CART22中CFSE稀释动力学的直方图表明大 多数T细胞经历多次增殖循环(图32B)。(门控策略:FSS vs SSC淋巴细胞→单峰→活的 →CD3+)。

[1943] 将CART22,CART19和UTD细胞与不同的照射靶(单独的,PMA/离子霉素,MOLM-14 和NALM-6)温育24小时。当与ALL细胞系NALM-6共培养时,仅CART22和CART19HtoL能 够释放多

种细胞因子(这里显示了IFNg,IL-2,GM-CSF,TNFa和MIP1b)(图33)。

[1944] 当患者CD19阴性疾病复发时,CART22,CART19和UTD细胞与在基线时和CART19治疗后来自ALL患者(CHP-959-101)的母细胞共温育4小时。测量脱粒。CART19和CART22都能 够在基线时脱粒(当母细胞为CD19+和CD22+时),但是在复发时,仅CART22脱粒(当疾病 为CD19阴性时)(图34A)。在与复发时CHP101样品温育后,测量CD8阳性和CD8阴性CART19 和CART22效应物中的CD107a脱粒。只有CART22在CD8和CD4 T细胞中显示脱粒(图34B)。(门控策略:FSS vs SSC淋巴细胞→单峰→活的→CD3+)。

[1945] 针对NALM-6的体内CART22效力如下评估:1ml NALM-6萤光素酶+细胞/小鼠静脉内注射 在NSG小鼠中。6天后,通过生物发光评估肿瘤植入。然后使小鼠随机接受未转导的T细胞或 不同剂量的CART22(1.25百万至5百万总细胞/小鼠,具有75%CAR表达)。然后监测小鼠的 肿瘤负荷,PB T细胞扩增和存活(图35A)。通过生物发光(BLI)测量肿瘤负荷,观察剂量 相关的抗白血病应答。接受5e6 CART22细胞的小鼠显示更好的肿瘤控制(图35B)。与UTD治疗的小鼠相比,CART22治疗的小鼠显示出统计学上显著更好的总体存活(OS)。对于OS 也存在较高剂量的CART22和更好的OS之间显著的相关性(图35C)。每周通过眶后取血监测 T细胞体内扩增。T细胞输注后一周,接受较高剂量CART22的小鼠显示出更好的CART扩增(中位数为12T细胞/μl)(图35D)。

[1946] 针对NALM-6的CART22和CART19之间的体内比较如下进行评价:将1百万NALM-6萤光素酶+细胞/小鼠静脉内注射在NSG小鼠中。6天后,通过生物发光评估肿瘤植入。然后将小鼠随机分配以接受未转导的T细胞,CART19或CART22(500万总细胞,75%CAR表达)。然 后监测小鼠的肿瘤负荷,PB T细胞扩增和存活(图36A)。通过生物发光(BLI)测量肿瘤负 荷,并在CART22和CART19治疗的小鼠中观察到抗白血病应答,而UTD小鼠快速进展(图 36B)。与CART22相比,CART19治疗的小鼠显示出更好的总生存期(OS),这可能是由于 NALM-6(CD19>>CD22)中不同的靶标表达(图36C)。

[1947] CART22和CART19在原发ALL的模型中进行体内比较。原发性ALL患者(JH331)的母细胞在体内传代并用萤光素酶转导以追踪肿瘤负担。在NSG小鼠中体内注射1百万JH331萤光 素酶+细胞/小鼠。14天后,通过生物发光评估肿瘤植入。然后将小鼠随机分配以接受未转导 的T细胞,CART19或CART22(500万总细胞,75%CAR表达)。然后监测小鼠的肿瘤负荷,PB T细胞扩增和存活(图37A)。通过生物发光(BLI)测量肿瘤负担,并观察到CART22和CART19治疗的小鼠中的抗白血病应答,而用UTD细胞治疗的小鼠快速进展(图37B)。

[1948] 通过免疫组织化学染色,对28个人正常组织进行CD22表达的组织微阵列。淋巴器官对 CD22表达(扁桃体,淋巴结,脾和胸腺)呈阳性(图38A)。所有非淋巴器官均未显示出CD22 的表达(图38B)。在多个组织中观察到CD22阳性驻留B细胞(图38C)。

[1949] 在B细胞,扁桃体和淋巴结中高水平观察到CD22 RNA表达,如GeneAtlas U133A的表达 数据所示。B淋巴母细胞和白血病/淋巴瘤细胞系也是高度阳性的(图39)。

[1950] CART22和CART19但不是UTD细胞在CART22毒性的51-铬释放测定中触发ALL细胞系NALM-6的裂解(图40)。在任何正常组织(CD34+,人神经元祖细胞或神经元和角质形成 细胞)或对照(K562细胞系)中均未观察到CART22的细胞毒性作用。

[1951] 实施例17:抗CD123和抗CD19 CAR T细胞的组合用于治疗和预防抗原丧失复发

[1952] 化疗难治性或复发性(r/r)B细胞急性淋巴性白血病(B-ALL)与预后不良相关,但

如最 近所证实的,对免疫系统仍然非常敏感。特别地,抗CD19嵌合抗原受体T细胞(CART19,CTL019)和双特异性抗CD19/CD3抗体(blinatumomab)在该患者群体中产生45-90%的前所未有的完全应答率。两种方法重新引导自体T细胞识别表达CD19的细胞。Blinatumomab使用将抗CD19单链可变片段(scFv)与抗CD3 scFv组合的双特异性构建体的连续长期输注;在CART19的情况下,T细胞被遗传修饰以表达抗CD19 scFv,该抗CD19 scFv与用内含共刺激结构域传导信号的T细胞受体融合。最近的一项研究表明,90%的用CTL019治疗的r/r B-ALL患 者达到完全缓解(CR),在6个月时总生存期(OS)为78%。在具有其他B细胞瘤如慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤的患者中用CART19也获得了的鼓舞人心的结果。

[1953] 然而,用CART19或blinatumomab治疗的患者的一部分发生复发,并且这些复发的重要 部分的特征在于CD19的丧失。在B-ALL中,在CART19或blinatumomab治疗后10-20%的患者中报道了CD19阴性复发,并没有在其他治疗方案中进行描述;blinatumomab后总共约有 30%的复发和在CART19之后高达50%的复发是CD19阴性的。CD19是从B细胞发育到成熟B细胞的最早阶段表达的原型B细胞标记物。CD19在B细胞生物学中起重要作用,因为CD19缺陷型B细胞表现出选择性生长缺陷。因此,CD19的缺失在B-ALL中是非常不寻常 的发现,并且在有效的CD19导向的免疫疗法时代之前,仅在罕见的患者进行报道。目前正 在研究抗原丧失的可能机制,其最有可能是由这些强大的抗CD19剂对白血病亚克隆的选择 性压力引起的。由于blinatumomab最近得到了FDA的批准和CTL019的突破状态,所以可 能有增加数目的r/r B-ALL患者将用这些活性剂治疗。因此,需要新颖的有效策略,以便能 够治疗那些在CART19或blinatumomab后会具有CD19阴性母细胞的复发患者。理想情况下, 一种新方法不仅可以治疗患有主动抗原丢失复发的患者,但是如果预先使用可能会预防其发生。

[1954] 白细胞介素-3受体α(或CD123)参与造血并已显示在几种血液肿瘤中表达,包括急性 骨髓性白血病(AML),急性淋巴性白血病(ALL),浆细胞样树突状细胞肿瘤,毛细胞白 血病,和霍奇金淋巴瘤。与谱系相关的表面抗原如CD33(骨髓)或CD19(B淋巴样)不同, CD123在造血祖细胞上分级表达,而在AML中CD123在白血病干细胞上表达,白血病干细 胞参与在初次治疗后对化疗的抗性和复发。由于这些特征,CD123对靶向疗法产生了极大的 兴趣,正在开发多种活性剂,如IL3-白喉毒素融合蛋白(SL-401,DT388IL3),裸抗CD123 单克隆抗体(CSL-360,CSL-362),抗体-药物缀合物,双特异性抗体或CD3Fv-IL3融合构 建体,以及最近的抗CD123嵌合抗原受体T细胞。其中一些方法目前正在临床试验中得到验 证,并且将在未来几年内在临床中进一步测试。靶向具有嵌合抗原受体T细胞(CART123) 的CD123可导致人类原代AML异种移植物的深层和长期应答,并可建立抗白血病T细胞记 忆。这里,CD123在CD19导向治疗后发生的CD19阴性B-ALL复发中表达,并且与CART19 (CTL019)组合的CAR-123T细胞是治疗和预防B-ALL异种移植物中抗原丢失复发的有效 疗法。

[1955] 材料和方法

[1956] 细胞系和原代样品。细胞系最初获自ATCC(Manassas,VA)(K-562)或DSMZ(德 国不伦瑞克)(MOLM-14和NALM-6)。测试所有细胞系是否存在支原体污染(MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit,LT07-318,Lonza,Basel,Switzerland)。对于一些实验,用萤火虫萤 光素酶/eGFP转导细胞系,然后分选以获得>99%的阳性群体。萤光素酶阳性K-562细胞系 也用截短的CD19或截短的CD123转导以获得不表达它们,仅表达CD19或仅CD123的

细胞 系。如相关图所示,使用MOLM-14和K562作为对照。使用补充有10%胎牛血清(FBS,Gemini,100-106,West Sacramento,CA)和50UI/ml青霉素/链霉素(Gibco,LifeTechnologies, 15070-063)的RPMI培养基1640(Gibco,11875-085,LifeTechnologies,Grand Island,NY) 将细胞系维持在培养物中。根据机构评估委员会(IRB)协议从宾夕法尼亚大学/费城儿童医 院的临床实践中获得了去鉴定的原代人ALL骨髓(BM)和外周血(PB)样本,购自宾夕法 尼亚大学的干细胞和异种移植中心或目前CTL019临床试验的研究样品(宾夕法尼亚大学的 翻译和相关研究实验室)。对于所有功能研究,将原代细胞在实验前至少12小时解冻并在 37℃下静置。

[1957] 原代B-ALL母细胞的体内扩增。D.M.Barrett,A.E.Seif,C.Carpenito,D.T.Teachey,J.D. Fish,C.H.June,S.A.Grupp,G.S.Reid,Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia:a strategy for preclinical modeling.Blood 118,e112-117(2011)中公 开了方法。

[1958] 荧光原位杂交(FISH)和免疫组织化学。FISH分析和免疫组织化学按照标准方法进行并 且如所述。(M.A.Belaud-Rotureau,M.Parrens,P.Dubus,J.C.Garroste,A.de Mascarel,J.P. Merlio,A comparative analysis of FISH,RT-PCR,PCR,and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas.Modern pathology:an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology,Inc 15,517-525(2002))。FISH分析按照标准方法进行。简 言之,将收获的ALL细胞悬浮在固定剂(乙酸和甲醇)中,沉积在载玻片上,并让其干燥。将双色基因融合探针BCR/ABL(Abbott Molecular)应用于杂交缓冲溶液中。将载玻片盖上 盖玻片,密封,并在37℃在HYBrite室内放置6小时。在去除密封剂和盖玻片之后,将载玻 片洗涤两次,印迹,干燥并用DAPI复染色。在荧光显微镜下检查载玻片,每个样品中评估 最少200个细胞核。

[1959] CAR构建体和CAR T细胞的产生。如前所述产生鼠抗CD19嵌合抗原受体(CD8铰链,4-1BB共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域)。(Milone,et al.,Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 17,1453-1464(2009)and Imai,et al.,Leukemia 18, 676-684(2004))。这是目前在宾夕法尼亚大学CTL019临床试验中使用的相同构建体。对于 CAR123 scFv,使用抗CD123(1172构建体(SEQ ID NO:707,并且如PCT/US2014/017328 中所述))和CAR19的相同骨架构建体。如前所述进行CAR表达T细胞的产生(Gill,et al., Blood 123,2343-2354(2014))。正常供体CD4和CD8 T细胞或PB单核细胞(PBMC)从宾夕 法尼亚大学的人类免疫学中心获得。T细胞以1x10^6/ml,CD4:CD8比为1:1平板接种,并在 补充有人AB血清5%(Gemini,100-512),青霉素/链霉素(Gibco,15070063)和Glutamax(Gibco, 35050061)的X-vivo 15培养基(Lonza,04-418Q)中扩增,在培养的第1天加入抗CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies,11161D),在第6天取出。在第2天用慢病毒转导T细胞。在培养物中扩增T细胞8-15天,当中值细胞体积低于300fl时收获。然后将T细胞用10% DMSO冷冻保存在FBS中,以备将来实验。在所有实验前,将T细胞解冻并在37℃下静置 过夜。

[1960] 多参数流式细胞术。如前所述进行流式细胞术(Kenderian,et al.,Leukemia,(2015))。抗人 抗体购自Biolegend,eBioscience或Becton Dickinson。从体外培养物或动物中分离细胞,在 补充有2%胎牛血清的PBS中洗涤一次,并在室温下染色15分钟。对于细

胞数量定量,根据 制造商的说明书使用Countbright(Invitrogen)珠。在所有分析中,感兴趣的群体基于正向和 侧向散射特征门控,然后进行单峰门控,并且使用Live Dead Fixable Aqua(Invitrogen)门控 活细胞。时间门控被纳入质量控制。使用抗独特型抗体,如前所述检测CAR19的表面表达。使用山羊抗小鼠抗体(Jackson Laboratories)或CD123-Fc/His(Sino Biologicals)和抗His-APC (R&D)或PE(AbCam)进行CAR123的检测。在四激光Fortessa-LSR II细胞仪 (Becton-Dickinson)上进行流式细胞术,并用FlowJo X 10.0.7r2(Tree Star)进行分析。

[1961] 体外T细胞效应子功能测定。如前所述进行脱粒,CFSE增殖,细胞毒性测定和细胞因 子测量。(Gill,et al.,Blood 123,2343-2354(2014)和Kalos,et al.,Science translational medicine 3,95ra73(2011))。

[1962] 脱粒测定。简言之,T细胞与靶细胞以1:5的比例在T细胞培养基中温育。将抗CD107a-PECY7(Biolegend),抗CD28(BD Biosciences),抗CD49d(BD Biosciences)抗 体和莫能菌素(BD Biosciences)加入到共培养物中。4小时后,收获细胞并染色CAR表达, 进行CD3,CD8和Live Dead aqua染色(Invitrogen)。将细胞固定并透化(Invitrogen Fix/Perm缓冲液),然后进行细胞内染色以检测多种细胞因子(IFN,TNFα,IL-2,GM-CSF,MIP1β)。

[1963] 增殖测定。将T细胞洗涤并以$1x10^7$/ml重悬于100ul PBS中,并在37℃下用100μl CFSE 2.5μM(Invitrogen)染色5分钟。然后用冷培养基淬灭反应,并将细胞洗涤三次。以100Gy 的剂量照射靶标。T细胞以1:1的比例与照射的靶细胞温育120小时,在24小时时加入培养 基。然后收集细胞,染色CD3,CAR和Live Dead aqua(Invitrogen),并在加入Countbright 珠(Invitrogen)后进行流式细胞术分析用于绝对定量。

[1964] 细胞毒性测定。萤光素酶/eGFP+细胞系用于细胞毒性测定,如前所述。简言之,将靶标 以指示的比例与效应T细胞一起温育24小时。在Xenogen IVIS-200Spectrum相机上通过生 物发光成像计算杀伤。

[1965] 细胞因子测量。效应细胞和靶细胞在T细胞培养基中以1:1的比例共温育24小时。收获 上清液并根据制造商的方案(Invitrogen)通过30-plex Luminex阵列(Luminex Corp,FLEXMAP 3D)进行分析。

[1966] 动物实验。如前所述进行体内实验。(Kenderian,et al.,Leukemia,(2015))。所用异种移植 模型的方案在相关图,结果中详细讨论。最初从Jackson Laboratories获得的NOD-SCID-γ链-/- (NSG)购自宾夕法尼亚大学的干细胞和异种移植中心。所有实验均根据Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)批准的方案(#803230)进行,其按照NIH“实验动物护理和 使用指南”(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)。将细胞(白血病细胞系 或T细胞)以200μl的PBS中指定的浓度注射到小鼠的尾静脉。使用Xenogen IVIS-200 Spectrum相机进行生物发光成像,并使用LivingImage软件v.4.3.1(Caliper LifeSciences)进行 分析。动物在实验结束时或者根据IACUC方案符合预先指定的终点时被安乐死。

[1967] 多光子显微术。麻醉小鼠并保持在37℃的核心温度。去除头皮并固定头骨后,对骨髓成 像。使用配备有皮秒激光(Coherent)的Leica SP5双光子显微镜系统(Leica Microsystems) 进行成像。每次成像采集持续20分钟,然后评估小鼠镇静。使用850nm的激光激发CellTrace Violet,GFP和CellTrace Orange(或TRITC)。使用20倍的水浸透镜获得

图像。所得图像用 Volocity软件(PerkinElmer)进行分析。

[1968] 统计分析。所有统计数据都是使用GraphPad Prism 6for Windows 6.04版(La Jolla,CA) 进行的。斯氏t检验用于比较两组;在比较多组的分析中,使用Holm-Sida校正进行多重比较 的单因素方差分析(ANOVA)。当在多个时间点/比例比较多个组时,使用每个时间点/比例 的斯氏t检验或ANOVA。使用对数秩检验比较存活曲线。在图中,星号用于表示p值(*＝<0.05, **＝<0.01,***＝<0.001,****＝<0.0001),“ns”表示“不显著”(p>0.05)。每个实验的统计数据 的更多细节列在图例中。

[1969] 结果

[1970] CD123在B-ALL,白血病干细胞和CD19阴性复发中表达

[1971] 为了评估CD123在B细胞急性淋巴细胞性白血病中的表达,分析了来自成人和儿科ALL 患者的42份样品,其中包括参加了我们目前的CTL019临床试验的14名受试者。如图49A, 49B和49A所示,CD123在大多数ALL母细胞的表面上高水平并且均匀地表达,代表了靶向疗法的理想候选者。此外,还发现CD123在推定的白血病干细胞(LSC)中表达,鉴定为CD34+CD38-(图49C)。在一些B-ALL患者中可以鉴定CD19阴性母细胞的小亚组,如果 它们含有具有恶性表型的细胞,则这些细胞可能有助于抗原损失复发。为了评估CD19阴性 亚组中疾病的存在,对来自Philadelphia染色体阳性B-ALL大量群体的CD19-CD123+细胞进 行分选(CD45dim,门控策略如图56B所示)。发现这些细胞对于BCR-ABL易位是克隆的, 尽管频率低于CD19+母细胞(图49D)。这一发现表明,单独靶向CD19在一些情况下可能 导致从CD19-CD123+细胞衍生的亚克隆复发。此外,这一发现表明靶向CD123可以通过消 除LSC和可能的CD19阴性白血病克隆导致更深的应答。

[1972] 最后也在CTL019后复发的具有CD19丢失的B-ALL患者的样品中评估CD123的表达。重要的是,与完全丢失CD19相反,大多数患者在复发时保持CD123表达(图49E,49F和 56C)。这些研究结果表明,CD123代表着靶向CART19或blinatumomab后发生的CD19阴 性ALL细胞的理想标记物。

[1973] 抗CD123嵌合抗原受体T细胞在体外和体内对人B-ALL具有活性

[1974] 产生抗CD123嵌合抗原受体T细胞(CART123),其被慢病毒转导并用抗CD3/CD28 磁珠扩增。如本文所述评估CART123对B急性成淋巴细胞白血病的体外和体内活性。

[1975] 使用为CD19++和CD123+的B-ALL细胞系NALM-6(图50A和57A)和原代B-ALL样 品。当T细胞与NALM-6或原代ALL共同培养时,CART123和CART19之间的头对头体外 比较揭示了CD107a的脱粒的相似速率(图50B)。CART123还能以剂量依赖的方式杀死 NALM-6细胞,具有与CART19相似的功效(图50C)。在更长期的实验中,当与NALM-6 或原代ALL共同培养3-5天时,CART123增殖(图50D和50E)并产生多种细胞因子(图 50F)。这些结果表明CART123对多个B-ALL靶标显示与CART-19相当的效力。

[1976] 为了在体内模型中确认这些数据,使用了原代ALL模型。在该模型中,从B-ALL患者获得的原代母细胞在NOD-SCID-γ链敲除(NSG)小鼠中传代,并用含有eGFP和扣甲萤光 素酶(GFP/Luc)的报道构建体转导。NSG小鼠静脉内注射GFP/Luc+原代ALL母细胞(JH331, CD19+,CD123+,添加表型),并且在移植后,将小鼠随机分配以接受CART19,CART123 或对照未转导的T细胞(UTD)。用对照T细胞治疗的小鼠由于疾病快速死亡,而用CART19 或CART123治疗的小鼠显示肿瘤根除和长期存活(图51A和51B)。与对照T细胞相比, CAR123 T细胞在

小鼠的外周血(PB)中显著扩增,并表达高水平的CAR123(图51C)。CART123的抗白血病活性是特异性的,并且基于在使用CD123-CD19+白血病(AV576)移 植小鼠时,在母细胞表面中CD123的识别,只有CART19显示抗白血病活性,而CART123 与对照UTD相比没有效果(图57B和57C)。

[1977] 为了检测CART123剂量与抗肿瘤活性的可能相关性,开发了携带高白血病负担小鼠(使 用NALM-6细胞系)的体内模型。在该模型中,标准剂量的CART123(2百万CAR+细胞)不能清除肿瘤。这些小鼠注射不同剂量的CART123(1.25,2和500万CAR+细胞),并观察 剂量相关的抗白血病活性(图57D)。

[1978] CART123但不是CART19在抗原丢失复发的新型临床前模型中具有高度活性

[1979] 为了测试靶向CD19阴性复发的新策略,开发了抗原丢失复发的新型体内模型。在基线 时(CTL019治疗前)(此时疾病为CD19++和CD123+),以及CTL019后复发(此时患者 发生了CD19阴性疾病)时,收集了从登记在我们的CTL019临床试验中的一名患者(CHP101) 获得的B细胞母细胞(CD123仍然表达,图58A)。然后将母细胞在NSG小鼠中扩增,并 对于基线疾病(CD19+)用扣甲绿色萤光素酶(CBG)转导或对于复发(CD19-)用扣甲红 色萤光素酶(CBR)转导(见方法部分)。重要的是,在体内扩增期间,母细胞保留除CD19 之外的B细胞身份的标志物(数据未显示)。在第一个实验中,NSG小鼠用基线疾病CD19+ (CBG,绿色)或CD19阴性(CBR,红色)白血病移植。两组随机接受CART19或对照T 细胞(UTD)(图52A)。如图52B所示,在两组中,用UTD治疗的小鼠显示基线和复发 疾病的快速进展(独立地通过CD19的表达)。相反,在用CART19治疗的小鼠组中,只有 用基线疾病(CD19阳性)移植的小鼠对CART19治疗应答,而用复发性疾病(CD19阴性) 移植的小鼠显示出预期的不应性。这也在体外在CD107a脱粒测定中再现(图58B)。为了 模拟体内表达CD19的不同克隆的存在或不存在,NSG小鼠用基线和复发疾病的1:1混合物 植入;在第8天,将小鼠随机分配以接受CART19或对照T细胞。用生物发光成像监测肿瘤负 担,所述生物发光成像可以区分CD19+(CBG,绿色)/CD19-(CBR,红色)白血病体内相 对生长。如图52C所示,在接受UTD的小鼠中,在第6天存在的CD19+(绿色)和CD19- (红色)白血病在第11天类似地增加,而在用CART19治疗的小鼠中,基线疾病(绿色) 被完全清除,而复发性疾病(红色)显示出进展。

[1980] 原发CD19阴性B-ALL和CART19失败的该独特异种移植模型用于评估CART123在抗原丢失复发的治疗中的作用。将原代CD19阴性母细胞(CBR阳性)注射入NSG小鼠(图 52D),并将小鼠随机化以接受CART19,CART123或对照T细胞。CART19和对照T细胞 显示完全缺乏抗肿瘤活性,而CART123导致完全根除疾病和这些小鼠中长期存活(图52E 和52F)。事实上,在CART19难治性原发B-ALL的临床前模型中,新型CART123能够根 除疾病并赋予长期存活。

[1981] 为了在单个细胞水平上理解CART19和CART123在该体内模型中的不同行为,通过注 射差异标记的CART19(CellTrace Violet,blue)和CART123(CellTracker Orange或TRITC,红 色)给携带CD19阳性原发性母细胞(GFP)或CD19阴性复发性母细胞(GFP)的小鼠,并 在注射后约24小时使用颅骨髓的活体双光子显微术追踪其行为(实验方案,图53A),来进 行一系列实验。这些研究表明,CART19和CART123被运输到含有白血病的骨髓空间,并且同源抗原的CART细胞识别与运动停滞相关。具体来说,在用基线CD19+CD123+白血病移 植的小鼠中,发现62.9%+/-3.8的CART19和81.1%+/-1.2的CART123停滞于与母细胞相邻 的圆形形态,而在复发的CD19-CD123+白血病移植的小鼠中,只有CART123细胞与肿瘤细 胞相

邻(CART123 80.9%±5.1对CART19 12.4%±2.2)(图53B和53C)。这些发现表明，在CD19阴性复发的ALL中，只有CART123能够与白血病细胞(GFP)建立生产性突触，从而降低其能动力，而CART19细胞在环境中持续取样和移动而不识别白血病母细胞。

[1982] CART123和CART19的组合能够防止CD19阴性复发

[1983] CART123被证明是在CAB19抗性的临床前模型中CD19导向疗法后发生的CD19阴性复发的治疗中有效的。然而，组合方法可以治疗活跃CD19阳性疾病，同时预防抗原丢失复发。为了测试这一假设，通过将原代CD19-和CD19+疾病一起注射入NSG小鼠来建模具有CD19阴性逃逸潜力的B-ALL的新出现的临床问题。然后将小鼠随机分配，以相同的T细胞 总剂量接受对照T细胞(UTD)，CART19或CART19和CART123的组合(图54A)。如 图54B所示，用对照T细胞治疗的小鼠具有两种白血病克隆的进展，CART19显示主要是CD19 阴性疾病(红色)的快速进展。相反，用CART123和CART19组合治疗的小鼠显示出疾病 的清除和改善的总生存期，如图54C所示。在实验结束时处死的小鼠的分析显示在合并的 CART细胞组中没有残留白血病的证据。相比之下，CART19单一疗法后具有进行性疾病的 小鼠保留了预期的CD19阴性表型。

[1984] 最后，用2种慢病毒转导T细胞，一种携带CAR19和另一种携带CAR123，以开发能够被CD19和/或CD123激活的CART。如图55A所示，检测到四种不同转导的T细胞亚组:CAR19 和CAR123双阴性，CAR19单阳性，CAR123单阳性和双阳性CAR19/CAR123 T细胞。对这 4个亚组进行分类，并对K562-WT，K562 CD19+或K562 CD123+进行了功能和特异性检测。图55B显示CD107a脱粒测定的结果，其中单个阳性亚组应答其特异性靶标，而在表达CD19 和CD123的K562存在下，仅双重阳性群体能够脱粒。此外，与相当数量的单刺激的CART 细胞相比，双刺激的CART细胞对双阳性靶标表现出更强的细胞毒性，表明通过使用由两种 不同抗原触发的CAR的功效的潜在增加。

[1985] 讨论

[1986] CD19导向的免疫疗法正在改变复发和难治性急性成淋巴细胞白血病治疗的范例。患有以 前不幸的结果的患者现在具有实现完全应答和长期疾病缓解的现实潜力。然而，如在某些情 况下所示，对于用其他形式的有效靶向疗法治疗的白血病，白血病细胞能够发展导致耐药性 和复发的抗原丢失突变。在CART19的情况下，已经观察到两种主要的复发模式。由于持续 性失败而早期丢失CART19的患者具有原始克隆复发的风险；确实，最小的残留疾病分析表 明，可能需要1-6个月的持续CART活性来完全消除恶性肿瘤。相比之下，尽管CART19持 续性也有约50%的复发，其特征是发生CD19阴性白血病。后一种观察结果表明CART19具 有强大的选择性压力。值得注意的是，在blinatumomab疗法之后，也发生CD19阴性复发， 尽管这些代表了该有争议的较不有效的疗法后少数的复发事件。CD19阴性疾病的发展有多种 潜在的机制。其中之一是CD19阴性克隆的选择和相对生存优势，其以非常低的频率在基线 存在，并且这最初被认为是导致CD19阴性复发的最可能的因素。最近其他机制，如CD19 的剪接失调也被认为是重要的。在这里，首次显示B-ALL中罕见的CD19-ve母细胞可以包含 在更常见的CD19阳性白血病母细胞中发现的特征性细胞遗传学异常，证实这是CD19阴性 复发的潜在机制。我们通过阐明CD123+CD19-ve母细胞能够在免疫缺陷小鼠中植入证实了这 些发现，表明CD123可能是B-ALL中白血病干细胞的标记物，如同在AML中一样。

[1987] 这项研究的目的是定义新的策略来治疗CD19导向疗法后抗原丢失复发的患者。CD123 在大多数B-ALL中高表达,特别是CD123在CD19阴性疾病复发的患者中保持表达。已经 证明在CD19-CD123+群体中存在克隆性白血病细胞,这表明靶向CD123与CART19组合可增加根除亚克隆的可能性,所述亚克隆由于CART19压力下的选择性优势而可以增殖。CD123先前已被证实为AML中白血病干细胞的标志物。这表明CD123在ALL中在免疫表型限定的 白血病干细胞(LSC)中表达,提高了靶向LSC上CD123可以促进ALL根除的可能性。

[1988] 为了研究CART123在抗原丢失复发中的作用,从宾夕法尼亚大学/费城儿童医院的一项 CTL019试验中登记的B-ALL患者(CHP101)的原代母细胞开发出CD19阴性复发的新型异 种移植模型。该患者在基线时具有典型的CD19+CD123+表型,但随后用CART19治疗后复发CD19-CD123+疾病。使用该模型,证明CART123可以根除复发的疾病,并结合CART19 可以预防抗原丢失复发。这是在临床相关的患者衍生模型中首次阐明双CART组合。此外, 通过使用活体成像,显示CART细胞在静脉内注射后不到24小时内进入骨髓,搜索其靶标, 并减缓以便与同源抗原携带细胞相互作用。此外,表明双重信号CART123/19比单独的CART 或两个CAR的池更有效,与先前发表的结果一致。

[1989] 以前,已经显示抗CD123嵌合抗原受体用于治疗急性骨髓性白血病的临床前疗效。CART123由于识别造血干细胞和祖细胞上的CD123而引起造血毒性,这是临床转换的潜在的主要挑战,因为严重的干细胞毒性可能导致永久性的重度骨髓抑制。假设为了尽量减少造 血毒性,一种仅在CD19和CD123同时共同接合时才激活T细胞的新型构建体可以消除这种 造血毒性。这里发现接受来自CD19识别的激活信号和来自CD123识别的刺激信号的CART细胞可以杀死B-ALL细胞,并且避免我们先前描述的深刻的造血毒性。虽然这个概念以前是使用CD19/PSMA识别的人造系统出版的,但这种临床相关的构建体代表了该领域的重大进步,具有相对明确的临床转换途径。值得注意的是,虽然这种双重CAR设计可能与毒性降低有关,但通过使CAR识别更多而不是较少地受限,可能解决不了抗原丢失复发的问题。然而,如果CD123的靶向成功地消除了ALL干细胞,那么这种方法既安全又有效。

[1990] 总之,这里展示的是通过靶向CD123来治疗B-ALL的新颖有效的策略。这种方法是特 别有吸引力的,因为CD123在一些B-ALL患者中罕见CD19阴性恶性细胞中表达,并且保留在CD19定向免疫治疗后发生的抗原丢失复发中。此外,CART19与CART123的组合可以 防止CD19阴性复发的发生。

[1991] 实施例18:低剂量RAD001在细胞培养模型中刺激CART增殖

[1992] 通过在不同浓度的RAD001存在下将CART表达细胞与靶细胞共培养来评价低剂量RAD001对体外CAR T细胞增殖的影响。

[1993] 材料和方法

[1994] CAR转导的T细胞的产生

[1995] 使用人源化的抗人CD19 CAR(huCART19)慢病毒转移载体来产生包装成VSVg假型包装 的慢病毒颗粒的基因组材料。人源化抗人CD19 CAR(huCART19)的氨基酸和核苷酸序列是在 2014年3月15日提交的PCT公开WO2014/153270中描述的CAR 1,ID 104875,并且在其中命名 为SEQ ID NOs.85和31。

[1996] 将慢病毒转移载体DNA与三种包装组分VSVg env,gag/pol和rev与lipofectamine试剂 的组合混合以转染Lenti-X 293T细胞。在24h和30h后更换培养基,之后收集含病毒的

培养 基,过滤并在-80℃下保存。CART通过转导新鲜或冷冻的幼稚T细胞产生,所述T细胞通过 对健康供体血液或leukopak的负磁选择而获得。通过与抗-CD3/抗-CD28珠温育24小时来活 化T细胞,之后将病毒上清液或浓缩的病毒(分别为MOI＝2或10)加入到培养物中。使修饰 的T细胞扩增约10天。通过在第7天和第9天之间的流式细胞术分析来测定转导的细胞的百 分比(在细胞表面上表达CAR)和CAR表达水平(相对荧光强度,Geo Mean)。减慢生长速率和 T细胞大小接近～350fL的组合决定了待被冷冻保存用于以后分析的T细胞的状态。

[1997] 评估CART的增殖

[1998] 为了评价CART的功能,将T细胞解冻并计数,并通过Cellometer评估存活力。使用非 转导T细胞(UTD)归一化每种培养物中的CAR阳性细胞的数量。在以50nM开始的RAD001滴定中测试RAD001对CART的影响。在所有共培养实验中使用的靶细胞系是 NALM6(Nalm-6),其是表达CD19并转导以表达萤光素酶的人前B细胞急性淋巴性白血病 (ALL)细胞系。

[1999] 为了测量CART的增殖,用靶细胞以1:1的比例培养T细胞。测定进行4天,此时细胞对CD3,CD4,CD8和CAR表达进行染色。通过流式细胞术,使用计数珠作为参考评估T 细胞的数量。

[2000] 结果

[2001] 在4天共培养测定中测试CART细胞的增殖能力。在用NALM6(Nalm-6)培养CAR-转导和非转导的T细胞后,评估CAR-阳性CD3-阳性T细胞(深色条形)和总CD3-阳性T细胞(浅色条形)的数量(图59)。当在小于0.016nM的RAD001存在下培养时,huCART19细胞扩增, 在较高浓度的化合物下扩增程度较小。重要的是,在0.0032和0.016nM RAD001下,增殖高 于在不添加RAD001的情况下观察到的增殖。非转导的T细胞(UTD)没有显示可检测的扩增。

[2002] 实施例19:低剂量RAD001在体内刺激CART扩增

[2003] 该实施例评价了huCAR19细胞在体内用不同浓度的RAD001增殖的能力。

[2004] 材料和方法:

[2005] NALM6-luc细胞:从患有复发性ALL的患者的外周血开发NALM6人类急性淋巴细胞白 血病(ALL)细胞系。然后用萤火虫萤光素酶标记细胞。这些悬浮细胞在补充有10％热灭活的 胎牛血清的RPMI中生长。

[2006] 小鼠:从Jackson Laboratory(货号005557)接收6周龄的NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tmlWjl}/SzJ)小鼠。

[2007] 肿瘤移植:使NALM6-luc细胞在补充有10％热灭活的胎牛血清的RPMI中在体外生长和 扩增。然后将细胞转移到15ml锥形管中,并用冷的无菌PBS洗涤两次。然后计数NALM6-luc 细胞,并以10x10^{6}个细胞/毫升PBS的浓度重悬。将细胞置于冰上并立即(在1小时内)植入 小鼠中。通过尾静脉以100微升体积静脉内注射NALM6-luc细胞,每只小鼠总共1x10^{6}个细 胞。

[2008] CAR T细胞给药:在肿瘤植入后7天给小鼠施用5x10^{6}CAR T细胞。将细胞在37℃水浴 中部分解冻,然后通过向含有细胞的管中加入1ml冷的无菌PBS完全解冻。将解冻的细胞转 移至15ml falcon管中,并用PBS调整至最终体积为10ml。将细胞以1000rpm洗涤两次,每次10分钟,然后在血细胞计数器上计数。然后将T细胞以50x10^{6}CAR T细胞/ml冷PBS的 浓度重悬,并保持在冰上直到对小鼠给药。通过尾静脉用100μl CAR T细胞静脉内注射小鼠, 每只小鼠5x10^{6}CAR T细胞的剂量。每组8只小鼠用100μl PBS单独(PBS)或人源化CD19 CAR T

细胞处理。

[2009] RAD001给药:配制50mg等于1mg RAD001的浓缩微乳液,然后在给药时重悬于D5W(5% 葡萄糖水溶液)中。每天口服给予小鼠(通过口服管饲)200微升所需剂量的RAD001。

[2010] PK分析:在肿瘤植入后7天开始对小鼠每天给药RAD001。给药组如下:0.3mg/kg,1mg/kg, 3mg/kg和10mg/kg。在RAD001的第一次和最后一次剂量后的第0天和第14天在以下的时 间点对小鼠采血用于PK分析:15分钟,30分钟,1小时,2小时,4小时,8小时,12小时 和24小时。

[2011] 结果:

[2012] 在具有NALM6-luc肿瘤的NSG小鼠中测试RAD001的扩增和药代动力学。每天单独口服给予RAD001对NALM6-luc肿瘤的生长没有影响(图60)。RAD001的药代动力学分析显示 其在荷瘤小鼠的血液中相当稳定(图61A和61B)。在第0天和第14天PK分析显示,在测试 的最低剂量(0.3mg/kg)下,即使在给药后24小时,血液中的RAD001浓度也高于10nm。

[2013] 基于这些剂量,给予huCAR19 CAR T细胞RAD001和不给予RAD001以测定这些细胞的增 殖能力。基于给药后24小时的血液中RAD001的水平,使用的最高剂量为3mg/kg。由于在RAD001的最终剂量后24小时RAD001的浓度高于10nM,在使用CAR T细胞的体内研究中使用 几种较低剂量的RAD001。在开始每日口服RAD001给药之前一天,静脉内给予CAR T细胞。通过FACS监测小鼠的T细胞扩增。

[2014] 最低剂量的RAD001显示CAR T细胞的增强的增殖(图62A和62B)。与$CD8^+$CAR T细胞相 比,使用$CD4^+$CAR T细胞,这种增强的增殖更加明显和延长。然而,对于$CD8^+$CAR T细胞,在CAR T细胞剂量后的早期时间点可以看到增强的增殖。

[2015] 实施例20:某些具有原发性DLBCL的患者显示CD3+/PD1+双重阳性癌细胞

[2016] 尽管最近以嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞和检查点抑制剂的形式在癌症免疫治疗 空间中取得了令人注目的进展,但是未能广泛获得用于探索其组合的治疗机制的先进工具。为了应对这种日益增长的需求,开发了使用多路AQUA(自动定量分析)技术的强大的定量 荧光免疫组织化学平台来评估检查点抑制剂表达,列举CART细胞,并通过新的共定位算法 确定肿瘤细胞和免疫细胞之间的相互作用。这种方法的实用性在临床前和临床模型系统中均 有表征。在B细胞淋巴瘤的免疫缺陷小鼠模型中,评估CAR T细胞归巢于原发性淋巴器官中恶 性B细胞。通过CD4,CD8,PD1和FOXP3表达的多路分析测定了CART细胞的表型和功能状 态。另外,为了实现弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)设置中的组合免疫疗法,通过来自DLBCL 患者(n=63)的主要和次要活检中的细胞质和细胞核染色产生的界标检查了免疫和肿瘤细胞 区室中PD1和PD-L1表达形式的适应性免疫抗性机制的流行程度。为了支持CAR T试验的患者 选择,定量了用传统方法不能重复评分的相关肿瘤抗原的表达和流行,以产生客观的切点。这些用于患者的最佳选择的定量多路IHC方法可用于即将到来的新型联合免疫治疗试验。

[2017] 在原发DLBCL(n=49)和继发DLBCL(15)人类患者中进行DLBCL组织样品的样品制备,成像和成像分析。

[2018] 样品制备。对福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织样品脱蜡。然后将载玻片通过一系 列二甲苯至醇洗涤再水合,然后在蒸馏水中温育。然后使用升高的压力和温度条件进行热诱 导的抗原恢复,使其冷却,并转移到Tris缓冲盐水中。然后进行染色,其中进行以下

步骤。首 先,封闭内源性过氧化物酶,然后用蛋白质封闭溶液温育,以减少非特异性抗体染色。接下 来,将载玻片用小鼠抗PD1一抗染色。然后洗涤载玻片后用抗小鼠HRP二抗温育。洗涤载玻 片,然后使用TSA+Cy®5(Perkin Elmer)检测PD-1染色。然后通过微波去除一级和二级抗体试 剂。在用兔抗CD3一级抗体染色之前,再次洗涤载玻片。洗涤载玻片,然后用抗兔HRP二抗 加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的混合物温育。洗涤载玻片,然后使用TSA-Cy®3(Perkin Elmer)检测CD3染色。在最后一次洗涤载玻片之后,将它们用封固剂盖上盖玻片,允许在室 温下干燥过夜。

[2019] 样品成像和分析。然后使用Vectra 2智能载玻片分析系统使用Vectra软件版本2.0.8(Perkin Elmer)获得荧光图像。首先,使用DAPI进行4x放大率的载玻片的单色成像。使用自动化算 法(使用inForm开发)来识别含有组织的载玻片的区域。

[2020] 将识别为含有组织的载玻片的区域以4倍放大率对与DAPI(蓝色),Cy®3(绿色)和Cy® 5(红色)相关的通道成像以产生RGB图像。在视野选择器中使用自动富集算法(使用InForm 开发)处理这些4x放大图像,以根据最高的Cy®3表达来识别和排列可能的20倍放大视野。

[2021] 前40个视野以20倍放大率在DAPI,Cy®3和Cy®5波长下成像。审查了原始图像的可接受 性,并且焦点外,缺少任何肿瘤细胞,或高度坏死的,或者包含高水平的与预期的抗体定位 (即背景染色)无关的荧光信号的图像在分析之前被拒绝。使用AQUAduct(Perkin Elmer) 处理接受的图像,其中每个荧光团通过光谱非混合器在光谱上不混合到各个通道中并保存为 单独的文件。

[2022] 使用AQUAnalysis™或通过使用AQUAserve™的全自动方法进一步分析处理过的文件。每 个DAPI图像由细胞掩蔽程序处理以识别该图像内的所有细胞核,然后扩大2个像素,以表示 整个细胞的近似大小。该所得掩码代表该图像中的所有细胞。每个Cy®5图像由生物标志物掩 蔽程序处理以产生所有PD-1阳性细胞的二进制掩码。每个Cy®3图像由生物标志物掩蔽程序处 理以产生CD3阳性的所有细胞的二进制掩码。将所有细胞PD-1阳性和CD3阳性的二进制掩码 组合以产生PD-1和CD3双阳性的所有细胞的二进制掩码。使用阳性计算器(positivity calculator),通过将所有PD-1阳性肿瘤细胞的掩码的总面积(以像素测量并由面积评估器确 定)除以所有CD3阳性细胞的掩码的总面积(以像素测量并由面积评估器确定),得到所有 表达PD-1的CD3细胞的生物标志物阳性百分比(PBP)。在原发和继发DLBCL人样品中表达 PD-1的所有CD3阳性细胞的PBP的代表性值显示于图63。CD3和PD-1状态显示CD3+/PD-1+细 胞在原发DLBCL背景中的患病率高于继发DLBCL背景中的患病率,提供了选择患者用于单个 或组合治疗的机会。

[2023] 进行类似的实验,其中使用兔抗PDL1一抗和TSA+Cy5(Perkin Elmer)在来自原发DLBCL 人类患者的DLBCL组织样品上检测PD-L1。还检测了相同样品上的PD1和CD3。实验表明, 肿瘤微环境包含表达PD1,CD3和PDL1的细胞。实验还鉴定了CD3+PD1+的细胞亚群(数据未显示)。这些结果支持肿瘤微环境养育了可以用PD1+或PD-L1+细胞特异性活性剂靶向的免疫抑制细胞的模型。

[2024] 实施例21:包含DLBCL细胞的样品中CD19和PD-L1的相互排斥性表达

[2025] 样品制备。将福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织样品脱蜡。然后将载玻片通过

一系 列二甲苯至乙醇洗涤再水合，然后在蒸馏水中温育。然后使用升高的压力和温度条件进行热 诱导的抗原恢复，使其冷却，并转移到Tris缓冲盐水中。然后进行染色，其中进行以下步骤。 首先，封闭内源性过氧化物酶，然后用蛋白质封闭溶液温育，以减少非特异性抗体染色。接 下来，将载玻片用兔抗PDL1一抗进行染色。然后在与抗兔HRP二抗温育之前洗涤载玻片。洗 涤载玻片，然后使用TSA+Cy®3(Perkin Elmer)检测PDL1染色。然后通过微波去除一级和二 级抗体试剂。在用小鼠抗CD19一抗进行染色之前，再次洗涤载玻片。洗涤载玻片，然后用抗 小鼠HRP二抗加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的混合物温育。洗涤载玻片，然后使用 TSA-Cy®5(Perkin Elmer)检测CD19染色。在最后一次洗涤载玻片之后，将它们用封固剂盖 好盖玻片，然后在室温下干燥过夜。

[2026] 样品成像和分析。然后使用Vectra 2智能载玻片分析系统使用Vectra软件版本2.0.8(Perkin Elmer)获得荧光图像。首先，使用DAPI以4x放大率进行载玻片的单色成像。使用自动化算 法(使用inForm开发)来识别含有组织的载玻片的区域。

[2027] 将识别为含有组织的载玻片的区域以4倍放大率对与DAPI(蓝色)，Cy®3(绿色)和Cy® 5(红色)相关的通道成像以产生RGB图像。在视野选择器中使用自动富集算法(使用InForm 开发)处理这些4x放大图像，以根据最高的Cy®3表达来识别和排列可能的20倍放大视野。

[2028] 前40个视野以20倍放大倍率在DAPI，Cy®3和Cy®5波长下成像。审查了原始图像的可接 受性，并且焦点外，缺少任何肿瘤细胞，或高度坏死的，或者包含高水平的与预期的抗体定 位(即背景染色)无关的荧光信号的图像在分析之前被拒绝。使用AQUAduct(Perkin Elmer) 处理接受的图像，其中每个荧光团通过光谱非混合器(unmixer)在光谱上不混合到各个通道 中并保存为单独的文件。

[2029] 使用AQUAnalysis™或通过使用AQUAserve™的完全自动化方法进一步分析处理过的文 件，如前面的实施例所述。

[2030] 原发和继发DLBCL人样品中所有CD19阳性和PD-L1阳性细胞的PBP的代表性值显示在 图64中。CDBC和PDL1表达在DLBCL样品中变化。CD19和PDL1表达倾向于是相互排斥的，即通常，给定的细胞表达CD19或PD-L1，但不是两者。虽然不希望被理论束缚，但是这可能是因为CD19在DLBCL肿瘤细胞中表达，而PD-L1在非肿瘤细胞，例如支持肿瘤微环境的细胞中表达。该观察结果表明CD19抑制剂(例如CD19 CAR表达细胞)和PD-L1信号传导抑制剂 的组合疗法可用于靶向这两个细胞群。

[2031] 进行类似的实验以例如证明AQUA分析监测CART19功效的能力。该研究监测在含有CART19+Jurkat细胞和CD19+REH细胞的混合细胞系的样品中的CD19，CD3和CART19核 酸。通过抗体检测CD19和CD3蛋白，并使用针对CAR核酸的3'UTR的RNA探针检测 CART19。实验显示，细胞系样品包含表达CD19，CD3和CART19的细胞(数据未显示)。 该实验还显示细胞系样品包含CD3+/CART19+的细胞亚群(数据未显示)。进行接近分析， 其显示CART19细胞在物理上接近CD19+细胞(数据未显示)。这些实验支持CD3+CART19 细胞浸润包含CD19+细胞的肿瘤微环境和CD19和CART19细胞的物理位置转化为CART19 治疗的功效的模型。

[2032] 实施例22:CAR的双顺反子表达

[2033] 在本实施例中，比较两种类型细胞群的功效。在称为“合并的”第一个细胞群中，每

个细 胞表达一个CAR。用CD19 CAR转导第一组细胞，用CD22 CAR或CD123 CAR转导第二组细胞，然后汇集两组细胞。在第二种类型的细胞群中，用表达CD19 CAR和第二CAR的双 顺反子载体转导多个细胞，使得大部分或全部细胞表达两种构建体。第二个CAR在一些实验 中是CD22 CAR，在其他实验中是CD123 CAR。这些细胞群在图65中示出。

[2034] 使用P2A系统产生两种新的构建体，如图66所示，以便使用单个双顺反子慢病毒载体 在相同T细胞中表达两个全长CAR。根据标准方案扩增T细胞，并使用携带CAR19和CAR123的单一慢病毒(多重感染，MOI＝3)转导。在使用所述双顺反子慢病毒载体获得的相同T 细胞群中对CAR19和CAR22进行类似的转导。图67显示CD19和CD22 CAR的共表达。可以认识到基于CAR19和/或CAR123的特异性表达的不同群体，包括双CAR19+/CAR123+ 群体和双阴性群体(图68，上图)。

[2035] 将用双顺反子CD19 CAR和CD123 CAR转导的细胞与表达CD19或CD123 CAR的汇集细胞进行比较(图68，底图)。NSG小鼠用B-ALL细胞系(NALM-6，CBG+)移植。在第 7天，基于肿瘤负荷(BLI，生物发光)随机分配小鼠，以接受对照T细胞(UTD)，CART19， CART123，CART123和CART19或双CART19/123的1:1合并组合(相同总数的CAR+细胞)。 单独的CD19 CAR表达细胞(正方形)和单独的CD123 CAR表达细胞(三角形)与对照(圆 圈)相比显示初始有效性，随后是白血病细胞的上升水平。表达CD19或CD123(菱形)的 合并细胞也显示初始有效性，随后白血病细胞水平升高。相比之下，用双顺反子载体转染的 细胞(倒三角形，“双CART”)在治疗后至少60天保持延长的应答。该实验表明双CART发 挥有效的抗白血病效果，其不仅优于单一CART治疗，而且优于合并的CART细胞。

[2036] 实施例23:CART22在动物模型中对CD19-neg B-ALL有效。

[2037] 在动物模型中测试CD19阴性B-ALL细胞对CD19 CAR表达细胞和CD22 CAR表达细胞的反应性。在第0天将100万CD19阴性B-ALL细胞输注入小鼠，第7天输注2e6 CAR+T 细胞(随机化后)。通过生物发光测量肿瘤负担。如图69所示，尽管癌症在阴性对照小鼠 和CART19治疗的小鼠中进展，但是CART22能够清除NSG异种移植物中的CD19阴性ALL。

[2038] 测定如下进行:将1e6 CD19-neg ALL细胞(CBG+)注射入NSG小鼠。在第5天，将小鼠随机接受2e6对照未转导的T细胞(UTD)，CART19或CART22(m971 scFv)。随后跟 踪小鼠肿瘤负荷(生物发光)。

[2039] 实施例24:低水平的免疫检查点分子与改善的结果相关联

[2040] 通过免疫组织化学检测淋巴瘤患者样品中的免疫检查点分子(PD-L1，PD1，LAG3和TIM3)。还进行阳性和阴性对照组织和细胞系。使用定量图像分析在可以包括肿瘤细胞和非肿瘤细胞如免疫细胞的感兴趣区域上进行免疫检查点表达分析。从组织，淋巴结或骨髓取样。

[2041] 在用CD19靶向CAR疗法治疗后，在完全应答者(CR)和进行性疾病(PD)患者中比 较了免疫检查点蛋白质表达。如图70所示，治疗前后CR患者倾向于具有低水平的PD-L1， PD1，LAG3和TIM3，而PD患者在治疗前后倾向于具有高水平的这些分子。本实施例支持 与CAR表达细胞和免疫检查点抑制剂的组合疗法，并支持测试以确定接受CAR疗法的患者 中免疫检查点分子水平。

[2042] 实施例25:CD22 CAR表达细胞的功能测定

[2043] 在NFAT测定中功能验证了几种CD22 CAR构建体。简单地说，实验如下进行。携带编

码具有CD22结合scFv结构域的CD22 CAR的核酸的慢病毒载体(pELPS)通过电穿孔引入 经修饰以表达处于NFAT应答元件(JNL)的控制下的萤光素酶的Jurkat T细胞系。培养细胞 并允许表达CAR构建体。将电穿孔细胞应用于用靶抗原(CD22)包被的平板上。包被平板 中萤光素酶信号的检测表明CD22 CAR与其抗原的结合活性,导致T细胞的活化和萤光素酶 的表达。

[2044] 图71是显示在存在和不存在m971 scFv竞争剂的情况下几种CD22 CAR构建体的活化 (以RLU)的图。这些结果表明CD22-53和CD22-12以及其他scFv的一个子集大约结合抗原以及m971阳性对照。结果还表明,不同的scFvs在不同程度上与m971竞争。

[2045] 测试了16个另外的人CD22结合结构域,并发现其具有弱结合活性(数据未显示),因 此未进一步进行。

[2046] 图72是显示几种CD22 CAR表达JNL细胞(包括CD22-57,CD22-58,CD22-59,CD22-60, CD22-61,CD22-62和CD22-63)的活化(以RLU)的图,其中提供了scFv序列。使用三种 不同的靶蛋白(CD22-FL-Fc,CD22-D567-Fc,和CD22-D67)包被组织培养板;还包括阴性对照(Fc)。间皮素结合CAR(Meso-G07)用作阴性对照。CD22-12和CD22-53用作阳性对照。 实验表明,该测定中所有CARs(CD22-57,CD22-58,CD22-59,CD22-60,CD22-61,CD22-62, 和CD22-63)均有功能。此外,这些结果表明测试的CAR(包括CD22-12和-53)结合CD22 的结构域6和7。在CD22结合结构域上进行结构域作图。使用三种不同形式的抗原:具有所 有7个外部结构域的CD22全长,结构域567(其中缺失结构域1-4)和结构域67(其中缺失 结构域1-5)。尽管不希望受理论束缚,但似乎各种CD22克隆的结合映射到图75所示的表 位。

[2047] 还测试了CD22 CAR构建体促进IFN-γ和IL-2分泌的能力。简单地说,来自表达不同 CD22 CAR的健康供体的转导的原代T细胞与CD22阳性靶细胞Raji-Luc和Daudi-Luc以及阴性对照K562-Luc共培养。T细胞和靶细胞以10比1的效应细胞-靶细胞比例(E:T)培养。 在20小时共培养后收获上清液。图73显示了以pg/mL表示的IFN-γ产生的三个条形图。与Raji-Luc(上图)和Daudi-luc(中图)细胞系的共培养通过hCD22-12,hCD22-53 CAR T细 胞以及两个阳性对照CAR19和m971-HL诱导IFN-γ分泌。值得注意的是,当测试hCD22-53 细胞时,观察到最高量,而在测试hCD22-12细胞时,观察到的量较小。当测试Nalm6-Luc,Pfeiffer-Luc,和K562-CD22-Luc和SEM-Luc细胞时,观察到相似的结果(数据未显示)。 当测试K562-Luc阴性对照细胞系时,观察到最小的IFN-γ分泌(底部图)。

[2048] CD22-12在细胞杀伤和细胞因子分泌测定中显示与m971相当的活性(实施例9)。命名 为CD22-64和CD22-65的两个scFv通过hCD22-12的亲和力成熟产生。如上所述,在NFAT测定中测试含有这些scFv的CAR构建体的活性。如图74所示,CD22-64和CD22-65都结合CD22或者比CD22-12和CD22-53更好的结合,导致JNL活化。图中的条形从左至右表示 CD22全长-Fc;CD22 D567-Fc;和用于包被平板的仅Fc阴性对照。测试CD22-12的四种变体 表明,LCDR3和HCDR3在一定程度上促进结合(数据未显示),并且HCDR3可能比LCDR3 容忍更多的突变。

[2049] 等同方案

[2050] 本文引用的每篇专利,专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。虽然已经 参考具体方面公开了本发明,但是显然本领域技术人员可以设计出本发明的其它方面和变型, 而不脱离本发明的真实精神和范围。所附权利要求旨在被解释为包括所有这些方面和等同变 化。

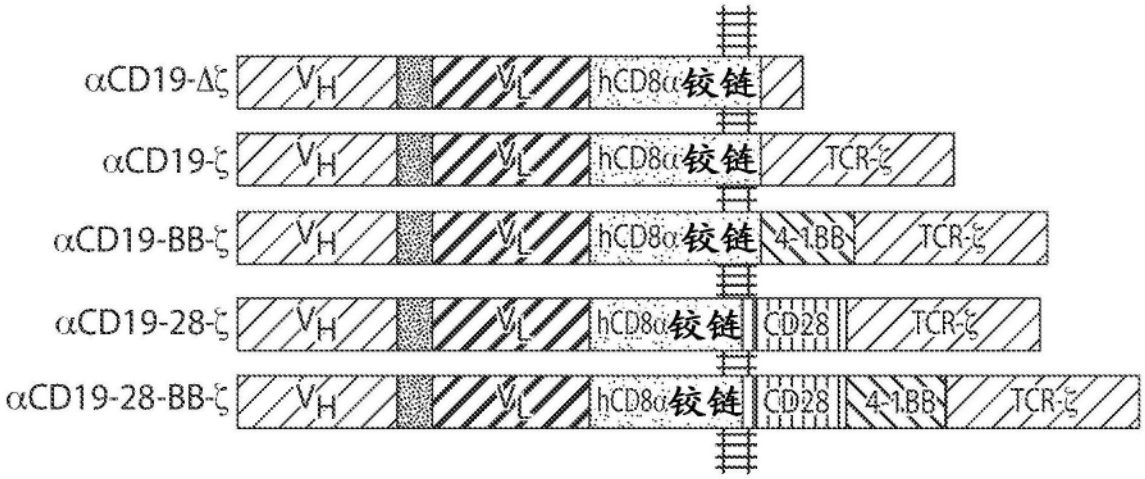

αCD19-Δζ
αCD19-ζ
αCD19-BB-ζ
αCD19-28-ζ
αCD19-28-BB-ζ
VH
VL
hCD8α铰链
4-1BB
CD28
TCR-ζ

图1A

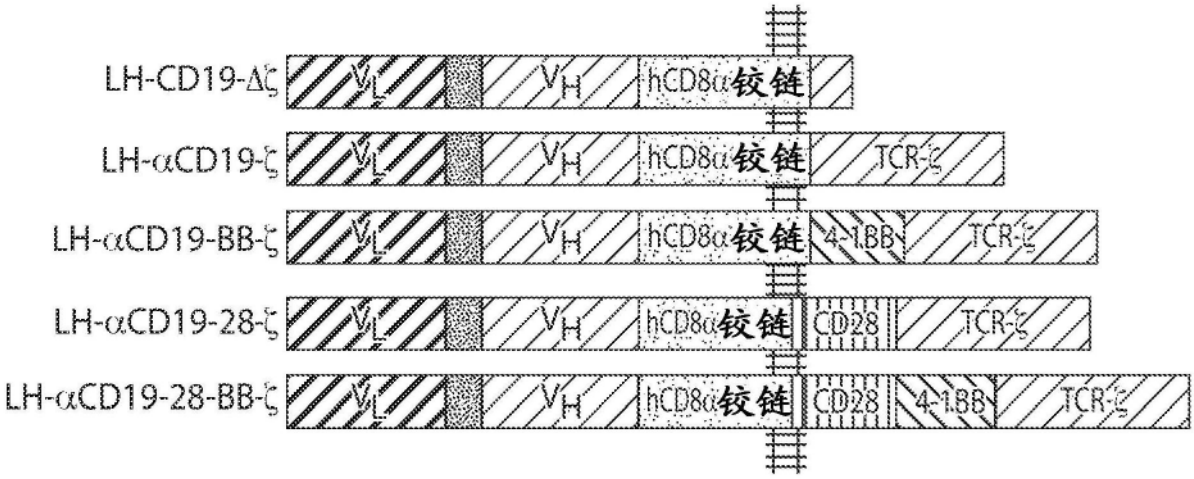

LH-CD19-Δζ
LH-αCD19-ζ
LH-αCD19-BB-ζ
LH-αCD19-28-ζ
LH-αCD19-28-BB-ζ
VL
VH
hCD8α铰链
4-1BB
CD28
TCR-ζ

图1B

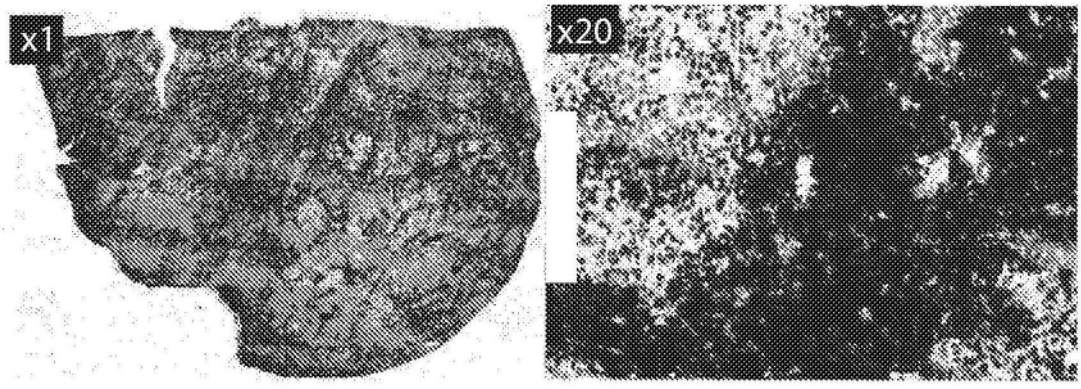

x1
x20

图2

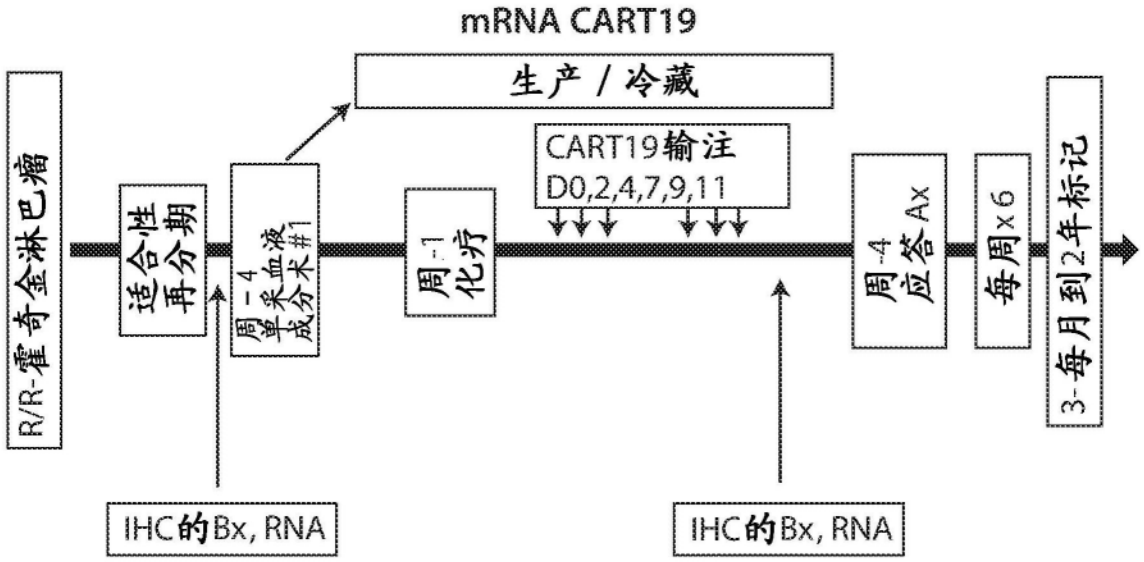

mRNA CART19
生产 / 冷藏
R/R-霍奇金淋巴瘤
适合性再分期
周 -4 单采血液成分术#1
周 -1 化疗
CART19输注 D0,2,4,7,9,11
周 -4 应答Ax
每周x 6
3-每月到2年标记
IHC的Bx, RNA
IHC的Bx, RNA

图3

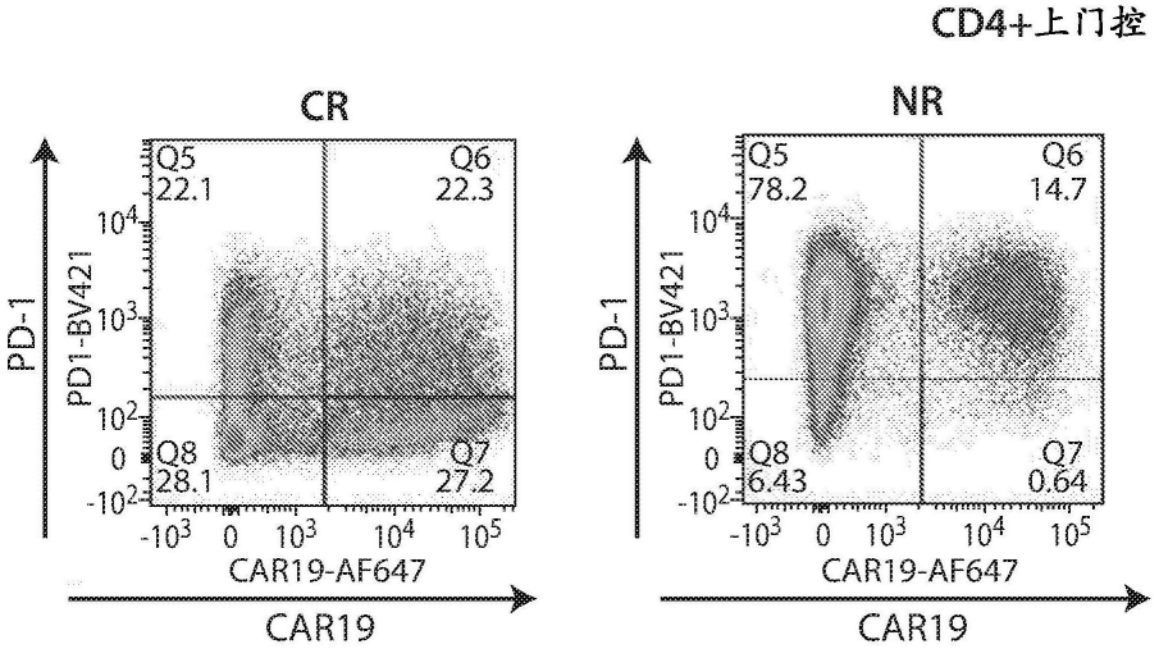

CD4+上门控
CR
NR
PD-1
PD1-BV421
CAR19-AF647
CAR19
Q5 22.1
Q6 22.3
Q8 28.1
Q7 27.2
Q5 78.2
Q6 14.7
Q8 6.43
Q7 0.64

图 4A 图 4B

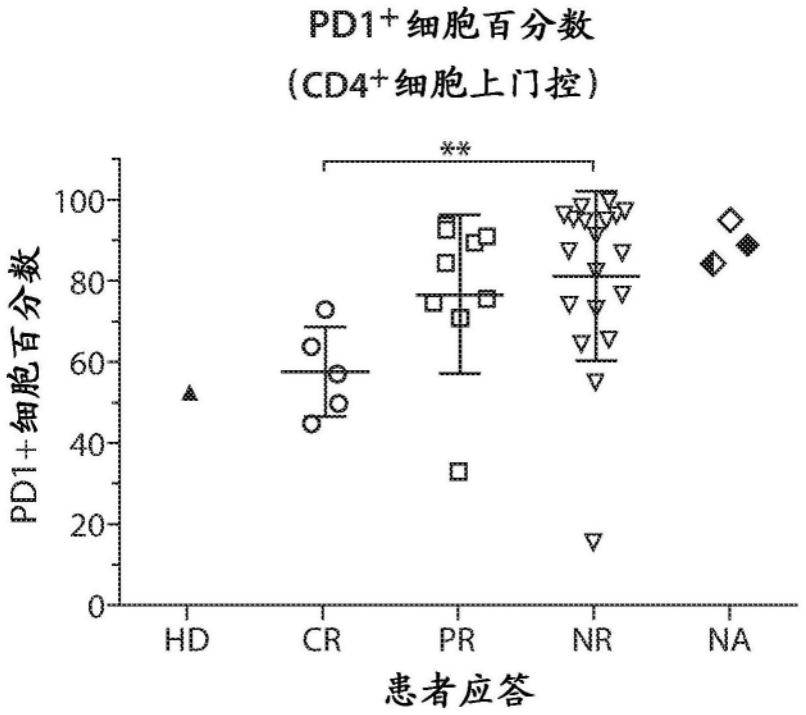

PD1+细胞百分数
(CD4+细胞上门控)
**
PD1+细胞百分数
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
患者应答

图4C

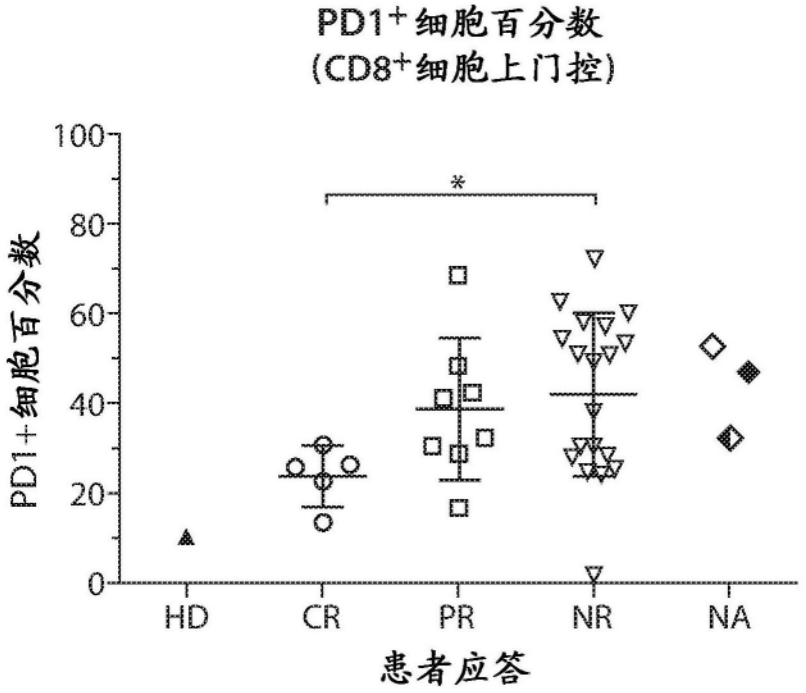

PD1+细胞百分数
(CD8+细胞上门控)
*
PD1+细胞百分数
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
患者应答

图4D

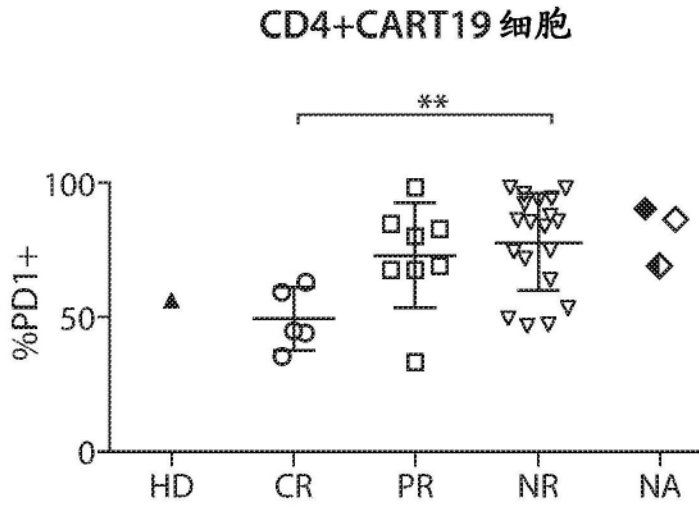

CD4+CART19细胞
**
100
50
0
%PD1+
HD
CR
PR
NR
NA

图5A

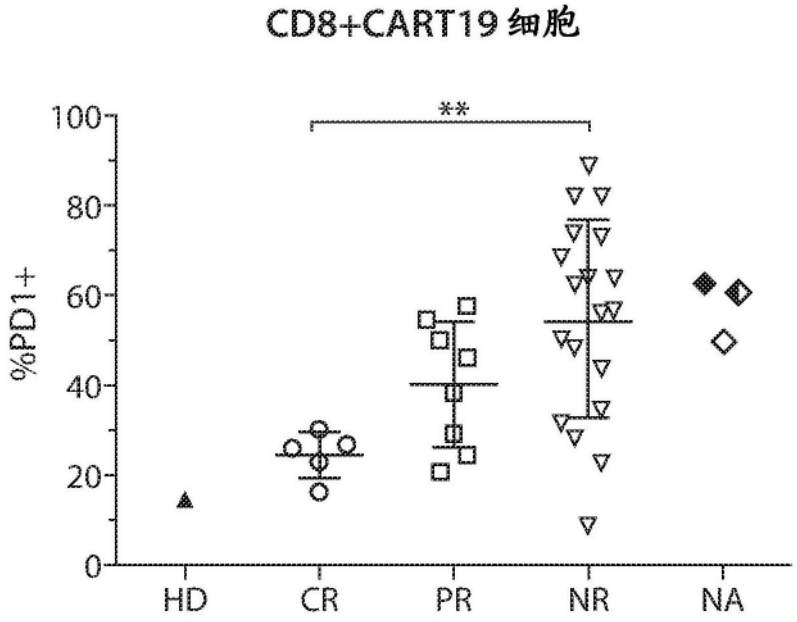

CD8+CART19细胞
**
100
80
60
40
20
0
%PD1+
HD
CR
PR
NR
NA

图5B

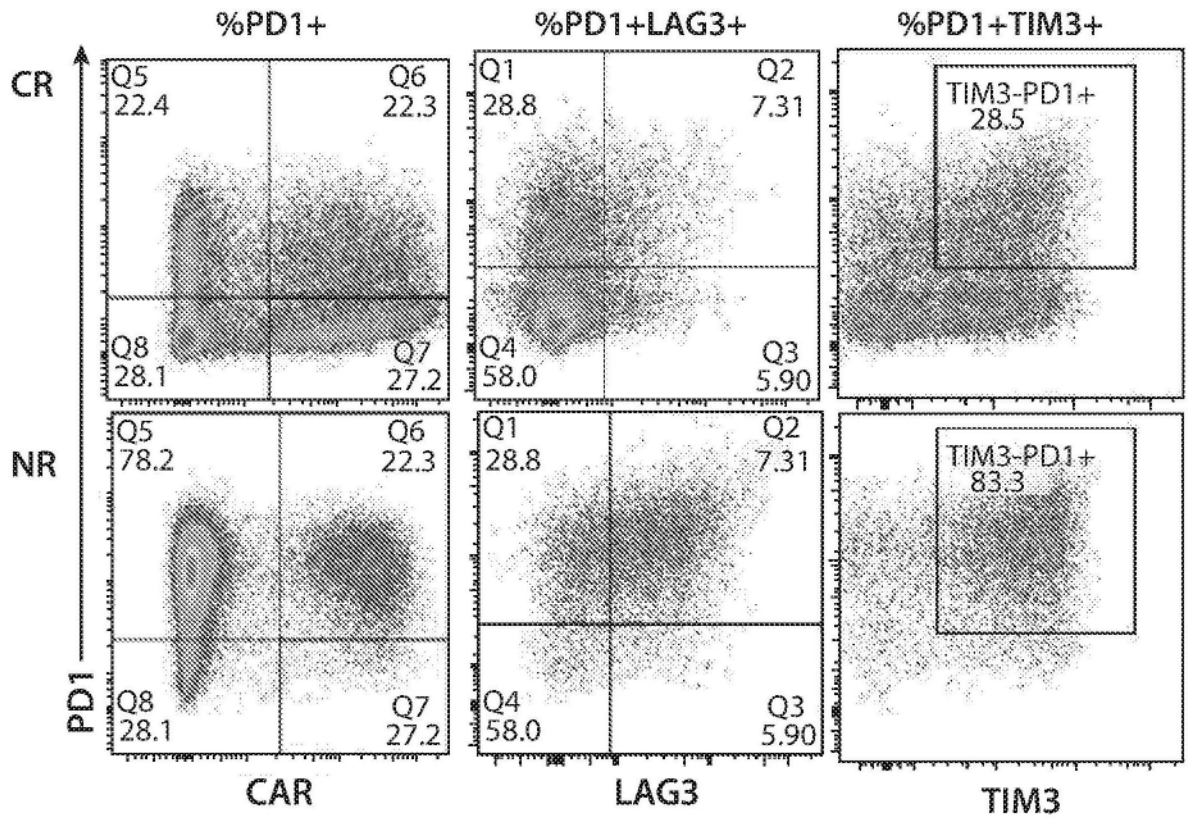

%PD1+
%PD1+LAG3+
%PD1+TIM3+
CR
NR
Q5
22.4
Q6
22.3
Q8
28.1
Q7
27.2
Q1
28.8
Q2
7.31
Q4
58.0
Q3
5.90
TIM3-PD1+
28.5
Q5
78.2
Q6
22.3
Q8
28.1
Q7
27.2
Q1
28.8
Q2
7.31
Q4
58.0
Q3
5.90
TIM3-PD1+
83.3
PD1
CAR
LAG3
TIM3

图6

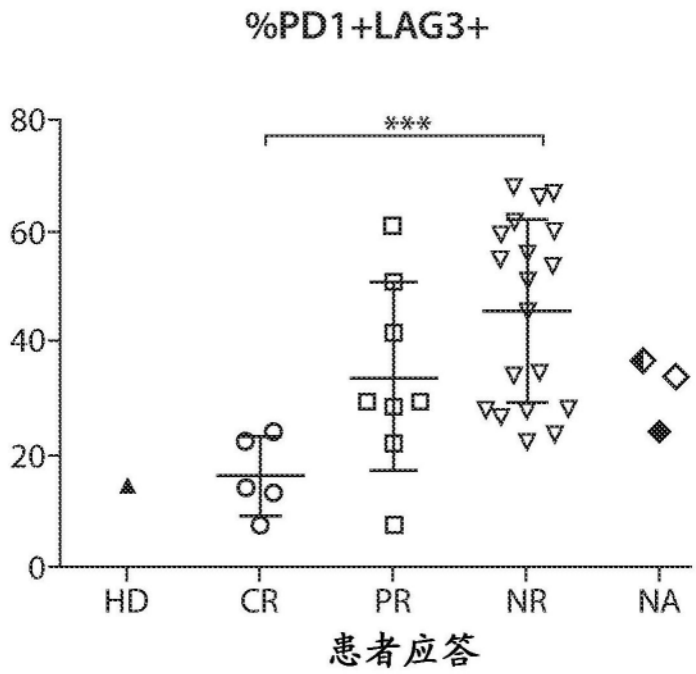

%PD1+LAG3+
***
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
患者应答

图7A

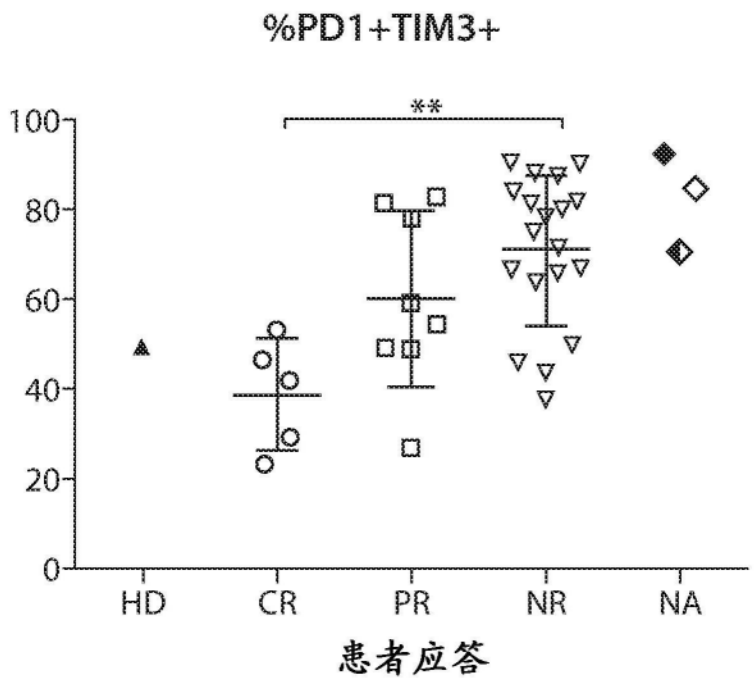

%PD1+TIM3+
**
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
患者应答

图7B

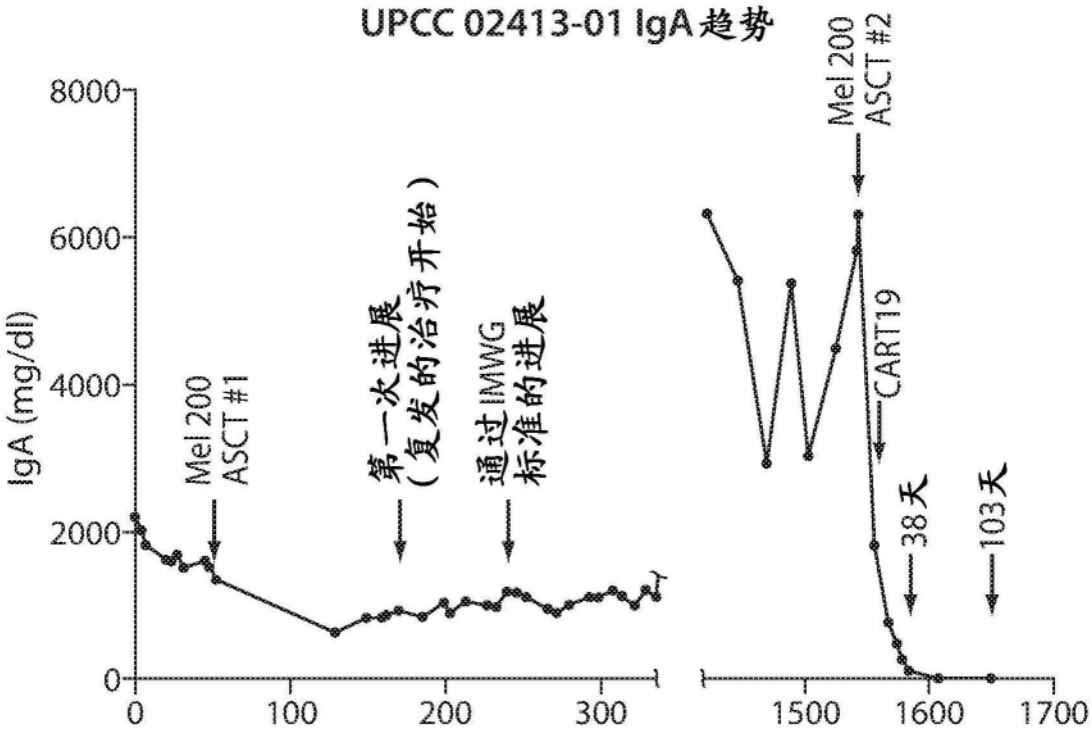

UPCC 02413-01 IgA趋势
IgA (mg/dl)
8000
6000
4000
2000
0
Mel 200
ASCT #1
第一次进展
(复发的治疗开始)
通过IMWG
标准的进展
Mel 200
ASCT #2
CART19
38天
103天
0
100
200
300
1500
1600
1700

图8

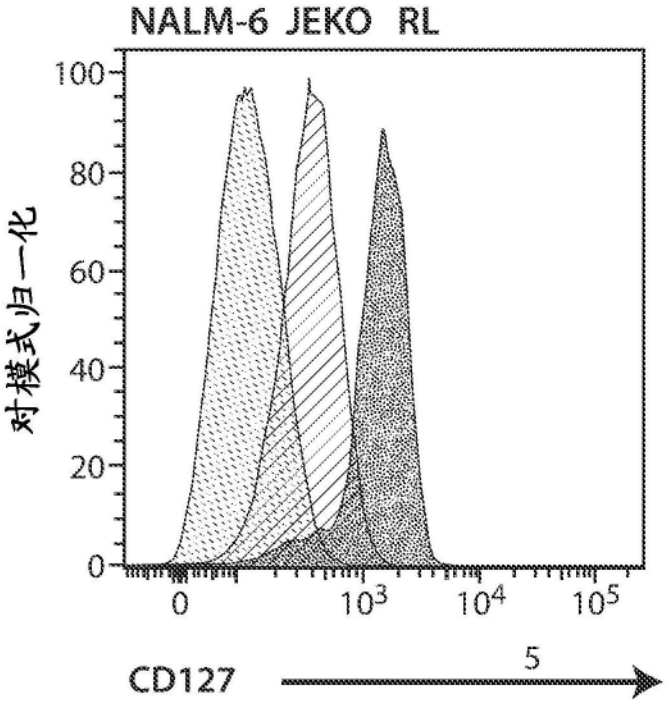

NALM-6 JEKO RL
对模式归一化
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
CD127
5

图9A

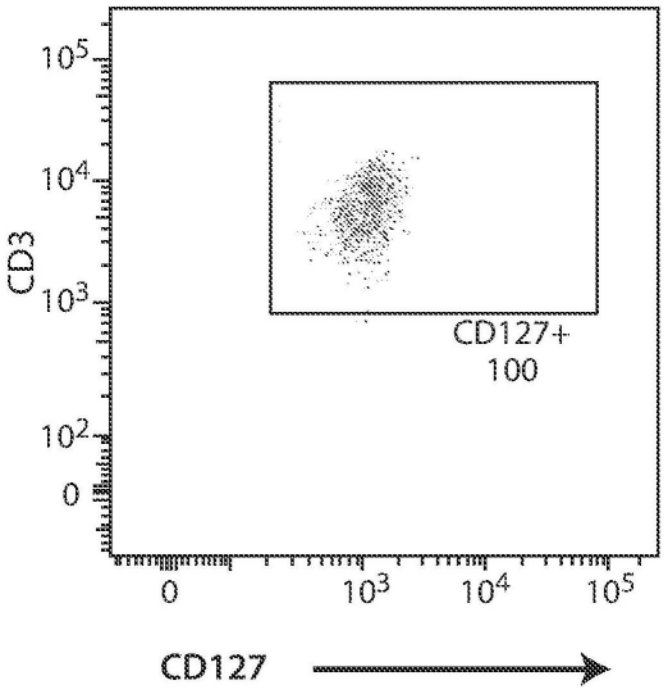

10^5
10^4
10^3
10^2
0
CD3
CD127+
100
0
10^3
10^4
10^5
CD127

图9B

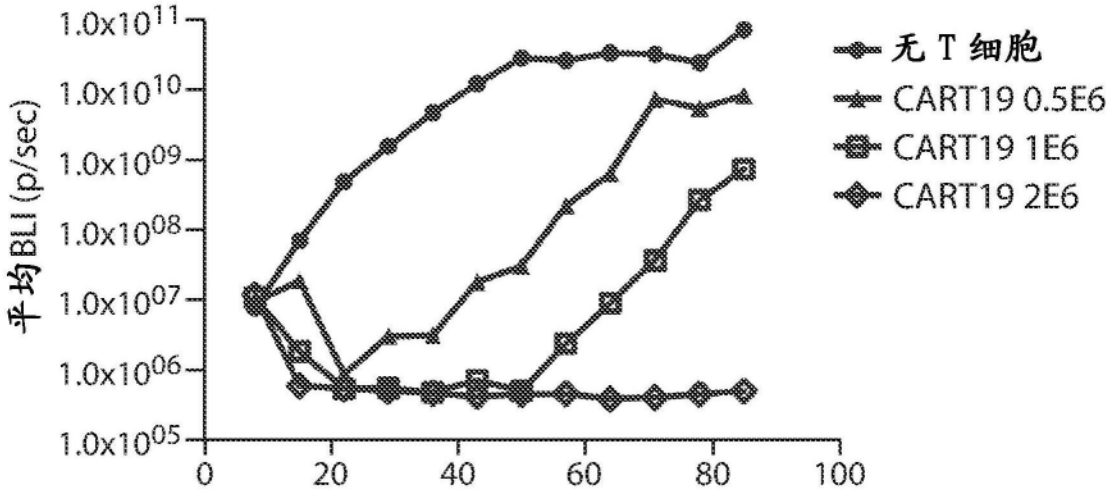

1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
平均BLI (p/sec)
0
20
40
60
80
100
无 T 细胞
CART19 0.5E6
CART19 1E6
CART19 2E6

图10A

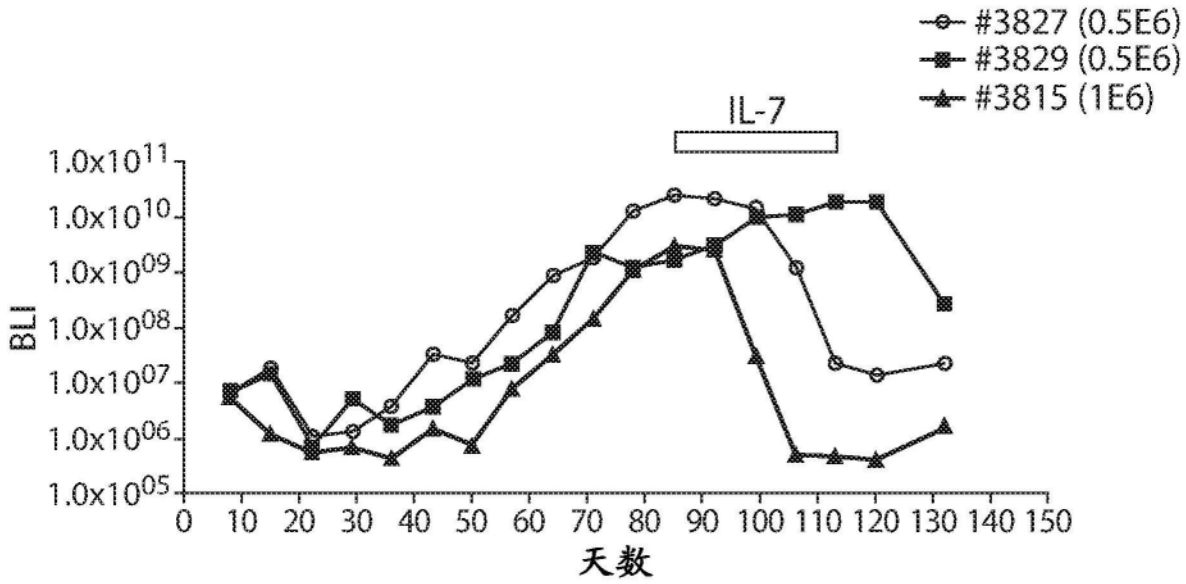

#3827 (0.5E6)
#3829 (0.5E6)
#3815 (1E6)
IL-7
1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
BLI
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150
天数

图10B

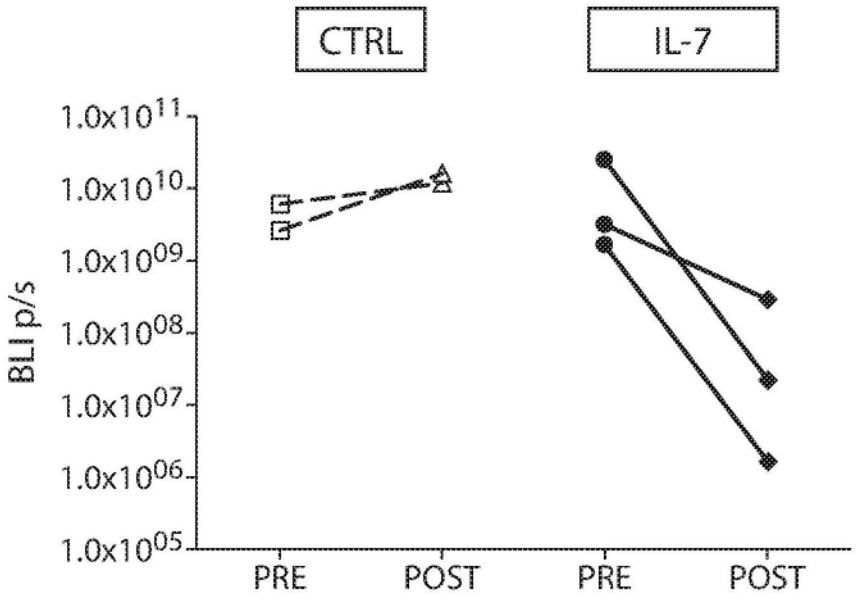

CTRL
IL-7
1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
BLI p/s
PRE
POST
PRE
POST

图10C

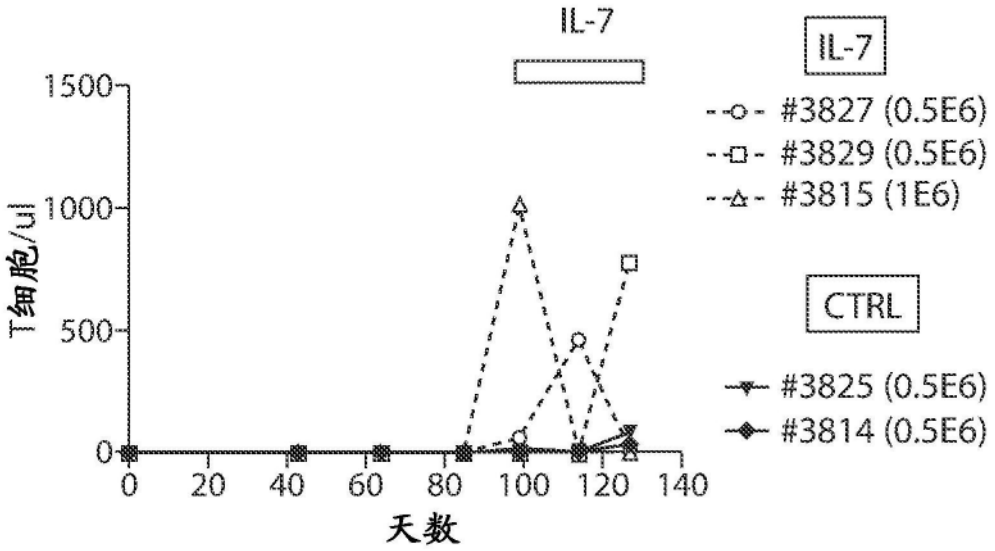

IL-7
IL-7
#3827 (0.5E6)
#3829 (0.5E6)
#3815 (1E6)
CTRL
#3825 (0.5E6)
#3814 (0.5E6)
1500
1000
500
0
T细胞/ul
0
20
40
60
80
100
120
140
天数

图11A

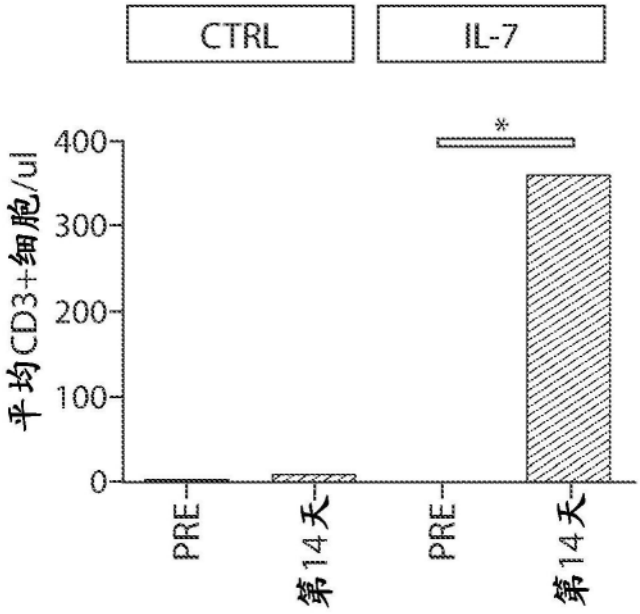


图11B

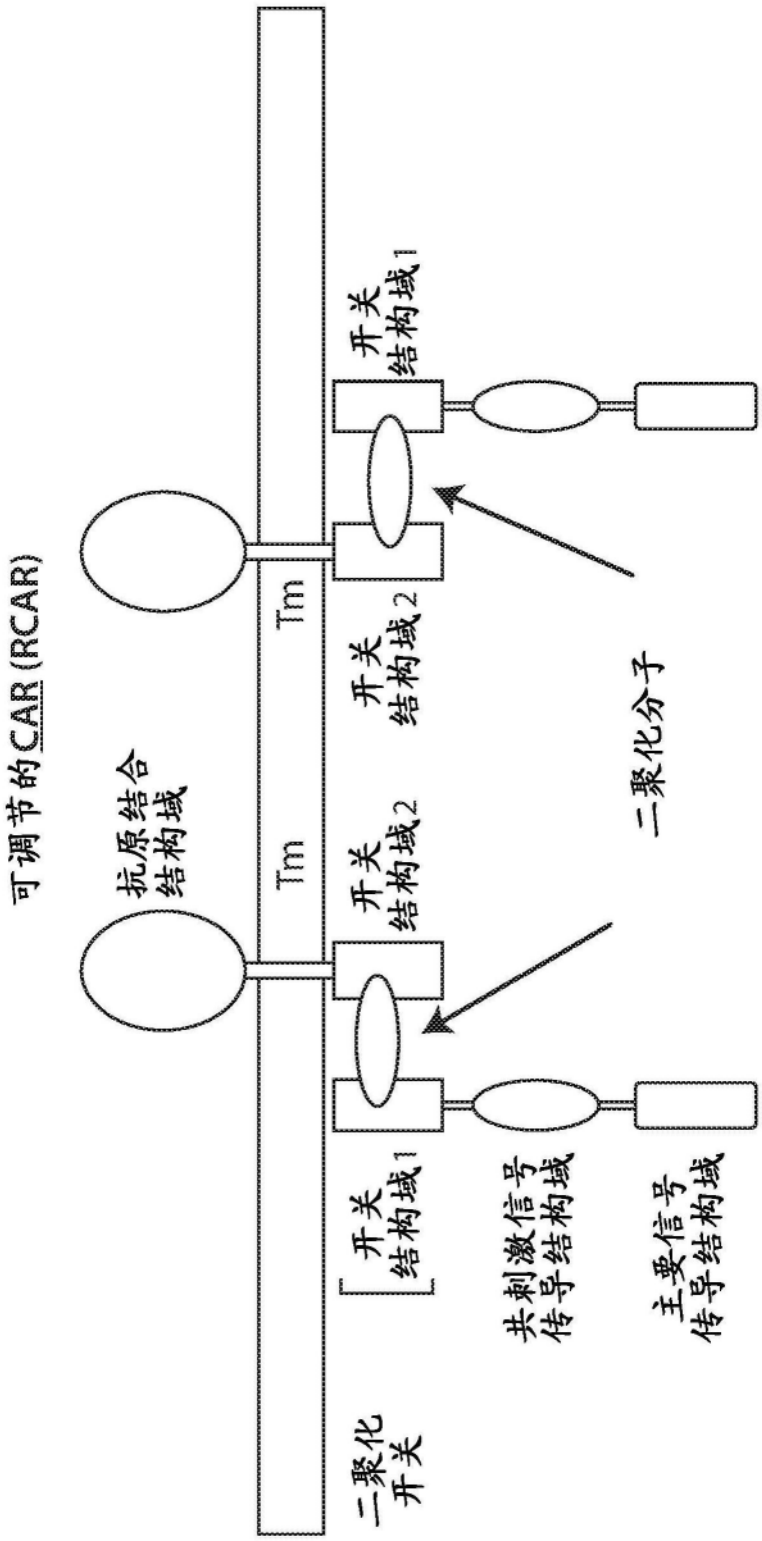

可调节的CAR (RCAR)
抗原结合结构域
Tm
Tm
开关结构域1
开关结构域2
开关结构域2
开关结构域1
二聚化分子
二聚化开关
共刺激信号传导结构域
主要信号传导结构域

图12

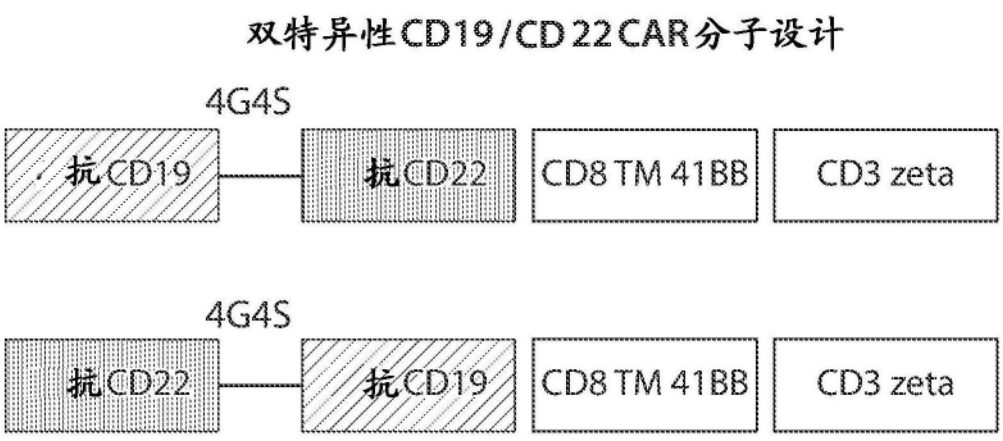

双特异性CD19/CD22CAR分子设计
4G4S
抗CD19
抗CD22
CD8 TM 41BB
CD3 zeta
4G4S
抗CD22
抗CD19
CD8 TM 41BB
CD3 zeta

图13

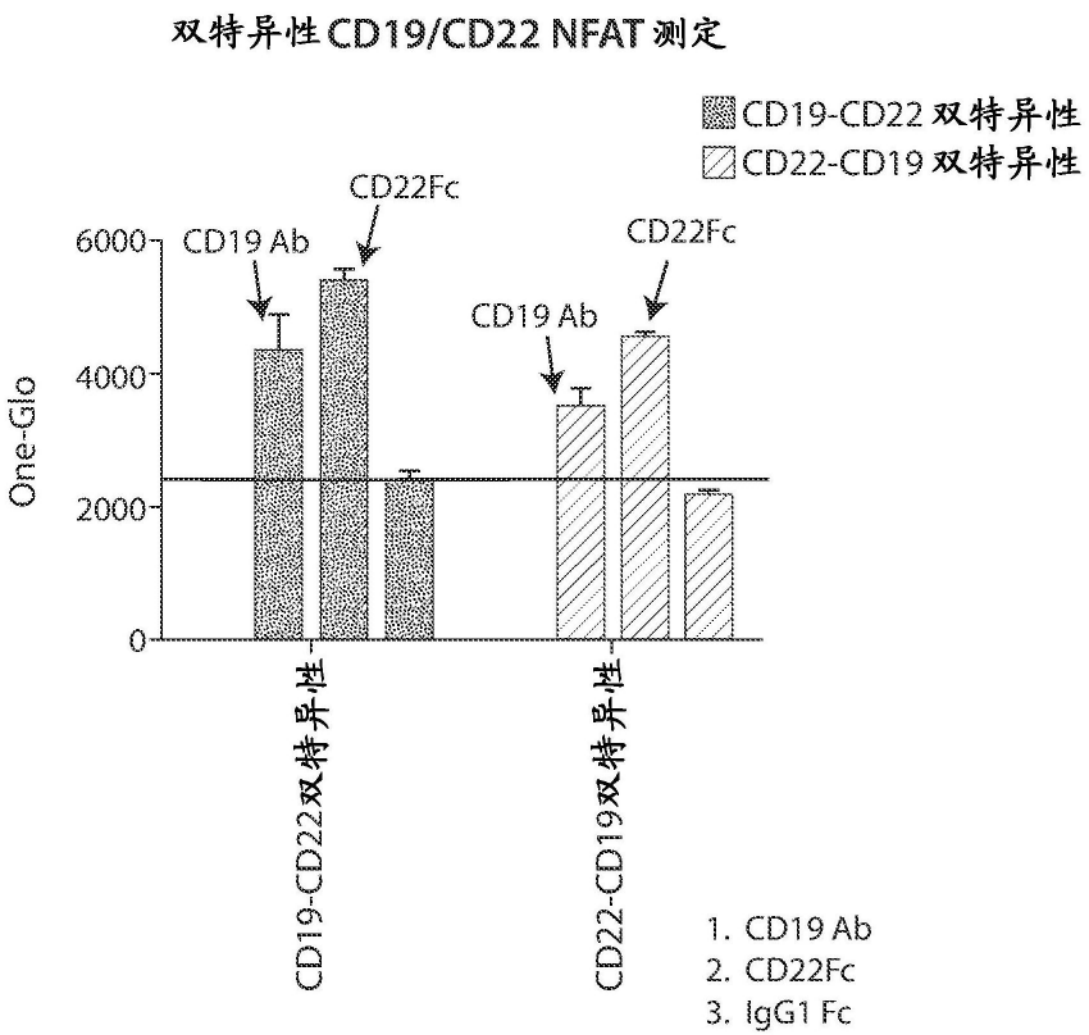

双特异性CD19/CD22 NFAT测定
CD19-CD22双特异性
CD22-CD19双特异性
One-Glo
6000
4000
2000
0
CD19 Ab
CD22Fc
CD19 Ab
CD22Fc
CD19-CD22双特异性
CD22-CD19双特异性
1. CD19 Ab
2. CD22Fc
3. IgG1 Fc

图14

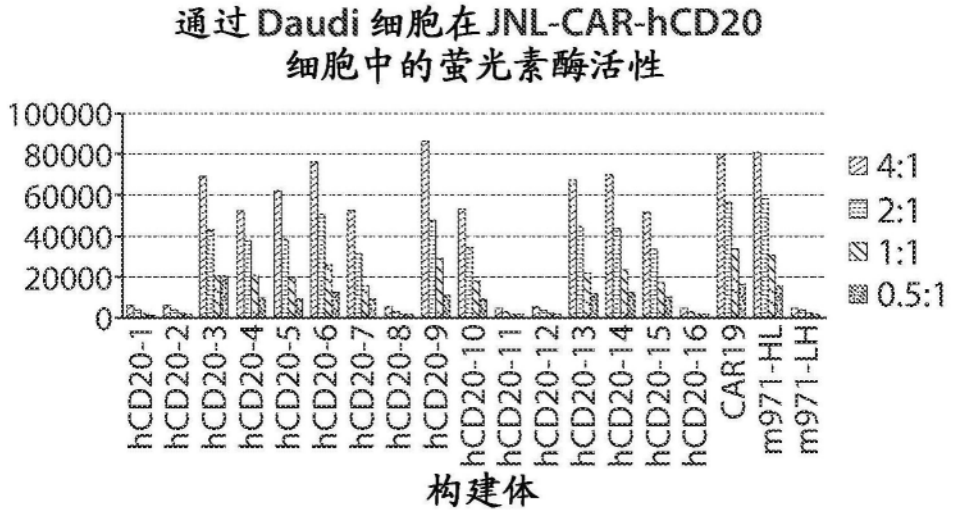

通过Daudi细胞在JNL-CAR-hCD20
细胞中的萤光素酶活性
100000
80000
60000
40000
20000
0
hCD20-1
hCD20-2
hCD20-3
hCD20-4
hCD20-5
hCD20-6
hCD20-7
hCD20-8
hCD20-9
hCD20-10
hCD20-11
hCD20-12
hCD20-13
hCD20-14
hCD20-15
hCD20-16
CAR19
m971-HL
m971-LH
构建体
4:1
2:1
1:1
0.5:1

图15A

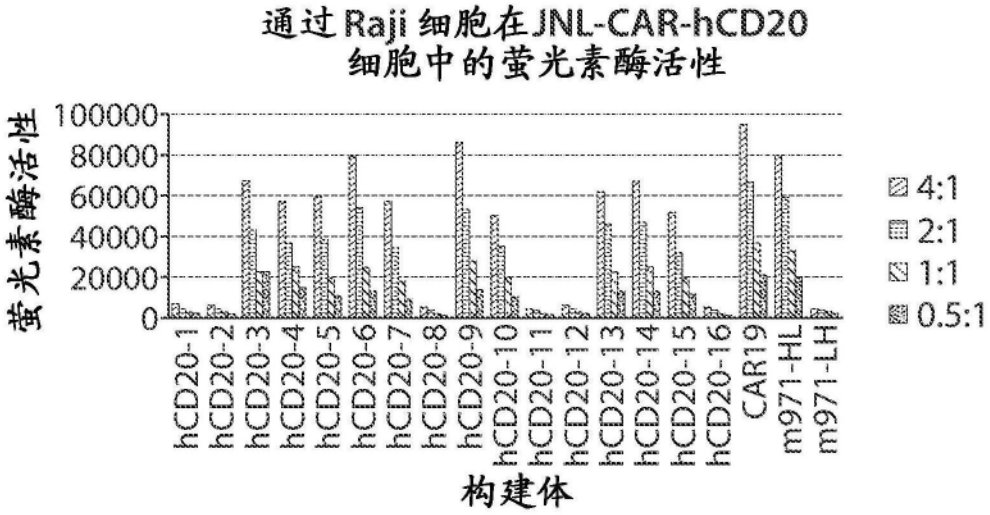

通过Raji细胞在JNL-CAR-hCD20
细胞中的萤光素酶活性
萤光素酶活性
100000
80000
60000
40000
20000
0
hCD20-1
hCD20-2
hCD20-3
hCD20-4
hCD20-5
hCD20-6
hCD20-7
hCD20-8
hCD20-9
hCD20-10
hCD20-11
hCD20-12
hCD20-13
hCD20-14
hCD20-15
hCD20-16
CAR19
m971-HL
m971-LH
构建体
4:1
2:1
1:1
0.5:1

图15B

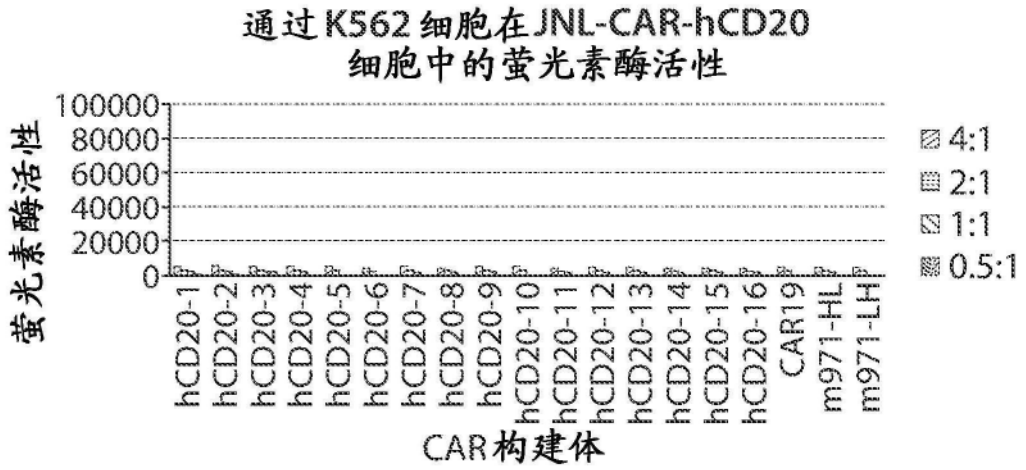

通过K562细胞在JNL-CAR-hCD20
细胞中的萤光素酶活性
萤光素酶活性
100000
80000
60000
40000
20000
0
4:1
2:1
1:1
0.5:1
hCD20-1
hCD20-2
hCD20-3
hCD20-4
hCD20-5
hCD20-6
hCD20-7
hCD20-8
hCD20-9
hCD20-10
hCD20-11
hCD20-12
hCD20-13
hCD20-14
hCD20-15
hCD20-16
CAR19
m971-HL
m971-LH
CAR构建体

图15C

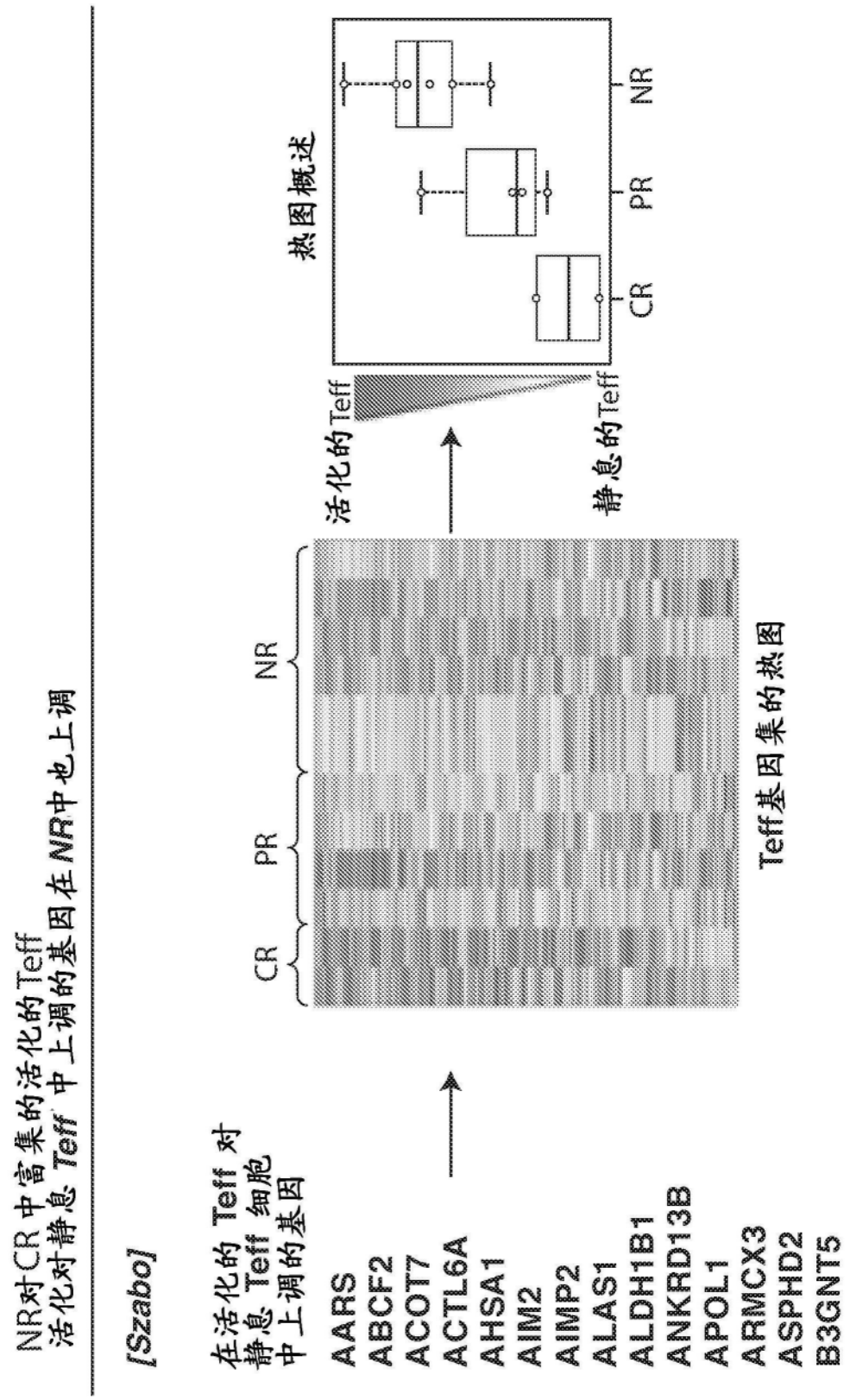

NR对CR 中富集的活化的Teff
活化对静息 Teff 中上调的基因在 NR中也上调
[Szabo]
在活化的 Teff 对
静息 Teff 细胞
中上调的基因
AARS
ABCF2
ACOT7
ACTL6A
AHSA1
AIM2
AIMP2
ALAS1
ALDH1B1
ANKRD13B
APOL1
ARMCX3
ASPHD2
B3GNT5
CR
PR
NR
活化的Teff
静息的Teff
热图概述
CR
PR
NR
Teff基因集的热图

图16

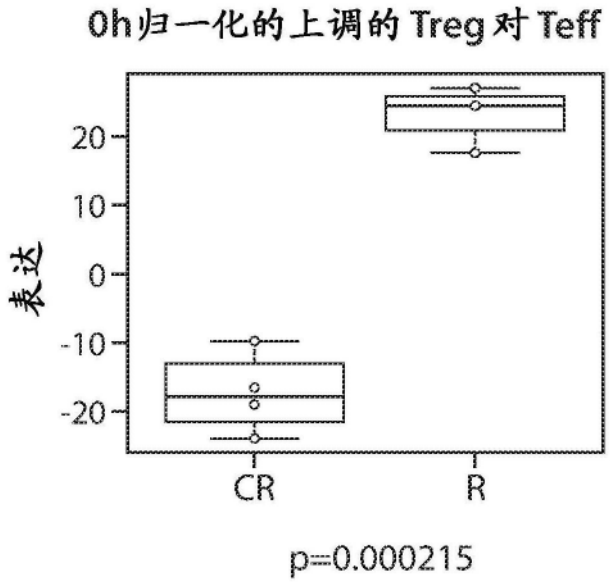


图17

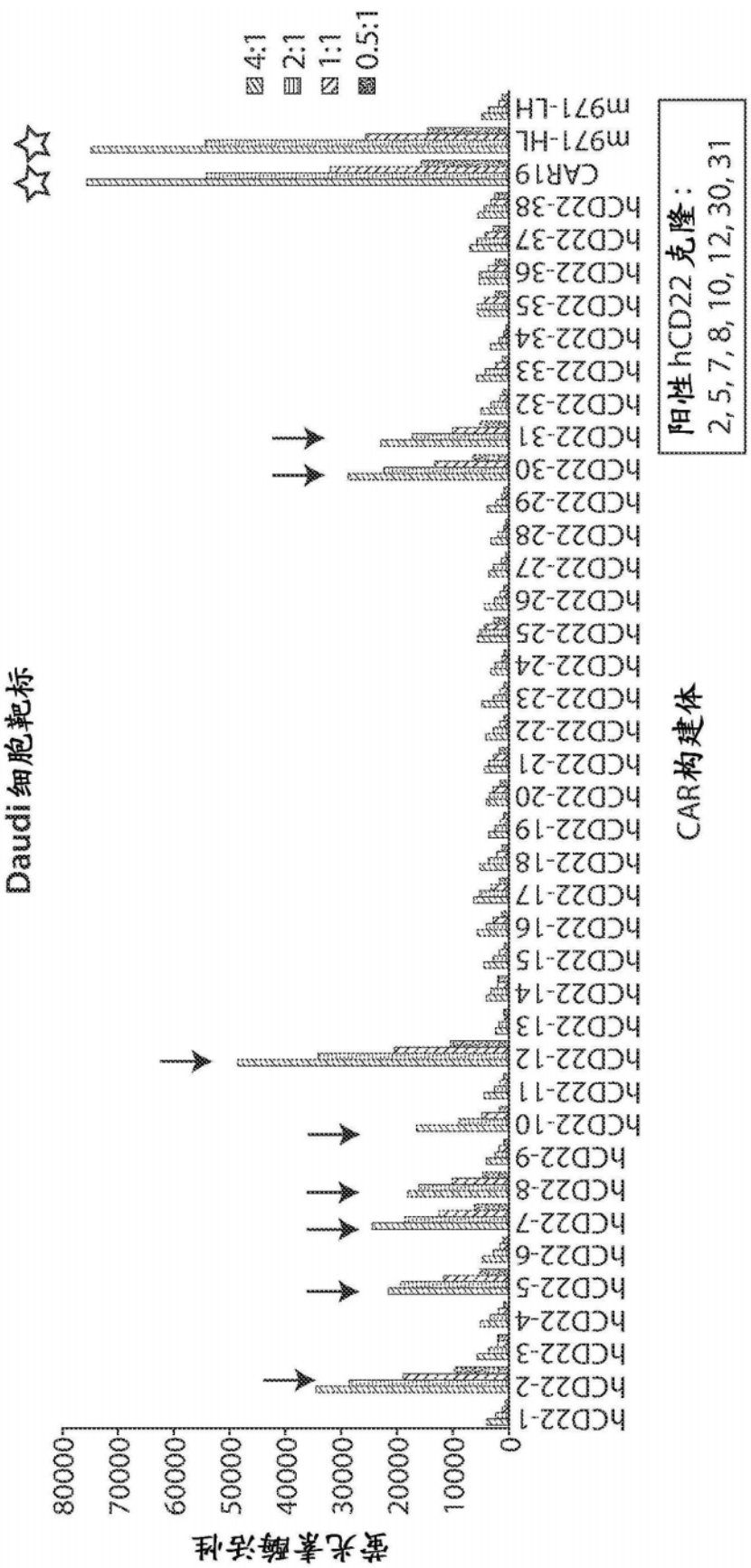

4:1
2:1
1:1
0.5:1
m971-LH
m971-HL
CAR19
hCD22-38
hCD22-37
hCD22-36
hCD22-35
hCD22-34
hCD22-33
hCD22-32
hCD22-31
hCD22-30
hCD22-29
hCD22-28
hCD22-27
hCD22-26
hCD22-25
hCD22-24
hCD22-23
hCD22-22
hCD22-21
hCD22-20
hCD22-19
hCD22-18
hCD22-17
hCD22-16
hCD22-15
hCD22-14
hCD22-13
hCD22-12
hCD22-11
hCD22-10
hCD22-9
hCD22-8
hCD22-7
hCD22-6
hCD22-5
hCD22-4
hCD22-3
hCD22-2
hCD22-1
CAR构建体
阳性hCD22克隆：
2,5,7,8,10,12,30,31
Daudi细胞靶标
萤光素酶活性
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0

图18A

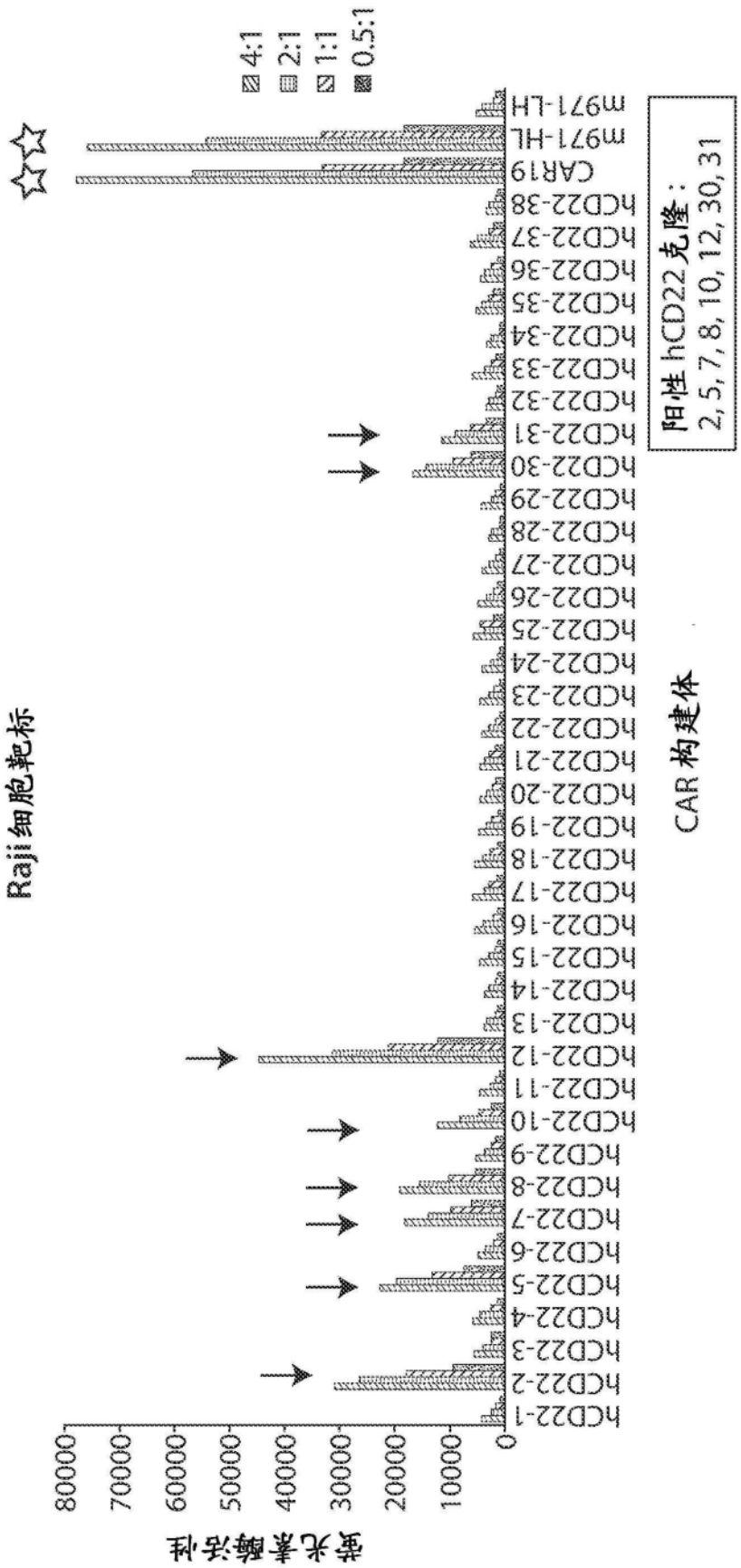

4:1
2:1
1:1
0.5:1
☆☆
m971-LH
m971-HL
CAR19
hCD22-38
hCD22-37
hCD22-36
hCD22-35
hCD22-34
hCD22-33
hCD22-32
hCD22-31
hCD22-30
hCD22-29
hCD22-28
hCD22-27
hCD22-26
hCD22-25
hCD22-24
hCD22-23
hCD22-22
hCD22-21
hCD22-20
hCD22-19
hCD22-18
hCD22-17
hCD22-16
hCD22-15
hCD22-14
hCD22-13
hCD22-12
hCD22-11
hCD22-10
hCD22-9
hCD22-8
hCD22-7
hCD22-6
hCD22-5
hCD22-4
hCD22-3
hCD22-2
hCD22-1
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
萤光素酶活性
Raji细胞靶标
CAR 构建体
阳性 hCD22 克隆：
2, 5, 7, 8, 10, 12, 30, 31

图18B

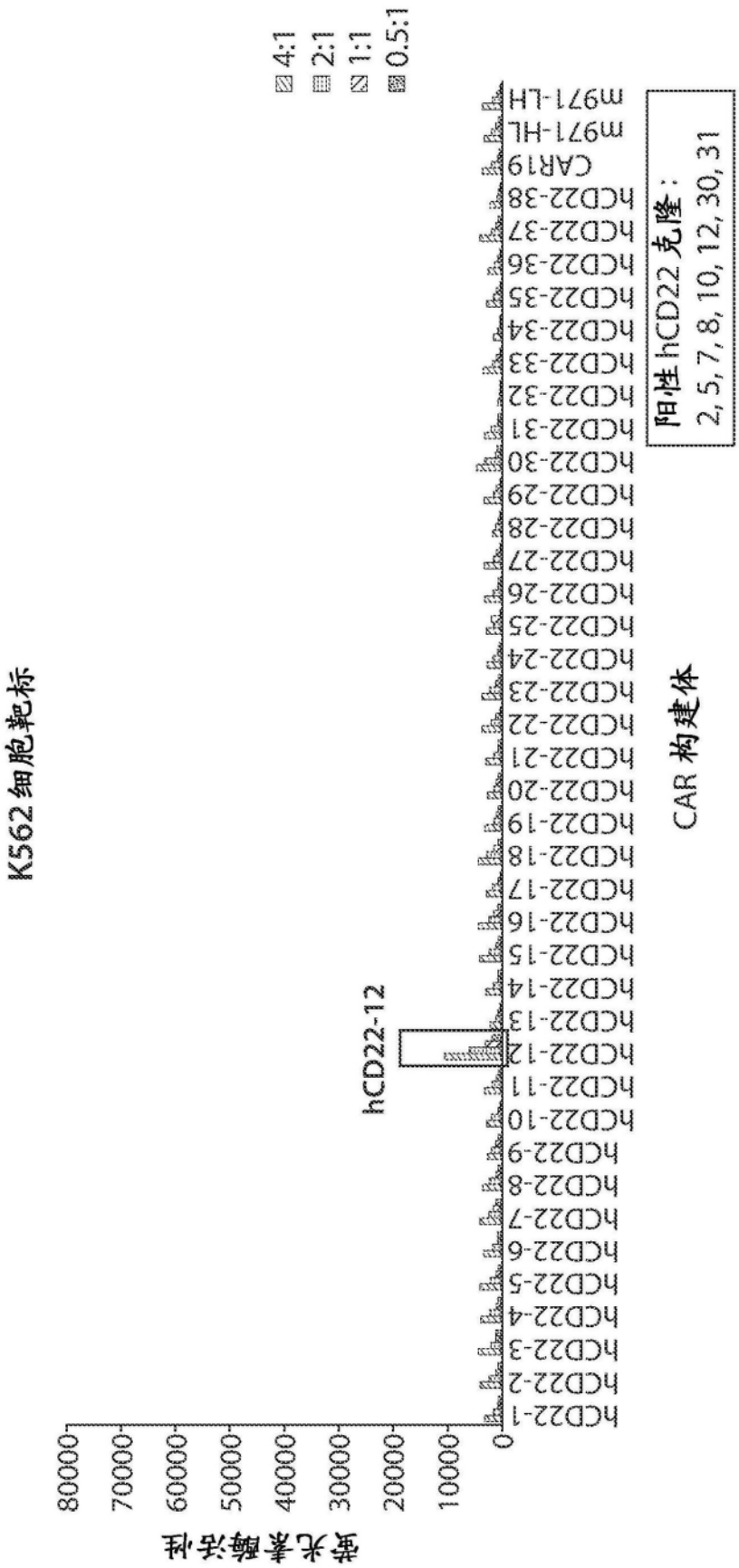

4:1
2:1
1:1
0.5:1
荧光素酶活性
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
hCD22-1
hCD22-2
hCD22-3
hCD22-4
hCD22-5
hCD22-6
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-9
hCD22-10
hCD22-11
hCD22-12
hCD22-13
hCD22-14
hCD22-15
hCD22-16
hCD22-17
hCD22-18
hCD22-19
hCD22-20
hCD22-21
hCD22-22
hCD22-23
hCD22-24
hCD22-25
hCD22-26
hCD22-27
hCD22-28
hCD22-29
hCD22-30
hCD22-31
hCD22-32
hCD22-33
hCD22-34
hCD22-35
hCD22-36
hCD22-37
hCD22-38
CAR19
m971-HL
m971-LH
hCD22-12
K562 细胞靶标
CAR 构建体
阳性 hCD22 克隆：
2, 5, 7, 8, 10, 12, 30, 31

图18C

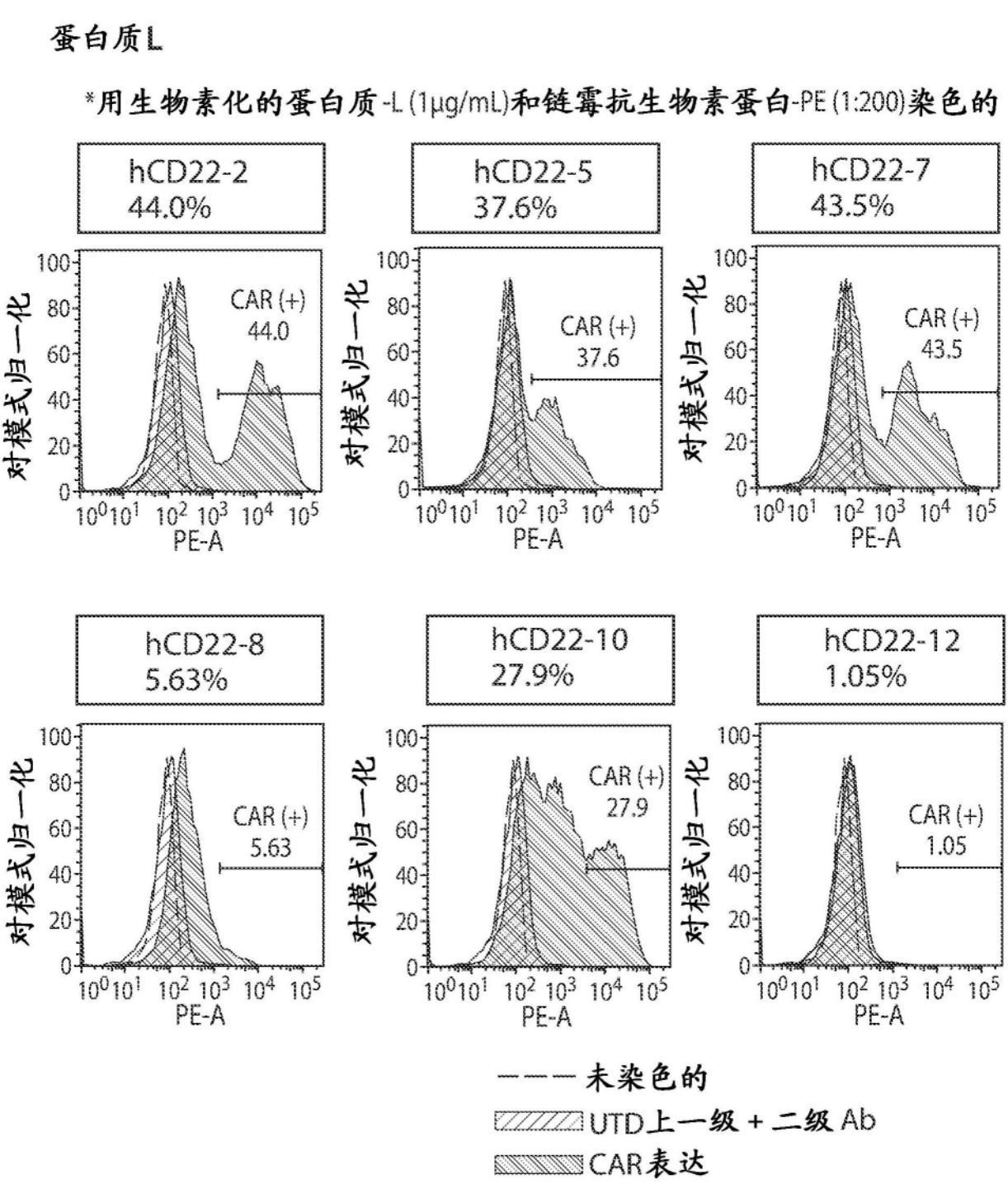

蛋白质L
*用生物素化的蛋白质-L (1μg/mL)和链霉抗生物素蛋白-PE (1:200)染色的
hCD22-2
44.0%
hCD22-5
37.6%
hCD22-7
43.5%
hCD22-8
5.63%
hCD22-10
27.9%
hCD22-12
1.05%
CAR (+)
44.0
CAR (+)
37.6
CAR (+)
43.5
CAR (+)
5.63
CAR (+)
27.9
CAR (+)
1.05
对模式归一化
PE-A
未染色的
UTD上一级 + 二级 Ab
CAR表达

图19-1

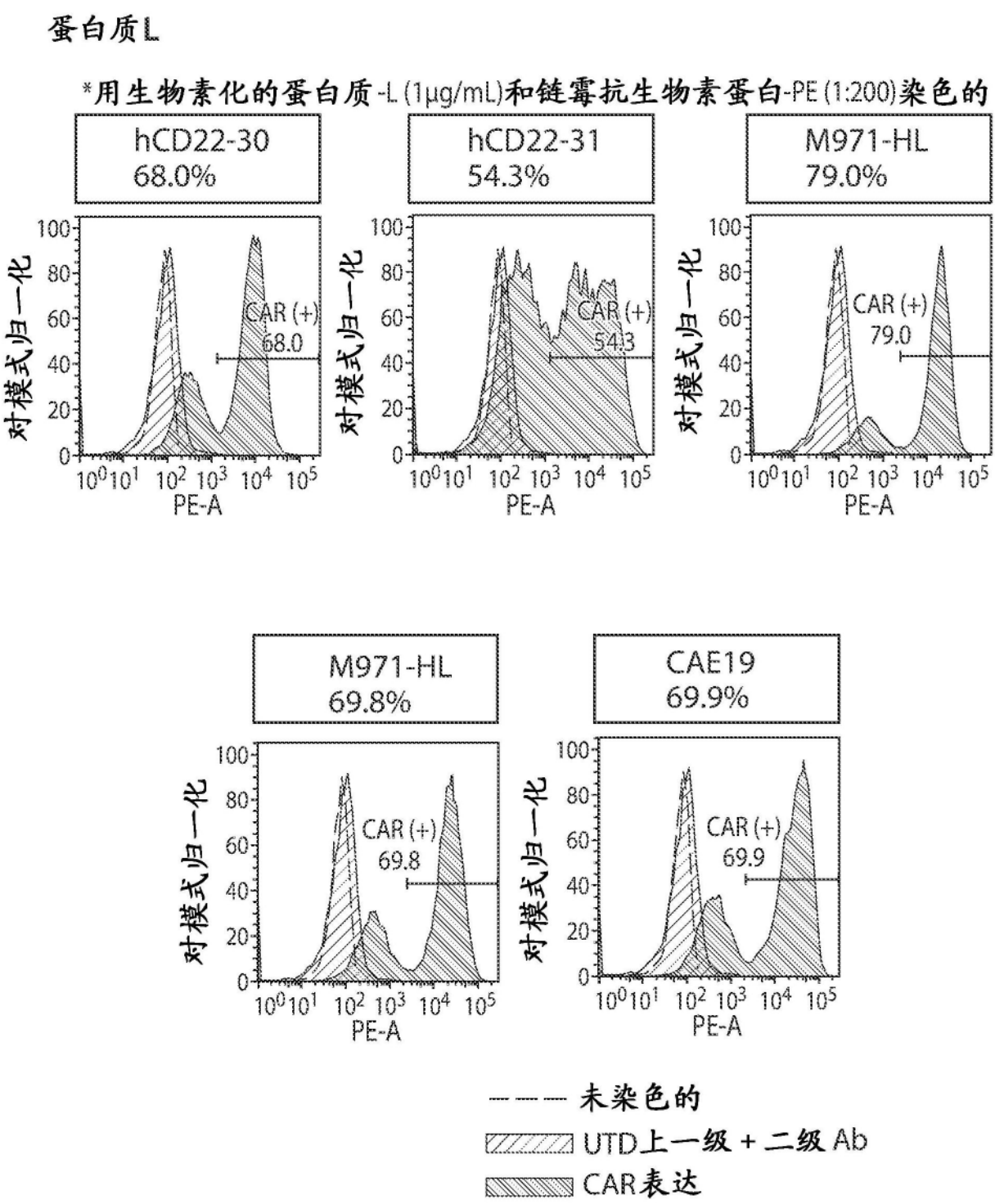

蛋白质L
*用生物素化的蛋白质-L (1μg/mL)和链霉抗生物素蛋白-PE (1:200)染色的
hCD22-30
68.0%
hCD22-31
54.3%
M971-HL
79.0%
M971-HL
69.8%
CAE19
69.9%
对模式归一化
CAR (+)
68.0
CAR (+)
54.3
CAR (+)
79.0
CAR (+)
69.8
CAR (+)
69.9
PE-A
未染色的
UTD上一级 + 二级 Ab
CAR表达

图19-2

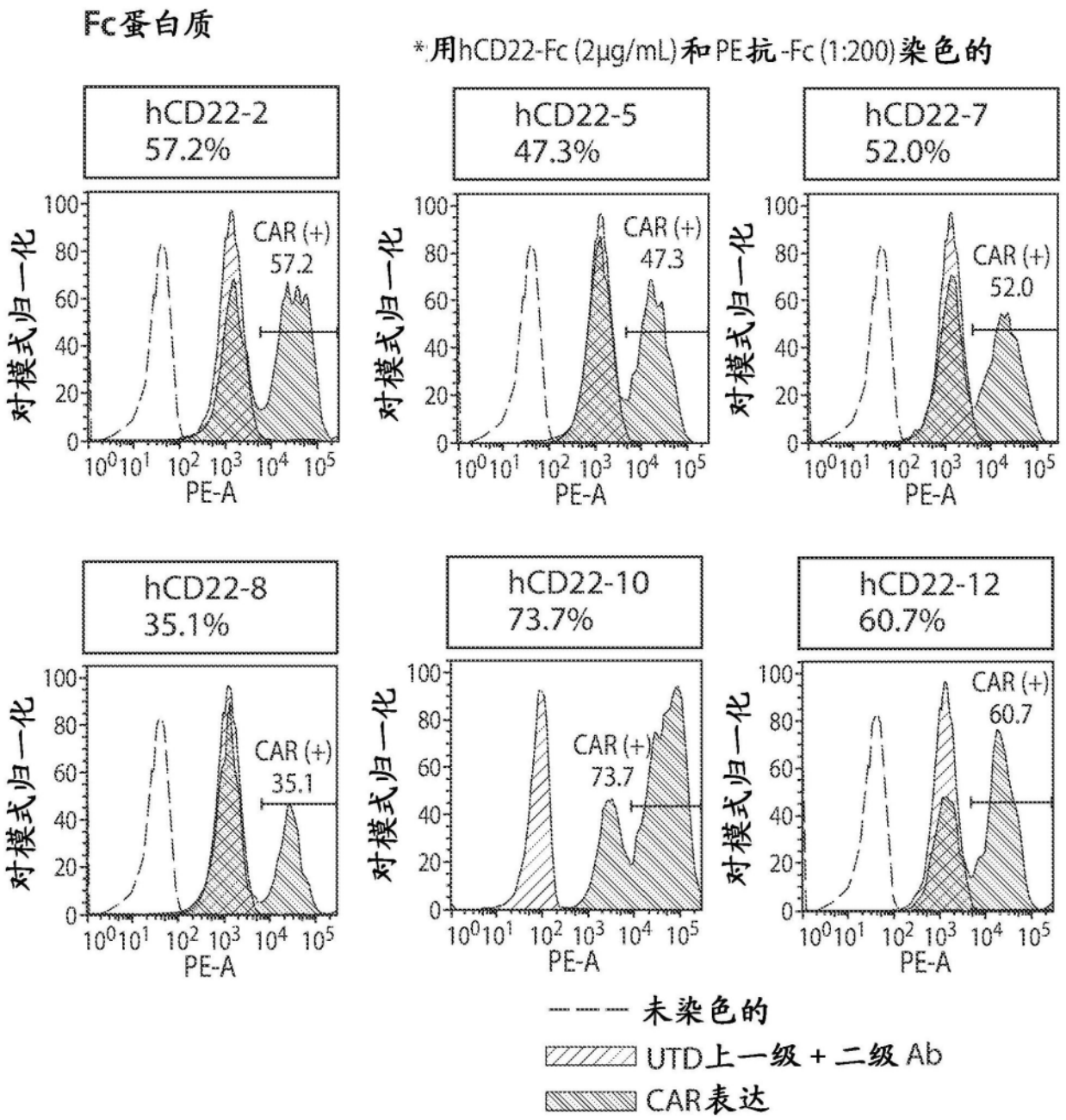

Fc蛋白质
*用hCD22-Fc (2μg/mL)和PE抗-Fc (1:200)染色的
hCD22-2
57.2%
CAR (+)
57.2
hCD22-5
47.3%
CAR (+)
47.3
hCD22-7
52.0%
CAR (+)
52.0
hCD22-8
35.1%
CAR (+)
35.1
hCD22-10
73.7%
CAR (+)
73.7
hCD22-12
60.7%
CAR (+)
60.7
对模式归一化
PE-A
未染色的
UTD上一级 + 二级 Ab
CAR表达

图19-3

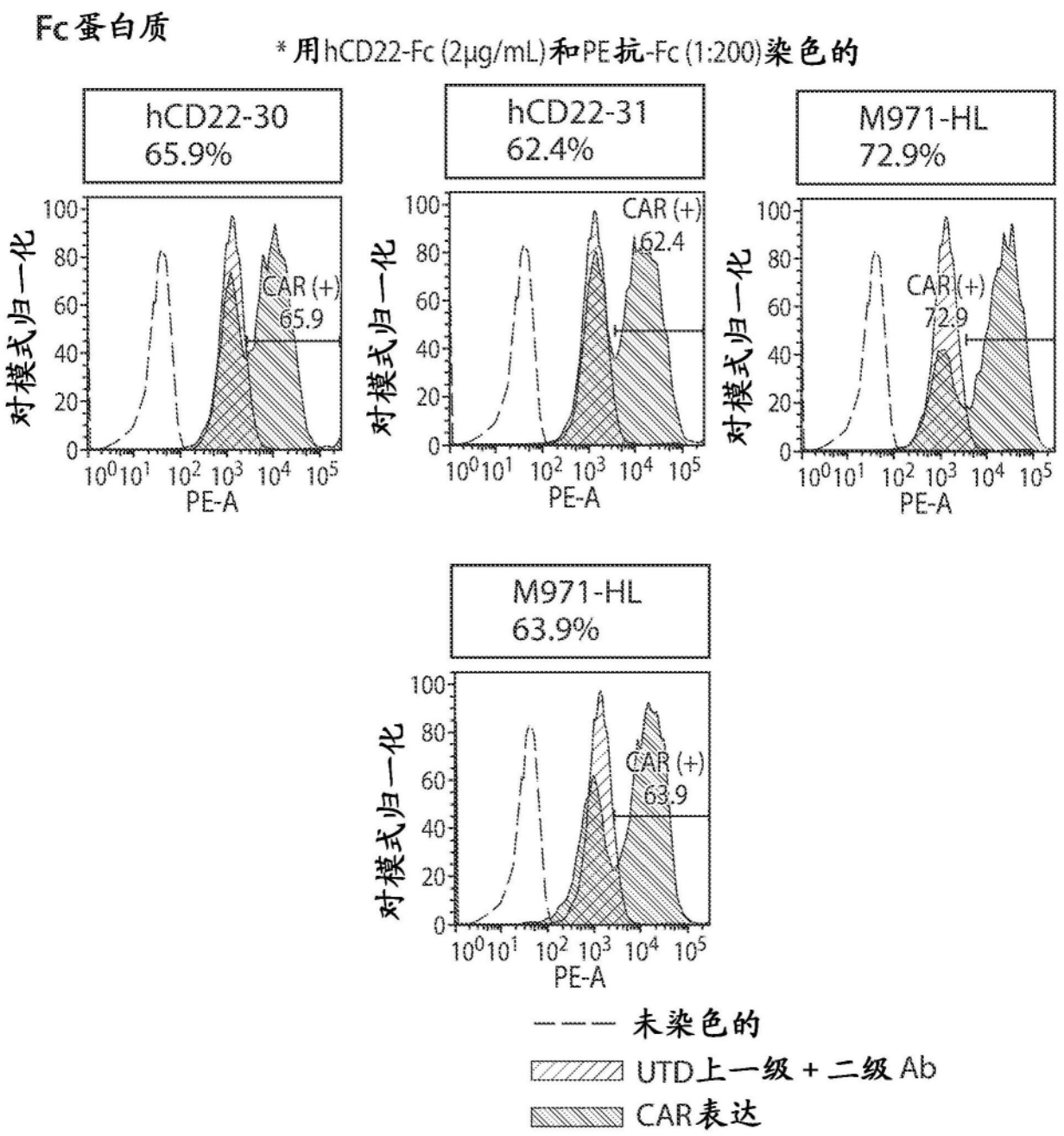

Fc蛋白质
*用hCD22-Fc (2μg/mL)和PE抗-Fc (1:200)染色的
hCD22-30
65.9%
CAR (+)
65.9
hCD22-31
62.4%
CAR (+)
62.4
M971-HL
72.9%
CAR (+)
72.9
M971-HL
63.9%
CAR (+)
63.9
对模式归一化
PE-A
未染色的
UTD上一级 + 二级 Ab
CAR表达

图19-4

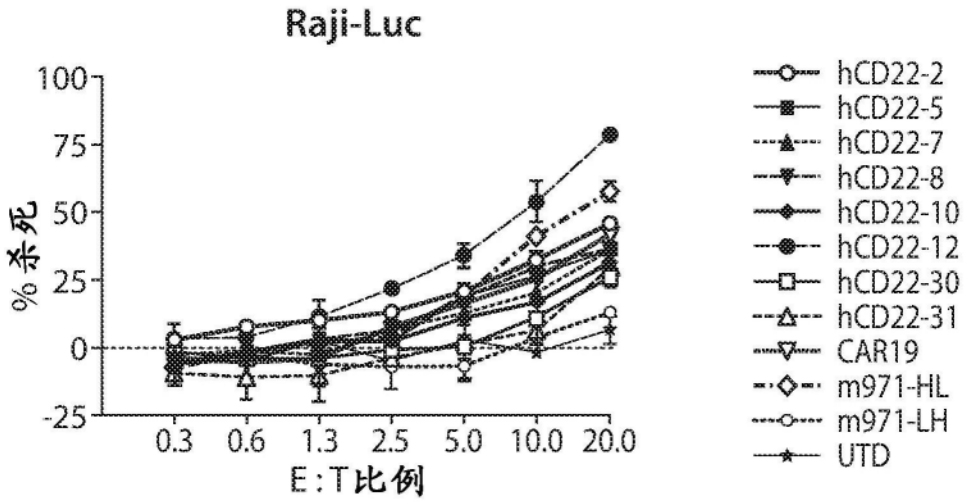

Raji-Luc
100
75
50
25
0
-25
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20A

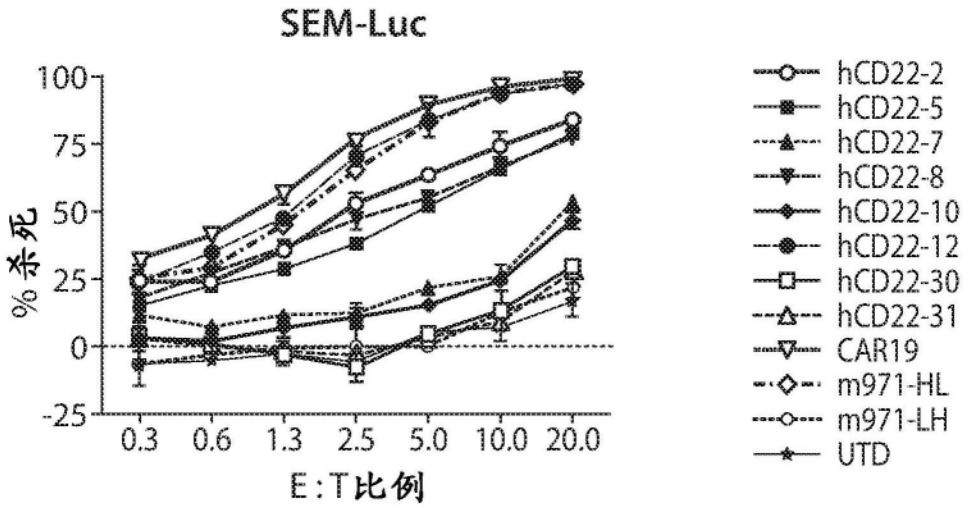

SEM-Luc
100
75
50
25
0
-25
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20B

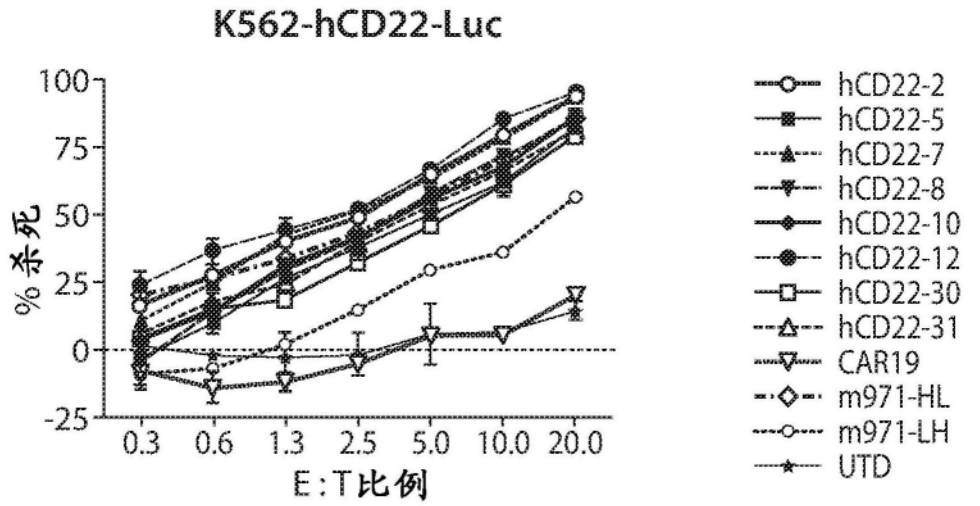

K562-hCD22-Luc
100
75
50
25
0
-25
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20C

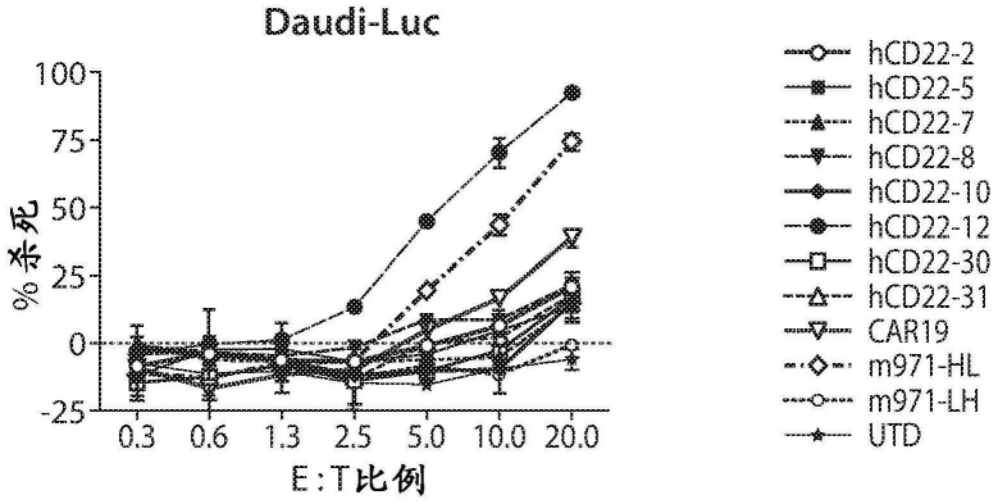

Daudi-Luc
100
75
50
25
0
-25
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20D

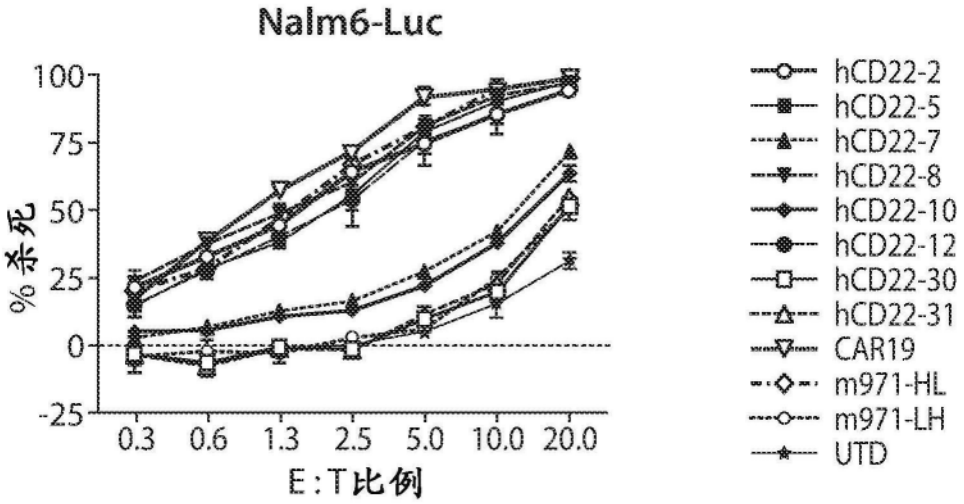

Nalm6-Luc
100
75
50
25
0
-25
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20E

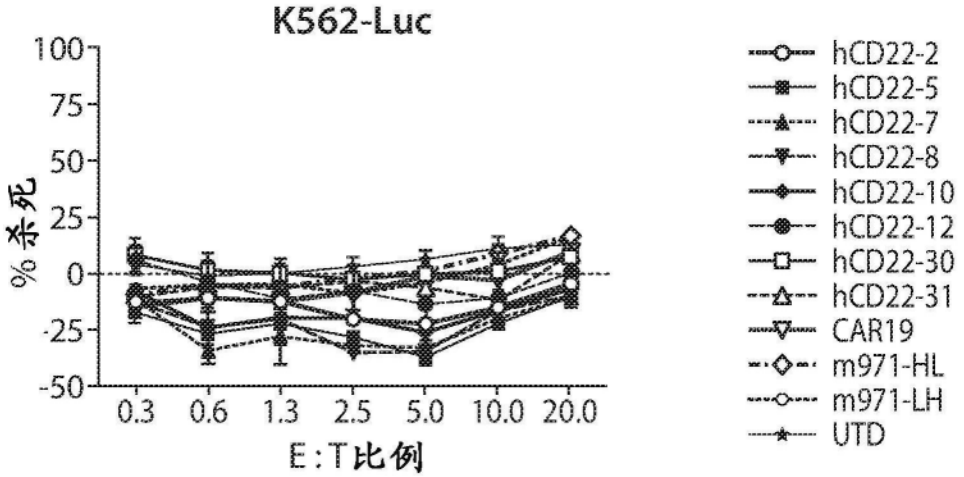

K562-Luc
100
75
50
25
0
-25
-50
% 杀死
0.3
0.6
1.3
2.5
5.0
10.0
20.0
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

图20F

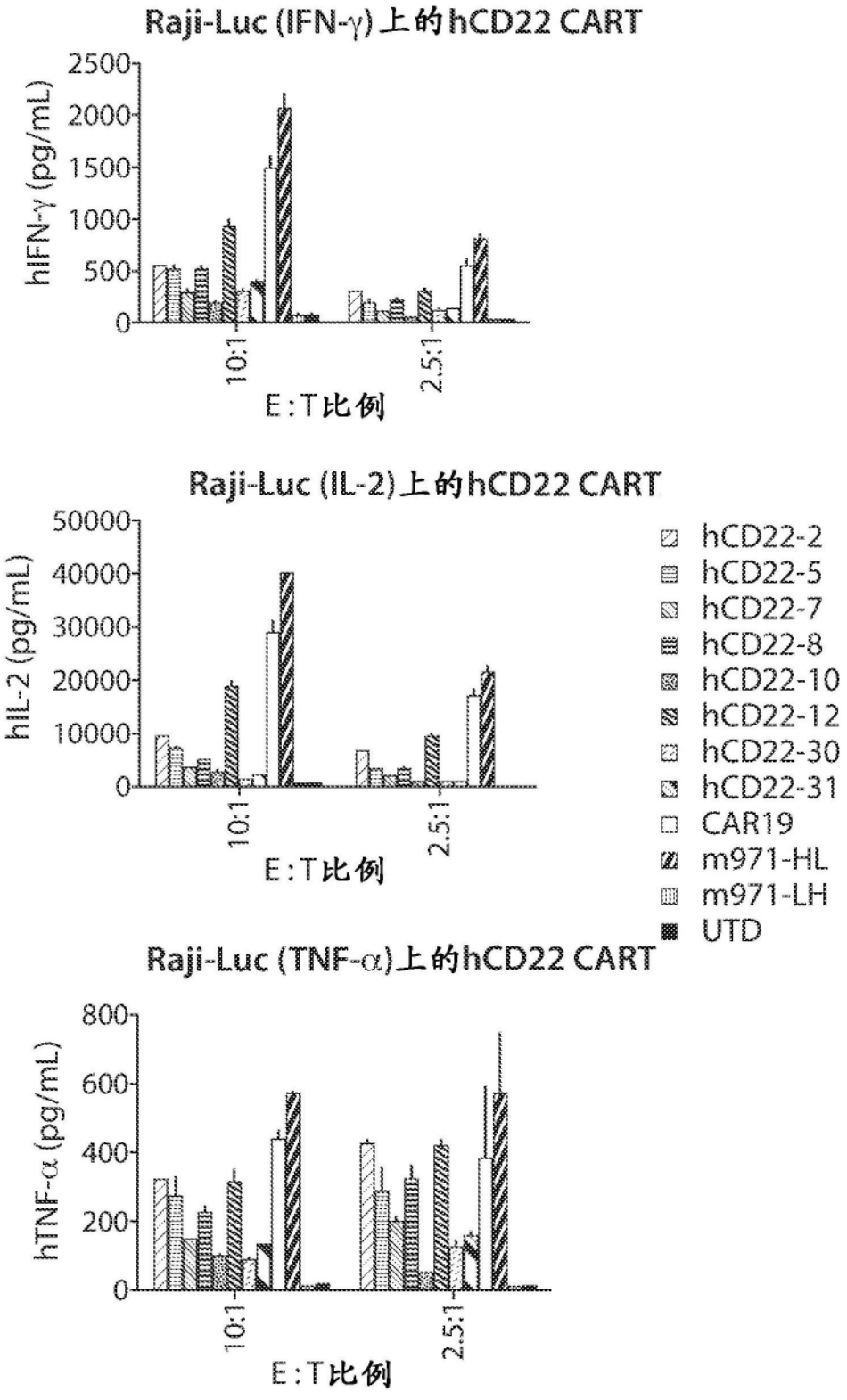

Raji-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
10:1
2.5:1
E:T比例
Raji-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
50000
40000
30000
20000
10000
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
Raji-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21A

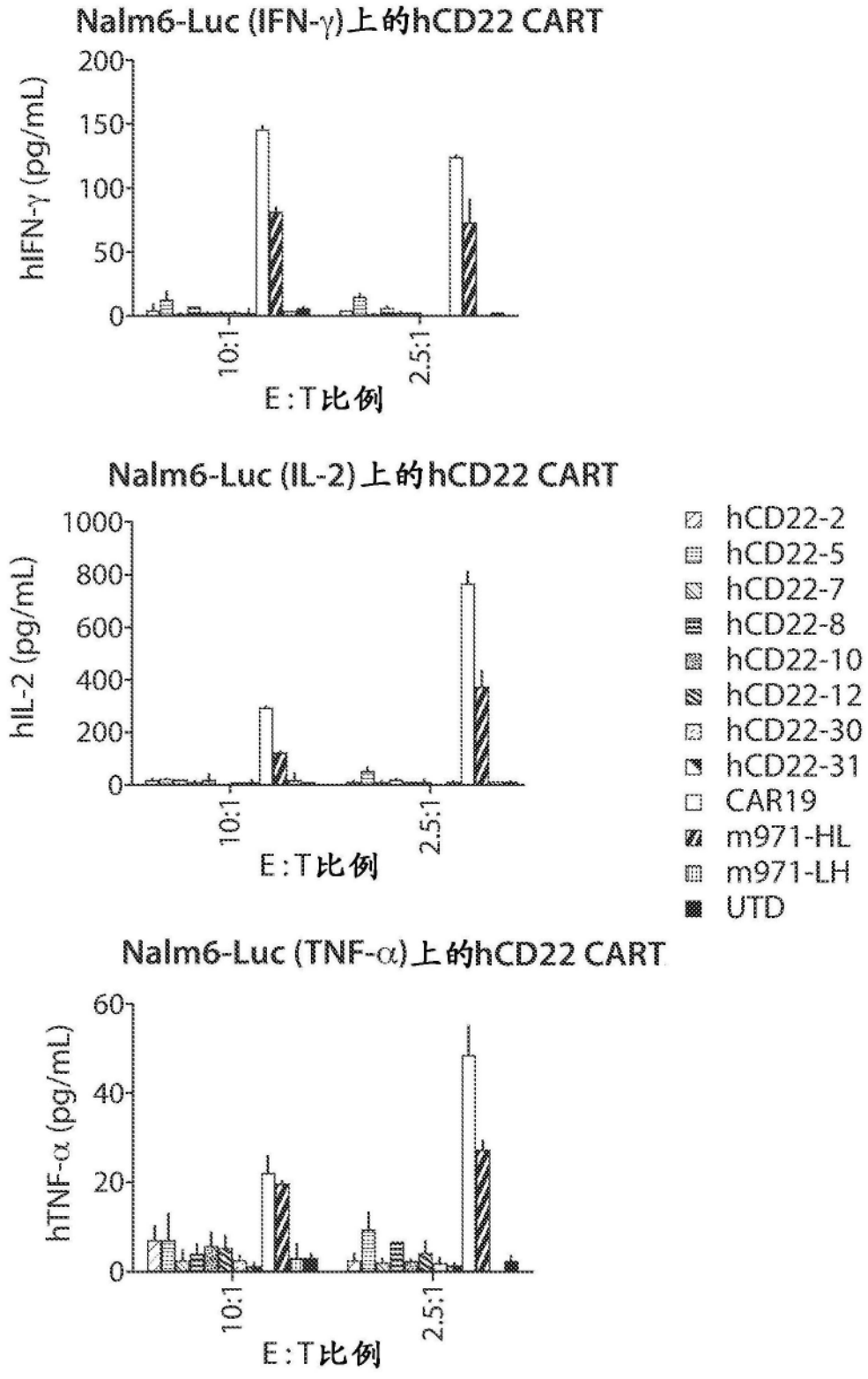

Nalm6-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
E:T比例
Nalm6-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
1000
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
Nalm6-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
60
40
20
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21B

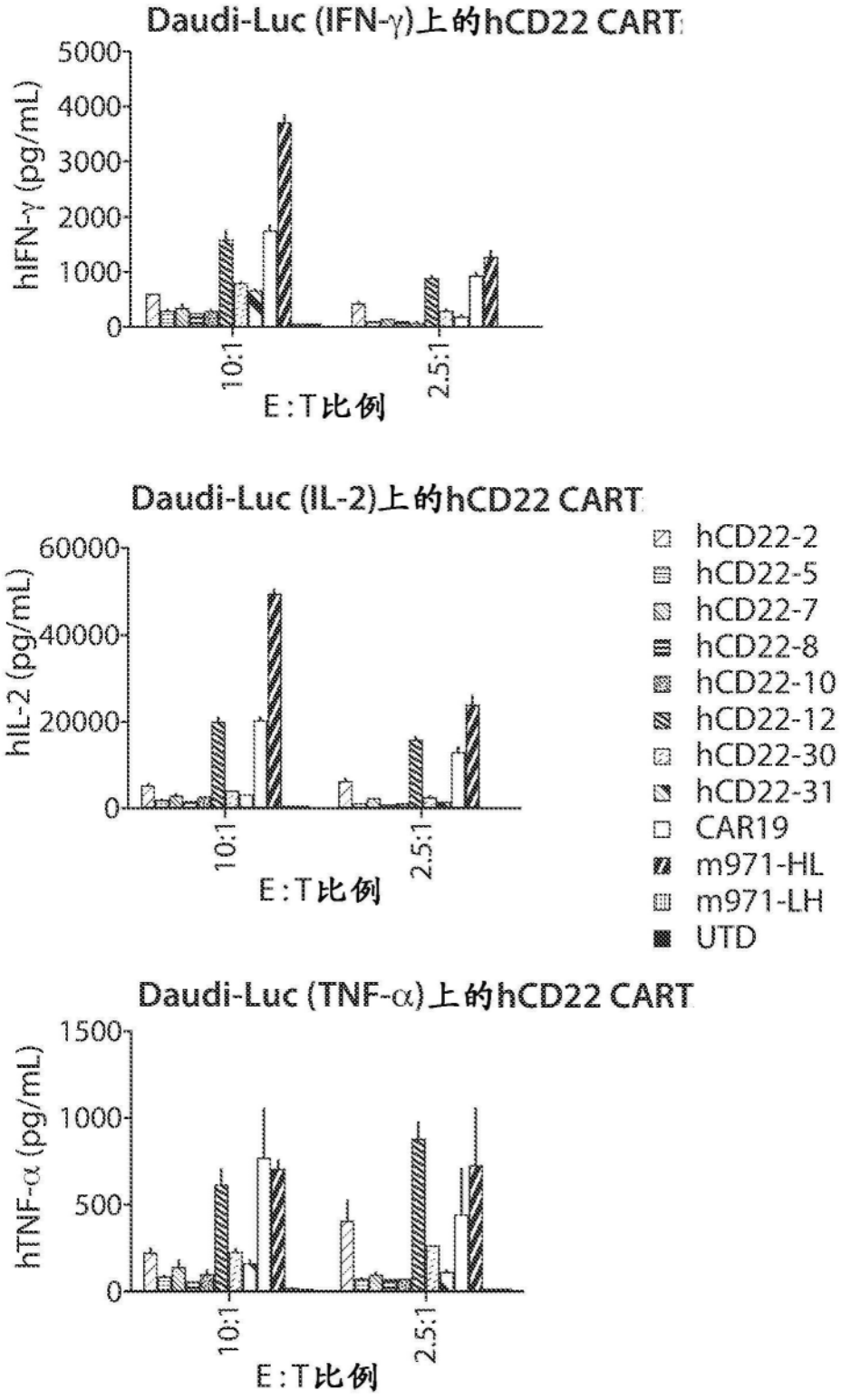

Daudi-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10:1
2.5:1
E:T比例
Daudi-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
60000
40000
20000
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
Daudi-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
1500
1000
500
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21C

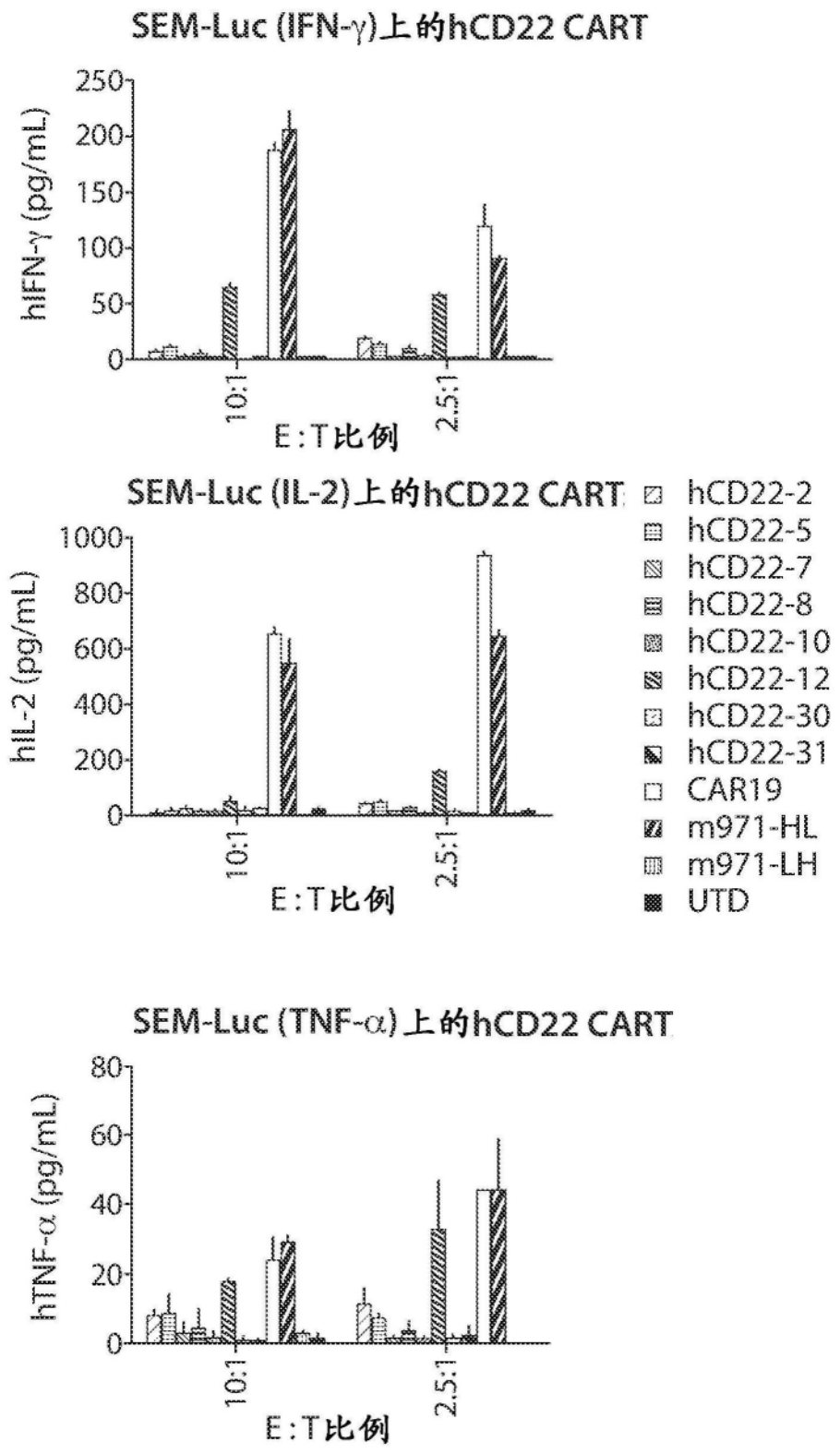

SEM-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
E:T比例
SEM-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
1000
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
SEM-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
80
60
40
20
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21D

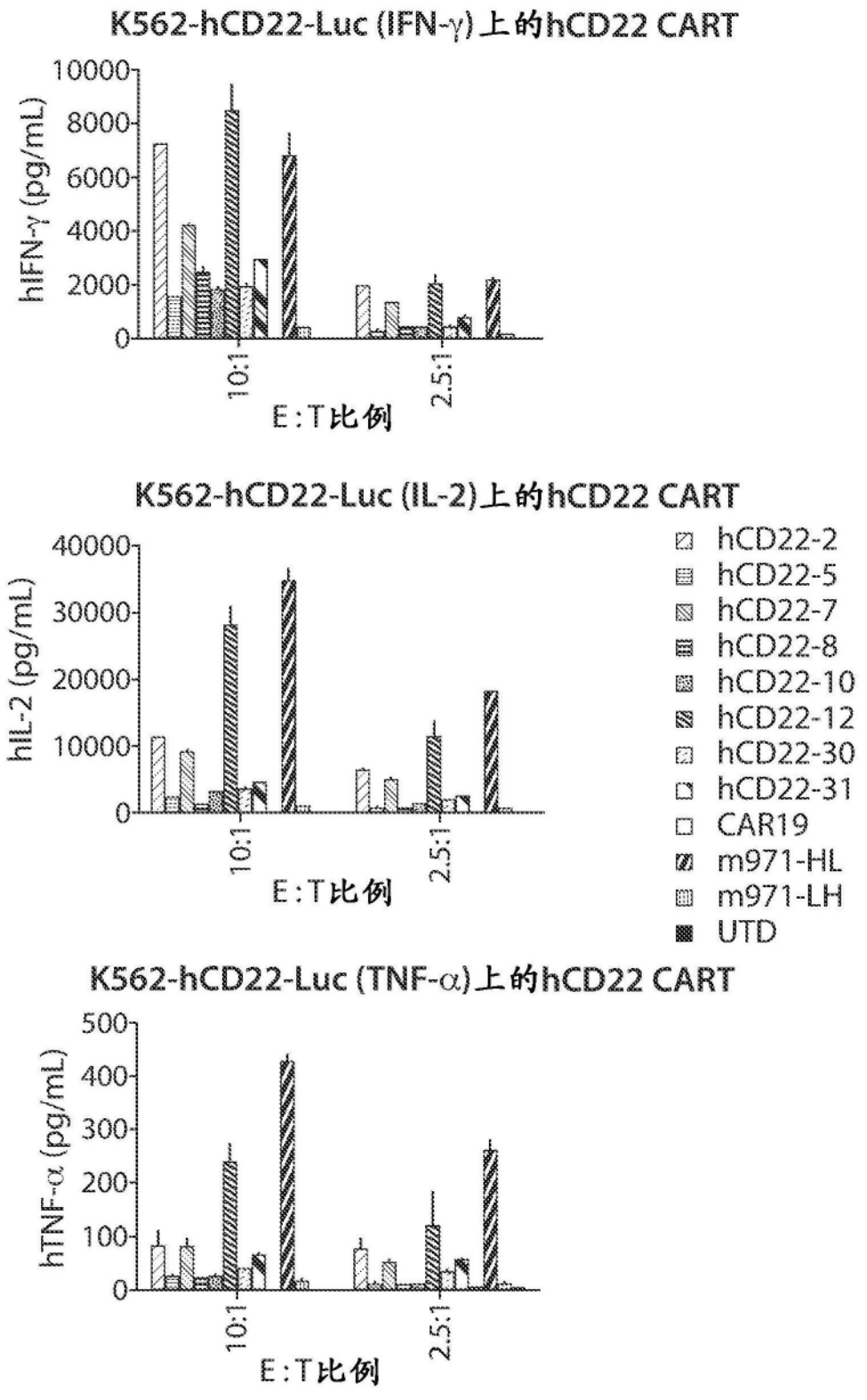

K562-hCD22-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
10:1
2.5:1
E:T比例
K562-hCD22-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
K562-hCD22-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
500
400
300
200
100
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21E

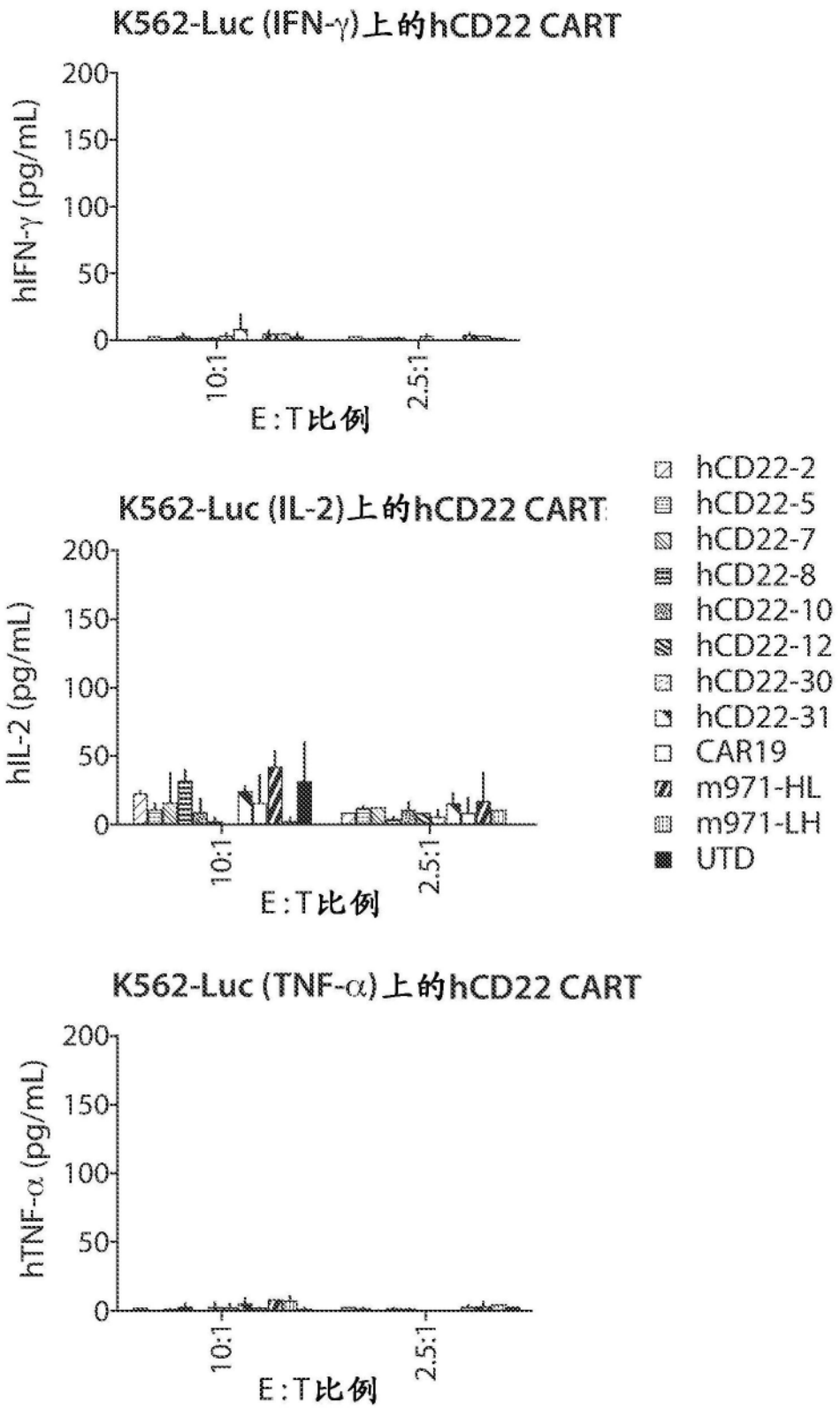

K562-Luc (IFN-γ)上的hCD22 CART
hIFN-γ (pg/mL)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
E:T比例
K562-Luc (IL-2)上的hCD22 CART
hIL-2 (pg/mL)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
E:T比例
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
K562-Luc (TNF-α)上的hCD22 CART
hTNF-α (pg/mL)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
E:T比例

图21F

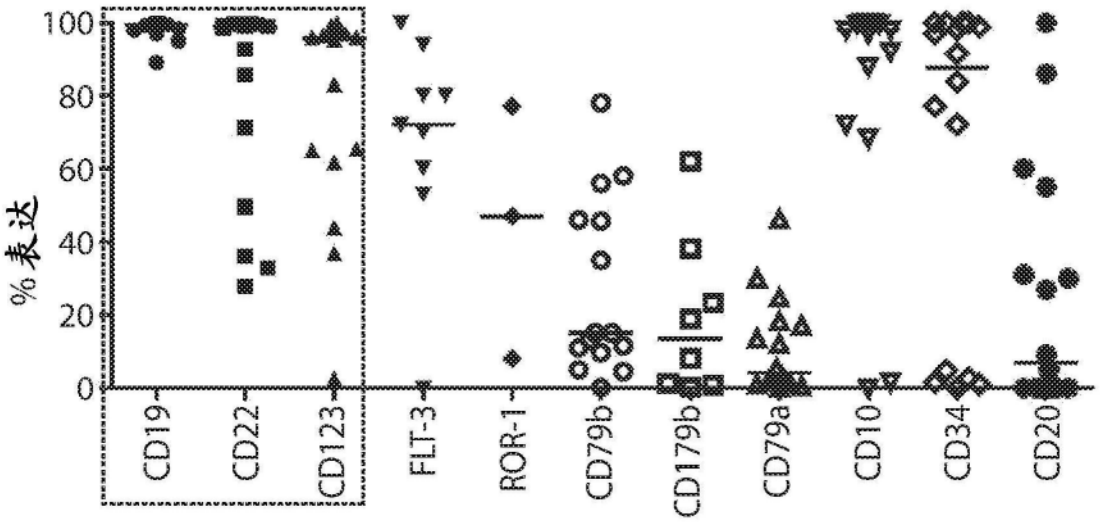

100
80
60
40
20
0
% 表达
CD19
CD22
CD123
FLT-3
ROR-1
CD79b
CD179b
CD79a
CD10
CD34
CD20

图22

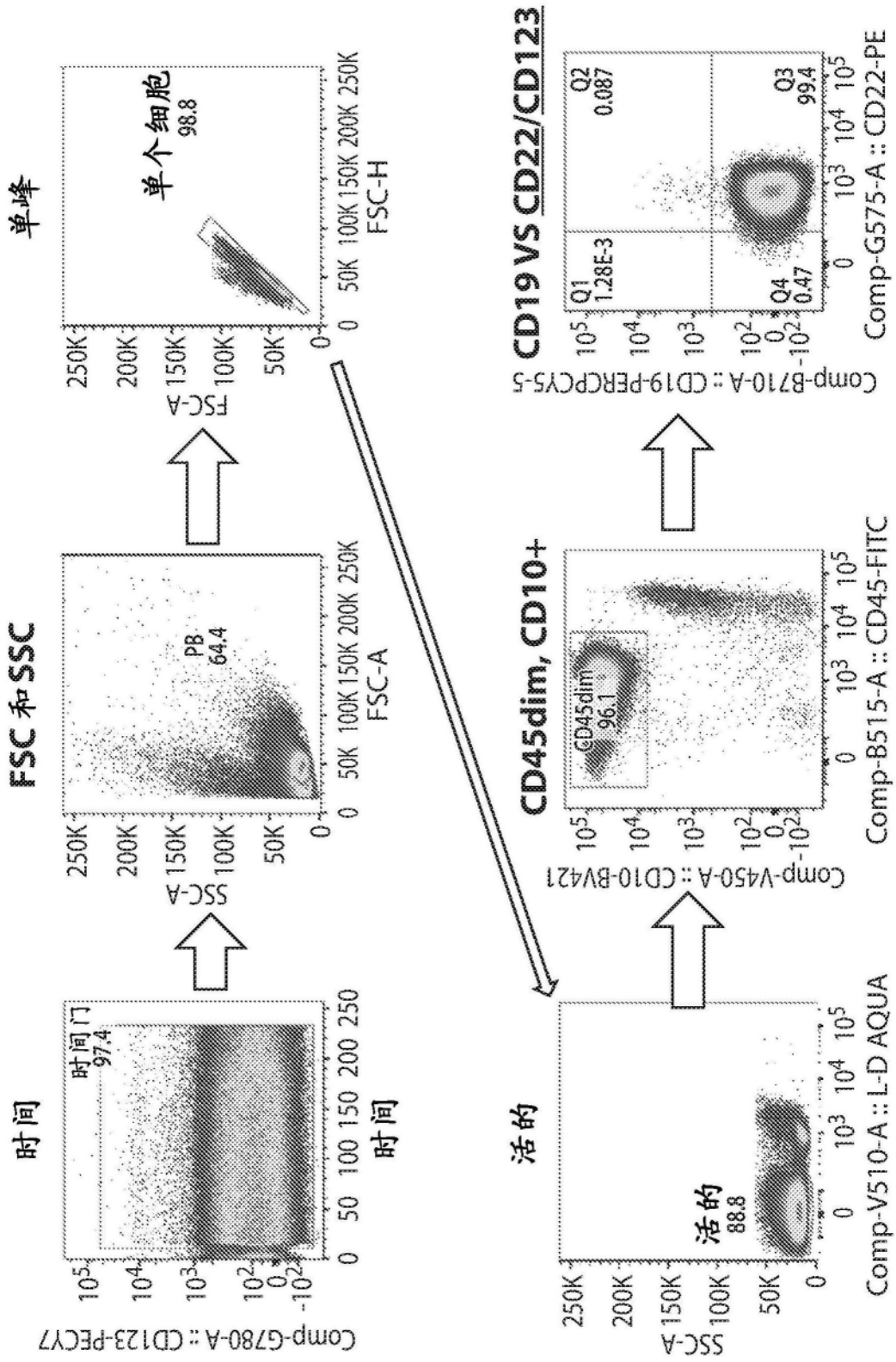

时间
时间门
97.4
Comp-G780-A :: CD123-PECY7
时间
FSC 和 SSC
PB
64.4
SSC-A
FSC-A
单峰
单个细胞
98.8
FSC-A
FSC-H
活的
活的
88.8
SSC-A
Comp-V510-A :: L-D AQUA
CD45dim, CD10+
CD45dim
96.1
Comp-V450-A :: CD10-BV421
Comp-B515-A :: CD45-FITC
CD19 VS CD22/CD123
Q1
1.28E-3
Q2
0.087
Q4
0.47
Q3
99.4
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575-A :: CD22-PE

图23

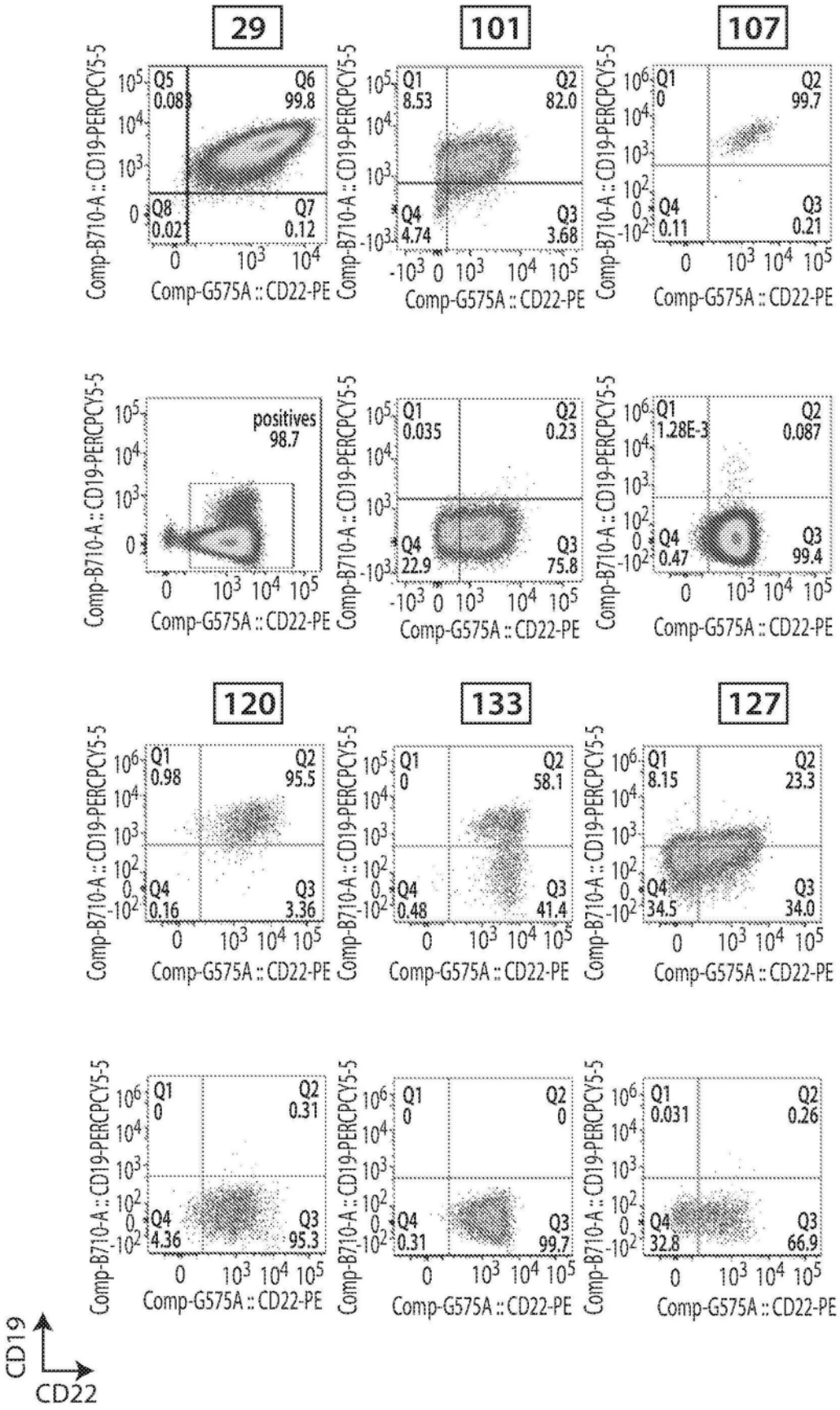

29
101
107
120
133
127
positives
98.7
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575A :: CD22-PE
CD19
CD22

图24

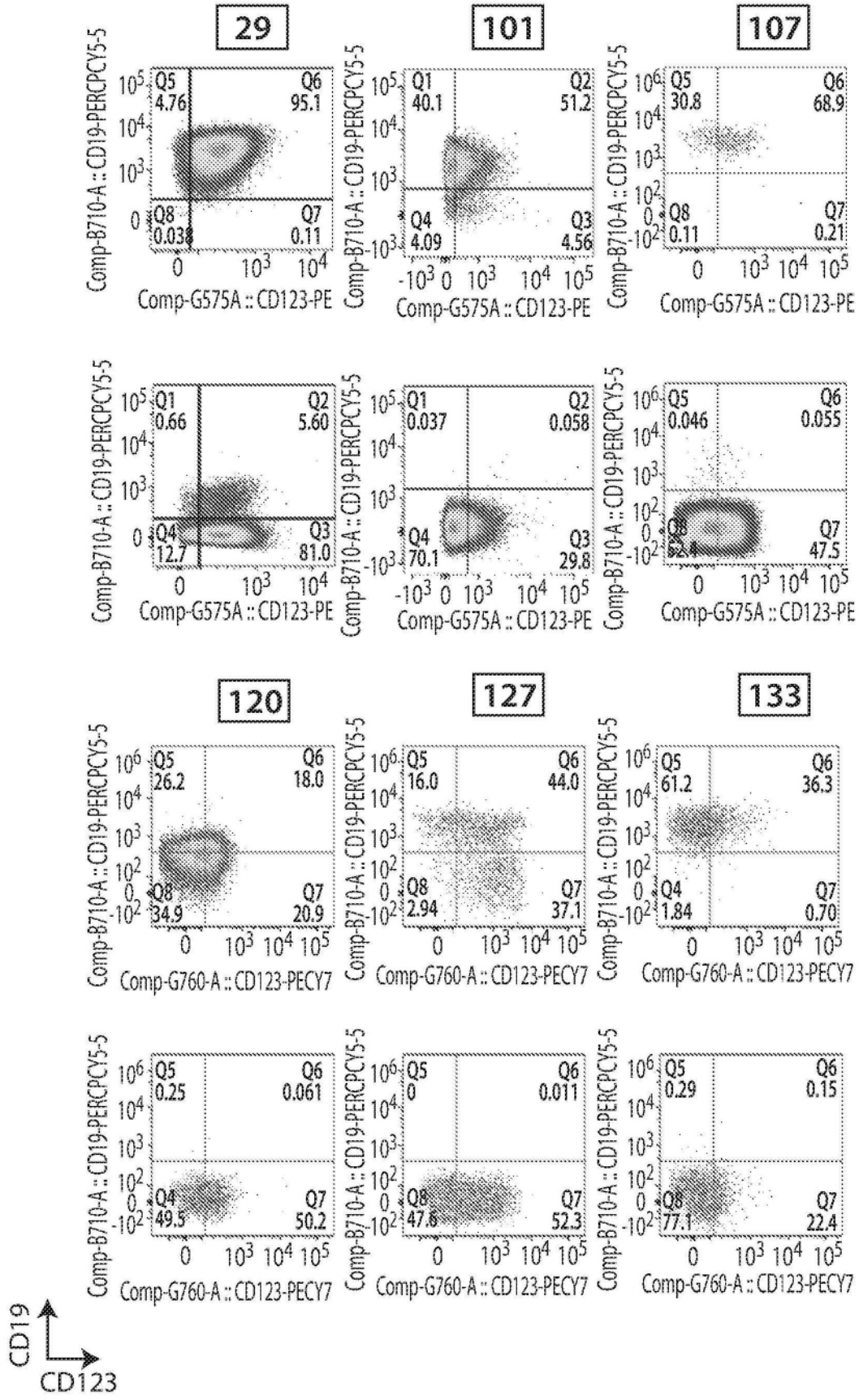

29
101
107
120
127
133
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575A :: CD123-PE
Comp-G760-A :: CD123-PECY7
Q5 4.76
Q6 95.1
Q8 0.038
Q7 0.11
Q1 40.1
Q2 51.2
Q4 4.09
Q3 4.56
Q5 30.8
Q6 68.9
Q8 0.11
Q7 0.21
Q1 0.66
Q2 5.60
Q4 12.7
Q3 81.0
Q1 0.037
Q2 0.058
Q4 70.1
Q3 29.8
Q5 0.046
Q6 0.055
Q7 47.5
Q5 26.2
Q6 18.0
Q8 34.9
Q7 20.9
Q5 16.0
Q6 44.0
Q8 2.94
Q7 37.1
Q5 61.2
Q6 36.3
Q4 1.84
Q7 0.70
Q5 0.25
Q6 0.061
Q4 49.5
Q7 50.2
Q5 0
Q6 0.011
Q8 47.6
Q7 52.3
Q5 0.29
Q6 0.15
Q8 77.1
Q7 22.4
CD19
CD123

图25

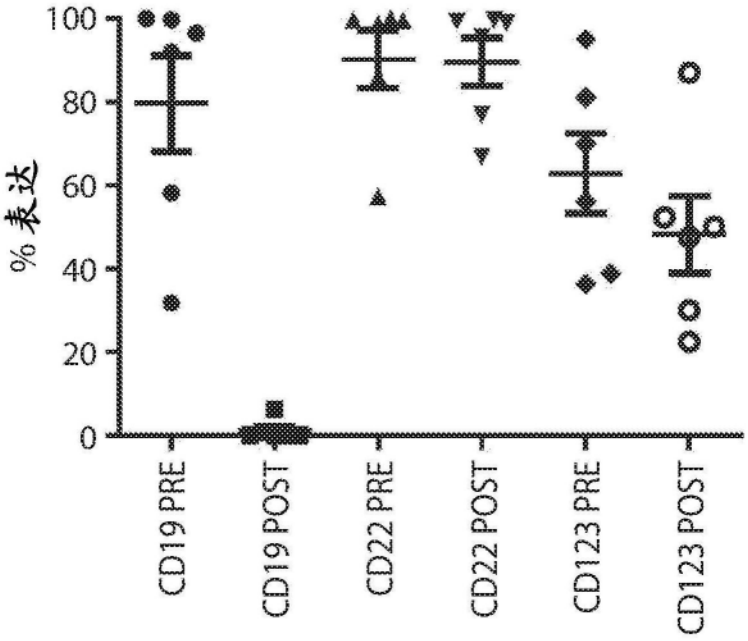

100
80
60
40
20
0
% 表达
CD19 PRE
CD19 POST
CD22 PRE
CD22 POST
CD123 PRE
CD123 POST

图26

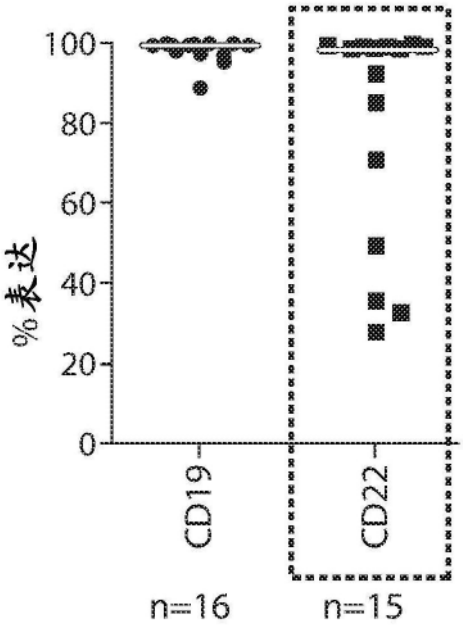

100
80
60
40
20
0
% 表达
CD19
CD22
n=16
n=15

图27A

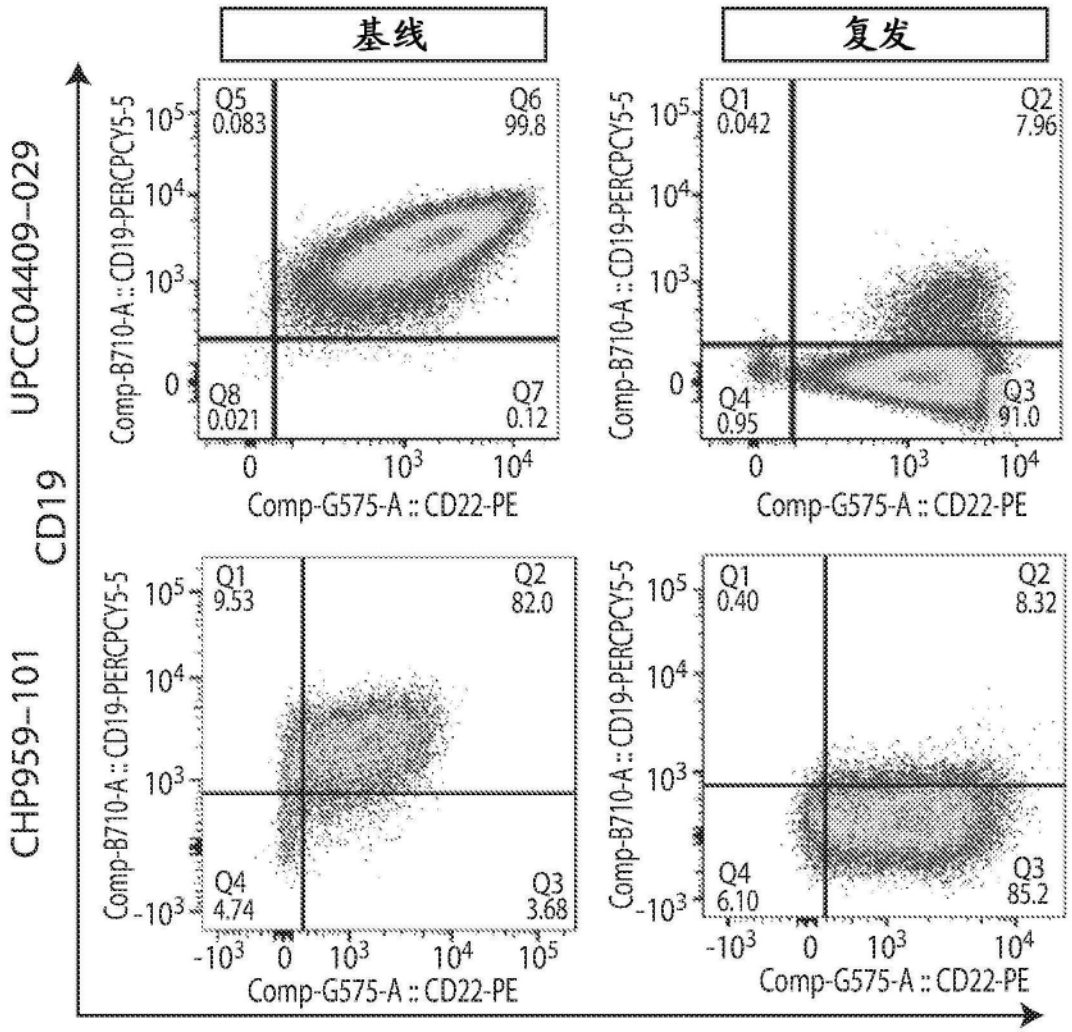

基线
复发
UPCC04409-029
CD19
CHP959-101
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575-A :: CD22-PE
Q5 0.083
Q6 99.8
Q8 0.021
Q7 0.12
Q1 0.042
Q2 7.96
Q4 0.95
Q3 91.0
Q1 9.53
Q2 82.0
Q4 4.74
Q3 3.68
Q1 0.40
Q2 8.32
Q4 6.10
Q3 85.2

图27B

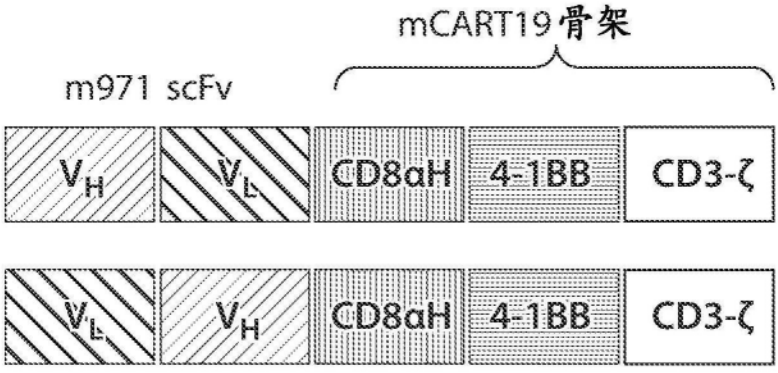

mCART19骨架
m971 scFv
VH
VL
CD8αH
4-1BB
CD3-ζ
VL
VH
CD8αH
4-1BB
CD3-ζ

图28A

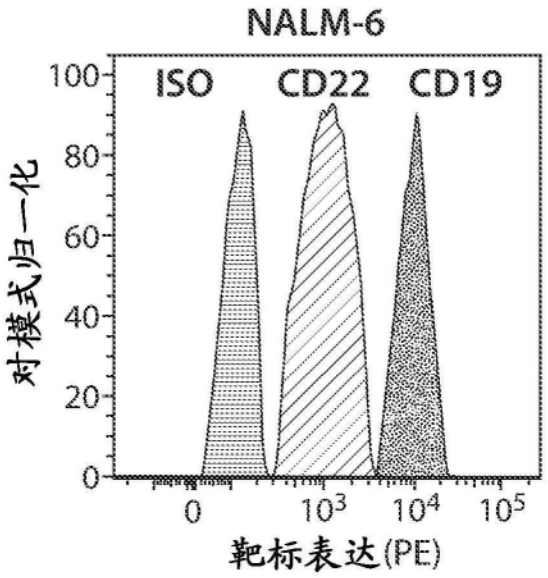

NALM-6
ISO
CD22
CD19
对模式归一化
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
靶标表达(PE)

图28B

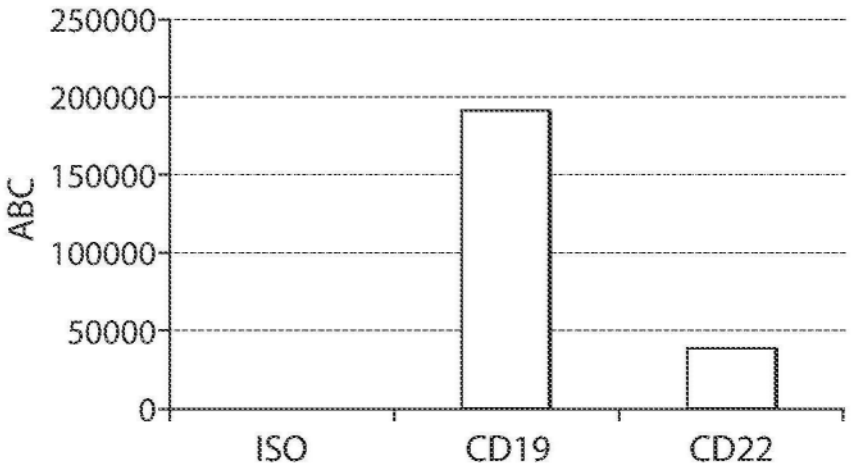

250000
200000
150000
100000
50000
0
ABC
ISO
CD19
CD22

图28C

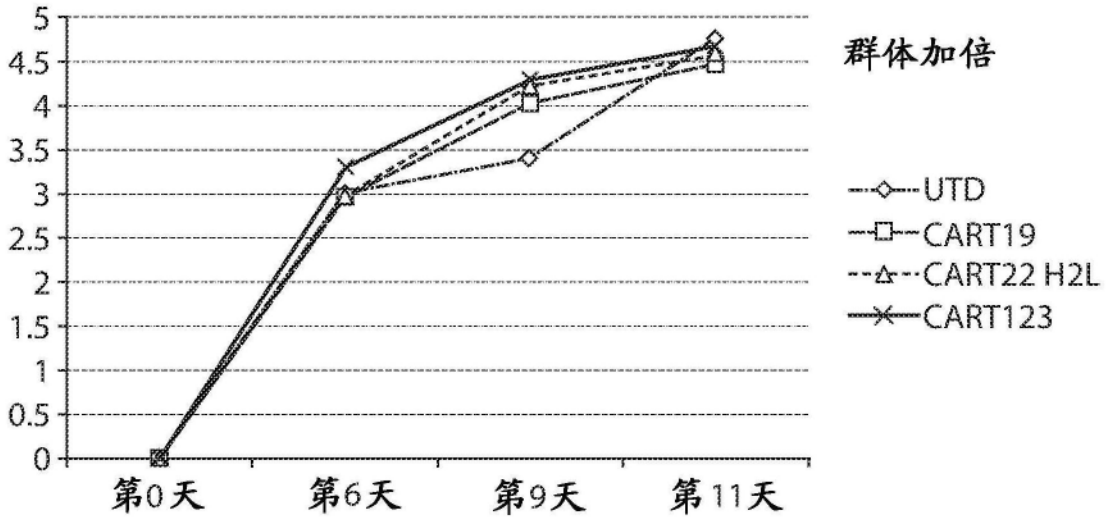

群体加倍
UTD
CART19
CART22 H2L
CART123
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
第0天
第6天
第9天
第11天

图29A

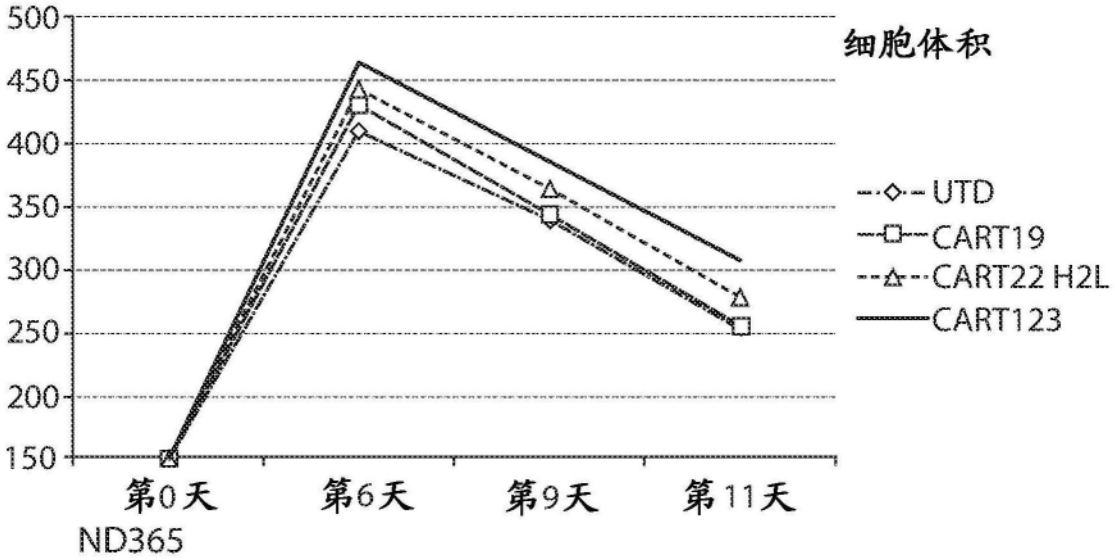

细胞体积
UTD
CART19
CART22 H2L
CART123
500
450
400
350
300
250
200
150
第0天
第6天
第9天
第11天
ND365

图29B

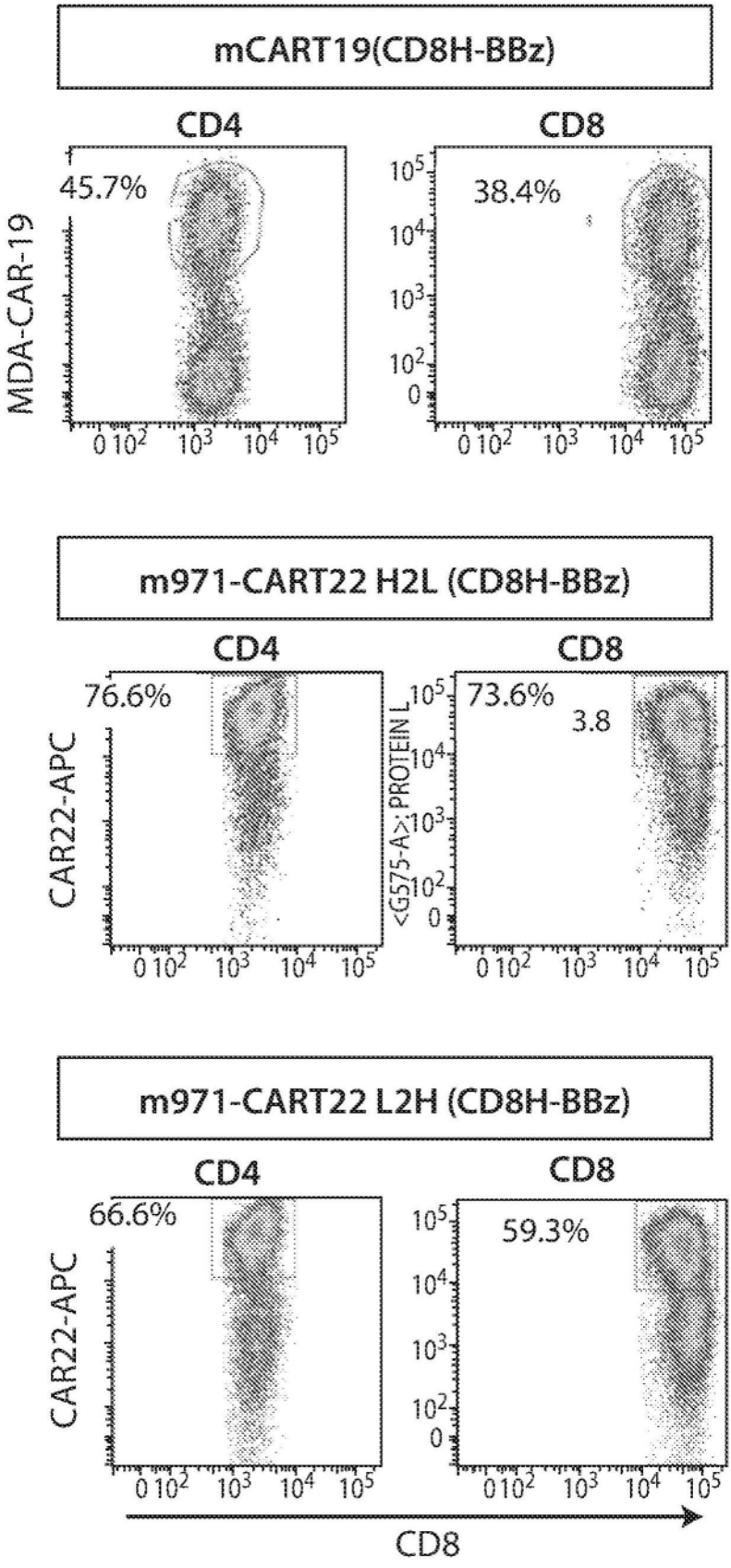

mCART19(CD8H-BBz)
CD4
CD8
MDA-CAR-19
45.7%
38.4%
m971-CART22 H2L (CD8H-BBz)
CD4
CD8
CAR22-APC
76.6%
73.6%
3.8
<G575-A>: PROTEIN L
m971-CART22 L2H (CD8H-BBz)
CD4
CD8
CAR22-APC
66.6%
59.3%
CD8

图29C

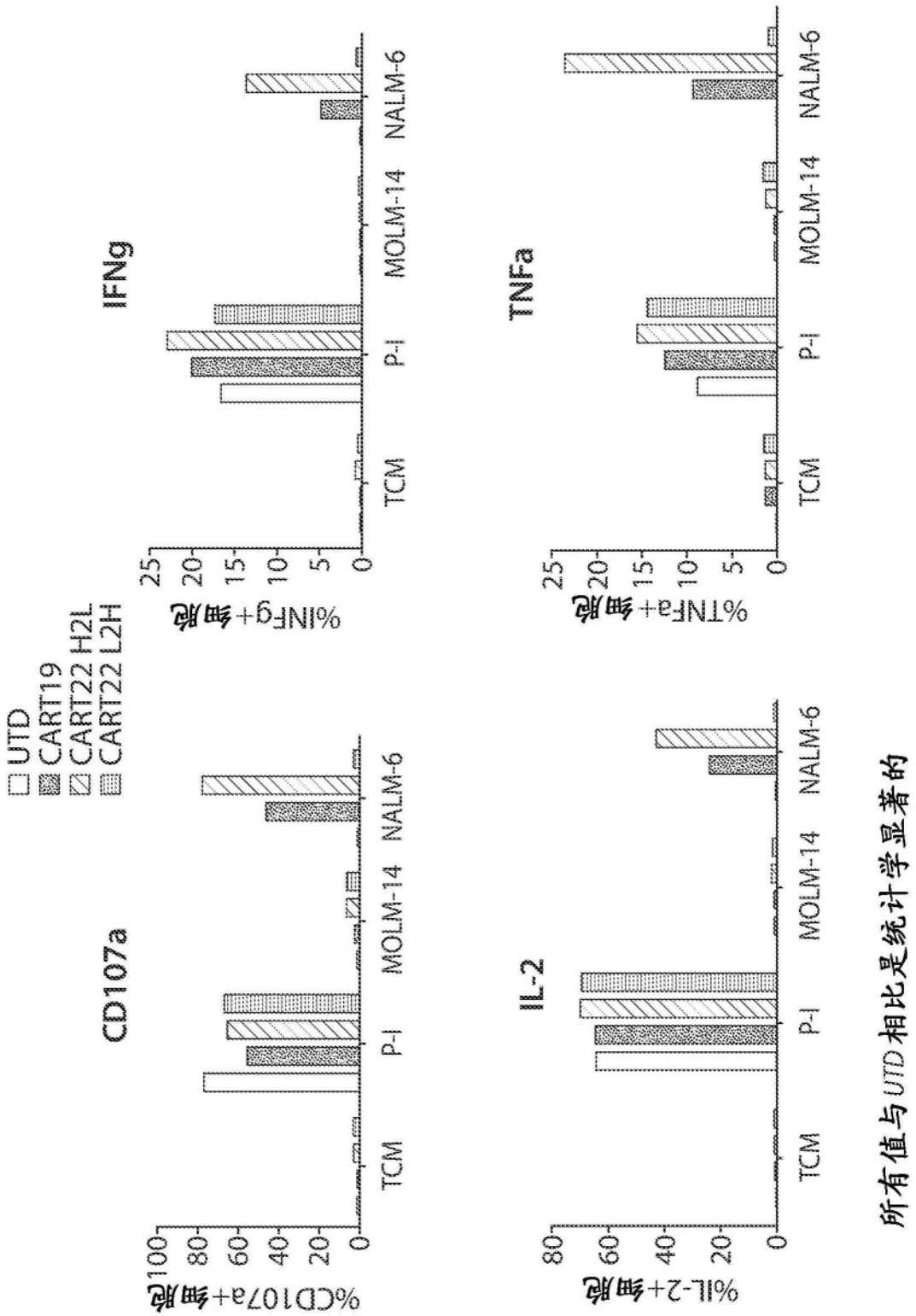

UTD
CART19
CART22 H2L
CART22 L2H
CD107a
%CD107a+细胞
IFNg
%INFg+细胞
TNFa
%TNFa+细胞
IL-2
%IL-2+细胞
TCM
P-I
MOLM-14
NALM-6
所有值与UTD相比是统计学显著的

图30

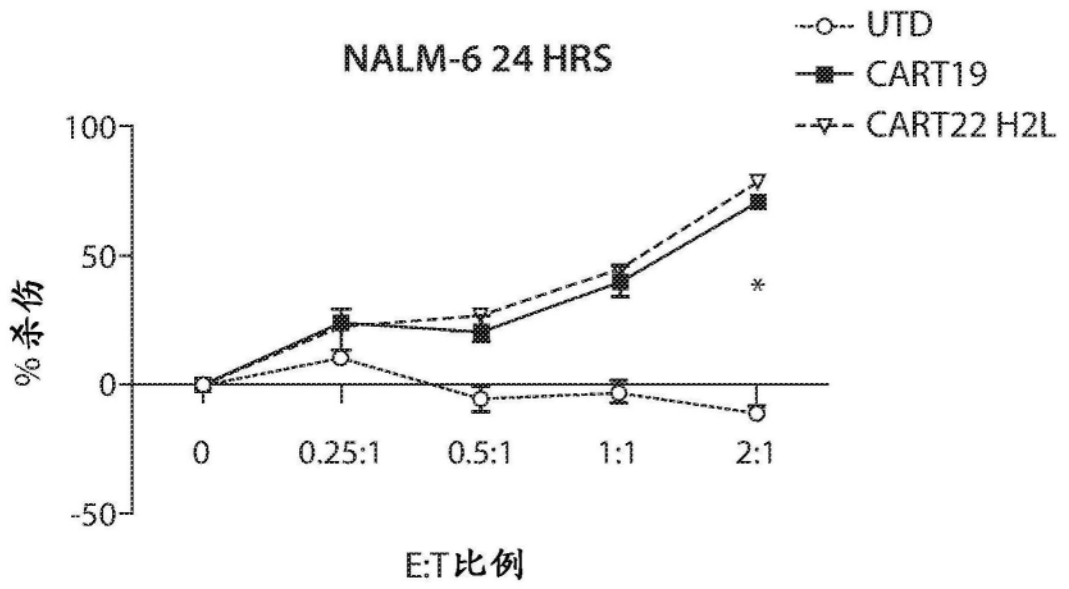

NALM-6 24 HRS
UTD
CART19
CART22 H2L
100
50
0
-50
% 杀伤
*
0
0.25:1
0.5:1
1:1
2:1
E:T比例

图31

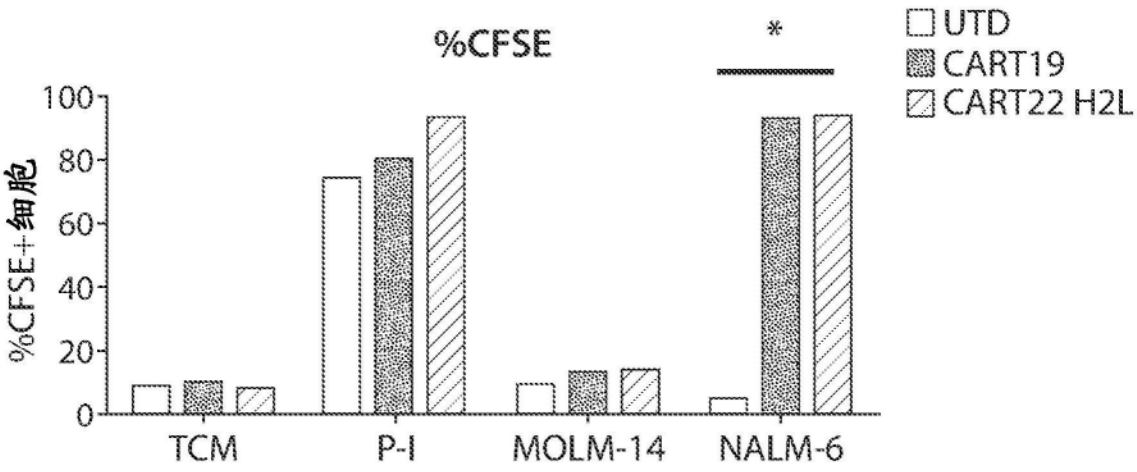

%CFSE
*
UTD
CART19
CART22 H2L
100
80
60
40
20
0
%CFSE+细胞
TCM
P-I
MOLM-14
NALM-6

图32A

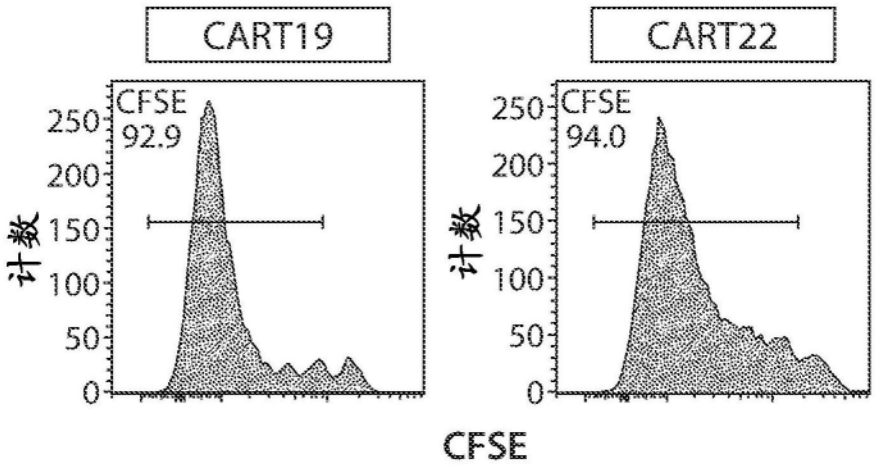

CART19
CFSE
92.9
250
200
150
100
50
0
计数
CART22
CFSE
94.0
250
200
150
100
50
0
计数
CFSE

图32B

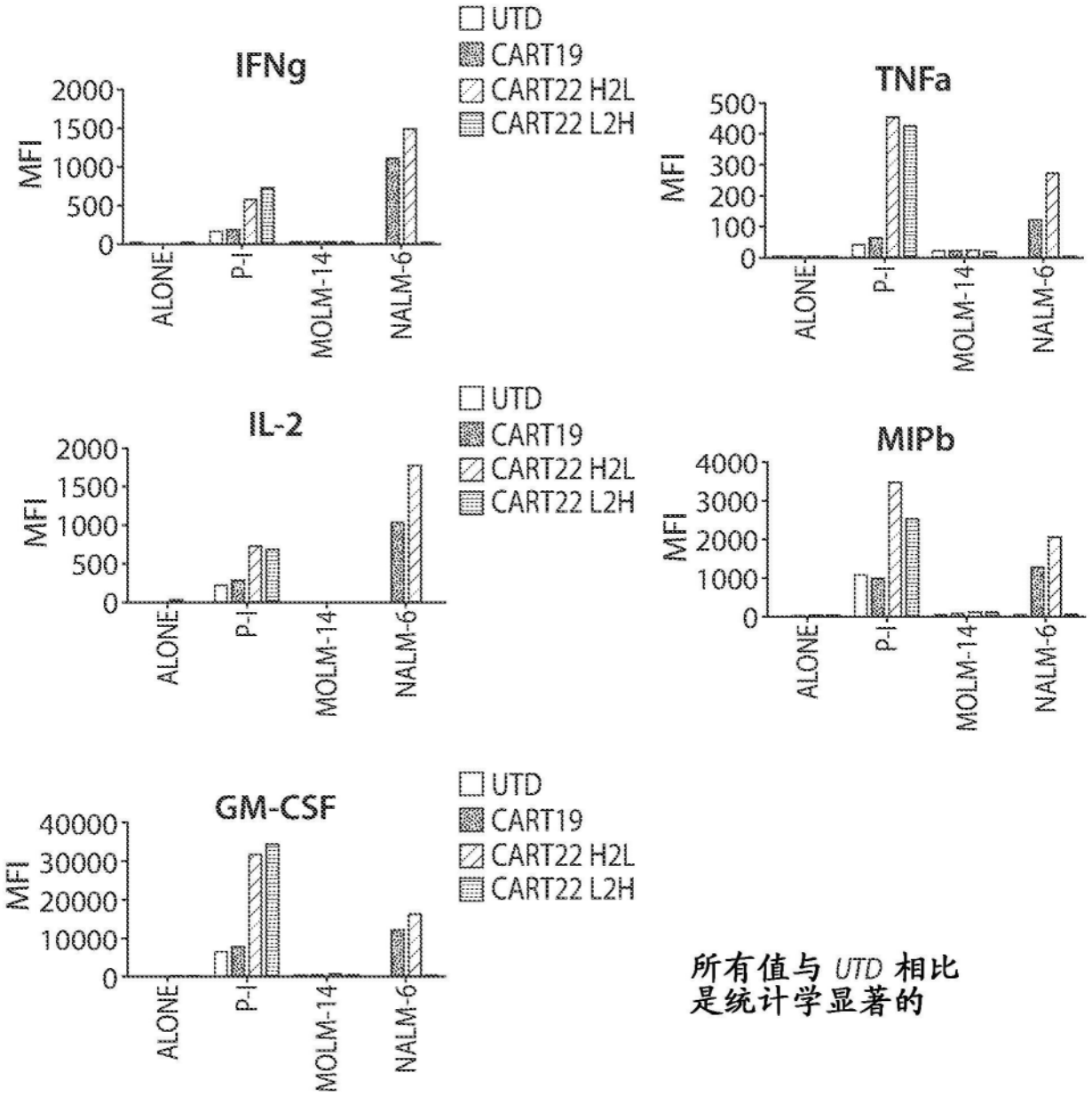

IFNg
MFI
2000
1500
1000
500
0
ALONE
P-I
MOLM-14
NALM-6
UTD
CART19
CART22 H2L
CART22 L2H
TNFa
MFI
500
400
300
200
100
0
ALONE
P-I
MOLM-14
NALM-6
IL-2
MFI
2000
1500
1000
500
0
ALONE
P-I
MOLM-14
NALM-6
UTD
CART19
CART22 H2L
CART22 L2H
MIPb
MFI
4000
3000
2000
1000
0
ALONE
P-I
MOLM-14
NALM-6
GM-CSF
MFI
40000
30000
20000
10000
0
ALONE
P-I
MOLM-14
NALM-6
UTD
CART19
CART22 H2L
CART22 L2H
所有值与 UTD 相比
是统计学显著的

图33

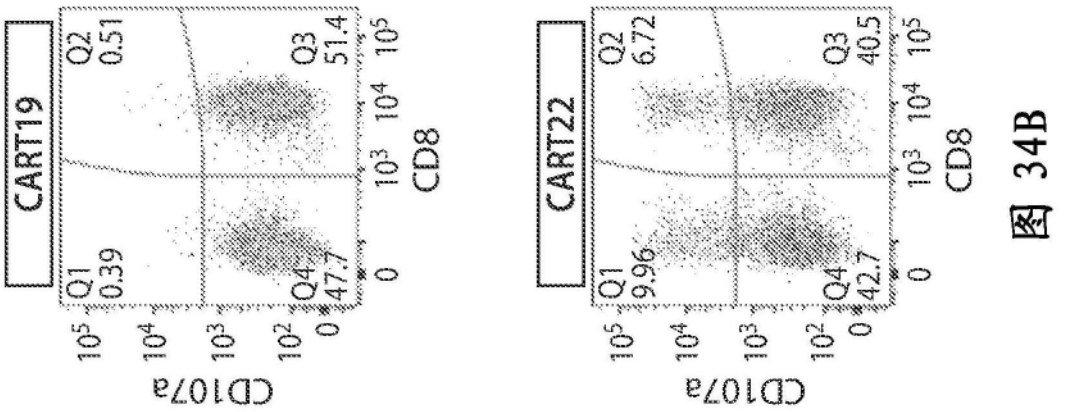

CART19
Q1 0.39
Q2 0.51
Q3 51.4
Q4 47.7
CD107a
CD8
CART22
Q1 9.96
Q2 6.72
Q3 40.5
Q4 42.7
CD107a
CD8

图 34B

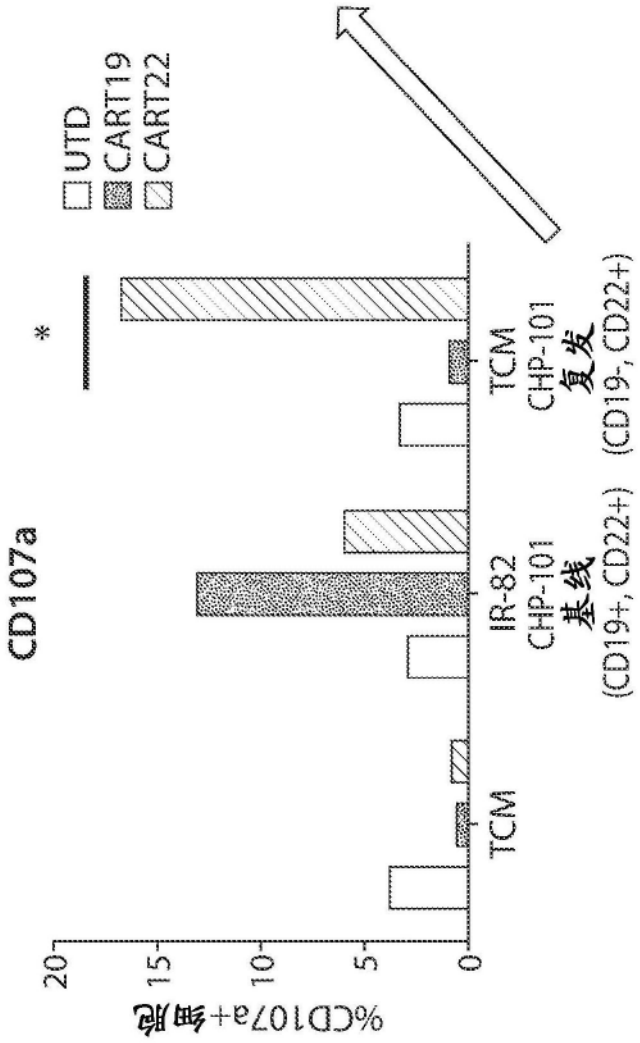

UTD
CART19
CART22
*
CD107a
%CD107a+细胞
TCM
IR-82
CHP-101
基线
(CD19+, CD22+)
TCM
CHP-101
复发
(CD19-, CD22+)

图 34A

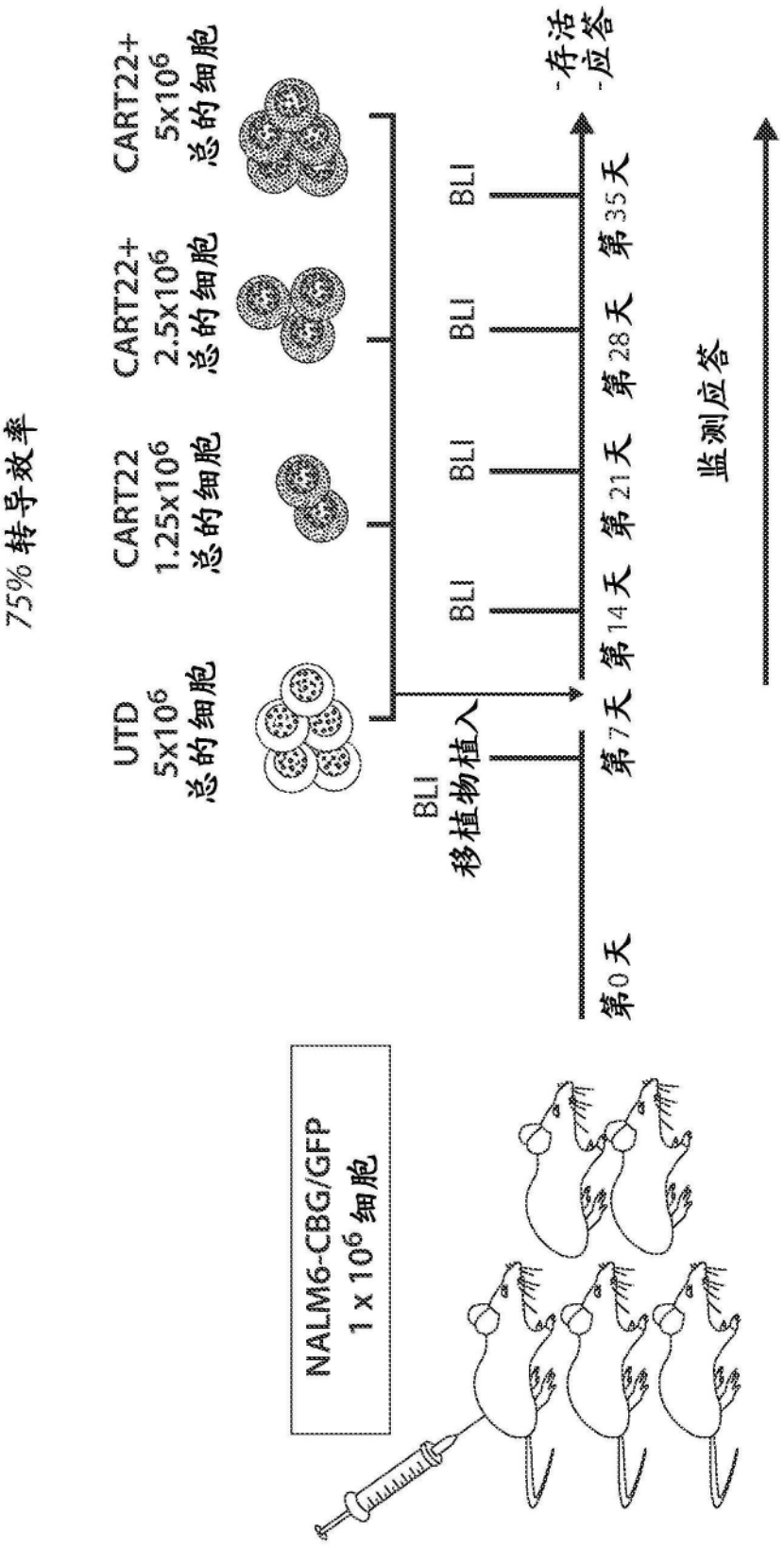

75% 转导效率
UTD
5x10^6
总的细胞
CART22
1.25x10^6
总的细胞
CART22+
2.5x10^6
总的细胞
CART22+
5x10^6
总的细胞
BLI
移植物植入
BLI
BLI
BLI
BLI
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
监测应答
-存活
-应答
NALM6-CBG/GFP
1 x 10^6 细胞

图35A

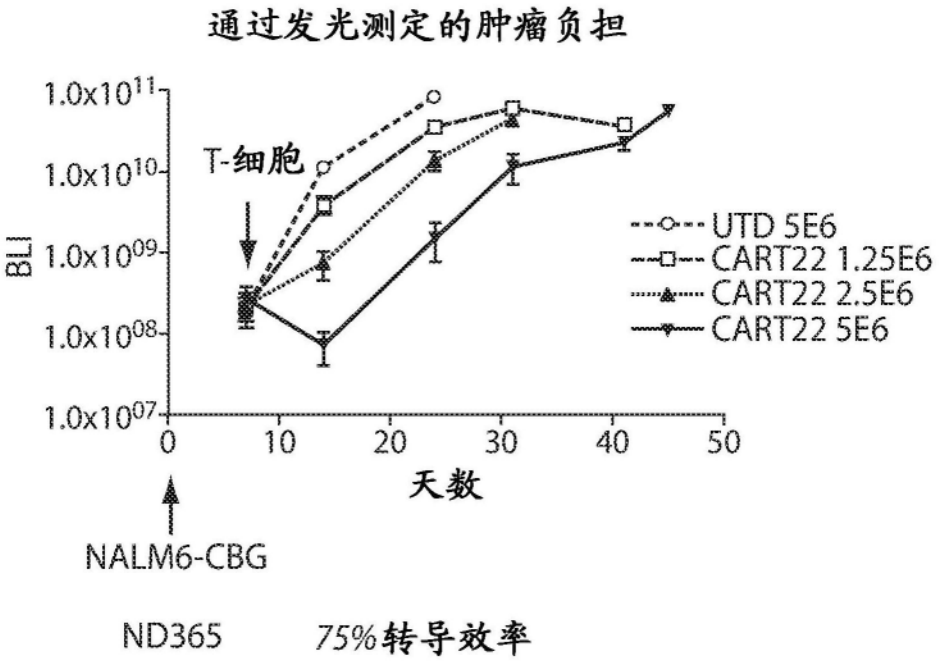

通过发光测定的肿瘤负担
1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
BLI
T-细胞
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6
0
10
20
30
40
50
天数
NALM6-CBG
ND365
75%转导效率

图35B

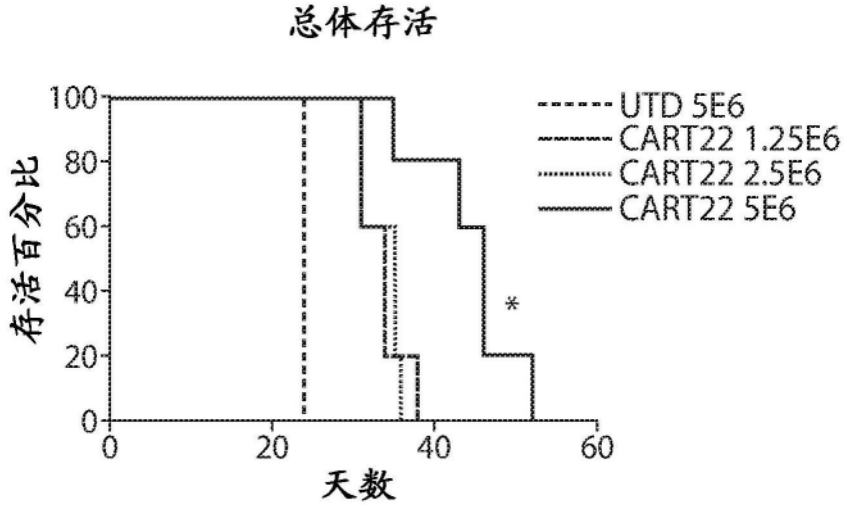

总体存活
100
80
60
40
20
0
存活百分比
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6
*
0
20
40
60
天数

图35C

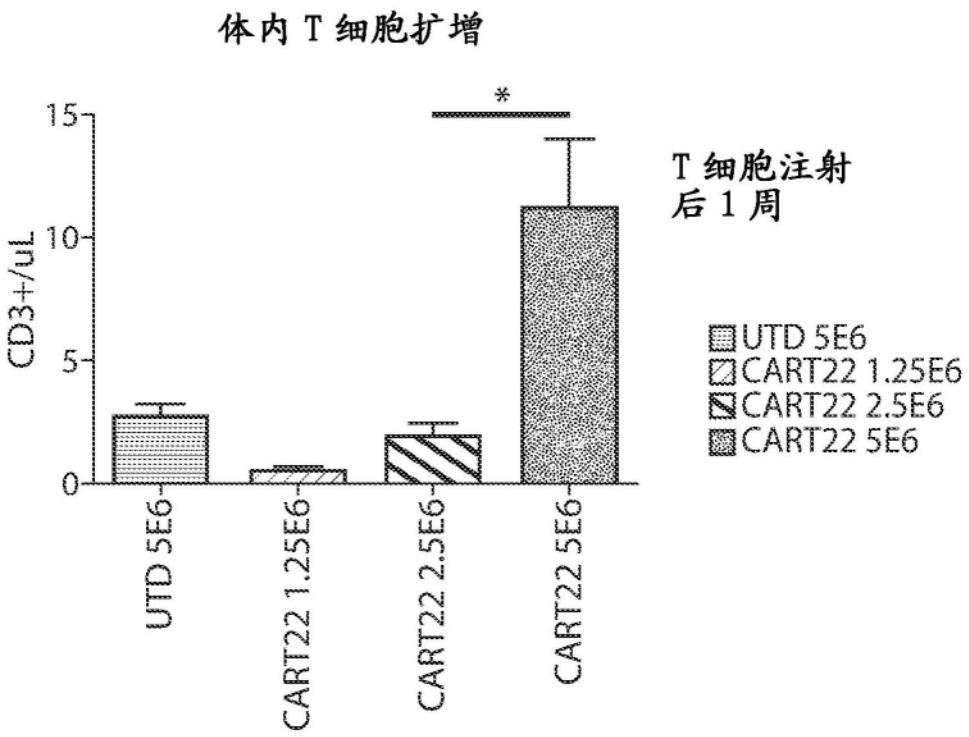

体内 T 细胞扩增
*
15
10
5
0
CD3+/uL
T 细胞注射
后 1 周
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6

图35D

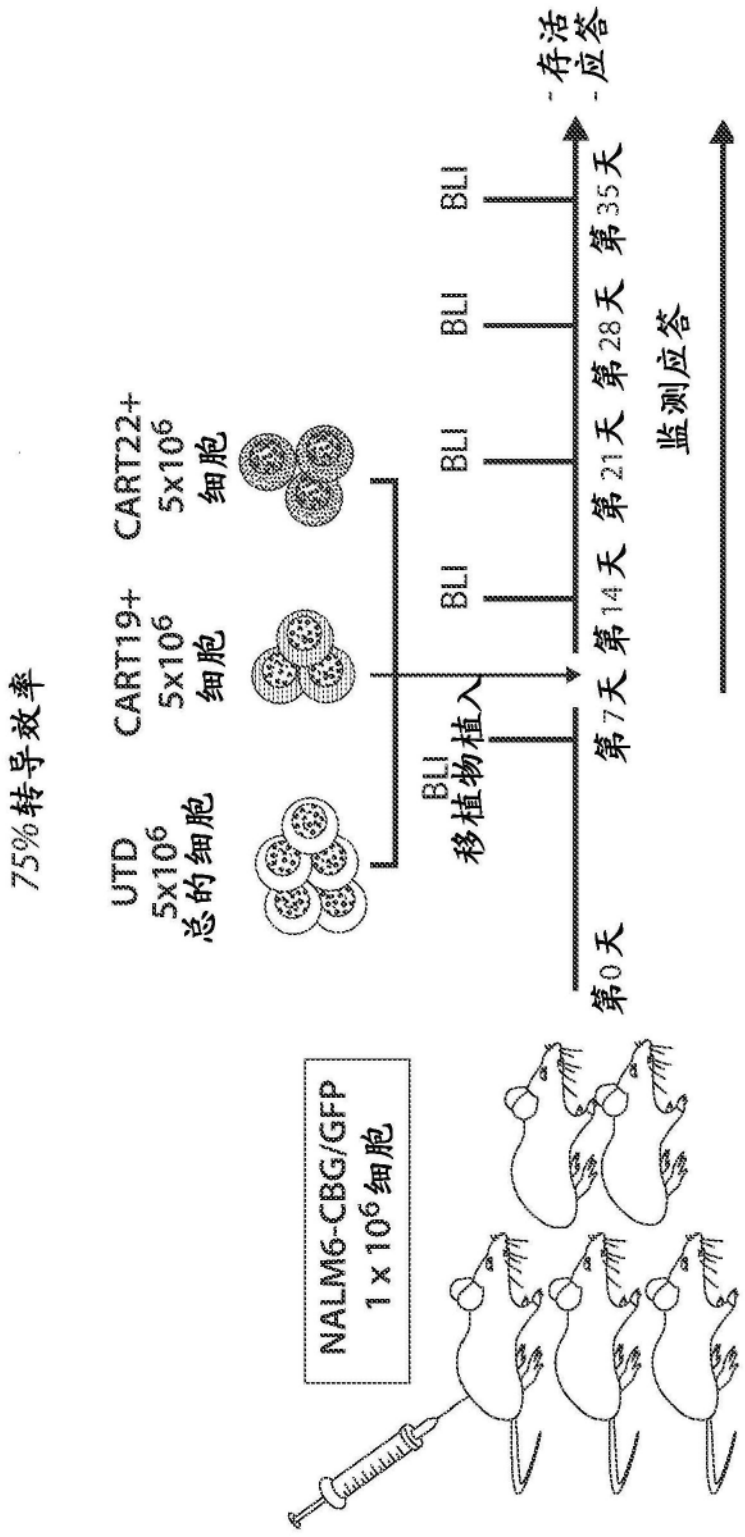

75%转导效率
UTD
5x10^6
总的细胞
CART19+
5x10^6
细胞
CART22+
5x10^6
细胞
BLI
移植物植入
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
BLI
BLI
BLI
BLI
监测应答
-存活
-应答
NALM6-CBG/GFP
1 x 10^6细胞

图36A

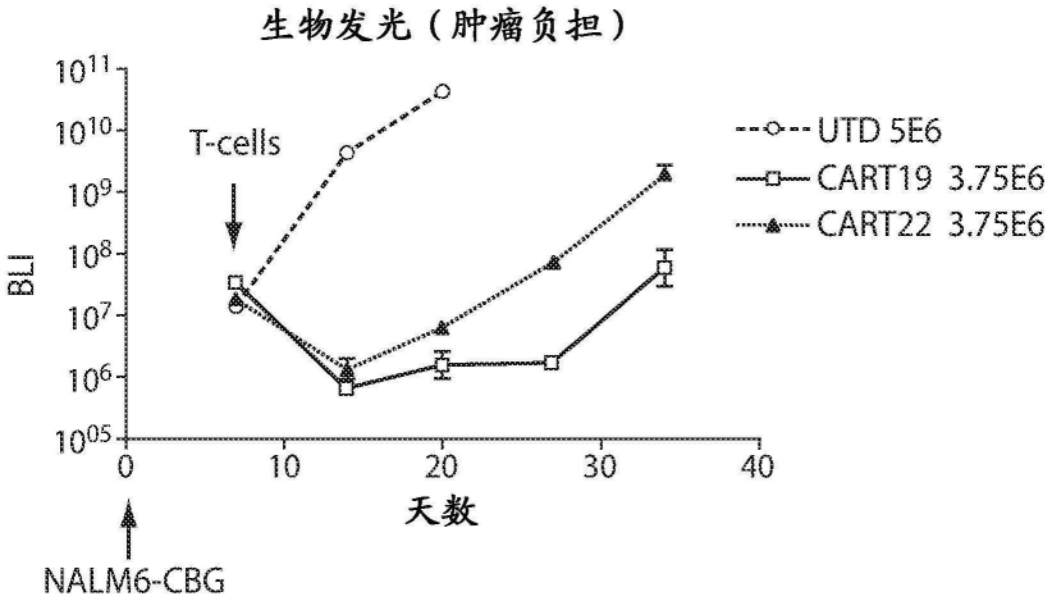

生物发光（肿瘤负担）
BLI
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{05}
T-cells
0
10
20
30
40
天数
NALM6-CBG
UTD 5E6
CART19 3.75E6
CART22 3.75E6

图36B

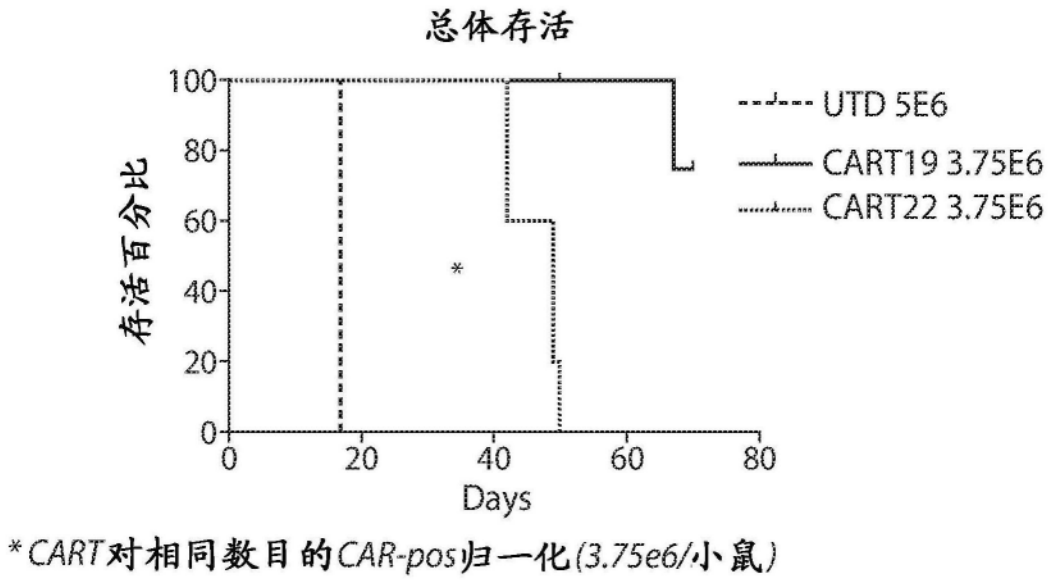

总体存活
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
Days
*
UTD 5E6
CART19 3.75E6
CART22 3.75E6
*CART对相同数目的CAR-pos归一化(3.75e6/小鼠)

图36C

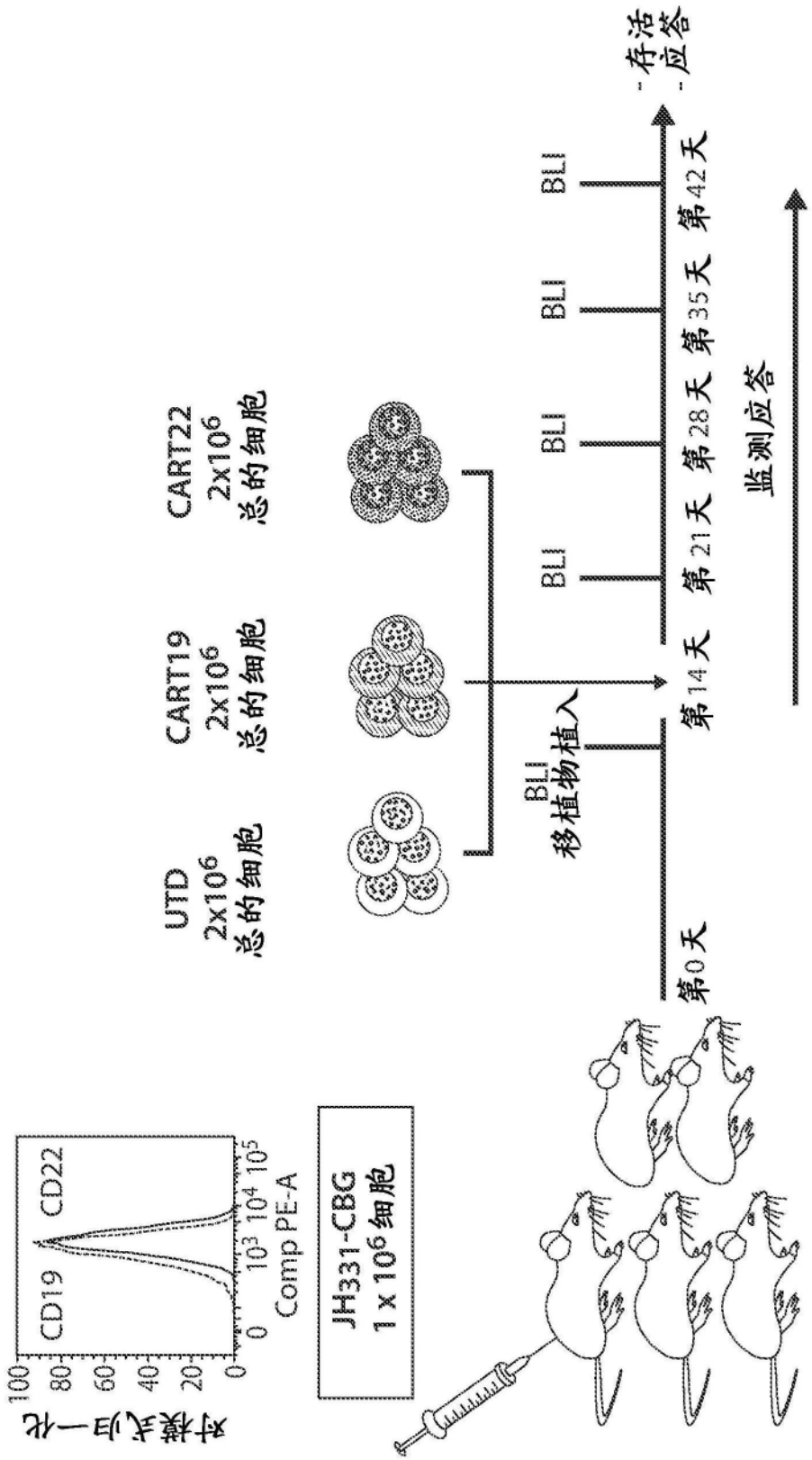

对模式归一化
CD19
CD22
Comp PE-A
JH331-CBG
1 x 10^6细胞
第0天
BLI
移植物植入
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
BLI
监测应答
- 存活
- 应答
UTD
2x10^6
总的细胞
CART19
2x10^6
总的细胞
CART22
2x10^6
总的细胞

图37A

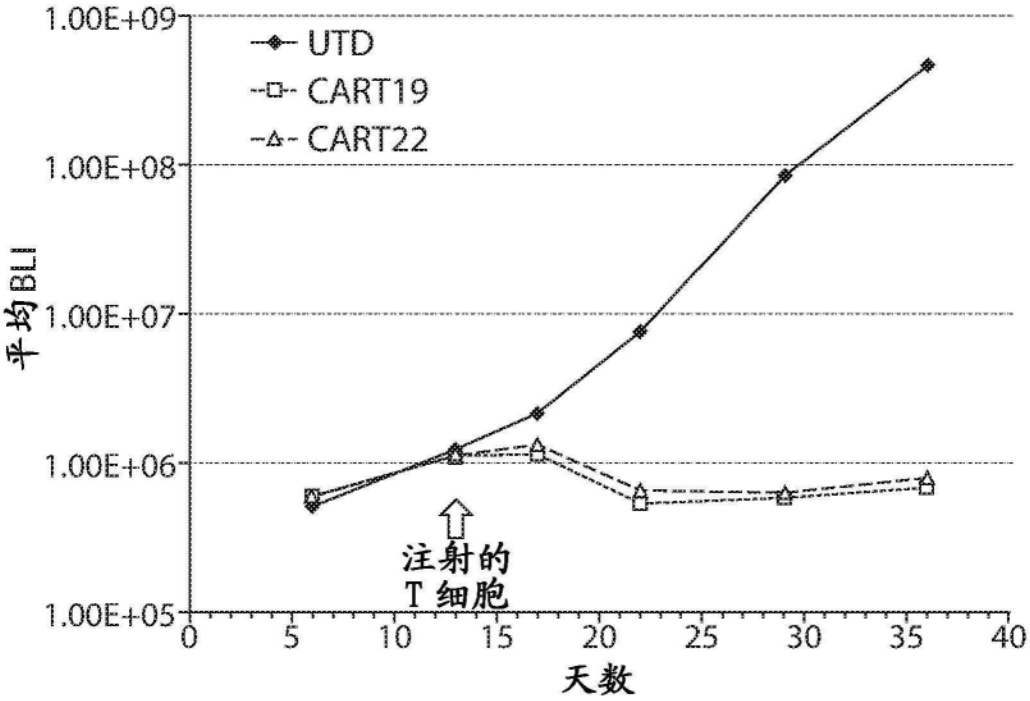

1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
平均BLI
UTD
CART19
CART22
注射的
T 细胞
0
5
10
15
20
25
30
35
40
天数

图37B

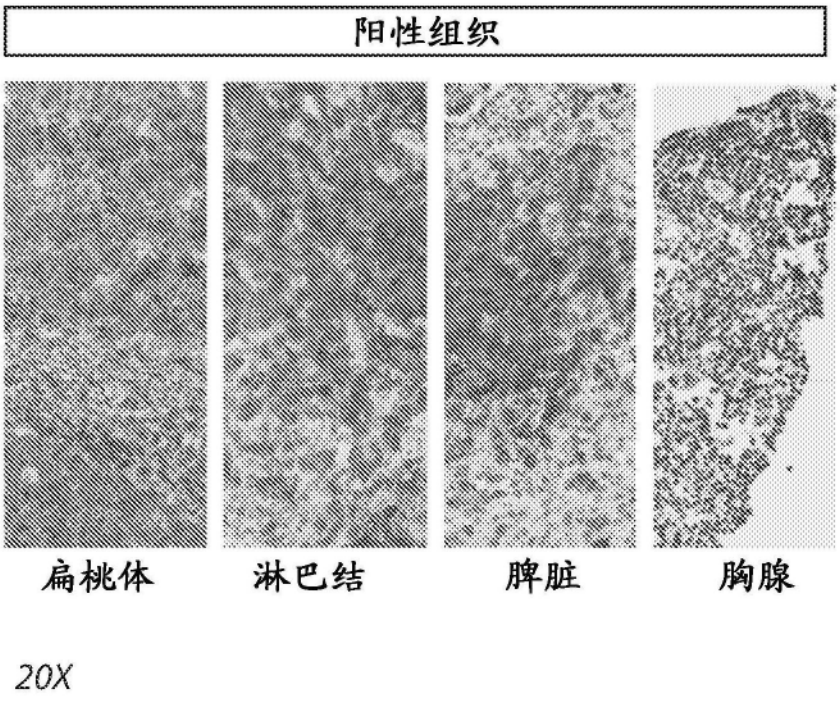

阳性组织
扁桃体
淋巴结
脾脏
胸腺
20X

图38A

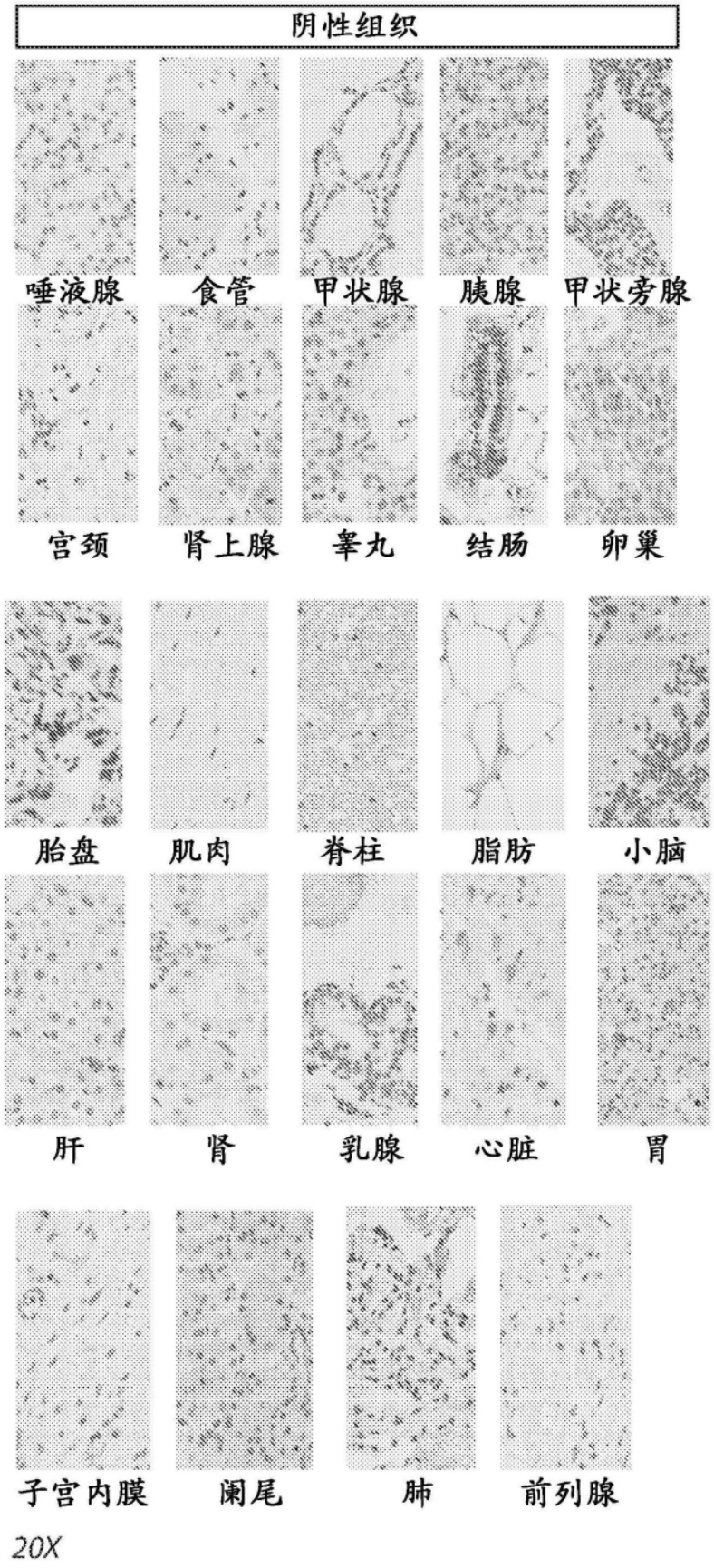

阴性组织
唾液腺
食管
甲状腺
胰腺
甲状旁腺
宫颈
肾上腺
睾丸
结肠
卵巢
胎盘
肌肉
脊柱
脂肪
小脑
肝
肾
乳腺
心脏
胃
子宫内膜
阑尾
肺
前列腺
20X

图38B

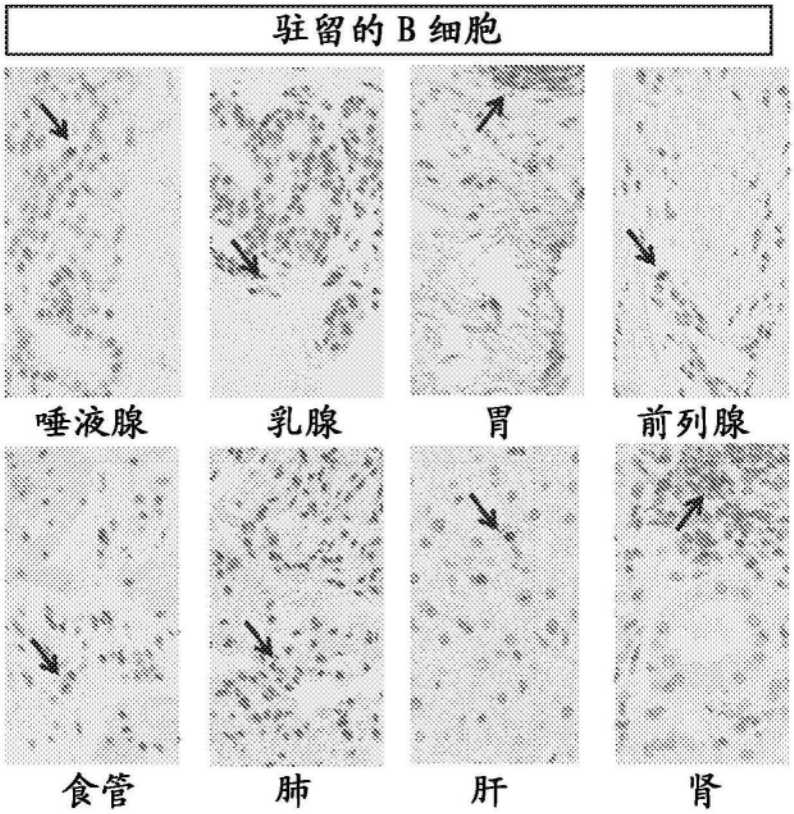


图38C

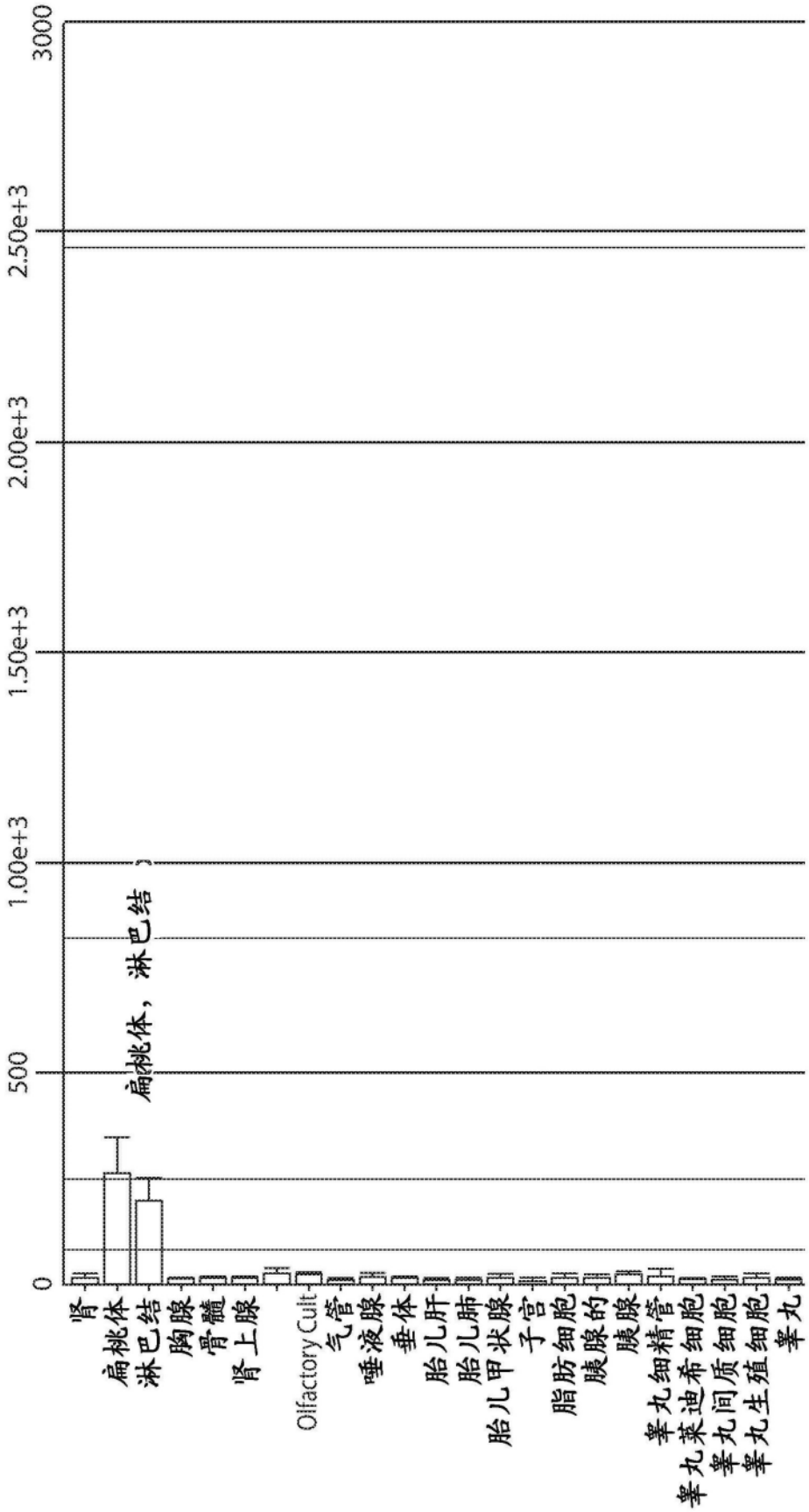

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
扁桃体，淋巴结
肾
扁桃体
淋巴结
胸腺
骨髓
肾上腺
Olfactory Cult
气管
唾液腺
垂体
胎儿肝
胎儿肺
胎儿甲状腺
子宫
脂肪细胞
胰腺的
胰腺
睾丸细精管
睾丸莱迪希细胞
睾丸间质细胞
睾丸生殖细胞
睾丸

图39-1

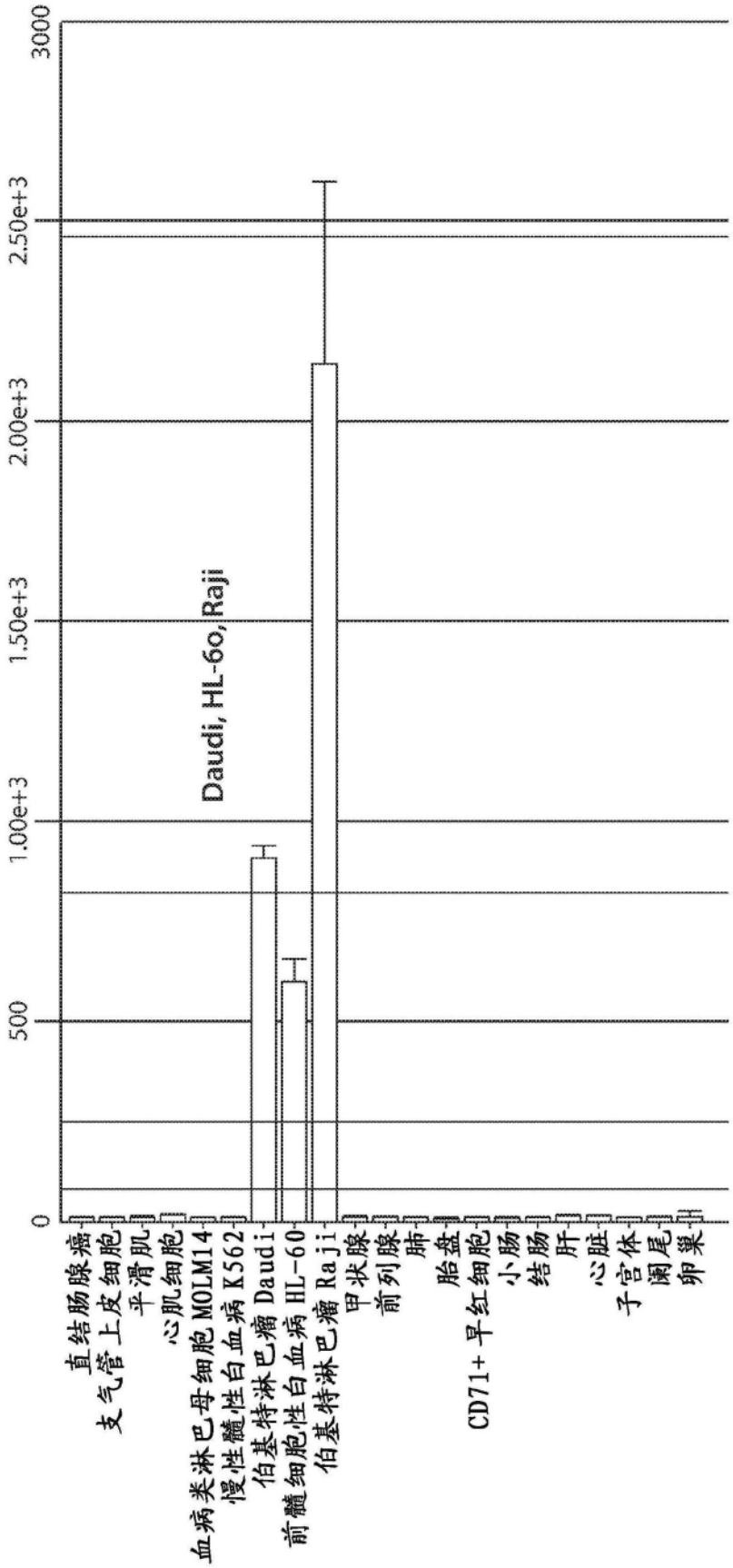

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
Daudi, HL-60, Raji
直结肠腺癌
支气管上皮细胞
平滑肌
心肌细胞
血病类淋巴母细胞 MOLM14
慢性髓性白血病 K562
伯基特淋巴瘤 Daudi
前髓细胞性白血病 HL-60
伯基特淋巴瘤 Raji
甲状腺
前列腺
肺
胎盘
CD71+ 早红细胞
小肠
结肠
肝
心脏
子宫体
阑尾
卵巢

图39-2

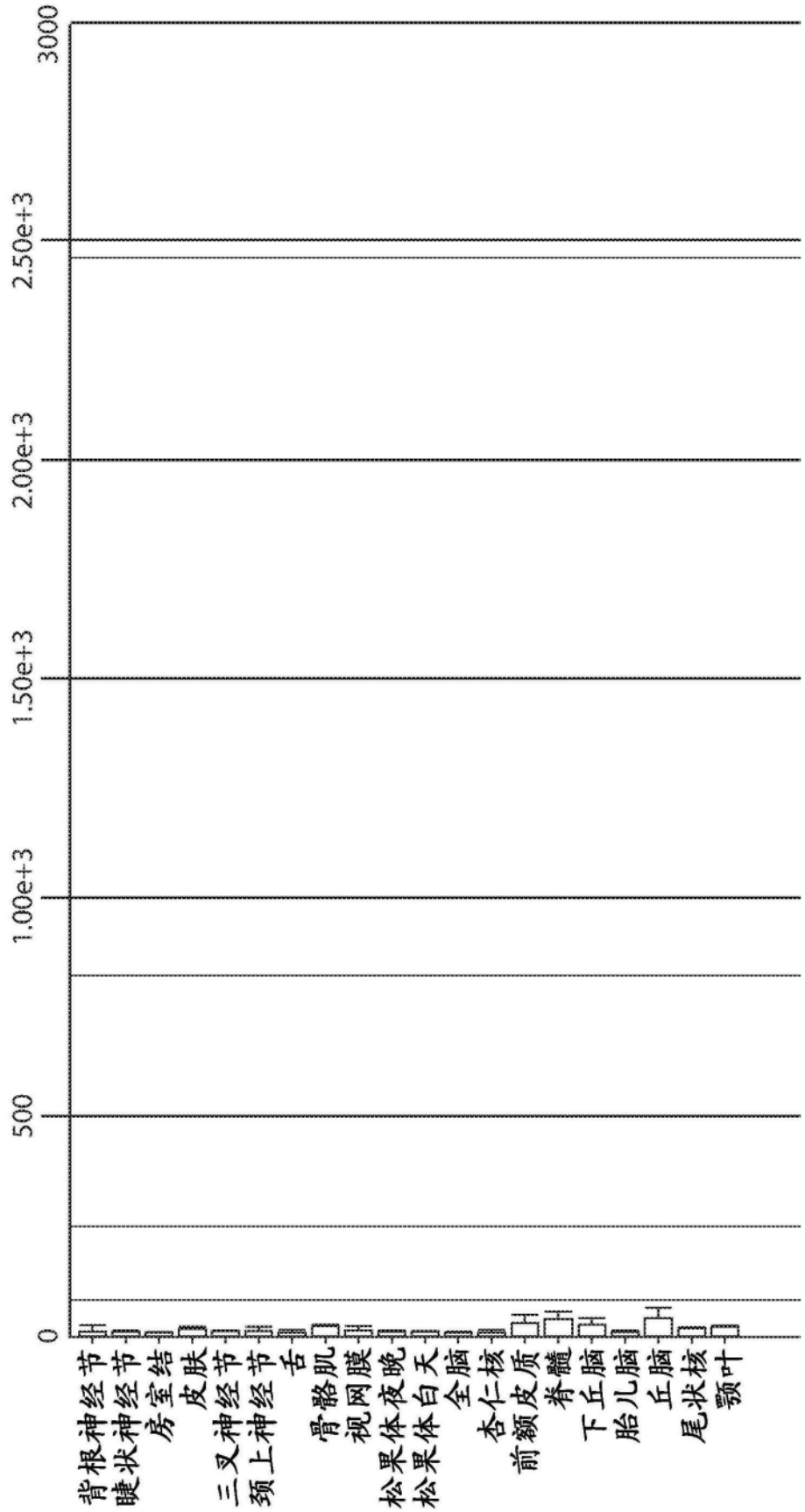

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
背根神经节
腱状神经节
房室结
皮肤
三叉神经节
颈上神经节
舌
骨骼肌
视网膜
松果体夜晚
松果体白天
全脑
杏仁核
前额皮质
脊髓
下丘脑
胎儿脑
丘脑
尾状核
颚叶

图39-3

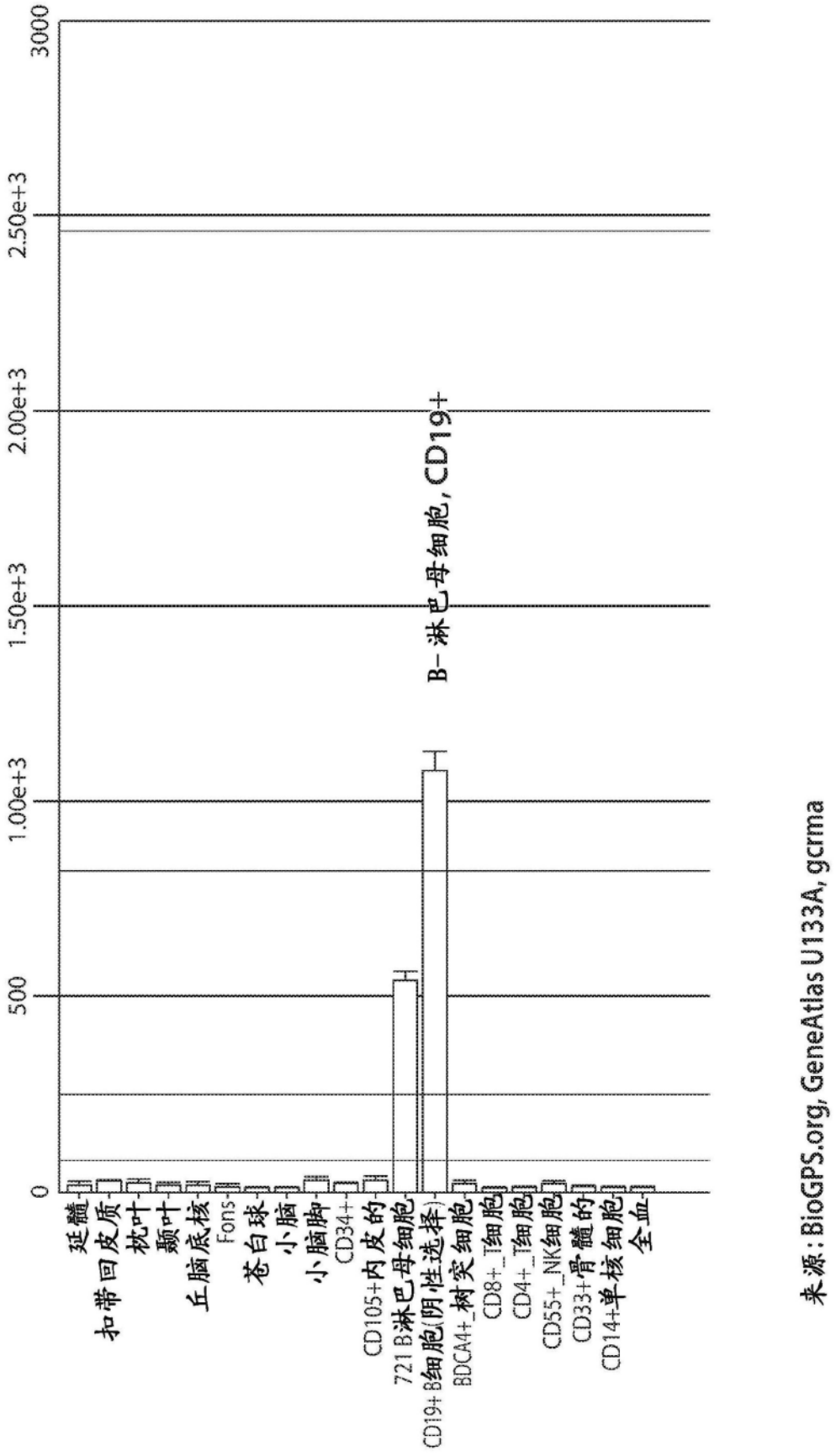

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
B-淋巴母细胞，CD19+
延髓
扣带回皮质
枕叶
颞叶
丘脑底核
Fons
苍白球
小脑
小脑脚
CD34+
CD105+内皮的
721 B淋巴母细胞
CD19+ B细胞(阴性选择)
BDCA4+_树突细胞
CD8+_T细胞
CD4+_T细胞
CD55+_NK细胞
CD33+骨髓的
CD14+单核细胞
全血
来源：BioGPS.org, GeneAtlas U133A, gcrma

图39-4

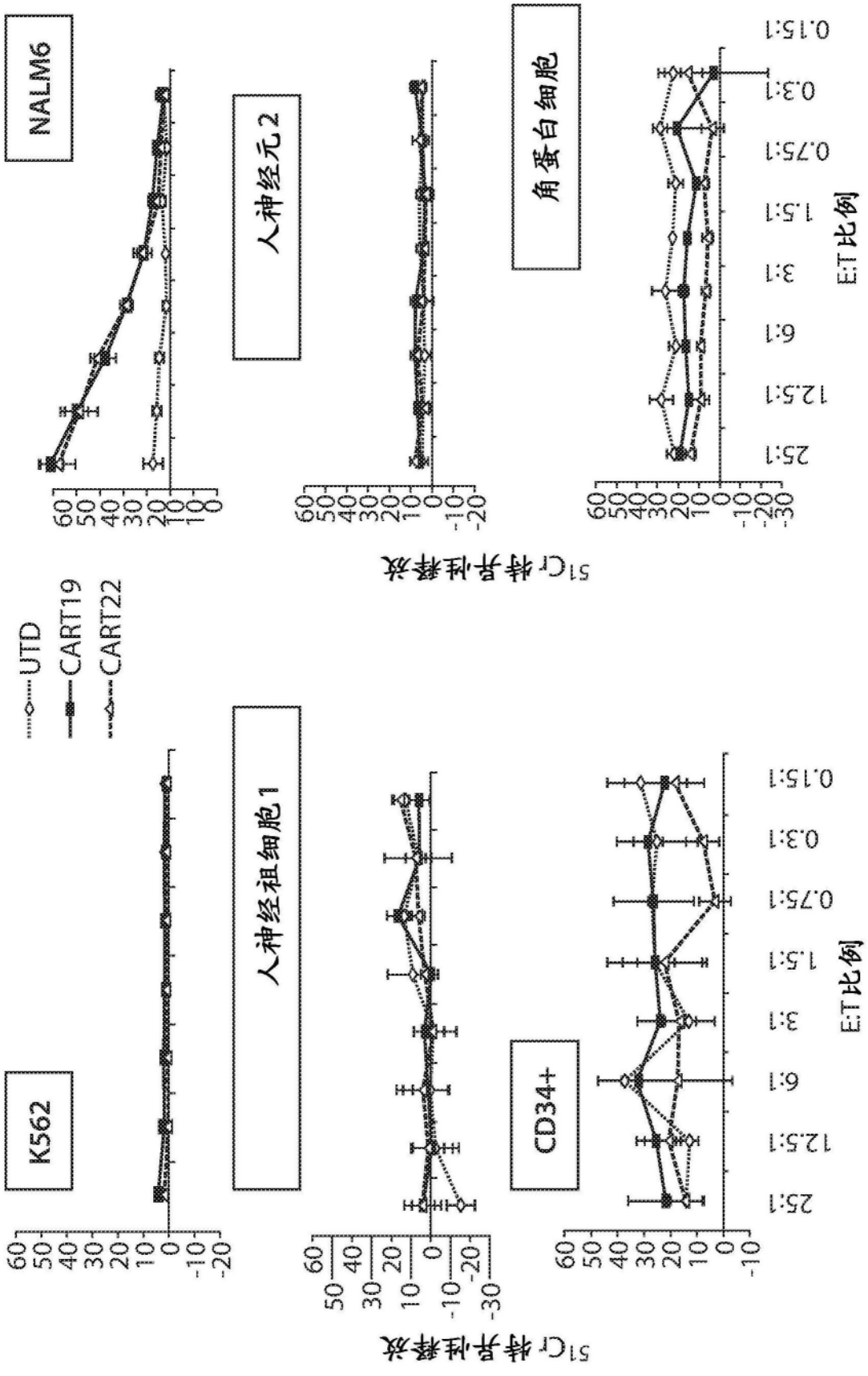

NALM6
人神经元2
角蛋白细胞
K562
人神经祖细胞1
CD34+
UTD
CART19
CART22
51Cr特异性释放
E:T比例
0.15:1
0.3:1
0.75:1
1.5:1
3:1
6:1
12.5:1
25:1

图40

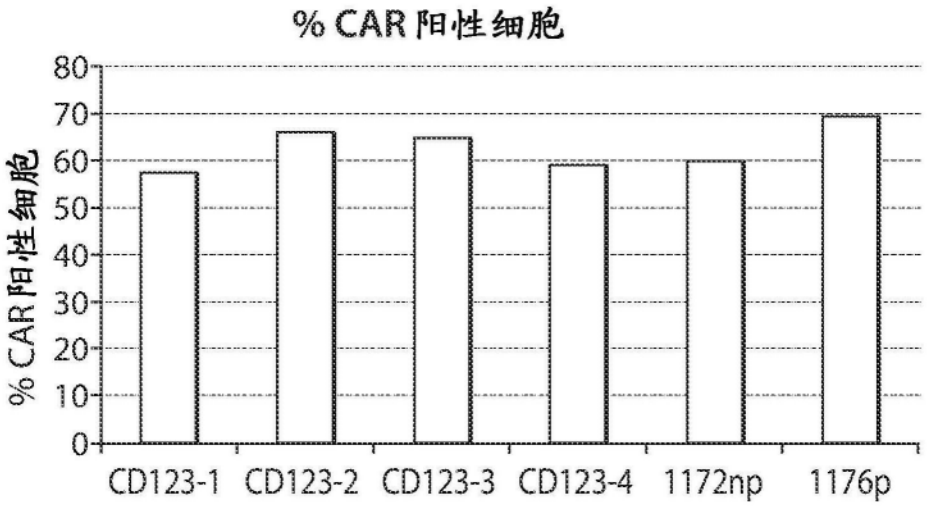

% CAR 阳性细胞
% CAR阳性细胞
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p

图41

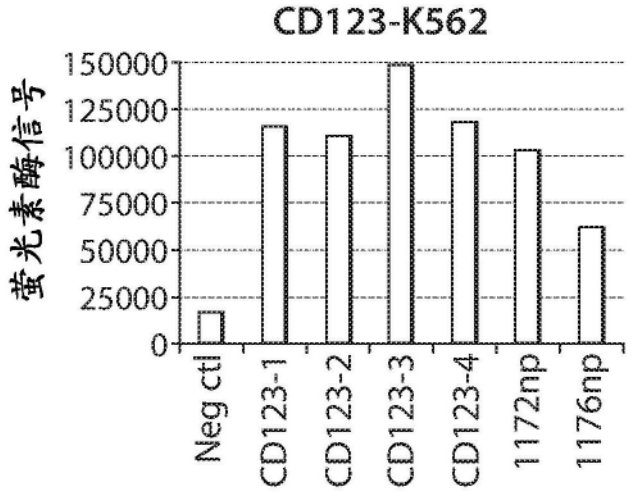

CD123-K562
萤光素酶信号
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
Neg ctl
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176np

图42A

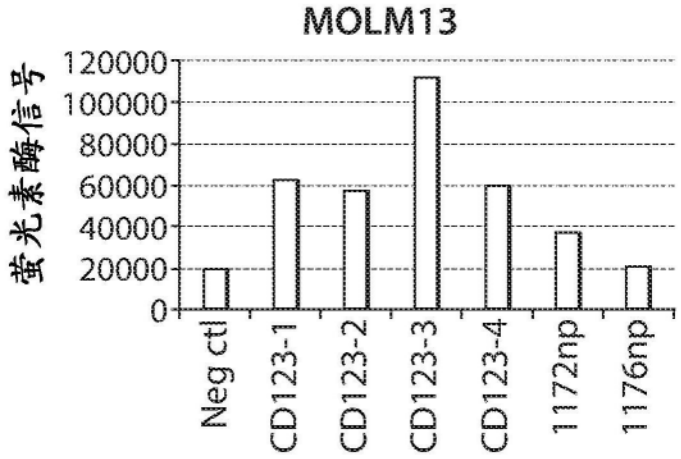

MOLM13
萤光素酶信号
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Neg ctl
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176np

图42B

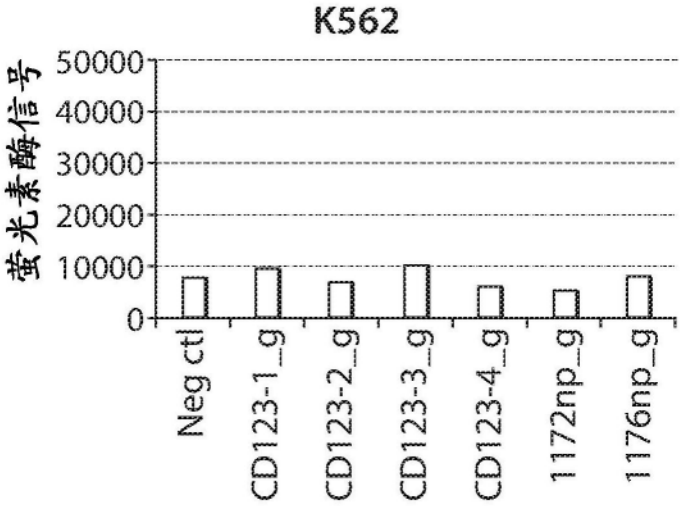

K562
萤光素酶信号
50000
40000
30000
20000
10000
0
Neg ctl
CD123-1_g
CD123-2_g
CD123-3_g
CD123-4_g
1172np_g
1176np_g

图42C

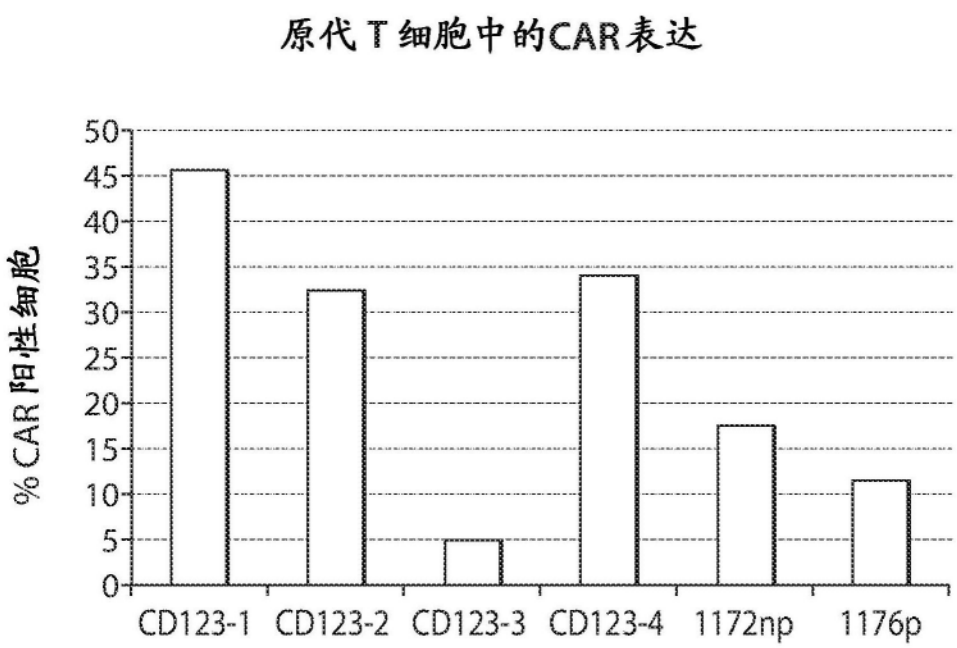

原代T细胞中的CAR表达
% CAR阳性细胞
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p

图43A

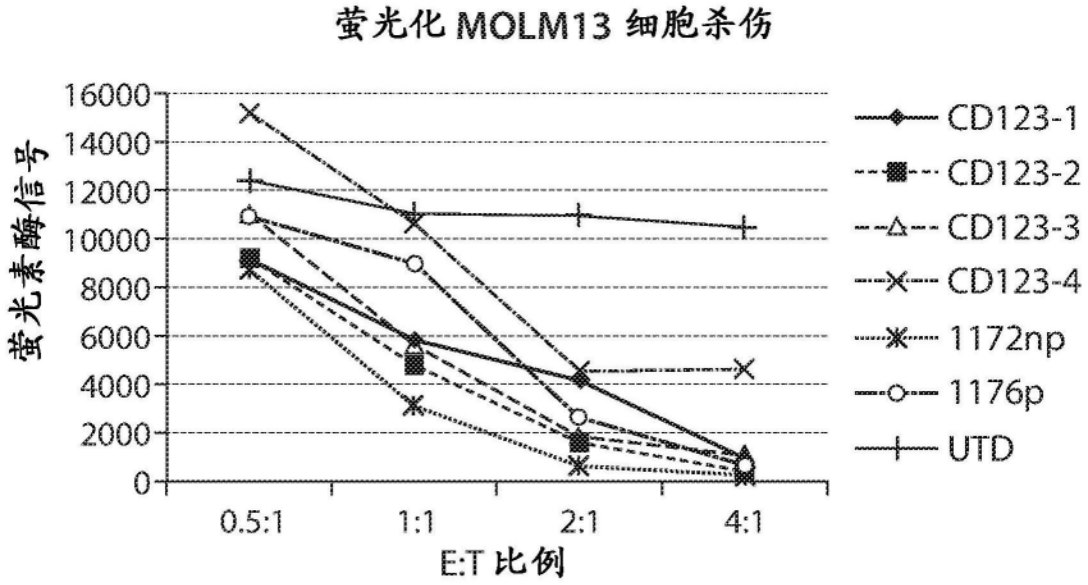
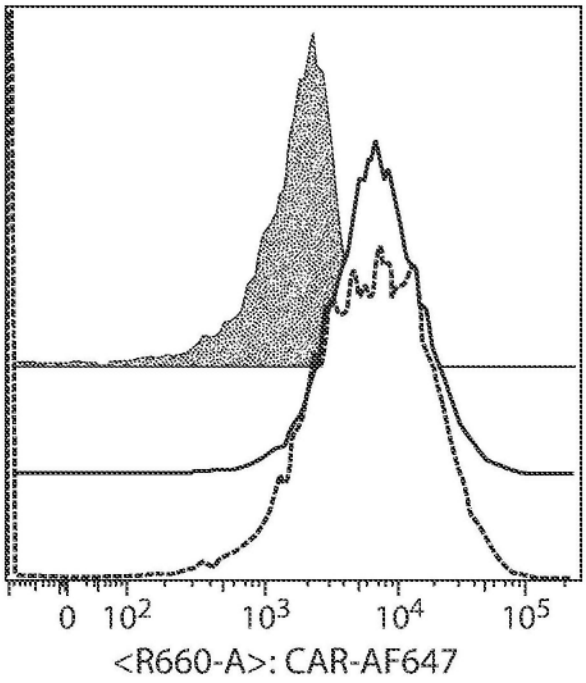
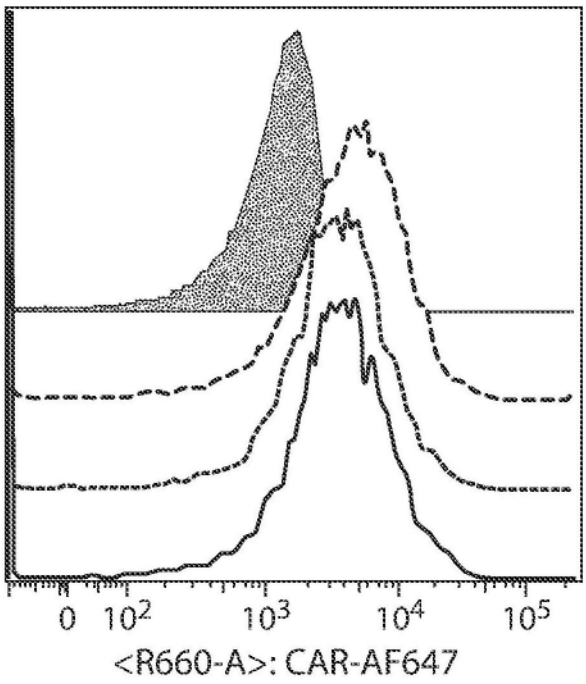

萤光化 MOLM13 细胞杀伤
萤光素酶信号
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.5:1
1:1
2:1
4:1
E:T 比例
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p
UTD

图43B



	样品	中值:<R660-A>
------	1176	5965
——	1172	6996
▒	UTD	1603

图44A



	样品	中值:<R660-A>
——	NVS4	3323
------	NVS3	3356
- - - -	NVS2	4265
▒	UTD IGG	1289

图44B

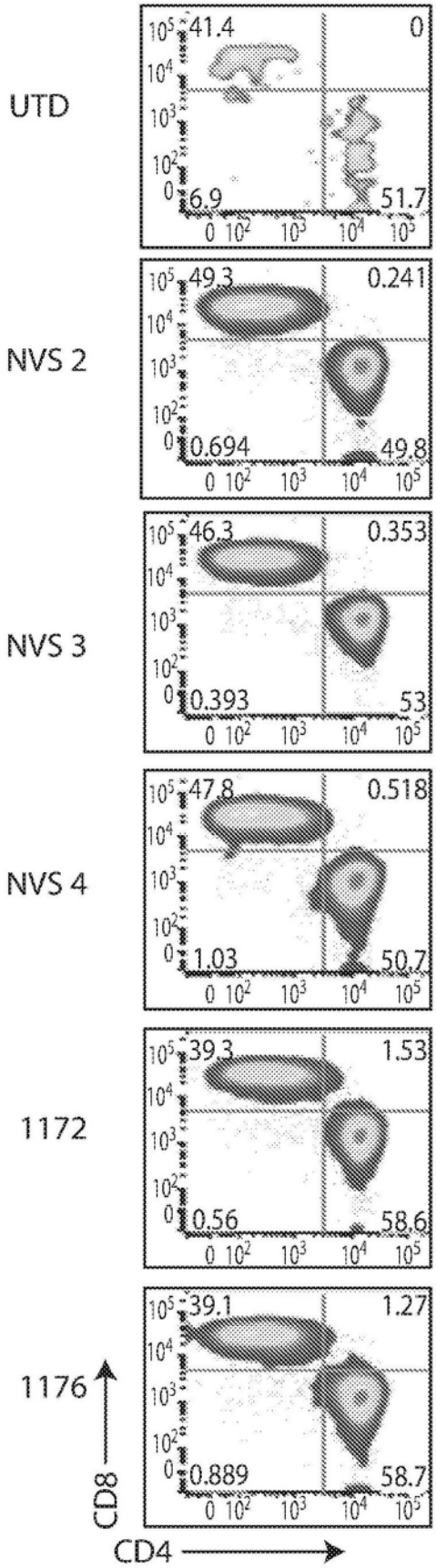

UTD
41.4
0
6.9
51.7
NVS 2
49.3
0.241
0.694
49.8
NVS 3
46.3
0.353
0.393
53
NVS 4
47.8
0.518
1.03
50.7
1172
39.3
1.53
0.56
58.6
1176
39.1
1.27
0.889
58.7
CD8
CD4

图45

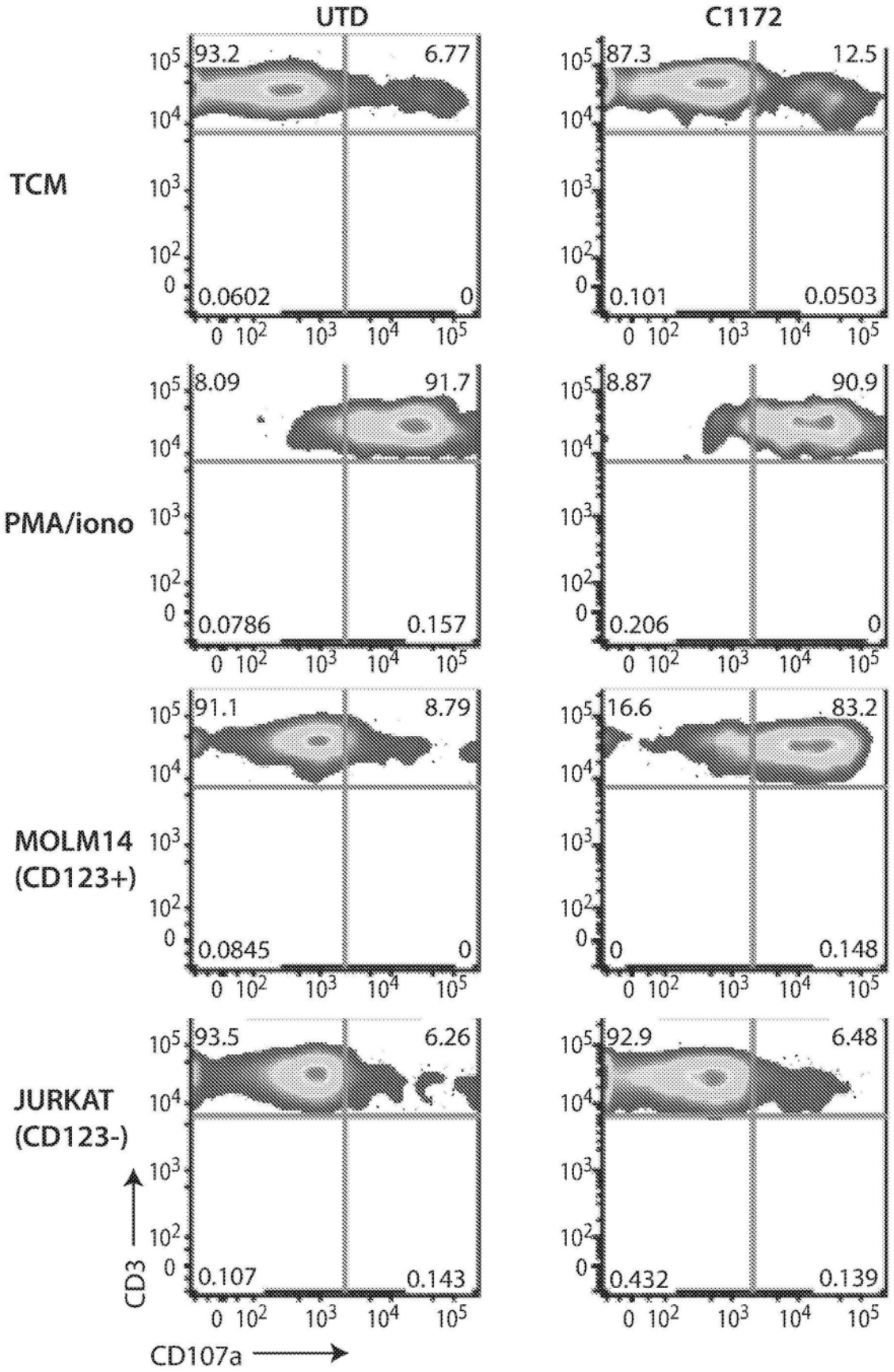

UTD
C1172
TCM
PMA/iono
MOLM14
(CD123+)
JURKAT
(CD123-)
93.2
6.77
0.0602
0
87.3
12.5
0.101
0.0503
8.09
91.7
0.0786
0.157
8.87
90.9
0.206
0
91.1
8.79
0.0845
0
16.6
83.2
0
0.148
93.5
6.26
0.107
0.143
92.9
6.48
0.432
0.139
CD3
CD107a

图46-1

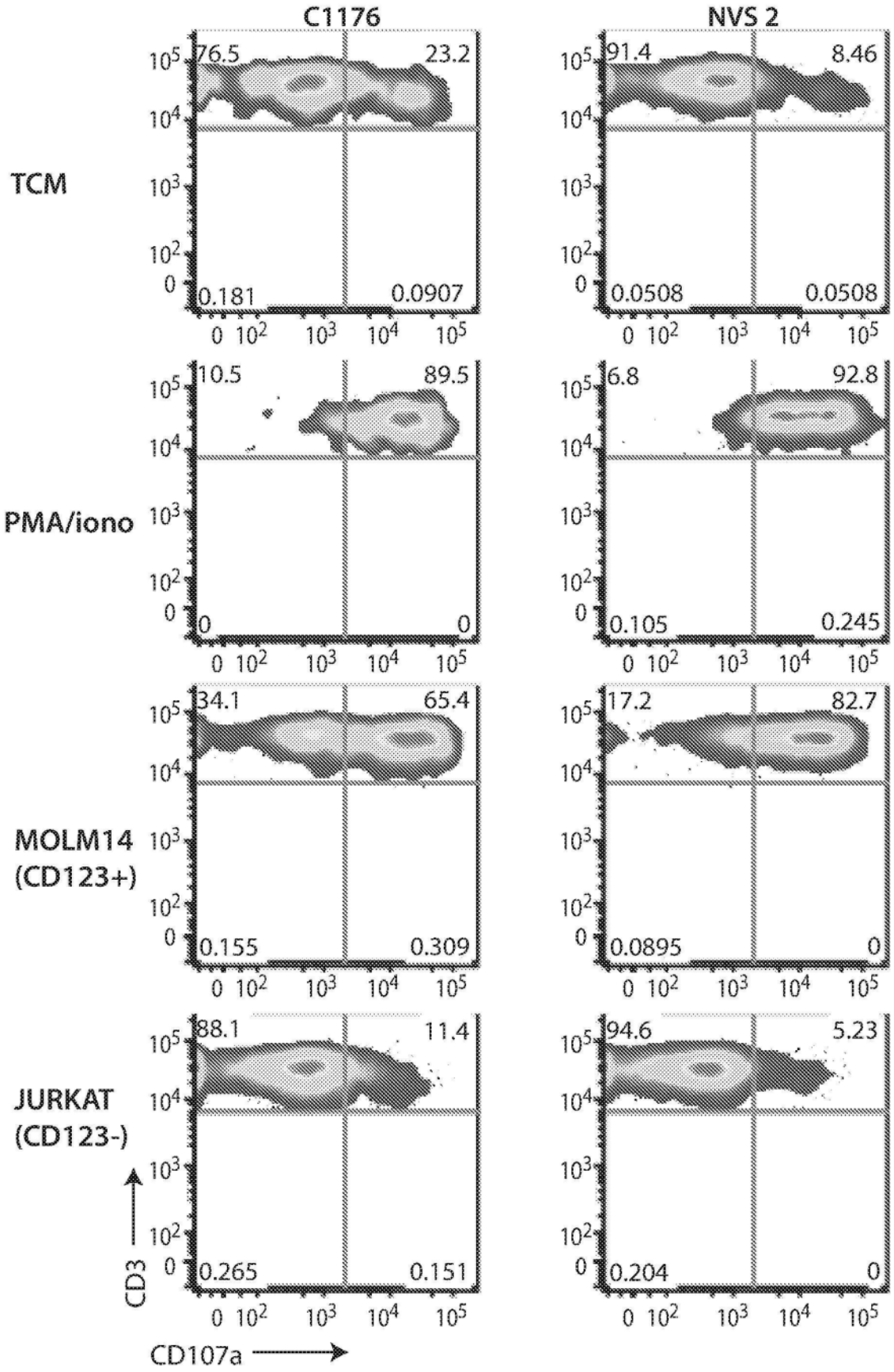

C1176
NVS 2
TCM
PMA/iono
MOLM14
(CD123+)
JURKAT
(CD123-)
76.5
23.2
0.181
0.0907
91.4
8.46
0.0508
0.0508
10.5
89.5
0
0
6.8
92.8
0.105
0.245
34.1
65.4
0.155
0.309
17.2
82.7
0.0895
0
88.1
11.4
0.265
0.151
94.6
5.23
0.204
0
CD3
CD107a

图46-2

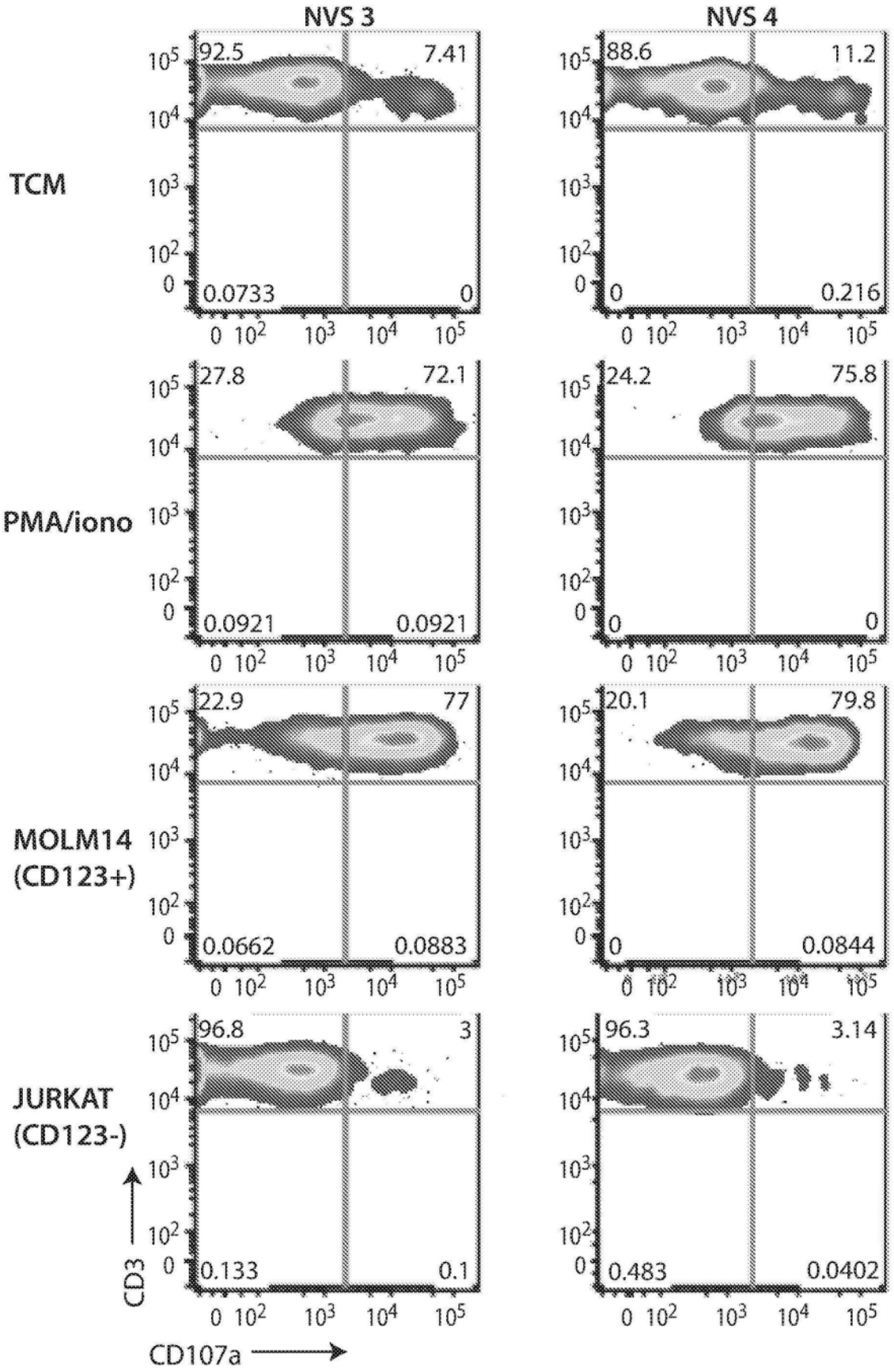

NVS 3
NVS 4
TCM
PMA/iono
MOLM14
(CD123+)
JURKAT
(CD123-)
92.5
7.41
0.0733
0
88.6
11.2
0
0.216
27.8
72.1
0.0921
0.0921
24.2
75.8
0
0
22.9
77
0.0662
0.0883
20.1
79.8
0
0.0844
96.8
3
0.133
0.1
96.3
3.14
0.483
0.0402
CD3
CD107a

图46-3

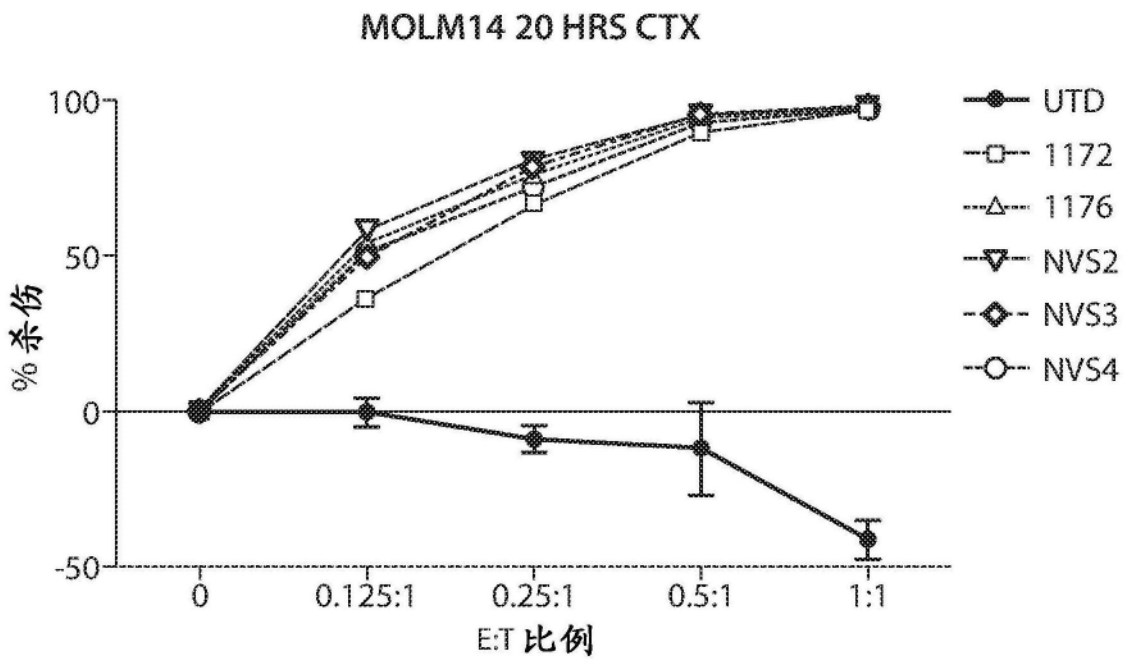

MOLM14 20 HRS CTX
100
50
0
-50
% 杀伤
0
0.125:1
0.25:1
0.5:1
1:1
E:T 比例
UTD
1172
1176
NVS2
NVS3
NVS4

图47

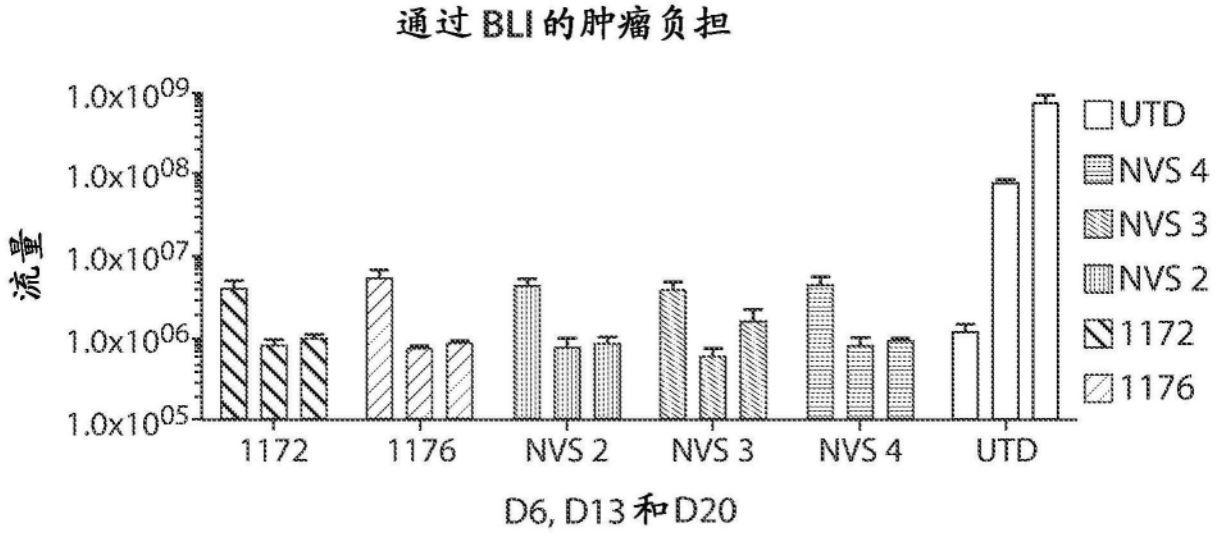

通过 BLI 的肿瘤负担
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
流量
1172
1176
NVS 2
NVS 3
NVS 4
UTD
D6, D13 和 D20
UTD
NVS 4
NVS 3
NVS 2
1172
1176

图48

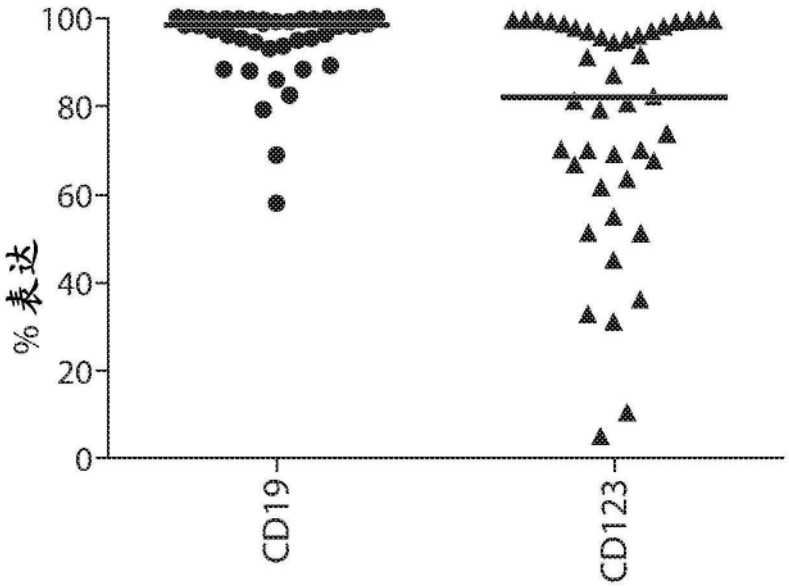

100
80
60
40
20
0
% 表达
CD19
CD123

图49A

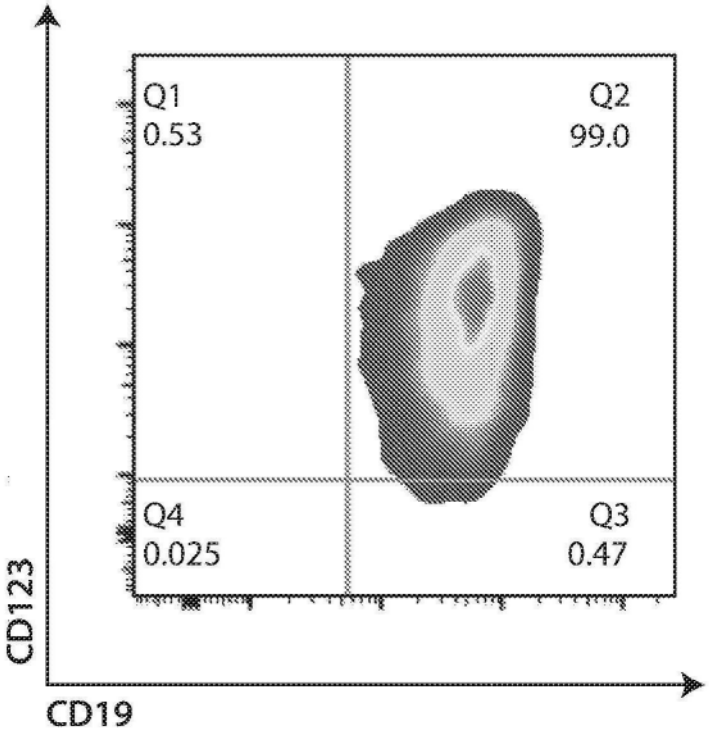

Q1
0.53
Q2
99.0
Q4
0.025
Q3
0.47
CD123
CD19

图49B

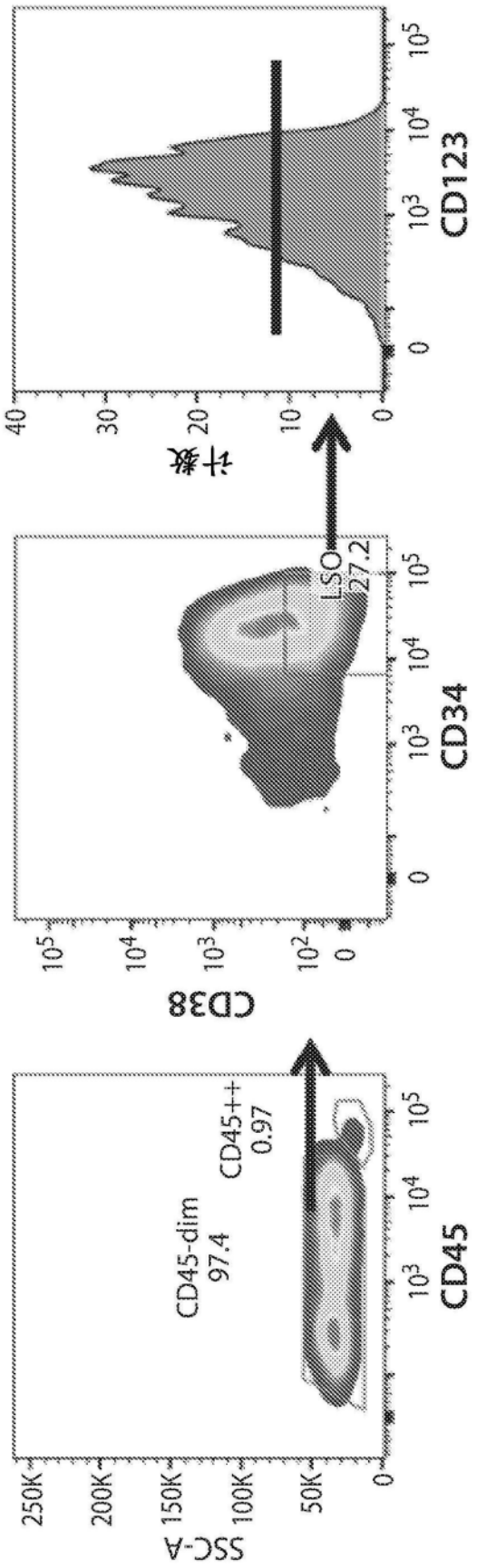

SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
CD45
CD45-dim
97.4
CD45++
0.97
CD38
CD34
LSO
27.2
计数
CD123

图49C

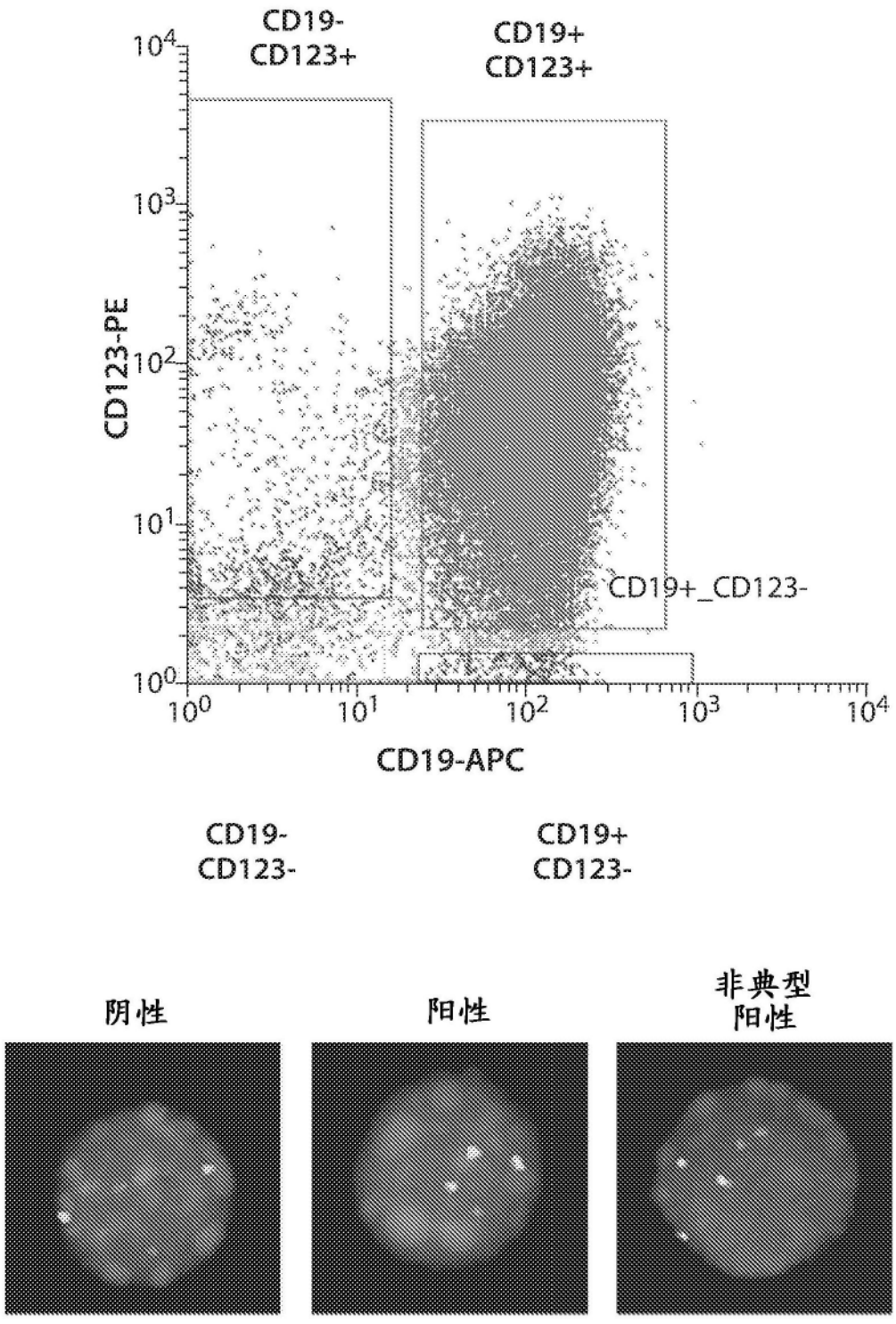

CD19-
CD123+
CD19+
CD123+
CD123-PE
CD19+_CD123-
CD19-APC
CD19-
CD123-
CD19+
CD123-
阴性
阳性
非典型
阳性

图49D

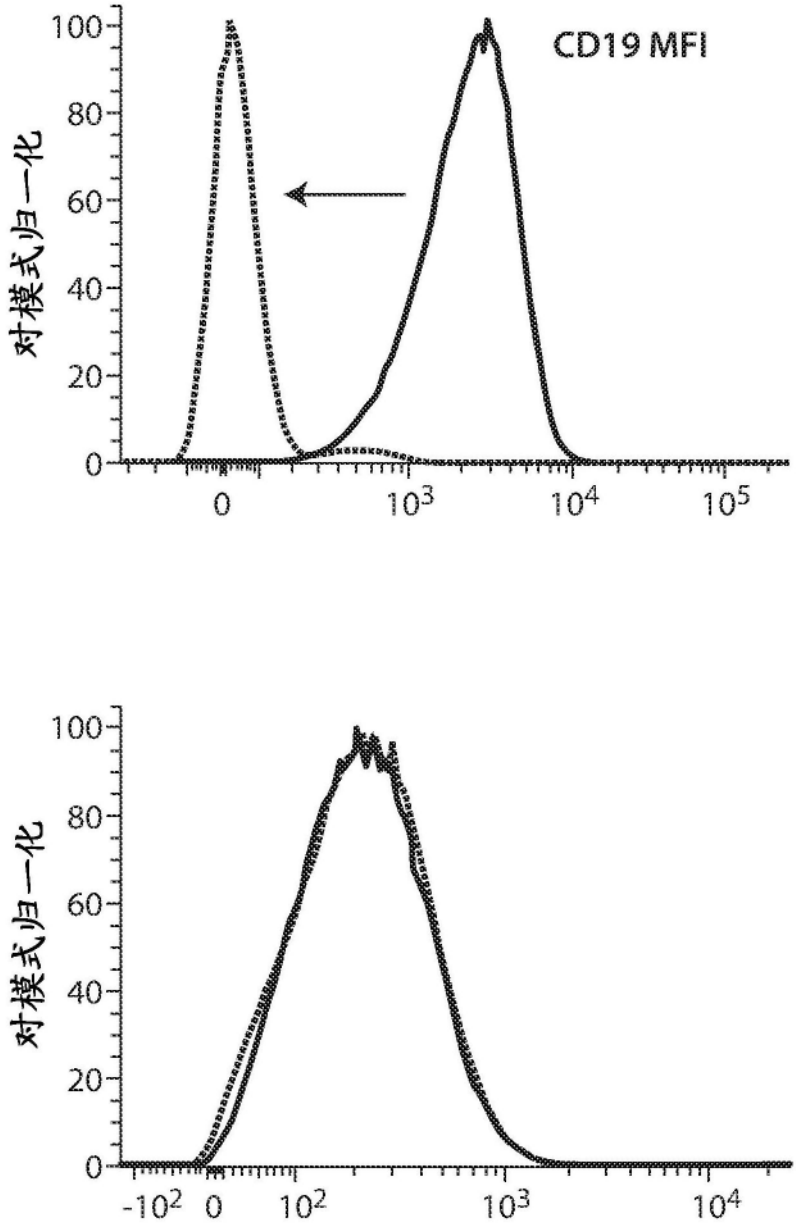

CD19 MFI
对模式归一化
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
对模式归一化
100
80
60
40
20
0
-10^2
0
10^2
10^3
10^4

图49E

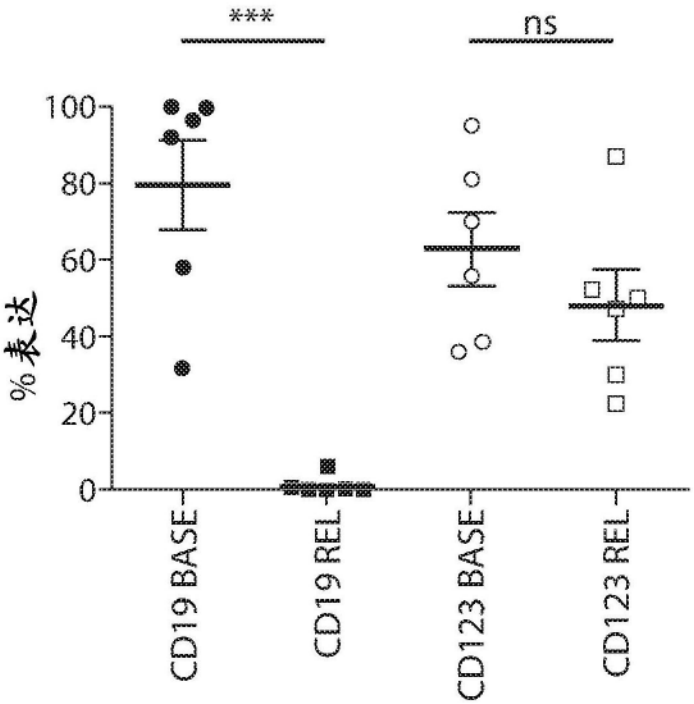

***
ns
100
80
60
40
20
0
% 表达
CD19 BASE
CD19 REL
CD123 BASE
CD123 REL

图49F

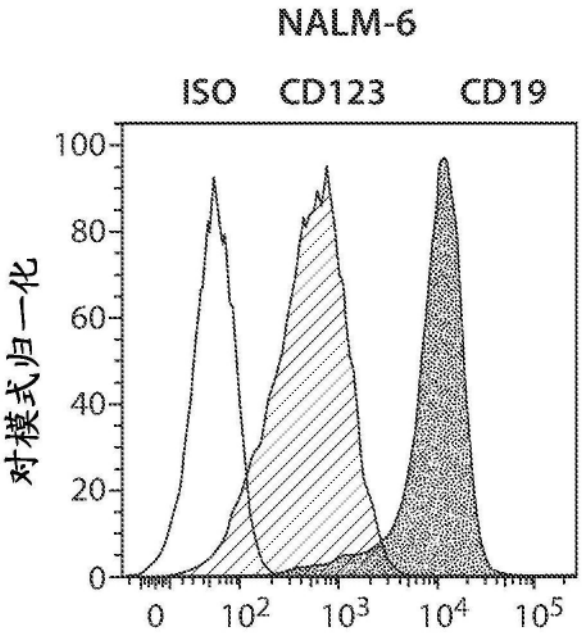

NALM-6
ISO
CD123
CD19
100
80
60
40
20
0
对模式归一化
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图50A

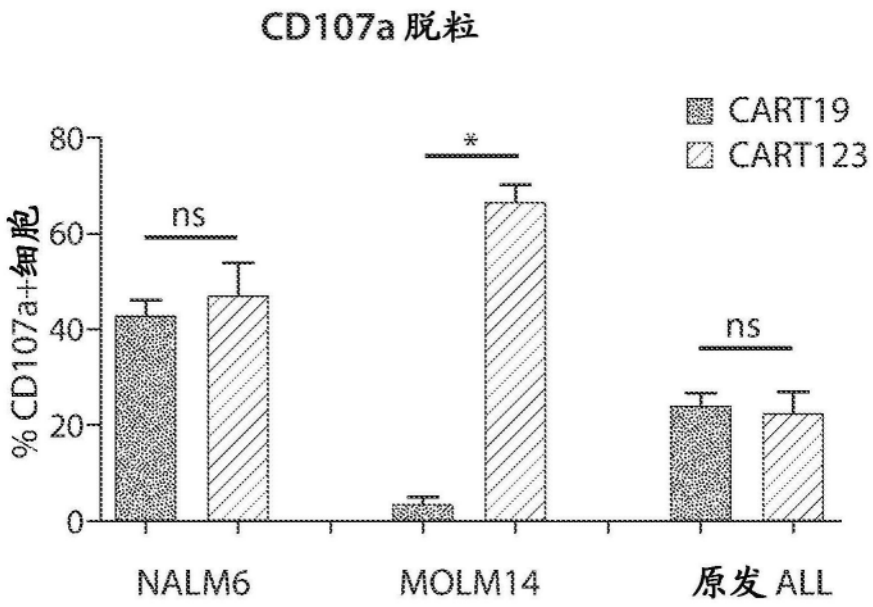

CD107a 脱粒
CART19
CART123
% CD107a+细胞
80
60
40
20
0
ns
*
ns
NALM6
MOLM14
原发 ALL

图50B

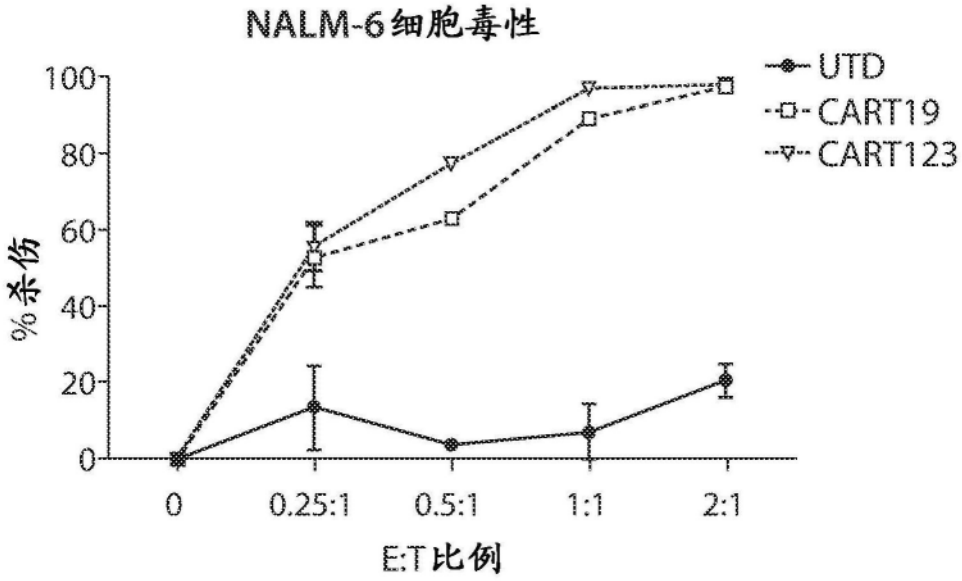

NALM-6细胞毒性
UTD
CART19
CART123
% 杀伤
100
80
60
40
20
0
0
0.25:1
0.5:1
1:1
2:1
E:T 比例

图50C

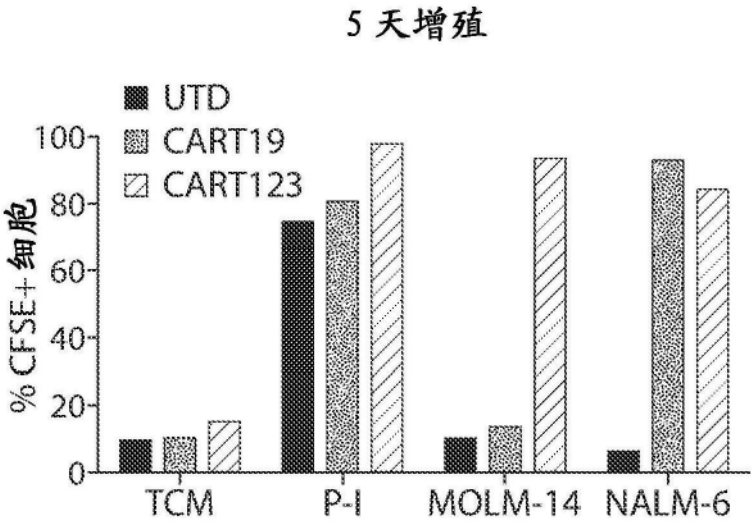

5 天增殖
UTD
CART19
CART123
% CFSE+ 细胞
100
80
60
40
20
0
TCM
P-I
MOLM-14
NALM-6

图50D

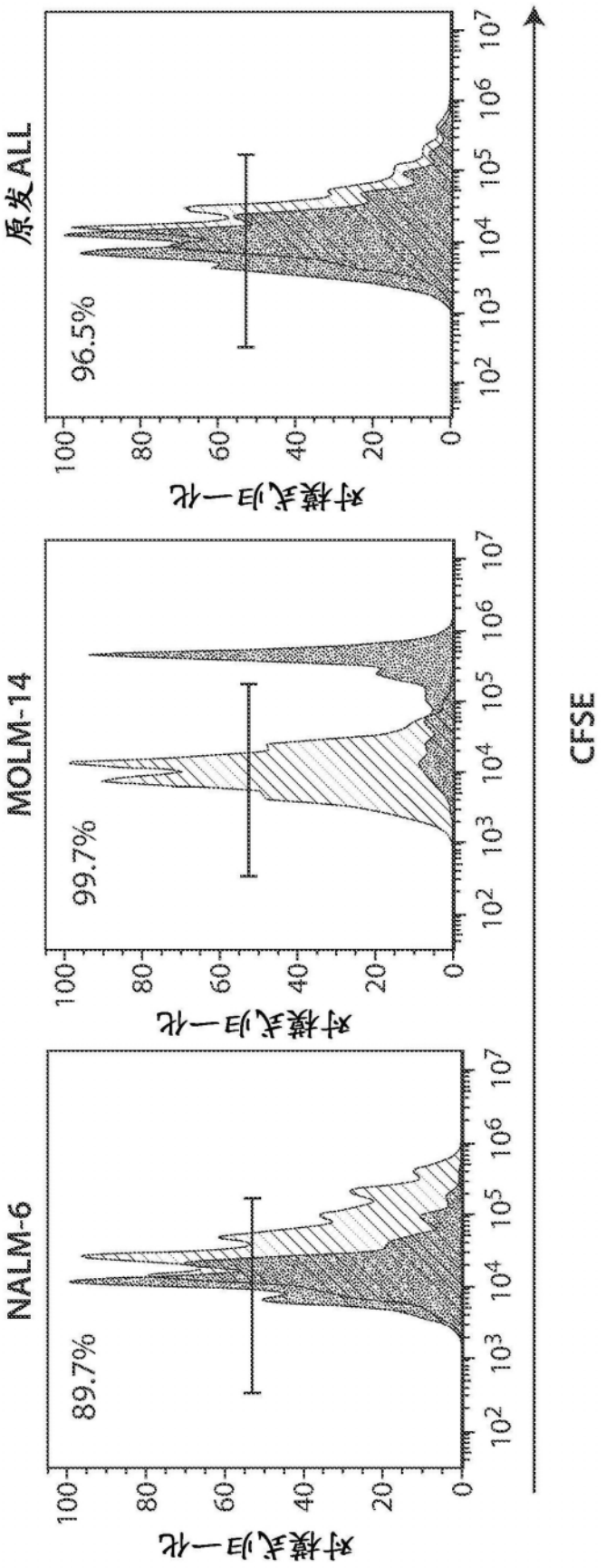


图50E

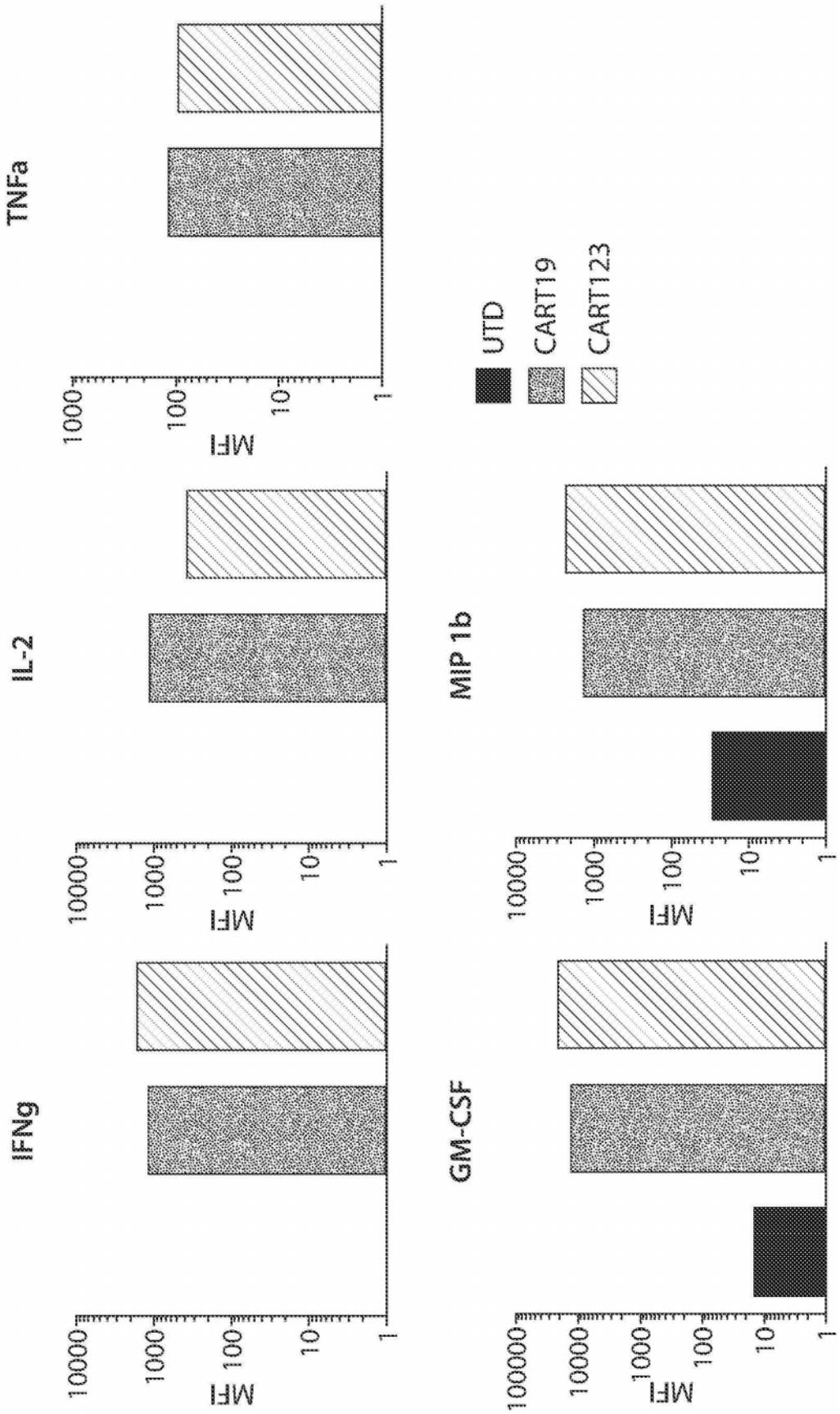

TNFa
IL-2
IFNg
MIP 1b
GM-CSF
MFI
UTD
CART19
CART123
1000
100
10
1
10000
100000

图50F

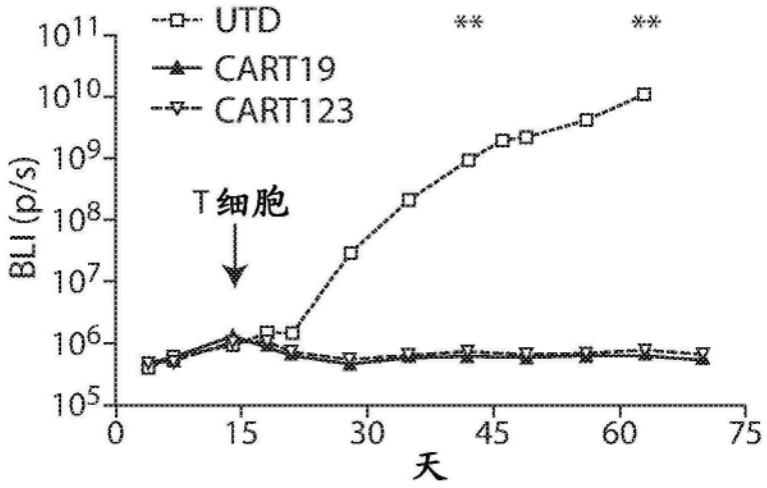

UTD
CART19
CART123
**
**
T细胞
BLI (p/s)
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
0
15
30
45
60
75
天

图51A

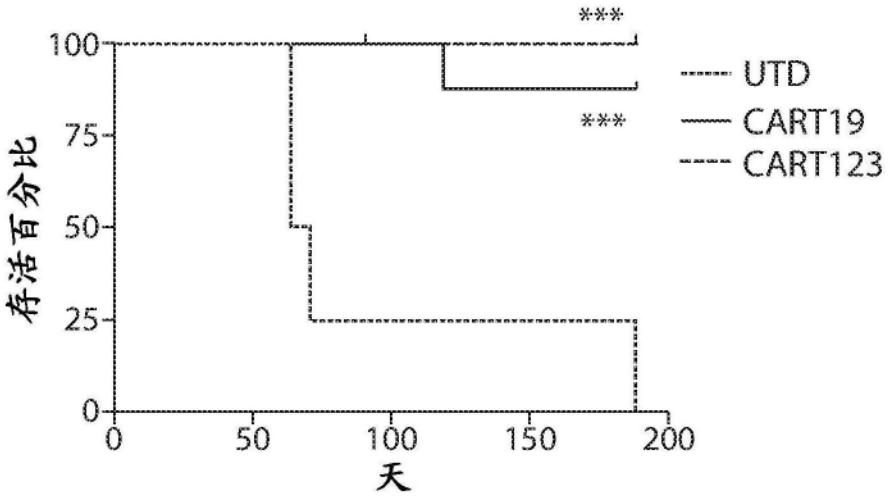

***
***
UTD
CART19
CART123
存活百分比
100
75
50
25
0
0
50
100
150
200
天

图51B

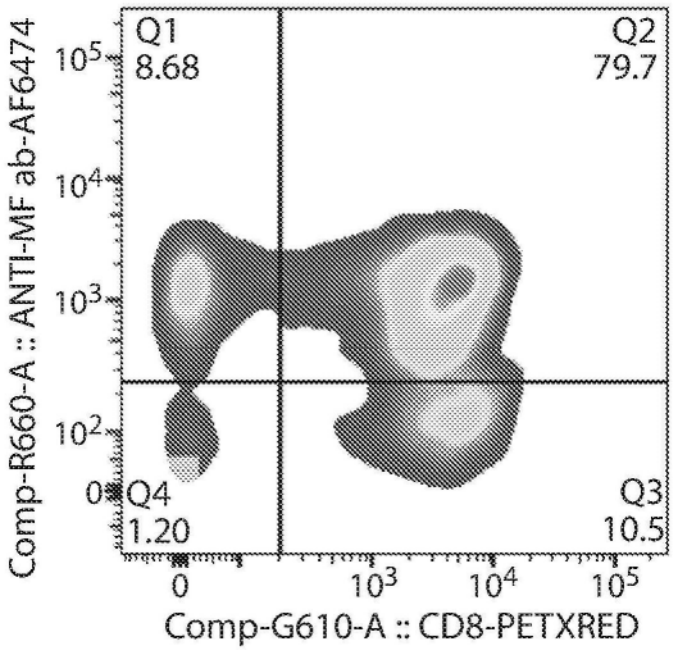

Q1
8.68
Q2
79.7
Q4
1.20
Q3
10.5
Comp-R660-A :: ANTI-MF ab-AF6474
Comp-G610-A :: CD8-PETXRED
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图51C

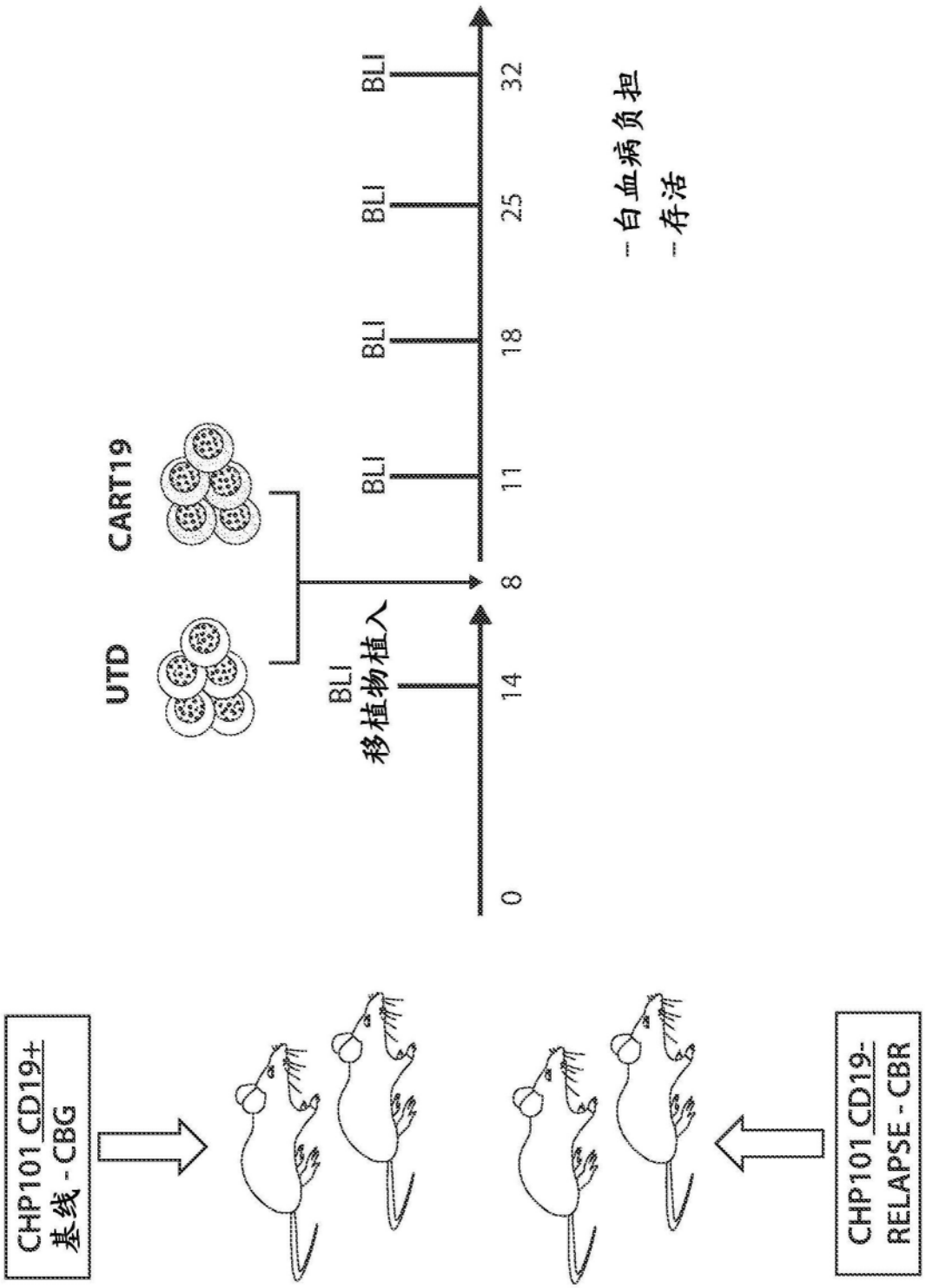

CHP101 CD19+
基线 - CBG
CHP101 CD19-
RELAPSE - CBR
UTD
CART19
BLI
移植物植入
0
14
8
11
18
25
32
BLI
BLI
BLI
BLI
白血病负担
存活

图52A

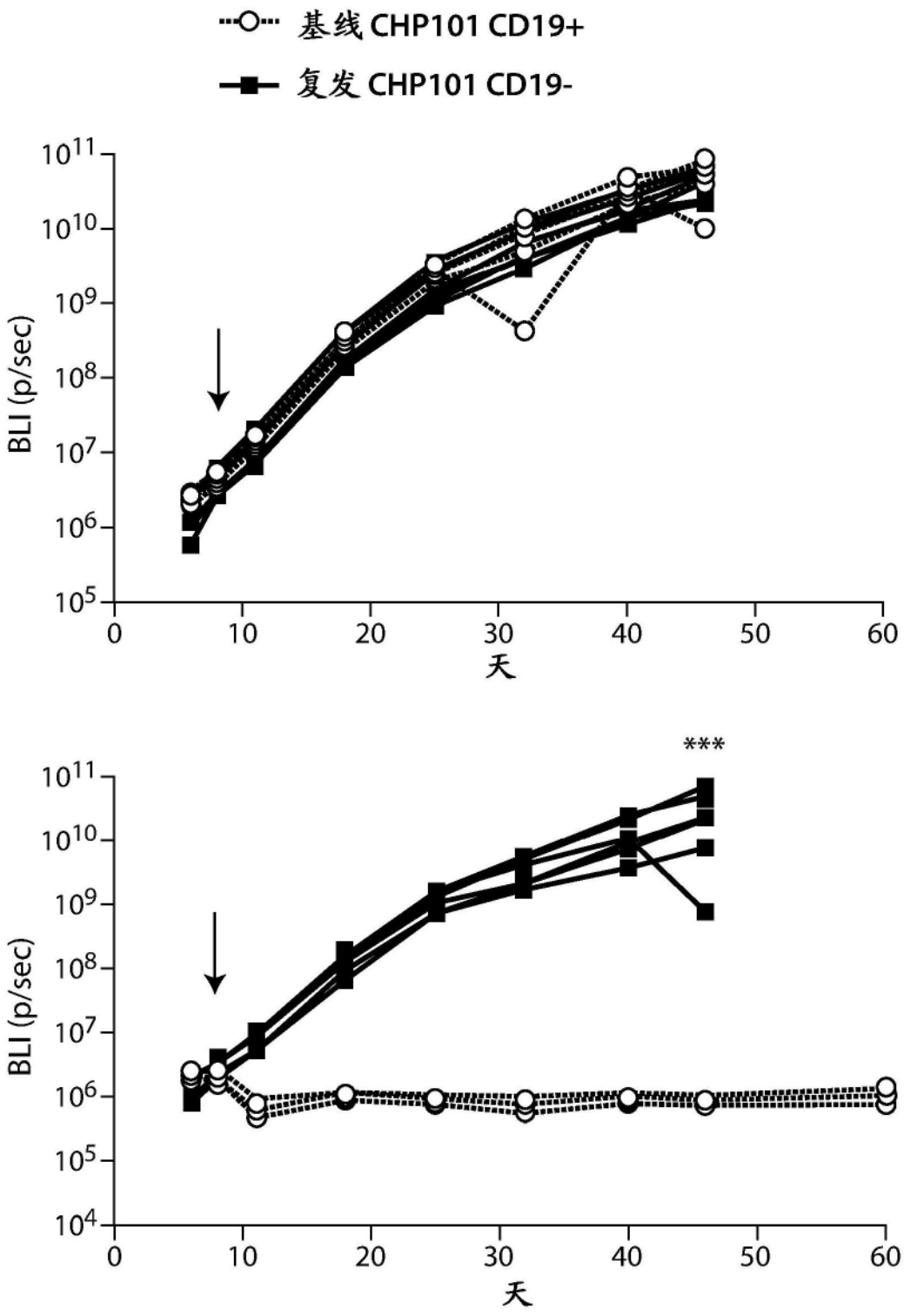


图52B

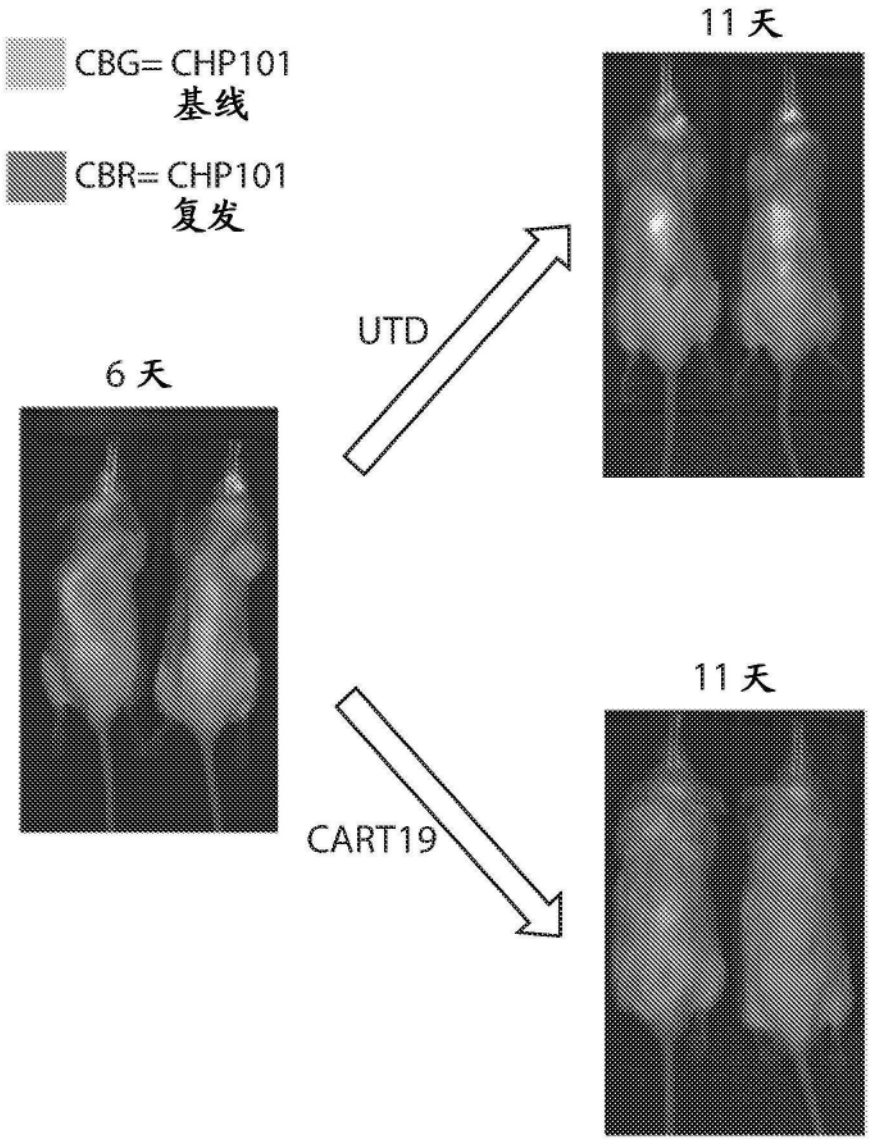


图52C

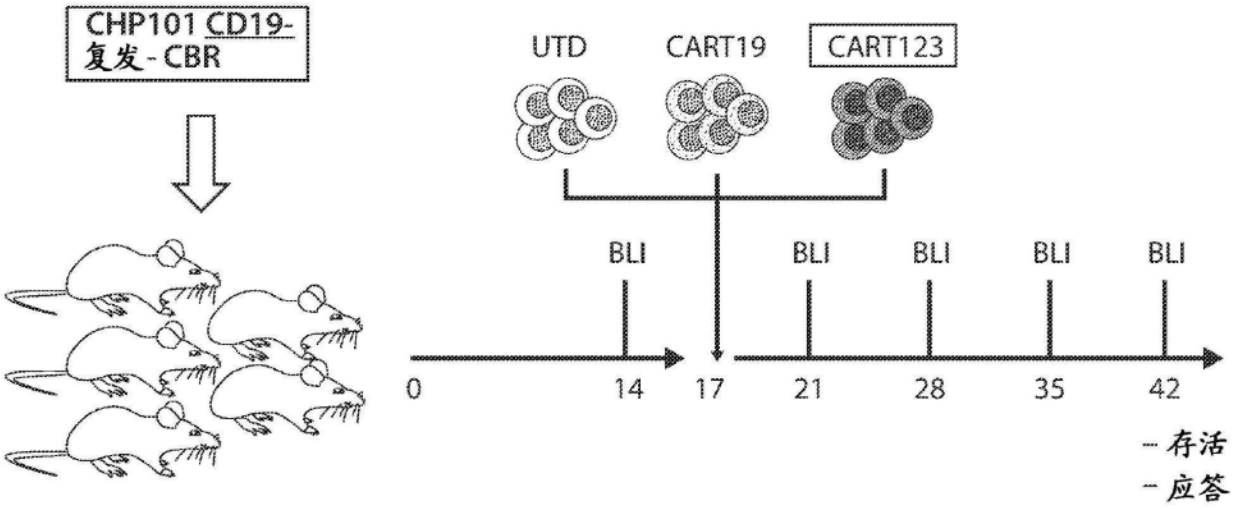

CHP101 CD19-
复发-CBR
UTD
CART19
CART123
BLI
BLI
BLI
BLI
BLI
0
14
17
21
28
35
42
-存活
-应答

图52D

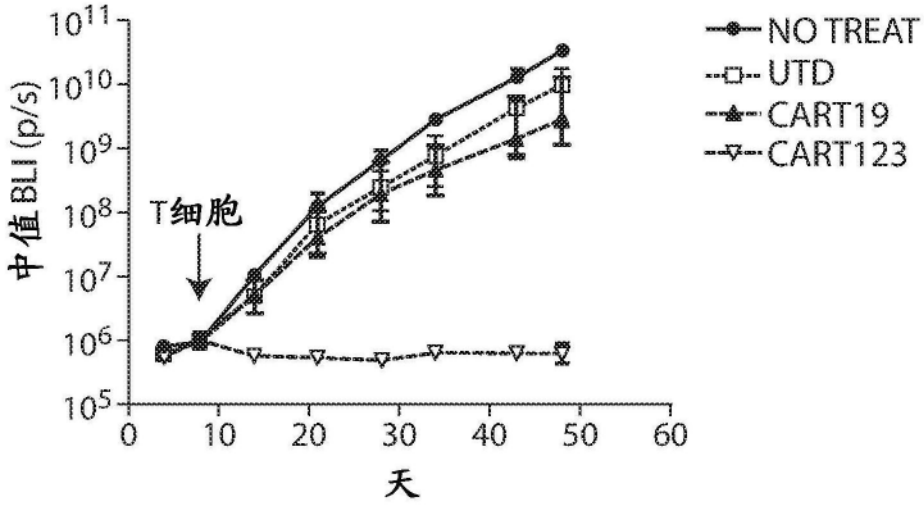

NO TREAT
UTD
CART19
CART123
中值BLI (p/s)
T细胞
天

图52E

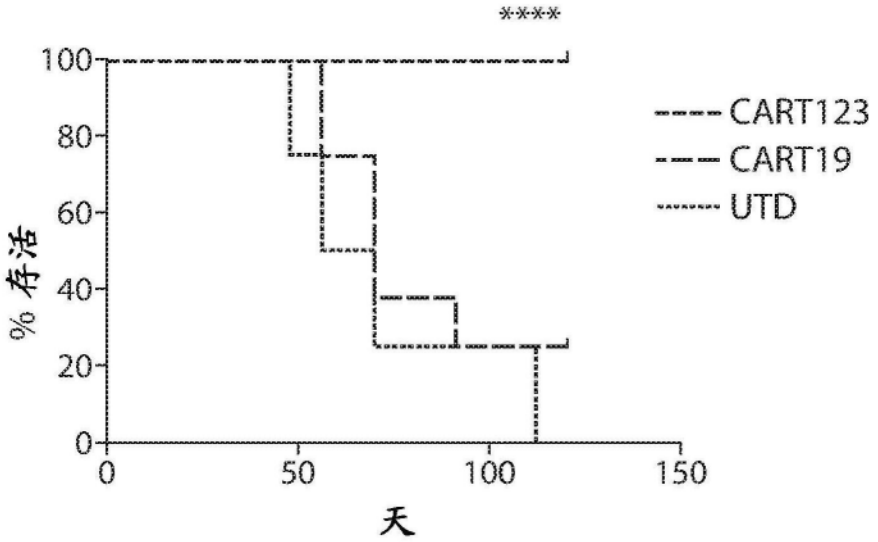


图52F

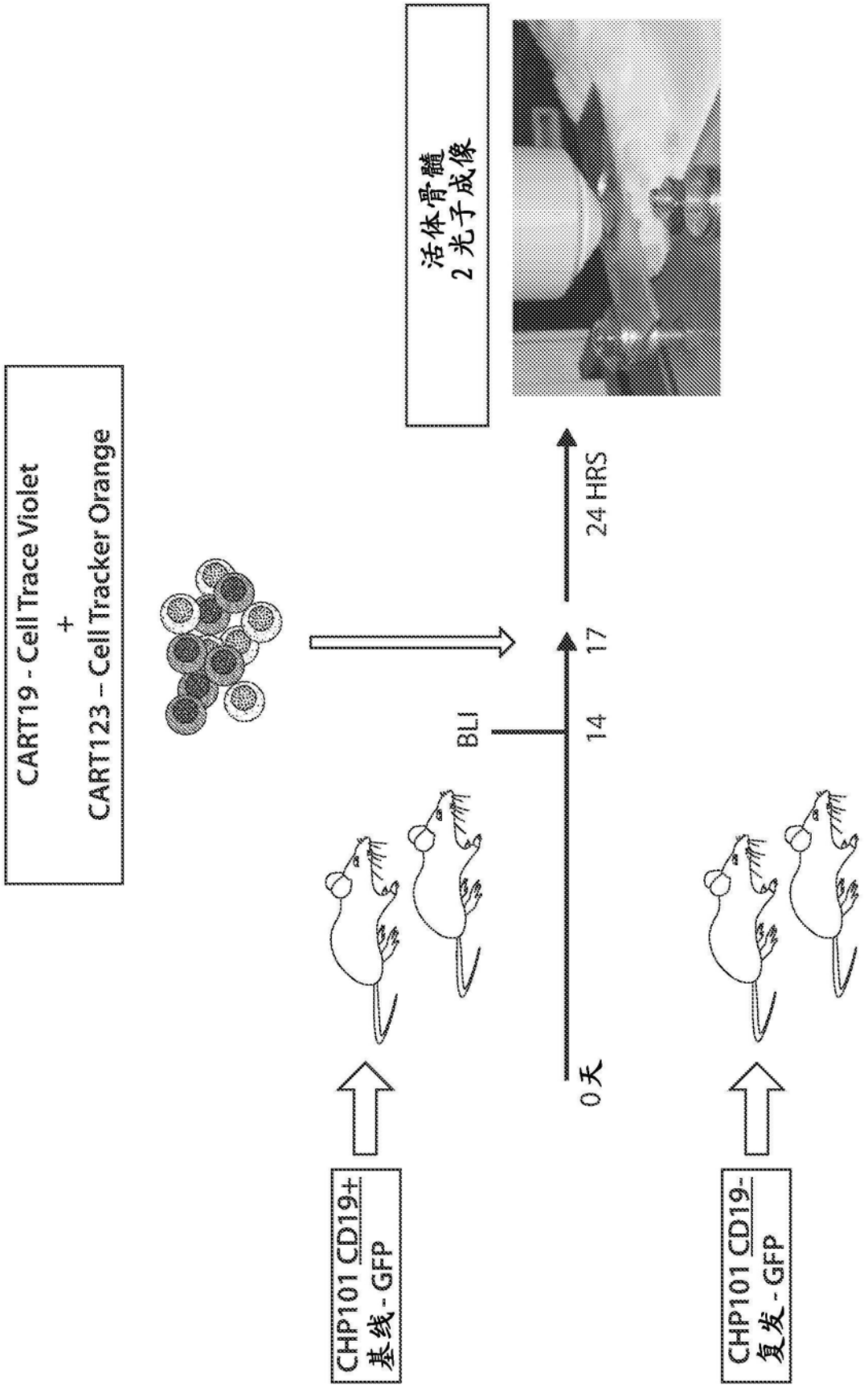

CART19 - Cell Trace Violet
+
CART123 – Cell Tracker Orange
活体骨髓
2 光子成像
BLI
24 HRS
14
17
0天
CHP101 CD19+
基线 - GFP
CHP101 CD19-
复发 - GFP

图53A

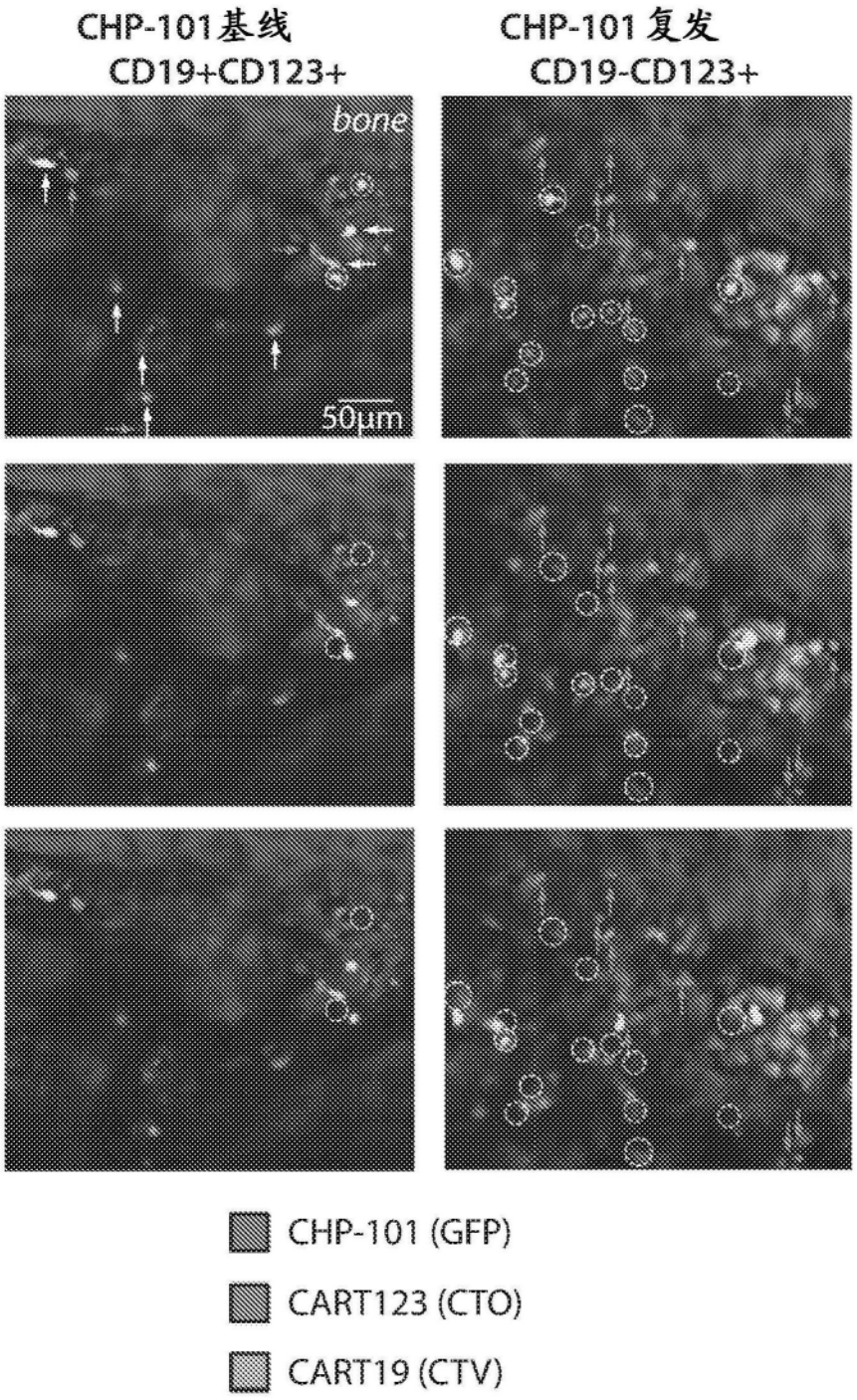

CHP-101基线
CD19+CD123+
CHP-101复发
CD19-CD123+
bone
50μm
CHP-101 (GFP)
CART123 (CTO)
CART19 (CTV)

图53B

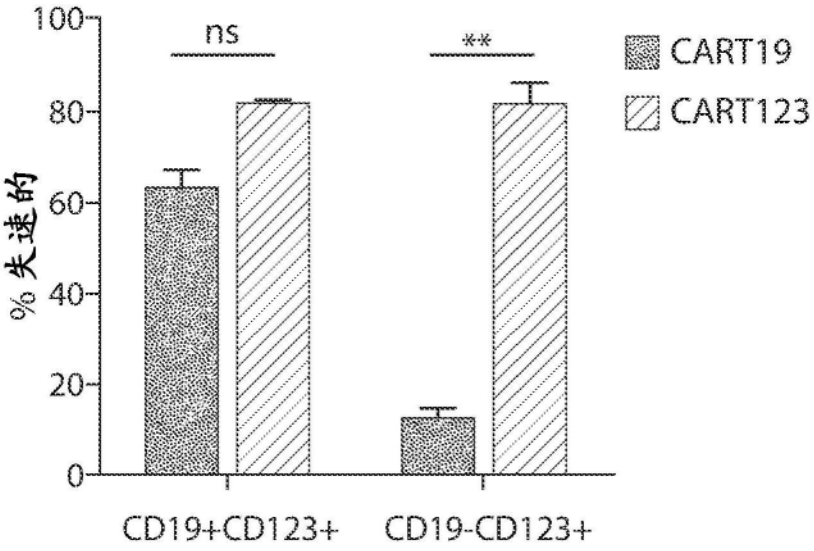


图53C

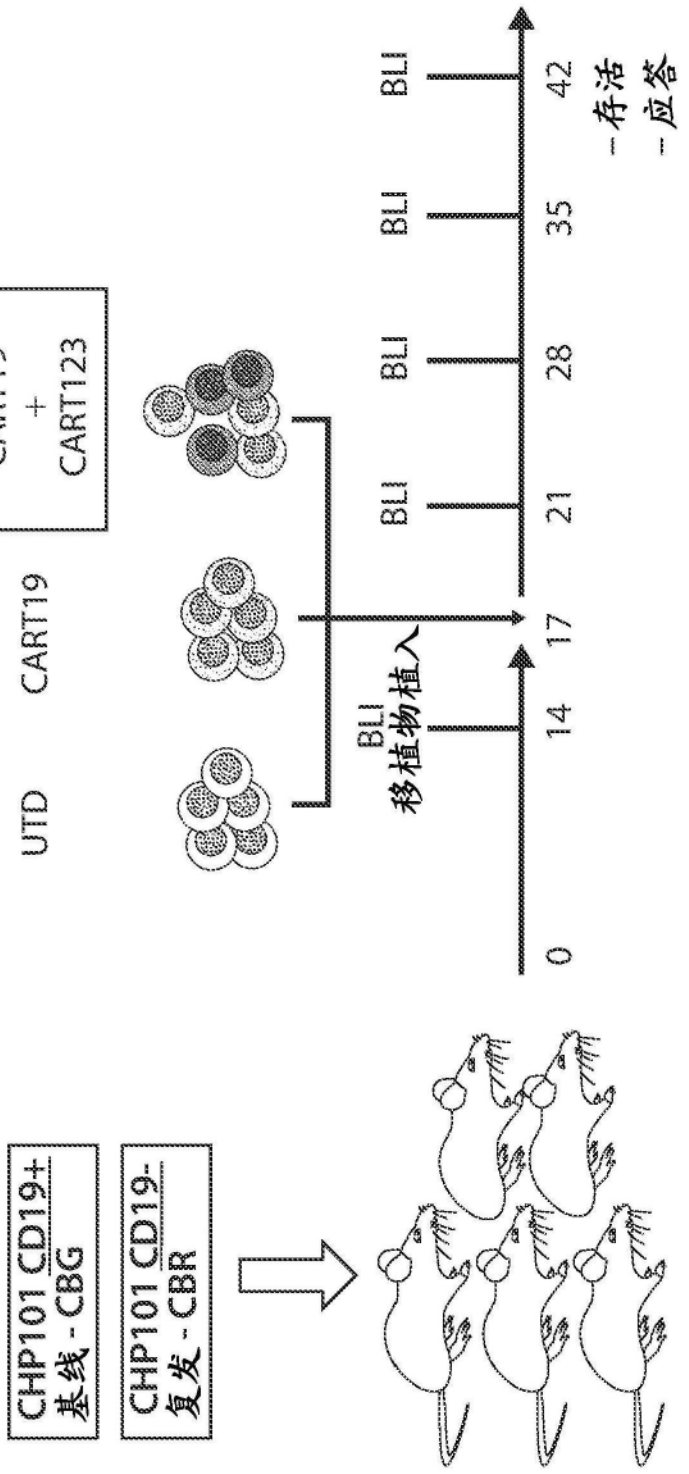

CHP101 CD19+
基线 - CBG
CHP101 CD19-
复发 - CBR
UTD
CART19
CART19
+
CART123
BLI
移植物植入
0
14
17
21
28
35
42
BLI
BLI
BLI
BLI
-存活
-应答

图54A

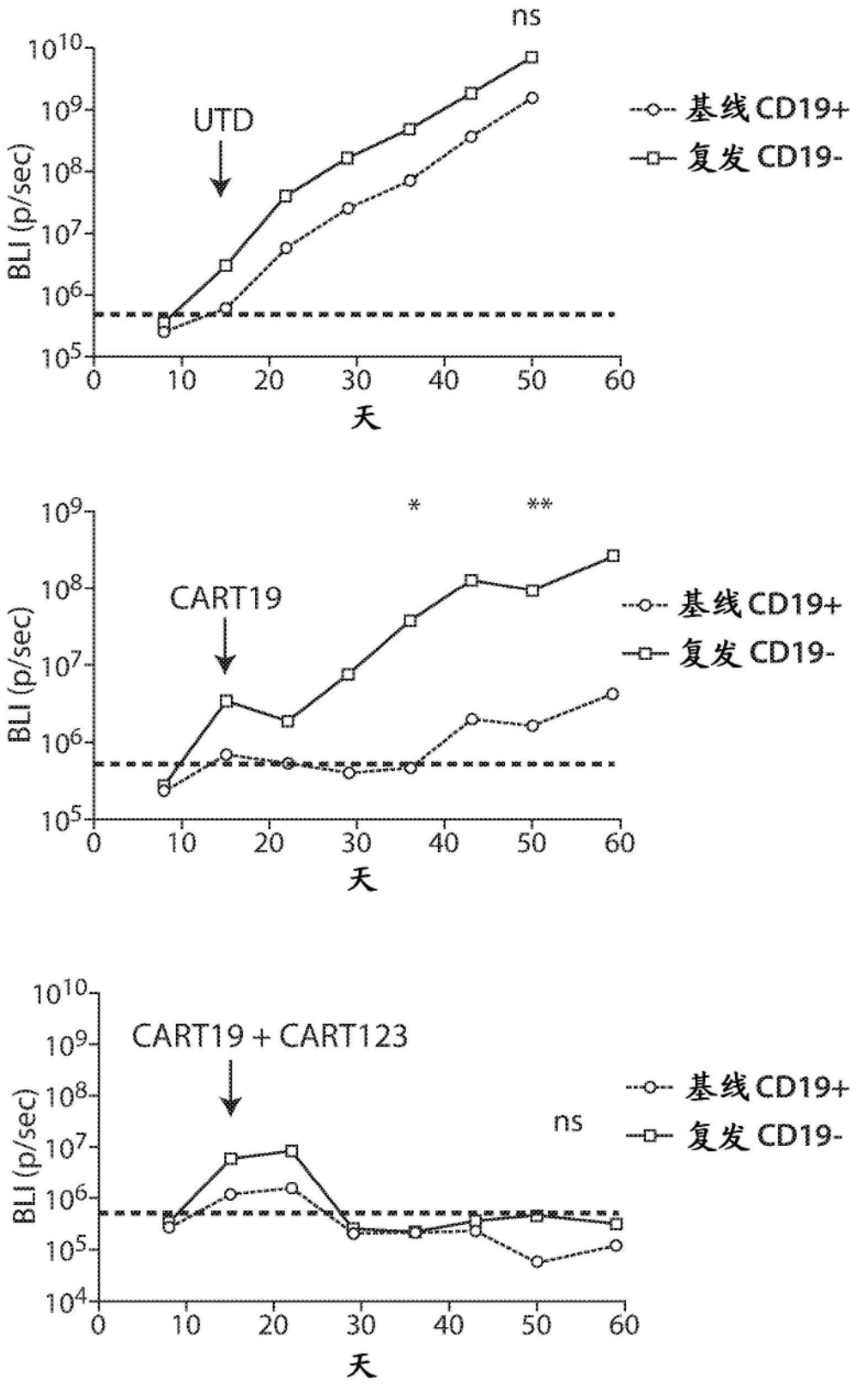


图54B

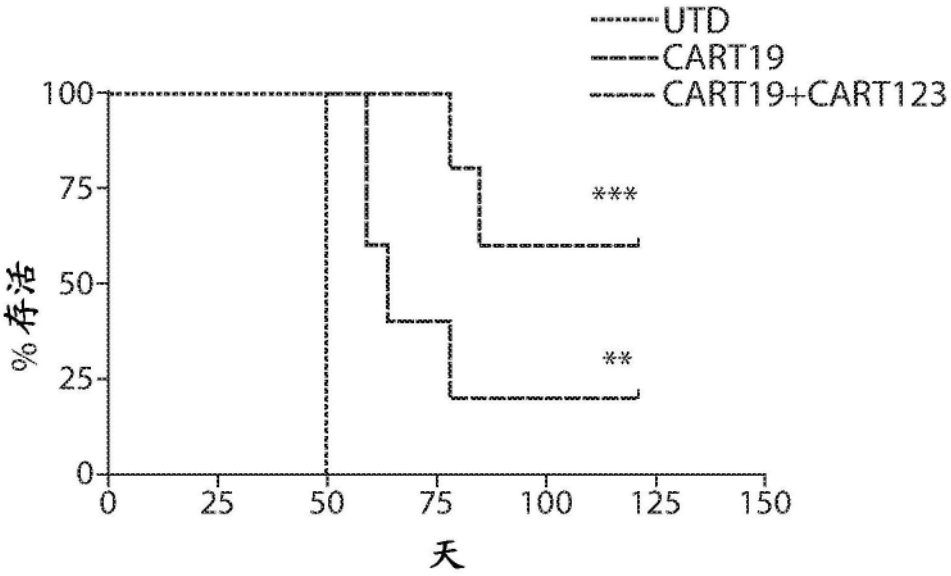

UTD
CART19
CART19+CART123
100
75
50
25
0
% 存活
***
**
0
25
50
75
100
125
150
天

图54C

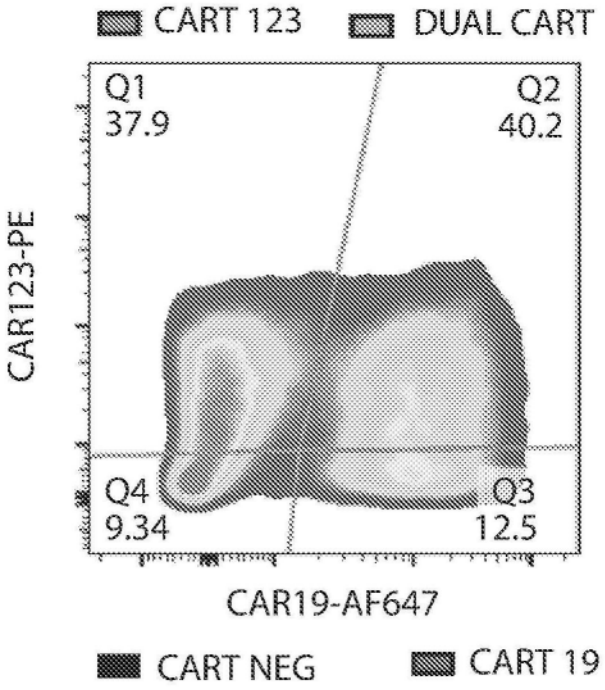

CART 123
DUAL CART
Q1
37.9
Q2
40.2
Q4
9.34
Q3
12.5
CAR123-PE
CAR19-AF647
CART NEG
CART 19

图55A

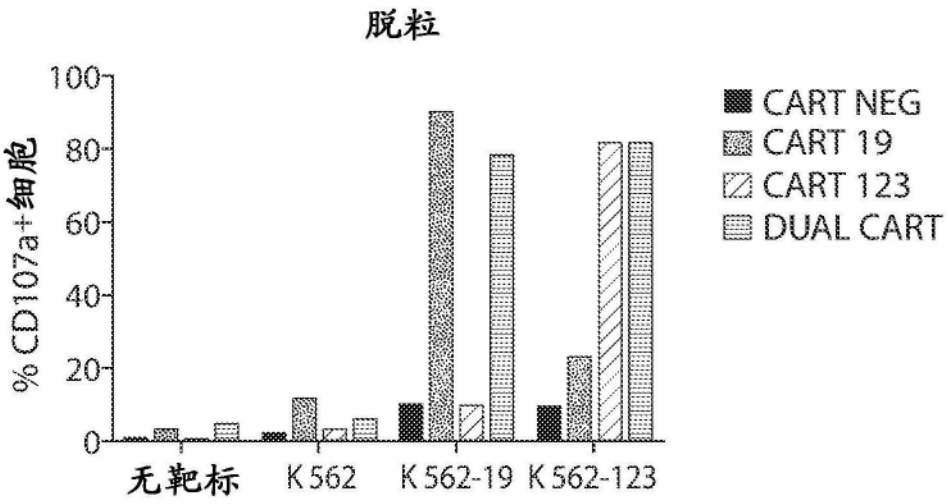

脱粒
% CD107a+细胞
100
80
60
40
20
0
无靶标
K562
K562-19
K562-123
CART NEG
CART 19
CART 123
DUAL CART

图55B

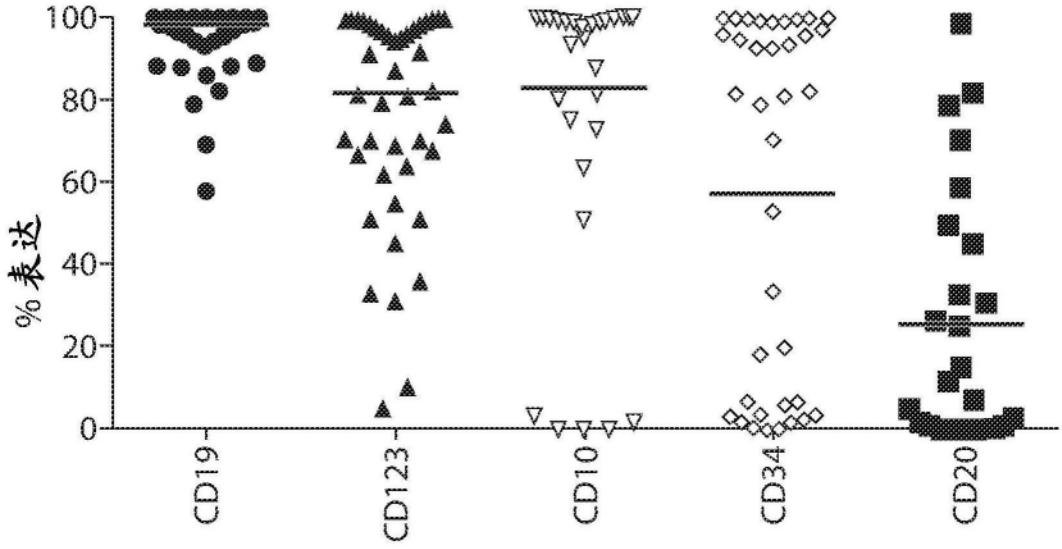

% 表达
100
80
60
40
20
0
CD19
CD123
CD10
CD34
CD20

图56A

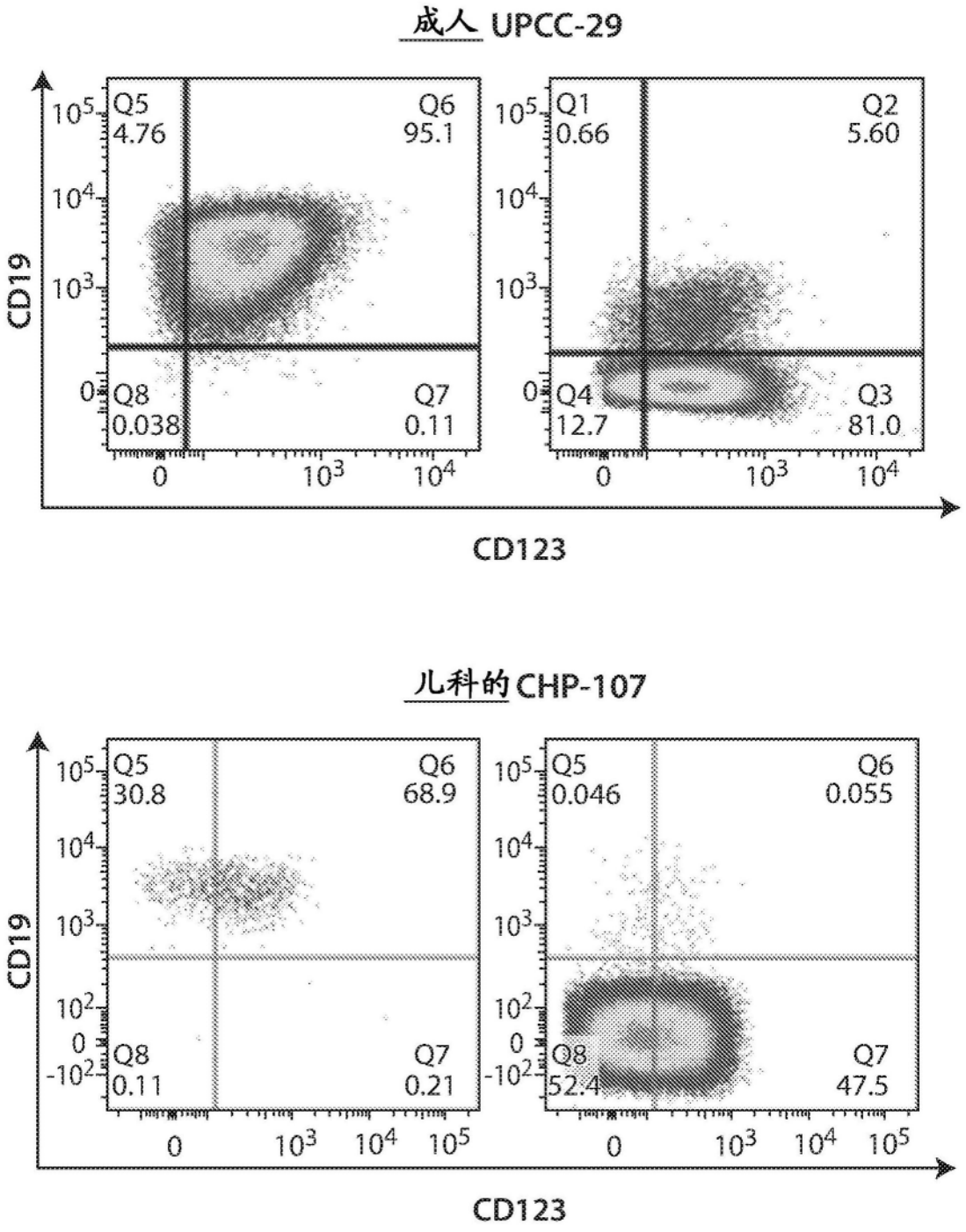

成人 UPCC-29
CD19
CD123
Q5
4.76
Q6
95.1
Q8
0.038
Q7
0.11
Q1
0.66
Q2
5.60
Q4
12.7
Q3
81.0
儿科的 CHP-107
Q5
30.8
Q6
68.9
Q8
0.11
Q7
0.21
Q5
0.046
Q6
0.055
Q8
52.4
Q7
47.5

图56B

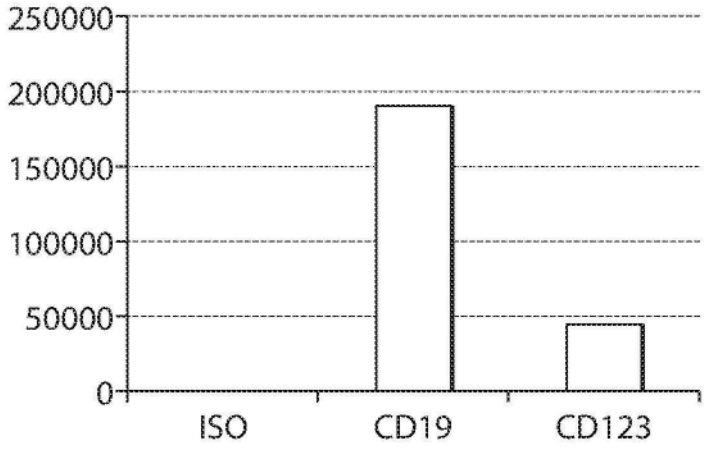

250000
200000
150000
100000
50000
0
ISO
CD19
CD123

图57A

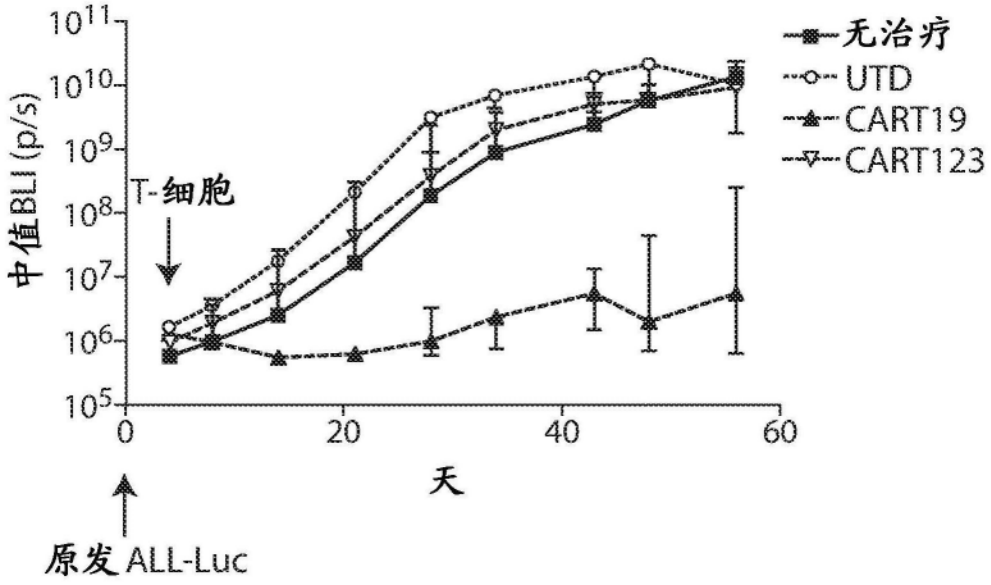

10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
中值BLI (p/s)
T-细胞
0
20
40
60
天
原发ALL-Luc
无治疗
UTD
CART19
CART123

图57B

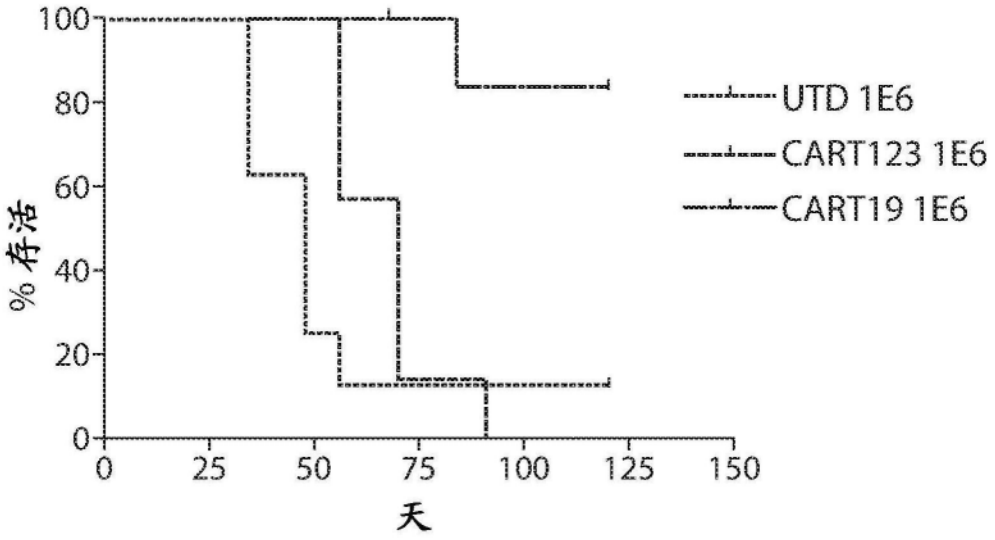

100
80
60
40
20
0
% 存活
0
25
50
75
100
125
150
天
UTD 1E6
CART123 1E6
CART19 1E6

图57C

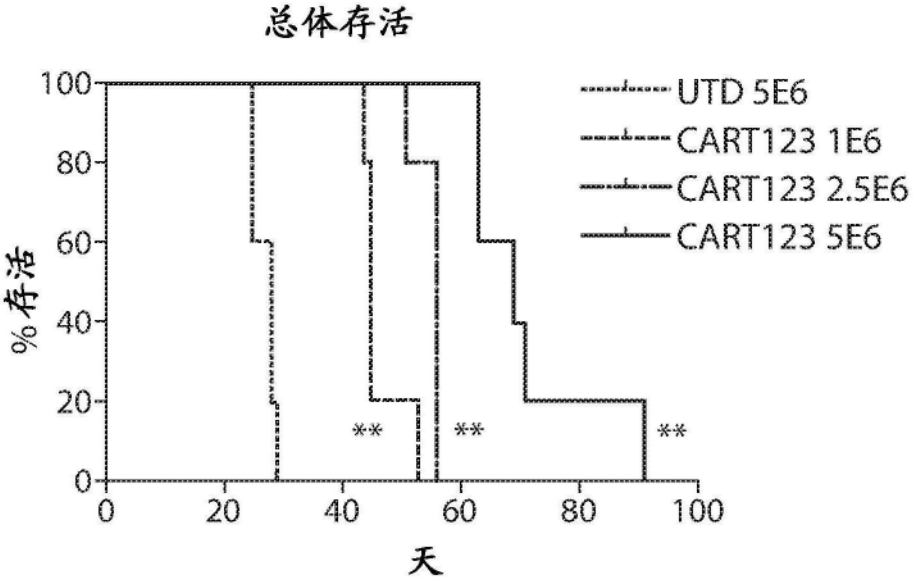

总体存活
100
80
60
40
20
0
% 存活
0
20
40
60
80
100
天
**
**
**
UTD 5E6
CART123 1E6
CART123 2.5E6
CART123 5E6

图57D

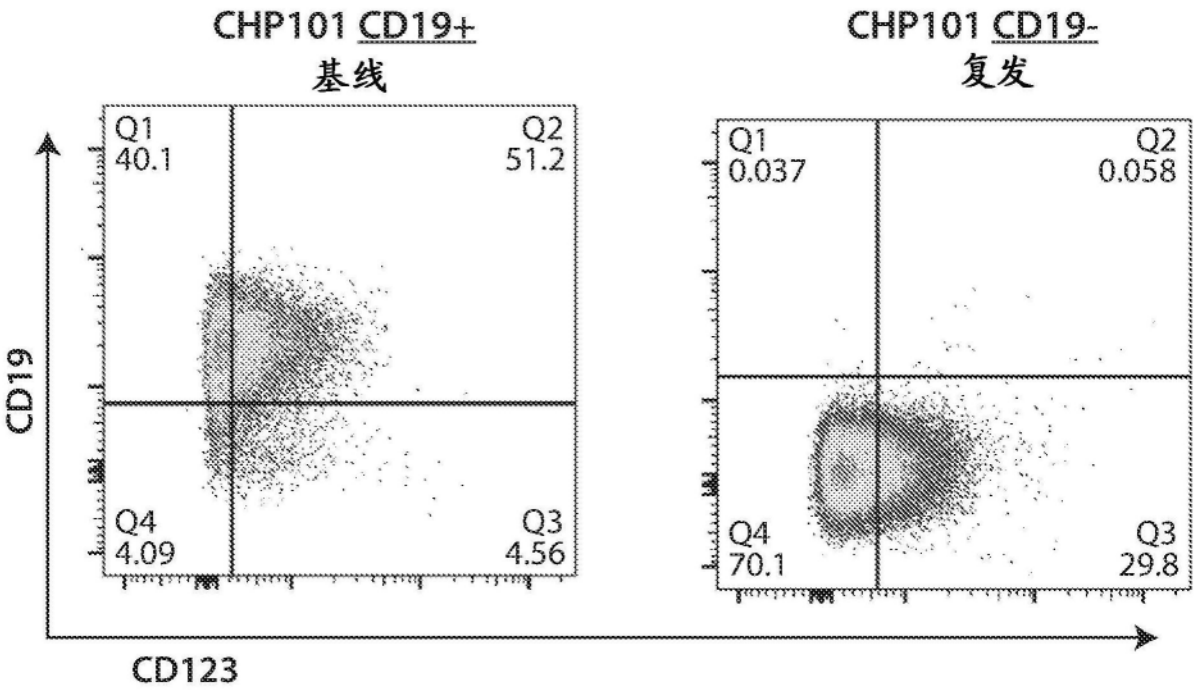

CHP101 CD19+
基线
Q1
40.1
Q2
51.2
Q4
4.09
Q3
4.56
CHP101 CD19-
复发
Q1
0.037
Q2
0.058
Q4
70.1
Q3
29.8
CD19
CD123

图58A

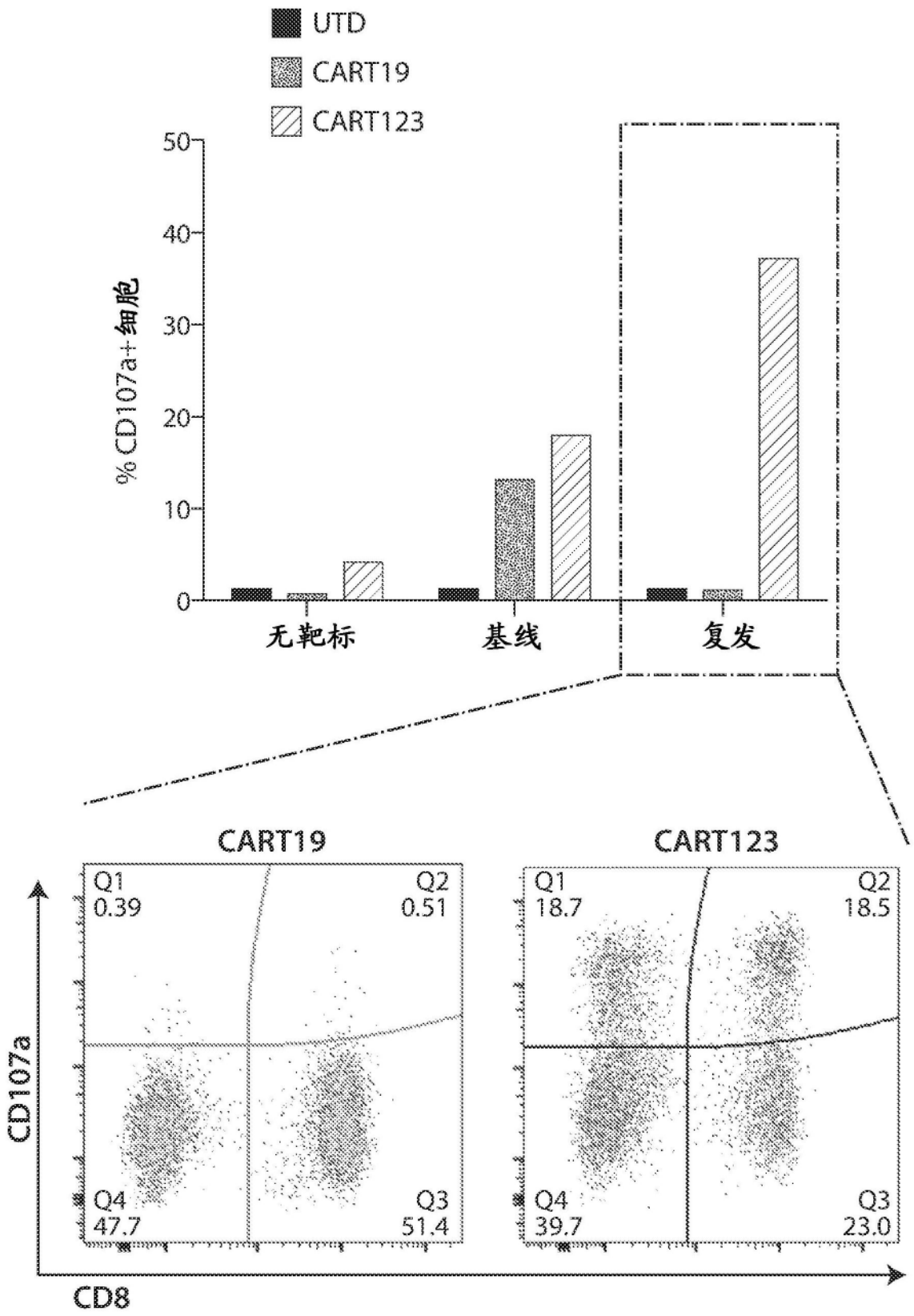

UTD
CART19
CART123
% CD107a+细胞
50
40
30
20
10
0
无靶标
基线
复发
CART19
CART123
Q1
0.39
Q2
0.51
Q4
47.7
Q3
51.4
Q1
18.7
Q2
18.5
Q4
39.7
Q3
23.0
CD107a
CD8

图58B

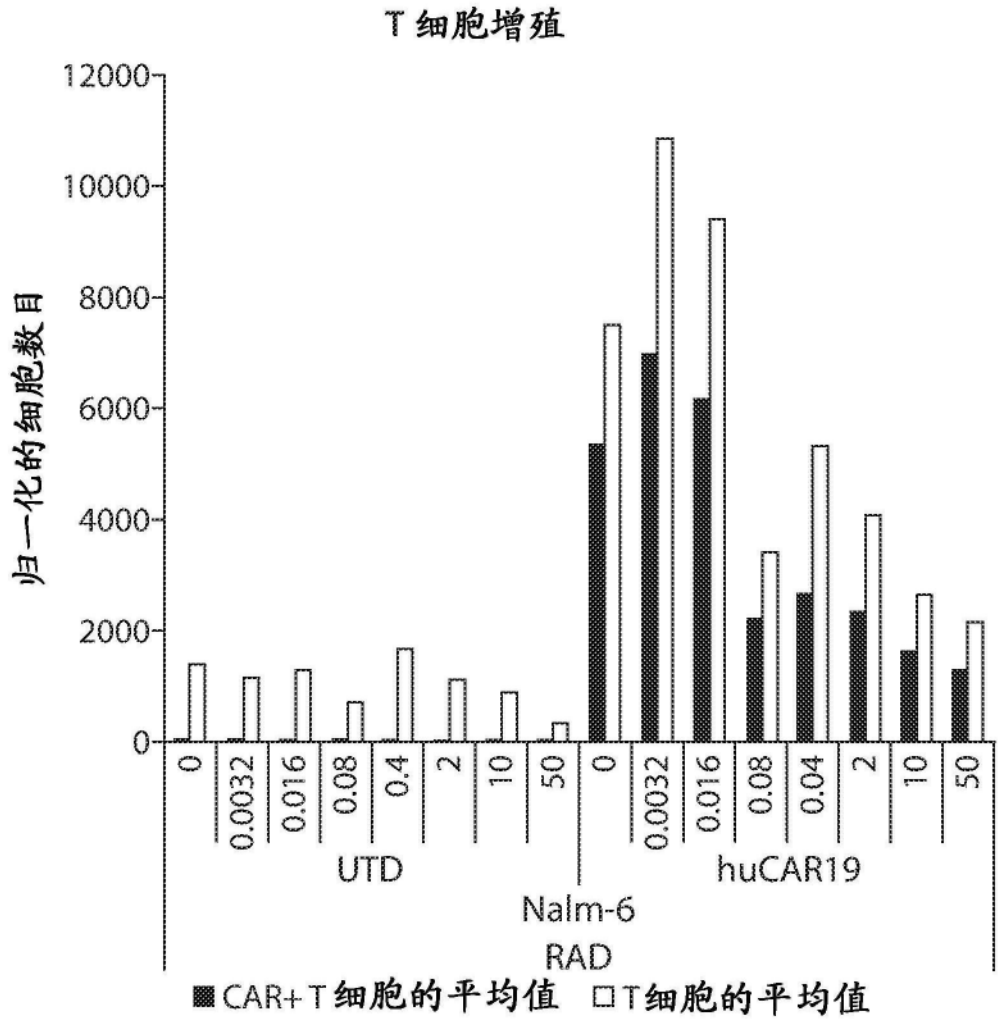

T细胞增殖
归一化的细胞数目
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0.0032
0.016
0.08
0.4
2
10
50
0
0.0032
0.016
0.08
0.04
2
10
50
UTD
huCAR19
Nalm-6
RAD
CAR+T细胞的平均值
T细胞的平均值

图59

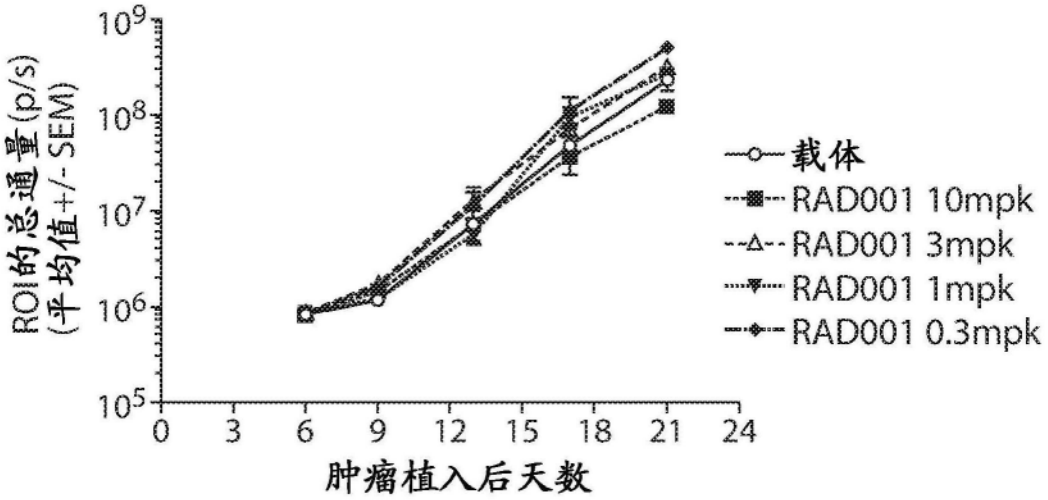

ROI的总通量(p/s)
(平均值+/- SEM)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
3
6
9
12
15
18
21
24
肿瘤植入后天数
载体
RAD001 10mpk
RAD001 3mpk
RAD001 1mpk
RAD001 0.3mpk

图60

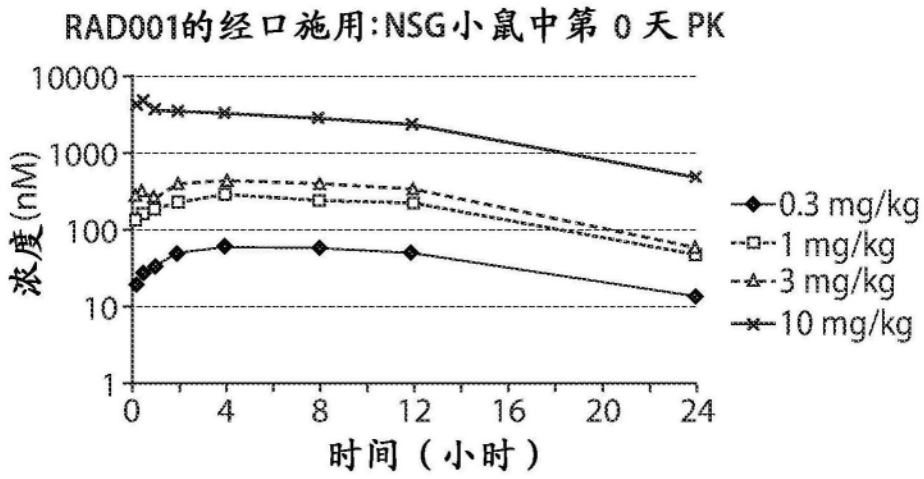

RAD001的经口施用:NSG小鼠中第 0 天 PK
浓度(nM)
10000
1000
100
10
1
0
4
8
12
16
20
24
时间（小时）
0.3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg

图61A

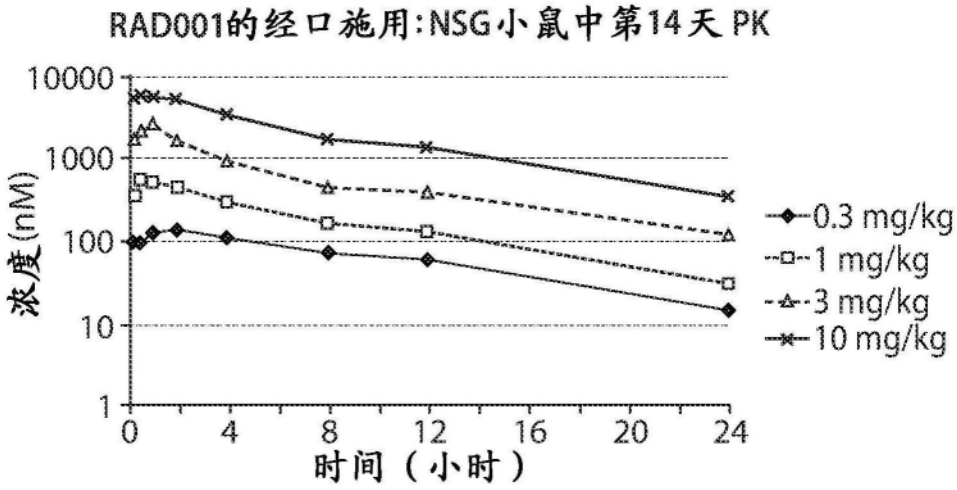

RAD001的经口施用:NSG小鼠中第14天 PK
浓度(nM)
10000
1000
100
10
1
0
4
8
12
16
20
24
时间（小时）
0.3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg

图61B

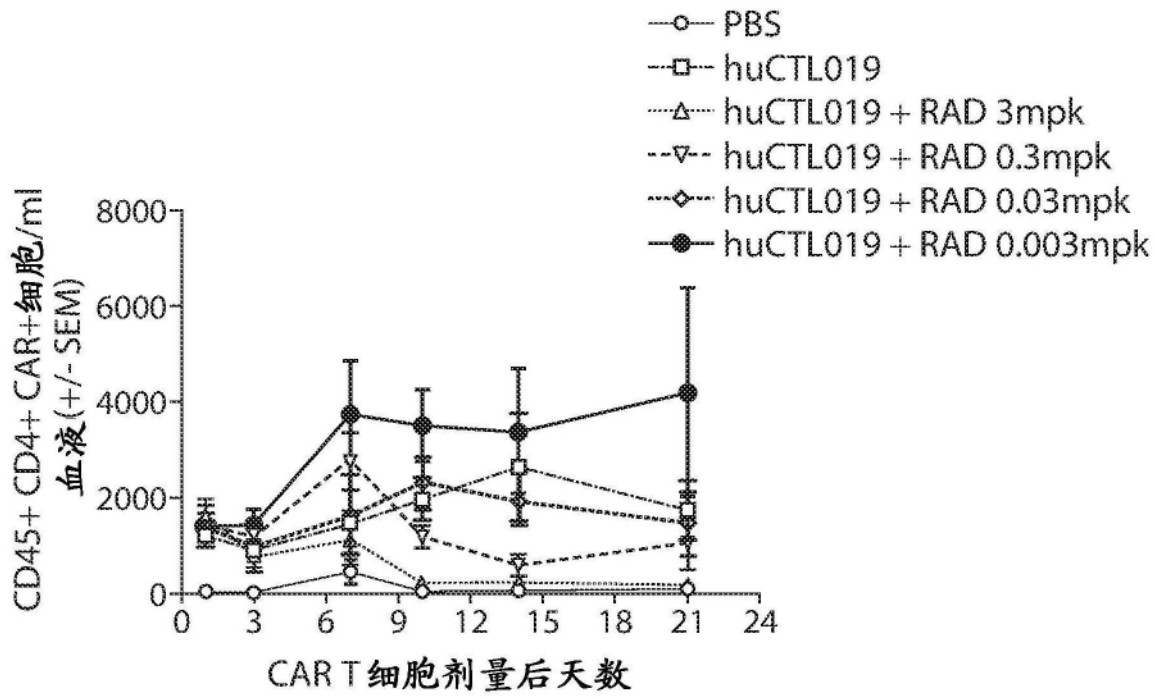

PBS
huCTL019
huCTL019 + RAD 3mpk
huCTL019 + RAD 0.3mpk
huCTL019 + RAD 0.03mpk
huCTL019 + RAD 0.003mpk
CD45+ CD4+ CAR+细胞/ml血液(+/- SEM)
8000
6000
4000
2000
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
CAR T细胞剂量后天数

图62A

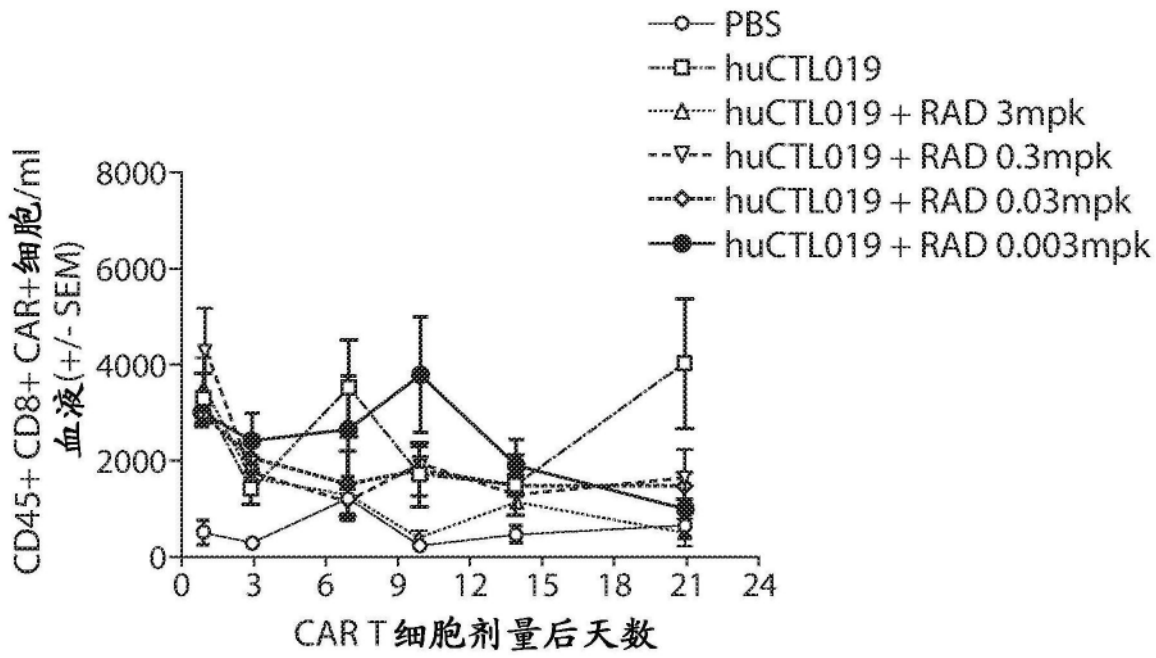

PBS
huCTL019
huCTL019 + RAD 3mpk
huCTL019 + RAD 0.3mpk
huCTL019 + RAD 0.03mpk
huCTL019 + RAD 0.003mpk
CD45+ CD8+ CAR+细胞/ml血液(+/- SEM)
8000
6000
4000
2000
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
CAR T细胞剂量后天数

图62B

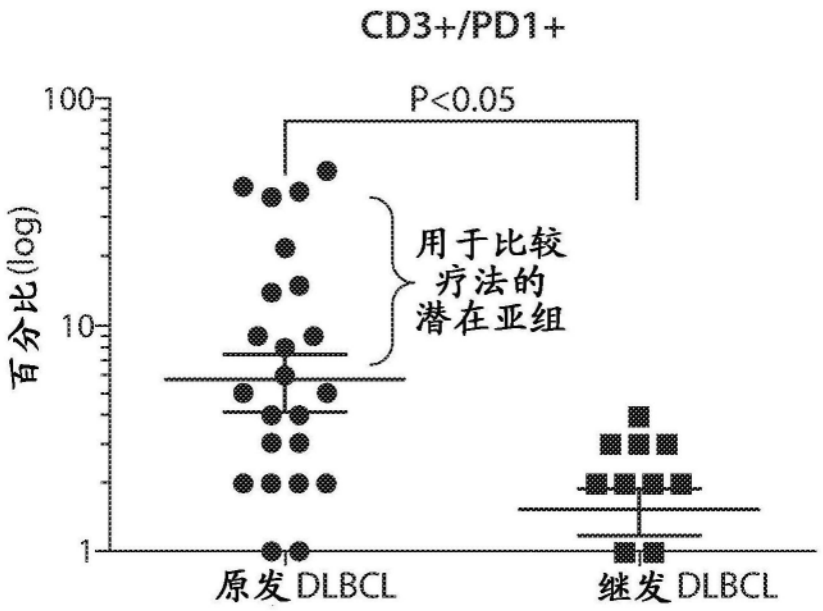


图63

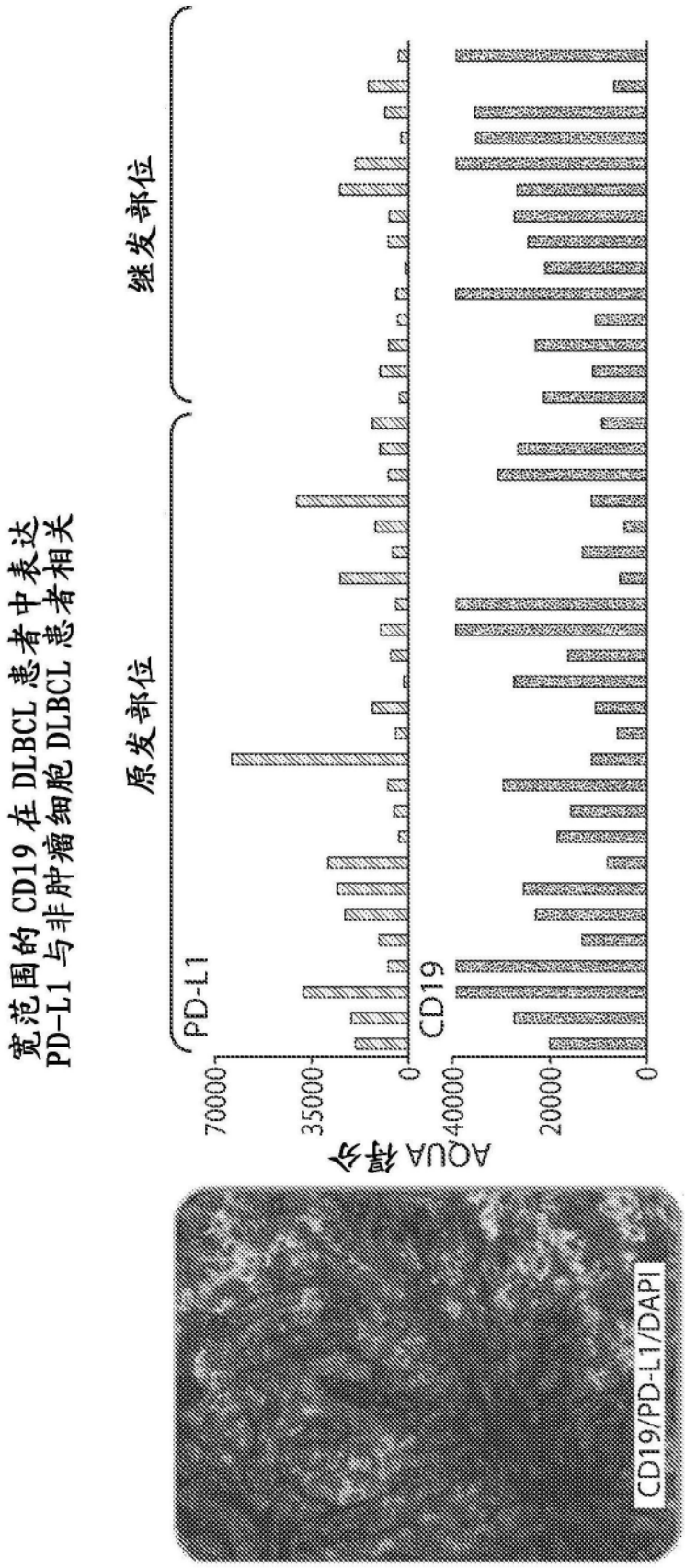

宽范围的 CD19 在 DLBCL 患者中表达
PD-L1 与非肿瘤细胞 DLBCL 患者相关
原发部位
继发部位
PD-L1
CD19
70000
35000
0
40000
20000
0
CD19/PD-L1/DAPI

图64

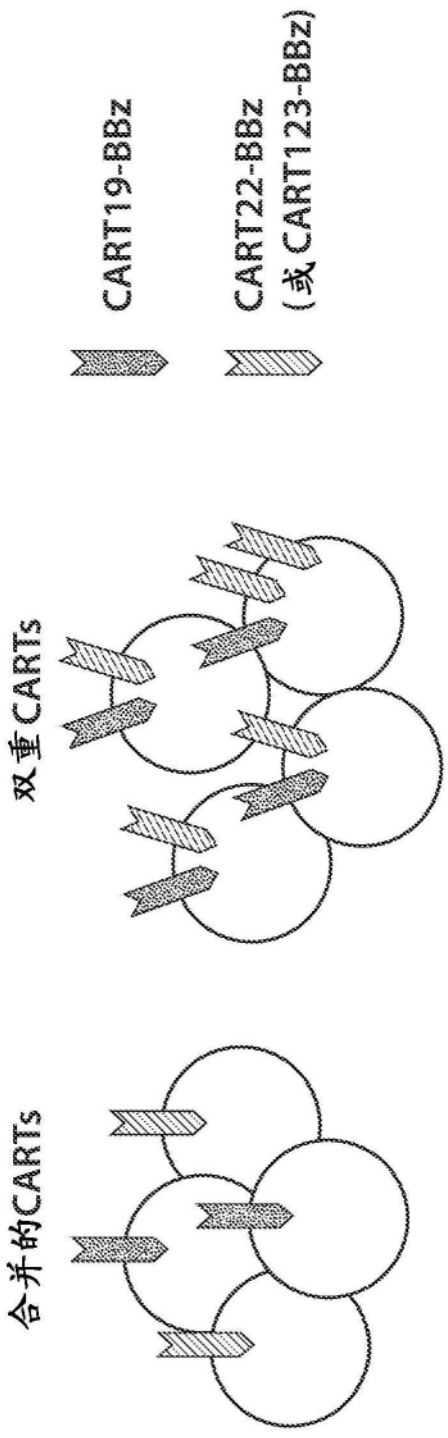


图65

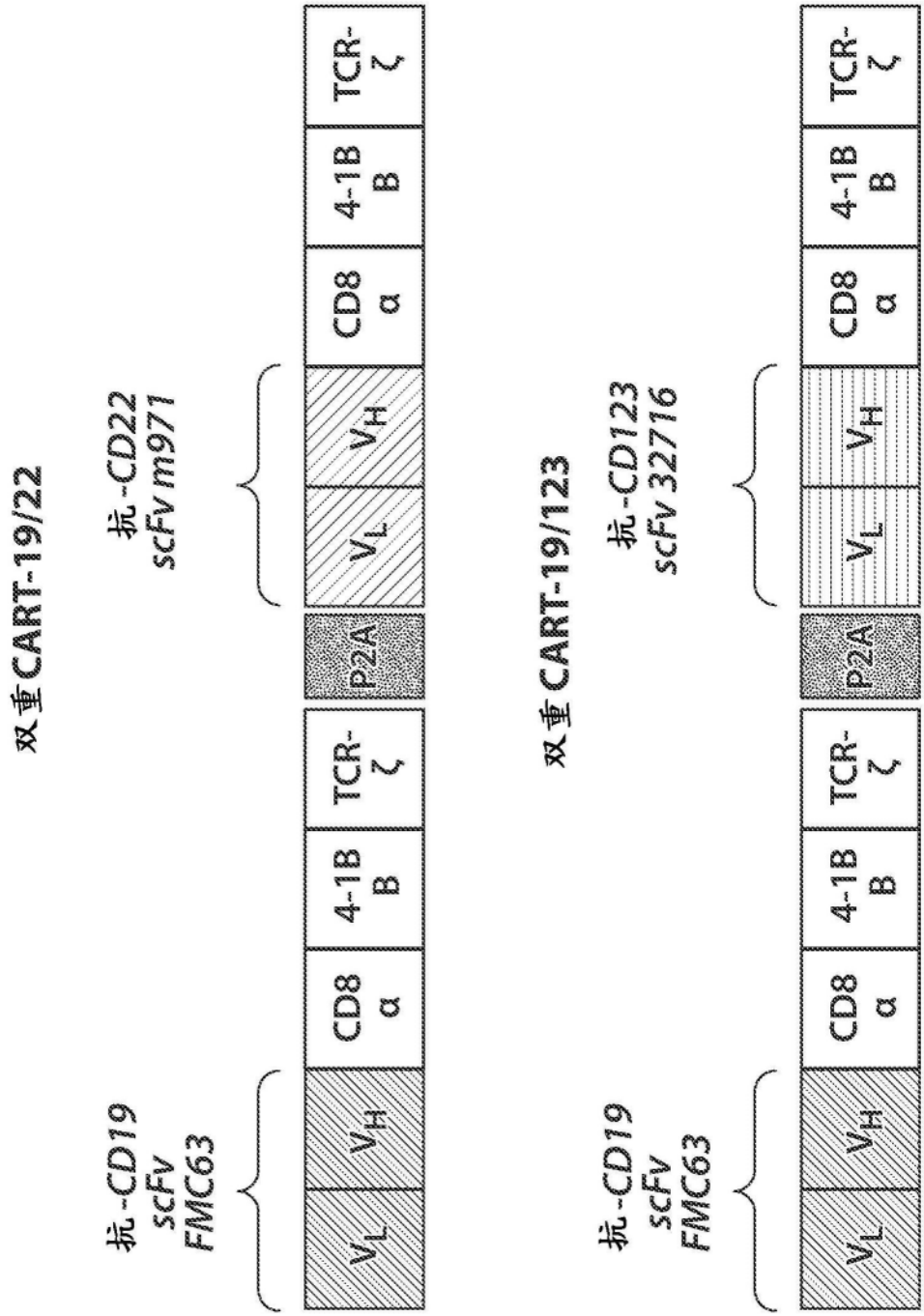

双重CART-19/22
抗-CD19 scFv FMC63
VL
VH
CD8 α
4-1B B
TCR-ζ
抗-CD22 scFv m971
P2A
VL
VH
CD8 α
4-1B B
TCR-ζ
双重CART-19/123
抗-CD19 scFv FMC63
VL
VH
CD8 α
4-1B B
TCR-ζ
抗-CD123 scFv 32716
P2A
VL
VH
CD8 α
4-1B B
TCR-ζ

图66

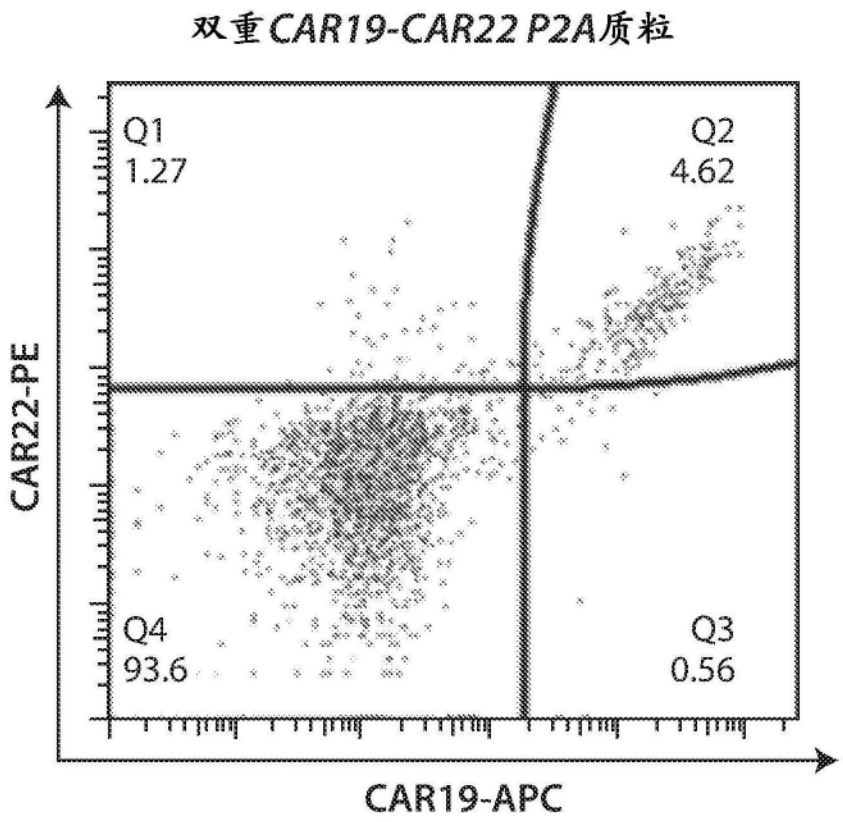
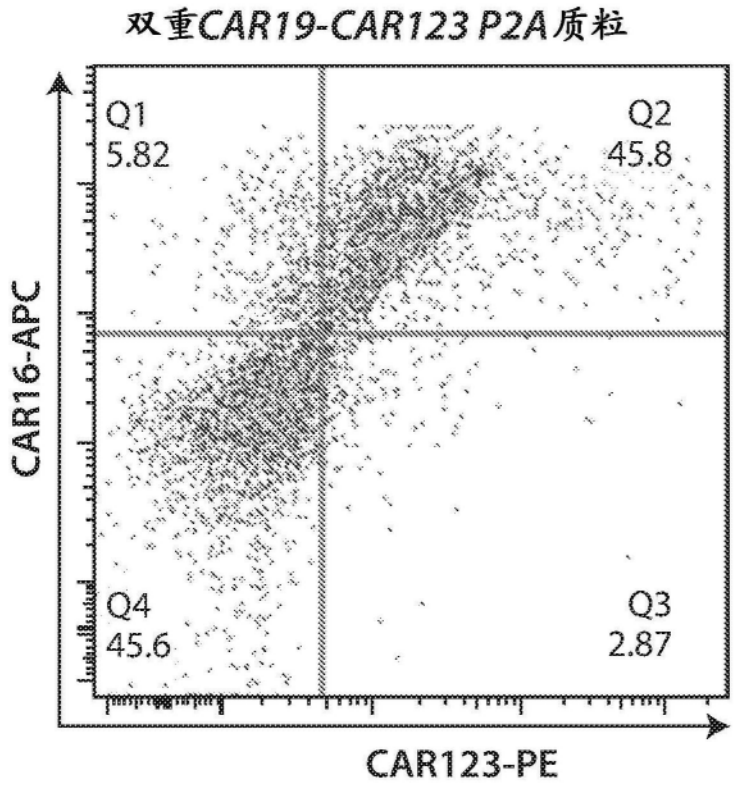

双重CAR19-CAR22 P2A质粒
Q1
1.27
Q2
4.62
Q4
93.6
Q3
0.56
CAR22-PE
CAR19-APC

图67


双重CAR19-CAR123 P2A质粒
Q1
5.82
Q2
45.8
Q4
45.6
Q3
2.87
CAR16-APC
CAR123-PE

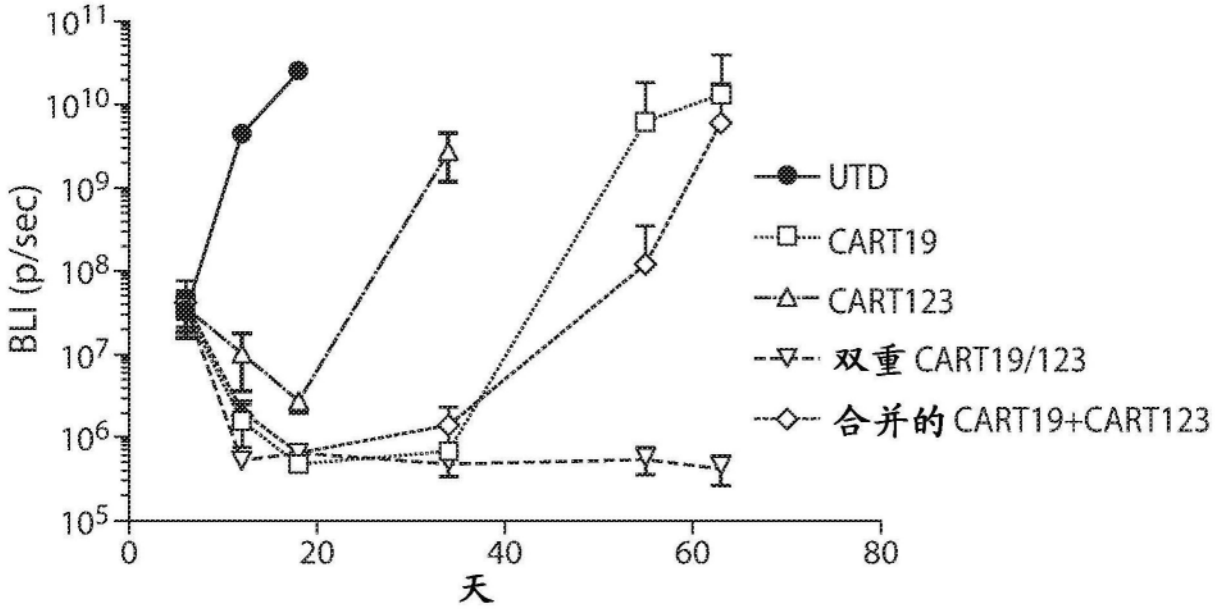

BLI (p/sec)
天
UTD
CART19
CART123
双重 CART19/123
合并的 CART19+CART123

图68

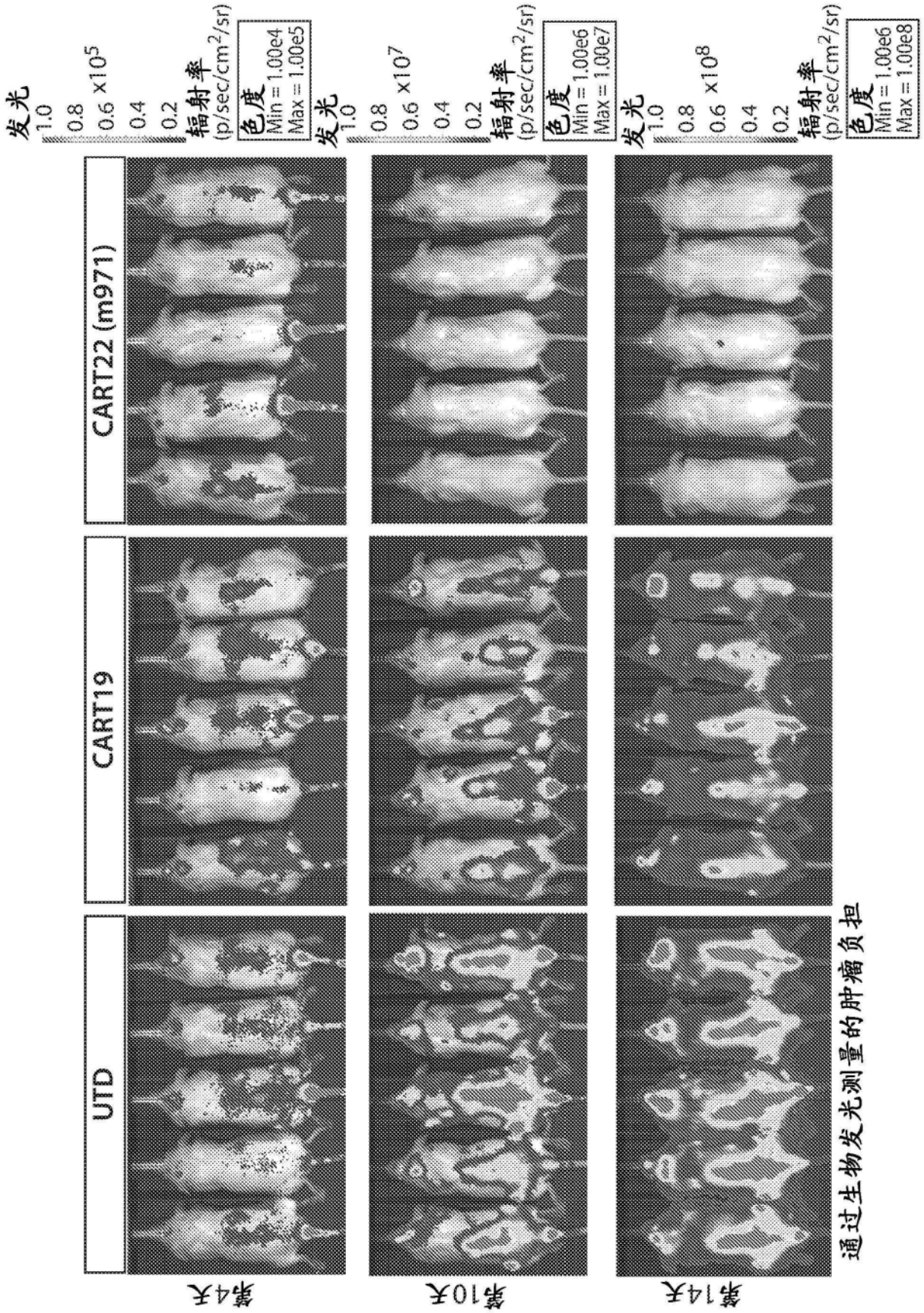

UTD
CART19
CART22 (m971)
发光
辐射率 (p/sec/cm²/sr)
色度
Min = 1.00e4
Max = 1.00e5
Min = 1.00e6
Max = 1.00e7
Min = 1.00e6
Max = 1.00e8
第4天
第10天
第14天
通过生物发光测量的肿瘤负担

图69

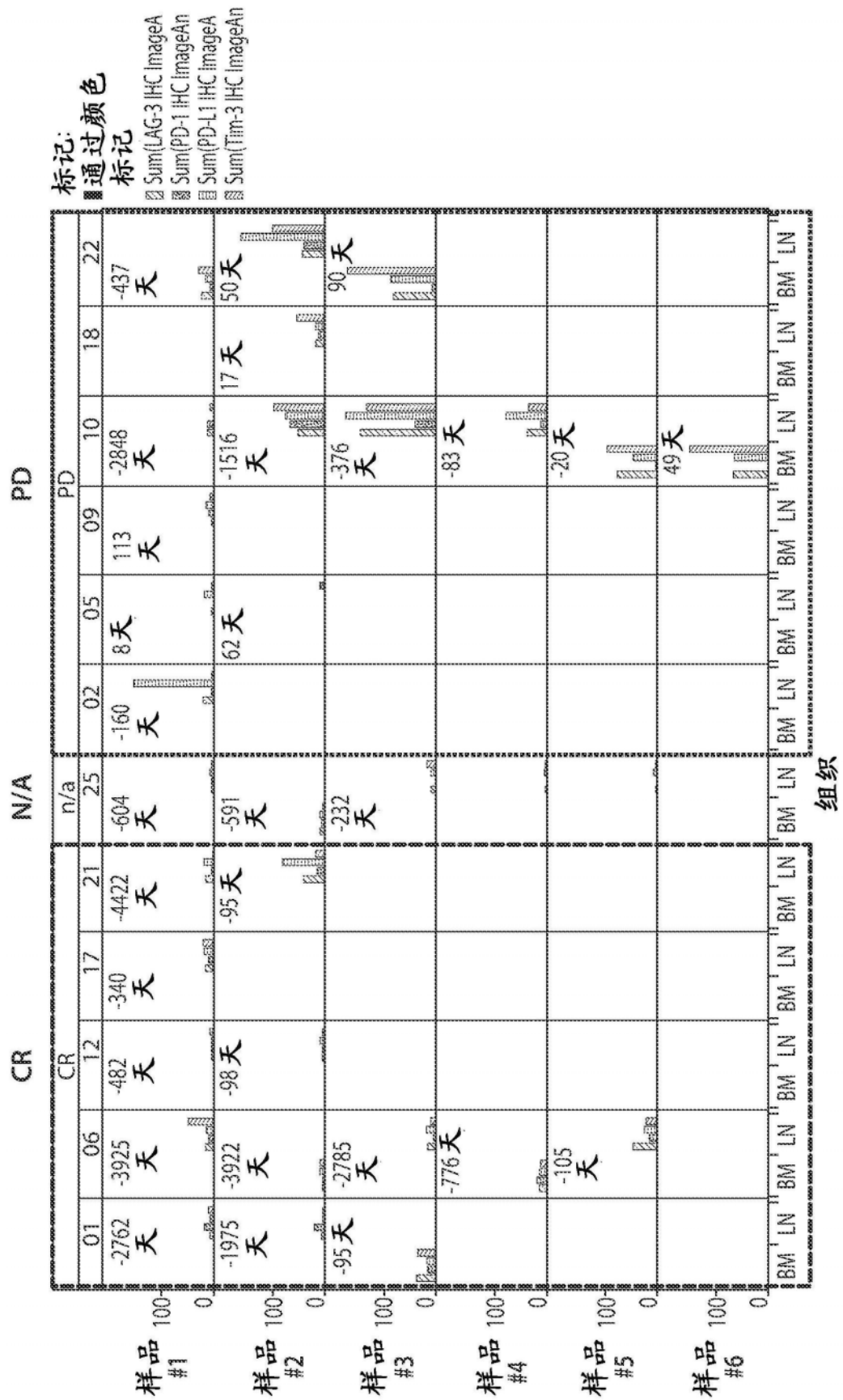

CR
N/A
PD
标记:
通过颜色标记
Sum(LAG-3 IHC ImageA
Sum(PD-1 IHC ImageAn
Sum(PD-L1 IHC ImageA
Sum(Tim-3 IHC ImageAn
样品#1
样品#2
样品#3
样品#4
样品#5
样品#6
组织
BM LN

图70

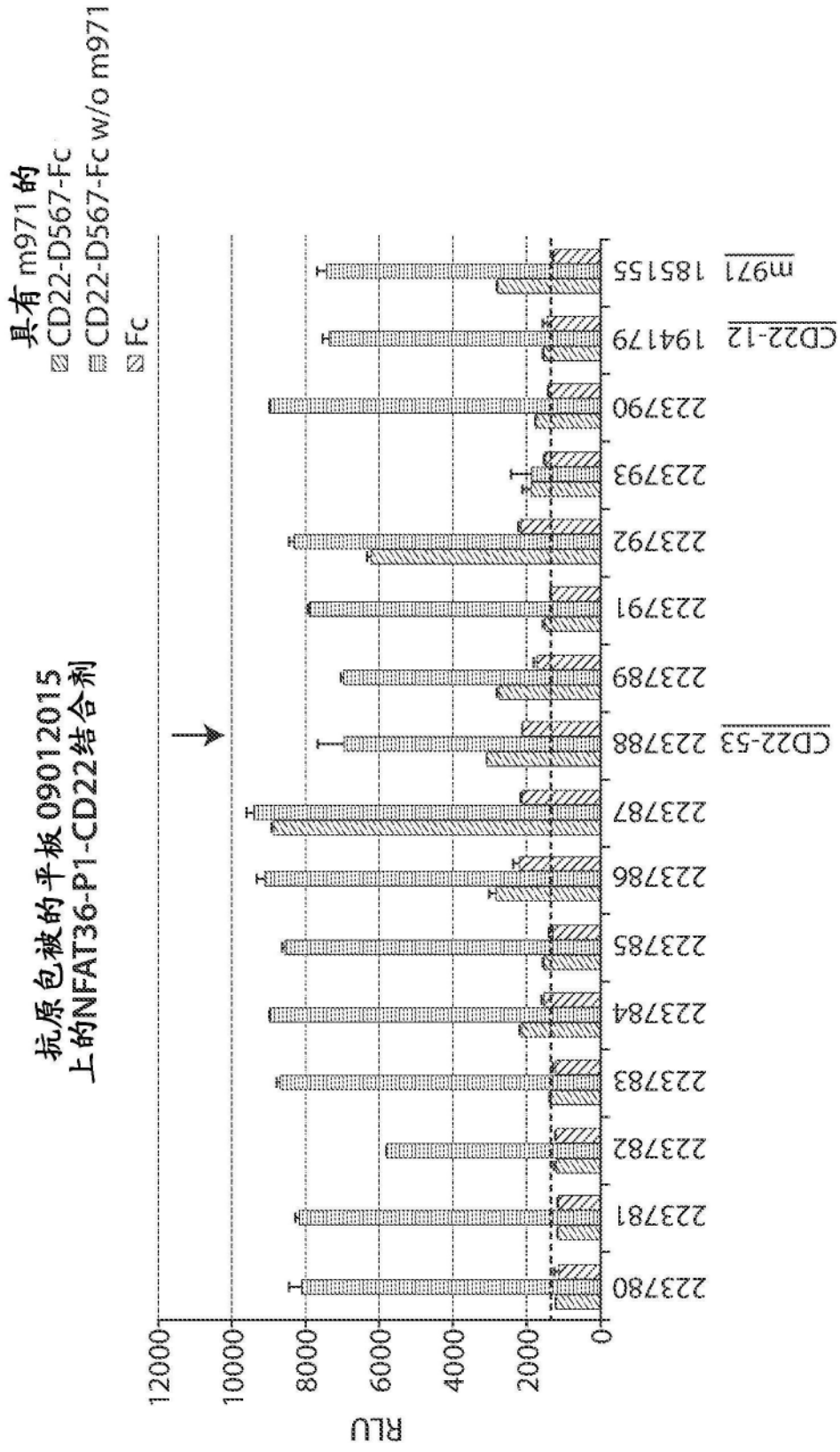

抗原包被的平板09012015
上的NFAT36-P1-CD22结合剂
具有m971的
CD22-D567-Fc
CD22-D567-Fc w/o m971
Fc
RLU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
223780
223781
223782
223783
223784
223785
223786
223787
CD22-53 223788
223789
223791
223792
223793
CD22-12 194179
m971 185155

图71

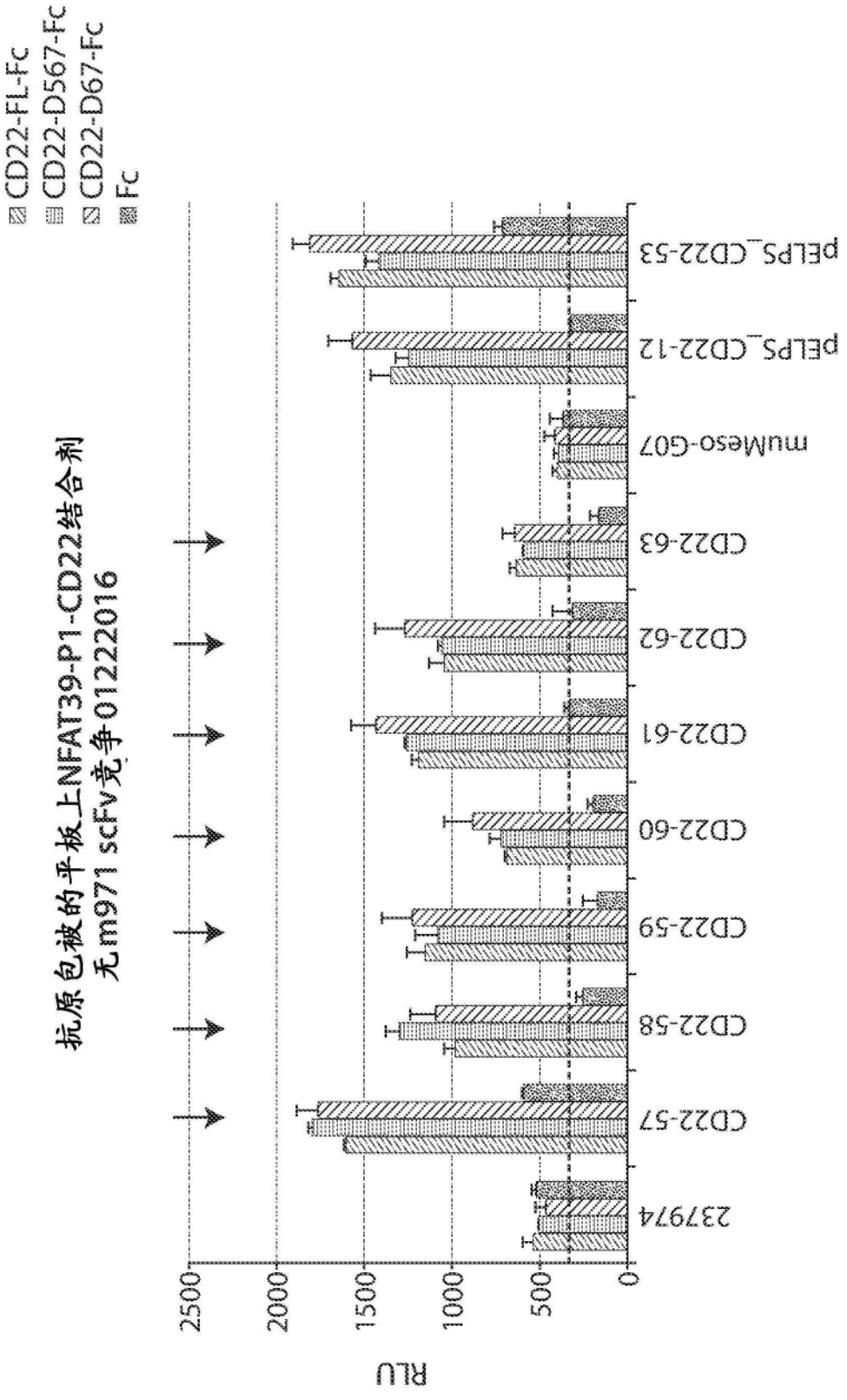

CD22-FL-Fc
CD22-D567-Fc
CD22-D67-Fc
Fc
抗原包被的平板上NFAT39-P1-CD22结合剂
无m971 scFv竞争01222016
RLU
2500
2000
1500
1000
500
0
237974
CD22-57
CD22-58
CD22-59
CD22-60
CD22-61
CD22-62
CD22-63
muMeso-G07
pELPS_CD22-12
pELPS_CD22-53

图72

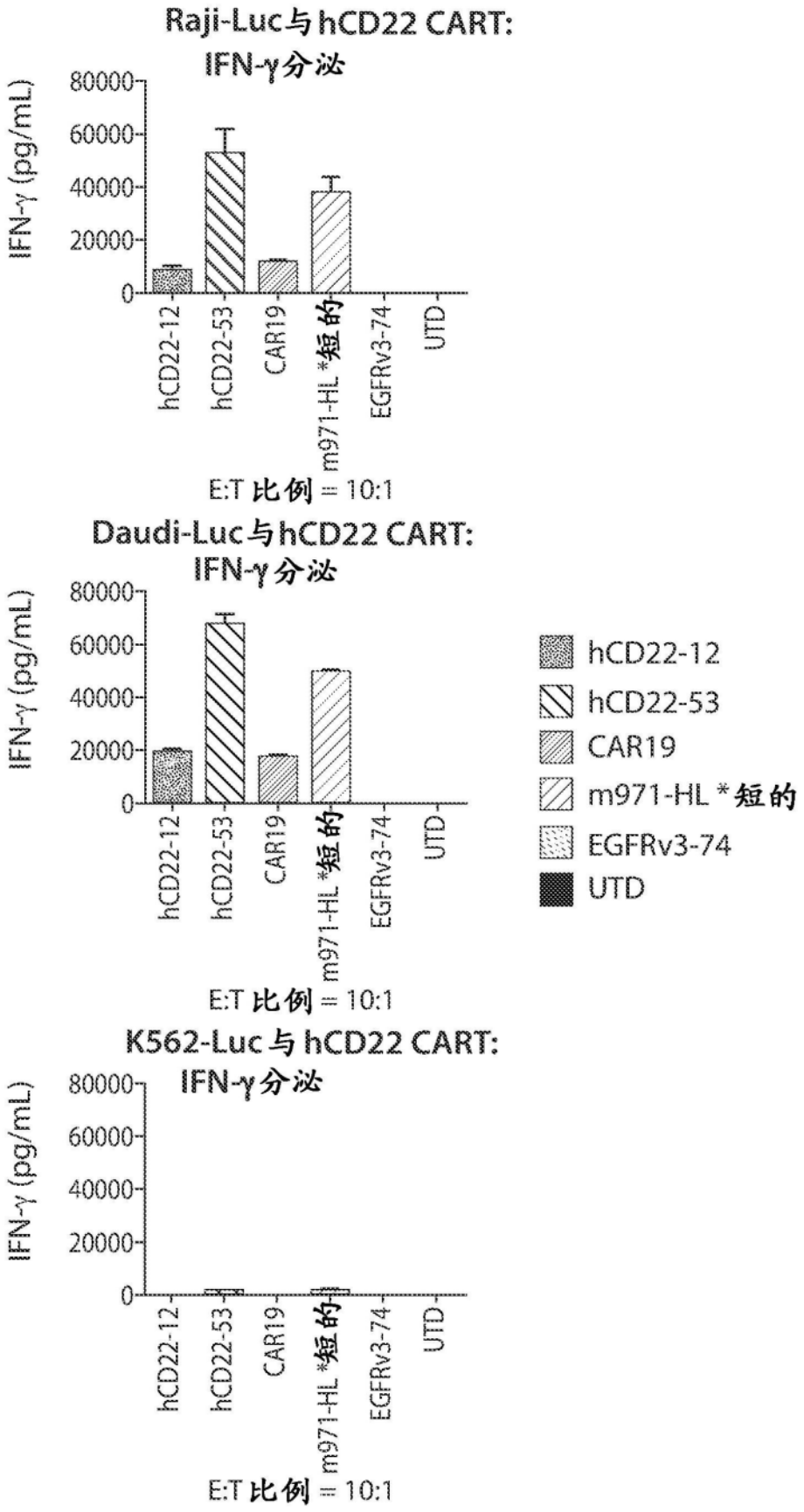

Raji-Luc与hCD22 CART:
IFN-γ分泌
IFN-γ (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL *短的
EGFRv3-74
UTD
E:T 比例 = 10:1
Daudi-Luc与hCD22 CART:
IFN-γ分泌
IFN-γ (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL *短的
EGFRv3-74
UTD
E:T 比例 = 10:1
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL *短的
EGFRv3-74
UTD
K562-Luc与hCD22 CART:
IFN-γ分泌
IFN-γ (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL *短的
EGFRv3-74
UTD
E:T 比例 = 10:1

图73

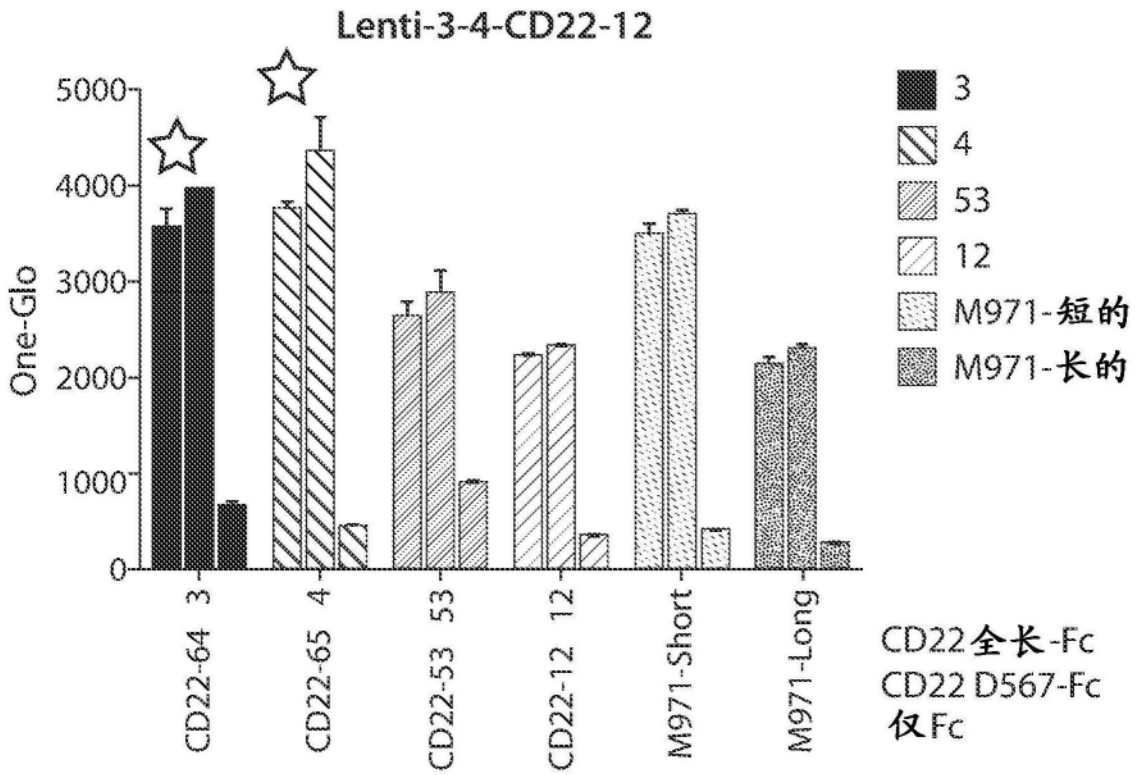

Lenti-3-4-CD22-12
One-Glo
5000
4000
3000
2000
1000
0
3
4
53
12
M971-短的
M971-长的
CD22-64 3
CD22-65 4
CD22-53 53
CD22-12 12
M971-Short
M971-Long
CD22全长-Fc
CD22 D567-Fc
仅Fc

图74

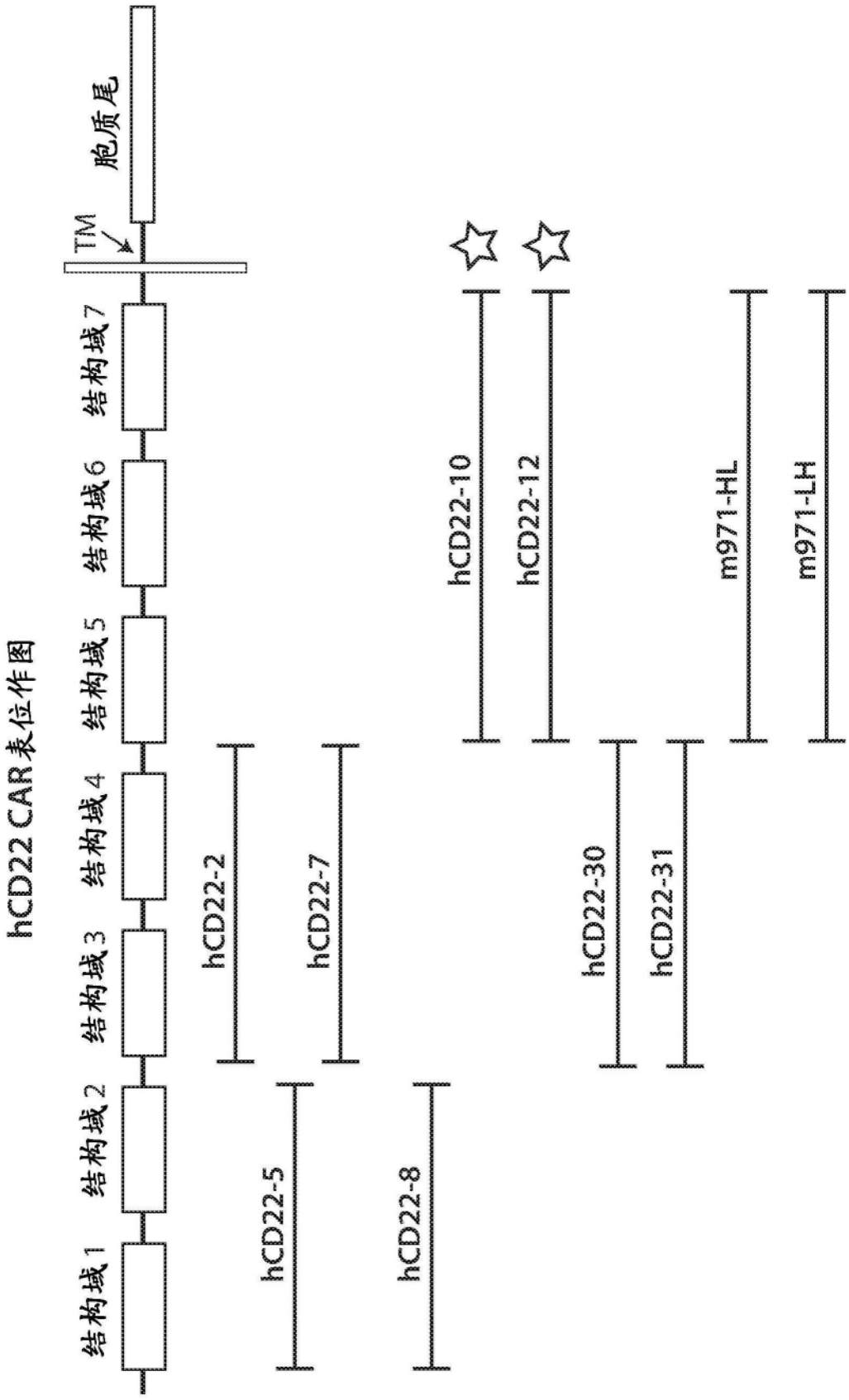

hCD22 CAR表位作图
结构域1
结构域2
结构域3
结构域4
结构域5
结构域6
结构域7
TM
胞质尾
hCD22-2
hCD22-7
hCD22-5
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
m971-HL
m971-LH

图75