



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397440 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180019063.X

(22) 申请日 2021.02.02

(30) 优先权数据

62/969,917 2020.02.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/016194 2021.02.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/158534 EN 2021.08.12

(71) 申请人 西雅图儿童医院 (DBA西雅图儿童研
究所)

地址 美国华盛顿州西雅图

(72) 发明人 迈克尔·C·詹森

詹姆斯·F·马泰伊

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 刘奇

(51) Int.Cl.

A61K 35/15 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

权利要求书7页 说明书71页

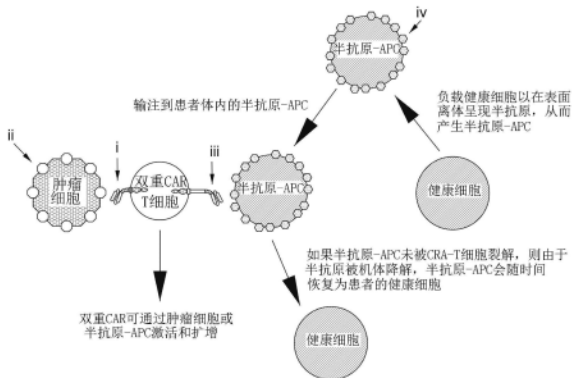
序列表21页 附图40页

(54) 发明名称

用半抗原标记细胞刺激嵌合抗原受体T细胞的方法和组合物

(57) 摘要

本文提供的方法和组合物的一些实施方式涉及半抗原标记的细胞刺激嵌合抗原受体 (CAR) T细胞的用途。在一些实施方式中,所述CART细胞可包括特异性结合至半抗原的CAR。一些实施方式涉及由半抗原标记的细胞在体内或体外刺激CART细胞。



1. 一种诱导嵌合抗原受体 (CAR) T细胞扩增的方法,包括:
将所述CAR T细胞与半抗原呈递细胞 (H-APC) 孵育,其中所述CAR T细胞的CAR与连接至所述H-APC的半抗原特异性结合。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述CAR T细胞和所述H-APC来源于单个受试者,例如人、牲畜或家畜。
3. 一种治疗、抑制或改善受试者癌症的方法,包括:
向诸如人、牲畜或家畜的受试者施用有效量的嵌合抗原受体 (CAR) T细胞,其中所述CAR T细胞的CAR与癌症的肿瘤特异性抗原特异性结合;和
通过将所述CAR T细胞与半抗原呈递细胞 (H-APC) 孵育诱导所述CAR T细胞的扩增,其中所述CAR T细胞的CAR与连接至所述H-APC的半抗原特异性结合。
4. 如权利要求3所述的方法,其中所述CAR T细胞和所述H-APC来源于所述受试者。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述CAR T细胞包括双特异性CAR。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述CAR T细胞包括一种以上CAR。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述CAR T细胞包括可与肿瘤特异性抗原特异性结合的第一配体结合结构域和能够与所述半抗原特异性结合的第二配体结合结构域。
8. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述CAR T细胞包括单特异性CAR。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述CAR包括可与肿瘤特异性抗原和半抗原特异性结合的单配体结合结构域。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述孵育是体外孵育。
11. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述孵育是体内孵育。
12. 如权利要求1-11中任一项的方法,其中所述CAR与肿瘤特异性抗原特异性结合。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述肿瘤特异性抗原选自CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原 (BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、表皮生长因子受体变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿素受体1 (ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述半抗原选自表1中所列的半抗原或选自包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。
15. 如权利要求1-14中任一项的方法,其中所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。
16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。
17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述半抗原共价连接到所述H-APC的细胞外表面。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述半抗原通过磷脂醚 (PLE) 连接至H-APC。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述CAR T细胞来源于CD4+细胞或CD8+细胞。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述CD8⁺细胞是CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8⁺T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、效应记忆CD8⁺T细胞和本体CD8⁺T细胞。

21. 如权利要求19所述的方法,其中所述CD8⁺细胞是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,所述CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。

22. 如权利要求19所述的方法,其中所述CD4⁺细胞为CD4⁺T辅助淋巴细胞,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺T细胞。

23. 如权利要求19所述的方法,其中所述CD4⁺辅助淋巴细胞是幼稚CD4⁺T细胞,并且其中所述幼稚CD4⁺T细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述CAR⁺T细胞来源于前体T细胞。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述CAR⁺T细胞来源于造血干细胞。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述H-APC来源于选自T细胞和B细胞的细胞。

27. 如权利要求2-26中任一项所述的方法,其中所述受试者是诸如人、牲畜或家畜的哺乳动物。

28. 如权利要求27所述的方法,其中所述受试者是人。

29. 一种组合物,所述组合物包括编码第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的一种或多种核酸,所述一种或多种核酸包括:

编码所述第一嵌合抗原受体(CAR)的第一序列,其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;和

编码所述第二嵌合抗原受体(CAR)的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中所述第一配体结合结构域特异性结合选自CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿素受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis X抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13的抗原。

31. 如权利要求29或30所述的组合物,其中所述半抗原选自抗表1中所列的半抗原或包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。

33. 如权利要求29-32中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。

34. 如权利要求29-33中任一项的组合物,其中所述第一配体结合结构域和/或所述第

二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。

35. 如权利要求29-33中任一项所述的组合物,其中所述第二配体结合结构域包括包括结合片段的抗体,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

36. 如权利要求29-35中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸的长度。

37. 如权利要求29-36中任一项所述的组合物,其中所述核酸进一步包括前导序列。

38. 如权利要求29-37中任一项所述的组合物,其中所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3,或与CD83或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或其任何组合。

39. 如权利要求38所述的组合物,其中所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。

40. 如权利要求29-39中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包括编码标记序列的序列。

41. 如权利要求40所述的组合物,其中所述标记选自EGFRt、Her2tG和CD19t。

42. 如权利要求29-41中任一项所述的组合物,其中所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构域。

43. 如权利要求29-42中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。

44. 如权利要求43所述的组合物,其中所述连接单元是核糖体跳跃序列。

45. 如权利要求44所述的组合物,其中所述核糖体跳跃序列是P2A、T2A、E2A或F2A。

46. 一种包括如权利要求29-45中任一项所述的组合物的载体。

47. 一种组合物,所述组合物包括编码第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的一种或多种核酸,所述一种或多种核酸包括:

第一核酸,所述第一核酸包括编码所述第一嵌合抗原受体(CAR)的第一序列,其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及

第二核酸,所述第二核酸包括编码所述第二嵌合抗原受体(CAR)的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。

48. 如权利要求47所述的组合物,其中所述第一配体结合结构域特异性结合至选自如下的抗原:CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13。

49. 如权利要求47或48所述的组合物,其中所述半抗原选自表1中所列的半抗原或包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列

抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

50. 如权利要求47-48中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。

51. 如权利要求47-48中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素、二硝基苯酚或其衍生物。

52. 如权利要求47-50中任一项所述的组合物,其中所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体、其结合片段或scFv。

53. 如权利要求47-51中任一项所述的组合物,其中所述第二配体结合结构域包括结合片段的抗体,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

54. 如权利要求47-53中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或者251-275个氨基酸的长度。

55. 如权利要求47-54中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种核酸进一步包括前导序列。

56. 如权利要求47-55中任一项所述的组合物,其中所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3,或与CD83或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或其任何组合。

57. 如权利要求56所述的组合物,其中所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。

58. 如权利要求47-57中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包括编码标记序列的序列。

59. 如权利要求58所述的组合物,其中所述标记选自EGFRt、Her2tG和CD19t。

60. 如权利要求47-59中任一项所述的组合物,其中所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构域。

61. 如权利要求47-60中任一项的组合物,其中所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。

62. 如权利要求61的组合物,其中所述连接单元是核糖体跳跃序列。

63. 如权利要求62所述的组合物,其中所述核糖体跳跃序列是P2A、T2A、E2A或F2A。

64. 多种载体,诸如两种载体,包括权利要求47-63中任一项所述的一种或多种核酸。

65. 一种组合物,所述组合物包括编码双特异性嵌合抗原受体(CAR)的一种或多种核酸,所述一种或多种核酸包括:

肿瘤抗原特异的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的编码序列。

66. 如权利要求65所述的组合物,其中所述第一配体结合结构域特异性结合至选自如下的抗原:CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、

HSP90和IL13。

67. 如权利要求65或66所述的组合物,其中所述半抗原选自表1中所列的半抗原或包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

68. 如权利要求65-67中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素、二硝基苯酚或其衍生物。

69. 如权利要求65-67中任一项所述的组合物,其中所述半抗原选自荧光素、二硝基苯酚或其衍生物。

70. 如权利要求65-68中任一项所述的组合物,其中所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体、其结合片段或scFv。

71. 如权利要求65-69中任一项所述的组合物,其中所述第二配体结合结构域包括结合片段的抗体,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

72. 如权利要求65-71中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或者251-275个氨基酸的长度。

73. 如权利要求65-72中任一项的组合物,其中所述一种或多种核酸进一步包括前导序列。

74. 如权利要求65-73中任一项的组合物,其中所述细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3,或与CD83或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或其任何组合。

75. 如权利要求74所述的组合物,其中所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。

76. 如权利要求65-75中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包括编码标记序列的序列。

77. 如权利要求76所述的组合物,其中所述标记选自EGFRt、Her2tG和CD19t。

78. 如权利要求65-78中任一项的组合物,其中所述跨膜结构域包括CD28的跨膜结构域。

79. 一种双特异性CAR表达载体,所述载体包括如权利要求65-78中任一项所述的一种或多种核酸。

80. 一种双特异性嵌合抗原受体,所述双特异性嵌合抗原受体被权利要求65-78任一项所述的一种或多种核酸或权利要求79所述的载体编码。

81. 一种细胞,所述细胞包括权利要求29-45、47-63或65-47中任一项所述的一种或多种核酸、权利要求46、64或79中任一项所述的一种或多种载体,或权利要求80所述的双特异性嵌合抗原受体。

82. 如权利要求81所述的细胞,其中所述细胞为CD8+T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。

83. 如权利要求82所述的细胞,其中所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并

且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO+、CD62L+和CD8+呈阳性。

84. 如权利要求81所述的细胞,其中所述细胞是CD4+T辅助淋巴细胞,所述辅助淋巴细胞选自幼稚CD4+T细胞、中央记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和本体CD4+T细胞。

85. 如权利要求84所述的细胞,其中所述细胞是幼稚CD4+T细胞,并且其中所述幼稚CD4+T细胞对CD45RA+、CD62L+和CD4+呈阳性,且对CD45RO呈阴性。

86. 如权利要求81所述的细胞,其中所述细胞是前体T细胞。

87. 如权利要求81所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞。

88. 一种细胞的制备方法,所述细胞表达对半抗原具有特异性的第一嵌合抗原受体和对肿瘤抗原具有特异性的第二嵌合抗原受体,所述方法包括:

在表达所述第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将权利要求29-45或47-63中任一项所述的一种或多种核酸或权利要求46或64中所述的一种或多种载体导入细胞。

89. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是CD8+T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。

90. 如权利要求89所述的方法,其中所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO+、CD62L+和CD8+呈阳性。

91. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是CD4+T辅助淋巴细胞,所述CD4+T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4+T细胞、中央记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和本体CD4+细胞。

92. 如权利要求91所述的方法,其中所述CD4+T辅助淋巴细胞是幼稚CD4+T细胞,并且其中所述幼稚CD4+T细胞对CD45RA+、CD62L+和CD4+呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

93. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是前体T细胞。

94. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞。

95. 一种细胞的制备方法,所述细胞表达对半抗原和肿瘤抗原具有特异性的双特异性嵌合抗原受体,所述方法包括:

在表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将权利要求65-78中任一项所述的一种或多种核酸或权利要求79中所述的一种或多种载体导入细胞。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述细胞是CD8+T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。

97. 如权利要求96所述的方法,其中所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO+、CD62L+和CD8+呈阳性。

98. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是CD4+T辅助淋巴细胞,所述CD4+T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4+T细胞、中央记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和本体CD4+T细胞。

99. 如权利要求91所述的方法,其中所述CD4+T辅助淋巴细胞是幼稚CD4+T细胞,并且其中所述幼稚CD4+T细胞对CD45RA+、CD62L+和CD4+呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

100. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是前体T细胞。

101. 如权利要求88所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞。

102. 一种刺激或再刺激受试者中携带嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法,所述受试者患有诸如癌症的疾病,所述方法包括:

向诸如人、牲畜或家畜的受试者提供如权利要求81-87中任一项所述的细胞；
监测受试者对所述疾病的抑制；和

向受试者提供半抗原呈递细胞(H-APC)，其中所述受试者任选地选择接受CAR T细胞治疗，所述CAR T细胞具有与疾病相关抗原的特异性受体，所述相关抗原诸如肿瘤抗原。

103. 如权利要求102所述的方法，其中所述H-APC通过用半抗原离体标记健康细胞而从所述受试者的健康细胞中产生。

104. 如权利要求102或103所述的方法，其中所述半抗原选自表1中列出的半抗原。

105. 如权利要求103-104中任一项所述的方法，其中重复所述监测和所述提供步骤。

106. 如权利要求102-105中任一项所述的方法，其中所述受试者患有癌症。

107. 如权利要求106所述的方法，其中所述癌症是实体瘤。

108. 如权利要求102-107中任一项所述的方法，其中所述受试者接受癌症治疗。

109. 如权利要求102-107中任一项所述的方法，其中所述受试者接受联合治疗，例如化疗或放疗。

110. 一种体外刺激或再刺激携带嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法，所述方法包括：

提供权利要求81-87中任一项所述的细胞；

提供半抗原呈递细胞(H-APC)或半抗原；

混合所述细胞和所述H-APC细胞，从而制备激活细胞；和

分离所述激活细胞。

111. 如权利要求110所述的方法，其中所述半抗原选自表1中列出的半抗原。

112. 如权利要求110所述的方法，其中所述H-APC包括选自表1中列出的半抗原。

113. 如权利要求110-112中任一项所述的方法，其中分离所述激活细胞包括用半抗原复合亲和珠进行亲和分离。

114. 如权利要求110-112中任一项所述的方法，其中分离所述激活细胞包括用EGFR、CD19t或Her2tG复合亲和珠进行亲和分离。

用半抗原标记细胞刺激嵌合抗原受体T细胞的方法和组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年2月4日提交的美国临时申请62/969,917的优先权,其标题为“用半抗原标记细胞刺激嵌合抗原受体T细胞的方法和组合物”,以引用的方式将其全部内容并入本文。

[0003] 序列表引用

[0004] 本申请与电子序列表一起提交。序列表以名为SCRI272W0SEQLIST的文件提供,创建于2021年2月1日,大小约为43Kb。电子序列表中的信息通过引用全部并入本文。

技术领域

[0005] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式涉及半抗原标记细胞刺激嵌合抗原受体(CAR) T细胞的用途。在一些实施方式中,CAR T细胞包括特异性结合半抗原的CAR。一些实施方式还涉及由半抗原标记的细胞在体内或体外对CAR T细胞的刺激。

背景技术

[0006] 先前已经描述了使用携带嵌合抗原受体的T细胞的过继细胞转化(ACT)的免疫疗法治疗癌症。嵌合抗原受体(CAR)的结构包括抗原结合域、连接单元和间隔子序列、共刺激激活结构域和跨膜结构域。表达CAR的细胞可以来自需要治疗的患者或供体细胞(亲属或非亲属)。CAR通过连接至细胞或肿瘤细胞上的特定蛋白质或抗原而发挥作用。将CAR T细胞输注到患者体内会导致工程化细胞在患者体内进一步增殖,从而识别并杀死癌细胞或肿瘤细胞表面具有特定蛋白或抗原的细胞。

[0007] 我们期望CAR T细胞随时间保持效力。由于癌细胞水平低,因此抗原水平降低,一旦血液癌症达到最终消退阶段,CAR T细胞群就会收缩并丧失效力。此外,实体瘤在其肿瘤环境中也具有很强的免疫抑制作用。因此,可能需要额外刺激CAR T细胞以去除残留的癌细胞,从而完成治疗。刺激和再刺激也可用于克服免疫抑制性肿瘤环境。

[0008] 先前已经描述了CAR T细胞的刺激和再刺激。例如可以在输注到患者体内之前,通过添加抗CD3/CD28珠在体外进行细胞刺激。本文提供的替代方式描述了在体内和体外刺激CAR T细胞的新方法。

发明内容

[0009] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括诱导嵌合抗原受体(CAR) T细胞扩增的方法,包括:将所述CAR T细胞与半抗原呈递细胞(H-APC)孵育,其中所述CAR T细胞的CAR与连接至所述H-APC的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述CAR T细胞和H-APC来源于单个受试者,例如哺乳动物,优选为人。

[0010] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括治疗、抑制或改善受试者癌症的方法,包括:向受试者施用有效量的嵌合抗原受体(CAR) T细胞,其中所述CAR T细胞的CAR与癌症的肿瘤特异性抗原特异性结合;以及通过将所述CAR T细胞与半抗原呈递细胞(H-APC)孵

育诱导所述CAT细胞的扩增,其中所述CAR T细胞的CAR与连接至所述H-APC的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述CAR T细胞和所述H-APC来源于受试者,例如人。

[0011] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞包括双特异性CAR。

[0012] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞包括一种以上的CAR。

[0013] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞包括可与肿瘤特异性抗原特异性结合的第一配体结合结构域和能够与所述半抗原特异性结合的第二配体结合结构域。

[0014] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞包括单特异性CAR。在一些实施方式中,所述CAR包括可与肿瘤特异性抗原和半抗原特异性结合的单配体结合结构域。

[0015] 在一些实施方式中,所述孵育是体外孵育。

[0016] 在一些实施方式中,所述孵育是体内孵育。

[0017] 在一些实施方式中,所述CAR与肿瘤特异性抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述肿瘤特异性抗原选自CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿素受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13。

[0018] 在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中所列的半抗原或选自包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。

[0019] 在一些实施方式中,所述半抗原共价连接到所述H-APC的细胞外表面。在一些实施方式中,所述半抗原通过磷脂醚(PLE)连接至H-APC。

[0020] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于CD4⁺细胞或CD8⁺细胞。

[0021] 在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞是CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8⁺T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、效应记忆CD8⁺T细胞和本体CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞是CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,所述CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。

[0022] 在一些实施方式中,所述CD4⁺细胞为CD4⁺T辅助淋巴细胞,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD4⁺辅助淋巴细胞是幼稚CD4⁺T细胞,并且其中所述幼稚CD4⁺T细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

[0023] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于前体T细胞。在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于造血干细胞。

[0024] 在一些实施方式中,所述H-APC来源于选自T细胞和B细胞的细胞。

[0025] 在一些实施方式中,所述受试者是诸如牲畜或家畜的哺乳动物。在一些实施方式中,所述受试者是人。

[0026] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种组合物,所述组合物包括编码第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的一种或多种核酸,所述一种或多种核酸包括:编

码所述第一嵌合抗原受体 (CAR) 的第一序列和编码所述第二嵌合抗原受体 (CAR) 的第二序列;其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。

[0027] 在一些实施方式中,所述第一配体结合结构域特异性结合抗原,所述抗原选自 CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原 (BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、表皮生长因子受体变体 III、受体酪氨酸激酶样孤儿素受体1 (ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、CD5、Lewis Y 抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90 和 IL13。

[0028] 在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中所列的半抗原或选自包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的 CAR。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。

[0029] 在一些实施方式中,所述第一配体结合结构域和/或所述第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或 scFv。在一些实施方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体结合片段,所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的 CAR。

[0030] 在一些实施方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有 1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250 或 251-275 个氨基酸的长度。

[0031] 在一些实施方式中,所述核酸进一步包括前导序列。

[0032] 在一些实施方式中,所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括 CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C 或 B7-H3,或与 CD83 或 CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或与两者均结合的配体。

[0033] 在一些实施方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分 CD3 ζ 和一部分 4-1BB。

[0034] 在一些实施方式中,所述组合物还包括编码标记序列的序列。在一些实施方式中,标记为 EGFRt、Her2tG 或 CD19t。

[0035] 在一些实施方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括 CD28 的跨膜结构域。

[0036] 在一些实施方式中,所述一种或多种核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。

[0037] 在一些实施方式中,所述连接单元是核糖体跳跃序列。在一些实施方式中,所述核糖体跳跃序列是 P2A、T2A、E2A 或 F2A。

[0038] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种包括本文提供的某些实施方式中所述的组合物的载体。

[0039] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种组合物,所述组合物包括编码

第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的一种或多种核酸,所述一种或多种核酸包括:第一核酸和第二核酸;所述第一核酸包括编码所述第一嵌合抗原受体(CAR)的第一序列,其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;所述第二核酸包括编码所述第二嵌合抗原受体(CAR)的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。

[0040] 在一些实施方式中,所述第一配体结合结构域特异性结合至选自如下的抗原:CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13。

[0041] 在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中所列的半抗原或包括抗体结合片段的配体结合结构域,所述抗体选自表1中所列的抗半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些实施方式中,所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。

[0042] 在一些实施方式中,所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。在一些实施方式中,所述第二配体结合结构域包括结合片段的抗体,所述抗体选自表1中所列的抗半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

[0043] 在一些实施方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或者251-275个氨基酸的长度。

[0044] 在一些实施方式中,所述一种或多种核酸进一步包括前导序列。

[0045] 在一些实施方式中,所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3,或与CD83或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或与两者均结合的配体。

[0046] 在一些实施方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。

[0047] 在一些实施方式中,所述组合物进一步包括编码标记序列的序列。在一些实施方式中,所述标记为EGFRt、Her2tG或CD19t。

[0048] 在一些实施方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构域。

[0049] 在一些实施方式中,所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。

[0050] 在一些实施方式中,所述连接单元是核糖体跳跃序列。在一些实施方式中,所述核糖体跳跃序列是P2A、T2A、E2A或F2A。

[0051] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括或使用多种载体,例如两种载体,其包括本文提供的任一实施方式所述的一种或多种核酸。

[0052] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种组合物,所述组合物包括编码

双特异性嵌合抗原受体 (CAR) 的一种或多种核酸, 所述一种或多种核酸包括: 肿瘤抗原特异的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的编码序列。

[0053] 在一些实施方式中, 所述第一配体结合结构域特异性结合至选自如下的抗原: CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原 (BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白多糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、表皮生长因子变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和IL13。

[0054] 在一些实施方式中, 所述半抗原选自表1中所列的半抗原或包括抗体结合片段的配体结合结构域, 所述抗体选自表1中所列的抗半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。在一些实施方式中, 所述半抗原选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些实施方式中, 所述半抗原选自荧光素或二硝基苯酚或其衍生物。

[0055] 在一些实施方式中, 所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。在一些实施方式中, 所述第二配体结合结构域包括结合片段的抗体, 所述抗体选自抗表1中所列的半抗原的抗体、表2中所列抗体、表3的序列的抗体或包括表4中的一个或多个序列的CAR。

[0056] 在一些实施方式中, 所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子具有1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或者251-275个氨基酸的长度。

[0057] 在一些实施方式中, 所述一种或多种核酸进一步包括前导序列。

[0058] 在一些实施方式中, 所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C或B7-H3, 或与CD83或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体或与两者均结合的配体。在一些实施方式中, 所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。

[0059] 在一些实施方式中, 所述组合物进一步包括编码标记序列的序列。在一些实施方式中, 所述标记为EGFRt、Her2tG或CD19t。

[0060] 在一些实施方式中, 所述跨膜结构域包括CD28的跨膜结构域。

[0061] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种双特异性CAR表达载体, 所述载体包括本文提供的任一实施方式所述的一种或多种核酸。

[0062] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括本文提供的任一实施方式所述的一种或多种核酸或本文提供的任一实施方式所述的载体编码的双特异性嵌合抗原受体。

[0063] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种细胞, 所述细胞包括本文提供的任一实施方式所述的一种或多种核酸、本文提供的任一实施方式所述的一种或多种载体或本文提供的任一实施方式所述的双特异性嵌合抗原受体。

[0064] 在一些实施方式中, 所述细胞为CD8+T细胞毒性淋巴细胞, 所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。在一些实施方式中, 所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞, 并且其中所述中央记忆T

淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。

[0065] 在一些实施方式中,所述细胞是CD4⁺T辅助淋巴细胞,所述辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,所述细胞是幼稚CD4⁺T细胞,并且其中所述幼稚CD4⁺T细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,且对CD45RO呈阴性。

[0066] 在一些实施方式中,所述细胞是前体T细胞。在一些实施方式中,所述细胞是造血干细胞。

[0067] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种细胞的制备方法,所述细胞表达对半抗原具有特异性的第一嵌合抗原受体和对肿瘤抗原具有特异性的第二嵌合抗原受体,所述方法包括:在表达所述第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将本文提供的任一实施方式所述的一种或多种核酸或本文提供的某些实施方式所述得一种或多种载体导入细胞。

[0068] 在一些实施方式中,所述细胞是CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8⁺T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、效应记忆CD8⁺T细胞和本体CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。

[0069] 在一些实施方式中,所述细胞是CD4⁺T辅助淋巴细胞,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺细胞。在一些实施方式中,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞是幼稚CD4⁺T细胞,并且其中所述幼稚CD4⁺T细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

[0070] 在一些实施方式中,所述细胞是前体T细胞。在一些实施方式中,所述细胞是造血干细胞。

[0071] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种细胞的制备方法,所述细胞表达对半抗原和肿瘤抗原具有特异性的双特异性嵌合抗原受体,所述方法包括:在表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将本文提供的某些实施方式所述的一种或多种核酸或本文提供的特定实施方式所述的一种或多种载体导入细胞。

[0072] 在一些实施方式中,所述细胞是CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8⁺T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8⁺T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、效应记忆CD8⁺T细胞和本体CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。

[0073] 在一些实施方式中,所述细胞是CD4⁺T辅助淋巴细胞,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD4⁺T辅助淋巴细胞是幼稚CD4⁺T细胞,并且其中所述幼稚CD4⁺T细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,并对CD45RO呈阴性。

[0074] 在一些实施方式中,所述细胞是前体T细胞。在一些实施方式中,所述细胞是造血干细胞。

[0075] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种刺激或再刺激受试者(优选为人)中携带嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法,所述受试者患有诸如癌症的疾病,所述方法包括:向受试者提供或施用本文提供的任一特定实施方式的细胞;监测受试者对所述疾病

的抑制;和向受试者提供半抗原呈递细胞(H-APC),其中所述受试者任选地选择或识别接受CAR T细胞治疗,所述CAR T细胞具有与疾病相关抗原(例如肿瘤抗原)的特异性受体。所述选择或识别可以根据临床和/或诊断评估来进行。

[0076] 在一些实施方式中,所述H-APC的制备包括用半抗原离体标记健康细胞,所述受试者的健康细胞产出H-APC。

[0077] 在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。

[0078] 在一些实施方式中,重复所述监测和所述提供或施用步骤。

[0079] 在一些实施方式中,所述受试者患有癌症。在一些实施方式中,所述癌症是实体瘤。在一些实施方式中,例如通过临床和/或诊断评估来选择或识别所述受试者(如人)接受癌症治疗。在一些实施方式中,所述受试者(如人)接受联合治疗,如化疗或放疗。

[0080] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括一种体外刺激或再刺激携带嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法,所述方法包括:提供本文某些实施方式所述的细胞;提供半抗原呈递细胞(H-APC)或半抗原;混合所述细胞和所述H-APC细胞,从而制备激活细胞;和分离所述激活的细胞。在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。在一些实施方式中,所述H-APC包括选自表1中列出的半抗原。在一些实施方式中,分离所述激活细胞包括用半抗原复合亲和珠进行亲和分离。在一些实施方式中,分离所述激活细胞包括用EGFR、CD19t或Her2tG复合亲和珠进行亲和分离。

附图说明

[0081] 图1A为三种嵌合抗原受体(CAR)的示意图。子图(1)显示了具有抗原识别部分(i)的第二代CAR,该抗原识别部分(i)通过间隔子结构域(ii)在距离细胞表面的期望距离处呈现。间隔子连接至跨膜结构域(iii),该跨膜结构域连接至两个信号传导结构域(iv和v)。子图(2)显示了具有延伸/更长间隔子的CAR。该CAR具有与图中(i)的CAR不同的抗原识别部分(vi)和更长的间隔子结构域(vii)。子图(3)显示了一种双特异性CAR,其包括连接在一起的两个抗原识别结构域。可以通过识别任一表位来激活该CAR。

[0082] 图1B为包括两种不同CAR的CAR T细胞(双重CAR T细胞)的示意图。

[0083] 图1C为包括双特异性CAR的CART细胞的示意图。双特异性CAR T细胞表达一种可识别两种不同表位的CAR。

[0084] 图2为治疗的示例性实施方式的示意图。通过在健康细胞的表面负载半抗原制备所述半抗原呈递细胞(H-APC)。然后将这些H-APC输注到患者体内。可通过识别肿瘤细胞或通过H-APC激活双重CAR T细胞和双特异CAR T淋巴细胞(图1C)。一种CAR(i)被设计为靶向肿瘤细胞上的表位(ii),而另一种CAR(iii)被设计为识别半抗原-APC上的半抗原(iv)。所述半抗原-APC是通过在健康细胞表面负载半抗原而生成的。然后将这些半抗原-APC输注到患者体内,其可以被识别和裂解,从而激活CAR T细胞。如果这些细胞未被CAR T细胞裂解,半抗原将被代谢,半抗原-APC将恢复为正常的健康细胞。注意,在一些实施方式中,例如如果用半抗原-APC标记的相同半抗原标记肿瘤细胞,则使用单个抗半抗原CAR T细胞。

[0085] 图3A显示了与磷脂醚(FL-PLE)连接的半抗原荧光素的结构。该结构包括:(i)荧光素部分;(ii)可以从细胞表面延伸半抗原的间隔区的聚乙二醇(PEG)部分;(iii)极性头部分;和(iv)组合到细胞质膜中的疏水尾部。

[0086] 图3B显示了N-(荧光素-5-硫代羰基)-1,2-双十六碳酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(N-(Fluorescein-5-Thiocarbonyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamine,FL-DHPE)的结构。

[0087] 图3C显示了N-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛烯-3-丙酰基)-1,2-双十六碳酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(N-(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Propionyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamine,Bodipy-DHPE)的结构,其包括半抗原bodipy。

[0088] 图4A显示了用FL-DHPE或抗D19-FITC抗体孵育CD19+Raji细胞后的流式细胞术结果。

[0089] 图4B显示了用0.5 μ M或5 μ M FL-PLE孵育K562细胞后的流式细胞术结果。

[0090] 图4C显示了用5 μ M FL-PLE孵育Be2细胞、U87细胞或daoy细胞后的流式细胞术结果。

[0091] 图5A为用5 μ M FL-PLE孵育并用DAPI染色的U87细胞的共聚焦图像的实施方式。

[0092] 图5B为用5 μ M FL-PLE孵育并用DAPI以及与Alexa Fluor 647荧光团缀合的抗荧光素抗体染色的U87细胞的共聚焦图像的实施方式。

[0093] 图6A显示了用5 μ M FL-DHPE孵育Be2细胞或U87细胞,然后测量一段时间内的信号保留率的结果。

[0094] 图6B显示了用5 μ M FL-PLE孵育Be2细胞或U87细胞,然后测量信号随时间的保留率的结果。

[0095] 图7A为一系列图,显示了细胞毒性测定。铬释放测定用于测试两种抗FL CAR T细胞(4M5.3和FITC-E2)对半抗原标记细胞的裂解能力。为了生成半抗原标记的细胞,用5 μ M FL-DHPE孵育CD19+K562细胞或用抗D19 FITC抗体染色。以OKT3细胞为阳性对照,其通过TCR提供T细胞的内源性激活。

[0096] 图7B为一系列图,显示了通过细胞因子释放法以测定检测细胞因子的产生。用5 μ M FL-DHPE或抗D19 FITC抗体孵育CD19+K562细胞得到半抗原标记细胞,用半抗原标记细胞对两个抗FL CART细胞(4M5.3和FITC-E2)进行测试。

[0097] 图8A显示了用0.5 μ M或5 μ M FL-PLE孵育K562细胞后的流式细胞术结果。

[0098] 图8B为一系列曲线图,显示了与半抗原标记细胞一起孵育的抗FL CAR T细胞的细胞毒性测定,用0.5 μ M或5 μ M FL-PLE孵育K562细胞制备所述半抗原标记的细胞。以K562亲代细胞作为阴性对照。K562+OKT3作为阳性对照。

[0099] 图8C为一系列曲线图,显示了通过细胞因子释放法测定以检测与半抗原标记细胞一起孵育的抗FL CAR T细胞产生的细胞因子,用0.5 μ M或5 μ M FL-PLE孵育K562细胞制备所述半抗原标记细胞。

[0100] 图9A显示了流式细胞术分析的结果,结果显示无论是经受FREP还是REP,抗FL CAR T细胞表达相似的表型标记物。

[0101] 图9B显示了在存在或不存在胎牛血清(FBS)的情况下,用5 μ M FL-PLE孵育K562细胞后的流式细胞术分析结果。

[0102] 图9C为一系列曲线图,显示了经受FREP或REP的抗FL CAR T细胞的细胞毒性测定。在这些测定中使用用图9B获得的细胞。

[0103] 图9D为一系列柱形图,显示了经受FREP或REP的抗FL CAR T细胞的细胞因子刺激。在这些测定中使用用图9B获得的细胞。

[0104] 图10A显示了与半抗原2,4-二硝基苯酚(DNP-PLE) [显示为(i)]连接的磷脂醚的结构图,所述半抗原2,4-二硝基苯酚(DNP-PLE)为CAR T细胞的靶标。(ii)所示的为聚乙二醇(PEG),其为将靶标从细胞表面的延伸至理想距离的间隔子。如(iii)和(iv)所示为PLE,(iii)为极性头部基团,(iv)为用于并入或连接至细胞质膜中的疏水尾部。

[0105] 图10B为显示DNP-PLE的正确结构的NMR图。

[0106] 图11A-图11E显示了用DNP-PLE生成的具有连接至细胞的外暴露半抗原(特别是DNP)的细胞的相关数据。

[0107] 图11A显示了仅用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本和MDA-MB-231细胞的流式细胞术数据。

[0108] 图11B显示了用5 μ M DNP-PLE孵育并用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本和MDA-MB-231细胞的流式细胞术数据。

[0109] 图11C显示了用500nM DNP-PLE孵育并用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本和MDA-MB-231细胞的流式细胞术数据。

[0110] 图11D显示了与50nM DNP-PLE孵育并用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本和MDA-MB-231细胞的流式细胞术数据。

[0111] 图11E显示了图11A-图11D中的流式细胞术数据的直方图。

[0112] 图12A-图12D显示了DNP-PLE整合到细胞相关的共聚焦显微数据。

[0113] 图12A显示了无DNP-PLE而用抗DNP Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本细胞的共聚焦图像。

[0114] 图12B显示了用5 μ M DNP-PLE,且不含抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本细胞的共聚焦图像。

[0115] 图12C显示了用5 μ M DNP-PLE,且不含抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本细胞的共聚焦图像。

[0116] 图12D显示了用1 μ M DNP-PLE,且不含抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本细胞的共聚焦图像。

[0117] 图13A-图13D显示了确认细胞上负载的半抗原的细胞外可及性以及PLE在膜中负载的相关数据。

[0118] 图13A显示了用于抗DNP CAR的第二代长CAR盒的示意图。

[0119] 图13B显示了流式细胞术数据,显示了H9亲本、用爱必妥(Erbix)抗体染色的H9亲本和用爱必妥(Erbix)抗体染色的抗DNP CAR H9细胞的数量。

[0120] 图13C显示了与抗DNP CAR H9细胞共培养的MDA-MB-231的共聚焦图像。

[0121] 图13D显示了与抗DNP CAR H9细胞共培养负载有5 μ M DNP-PLE的MDA-MB-231的共聚焦图像。

[0122] 图14显示了具有多种靶细胞和非自体T-APC的CD19 CAR-T细胞产生细胞因子的相关数据。

[0123] 图15A-图15C显示了与体外自体T-APC激活的相关数据。

[0124] 图15A显示了通过流式细胞术检测临床制备的混合CD4+/CD8+截短的CD19(CD19t)

转导抗原呈递细胞(T-APC)的细胞表面上CD19t和截短的EGFR(EGFRt)的表达。

[0125] 图15B显示了通过流式细胞术检测EGFR在CD4+和CD8+转导的CD19 CAR T细胞上的表达。

[0126] 图15C显示了与CD4+和CD8+转导的CD19 CAR T细胞产生细胞因子的图。

[0127] 图16A-图16C显示了与体外自体半抗原-APC激活的相关数据。

[0128] 图16A显示了通过流式细胞术分析在有或没有5 μ M FL-PLE的情况下孵育过夜的K562白血病细胞的荧光。

[0129] 图16B显示了通过流式细胞术分析在有或没有5 μ M FL-PLE的情况下孵育过夜的原代CD8+T细胞的荧光。

[0130] 图16C显示了激活的抗FL CAR T细胞产生细胞因子相关的图。

[0131] 图17A-图17D显示了两名儿科患者的外周血(PB)中的CAR T细胞持久性以及使用T-APC刺激CAR T淋巴细胞的相关数据。

[0132] 图17A显示了患者治疗后外周血中CAR T细胞、T-APC和CD19+B细胞群状态的相关图。

[0133] 图17B显示了第二名患者治疗后外周血中CAR T细胞、T-APC和CD19+B细胞群状态的相关图。

[0134] 图17C显示了在图17B所示的C1.T2.D1处对第二名患者中CAR T细胞进行流式细胞术检测。

[0135] 图17D显示了在图17B所示的C1.T3.D14处对第二名患者中CAR T细胞进行流式细胞术检测。

[0136] 图18A显示了依次通过CD8+和CD4+磁珠分离大量减少T细胞的外周血单个核细胞(PBMC)的流式细胞术的结果。

[0137] 图18B显示了如图18A所示依次通过CD8+和CD4+磁珠分离大量减少T细胞的PBMC,并用5 μ M FL-PLE标记如图18A所示的PBMC的流式细胞术的结果。

[0138] 图18C显示了如图18B所示依次通过CD8+和CD4+磁珠分离大量减少T细胞,并用5 μ M FL-PLE标记的PBMC,然后冷冻和解冻如图18B所示的PBMC的流式细胞术结果。

[0139] 图18D显示了如图18A所示细胞上FL-PLE呈递量的直方图。

[0140] 图18E显示了如图18B所示细胞上FL-PLE呈递量的直方图。

[0141] 图18F显示了如图18C所示细胞上FL-PLE呈递量的直方图。

[0142] 图18G为如图18A所示细胞上FL-PLE呈递量的侧向散射图。

[0143] 图18H为如图18B所示细胞上FL-PLE呈递量的侧向散射图。

[0144] 图18I为如图18C所示细胞上FL-PLE呈递量的侧向散射图。

[0145] 图19A为使用辐照的TM-LCL和PBMC进行标准快速扩增方案(REP)的细胞数随时间变化的曲线图。

[0146] 图19B为使用以7:1靶效应比负载5 μ M FL-PLE的辐照TM-LCL进行荧光素REP(FREP)的细胞数随时间变化的曲线图。

[0147] 图19C为使用以7:1靶效应比负载5 μ M FL-PLE的辐照自体PBMC(大量减少T细胞)进行FREP的细胞数随时间变化的曲线图。

[0148] 图19D为使用以14:1靶效应比负载5 μ M FL-PLE的辐照自体PBMC(大量减少T细胞)

进行FREP的细胞数随时间变化的曲线图。

[0149] 图19E显示了使用以7:1的靶效应比负载5 μ M FL-PLE(冷冻前)的冷冻、解冻和辐照的自体PBMC(大量减少T细胞)进行FREP的细胞数随时间变化的曲线图。

[0150] 图20A显示了施用抗FL CAR T细胞的小鼠随时间的通量图,包括组的平均结果:(a)仅施用抗FL CAR T细胞(圆圈);(B)还施用20e6照射的TM-LCL(正方形);(C)还施用负载有5 μ M FL-PLE(三角形)的5e6辐照TM-LCL;和(D)还施用20e6辐照的TM-LCL,其负载5 μ M FL-PLE(三角形向下)。

[0151] 图20B为仅施用抗FL CAR T细胞的(A)组小鼠随时间的通量曲线图。

[0152] 图20C为施用抗FL CAR T细胞和20e6照射的TM-LCL(B)组小鼠随时间的通量曲线图。

[0153] 图20D为施用抗FL CAR T细胞和负载有5 μ M FL-PLE的5e6辐照TM-LCL的(C)组小鼠随时间的通量图。

[0154] 图20E为施用抗FL CAR T细胞和负载有5 μ M FL-PLE的20e6辐照TM-LCL的(D)组小鼠随时间的通量图。

具体实施方式

[0155] 定义

[0156] 如本文所用,“约”可表示包括用于确定值的方法的固有误差变化,或实验之间存在的变化。

[0157] 如本文所用“核酸”或“核酸分子”指多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、聚合酶链式反应(PCR)产生的片段,或连接、剪切、核酸内切酶作用或核酸外切酶作用产生的片段。核酸分子可以由天然核苷酸的单体(如DNA和RNA)和/或天然存在的核苷酸的类似物(如天然存在的核苷酸的对映体形式)或两者的组合。修饰的核苷酸可以在核糖部分或嘧啶或嘌呤碱基部分发生改变。例如,核糖修饰包括用卤素、烷基基团、胺或叠氮基团取代一个或多个羟基基团,或者核糖可以官能化为醚或酯。此外,整个核糖部分可以被空间和电子相似的结构(如氮杂糖或碳环糖类似物)取代。碱基部分修饰的示例包括烷基化嘌呤或嘧啶、酰化嘌呤和嘧啶或其它众所周知的杂环取代。可通过磷酸二酯键或此类键的类似物连接核酸单体。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺酸磷酸酯(phosphoranilidate)或磷酰胺酸酯(phosphoramidate)等。术语“核酸分子”还包括“肽核酸”,其包括连接到聚酰胺主链的天然存在或修饰的核酸碱基。核酸可以是单链或双链。本文中的“编码”是指多核苷酸(如基因、cDNA或mRNA)中用作合成其它大分子(如确定的氨基酸序列)的模板的特定核苷酸序列的性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白,则所述基因编码所述蛋白质。“编码多肽的核酸序列”包括彼此简并形式并且编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。“特异性的”或“特异性”可以是指配体对结合伴侣的特性,也可以是指结合伴侣对配体的特性,并且可以包括结合的互补的形状、电荷和疏水特异性。结合的特异性可以包括立体特异性、区域选择性或化学选择性。在一些替代方式中,提供了一种编码嵌合抗原受体的核酸的制备方法,使得生成编码对半抗原或肿瘤抗原具有特异性的嵌合抗

原受体的核酸。

[0158] “载体”或“构建体”是用于将异源核酸导入细胞的核酸,其也可以具有调节元件以提供异源核酸在细胞中的表达。所述载体包括但不限于质粒、微环、酵母或病毒基因组。在一些替代方式中,载体为质粒、微环、病毒载体、DNA或mRNA。在一些替代方式中,载体为慢病毒载体或逆转录病毒载体。在一些替代方式中,载体为慢病毒载体。

[0159] 在根据说明书阅读时,“嵌合抗原受体”或“CAR”或“嵌合T细胞受体”具有其明确和通常的含义,可以包括但不限于合成设计的受体,所述受体包括结合至与疾病或病症相关的分子的抗体或其它蛋白质序列的配体结合结构域,并通过间隔子结构域连接到T细胞或其它受体的一个或多个细胞内信号传导结构域(例如共刺激结构域)。嵌合受体也可以称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体,嵌合免疫受体或嵌合抗原受体(CAR)。这些CAR是工程化受体,可以将任意特异性转移到免疫受体细胞上。一些研究者认为术语嵌合抗原受体或“CAR”也包括抗体或抗体片段、间隔子、信号传导结构域和跨膜结构域。然而,由于修饰本文所述的CAR的不同组分或结构域(例如表位结合区(例如,抗体片段、scFv或其部分)、间隔子、跨膜结构域或信号传导结构域)的惊人效果,在本公开中,经常根据独立要素区分CAR的组分。在一些替代方式中,选择嵌合抗原受体的间隔子(例如,间隔子中特定长度的氨基酸),以实现所期望的CAR的取向、亲和力或结合特性。然后根据与CAR所导向的靶标部分结合或相互作用的能力,对(例如细胞上存在的)具有不同长度间隔子的CAR进行筛选。示例性靶标部分可包括但不限于生物素、地高辛、二硝基苯酚、绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白、橙色荧光蛋白、红色荧光蛋白、远红色荧光蛋白或荧光素(例如异硫氰酸荧光素,FITC)。CAR结合或相互作用的靶标部分可以呈现在基质上,例如膜、珠或支持物(例如孔)或粘合剂,例如脂质(例如PLE)、半抗原或细胞(例如呈递半抗原的细胞)上,例如与携带靶标的半抗原相关的癌细胞。CAR还可对其它细胞上的半抗原或癌细胞或病原体(如病毒或细菌)上存在的抗原具有特异性。通过一种方法,将包括所需靶标部分的基质或粘合剂与包括对所述靶标部分具有特异性的CAR或TCR的多个细胞接触,并确定包括CAR或TCMR的细胞与存在于基质或粘合剂上的靶标部分的结合水平或量。此类对结合的评估可包括对结合到靶标部分的细胞进行染色或评估荧光或荧光损失。同样,可以通过这种方式评估对CAR结构的修改,例如改变间隔子的长度。在一些方法中,还提供了包括半抗原的细胞,使得所述方法包括将细胞与半抗原接触,以使用第二CAR或TCR刺激T细胞,所述第二CAR或TCR对靶细胞(例如癌细胞、肿瘤细胞或靶病毒)上的靶标部分或抗原具有特异性。

[0160] “具有特异性”或“特异性”可指配体对结合伴侣的特性,或结合伴侣对配体的特性,并可包括结合的互补形状、电荷和疏水特异性。结合的特异性可以包括立体特异性、区域选择性和/或化学选择性。在一些替代方式中,提供了一种制备编码嵌合抗原受体的核酸的方法,从而生成编码对肿瘤抗原或半抗原具有特异性的嵌合抗原受体的核酸。

[0161] 本文所用的“抗原”或“Ag”是指引起免疫应答的分子。这种免疫应答可以涉及抗体产生和/或特异性免疫活性细胞的激活。很明显,抗原可以合成产生、重组产生或来源于生物样品中。所述生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物液体(例如血液、血浆或腹水)。本文所用的“抗肿瘤作用”是指生物学效应,其表现为肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数量的减少、转移数量的减少、预期寿命延长或与癌症相关的各种生理症状减少。“抗肿瘤作用”也可以表现为减少复发或增加复发前的时间。在本文提供的一些替代方式

中,携带CAR的T细胞具有抗肿瘤作用。

[0162] “双特异性嵌合抗原受体”是指包括两个结构域的CAR,其中第一结构域对第一配体具有特异性,第二结构域对于第二配体具有特异性。在一些替代方式中,第一配体为半抗原。在一些替代方式中,第二配体为肿瘤特异性配体。在一些替代方式中,双特异性CAR包括两个scFv结构域,其中第一scFv结构域对肿瘤特异性配体具有特异性,第二scFv结构域对半抗原具有特异性。

[0163] “配体”是指与另一种物质特异性结合形成复合物的物质。配体的示例包括抗原表位、与受体结合的分子、基质、抑制剂、激素或激活剂。本文所用的“配体结合结构域”是指与配体结合的物质或物质的一部分。所述配体结合结构域的示例包括抗体的抗原结合部分、受体的胞外结构域和/或酶的活性位点。关于本文鉴定的嵌合受体多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为候选序列中氨基酸残基与参考序列中的氨基酸残基相同的百分比,所述参考序列包括配体结合结构域、间隔子、跨膜结构域或淋巴细胞激活结构域,对齐序列后并引入空位(如有必要)以实现最大序列同一性百分比,并且不将任何保守替换视为序列同一性的一部分。确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR) 软件等公众可得的计算机软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。例如,使用WU-BLAST-2计算机程序 [Altschul等人,Methods in Enzymology,266:460-480 (1996)] 生成的氨基酸序列同一性百分比值使用了若干搜索参数,其中的大多数参数被设置为默认值。那些未设置为默认值(即可调参数)的参数将设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,字长阈值(T)=11以及得分矩阵=BLOSUM62。通过将(a)参考嵌合受体序列的多肽氨基酸序列中的每个或全部之间的匹配的相同氨基酸残基的数目相除来确定氨基酸序列同一性%值。在一些替代方式中,编码CAR或CAR多肽的核酸可与表3或表4中所示的序列具有一定的序列同一性百分比。

[0164] 在一些实施方式中,细胞工程可通过载体(如病毒载体,如 γ 逆转录病毒或慢病毒载体)或CRISPR/CAS9系统进行,以表达两种CAR或双特异性CAR。本领域技术人员已知对T细胞进行基因工程以获得CAR或双特异性CAR表达的此类技术。在一些替代方式中,所述载体为转座子、整合酶载体系统或mRNA载体。

[0165] 在根据说明书阅读时,“共刺激结构域”或“细胞内信号传导结构域”具有其明确和通常的含义,可以包括但不限于,例如向T细胞提供信号的信号传导部分,所述信号除由例如TCR/CD3复合物的CD3 ζ 链提供的初级信号外,还介导T细胞反应,包括但不限于激活、增殖、分化、细胞因子分泌等。共刺激结构域可包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体的全部或一部分。在一些替代方式中,共刺激结构域是细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域与其它细胞内介质相互作用以介导包括激活、增殖、分化和/或细胞因子分泌的细胞应答。

[0166] 在本文所述的一些替代方式中,CAR对半抗原具有特异性。在本文描述的一些替代方式中,T细胞上存在第二CAR,其对细胞或肿瘤细胞上的抗原具有特异性。在本文的一些替代方式中,所述CAR包括共刺激结构域。在一些替代方式中,所述共刺激结构域为CD27、

CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体或其一部分。

[0167] “跨膜结构域”为疏水性蛋白区域,可以驻留在细胞的双层中,以锚定嵌入生物膜的蛋白。在没有特殊限定的情况下,跨膜结构域的拓扑结构可以是跨膜 α -螺旋。在制备具有嵌合抗原受体的转基因T细胞的方法的一些替代方式中,载体包括编码跨膜结构域的序列。在该方法的一些替代方式中,跨膜结构域包括CD28跨膜序列或其片段,其长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个氨基酸,或由上述任意两个长度所限定的范围内。在该方法的一些替代方式中,所述CD28跨膜序列或其片段长度包括28个氨基酸。在一些替代方式中,嵌合受体包括跨膜结构域。所述跨膜结构域提供嵌合受体在膜中的锚定。

[0168] 在根据说明书阅读时,“T细胞受体”或“TCR”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如在T淋巴细胞或T细胞表面发现的分子,所述分子负责识别与主要组织相容性复合物分子结合的抗原的片段。

[0169] 在根据说明书阅读时,如本文所用,“半抗原”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如小分子结合部分。在一些实施方式中,半抗原可以不诱导免疫应答或显著的免疫应答;而连接至载体上的半抗原可诱导免疫应答。在一些实施方式中,所述半抗原可以连接在载体(例如细胞)上。

[0170] 在一些实施方式中,所述半抗原可以为任何Alexa Fluor荧光团。在一些实施方式中,半抗原可以为仅当连接至大载体(例如蛋白)时才引发免疫应答的任何小分子;所述载体可以为自身也不引发免疫应答的载体。在一些实施方式中,所述半抗原可以为当与较大载体(如蛋白质)结合时可以诱导产生特异性与半抗原结合的抗体(游离或结合状态)的任何小分子,。在一些实施方式中,所述半抗原还可以是肽、其它较大的化学物质和适体。在一些实施方式中,所述半抗原可以为在万维网(WorldWide Web)上访问的半抗原数据库中提供的任何半抗原。

[0171] 表1列出了可用于本文的实施方式的半抗原的非限制性示例。

[0172] 表1

可用于本文实施例的示例半抗原

[0173]

Alexa Fluor 405; Alexa Fluor 430; Alexa Fluor 500; Alexa Fluor 514; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 555; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 610; Alexa Fluor 633; Alexa Fluor 635; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 660; Alexa Fluor 680; Alexa Fluor 700; Alexa Fluor 750; Alexa Fluor 790; 级联蓝 (Cascade Blue); Alexa Fluor 488; BODIPY; 丹磺酰氯; 俄勒冈绿; 荧光黄; 罗丹明; 四甲基罗丹明; 硝基酪氨酸; 地高辛; 2,4-二氯苯氧乙酸; 莠去津(2-氯-4-(乙基氨基)-6-(异丙基氨基)-s-三嗪); 尼古丁 (3-(1-甲基-2-吡咯基)吡啶; Blak Leaf); 吗啡 (变体 (morph); 硫酸吗啡); 2,4-二硝基氯苯 (1-氯-2,4-二硝基苯; DNCB; 二硝基氯基苯); 4-氯-6-(乙基氨基)-1,3,5-三嗪-2-(6-氨基己烷羧酸); 结构相关的 s-三嗪 (修饰: H/Cl/C6 R1=NH₂, R2=-Cl, R3=-NH-(CH₂)₅-COOH; iPr/Cl/nBu R1=(CH₃)₂-CH-NH-, R2=-Cl, R3=-NH-(CH₂)₃-(CH₃)); 莠灭净 (2-乙基氨基-4-异丙基氨基-6-甲硫基-1,3,5-三嗪); 去乙基莠去津 (DEA) (结构相关的 s-三嗪); 去异丙基莠去津 (DIA) (结构相关的 s-三嗪); 去乙基去异丙基莠去津 (DEDIA) (结构相关的 s-三嗪); 去乙基去异丙基莠去津 (DEDIA) (结构相关的 s-三嗪); 羟基莠去津 (HA) (结构相关的 s-三嗪); 去异丙基羟基莠去津 (DIHA) (结构相关的 s-三嗪); 去乙基去异丙基羟基莠去津 (DEDIHA) (结构相关的 s-三嗪); 西玛津 (结构相关的 s-三嗪); 敌草净 (结构相关的 s-三嗪); 扑草净 (结构相关的 s-三嗪); 2-羟基莠去津 (莠去津衍生物); 2-羟基扑草津 (结构相关的 s-三嗪); 2-羟基西玛津; N-(4-胺-6-羟基-[1,3,5]三嗪-2-基)-4-氨基丁酸 (修饰: R1=NH₂, R2=NH(CH₂)₃COOH, R3=OH); 磺吡隆 (SulcoFuron); 5-氯-2-{4-氯-2-[3-(3,4-二氯苯基)脲基]苯氧基}苯磺酸; FlucoFuron (1,3-双(4-氯- α,α,α -三氟间甲苯基)脲); 脱碳木脂素 (Agatharesinol); Sequirin C; 柳杉树脂酚; 羟基柳杉树脂酚; 异扁柏脂素; 松柏醇; 肉桂醇; 对香豆酸; 肉桂酸; 对香豆酸; 肉桂酸; 扁柏脂素; 愈创木基甘油- β -愈创木基醚; 吗啡-3-葡萄糖苷酸

可用于本文实施例的示例半抗原

(M3G); 可待因; 去甲可待因; 6-单乙酰吗啡; (+)甲基苯丙胺; 头孢他啶; 苯巴比妥; 对羟基苯巴比妥; 对氨基苯巴比妥; 环己巴比妥; 3'-酮基环己巴比妥; 3'-羟基环己巴比妥; 司可巴比妥; 巴比妥; 美沙比妥; 巴比妥酸; 戊硫代巴比妥; 硫代巴比妥酸; 扑米酮; 格鲁米特; 戊巴比妥; 海洛因; 二乙酰吗啡; 左洛啡烷; L-11-烯丙基-1,2,3,9,10,10a-六氢-4H-10,4a-亚氨基桥亚乙基菲-6-酚; 哌替啶(德美罗; 杜冷丁; 度冷丁; 1-甲基-4-苯基哌啶-4-羧酸乙酯; 异尼皮卡因); 甲基苯丙胺; 右旋去氧麻黄碱; 梅太德林; 托普帕敏; Pratalgin; 苯甲苯丙胺 (Pragman); 苯甲酰芽子碱; 3-羧甲基吗啡; 可卡因; 5-苯并咪唑羧酸; ABA(4-乙酰苯甲酸); 地塞米松; 二氟美松; 6 α ,9 α -二氟-11 β ,17,21-三羟基-16 α -甲基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮; 9 α -氟-11 β ,17,21-三羟基-16 β -甲基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮; 9- α -氟泼尼松龙; 去氧米松; 曲安西龙; 9 α -氟-11 β ,16 α ,17,21-四羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮; 氟可龙; 6 α -氟-11 β ,21-二羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮; 皮质醇; 11 β ,17,21-三羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮; 泼尼松; 17,21-二羟基孕甾-4-烯-3,11,20-三酮; 甲泼尼松龙; 11 β ,17,21-三羟基-6 α -甲基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮己曲安奈德; 21-(3,3-二甲基-1-氧丁氧基)-9 α -氟-11-羟基-16,17-[(1-甲基亚乙基)双(氧基)]孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮; 吠喃丹; 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并吠喃甲基氨基甲酸酯; BFNP(3-[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并吠喃基氧基)羰基]氨基)丙酸); 吠喃丹衍生物; 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并吠喃酚; 恶虫威; 西维因; 甲硫威; 残杀威; 涕灭威; 灭多威; 苯霜灵; N-(苯乙酰)-N-(2,6-二甲苯基)-DL-丙氨酸甲酯; Bn-Ba(4-[2-(N-苯乙酰-N-2,6-二甲苯基氨基)丙酰胺基]丁酸); Bn-COOH(4-[2-(N-苯乙酰-N-2,6-二甲苯基-DL-丙氨酸); 苯霜灵衍生物; 吠霜灵; 甲霜灵; 乙草胺; Dimetachlor; 异丙甲草胺; 2-氯-6'-乙基-N-(2-甲氧基-1-甲基乙基)乙酰-邻甲苯胺; Diethathyl-ethyl; 新燕灵; 新燕灵; 2,4,5-三氯苯氧乙酸; 2-氯-6'-乙基-N-(2-甲氧基-1-甲基乙基)乙酰-邻甲苯胺; Diethathyl-ethyl; 新燕灵; 毒草胺; 毒草胺; 2,4,5-三氯苯氧基乙酸; 2,4,5,T; Weedone; 2,4-二氯苯氧基丁酸(2,4-DB); 2,4-DB; 丁酸; 4-(2,4-二氯苯氧基)-丁酮; 二氯苯氧基丁酸钠 (Embutone); MCPA; 2-甲基-4-氯苯氧基乙酸; 氯甲基苯氧基乙酸 (Metaxon); 2,4-滴丙酸(2,4-DP); 1-[(2-氯)苯基磺酰基]单酰胺基琥珀酸; 绿磺隆; 氯溴隆; 酰磺隆; 绿麦隆; 异丙隆; 敌草隆; 利谷隆; O-甲基-O-(4-硝基苯基)-N-(4-羧基丁基)-

[0174]

可用于本文实施例的示例半抗原

硫代磷酸酯；甲基对硫磷；O,O-二甲基 O-4-硝基苯基硫代磷酸酯；Methaphos；
 Wolfatox；二甲基对硫磷；甲基对硫磷；乙基对硫磷；二乙基对硝基苯基硫代磷酸酯；
 O,O-二乙基 O-(对硝基苯基)硫代磷酸酯；杀螟硫磷；O,O-二甲基 O-4-硝基-间甲苯基
 硫代磷酸酯；倍硫磷；O,O-二甲基 O-4-甲硫基-间甲苯基硫代磷酸酯；溴硫磷，O-4-
 溴-2,5-二氯苯基 O,O-二甲基硫代磷酸酯；甲基毒死蜱；O,O-二甲基 O-3,5,6-三氯-2-
 吡啶基硫代磷酸酯；氧化的甲基对硫磷；对氧磷；磷酸；O,O-二乙基 O-(4-硝基苯基)
 酯，二嗪酮，O,O-二乙基 O-2-异丙基-6-甲基嘧啶-4-基硫代磷酸酯；甲基谷硫磷；甲
 基嘧啶磷；O-2-二乙基氨基-6-甲基嘧啶-4-基 O,O-二甲基硫代磷酸酯；杀扑磷；S-2,3-
 二氢-5-甲氧基-2-氧代-1,3,4-噻二唑-3-基甲基 O,O-二甲基二硫代磷酸酯；二甲基氯硫
 代磷酸酯；4-硝基苯酚；对硝基苯酚；苯酚衍生物(在苯环上修饰，R1=OH，R2=NO₂，
 R3=H，R4=CH₂COOH，R5=H，R6=H)；2-硝基苯酚；邻硝基苯酚；3-硝基苯酚；间
 硝基苯酚；2,4-二硝基苯酚；3,4-二硝基苯酚；2,5-二硝基苯酚；2,4-二硝基-6-甲基苯
 酚；2,3,6-三硝基苯酚；2-氯苯酚；4-氯-3-甲基苯酚；杀螟氧磷 (Fenitroxon)；3-甲
 基-4-硝基苯酚；壬基苯酚；HOM(3-[2-羟基-5 硝基苄硫基]丙酸)；苯酚，Delor103；
 多氯联苯；Delor104；多氯联苯；Delor105；多氯联苯；Delor106；4,4'-二氯联苯；
 PCB 同源物；2,4,4'-三氯联苯；PCB 同源物；2,4'-二氯联苯；PCB 同源物；2,2'-二氯
 联苯；PCB 同源物；2,4,5-三氯联苯；PCB 同源物；3,3',4,4'-四氯联苯；PCB 同源物；
 PCB 同源物；2,2',4,4',5,5'-六氯联苯；2-(5-羧基戊酰基氨基)-4,4'-二氯联苯；联苯衍
 生物；4-氯苯氧基乙酸；2-氯苯氧基乙酸；DDT；1,1,1-三氯-2,2-双-(对氯苯基)乙烷；
 DDE；1,1-二氯-2,2-双(对氯苯基)乙烯；对氯苯酚；4-氯苯酚；间氯苯酚；3,4-二氯苯
 酚；3,5-二氯苯酚；2,3,4-三氯苯酚；2,3,5-三氯苯酚；3-甲基吡啶；3-甲基吡啶衍生物；
 4-(3-甲基吡啶-5-基氧基)丁酸；4-(3-甲基吡啶-5-基氧基)丁酸；3-甲基吡啶衍生物；
 6-[n-3-甲基吡啶-5-基氧基羰基]氨基]己酸；6-[n-3-甲基吡啶-5-基氧基羰基]氨基]己酸；
 3-甲基吡啶衍生物；2-[4-(3-甲基吡啶-6-基)丁-1-基硫代]乙酸；2-[4-(3-甲基吡啶-6-基)
 丁-1-基硫代]乙酸；3-甲基吡啶衍生物；4-(3-甲基吡啶-6-基-4-氧代)丁酸；4-(3-甲基吡
 啶-6-基-4-氧代)丁酸；3-甲基吡啶衍生物；6-(3-甲基吡啶-7-基氧基)己酸；6-(3-甲基吡
 啶-7-基氧基)己酸；吡啶；吡啶-3-羧酸；吡啶衍生物-吡啶-3-乙酸；吡啶-3-乙酸；吡

[0175]

可用于本文实施例的示例半抗原

[0176]

啉衍生物-吡啶-3-丙酸; 吡啶-3-丙酸; 吡啶衍生物-吡啶-3-甲醇; 吡啶-3-甲醇; 色氨酸; 色胺; 5-甲氧基吡啶-3-甲醛; 5-甲氧基色胺; 5-甲氧基吡啶; 6-甲氧基吡啶; 7-甲氧基吡啶; EB1089(西奥骨化醇); EB1089(西奥骨化醇)衍生物; (22E,24E)-去-A,B-24-高-26,27-二甲基-8-[(E)-N-(2-羧乙基)-氨基甲酰基亚甲基]-胆甾-22,24-二烯-25-醇; 1 α -25-二羟基维生素 D₃; 25(OH)D₃; 25-羟基维生素 D₃; 24R,25(OH)2D₃; 24R,25-二羟基维生素 D₃; 维生素 D₂; 麦角钙化醇; 维生素 D₃; 胆钙化醇; EB1446; EB1436; EB1445; EB1470; 去乙基羟基莠去津 (DEHA) (结构相关的 s-三嗪); Irgarol 1051; 异硫氰酸荧光素; FITC; 变肾上腺素; 去甲变肾上腺素; 扑灭津; 特丁津; 6-氯-N-(1,1-二甲基乙基)-N'-乙基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺; (结构相关的 s-三嗪); 莠灭净(2-乙基氨基-4-异丙基氨基-6-甲硫基-1,3,5-三嗪(修饰: iPr/SCH₃/Et R₁=(CH₃)₂-CH-NH-, R₂=-SCH₃, R₃=-NH-CH₂-CH₃); Irgarol; 氰草津(修饰: R₁=Cl, R₂=NHCH₂CH₃, R₃=NHCCN(CH₃)₂); OH-特丁津; 特丁津-2OH; 羟基三嗪 (EQ-0027); 去异丙基莠去津(结构相关的 s-三嗪); 去乙基特丁津(结构相关的 s-三嗪); 去乙基-去异丙基莠去津(结构相关的 s-三嗪); 阿特拉通; 特丁净(结构相关的 s-三嗪); 莠去津衍生物(修饰: R₁=-NHCH(CH₃)₂, R₂=-S(CH₂)₂COOH, R₃=-NHC₂H₅); 三聚氯氰; 氟乐灵; (结构相关的 s-三嗪)tBu/C₄/SCH₃(修饰: R₁=-NH-C-(CH₃)₃, R₂=-NH(CH₂)₃COOH, R₃=-SCH₃); 磺胺二甲嘧啶;(结构相关的 s-三嗪)6-[[[4-氯-6-(甲基氨基)]-1,3,5-三嗪-2-基]氨基]己酸(修饰: Me/Cl/C₆ R₁=-NHCH₃, R₂=-Cl, R₃=-NH(CH₂)₅COOH); (结构相关的 s-三嗪)环丙腈津(修饰: R₁=-Cl, R₂=-NH 环丙基, R₃=-NHCCN(CH₃)₂); (结构相关的 s-三嗪); 扑灭通(修饰: R₁=-OCH₃, R₂=-NHCH(CH₃)₂, R₃=-NHCH(CH₃)₂); (结构相关的 s-三嗪)莠去津硫醚氨酸(AM)(修饰: R₁=-SCH₂CH(NHAc)COOH, R₂=-NHCH₂CH₃, R₃=-NHCH(CH₃)₂); (结构相关的 s-三嗪); 去乙基莠去津硫醚氨酸(去乙基 AM)(修饰: R₁=-NAcCys, R₂=-NH₂, R₃=-NHCH(CH₃)₂); (结构相关的 s-三嗪); 去异丙基莠去津硫醚氨酸(去异丙基 AM)(修饰: R₁=-NAcCys, R₂=-NHCH₂CH₃, R₃=-NH₂); (结构相关的 s-三嗪); 二脱烷基化莠去津硫醚氨酸(二脱烷基化 AM)(修饰: R₁=-NAcCys, R₂=-NH₂, R₃=-NH₂); (结构相关的 s-三嗪); 西玛津硫醚氨酸酯(修饰: R₁=-NAcCys, R₂=-NHCH₂CH₃, R₃=-NHCH₂CH₃); (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R₁=-S(CH₂)₂COOH,

可用于本文实施例的示例半抗原

[0177]

R2=-NHCH₂CH₃, R3=-NHCH₂CH₃); (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R1=-Cl, R2=-NHCH(CH₃)₂, R3=-NH(CH₂)₂COOH); (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R1=-Cl, R2=-NHCH₂CH₃, R3=-NH(CH₂)₂COOH);(结构相关的 s-三嗪);莠去津硫醚氨甲酯(AM 甲酯)(修饰: R1=-NAcCysME, R2=-NHCH₂CH₃, R3=-NHCH(CH₃)₂); N-乙酰半胱氨酸; S-苄基硫醚氨酸酯; (结构相关的 s-三嗪); 西草净(修饰: R1=-SCH₃, R2=-NHCH₂CH₃, R3=-NHCH₂CH₃);赛克津;4-氨基-6-叔丁基-4,5-二氢-3-甲硫基-1,2,4-三嗪-5-酮;磺胺类药物; N4-乙酰基-磺胺二甲嘧啶(修饰: N4-乙酰基-磺胺二甲嘧啶);磺胺类药物;磺胺噻唑;磺胺噻唑;磺胺甲基嘧啶;磺胺甲基嘧啶;磺胺喹恶啉;磺胺喹恶啉;磺胺氯哒嗪;磺胺氯哒嗪;磺胺吡啶;磺胺二甲氧嘧啶;磺胺二甲氧嘧啶;磺胺甲恶唑;磺胺甲恶唑;磺胺异恶唑;磺胺异恶唑;磺胺甲基噻唑;磺胺甲基噻唑;对氨基苯磺酰胺;对氨基苯磺酰胺;磺胺胍;磺胺胍;磺胺嘧啶;磺胺嘧啶;磺胺甲氧吡嗪;磺胺甲氧吡嗪;五氯苯氧基丙酸;五氯苯酚;PCP;2,3,5,6-四氯苯酚;1,2,4,5-四氯苯;2,4,6-三氯苯酚;2-甲氧基-3,5,6-三氯吡啶;1,3,5-三氯苯;1,3-二氯苯;2,4,5-三氯苯酚;2,6-二氯苯酚;3,5,6-三氯-2-吡啶氧基乙酸;3,5,6-三氯-2-吡啶醇;TCP;2,4-二氯苯酚;2,5-二氯苯酚;DNC;4,4'-二硝基二苯脲;(结构相关的 s-三嗪);二氯莠去津;(结构相关的 s-三嗪);二氯西玛津;1-((6-氯吡啶-3-基)甲基)亚咪唑烷-2-基胺;吡啶衍生物;6-氯吡啶-3-羧酸;烟酸;吡啶衍生物;N-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-N-甲基乙酰胺;(6-氯吡啶-3-基)-N-甲基甲胺;(6-氯吡啶-3-基)甲醇;吡虫啉;1-(6-氯-3-吡啶基甲基)-N-硝基咪唑烷-2-基亚基胺;啉虫脒;(E)-N1-[(6-氯-3-吡啶基)甲基]-N2-氰基-N1-甲基乙脒;烯啉虫胺;溴氰菊酯;1(R)-顺式- α (S)-3-(2,2-二溴乙烯基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸氰基(3-苯氧基苯基)甲酯;DON;脱氧雪腐镰刀菌烯醇;DON 衍生物;15-AcDON(15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇);DON 衍生物;3-AcDON(3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇);DON 衍生物;3,15-DiacDON(3,15-二乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇);DON 衍生物;3,7,15-TriacDON(3,7,15-三乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇);NIV(雪腐镰刀菌烯醇);雪腐镰刀菌烯醇;NIV 衍生物;4-AcNIV(镰刀霉酮 X);氰酰胺; α,α,α -三氟-3'-异丙氧基-2-甲基苯酰胺基苯胺;担菌宁;灭锈胺;麦锈灵;24,25(OH)₂D₃; (24R)-24,25-二羟基维生素 D₃; 24S, 25(OH)₂D₃; 24S; 25-二羟基维生素 D₃; 25R, 26(OH)₂D₃;

可用于本文实施例的示例半抗原

[0178]

25R, 26-二羟基维生素 D3; 25S, 26(OH)₂D3; 25S; 26-二羟基维生素 D3; 1,24,25(OH)₃D3; 1,24,25-三羟基维生素 D3; 1,25-内酯; (23S,25R)-1,25(OH)₂ D3 26,23-内酯; 24,25(OH)₂-7-DHC; 24,25(OH)₂-7-脱氢胆固醇; 25(OH)D3 3S; 25(OH)D3 3-硫酸酯; 24,25(OH)₂D3-半戊二酸酯衍生物; 11 α -半戊二酰基氧基-(24R)-24,25-二羟基维生素 D3; 24,25(OH)₂D3-半戊二酸酯衍生物; (24R)-24,25-二羟基维生素 D3-3-半戊二酸酯; 24R,25(OH)₂D2; 24S,25(OH)₂D2; 25(OH)D2; 1,24(OH)₂D3; 2,3,6-三氯苯酚; 四氯对苯二酚; 五氯苯胺; 五氯苯; 2,3-二硝基甲苯; 4-二硝基甲苯; 2,4,5-三氯硝基苯; 3-(3-羟基-2,4,6-三氯苯基)-丙酸; 2,3,4,6-四氯苯酚; 2,4,6-三氯茴香醚; 2,4,6-TCA; 五溴苯酚; PBP; 2,4,6-三溴苯酚; 2,4,6-TBP; 2-溴-4-氯苯酚; 2-B-4-CP; 2,4-二溴苯酚; 2,4-DBP; 2,6-二溴苯酚; 2,6-DBP; 4-溴苯酚; 4-BP; 利尿磺胺; 氟苄青霉素; 阿莫西林; 6-氨基青霉烷酸 (6-APA); 阿洛西林; 巴氨西林; 羧苄青霉素; 依匹西林; 氯唑西林; 双氯西林; 美坦西林; 甲氧西林; 拉氧头孢; 苯唑西林; 青霉素 G; 苄青霉素; 青霉素 V; 苯氧甲基青霉素; 非奈西林; 哌拉西林; 替卡西林; 水解氟苄青霉素; 水解青霉素 G; 3-苯氧基苯甲酸(3-PBAc)毒死蜱; 毒死蜱衍生物; HClO1; 通过用 3-巯基丙酸间隔臂取代 6 位的氯以工业级直接从毒死蜱合成; 毒死蜱衍生物; HTCP(TCP 代谢物的改性 HTCP 从 HClO1 通过水解硫代磷酸酯制备); 玉米素核苷(反式异构体); 玉米素(反式异构体); N6-(2-异戊烯基)-腺苷; IPA; N6-(2-异戊烯基)-腺嘌呤; 2-iP; 苄基腺嘌呤; 激动素; 灭草隆; 绿谷隆; 非草隆; 草不隆; 敌稗; 苯胺灵; 氯苯胺灵; 4-氯苯胺; 甲基脲衍生物; 1-(3-羧基丙基)-3-(4-氯苯基)-1-甲基脲; 甲基脲衍生物; 1-(5-羧基戊基)-3-(4-氯苯基)-1-甲基脲; 秀谷隆; 番泻苷 B; SB; 在 C-10 和 C-10' 间具有赤式构型的番泻苷 B; 番泻苷 A(在 C-10 和 C-10' 间具有苏式构型的改性番泻苷 A); 大黄酸; 大黄素; 芦荟大黄素; 芦荟甙; 1,4 二羟基蒽醌; 土大黄苷; 没食子酸; 香草酸; 咖啡酸; 尿黑酸; 七叶苷; 桂皮鞣质 B1; 黄芩苷; 柚皮苷水合物; 黄芩素; 黄芩素 7-o- β -葡萄糖苷酸; 姜黄素; δ 1-四氢大麻酚酸; δ 1-四氢大麻酚; (+)-顺式-4-氨基氯菊酯; 3-(4-氨基苯氧基)苄基(+)-顺式-3-(2,2-二氯乙基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸酯; 氯菊酯; 反式-氯菊酯; 顺式-氯菊酯; 氟氯菊酯; 苯醚菊酯; 苄呋菊酯; 氟氯菊酯; 反式-氯菊酯酸氟戊菊酯; 氟胺氯菊酯; 甲氧菊酯;

可用于本文实施例的示例半抗原

顺式-氯菊酯酸；4-苯氧基苯甲酰醇；敌草隆衍生物；1-(3-羧基丙基)-3-(3,4-二氯苯基)-1-甲基脲；环草隆；特丁噻草隆 (Terbuthiuron)；燕麦灵；酸性氟乐灵；2,6-二硝基-N-丙基-N-(2-羧乙基)-4-(三氟甲基)苯胺；TR-13；2-乙基-7-硝基-1-丙基-5-(三氟甲基)-1H-苯并咪唑；氟草胺；2,6-二硝基-N-丁基-N-乙基-4-(三氟甲基)苯胺；TR-2；2,6-二硝基-N-丙基-4-(三氟甲基)苯胺；ethalfluaralin；2,6-二硝基-N-乙基-N-(2-甲基-2-丙烯基)-4-(三氟甲基)苯胺；TR-40；N-(2,6-二硝基-4-(三氟甲基)苯基)-N-丙基丙酰胺；TR-15；2-乙基-4-硝基-6-(三氟甲基)-1H-苯并咪唑；TR-3；2,6-二硝基-4-(三氟甲基)苯胺；TR-6；3-硝基-5-(三氟甲基)-1,2-苯二胺；TR-9；5-(三氟甲基)-1,2,3-苯三胺；TR-21；4-(二丙基氨基)-3,5-二硝基苯甲酸；TR-36M；3-甲氧基-2,6-二硝基-N,N-二丙基-4-(三氟甲基)苯胺；氯磺灵；3,5-二硝基-4-(二丙基氨基)苯磺酰胺；二甲戊乐灵；2,6-二硝基-N-(1-乙基丙基)-3,4-二甲基苯胺；五没食子酰葡萄糖；苾；苾-1-甲醛；菲；苯并(a)苾；3,4-苯并苾；蒽；3,4-苯并苾；茈；芴；蒽；1,2-苯并菲；苯并[g,h,i]花；苯并[c]苾；茈烯；荧蒽；苯并(j,k)芴；茛并-1,2,3-cd-苾；1,10-(1,2-亚苯基)苾；苯并[a]蒽；1,2-苯并蒽；苯并(k)荧蒽；萘；苯并[a]荧蒽；二苯并[ah]蒽；1,2:5,6-二苯并蒽；2,3-二氨基萘；2,6-二硝基苯胺；17-β-雌二醇(ED)；雌甾-1,3,5(10)-三烯-3,17-β-二醇；氟乐灵衍生物；2,6-二硝基-4-三氟甲基苯胺；氟乐灵衍生物；N-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯基)-6-氨基己酸；氟乐灵衍生物；N-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯基)-N-甲基-6-氨基己酸；氟乐灵衍生物；N-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯基)-N-丙基-6-氨基己酸；氟乐灵衍生物；N-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯基)-6-氨基己酸甲酯；氟乐灵衍生物；N-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯基)-6-氨基己酸叔丁酯；氟草胺；乙丁烯氟灵；氟乐灵衍生物；2,6-二硝基-4-三氟甲基苯酚；异丙乐灵；苯胺；2-羟基三氟甲苯；N-丙基-6-氨基己酸；N-甲基-6-氨基己酸；MHPG 衍生物；D-MHPG(D-3-甲氧基-4-羟基苯基乙二醇)；MHPG 衍生物；L-MHPG(L-3-甲氧基-4-羟基苯基乙二醇)；MHPG 衍生物；DL-MHPG(DL-3-甲氧基-4-羟基苯基乙二醇)；D-MHPG 型和 L-MHPG 型的异构体混合物；MHPG 衍生物；DL-MHPG-SO₄(DL-3-甲氧基-4-羟基苯基乙二醇-硫酸酯)修饰可包括 D-MHPG-SO₄ 型和 L-MHPG-SO₄ 型的异构体混合物；5-羟色胺；5-HT；5-羟基多巴胺(5-4HDA)；3,4-二羟基苯基乙二醇(DOPEG)；多巴胺；4-(2-氨基乙基)邻苯二酚；

[0179]

可用于本文实施例的示例半抗原

[0180]

3-羟基酪胺；3,4-二羟基苯乙胺；L-3,4-二羟基苯丙氨酸；L-DOPA；香草扁桃酸；DL-VMA；高香草酸；去甲肾上腺素；DL-NE；D-肾上腺素；D-E；3-甲氧基酪胺；MTA；3-甲氧基酪氨酸；MTyr；3,4-二羟基扁桃酸；DL-DOMA；3,4-二羟基苯基乙酸；DOPAC；L-苯丙氨酸；酪胺；对酪胺；4-(2-氨基乙基)苯酚；D-扁桃酸；高儿茶酚；章鱼胺；DL-章鱼胺；益棉磷；S-(3,4-二氢-4-氧代苯并[d]-[1,2,3]-三嗪-3-基甲基)O,O-二乙基二硫代磷酸酯；亚胺硫磷；O,O-二甲基 S-丙氨酸酰亚氨基甲基二硫代磷酸酯；灭菌丹；N-[(三氯甲基)硫代]邻苯二甲酰亚胺；胺菊酯；(1-环己烯-1,2-二甲酰亚氨基)甲基-2,2-二甲基-3-(2-甲基丙烯基)-环丙烷羧酸酯；N-(溴甲基)邻苯二甲酰亚胺；N-(氯甲基)苯基重氮胺；6-(N-苯二甲酰亚氨基甲硫基)己酸(MFH)；除草定；5-溴-3-仲丁基-6-甲尿嘧啶；除草定衍生物；5-溴-6-(羟甲基)-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶酮；除草定衍生物；5-溴-3-(2-甲基丙基-6-甲基-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮)；除草定代谢物；除草定衍生物；3-羟基-1-甲基丙基-6-甲基-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮(修饰：除草定代谢物)；除草定衍生物；6-甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮(修饰：除草定代谢物)；特草定衍生物；[5-氯-3-(1,1-二甲基乙基)-6-(羟甲基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮]；特草定；3-叔丁基-5-氯-6-甲尿嘧啶；除草定衍生物；乙基-5-(5-溴-6-甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-1-基)己酸酯；在 N-1 处烷基化的除草定衍生物；除草定衍生物 5-(5-溴-6-甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-1-基)己酸(修饰：在 N-1 处烷基化的除草定衍生物)；除草定衍生物；溴-6-(溴甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮(修饰：在 6-甲基位置取代的除草定衍生物)；除草定衍生物-[5-溴-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-6-基]-2-羧基丙酸(修饰：在 6-甲基位置取代的除草定衍生物)；3-[5-溴-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮-6-基]丙酸(修饰：在 6-甲基位置取代的除草定衍生物)；除草定衍生物 5-溴-1,6-二甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮；除草定衍生物 5-溴-1-丁基-6-甲基-3-(1-甲基丙基)-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮；丁草胺；N-丁氧基甲基-2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺；先甲草胺 (Amidochlor)；N-[(乙酰氨基)甲基]-2-氯-N-(2,6-二乙基苯基)乙酰胺；尼卡巴嗪；具有 4,6-二甲基-2(1H)-嘧啶酮的 N,N'-双(4-硝基苯基)-化合物(修饰：(DNC+HDP))；2-羟基-4,6-二甲基嘧啶；HDP；抑霉唑；[1-(β-烯丙氧基-2,4-二氯苯乙基)咪唑]；抑霉唑衍生物；EIT-0073(修

可用于本文实施例的示例半抗原

[0181]

饰：具有-O(CH₂)₅-COOH 基团替代抑霉唑原有的-OCH₂CH=CH₂ 基团)；戊菌唑；
 (RS)-1-(2,4-二氯-β-丙基苯乙基)-1H-1,2,4-三唑；己唑醇；(RS)-2-(2,4-二氯苯
 基)-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)己-2-醇；丙环唑；顺式-反式-1-[2-(2,4-二氯苯基)-4-丙基-1,3-
 二氧戊环-2-基甲基]-1H-1,2,4 三唑；苜氯三唑醇；(2RS,3RS)-1-(2,4-二氯苯基)-4,4-二
 甲基-2-(1H-1,2,4-三唑-1-基)戊-3-醇；氟菌唑；(E)-4-氯-α,α,α-三氟-N-(1-咪唑-1-基-2-
 丙氧基亚乙基)-邻甲苯胺；抑霉唑衍生物；EIT-0183；抑霉唑衍生物；EIT-0180；抑
 霉唑衍生物；EIT-0111；抑霉唑衍生物；EIT-0158；抑霉唑衍生物；K-240；百菌清；
 四氯异间苯二腈(在苯环上修饰 R₁=CN, R₂=Cl, R₃=CN, R₄=Cl, R₅=Cl, R₆=Cl)；
 百菌清衍生物-2,4,5,6-四氯-3-氰基苯甲酰胺(在苯环上修饰 R₁=CONH₂, R₂=Cl,
 R₃=CN, R₄=Cl, R₅=Cl, R₆=Cl)；百菌清衍生物-2,5,6-三氯-4-羟基间苯二腈(在苯环
 上修饰 R₁=CN, R₂=Cl, R₃=CN, R₄=OH, R₅=Cl, R₆=Cl)；3-氨基甲酰-2,4,5-三氯
 苯甲酸(在苯环上修饰 R₁=CONH₂, R₂=Cl, R₃=COOH, R₄=H, R₅=Cl, R₆=Cl)；
 五氯硝基苯(在苯环上修饰 R₁=NO₂, R₂=Cl, R₃=Cl, R₄=Cl, R₅=Cl, R₆=Cl)；六氯
 化苯；六氯苯；BHC；林丹(在苯环上修饰 R₁=Cl, R₂=Cl, R₃=Cl, R₄=Cl, R₅=Cl,
 R₆=Cl)；2,4,5,6-四氯苯酚(苯环上修饰 R₁=OH, R₂=Cl, R₃=H, R₄=Cl, R₅=Cl, R₆=Cl)；
 西维因衍生物；氨基甲酸乙酯(修饰：R₁=OCONHCH₂CH₃, R₃=H)；1-萘酚；1-萘乙
 酰胺；-(1-萘基)乙酰胺；西维因衍生物；1-碳酸甲酯(修饰：R₁=OCOOCH₃, R₂=H)；
 西维因衍生物；1-碳酸乙酯(修饰：R₁=OCOOCH₂CH₃, R₂=H)；西维因衍生物 2-
 碳酸乙酯(修饰：R₁=H, R₂=OCOOCH₂CH₃)；西维因衍生物；1-乙基硫代碳酸酯(修
 饰：R₁=OCOSCH₂CH₃, R₂=H)；西维因衍生物；2-乙基硫代碳酸酯(修饰：R₁=H,
 R₂=OCOSCH₂CH₃)；抑草生；N-1-萘基邻氨基甲酰基苯甲酸；西维因衍生物；3-羟基西
 维因(修饰：R₁=OCONHCH₃, R₂=H, R₃=OH, R₄=H, R₅=H)；西维因衍生物 4-羟
 基西维因(修饰：R₁=OCONHCH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=OH, R₅=H)；西维因衍生物
 5-羟基西维因(修饰：R₁=OCONHCH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=OH)；西维因衍
 生物；1-(5-羧基戊基)-3-(1-萘基)脲(修饰：R₁=NHCONH(CH₂)₅COOH, R₂=H)；(结构
 相关的 s-三嗪)-叠氮津；4-叠氮-N-异丙基-6-甲硫基-1,3,5-三嗪-2-基胺(修饰：
 R₁=-SCH₃, R₂=-N₃, R₃=-CH(CH₃)₂)；(结构相关的 s-三嗪)；2-(乙基氨基)-4-(甲硫基)-6-

可用于本文实施例的示例半抗原

[0182]

氨基三嗪(修饰: R1=-SCH₃, R2=-NH-C₂H₅, R3=-NH₂); (结构相关的 s-三嗪)-2-氨基-4-(甲硫基)-6-(异丙基氨基)三嗪(修饰: R1=-SCH₃, R2=-NH₂, R3=-NH-CH(CH₃)₂); (结构相关的 s-三嗪)-2-氨基-4-甲氧基-6-(异丙基氨基)三嗪(修饰: R1=-OCH₃, R2=-NH₂, R3=-NH-CH(CH₃)₂); TCP 衍生物(3,5,6-三氯-2-吡啶醇衍生物); 3-(3,5-二氯-6-羟基-2-吡啶基)硫代丙酸; 对硝基琥珀酰苯胺酸(PNA-S); PNA-S; PNA-C; 对硝基-顺式-1,2-环己烷二羧基苯胺酸; 硝基苯胺衍生物; 2-硝基苯胺; 邻硝基苯胺; 硝基苯胺衍生物-3-硝基苯胺; 间硝基苯胺; 硝基苯胺衍生物-4-硝基苯胺; 对硝基苯胺; 芳香醇; 4-硝基苄醇; 芳香醇-4-硝基苯乙醇; 芳香醇 2-硝基苄醇; 芳香醇; 3-硝基苄醇; 脲衍生物-1-苄基-3-(4-硝基苯基)脲; 脲衍生物-1-(3-氯苯基)-3-(2-甲氧基-5-硝基苯基)脲; 脲衍生物-1-(3-氯苯基)-3-(4-甲氧基-3-硝基苯基)脲; 脲衍生物-1-(4-氯苯基)-3-(4-硝基苯基)脲; 脲衍生物-(2-氯苯基)-3-(2-甲氧基-4-硝基苯基)脲; 1-(3-甲氧基苯基)-3-(3-硝基苯基)脲; 吡喃丹衍生物; 间吡喃丹苯酚; 羟基吡喃丹; 酮基吡喃丹; 丁硫克百威; 3-二氢-2,2-二甲基苯并吡喃-7-基(二丁基氨基硫代)甲基氨基甲酸酯; 丙硫克百威; N-[2,3-二氢-2,2-二甲基苯并吡喃-7-基氧基羰基(甲基)氨基硫代]-N-异丙基-β-丙氨酸酯; 吡喃丹; 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并吡喃基 2,4-二甲基-5-氧代-6-氧杂-3-硫杂-2,4-二氮杂癸酸酯; 吡喃丹衍生物; 4-[[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并吡喃基氧基)羰基]-氨基]丁酸(BFNB) (修饰: n=3X=CH₂); 异狄氏剂; 异狄氏剂 (nendrin); (1R、4S、4aS、5S、6S、7R、8R、8aR)-1,2,3,4,10,10-六氯-1,4,4a; 5,6,7,8,8a-八氢-6,7-环氧-1,4:5,8-二甲桥萘; 七氯; 1,4,5,6,7,8,8-七氯-3a,4,7,7a-四氢-4,7-; 氯丹; 1,2,4,5,6,7,8,8-八氯-2,3,3a,4,7,7a-六氢-4,7-甲桥萘; 硫丹 (修饰: α型和β型的异构体混合物); 硫丹 (改性: α异构形式); 硫丹 (改性: β-异构形式); 硫丹衍生物; 硫丹硫酸盐/酯 (改性: 硫酸盐/酯形式); 硫丹衍生物; 硫丹二醇; 硫丹的二醇代谢物; 硫丹衍生物; 硫丹醚 (改性: 硫丹的醚代谢物); 硫丹衍生物; 羟基醚; 硫丹的羟基醚代谢物; 硫丹衍生物; 硫丹内酯 (改性: 硫丹的内酯代谢物); 艾氏剂; 狄氏剂; 氟戊菊酯异构体 (改性: 1S, 2R 异构体 R: Ph); 氟戊菊酯异构体 (改性: 1R; 2S 异构体 R: Ph); 氟戊菊酯异构体 (改性: 1R; 2R 异构体 R: Ph); 氟戊菊酯异构体 (改性: 1S; 2R/S 异构体 R: Ph); 氟戊菊酯异构体 (改性: 1R; 2R/S 异构体 R: Ph); 氟戊菊酯异

可用于本文实施例的示例半抗原

[0183]

构体；氰戊菊酯（改性：1R/S；2R/S 异构体 R：Ph）；噻苯咪唑；2-(噻唑-4-基)苯并咪唑；噻苯咪唑衍生物；5-羟基噻苯咪唑（修饰：5-OH-TBZ）；噻苯咪唑衍生物；5-NH₂-TBZ；噻苯咪唑衍生物；甲基苯并咪唑氨基甲酸酯；阿苯达唑；甲苯达唑；芬苯达唑；噻苯咪唑衍生物；2-琥珀酰胺噻苯咪唑；噻苯咪唑衍生物；2-琥珀酰胺噻苯咪唑；噻苯咪唑酯；氰戊菊酯半抗原；氰基[3-(4-氨基苯氧基)苯基]甲基(S)-4-氯- α -(1-甲基乙基)苯乙酸酯(4-氨基氰戊菊酯)；氰戊菊酯半抗原；苄基 4-[3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧基]苯丙酸酯；氰戊菊酯半抗原；苄基 3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧乙酸酯；氰戊菊酯半抗原；3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧乙酸；氰戊菊酯半抗原；苄基 6-[3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧基]己酸酯；氰戊菊酯半抗原；6-[3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧基]己酸氰戊菊酯半抗原；4-[3-[氰基[(S)-2-(4-氯苯基)-3-甲基-1-氧代丁氧基]甲基]苯氧基]苯丙酸；(S)-氰戊菊酯酸；（结构相关的 s-三嗪）；莠去津硫醚氨酸酯修饰 R1=-SCH₂CH(NHCOCH₃)COOH，R2=-NHCH₂CH₃，R3=-NHCH(CH₃)₂；倍硫磷半抗原；甲基 O-[3-甲基-4-(甲硫基)苯基]N-(3-羧丙基)硫代磷酸酯，修饰称为半抗原 B；倍硫磷衍生物；氧化倍硫磷；倍硫磷衍生物；氧化倍硫磷；乙基虫螨磷；4-(甲硫基)-间甲酚；毒死蜱衍生物；氧代毒死蜱；皮蝇磷；O,O-二甲基 O-2,4,5-三氯苯基硫代磷酸酯；毒壤磷；O-乙基 O-2,4,5-三氯苯基乙基-硫代磷酸酯；除线磷；O-2,4-二氯苯基 O,O-二乙基硫代磷酸酯；对硫磷；O,O-二乙基 O-4-硝基苯基硫代磷酸酯；对硫磷；毒死蜱衍生物修饰：描述了 AR1 的合成；毒死蜱衍生物；O-乙基 O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)O-(3-羧丙基)硫代磷酸酯；(PO)；毒死蜱衍生物-O-乙基 O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)N-(5-羧乙基)硫代磷酸酯；(PN1)（修饰：硫代磷酸酯试剂的酰胺键）；毒死蜱衍生物；O-乙基 O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)N-(2-羧乙基)硫代磷酸酯；(PN1)（修饰：合适的硫代磷酸酯试剂的酰胺键）；三唑酮；(RS)-1-(4-氯苯氧基)-3,3-二甲基-1-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丁-2-酮；GR151004；[4-[[5-[3-[2-(二甲氨基)乙基]]-5-苯并咪唑基]-3-吡啶基]乙酰基]吗啉盐酸盐；除虫脲；1-(4-氯苯基)-3-(2,6-二氟苯甲酰基)脲；（结构相关的 s-三嗪）-SprAAT（修饰：R1=CH₂CH₂COOH，R2=NH₂，R3=NH₂）；（结

可用于本文实施例的示例半抗原

[0184]

构相关的 s-三嗪) ; SBeAAT (修饰: R1=S(C₆H₄)COOH, R2=NH₂, R3=NH₂) ; (结构相关的 s-三嗪) ; SAAT (修饰: R1=SH, R2=NH₂, R3=NH₂) ; (结构相关的 s-三嗪) ; CDAT (修饰: R1=Cl, R2=NH[C(O)CH₃], R3=NH₂) ; (结构相关的 s-三嗪) -CDET (修饰: R1=Cl, R2=NH[C(O)CH₃], R3=NH(CH₂CH₃); (与结构相关的 s-三嗪) -CDIT (修饰: R1=Cl, R2=NH[C(O)CH₃], R4=NH(CH(CH₃)₂)) ; (结构相关的 s-三嗪) ; CDDT (修饰: R1=Cl, R2=NH[C(O)CH₃], R3=NH[C(O)CH₃]) ; (结构相关的 s-三嗪) -三聚氰酸二酰胺; OAAT(修饰: R1=OH, R2=NH₂, R3=NH₂); (结构相关的 s-三嗪)-三聚氰酸一酰胺; OOAT(修饰: R1=OH, R2=OH, R3=NH₂); (结构相关的 s-三嗪)-三聚氰酸; OOOT(修饰: R1=OH, R2=OH, R3=OH); (结构相关的 s-三嗪); 三聚氰胺; AAAT(修饰: R1=NH₂, R2=NH₂, R3=NH₂); 结构相关的 s-三嗪-N-异丙基三聚氰酸二酰胺; OIAT(修饰: R1=OH, R2=NH[CH(CH₃)₂], R3=NH₂); 结构相关的 s-三嗪-N-乙基三聚氰酸二酰胺; OEAT(修饰: R1=OH, R2=NHCH₂CH₃, R3=NH₂); 结构相关的 s-三嗪; N-乙基三聚氰酸一酰胺; OOET(修饰: R1=OH, R2=OH, R3=NHCH₂CH₃); (结构相关的 s-三嗪)-灭蝇胺; CyPAAT(修饰: R1=NH(C₃H₅), R2=NH₂, R3=NH₂); 结构相关的 s-三嗪-二氨基-s-三嗪; HAAT(修饰: R1=H, R2=NH₂, R3=NH₂); PCB 同源物; 2,5,3',4'-四氯联苯(修饰: IUPAC no.70); PCB 同源物 2,4,5,3',4'-五氯联苯(修饰: IUPAC no.118); PCB 同源物-2,2',5,5'-四氯联苯(修饰: IUPAC no.52); PCB 同源物; 6-[3,3',4'-三氯联苯-4-基]氧基]己酸; 美托拉宗, 商标名 Mykrox; Zaroxolyn; 苯甲酸糠酯; DDT 代谢物; DDA; 百草枯; 1,1'-二甲基-4,4'-二吡啶鎓离子; 乙胺嗪; THP; 2,4,6-三苯基-N-(4-羟基苯基)-吡啶鎓; 邻-DNCP; -二硝基羧基苯酚; PCB 同源物; 3-氯联苯酚(修饰: IUPAC No.2); PCB 同源物; 3,4'-二氯联苯(修饰: IUPAC No.13); PCB 同源物; 3,5-二氯联苯(修饰: IUPAC No.14); PCB 同源物; 3,4,5,3',4'-五氯联苯(修饰: IUPAC No.126); 2,3,3',4'-四氯联苯(修饰: IUPAC No.56); 2',3,4,5-四氯联苯(修饰: IUPAC No.76); 3,3',5,5'-四氯联苯(修饰: IUPAC No.80); 2,4,5,2',5'-五氯联苯(修饰: IUPAC No.101); 2,3,3',4,4'-五氯联苯(修饰: IUPAC No.105); 2,3,6,3',4'-五氯联苯(修饰: IUPAC No.110); 3,3',4,5,5'-五氯联苯(修饰: IUPAC No.127); 3,4,5,3',4',5'-六氯联苯(修饰: IUPAC No.169); 2,3,3',4,4',5-六氯联

可用于本文实施例的示例半抗原

[0185]

苯(修饰: IUPAC No.156); 3,4,3',4'-四溴联苯; 3,4,5,3',4',5'-六溴联苯; 2,4,5,2',4',5'-六溴联苯; 二苯并呋喃和二噁英; 2,3,7,8-四氯苯并呋喃; 2,3,7,8-四氯二苯并-对-二噁英; 3,4',5-三氯-4-联苯酚; 3,3',5,5'-四氯-4,4'-联苯二酚; 3,4,3',4'-四氯联苯醚; 1,2-二氯苯; 1,4-二氯苯; 1,2,4-三氯苯; 3,4-二氯苯胺; DDT 代谢物; 4,4'-DDT; 4,4'-DDD; 倒千里光裂碱; 3,4-二氯联苯修饰: IUPAC No.12; 3,4,3'-三氯联苯(修饰: IUPAC No.35); PCB 同源物; 3,4,4'-三氯联苯(修饰: IUPAC No.37); 3,4,3',5-四氯联苯(修饰: IUPAC No.78); 3,4,3',5'-四氯联苯(修饰: IUPAC No.79); 3,4,4',5-四氯联苯(修饰: IUPAC No.81); DDT 代谢物; p,p'-DDT(修饰: p,p'-二氯联苯基三氯乙烷); o,p'-DDT 修饰: o,p'-二氯联苯基三氯乙烷; p,p'-DDE 修饰: p,p'-DDE; o,p'-DDE 修饰: o,p'-DDE; p,p'-DDD 修饰: p,p'-DDD; o,p'-DDD 修饰: o,p'-DDD; 三氯杀螨醇; 4,4-二氯-a-(三氯甲基)二苯甲醇; 环草津; 6-氯-N-环丙基-N'-(1-甲基乙基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺; 结构相关的 s-三嗪; 杀草净; 6-(乙硫基)-N,N'-双(1-甲基乙基)-1,3,5-三嗪-2,4-二胺; 草达津; 6-氯-N,N,N'-三乙基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺; 6-羟基莠去津; 环嗪酮; 3-环己基-6-二甲基氨基-1-甲基-1,3,5-三嗪-2,4(1H,3H)-二酮; TNT; 2,4,6-三硝基甲苯; 四氯醚唑(M14360); 1-[2-(2,4-二氯苯基)-3-(1,1,2,2-四氟乙氧基)丙基]-1H-1,2,4-三唑; DTP; 2-(2,4-二氯苯基)-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丙醇; Imazalyl; 氯苯嘧啶醇; (RS)-2,4'-二氯- α -(嘧啶-5-基)二苯甲基醇; 白羽扇豆碱代谢物; (+)-白羽扇豆碱(修饰: R=H); 白羽扇豆碱代谢物; (+)-13-羟基白羽扇豆碱(修饰: R=OH); 白羽扇豆碱代谢物; (+)-13-羟基白羽扇豆碱的半琥珀酸酯(修饰: R=OCO-(CH₂)₂·COOH); 白羽扇豆碱代谢物; (+)-13-羟基白羽扇豆碱的顺式-六氢邻苯二甲酸酯(修饰: R=OCO·C₆H₁₀·COOH); 白羽扇豆碱代谢物; α -异白羽扇豆碱; 白羽扇豆碱代谢物; -羟基白羽扇豆碱; 金雀花碱; 半胱氨酸; 多花羽扇豆碱; 表羽扇豆碱; (结构相关的 s-三嗪); 氟草津酸修饰: R₁=Cl, R₂=NHCH₂CH₃, R₃=NHCCOOH(CH₃)₂; 结构相关的 s-三嗪修饰: R₁=Cl, R₂=NHCH₂CH₃, R₃=NH(CH₂)₃COOH; 结构相关的 s-三嗪(修饰: R₁=Cl, R₂=NHCH₂CH₃, R₃=NHCH₂COOH); (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R₁=Cl, R₂=NHCH₂CH₃, R₃=NH(CH₂)₄COOH); 达草灭; 4-氯-5-(甲基氨基)-2-[3-(三氟甲基)苯基]-3(2H)-哒嗪酮; 达草灭衍生物; 去甲基-达草灭; 二甲哒草伏; -氯-5-(二甲基氨基)

可用于本文实施例的示例半抗原

[0186]

基)-2-[(3-三氟甲基)苯基]-3(2H)-吡嗪酮; 杀草敏; 氟草敏; 5-氨基-4-氯-2-苯基-3(2H)-吡嗪酮(活性成分); 二氯苯基-吡嗪酮; (结构相关的 s-三嗪)叠氮莠去津(修饰: R1=N₃, R2=NHCH(CH₃)₂, R3=NHCH₂CH₃); 甲草胺 2-氯-2',6'-二乙基-N-甲氧基甲基乙酰苯胺; 单端孢霉烯酮(修饰: R1=H, R2=OH, R3=H R4=O R5=H); DON 衍生物; 乙酰基-T-2; DON 衍生物; T-2 四醇四乙酸酯; 毒死蜱衍生物; 单-脱氯-CP; 溴硫磷衍生物; 甲基溴硫磷; 溴硫磷衍生物; 乙基溴硫磷; 异氯磷; -2-氯-4-硝基苯基 O,O-二甲基硫代磷酸酯; 杀虫威; (Z)-2-氯-1-(2,4,5-三氯苯基)乙烯基二甲基磷酸酯; 绿草定; 3,5,6-三氯-2-吡啶基氧基乙酸; 氨基吡啶酸; 4-氨基-3,5,6-三氯吡啶-2-羧酸; 芒柄花黄素; 鹰嘴豆芽素 A; 5,7-二羟基-4'-甲氧基异黄酮(修饰: 其为染料木黄酮的 4'-甲醚); 雌马酚; (7-羟基-3-(4'-羟基苯基)-色满; 2'甲氧基芒柄花黄素; 黄豆苷元; 7-羟基-3-(4-羟基苯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮; 染料木黄酮; 槲皮素; 3,3',4',5,7-五羟基黄酮; 3,5,7,3',4'-五羟基黄酮; matheucinol; 香豆雌酚; (结构相关的 s-三嗪); 羟基西玛津(修饰: R1=OH, R2=NHCH₂CH₃, R3=NHCH₂CH₃); 狭叶羽扇豆碱; 冰片丹; 1-甲基-4-苯基-4-羧基乙氧基吡啶盐酸盐; 玉米赤霉烯酮; RAL; F-2 毒素; 丁苯吗啉; (RS)-顺-4-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基丙基]-2,6-二甲基吗啉; 十三吗啉; 2,6-二甲基-4-十三烷基吗啉; 2,6-二甲基吗啉; 阿莫罗芬; 苯锈啶; (RS)-1-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基丙基]吡啶; (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R1=Cl, R2=Cl, R3=NHCH₂CH₃); (结构相关的 s-三嗪)修饰: R1=Cl, R2=Cl, R3=NHCH(CH₃)₂; (结构相关的 s-三嗪)修饰: R1=Cl, R2=NHCH₂CH₃, R3=NH(CH₂)₅COOH; (结构相关的 s-三嗪)修饰: R1=Cl, R2=NHCH(CH₃)₂, R3=NHCH₂COOH; (结构相关的 s-三嗪)(修饰: R1=Cl, R2=NHCH(CH₃)₂, R3=NH(CH₂)₅COOH); 结构相关的 s-三嗪; 氟草津酰胺(修饰: R1=Cl, R2=NHCH₂CH₃, R3=NHCCONH₂(CH₃)₂); 羟基氟草津酸(修饰: R1=OH, R2=NHCH₂CH₃, R3=NHCCOOH(CH₃)₂); 去乙基西玛津(修饰: R1=Cl, R2=NH₂, R3=NHCH₂CH₃); 阿苯达唑亚砷; [5-(丙基亚硫酸基)-1H-苯并咪唑-2-基]-甲酯; 阿苯达唑砷; 5(6)-烷基苯并咪唑; 2-氨基-5-(丙硫基)苯并咪唑; 5(6)-烷基苯并咪唑; 2-氨基-5-(丙基磺酰基)苯并咪唑; 奥苯达唑; 5-丙氧基-苯并咪唑-2-甲基氨基甲酸酯; 5(6)-芳基苯并咪唑; 芬苯达唑砷(修饰: 芬苯达唑的砷代谢物); 5(6)-芳基苯并咪唑; 4'-

可用于本文实施例的示例半抗原

[0187]

羟基芬苯达唑；5(6)-芳基苯并咪唑；奥芬达唑(修饰：奥芬达唑是芬苯达唑的亚砷代谢物)；5(6)-芳基苯并咪唑；氟苯达唑；苯并咪唑代谢物；2-氨基苯并咪唑；苯并咪唑代谢物；5-氨基苯并咪唑；苯并咪唑代谢物；2-乙酰苯并咪唑；二苯甲酮；二苯基甲酮；苯基酮；二苯基甲酮；苯甲酰苯；苯甲醛；苯醛；4-溴-2,5-二氯苯酚；乙酰甲胺磷；O,S-二甲基乙酰基硫代磷酰胺酯；甲胺磷；O,S-二甲基硫代磷酰胺酯；敌敌畏；2,2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯；稻丰散；S- α -乙氧基羰基苄基 O,O-二甲基二硫代磷酸酯；EPN；乙基对硝基苯基硫逐苯膦酸酯；生物苄咪菊酯；-苄基-3-咪喃甲基(1R, 3R)-2,2-二甲基-3-(2-甲基丙-1-烯基)环丙烷羧酸酯(修饰：该物质的未溶解的异构体混合物具有 ISO 通用名称苄咪菊酯)；氟虫脲；1-[4-(2-氯- α,α,α -三氟-对甲苯氧基)-2-氟苄基]-3-(2,6-二氟苯甲酰)脲；杀草强；1H-1,2,4-三唑-3-基胺；草达灭；S-乙基氮杂环庚烷-1-硫代羧酸酯；草达灭衍生物(修饰：S-2-羧基乙基六氢氮杂-1-硫代羧酸酯)；草达灭衍生物(修饰：S-5-羧基戊基六氢氮杂-1-硫代羧酸酯)草达灭衍生物(修饰：草达灭砷)；草达灭衍生物(修饰：S-(对氨基苄基)六氢氮杂-1-硫代羧酸酯)；草达灭衍生物(修饰：S-2-(对氨基苄基)乙基六氢氮杂-1-硫代羧酸酯)；六亚甲基亚胺；禾草丹(杀草丹)；苏达灭(莠丹)；EPTC(扑草灭)；草灭特(Ronect)；克草猛(Tillam)；灭草猛(卫农)；黄曲霉毒素 M1；AFM1(修饰：AFM1)；黄曲霉毒素 B1；AFB1(修饰：AFB1)；黄曲霉毒素 G1；AFG1(修饰：AFG1)；黄曲霉毒素 M2；AFM2(修饰：AFM2)；黄曲霉毒素 B2；AFB2(修饰：AFB2)；黄曲霉毒素 G2；AFG2(修饰：AFG2)；黄曲霉毒素 B2 α ；AFB2 α (修饰：AFB2 α)；黄曲霉毒素 G2 α ；AFG2 α (修饰：AFG2 α)；KB-6806；6-氨基-5-氯-1-异丙基-2-(4-甲基-1-哌嗪基)(修饰：R1=NH₂, R2=CH(CH₃)₂, R3=CH₃)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物修饰：R1=NH₂, R2=CH₂CH(CH₃)₂, R3=CH₃；半抗原名为 KB-6806(苯并咪唑)衍生物(修饰：R1=NH₂, R2=CH(CH₂CH₃)₂, R3=CH₃)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物(修饰：R1=NHCOCH₃, R2=CH(CH₃)₂, R3=CH₃)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物(修饰：R1=H, R2=CH(CH₃)₂, R3=CH₃)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物(修饰：R1=NH₂, R2=CH(CH₃)₂, R3=CH₃)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物修饰：R1=NH₂R2=CH(CH₃)₂, R3=N(->O)CH₃(N-OXIDE)；KB-6806(苯并咪唑)衍生物修饰：R1=NH₂, R2=CH(CH₃)₂, R3=H；KB-6806(苯并咪唑)衍生物修饰：R1=NH₂,

可用于本文实施例的示例半抗原

[0188]

R2=CH₂CH₃, R3=CH₃; 氨基对氧磷; 磷酸 O,O-二乙基 O-(4-氨基苯基)酯; 甲基对硫磷; 硫代磷酸 O,O-二甲基 O-(4-硝基苯基)酯; 二乙基苯基磷酸酯; 苯基磷酸 O,O-二乙酯; 磷酸二乙酯; 乙基磷酸 O,O-二乙酯; 对硝基苯磷酸酯; 磷酸 O-(4-硝基苯基)酯; 甲拌磷; 二硫代磷酸 O,O-二乙基 S-[(乙硫基)甲基]酯; 乙硫磷; 双(二硫代磷酸)S,S'-亚甲基 O,O',O',O'-四乙酯; 三硫磷; 二硫代磷酸 O,O-二乙基 S-[[4-氯苯基]硫代]甲基]酯; 乙拌磷; 二硫代磷酸 O,O-二乙基 S-[(2-乙硫基)乙基]酯; TS; N-[4-(羧甲基)-2-噻唑基]磺胺; NS; N-(4-硝基苯基)磺胺; 磺胺二甲噻唑; 磺胺乙酰; DNP-SL; 自旋标记的二硝基苯基(修饰: DNP-SL 的合成已经由 Balakrishnan 等(1982)记载, 分子式可见于 Anglister 等(1984)); β蜕皮激素; 苯并咪唑衍生物; 5(6)-[羧基戊基]硫代]-2-(甲氧基羰基)氨基]-苯并咪唑; 2-羟基联苯; HBP; 莠去津己酸; 溶血磷脂酸(LPA); 1-酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸酯); 小檗碱; 巴马汀; 9-乙酰小檗碱; 延胡索碱; 黄连碱; 小檗红碱; 8-氧代小檗碱; 罂粟碱; 小檗碱衍生物; 9-O-羧甲基小檗碱; 苯环利定; 1-(1-苯基环己基)吡啶; 甲氧滴滴涕; 硫丹衍生物; 4-氧代丁酸; 4-(4,5,6,7,8,8-六氯-3a,4,7,7a-四氢-4,7-桥亚甲基-1H-茛基-1-氧基); 硫丹衍生物; 4-氧基丁酸; 4-(1,3,4,5,6,7,8-八氯-3a,4,7,7a-四氢-4,7-桥亚甲基茛满基-2-氧基); 硫丹衍生物(修饰: 硫丹二醇的半琥珀酸酯); 三唑衍生物; 5-(3-羟基丙基)-3-氨基-2H-1,2,4-三唑; 三唑衍生物; 5-(3-羟基丙基)-3-(2-硝基苯基亚氧硫基)氨基-2H-1,2,4-三唑; 三唑衍生物; 3-氨基-5-[(3-琥珀酰基氧基)丙基]-2H-1,2,4-三唑; 三唑衍生物; 3-氨基-1,2,4-三唑-5-硫醇; 三唑衍生物; 3-[(2-硝基苯基亚氧硫基)氨基-2H-1,2,4-三唑-5-硫醇]; 三唑衍生物; 2H-1,2,4-三唑-5-硫醇; 三唑衍生物; 4-甲基-1,2,4-三唑-3-硫醇; 三唑衍生物; (1,2,4-三唑-2-基)乙酸; 1,2,4-三唑; 4-硝基苯基 4'-羧甲基苯基磷酸酯; 三唑衍生物; 4-氨基-1,2,4-三唑; 三唑衍生物; 3-乙酰胺基-1H-1,2,4-三唑; 三唑衍生物; 3-氨基-1,2,4-三唑-5-羧酸半水合物; 三唑衍生物; 2-(4-氯苯基)-2-(1,2,4-三唑-1-基)-甲基己酸; 琥珀酸; 咪唑; L-组氨酸; L-谷氨酸; 氯菊酯衍生物; 3-苯氧基苄基 2,2-二甲基环丙烷-1,3-二羧酸酯; 3-苯氧基苯甲醛; 氟氯菊酯; 菊酸; 2,4-二硝基苯; DNP; 福美双半抗原; 4-[二硫代氨基甲酸(甲基)-氨基]丁酸二钠; 福美双半抗原; 5,11-二甲基-6,10-二硫代氧-7,9-二硫杂-5,11-二氮杂十二烷酸; 福美双半抗原; 2-[[[(二甲基氨基)硫代羰基]磺酰基]

可用于本文实施例的示例半抗原

[0189]

乙酸;福美双半抗原;4-[[[(二甲基氨基)硫代羰基]磺酰基]丁酸;福美双半抗原;6-[[[(二甲基氨基)硫代羰基]磺酰基]己酸;福美双半抗原;11-[[[(二甲基氨基)硫代羰基]磺酰基]十一烷酸;福美双半抗原;2-[[[(二甲基氨基)硫代羰基]磺酰基]乙酸;福美双;四甲基福美双一硫化物;四乙基福美双二硫化物;二甲基二硫代氨基甲酸钠盐;二甲基二硫代氨基甲酸锌盐;二乙基二硫代氨基甲酸钠盐;N,N,N',N'-四甲基硫脲;代森钠;代森锌;代森锰;乙烯硫脲;毒死蜱半抗原;O,O-二乙基 O-[3,5-二氯-6-[(2-羧乙基)硫代]-2-吡啶基]硫代磷酸酯;2-琥珀酰胺苯并咪唑;2-苯并咪唑氨基甲酸甲酯;MBC;苯并咪唑;2-苯并咪唑基脲;琥珀酰胺;氨基甲酸乙酯;脲;N-甲基脲;N,N'-二甲基脲;短裸甲藻毒素 PbTx-3;有机磷半抗原;O,O-二乙基 O-(5-羧基-2-氟苯基)硫代磷酸酯;乙基毒死蜱;花生四烯乙醇胺半抗原;N-花生四烯基-7-氨基-6-羟基-庚酸;花生四烯乙醇胺;花生四烯酸;二十二碳四烯基乙醇胺;二高- γ -亚麻烯基乙醇胺;2-花生四烯基甘油;2-花生四烯基甘油醚;硬脂酰乙醇胺;十七烷酰乙醇胺;前列腺素 E1;3-羟基-2-(3-羟基-1-辛烯基)-5-氧代环戊烷庚酸;前列地尔;PGE1;前列腺素 D2;PGD2;前列腺素 A2;PGA2;前列腺素 B2;PGB2;前列腺素 F2 α ;7-[3,5-二羟基-2-(3-羟基-1-辛烯基)环戊基]-5-庚烯酸;地诺前列素;PGF2 α ;前列腺素 F1 α ;PGF1 α ;6-酮-前列腺素 F1 α ;6-酮-PGF1 α ;13,14-二氢-15-酮-前列腺素 E2;13,14-二氢-15-酮-PGE2;13,14-二氢-15-酮-前列腺素 F2 α ;14-二氢-15-酮-PGF2 α ;5 α ,7 α -二羟基-11-ketotetranorpostanc-1,16-二酸;15-酮-PGF2 α ;TXB2;前列腺素 E2;7-[3-羟基-2-(3-羟基-1-辛烯基)-5-氧代环戊基]-5-庚烯酸;地诺前列酮;PGE2;hCG- α -(59-92)-肽(34个残基);百草枯衍生物;百草枯己酸酯(PQ-h);Monoquat;敌草快;9,10-二氢-8a,10a-二氮鎓菲;MPTP;1-甲基-4-苯基-1,2,5,6-四氢吡啶;1,2-茶醌;N-乙酰基-S-(1,2-二羟基-4-萘基)半胱氨酸;N-乙酰基-S-(1,4-二羟基-2-萘基)半胱氨酸;N-乙酰基-S-(1,2-二羟基-1-羟基-1-萘基)半胱氨酸;2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺(CDA)半抗原;2-[2-氯-(2'-6'-二乙基)乙酰苯胺]乙酸;2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺(CDA)半抗原;2-[2-氯-(2'-6'-二乙基)乙酰苯胺]丁酸;2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺(CDA)半抗原;5-(4-氯乙酰氨基-3,5-二乙基)苯氧基戊酸;CDA;2-氯-2',6'-二乙基乙酰苯胺;HDA;2-羟基-2',6'-二乙基乙酰苯胺;2,6-二乙基-苯胺;羟基甲草胺;甲草胺 ESA;甲草胺乙磺酸;异

可用于本文实施例的示例半抗原

丙隆半抗原; 3-(4-异丙基苯基)-1-羧基丙基-1-甲基脘; 绿麦隆; 3-(3-氯-对甲苯基)-1,1-二甲基脘; 甲氧隆; 3-(3-氯-4-甲氧基苯基)-1,1-二甲基脘; 苯嗪草酮; 4-氨基-4,5-二氢-3-甲基-6-苯基-1,2,4-三嗪-5-酮; 2 甲 4 氯丙酸; (RS)-2-(4-氯-邻甲苯基氧基)丙酸; 拿草特; 3,5-二氯-N-(1,1-二甲基丙炔基)苯甲酰胺; 二氯百草枯; MCPB; 4-(4-氯-邻甲苯基氧基)丁酸; 绿麦隆半抗原; N-(3-氯-4-甲基苯基)-N-甲基-N-羧基丙基脘; 甲磺隆; 甲基 2-[3-(4-甲氧基-6-甲基-1,3,5-三嗪-2-基)脘基磺酰]苯甲酸酯; 卡托普利半抗原; 卡托普利-4-(马来酰亚胺基甲基)-环己烷羧酸(MCC); 卡托普利半抗原; 卡托普利二硫化物修饰; 巯基乙醇-MCC; 巯基乙醇-4-(马来酰亚胺基甲基)-环己烷羧酸修饰; 卡托普利半抗原; 无 MCC 的卡托普利; Aculeatiside A; Aculeatiside B; 边缘茄碱; 澳洲茄碱; 龙葵碱-S; purapurine; 澳洲茄次碱; Khasianine; 番茄碱糖苷; 番茄素; 番茄碱; 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-澳洲茄次碱; O-α-L-鼠李糖基-1(1->2)-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-澳洲茄次碱; 3-O-β-D-吡喃半乳糖基-澳洲茄次碱; O-β-D-吡喃葡萄糖基-1(1->3)-3-O-β-D-吡喃半乳糖基-澳洲茄次碱; 12-羟基边缘茄碱; 12-羟基澳洲茄碱; Isoanguivine; 野烟叶苷 I; 野烟叶苷 II; 木糖基-β-边缘茄碱; α-龙葵碱; α-查茄碱; Dioscine; 吡啶衍生物; β-吡啶乙酸; 2-溴-4,6-二硝基苯胺; 2-氯-4,6-二硝基苯胺; 三硝基苯甲胺; 2,4,6-三硝基苯基-n-甲基胺; 胺; 特屈儿; tetril; 2-氨基-4,6-二硝基甲苯; 2,4-二硝基苯胺; 3,5-二硝基苯胺; 2-氨基-4,6-二硝基苯甲酸; 分散蓝 79; N-[5-[双[2-(乙酰基氧基)乙基]氨基]-2-[(2-溴-4,6-二硝基苯基)偶氮]-4-乙氧基苯基]乙酰胺; 1,3-二硝基苯; 2,6-二硝基甲苯; 4-氨基-2,6-二硝基甲苯; 1,3,5-三硝基苯; 尼麦角林; 乙基吗啡; 8-二脱氢-4,5-环氧-3-乙氧基-17-甲基吗啡喃-6-醇; 二氢吗啡; 二氢可待因; 二氢吗啡酮; 氢吗啡酮; 二氢可待因酮; 氢可酮; 纳曲酮; N-环丙基甲基-14-羟基二氢吗啡酮; 右美沙芬; (±)-3-甲氧基-17-甲基吗啡喃; 后马托品; 内啡肽修饰衍生物类型: b-内啡肽; 甲硫氨酸-脑啡肽; DALEA; D-Ala(2)-D-Leu(5)-脑啡肽酰胺; 长春新碱; 22-氧代长春碱; 醛基长春碱; VCR; LCR; OCT; 22-奥沙骨化三醇; OCT-3-HG; 22-奥沙骨化三醇-3-半戊二酸酯; 24(OH)OCT; 24(OH)-22-奥沙骨化三醇; 1,20(OH)₂-hexanor-D3; 辛弗林; 肾上腺素; 4-[(1R)-1-羟基-2-(甲基氨基)乙基]-1,2-苯二酚; 苯肾上腺素; 多巴胺衍生物; 6-羟基多巴胺; 酪胺衍生物; 3-甲氧基

[0190]

可用于本文实施例的示例半抗原

酪胺; 苯乙基胺; 苯乙胺; PEA; 间酪胺; 邻酪胺; 二甲氧基苯乙基胺; 胸苷乙二醇单磷酸酯; 5,6-二羟基胸苷单磷酸酯; 胸苷单磷酸酯; 胸苷乙二醇; 胸腺嘧啶乙二醇; 5,6-二氢胸苷; 胸苷; 胸腺嘧啶; 5-甲基尿嘧啶; 2,4-二羟基-5-甲基嘧啶; AMP; 一磷酸腺苷; CMP; 一磷酸胞苷; 卡马西平; 5-氨基甲酰-5H-二苯并[b,f]氮杂 ; 新蝶呤异构体; D-赤式-新蝶呤; 新蝶呤异构体; L-赤式-新蝶呤; 新蝶呤异构体; D-苏式-新蝶呤; 生物蝶呤异构体; L-赤式-生物蝶呤; 生物蝶呤异构体; D-赤式-生物蝶呤; 生物蝶呤异构体; L-苏式-生物蝶呤; 生物蝶呤异构体; D-苏式-生物蝶呤; 蝶呤-6-羧酸; C₇H₅NiO₃; 蝶呤; 血栓素 B₂; (5Z,9α,13E,15S)-9,11,15-三羟基血栓素-5,13-二烯-1-酸; 15 酮前列腺素 F_{2α}; 伏马菌素 B₁; 付马毒素 B₁; FB₁; 促甲状腺素释放素; TRH; 促甲状腺激素释放因子; 促甲状腺激素释放激素; TRF; 普罗瑞林; 促甲状腺激素释放激素; 促甲状腺素释放素-OH; TRH-OH; 二酮哌嗪; 环(H-P); TRH 类似物; 甲基化 TRH; TRH 类似物; TRH 延长肽; TRH-Gly; TRH 延长肽; TRH-Gly-Lys-Arg; TRH 延长肽; TRH-Gly-Lys-Arg-Ala; TRH 延长肽; P7(修饰: Q-H-P-G-L-R-F); TRH 延长肽; P10(修饰: S-L-R-Q-H-P-G-L-R-F); TRH 延长肽; Ps5 修饰: pro-TRH[178-199]; TRH 延长肽; TRH-Ps5 (修饰: pro-TRH[172-199]); 下丘脑肽; LHRH; 微囊藻毒素-LA (Cyanoginosin-LA); 微囊藻毒素-LB; 微囊藻毒素-LR; 微囊藻毒素-LY; 微囊藻毒素-AY; 微囊藻毒素-FR; 微囊藻毒素-YR; 含 Ne-乙酰赖氨酸的肽; Gly-Lys(Ac)-ε-氨基己酸(Aca)-Cys; 苯甲酸; 苯羧酸; 苯蚁酸; 苯甲酸; 间羟基苯甲酸; 3-羟基苯甲酸; 邻甲氧基苯甲酸; 2-甲氧基苯甲酸; 邻甲基苯甲酸; 2-甲基苯甲酸; 邻氯苯甲酸; 2-氯苯甲酸; 邻氨基苯甲酸; 2-氨基苯甲酸; 硫代水杨酸; 2-巯基苯甲酸; 邻巯基苯甲酸; 水杨酰胺; 2-羟基苯甲酰胺; 水杨苷; 水杨醇; 邻羟基苯甲醇; 水杨醇; 2-氨基苯酚; 2-羟基苯乙酸; 对羟基苯甲酸; 对氨基苯甲酸; 4-氨基苯甲酸; 维生素 B_x; 细菌维生素 H₁; 对甲基苯甲酸; 对甲基氨基苯甲酸; 对氯水杨酸; 4-氯-2-羟基苯甲酸; 2,4-二羟基苯甲酸; β-二羟基苯甲酸; 2,4-二羟基苯羧酸; BRA; 4-氨基水杨酸; 4-氨基-2-羟基苯甲酸; 对氨基水杨酸; 龙胆酸; 2,5-二羟基苯甲酸; 5-羟基水杨酸; 吡啶甲酸; 邻吡啶羧酸; 2-吡啶羧酸; 吡啶甲酸 N-氧化物; 3-羟基吡啶甲酸; 2-羟基烟酸; 7-甲基鸟嘌呤; N²-羧甲基-N⁷-甲基鸟嘌呤; 2-(7-甲基-6-氧代-6,7-二氢-1H-嘌

[0191]

可用于本文实施例的示例半抗原

[0192]

呤-2-基氨基)乙酸; 7-甲基黄嘌呤; 7-甲基尿酸; 7-甲基腺嘌呤; 鸟嘌呤; 2-氨基-1,7-二氢-6H-嘌呤-6-酮; 2-氨基次黄嘌呤; 腺嘌呤; 6-氨基嘌呤; 6-氨基-1H-嘌呤; 6-氨基-3H-嘌呤; 6-氨基-9H-嘌呤; 7-(2-羧乙基)鸟嘌呤; 7-CEGua; 7-乙基鸟嘌呤; 2-氨基-7-乙基-1H-嘌呤-6(7H)-酮; 7-(2,3-二羟基丙基)鸟嘌呤; 2-氨基-7-(2,3-二羟基丙基)-1H-嘌呤-6(7H)-酮; 7-(2-羟乙基)鸟嘌呤; 2-氨基-7-(2-羟乙基)-1H-嘌呤-6(7H)-酮; 7-(2-[(2-羟乙基)氨基]乙基)-鸟嘌呤; 2-氨基-7-(2-(2-羟乙基氨基)乙基)-1H-嘌呤-6(7H)-酮; 7-羧甲基鸟嘌呤; 2-(2-氨基-6-氧代-1,6-二氢嘌呤-7-基)乙酸; 荧光素; 漆酚; 靛; 生物素; His 标签; FLAG 标签; Strep 标签; Myc 标签; HA 标签; Spot 标签; 或 NE 标签或其任何组合。

[0193] 在一些实施方式中,所述半抗原包括荧光素或其衍生物。

[0194] 在一些实施方式中,所述半抗原包括DNP或其衍生物。

[0195] 在根据本说明书阅读时,“靶标部分”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如分子或化学物质作为另一所需的化学物质或蛋白的结合靶标上的特定基团或位点。在本文所述的一些替代方式中,所述靶标部分为半抗原。表1列出了可用于本文提供的实施方式的示例半抗原。在一些替代方式中,所述CAR包括抗体或其一部分,例如一个或多个结合结构域,或包括一个或多个CDR。可用于本文提供的实施方式的抗体或其抗原结合部分的非限制性示例包括针对表1中列出的半抗原的抗体和表2中列出的抗体。

[0196] 表2

可用于本文的实施例的示例抗体

[0197]

抗 3-甲基吡啶抗体; 3F12; 抗 3-甲基吡啶抗体; 4A1G; 抗 3-甲基吡啶抗体; 8F2; 抗 3-甲基吡啶抗体; 8H1; 抗 3-甲基吡啶抗体; 抗伏马菌素 B1 抗体; 抗 1,2-萘醌抗体; 抗 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体; 抗 (2-(2,4-二氯苯基)-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丙醇) 抗体 (抗-DTP 抗体); 抗 22-奥沙骨化三醇抗体 (As-1; 2 和 3); 抗 (24,25(OH)₂D3) 抗体 (Ab11); 抗 (24,25(OH)₂D3) 抗体 (Ab3); 抗 (24,25(OH)₂D3) 抗体 (Ab3-4); 抗 2,4,5-三氯苯氧乙酸抗体; 抗 (2,4,5-三氯苯氧乙酸) 抗体; 抗 (2,4,6-三氯酚) 抗体; 抗 (2,4,6-三氯酚) 抗体; 抗 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT) 抗体; 抗 2,4-二氯苯氧乙酸 (单克隆抗体 B5/C3; E2/B5; E2/G2; F6/C10 和 F6/E5); 抗 (2,4-二氯苯氧乙酸) 抗体; 抗 2-羟基联苯抗体; 抗 (3,5,6-三氯-2-吡啶醇) 抗体 (LIB-MC2;

可用于本文的实施例的示例抗体

[0198]

LIB-MC3)；抗(3,5,6-三氯-2-吡啶醇)抗体(LIB-MC2 单克隆抗体)；抗3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-AcDON)抗体；抗3-苯氧基苯甲酸(3-PBAc)抗体；抗4-硝基苯酚抗体；抗4-硝基苯基-4'-羧甲基苯基磷酸酯抗体；抗7-(羧乙基)鸟嘌呤(7-CEGua)抗体(7-MEGua 组特异性)；抗7-甲基鸟嘌呤(7-MEGua)抗体；抗ABA抗体；抗乙酰甲胺磷抗体(抗血清 8377)；抗乙酰赖氨酸抗体(单克隆抗体 AL3D5；AL11；AKL3H6；AKL5C1)；抗Aculetiside-A抗体；抗黄曲霉毒素 M1 (AFM1)抗体(单克隆抗体 A1；N12；R16；FF32)；抗脱碳木脂素抗体；抗脱碳木脂素抗体；抗氨基氯(Amidochlor)抗体；抗杀草强抗体(抗1a-BSA抗体)；抗氨基青霉素抗体(AMPI I 1D1 和 AMPI II 3B5)；抗-花生四烯乙醇胺抗体(9C11.C9C；30G8.E6C；7D2.E2b；13C2 MAb)；抗阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体；抗阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体；抗-阿特拉津抗体(4063-21-1MAb 细胞系 mAb 和 scAbs)；抗-阿特拉津抗体(4D8 和 6C8 scAb)；抗阿特拉津抗体(C193)；抗阿特拉津抗体(兔/绵羊)；抗阿特拉津抗体(K4E7)；抗阿特拉津抗体(MAb: AM7B2.1)；抗阿特拉津抗体(ScAb)；抗阿特拉津硫醚氨酸抗体；抗(保棉磷)抗体(MAB LIB-MFH14；LIB-MFH110)；抗苯霜灵抗体；抗苯并咪唑羧酸；抗苯并咪唑抗体(Ab 587)；抗-苯并[a]芘抗体；抗苯并(a)芘抗体(10C10 和 4D5 MAb)；抗-(苯甲酰苯基脲)-抗体(主要针对除虫脲)；抗-小檗碱抗体；抗-β 吲哚乙酸抗体；抗-生物蝶呤(L-赤式型)抗体；抗-短裸甲藻毒素 PbTx-3-抗体；抗除草定抗体；抗-溴硫磷抗体；抗-溴硫磷乙基抗体；抗丁草胺抗体；抗-卡托普利-MCC 抗体；抗-卡马西平(CBZ)-抗体；抗西维因抗体；抗西维因抗体(LIB-CNH32；LIB-CNH33；LIB-CNH36；LIB-CNH37；LIB-CNH45；LIB-CNA38)；抗-西维因抗体(LIB/CNH-3.6MAb)；抗咪喃丹抗体(LIB-BFNB-52；LIB-BFNB-62；LIB-BFNB-67)；抗咪喃丹抗体(LIB-BFNP21)；抗-CDA-抗体；抗-CDA-抗体(抗-2-[2-氯-(2'-6'-二乙基)乙酰苯胺]丁酸)；抗-CDA-抗体(抗-2-[2-氯-(2'-6'-二乙基)乙酰苯胺]乙酸)；抗-CDA-抗体(抗-5-(4-氯乙酰氨基-3,5-二乙基)苯氧戊酸)；抗-头孢他啶抗体；抗-(氯二氨基-s-三嗪)抗体(抗 CAAT) (PAb1-8) 抗百菌清抗体；抗-毒死蜱抗体；抗-毒死蜱抗体；抗-毒死蜱抗体(LIB-AR1.1；LIB-AR1.4 MAb)；抗-毒死蜱抗体(LIB-C4)；抗(毒死蜱)抗体(LIB-C4 MAb)；抗-毒死蜱抗体

可用于本文的实施例的示例抗体

(LIB-PN1Mab); 抗-毒死蜱抗体(LIB-PN2 Mab); 抗-毒死蜱抗体(LIB-PO Mab); 抗-绿磺隆抗体; 抗-绿磺隆抗体; 抗绿麦隆抗体(抗血清); 抗-Cyanoginosin-LA 抗体(mAb 2B2-2; 2B2-7; 2B2-8; 2B2-9; 2B2-10; 2B5-5; 2B5-8; 2B5-14; 2B5-15; 2B5-23); 抗(D-3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇)抗体; 抗-DDA 抗体; 抗 DDT 抗体(PAb 和 MAb); 抗-DDT Mab(LIB1-11; LIB5-21; LIB5-25; LIB5-28; LIB5-212; LIB5-51; LIB5-52; LIB5-53); 抗-DEC 抗体(抗乙胺嗪抗体); 抗 DEHA 抗体; 抗-(Delor 103)抗体; 抗-溴氰菊酯抗体; 抗溴氰菊酯抗体(Del 01 至 Del 12MAb 和 PAb); 抗-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)抗体; 抗-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)抗体; 抗地塞米松抗体; 抗地塞米松抗体; 抗-二硝基苯基(DNP)-抗体; 抗二硝基苯基自旋标记抗体(AN01-AN12); 抗敌草隆抗体(MAb: 21; 60; 195; 202; 275; 481; 488; 520); 抗-D-MHPG 抗体; 抗 DNC 抗体; 抗-EB1089 抗体; 抗-蜕皮激素抗体; 抗-硫丹抗体; 抗-硫丹抗体; 抗高氰戊菊酯抗体(Ab7588); 抗雌二醇抗体; 抗-杀螟硫磷抗体(pAb 和 mAb); 抗-丁苯吗啉抗体; 抗倍硫磷抗体; 抗-倍硫磷抗体; 抗 FITC 抗体(B13-DEI); 抗-Flucofuron 抗体(F2A8/1/A4B3); 抗-氟虫脲抗体; 以及抗-(苯甲酰苯基脲)-抗体; 抗-芒柄花素抗体; 抗-咪塞米抗体(Furo-26; Furo37; Furo-72; Furo73 Mab); 抗-GR151004 抗体; 抗-hCG- α -肽抗体(FA36; 抗羟基阿特拉津抗体(HYB-283-2); 抗-羟基西玛津抗体; 抗抑霉唑抗体 MoAb(9C1-1-1; 9C5-1-1; 9C6-1-1; 9C8-1-1; 9C9-1-1; 9C12-1-1; 9C14-1-1; 9C16-1-1; 9C18-1-1; 9C19-1-1; 9E1-1; 9G2-1); 抗 Irgarol 抗体; 抗异戊烯腺苷抗体; 抗异丙隆抗体; 抗-KB-6806 抗血清; 抗-(+)白羽扇豆碱抗体; 抗溶血磷脂酸(LPA); 抗 M3G Ab1 和 Ab2; 抗 M3G Ab1 和 Ab2; 抗-MBC 抗体(抗-2-琥珀酰氨基苯并咪唑抗血清); 抗变肾上腺素抗体; 抗(+)甲基苯丙胺抗体; 抗-甲硫威抗体(LIB-MXNB31; LIB-MXNB-33; LIB-MXNH14 和 LIB-MXNH-15MAb); 抗异丙甲草胺抗体; 抗-异丙甲草胺抗体; 抗-异丙甲草胺抗体(MAb 4082-25-4); 抗草达灭抗体; 抗灭草隆抗体; 抗-吗啡-3-葡萄糖苷酸(E3scFv 抗体); 抗吗啡抗体; 抗-吗啡抗体; 抗-吗啡抗体(mAb 8.2.1; 33.2.9; 35.4.12; 39.3.9; 44.4.1; 76.7F.16; 83.3.10; 115.1.3; 124.2.2; 131.5.13; 158.1.3; 180.2.4); 抗-新蝶呤(D-赤式型)抗体; 抗-尼卡巴嗪抗体(Nic 6; Nic 7; Nic 8 和 Nic9); 抗尼麦角林抗体(Nic-1; Nic-2; Nic-3 和 BNA-1; BNA-3); 抗-达草灭抗体;

[0199]

可用于本文的实施例的示例抗体

[0200]

抗去甲变肾上腺素抗体；抗(邻-DNCP)抗体；抗-P10 抗体(TRH 延长肽)；抗-对氧磷抗体(BD1 和 CE3)；抗百草枯抗体；抗-百草枯抗体；抗甲基对硫磷抗体；抗 PCB 抗体(针对 3,3',4,4'-四氯联苯)MAb S2B1；抗五氯苯酚抗体；抗五氯苯酚抗体；抗-五氯苯酚抗体；抗氯菊酯抗体(Mab Py-1；Py-3 和 Py-4)；抗-苯环利定抗体(Mab 6B5 Fab)；抗-苯巴比妥抗体；抗-苯巴比妥抗体；抗-(p,p'-DDT)- 抗体 (LIB-DDT-35 和 LIB-DDT5-52)；抗氯菊酯抗体(Ab549)；抗残杀威抗体(LIB-PRNP15；LIB-PRNP21；LIB-PRNB21；LIB-PRNB33)；抗-前列腺素 E2-抗体；抗-对酪胺抗体；抗茈抗体；抗倒千里光裂碱抗体；抗-倒千里光裂碱抗体；抗水杨酸酯抗体；抗番泻苷 A 抗体(MAb 6G8)；抗番泻苷 B 抗体(MAb: 7H12；5G6；5C7)；抗 Simizine 抗体；抗磺胺抗体(抗-TS)；抗-Sulocfuron 抗体(S2B5/1/C3)；抗磺胺二甲嘧啶抗体(21C7)；抗-辛弗林抗体；抗-噻苯咪唑抗体(抗体 300)；抗-噻苯咪唑抗体(抗体 430 和 448)；抗-福美双-抗体；抗-THP 抗体(7S 和 19S)；抗-血栓素 B2 抗体；抗-胸苷乙二醇一磷酸酯抗体(mAb 2.6F.6B.6C)；抗-促甲状腺素释放素(TRH)抗体；抗 TNT 抗体(AB1 和 AB2 抗血清)；抗三唑酮抗体；抗-三嗪抗体(AM1B5.1)；抗-三嗪抗体(AM5C5.3)；抗三嗪抗体(AM5D1.2)；抗-三嗪抗体(AM7B2.1)；抗-三嗪抗体(SA5A1.1)；抗-三嗪血清(抗-莠灭净)；抗-三嗪血清(抗-阿特拉津)；抗-三嗪血清(抗-西玛津)；抗-三嗪血清(抗-西草净)；抗氟乐灵抗体；抗氟乐灵抗体；抗长春新碱抗体；抗-玉米赤霉烯酮抗体；抗玉米素核苷抗体；E2G2 和 E4 C2；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；LIB-BFNP23Mab；MAb H-7 和 H-9(针对 O,O-二乙基 OP 农药)；MoAb 33A7-1-1；MoAb33B8-1-1；MoAb 33C3-1-1；MoAb 3C10-1-1 和 MoAb 3E17-1-1；MoAb45D6-5-1；MoAb 45E6-1-1；MoAb 45-1-1；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlnL89Glu)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlnL89Glu/ValH37Ile/GluL3Val)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体 (GlnL89Glu/ValH37Ile/GluL3Val)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlnL89Glu/ValH37Ile)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlnL89Glu/ValH37Ile)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b)；衍生自 MAb

可用于本文的实施例的示例抗体

[0201]

K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GluH50Gln) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GluH50X)(具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlyH100aAla) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(GlyH100aSer) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(HisH95Phe) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(HisH95Tyr) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(PheL32Leu) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(TrpH33Phe,Tyr,Leu) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(TryI96Phe) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(TryI96Phe) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(ValH37Ile) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); 衍生自 MAb K4E7 的 Fab 片段 K411B 中的突变体(ValH37Ile) (具有 k 轻链的同种型 IgG2b); P6A7MAb; PNAS2 6/3 56(1)-1-5-1; PNAS26/3 56(1)-1-5-2; PNAS2 6/356(1)-1-10-4;PNAS2 6/3 56(1)-1-10-5 和 PNAS2 6/3 56(1)-3-1-5;Alexa Fluor 405/Cascade Blue 染料抗体; Alexa Fluor 488 染料抗体; BODIPYFL 染料抗体; 丹磺酰基抗体; 荧光素/俄勒冈绿染料抗体; 荧光黄染料抗体; 四甲基罗丹明和罗丹明红染料抗体; 德克萨斯红和德克萨斯红-X 染料抗体; 生物素抗体; 二硝基苯基抗体或硝基酪氨酸抗体或来自上述抗体的任何结合片段或 CDR 或上述抗体、其结合片段或其 CDR 结构域的任何组合。

[0202] 本文所述的“标记序列”编码用于选择或追踪蛋白或具有目的蛋白的细胞。在本文所述的替代方式中,所提供的融合蛋白可包括可在实验(如流式细胞术)中选择的标记序列。在一些替代方式中,标记为蛋白质Her2tG、CD19t或EGFRt。

[0203] 如本文所述的“ScFv”是由10至25个氨基酸或约25个氨基酸的短连接肽连接的免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。在一些替代方式中,提供了CAR,其中,所述CAR包括对细胞表面肿瘤分子或细胞上呈递的半抗原具有特异性的ScFv。

[0204] 本文所述的“核糖体跳跃序列”是指在翻译过程中迫使核糖体“跳跃”核糖体跳跃序列并翻译核糖体跳跃序列后的区域而不形成肽键的序列。例如,几种病毒具有核糖体跳跃序列,所述跳跃序列能够在单个核酸上顺序翻译几种蛋白质,而不需要通过肽键连接蛋白质。如本文所述,这是“连接”序列。在本文提供的核酸的一些替代方式中,所述核酸在嵌合抗原受体序列和标记蛋白序列之间的包括核糖体跳跃序列,使得蛋白共表达,并不通过

肽键连接。在一些替代方式中,所述核糖体跳跃序列为P2A、T2A、E2A或F2A序列。在一些替代方式中,核糖体跳跃序列为T2A序列。在一些替代方式中,在两个嵌合抗原受体之间存在核糖体跳跃序列,在一个嵌合抗原受体和标记物之间存在第二核糖体跳过序列。

[0205] 在根据本说明书阅读时,“生物素”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于水溶性维生素B。在本文的替代方式中,所述半抗原为生物素。

[0206] 在根据本说明书阅读时,“荧光素”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如可溶于水和醇的合成有机化合物。它被广泛用作许多应用的荧光示踪剂。在本文的一些替代方式中,所述荧光素是由嵌合抗原受体识别和结合的脂质上的靶标部分。在一些替代方式中,所述半抗原为荧光素或其衍生物。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂,如磷脂醚。

[0207] 在根据本说明书阅读时,如本文所述的2,4-二硝基苯酚具有明确和通常的含义,2,4-二硝基苯酚(2,4-DNP或简称DNP)是一种有机化合物,分子式为 $\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ 。DNP用作防腐剂、非选择性生物蓄积农药、除草剂等。DNP是硫染料、木材防腐剂和苦味酸的生产过程中的化学中间体。在本文的一些替代方式中,DNP是由嵌合抗原受体识别和结合的脂质上的靶标部分。在一些替代方式中,所述半抗原为DNP或其衍生物。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂,如磷脂醚。

[0208] 在根据本说明书阅读时,如本文所述的“脂质”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如包括碳链、脂肪酸或脂肪酸衍生物的一类有机化合物,所述有机化合物通常不溶于水,但可溶于或混于疏水和/或有机溶剂。在没有特殊限定的情况下,所述脂质可以包括脂肪、蜡、脂溶性维生素、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、鞘脂、脑苷脂、神经酰胺或磷脂。如本文所述,所述脂质可以具有极性头部基团和疏水部分或疏水基团的两亲脂质。在根据本说明书阅读时,“疏水基团”或疏水部分具有明确和通常的含义,并且可以包括但不限于例如与大量水排斥且倾向于非极性的分子或分子的一部分。其可以包括烷烃、油或脂肪。在没有特殊限定的情况下,所述脂质可以为甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、固醇脂质、异戊烯醇脂质、糖脂或聚酮。

[0209] 在一些替代方式中,所述脂质可以为鞘脂。所述鞘脂可以包括鞘氨基醇碱的骨架,例如包括鞘氨醇的一组脂族氨基醇。具有仅由氢原子组成的R基团的鞘脂为神经酰胺。其它常见的R基团包括产生鞘磷脂的磷酸胆碱和分别产生脑苷脂和球苷脂的各种糖单体或二聚体。脑苷脂和红细胞糖苷脂统称为糖鞘脂。在一些替代方式中,所述脂质为糖鞘脂。

[0210] 如本文所述,脂质包括极性头部基团和疏水基团。在一些替代方式中,所述疏水基团包括脂肪酸,例如脂肪链。在一些替代方式中,所述脂肪酸为饱和或不饱和的。在一些替代方式中,所述疏水基团包括烷基、烯基或炔基。在一些替代方式中,所述疏水基团包括萜类脂质,如类固醇或胆固醇。在一些替代方式中,所述疏水基团包括醚键,其中所述醚键位于极性头部基团和脂肪链之间。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂醚。在一些替代方式中,所述极性头部包括胆碱、磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷酸乙醇胺基团、寡糖残基、糖残基,磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇。在一些替代方式中,所述糖基为甘油。

[0211] 在一些替代方式中,所述脂质为单链烷基磷脂。

[0212] 在一些替代方式中,所述脂质包括合成烷基磷脂的结构,如依地福新、哌立福新或芥酸磷酸胆碱。在一些替代方式中,所述脂质为溶血磷脂酰胆碱、依地福新、芥酸磷酸胆碱、D-21805或哌立福新。例如,van der Lui等人(“A new class of anticancer

alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells”Mol Cancer Ther 2007;6(8),2007;以引用的方式全部并入)描述了此类脂质。在本文所述脂质的一些替代方式中,所述极性头部基团内的胆碱可被哌啶部分取代。在一些替代方式中,所述脂质为抗癌烷基磷脂。van der Lui等人(“A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells”Mol Cancer Ther 2007;6(8),2007;以引用的方式全部并入)描述了抗癌磷脂。

[0213] 在一些替代方式中,本文提供的脂质为合成的与细胞膜相互作用的结构相关的抗肿瘤剂。这些类型的合成脂质为烷基磷脂,如van Blitterswijk等人所述(“Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids”Biochimica et Biophysica Acta 1831(2013)663-674;以引用的方式全部并入)。在没有特殊限定的情况下,所述合成的烷基磷脂可以包括依地福新、米替福新、哌立福新、芥酸磷酸胆碱和/或Erufosine。在一些替代方式中,所述脂质为依地福新、米替福新、哌立福新、芥酸磷酸胆碱或Erufosine。在一些替代方式中,所述脂质为溶血磷脂酰胆碱的稳定类似物。在一些替代方式中,所述脂质为依地福新的硫醚变体或1-十六烷基硫代-2-甲氧基甲基-外消旋-甘油-3-磷酸胆碱。在一些替代方式中,所述脂质为LysoPC、依地福新、伊莫福新、米替福新、哌立福新、芥酸磷酸胆碱或Erufosine。

[0214] 在根据本说明书阅读时,如本文所用“极性头部基团”具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如脂质(如磷脂)的亲水基团。在根据本说明书阅读时,“磷脂”具有明确和通常的含义,可包括但不限于例如由于其两亲性特征,可形成脂质双层的特定类脂质。磷脂分子包括至少一个疏水性脂肪酸“尾”和亲水性“头”或“极性头部基团”。在本文的替代方式中,所述磷脂或磷脂醚包括极性头基。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括磷酸胆碱、哌啶部分或三甲基肼-乙基-磷酸酯部分。在一些替代方式中,所述脂质包括靶标部分,并且CAR通过与所述靶标部分的相互作用与所述脂质结合。在一些替代方式中,所述脂质包括极性头部基团(例如,包括芳香环)和碳烷基链。在本文的一些替代方式提供了一种包括脂质的复合物。在一些替代方式中,所述脂质包括所述极性头部基团。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂醚。在一些替代方式中,所述磷脂醚包括极性头部基团和碳烷基链。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括胆碱、磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷酸乙醇胺基团、寡糖残基、糖残基,磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括磷酸胆碱、哌啶部分或三甲基肼-乙基-磷酸酯部分。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂醚。在一些替代方式中,所述糖基为甘油。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括糖基。在一些替代方式中,所述脂质包括含有头部基团的甘露糖。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括鞘氨醇。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括葡萄糖。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括二糖、三糖或四糖。在一些替代方式中,所述脂质为葡萄糖基神经酰胺。在一些替代方式中,所述脂质为一种乳糖基神经酰胺。在一些替代方式中,所述脂质为糖脂。在一些替代方式中,所述糖脂包括糖单体,如n-葡萄糖、n-半乳糖或N-乙酰-n-氨基半乳糖。

[0215] 在一些替代方式中,所述脂质包括烃环,如固醇。

[0216] 在一些替代方式中,所述脂质的极性头部基团包括甘油。在一些替代方式中,所述脂质的极性头部基团包括磷酸基团。在一些替代方式中,所述脂质的极性头部基团包括胆

碱。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂酰乙醇胺。在一些替代方式中,所述脂质为磷脂酰肌醇。在一些替代方式中,所述脂质包括鞘氨醇碱骨架。在一些替代方式中,所述脂质包括固醇脂质,如胆固醇或其衍生物。在一些替代方式中,所述脂质包括糖脂。在一些替代方式中,所述极性头部基团包括胆碱、磷酸酯或甘油。

[0217] 在一些替代方式中,所述脂质为糖脂。在一些替代方式中,所述脂质包括糖基。在一些替代方式中,所述脂质来源于鞘氨醇。在一些替代方式中,所述脂质为甘油糖脂或鞘脂糖脂。

[0218] 在一些替代方式中,所述脂质为具有疏水性支链的醚脂质。

[0219] 在根据说明书阅读时,如本文所用“磷脂醚”具有明确和通常的含义,可包括但不限于例如所述极性头基上的一个或多个碳原子通过醚键(而不是更常见的酯键)与烷基链结合的脂质。在一些替代方式中,所述极性头部基团为甘油。

[0220] 如本文所用,“抗体”有明确和通常的含义,根据说明书,可以指由浆细胞产生的大Y形蛋白质,免疫系统使用所述大Y形蛋白质来识别和中和外来物(如细菌和病毒)。所述抗体蛋白可包括四条多肽链;通过二硫键连接两条相同的重链和两条的相同的轻链。每条链由结构域(免疫球蛋白结构域)组成。所述结构域可以包括70-110个氨基酸,并根据所述结构域的大小和功能分为不同类别。在一些替代方式中,CDR结构域位于抗体区域内,Kabat编号如下:对于轻链:氨基酸24-34处的CDRL1;氨基酸50-56处的CDRL2;氨基酸89-97处的CDRL3;对于重链:氨基酸31-35处的CDRH1;氨基酸50-65处的CDRH2;和氨基酸95-102处的CDRH3。抗体中的CDR结构域可以很容易地确定。

[0221] 可与靶标部分结合的抗体或其结合片段的示例包括单克隆抗体、双特异性抗体、Fab、Fab2、Fab3、单链抗体(scFv)、双单链抗体(Bis-scFv)、微型抗体、三抗体、双抗体、四抗体、VhH结构域、V-NAR结构域、IgNAR和骆驼Ig(camel Ig)。所述抗体的其它示例是IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgM、IgE、IgD和IgA。所述抗体的非限制性示例包括人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。重组抗体的非限制性示例包括与NGF特异性结合的抗体。

[0222] 所述抗体或其结合片段可对靶标部分具有特异性,并且可包括例如肿瘤上的抗原或半抗原。表1中列出了可用于本文提供的实施方式的半抗原的示例。

[0223] 本文所述的任何癌症特异性抗体可结合癌细胞(例如肿瘤细胞)上的抗原。可与靶标部分结合的特定肿瘤细胞抗原(可针对该抗原产生抗体)可包括例如血管生成素、跨膜受体、细胞粘附分子、分化分子簇、神经节苷脂、糖蛋白、生长因子、整联蛋白、白介素、Notch受体、跨膜糖蛋白、肿瘤坏死因子或酪氨酸激酶。在一些实施方式中,所述肿瘤细胞抗原可包括例如5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1、VEGF或其它癌症表达抗原。还考虑了可结合半抗原靶标部分的抗体。表1中列出了可用于本文提供的实施方式的半抗原的示例。

[0224] 与本文所述实施方式一起使用几种类型的“垫片”在考虑之列。所述嵌合抗原受体的间隔子是指多肽间隔子,其中选择所述间隔子的长度以调节(例如增加或改善)嵌合抗原

受体与其靶标结合的能力。所述脂质还可以包括将所述靶标部分与所述脂质分离并与所述脂质的极性头部基团结合的间隔子。可筛选用于嵌合抗原受体的选定的多肽间隔子以识别特定间隔子,以促进所需结合特性(例如对靶标部分的亲和力)的方式定向。关于脂质的特异性间隔子,所述脂质的间隔子可以包括PEG间隔子、半抗原间隔子、小肽或烷烃链。在一些替代方式中,所述半抗原间隔子包括两个半抗原,称为半抗原(2X)间隔子。在一些替代方式中,所述脂质包括疏水基团,例如烷烃链。在一些替代方式中,所述烷烃链可包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个碳,或由上述任意两个值定义的范围内的任意数量的碳。在一些替代方式中,所述PEG间隔子包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个PEG分子,或由上述任意两个值定义的范围内的任意数量的PEG分子。

[0225] 如本文所用,“细胞毒性T淋巴细胞”(CTL)是指在其表面表达CD8的T淋巴细胞(例如CD8⁺T细胞)。在一些替代方式中,所述细胞毒性T淋巴细胞优选为抗原遭遇型(antigen-experienced)的“记忆”T细胞(T_M)。在一些替代方式中,所述细胞可用于融合蛋白分泌。在一些替代方式中,所述细胞为细胞毒性T淋巴细胞。本文所用的“中央记忆”T细胞(T_{CM})为抗原遭遇型(antigen-experienced)CTL,与幼稚细胞相比,“中央记忆”T细胞在表面表达CD62L、CCR-7和/或CD45RO,不表达或降低CD45RA的表达。在一些替代方式中,所述细胞可用于融合蛋白分泌。在一些替代方式中,所述细胞为中央记忆T细胞(T_{CM})。在一些替代方式中,与幼稚细胞相比,所述中央记忆细胞对CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和/或CD95的表达呈阳性,并且可能降低CD54RA的表达。本文所用的“效应记忆”T细胞(T_{EM})是指与中央记忆细胞相比,其表面不表达或降低CD62L的表达,且与幼稚细胞相比,不表达或降低CD45RA的表达的抗原遭遇型(antigen-experienced)T细胞。在一些替代方式中,所述细胞可用于融合蛋白分泌。在一些替代方式中,所述细胞为效应记忆T细胞。在一些替代方式中,与幼稚细胞或中央记忆细胞相比,所述效应记忆细胞对CD62L和/或CCR7的表达呈阴性,并且CD28和/或CD45RA的表达是可变的。

[0226] “幼稚T细胞”是指与中央记忆细胞或效应记忆细胞相比,表达CD62L和/或CD45RA且不表达CD45RO的非抗原遭遇型的T淋巴细胞。在一些替代方式中,所述细胞可用于融合蛋白分泌。在一些替代方式中,所述细胞为幼稚T细胞。在一些替代方式中,所述幼稚CD8⁺T淋巴细胞的特征在于幼稚T细胞的表型标记物(包括CD62L、CCR7、CD28、CD127和/或CD45RA)的表达。

[0227] 本文中使用的“T细胞”或“T淋巴细胞”可以来源于任何哺乳动物,优选为灵长类动物,包括猴子、狗和人。在一些替代方式中,所述T细胞与受体受试者为同种异体的(来自同一物种但不同的供体);在一些替代方式中,所述T细胞为自体的(供体和受体是相同的);在一些替代方式中,所述T细胞是同基因的(供体和受体不同,但为同卵双胞胎)。

[0228] 如本文所述,“T细胞前体”是指可以迁移到胸腺并成为T细胞前体的不表达T细胞受体的淋巴样前体细胞。所有所述T细胞都来源于骨髓中的造血干细胞。所述来自造血干细胞的造血祖细胞(淋巴祖细胞)在胸腺中聚集并通过细胞分裂而扩增,以产生大量未成熟胸腺细胞。最早的胸腺细胞既不表达CD4也不表达CD8,因此被归类为双阴性(CD4⁻CD8⁻)细胞。其发育成为双阳性胸腺细胞(CD4⁺CD8⁺),最终成熟为单阳性(CD4⁺CD8⁻或CD4⁻CD8⁺)胸腺细胞,然后从胸腺释放到外周组织。

[0229] 如本文所述,“CD8⁺T细胞”或“杀伤T细胞”为能够杀死癌细胞、受病毒感染的细胞

或损伤细胞的T淋巴细胞。所述CD8 T细胞识别特定抗原或能够刺激免疫反应并由癌细胞或病毒产生的蛋白。如果所述CD8 T细胞的T细胞受体识别抗原,则CD8 T细胞可以与呈递的抗原结合并破坏细胞。

[0230] “中央记忆T细胞”(T_{CM})是指在其表面表达CD62L或CCR-7和CD45RO的抗原遭遇型CTL,与幼稚细胞相比不表达或降低CD45RA的表达。在一些替代方式中,所述中央记忆细胞对CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和/或CD95的表达呈阳性,与幼稚细胞相比,对CD54RA的表达降低。

[0231] “效应记忆”T细胞(或“T_{EM}”)是指与所述中央记忆细胞相比,其表面不表达或降低CD62L的表达,并且与所述幼稚细胞相比,不表达或降低CD45RA的表达。在一些替代方式中,与所述幼稚细胞或所述中央记忆细胞相比,所述效应记忆细胞对CD62L和/或CCR7的表达呈阴性,并且CD28和/或CD45RA的表达是可变的。本文所用的“效应T细胞”是指与中央记忆或幼稚T细胞相比,不表达或降低CD62L、CCR7和/或CD28的表达,并对颗粒酶B和/或穿孔素呈阳性的抗原遭遇型的细胞毒性T淋巴细胞。在一些替代方式中,所述细胞可用于融合蛋白分泌。在一些替代方式中,所述细胞为效应T细胞。在一些替代方式中,与中央记忆或幼稚T细胞相比,所述效应T细胞不表达或降低CD62L、CCR7和/或CD28的表达,并对颗粒酶B和/或穿孔素呈阳性。

[0232] 本文所述的“前导序列”也称为可将蛋白引导至细胞表面的信号序列。在CAR的情况下,前导序列是指CAR中引导表面表达的第一氨基酸序列。所述前导序列或信号序列可以为蛋白表面表达所必需的。在一些替代方式中,所述前导序列包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子信号序列。

[0233] 在根据本说明书阅读时,“半抗原呈递细胞”(H-APC)具有明确和通常的含义,可以包括但不限于例如用半抗原标记的细胞。在一些实施方式中,所述半抗原连接到细胞的细胞外表面。在一些实施方式中,所述H-APC可由患者的健康细胞或与所述患者相容的细胞产生,并用半抗原标记。表1列出了可用于本文提供的实施方式的半抗原的示例。有多种用半抗原标记细胞的方法,例如化学物质、肽、适体、脂质或蛋白。用半抗原负载细胞的示例包括所需的细胞与荧光素脂质一起孵育过夜。荧光素作为半抗原的一个优点为荧光素的荧光。因此,可以借助流式细胞术通过荧光素部分的荧光来监测半抗原的结合。因此,孵育后,可以去除多余的荧光素-脂质,对一部分细胞进行流动分析以分析半抗原结合,剩余细胞可用于向患者输注。患者输注后,如果没有被CAR T细胞靶向,H-APC将缓慢丧失半抗原(被代谢、从表面去除等),并恢复到其原始健康细胞形式,这表明该方法具有安全性。在一些实施方式中,可以转导所述细胞以在细胞的外表面上表达半抗原。在一些实施方式中,所述半抗原可以共价连接到细胞的外表面。在一些实施方式中,所述半抗原可通过磷脂(如磷脂醚)共价连接到细胞的外表面。

[0234] “刺激”或激活T细胞是指诱导T细胞启动应答(如信号转导反应,如增殖),同时保持T细胞活性和免疫功能的方法。细胞的刺激也可诱导包括CAR的T细胞的活性。在一些替代方式中,用包括抗CD3和/或抗CD28抗体的抗体结合支持物进行刺激。在一些替代方式中,该方法还包括去除抗体结合的支持物,如珠或颗粒或基质(如皿或管)。如本文替代方式中所述,可使用半抗原抗原呈递细胞(H-APC)刺激包括半抗原特异性CAR的T细胞,或可使用例如与半抗原结合的支持物(如珠)进行体外刺激。

[0235] “化疗药物”是一类抗癌药物，其可以使用化学物质，例如可以作为标准化疗方案的一部分施用的抗癌药物（化疗剂）。所述化疗药物可以有治疗目的施用，也可以旨在延长寿命或减轻症状（姑息性化疗）。其它化疗还可以包括激素治疗和靶向治疗，因为其作为医学肿瘤学（癌症药物治疗）的主要类别之一。这些方式通常与其它癌症疗法（如放射治疗、手术和/或热疗）结合使用。在少数情况下，癌症可因手术而扩散。在一些替代方式中，在外科手术之前或之后，向肿瘤部位施用转基因免疫细胞。在本文的一些替代方式中，选择接受CART细胞治疗的受试者接受化疗药物或抗癌药物。一些较新的抗癌药物（例如各种单克隆抗体、其人源化形式及其结合片段）不是无差别地具有细胞毒性，而是靶向癌细胞中异常表达且对其生长至关重要的蛋白质。这类疗法通常被称为靶向疗法（与传统化疗不同），并经常与传统化疗药物一起用于抗肿瘤治疗方案。在一些替代方式中，本文所述方法可进一步包括施用这些靶向抗癌疗法（例如各种单克隆抗体、其人源化版本和/或其结合片段）中的任意一种或多种。

[0236] 施用化疗药物的化疗可以一次施用一种药物（单药化疗）或同时使用多种药物（联合化疗或多药化疗）。化疗和放疗的结合为放化疗。使用仅在光照射下转化为细胞毒性活性的药物的化疗称为光化学疗法或光动力疗法。在本文所述的施用转基因免疫细胞的一些替代方式中，所述方法可进一步包括在接受转基因免疫细胞或转基因巨噬细胞（GEM）后，向患有癌症的受试者施用光化学疗法或光动力疗法。

[0237] 化疗药物可以包括但不限于抗体-药物缀合物（例如通过连接单元连接至药物的抗体）、纳米颗粒（例如纳米颗粒可为1-1000纳米大小的颗粒，用于促进肿瘤选择性和辅助递送低溶解度药物）、电化学疗法、烷基化剂、抗代谢物（例如5-氟尿嘧啶（5-FU）、6-巯基嘌呤（6-MP）、卡培他滨（Xeloda®）、克拉屈滨、氟达拉滨、阿糖胞苷（Ara-C®）、氟尿苷（Floxuridine）、氟达拉滨、吉西他滨（Gemzar®）、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞（Alimta®）、喷司他丁和硫鸟嘌呤）、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇、DNA嵌入剂或检查点抑制剂（例如检查点激酶CHK1或CHK2）。在本文描述的方法的一些替代方式中，将包括CAR的遗传修饰的免疫细胞或者含有包括CAR的遗传修饰的免疫细胞的组合物与一种或多种抗癌剂（例如前述化合物或疗法中的任一种或多种）联合给药。在一些替代方式中，与遗传修饰的免疫细胞共同给药或联合给药的一种或多种抗癌剂包括抗体-药物缀合物、纳米颗粒、电化学疗法、烷基化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇、DNA嵌入剂或检查点抑制剂。在一些替代方式中，抗代谢物包括5-氟尿嘧啶（5-FU）、6-巯基嘌呤（6-MP）、卡培他滨（Xeloda®）、克拉屈滨、氟达拉滨、阿糖胞苷（Ara-C®）、氟尿苷（Floxuridine）、氟达拉滨、吉西他滨（Gemzar®）、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞（Alimta®）、喷司他丁和硫鸟嘌呤。

[0238] 当根据本说明书阅读时，“癌症”具有其清晰且通常的含义，并且可以包括但不限于例如涉及异常细胞生长、具有侵袭或扩散到机体的其它部分的潜力的一组疾病。可以使用本文描述的方法应对的受试者包括被鉴定或选择为患有癌症的受试者，所述癌症包括但不限于结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌（包括黑色素瘤）、骨癌和/或脑癌等。可以通过临床或诊断评价来进行鉴定和/或选择。在一些替代方式中，所述肿瘤相关抗原或分子是已知的，例如黑色素瘤、乳腺癌、脑癌、鳞状细胞癌、结肠癌、白血病、骨

髓瘤或前列腺癌或其任意组合。示例包括但不限于B细胞淋巴瘤、乳腺癌、脑癌、前列腺癌和/或白血病。在一些替代方式中,一种或多种致癌多肽与如下有关:肾癌、子宫癌、结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌、脑癌、腺癌、胰腺癌、慢性髓性白血病或白血病。在一些替代方式中,提供了治疗、改善或抑制受试者中的癌症的方法。在一些替代方式中,所述癌症为乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、肾癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、肉瘤、肝癌、结肠癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌或脑癌。在一些替代方式中,选择受试者以接受额外的癌症疗法,可包括癌症治疗、放射、化疗或适于癌症疗法的药物。在一些替代方式中,药物包括阿比特龙、阿仑单抗、阿那曲唑、阿瑞匹坦、三氧化二砷、阿特朱单抗、阿扎胞苷、贝伐珠单抗、博来霉素、硼替佐米、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、西妥昔单抗、化学疗法药物组合、顺铂、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、地诺单抗、多西他赛、多柔比星、艾日布林、厄洛替尼、依托泊苷、依维莫司、依西美坦、非格司亭、氟尿嘧啶、氟维司群、吉西他滨、伊马替尼、咪喹莫特、伊匹单抗、伊沙匹隆、拉帕替尼、来那度胺、来曲唑、亮丙瑞林、美司钠、甲氨蝶呤、纳武单抗、奥沙利铂、紫杉醇、帕洛诺司琼、派姆单抗、培美曲塞、泼尼松、镭-223、利妥昔单抗、Sipuleucel-T、索拉非尼、舒尼替尼、Talc Intrapleural、他莫昔芬、替莫唑胺、替西罗莫司、沙利度胺、曲妥珠单抗、长春瑞滨或唑来膦酸。

[0239] 在根据本说明书阅读时,“肿瘤微环境”具有明确和通常的含义,可包括但不限于肿瘤存在的细胞环境。在没有特殊限定的情况下,所述肿瘤微环境可包括周围血管、免疫细胞、成纤维细胞、骨髓来源的炎性细胞、淋巴细胞、信号分子和/或细胞外基质(ECM)。在本文的一些替代方式中,在肿瘤环境中施用携带CAR的T细胞,并使用H-APC进行刺激。

[0240] 详细说明

[0241] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式涉及半抗原标记细胞刺激嵌合抗原受体(CAR) T细胞的用途。在一些实施例中,CAR T细胞可包括特异性结合半抗原的CAR。一些实施方式涉及由半抗原标记的细胞在体内或体外刺激CAR T细胞。

[0242] 嵌合抗原携带细胞为免疫细胞,所述免疫细胞被设计为导向与恶性细胞表面相关的生物标记物。这些表面靶标或抗原允许进行定向、特异性治疗,以减少对健康组织的破坏,并在治疗期间保护患者的免疫系统。所述T细胞为适应性免疫系统的关键组成部分,因为所述T细胞不仅协调细胞毒性效应,而且可以提供特定抗原的长期细胞“记忆”。所述T细胞内源地需要MHC展示的肽与其TCR之间的相互作用来激活,但CAR T细胞通过肿瘤相关或肿瘤特异性抗原(分别为TAA和TSA)来激活。因此,CAR T细胞可被视为一种“活药物”,包括与T细胞的信号传导结构域融合的靶向结构域(单链可变片段(scFv)、肽、多肽、配体、突变蛋白质、间隔子和/或连接单元)。T细胞在识别靶向结构域并与特定靶结合后激活,随后启动杀伤靶细胞。CAR T细胞疗法在以CD19和CD20为靶标的血液系统恶性肿瘤的治疗中具有革命性的意义。然而,所述CAR T细胞无法有效地转化为实体瘤,需要开展工作来解决这一问题。本文提供了与刺激受刺激的CAR T细胞相关的实施例。此外,刺激CAR T细胞可以消除目前CAR T淋巴细胞疗法面临的挑战(如体内持久性和免疫抑制肿瘤微环境),这对进一步的CAR T细胞发育和成功至关重要。

[0243] 在本文的一些替代方式中,所述T细胞进行转导、转染或转化以在一个细胞中表达至少两种独特的CAR(双重CAR),其中一种CAR对肿瘤靶点具有特异性,另一种CAR对半抗原

具有特异性,例如荧光素。或者,对T细胞进行转导、转染或转化以表达含有两个靶向部分(例如两个单链抗体)的单个CAR(双特异性CAR),其中一种靶向部分为肿瘤特异性的,而另一种CAR对半抗原具有特异性。然而,如果用半抗原标记肿瘤,则抗半抗原CAR将是唯一必要的CAR。可以通过许多不同的方法产生双重和双特异性CAR T细胞,例如使用病毒载体进行双重转导、使用病毒载体进行单转导,其中病毒包括两种CAR、非病毒转座子载体等。有许多选择纯化或分离的CAR T细胞群的方法。例如,使用两种表面标记(例如EGFRt、Her2tG、CD19t等),然后通过各表面标记物分选细胞。同样,在本文的一些替代方式中,借助半抗原标记的血或管或基质(例如磁珠)对抗半抗原CAR进行分选。该方法特有的特征是抗半抗原CAR也可以组成型表达,因为其不应该识别患者内的任何内源表位。

[0244] H-APC(半抗原呈递细胞)优选由患者的健康细胞或与所述患者相容的细胞产生,并用半抗原体外标记细胞。在没有特殊限定的情况下,半抗原的示例包括荧光素、漆酚、醌或生物素。表1列出了可用于本文提供的实施方式的更半抗原的更多示例。有多种用半抗原(例如化学、肽、适体、脂质或蛋白质)标记细胞的方法。例如,可以将荧光素-脂质与所需的细胞孵育过夜。使用荧光素作为半抗原的一个优点为其荧光。通过所述方法,可以借助流式细胞术通过荧光素部分的荧光来监测半抗原的结合。因此,孵育后,可以去除多余的荧光素-脂质,对一部分细胞进行流动分析以分析半抗原结合,剩余细胞可用于向患者输注。患者输注后,如果没有被CAR T细胞靶向,H-APC将缓慢丧失半抗原(被代谢、从表面去除等),并恢复到其原始健康细胞形式,因此,该方法具有安全性。

[0245] 如果需要刺激患者体内的CAR T细胞,可以在治疗期间的任何时间点施用H-APC。这种需求的一个示例为如下时期,一旦血液系统癌症由于低癌细胞水平而达到消退的最后阶段,CAR T细胞收缩并丧失效力。在这种情况下,输注H-APC以扩增和激活CAR T细胞,以继续使癌症的消退,并有望实现肿瘤的完全缓解。

[0246] 这种需求的另一个示例为在实体瘤治疗期间。所述实体瘤通常具有很强的免疫抑制作用,添加H-APC可能有助于刺激T细胞克服免疫抑制性肿瘤环境。H-APC方法提供了一种在体内刺激CAR T细胞的安全的方法。

[0247] H-APC也可用于体外刺激CAR T细胞。根据某些临床方案,磁珠用于通过TCR刺激CAR T细胞,然后再将其输注患者体内。可以使用半抗原标记的磁珠制备H-APC。在这种情况下,所述H-APC将在输注之前通过CAR刺激细胞。

[0248] 此外,如果在输注患者体内之前需要采用快速扩增方案(REP),H-APC是一种安全的替代方式。标准REP使用辐照的TM-LCL和PBMC作为饲养细胞。作为替代方式,有多种可以在REP中使用H-APC的方法。首先,如果H-APC是由患者自身细胞制备的,则可以跳过辐照步骤,并且不需要培养TM-LCL和分离PBMC。其次,所述H-APC可以由来自另一供体的辐照细胞产生。最后,H-APC REP可以代替标准的REP用于实验室工作。这些示例提供了几种通过半抗原特异性刺激选择性扩增CAR T细胞的方法。

[0249] CAR T细胞疗法所面临的临床障碍,特别是对于实体瘤,可能需要使用超出单个CAR活性的补充支持。所述H-APC提供了一种超出当前临床方案中所证实的能改善CAR T细胞的植入和持久性的机制,并可以促进T细胞迁移至实体瘤的免疫抑制肿瘤转移部位。而在血液系统癌症中,所述癌症的阈值可能太低而无法进行初次CAR T细胞植入,所述H-APC可用于促进初次激活。在这两种情况下,抗半抗原CAR将驱动输注的CAR T细胞的激活、增殖和

分散,而另一种表达的CAR则将协调肿瘤的消融。本发明还提供了一种独特的方法,可以在输注到患者体内之前重新表达CAR T细胞。

[0250] 本文所述的替代方式旨在提高实体癌和血液癌中CAR T细胞疗法的疗效。所述H-APC可以在体内刺激CAR T细胞,以克服免疫抑制性肿瘤微环境,有助于提高CAR T淋巴细胞发现和根除微量癌症的能力,或对CAR T细胞有辅助作用。所述H-APC的使用较为安全,未被CAR T细胞裂解的H-APC随着时间的推移将半抗原安全降解,并将恢复到正常的健康细胞。此外,使用REP和H-APC刺激细胞还具有成本更低和细胞培养周期更短的优点。

[0251] 关于一个病毒载体中具有两种CAR的细胞的制备,另一个需要考虑的因素为大小限制。在本文的一些替代方式中,可以进行额外载体的共转导。本文还考虑了制备CAR T细胞以避免潜在大小限制的替代方式。

[0252] 本文还考虑了半抗原的毒性。然而,本领域技术人员应当理解,可以进行分析以确定人们是否可以很好地耐受所选半抗原(例如荧光素)。与半抗原的结合成分(例如脂质、蛋白质、肽或适体)的毒性也可能是一个影响因素。同样,存在控制,因为可以选择一种结合成分,该成分被身体快速代谢。PCT/US2018/017126描述了一种这样的化学物质(在此通过引用将其全部并入本文)。

[0253] 同样,先前开发的经转染以表达细胞表面tROR 1的自体T细胞(ROR 1+T-APC)(Berger等人,2015,Cancer Immunology Research,3(2),206-216)。然而,Berger和本文所述的替代方式之间的一个主要差异为,Berger等人所述的ROR1+T-APC产品必须进行转换、扩增、培养和表征,所述产品需要花费数周到数月的时间,成本较高。在本文描述的替代方式中,所述细胞只需要负载半抗原,这可以在非常短的时间内(例如,数小时)完成,然后可以输注患者体内。在本文描述的替代方式的系统中,所述细胞的类型也可以变化。因此,不需要使用珍贵的T细胞。此外,Berger描述的技术尚未用于实体瘤中。此外,Berger对T-APC进行了基因改造,这需要大量的成本和时间。相反,本文提供的实施方式通过直接连接至细胞的外表面以快速有效地提供半抗原标记的细胞。因此,本文替代方式中描述的方法将彻底改变实体瘤T细胞免疫治疗领域,并极大地改善目前存在的CAR T细胞的血液学癌症疗法。

[0254] 本文提供的方法和组合物的一些实施例包括W02018/148224;W02019/156795;W02019/144095;US2019/0224237和W02020/033272(PCT/US2019/044981)中公开的内容,其全部通过引用并入本文。

[0255] 诱导CAR T细胞扩增

[0256] 本文提供的方法和组合物的一些实施方式包括诱导嵌合抗原受体(CAR)T细胞的扩增。在一些实施方式中,在诱导CAR T淋巴细胞扩增的条件下将所述CAR T细胞与所述半抗原呈递细胞(H-APC)一起孵育。在一些实施方式中,所述CAR T细胞的CAR与连接至H-APC的半抗原特异性结合。一些实施方式包括治疗、抑制或改善受试者的癌症。在一些实施方式中,向受试者施用有效量的CAR T细胞,其中所述CAR T细胞的CAR与癌症的肿瘤特异性抗原特异性结合,并通过将CAR T细胞与半抗原呈递细胞(H-APC)一起孵育以诱导CAR T细胞的扩增,其中,所述CAR T细胞的CAR特异性结合到连接至H-APC的半抗原。在一些实施方式中,CAR T细胞和H-APC来源于单一受试者,例如人。在一些实施方式中,所述受试者为哺乳动物,例如人、牲畜或家畜。

[0257] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞可含双特异性CAR。例如,CAR可以具有两个特异性结合域,可以特异性结合靶标(例如肿瘤特异性抗原)的第一个结构域;以及能够特异性结合半抗原的第二结构域。

[0258] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞可以包括一种以上CAR。例如,CAR可以包括第一CAR,所述第一CAR包括可以特异性结合靶标(例如肿瘤特异性抗原)的第一结合结构域;以及第二CAR,第二CAR包括可以特异性结合至半抗原的第二结合结构域。

[0259] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞可以包括可以结合靶标(例如肿瘤特异性抗原)并且还可以结合半抗原的CAR。在一些这样的实施方式中,所述靶标和半抗原可以包括相同的结合部分或基本上相同的结合部分,使得CAR可以结合靶标的结合部分和半抗原的结合部分。在一些这样的实施方式中,所述靶标和半抗原可以是本文提供的肿瘤抗原。

[0260] 可用于本文提供的实施方式的靶抗原的示例包括CD19、CD22、HER2、CD7、CD30、B细胞成熟抗原(BCMA)、GD2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、MUC1、CD70、CD33、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子变体III、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、CD123、前列腺干细胞抗原(PSCA)、CD5、Lewis Y抗原、B7H3、CD20、CD43、HSP90和或IL13或其任意组合。

[0261] 可用于本文提供的实施方式的半抗原的示例包括表1中列出的那些半抗原。在一些实施方式中,可用于本文提供的实施方式的半抗原包括荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚和/或其的衍生物。

[0262] 在一些实施方式中,将半抗原共价连接至细胞的细胞外表面以制备H-APC。在一些实施方式中,半抗原通过磷脂醚(PLE)连接至H-APC。

[0263] 在一些实施方式中,孵育可为体外的。例如,可以通过用编码CAR的载体转导细胞来制备CAR T细胞,并可以通过将细胞与H-APC一起孵育来诱导经转导的细胞扩增。在一些实施方式中,可以将扩增的细胞给予受试者(例如人)。在一些实施方式中,孵育可为体内的。例如,可以给予受试者CAR T细胞。还可以给予受试者H-APC,其在体内诱导CAR T细胞的扩增。

[0264] 在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于CD4⁺细胞或CD8⁺细胞。在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞为CD8⁺C细胞毒性淋巴细胞,所述CD8⁺C细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8⁺T细胞、中央记忆CD8⁺T细胞、效应记忆CD8⁺T细胞和本体CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD8⁺细胞为CD8⁺的细胞毒性T淋巴细胞,所述CD8⁺的细胞毒性T淋巴细胞为中央记忆T细胞,其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO⁺、CD62L⁺和CD8⁺呈阳性。在一些实施方式中,所述CD4⁺细胞为,所述CD4⁺辅助淋巴细胞选自幼稚CD4⁺T细胞、中央记忆CD4⁺T细胞、效应记忆CD4⁺T细胞和本体CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,所述CD4⁺辅助淋巴细胞为幼稚的CD4⁺T细胞,其中所述幼稚的CD4⁺T淋巴细胞对CD45RA⁺、CD62L⁺和CD4⁺呈阳性,而对CD45RO呈阴性。在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于前体T细胞。在一些实施方式中,所述CAR T细胞来源于造血干细胞。在一些实施方式中,所述H-APC来源于受试者的健康细胞(例如T细胞和B细胞)。

[0265] 在一些实施方式中,所述健康细胞可为T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和NK细胞、红细胞。在一些实施方式中,所述健康细胞可为任何外周血单个核细胞。在一些实施方式中,所述健康细胞可为来自机体的任何健康细胞。在一些实施方式中,所述健康细胞可为来自单采血液分离术(apheresis)产物的任何细胞。在一些实施方式中,所述健

康细胞可为可以离体标记的任何细胞。

[0266] 在一些实施方式中,将单一CAR细胞与H-APC一起使用。在一些实施方式中,将多聚(multimeric) CAR与H-APC一起使用。在一些实施方式中,例如当用半抗原标记肿瘤(例如用半抗原标记的CD19抗体、半抗原-PLC、用半抗原标记的小分子、用半抗原标记的肽、用半抗原标记的适体或其它用半抗原标记的肿瘤细胞)并且用相同的半抗原制备H-APC以扩增患者中的抗半抗原CAR T细胞时,使用单一抗半抗原CAR T细胞。在一些实施方式中,可以使用双重或双特异性CAR细胞,其中一种CAR(例如CD19、CD22或ROR1)攻击癌症,而将抗半抗原CAR用于经由H-APC来扩增双重或双特异性CAR(参见例如图2)。在一些实施方式中,这可以进一步扩展,其中将多于两种CAR再加上抗半抗原CAR负载到细胞中(例如用于对抗ALL的CD19和CD22),并且将抗半抗原CAR用于激活和扩增CART细胞。

[0267] 在一些替代方式中,所述T细胞为非自体T细胞。

[0268] 在一些替代方式中,本文公开的方法可用于通过CAR和H-APC扩增任何细胞。例如,通过H-APC扩增表达抗半抗原CAR的B细胞。因此,所方法可用于在体内扩增任何类型的细胞。

[0269] 在一些替代方式中,所述CAR T细胞不仅可以作为癌症的治疗手段,还可以作为病毒感染(如HIV或肝炎)的治疗手段以及自身免疫性疾病和相关疾病的治疗手段。

[0270] 在一些替代方式中,可以从肿瘤/癌症中收集肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),用CAR转导,并使用H-APC在体外/体内扩增。

[0271] 编码CAR和双特异性CAR的核酸

[0272] 在一些替代方式中,提供了用于表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的一种或多种核酸。可以在单个载体或多个载体内提供一种或多种核酸,以适应两种CAR的有效负载大小(payload size)。所述一种或多种核酸可包括编码所述第一嵌合抗原受体的第一序列,其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及编码第二嵌合抗原受体的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对所述肿瘤细胞抗原具有特异性。在一些替代方式中,所述肿瘤细胞抗原包括5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-1R、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1或VEGF。在一些实施方式中,所述CAR可以与表1中列出的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述半抗原可以选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(如抗表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。表3中列出了编码可与半抗原(如荧光素或二硝基苯酚)结合的抗原结合结构域(如svFc)的示例氨基酸序列和核酸,所有内容可并入本文描述的一个或多个实施方式中。

[0273] 表3

[0274]

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO:01 FITCE2 scFv	SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYC AAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWV AGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRVEDTA

[0275]

SEQ ID NO:	序列
	VYYCARRSYDSSGYWGHFYSYMDVWGQGLTVTS
SEQ ID NO:02 FITCE2 TyrH133Ala scFv	SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYC AAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWV AGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRVEDTA VYYCARRSYDSSGYWGHFASYMDVWGQGLTVTS
SEQ ID NO:03 FITCE2 HisH131Ala scFv	VLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPK LMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCA AWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVES GGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVA GLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRVEDTAV YYCARRSYDSSGYWGAIFYSYMDVWGQGLTVTS
SEQ ID NO:04 4M5.3 scFv	DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQ KPGQSPKVLIIYKVS NRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAED LGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAAKKDDAK KDDAKKDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYW MNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISR DSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSTVTS
SEQ ID NO:05 4D5Flu scFv	DYKDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSLVHSQGNTYLRWY QQKPGKAPKVLIIYKVS NRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSTHVPWTFGQGTKVELKRAGGGGSGGGGSGGGG SSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSDYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKPYNYETYYADSVKG RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTGSYYGMDYWGQ GTLVTVSS

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO:06 4420	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSQGNTYLRWYLQ KPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIGGGGSGGGGSGGGGSEVKL DETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLR VEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:07 anti DNP scFv (来自兔子的 VH 至 VL)	cagtgtcagcagctggagcagctccggaggaggagccgaaggaggcctggcaagcctgggggat ccctggaactctgctgcaaagcctctgattctccctcagtagtagctactgcatatgttgggtccgcc aggctccaggggaaggggctggagtggatcggatgcatttatgctggtagtagtggtagcacttacta cgcgagctgggtgaatggccgattcactctctccagagacattgaccagagcacaggtgcttaca ctgaacagtctgacagccgcggacacggccatgtattactgtgcgagagccccctatagtagtggt gggtcctctactttaactgtggggcccaggcacctgtcattgtctcctcaggcggagggggctct ggcggcggaggatctgggggagggggcagcccagggtccacattgcccagtgctgaccaga ctccatgcctgtgtctgcagctgtgggaggcacagtcaccatcagttgccagtcagtgagagtgtt tatggaacagccgcttagcctggatcagcagaaaccagggcagtcctccaagctctgatctattat gcatccactctggcatctgggtcccttcgcggtcaaaggcagtgatctgggacacagttcactct caccattagcgacctggagtgtgacgatgctgctcttactactgtcaaggcgggtattatagtggaat cttgatgcgcttgccttcggcggaggaccgaggtgggtgagaggt
SEQ ID NO:08 anti DNP scFv (来自兔子的 VH 至 VL)	QCQQLQSGGGAEGGLVKPGGSLELCKASGFSLSYYCICWV RQAPGKGLEWIGCIYAGSSGSTYYASWVNGRFTLSRDIDQSTGC LQLNSLTAADTAMYYCARAPYSSGWVLYFNLWPGTLVIVSSG GGGSGGGGSGGGGSPGATFAQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQS SESVYGNRLAWYQKPGQSPKLLIYYASTLASGVPSRFKGS GTQFTLTISDLECDDAASYCQGGYYSGNLDALAFGGGTEVVV RG
SEQ ID NO:09	ccaggtgccacattgcccagtgctgaccagactccatcgctgtgtctgcagctgtgggaggca

[0276]

SEQ ID NO:	序列
anti DNP scFv (来自兔子的 VH 至 VL)	<pre> cagtcaccatcagtgccagtcagtgagagtgttatggaacagccgcttagcctggatcagcag aaaccagggcagtcctccaagctcctgatctattatgcatccactctggcatctggggtccttcgcg gttcaaaggcagtgatctgggacacagttcactctcaccattagcgacctggagtgtagcagtgctg cctcttactactgtcaaggcgggtattatagtggaatcttgatgcgcttgcttcggcggaggaccga gggggtggcagaggtggcggagggggctctggcggcggaggatctgggggagggggcagcc agtgtagcagctggagcagtcggaggaggagccgaaggaggcctggtaagcctgggggagc cctggaactctgctgcaaacctctggattctccctcagtagtagctactgcatatgttgggtccgcca ggctccaggggaaggggctggagtgatcgatgcatattatgctgtagtagtgtagcacttactac gcgagctgggtgaatgccgattcactctcctcagagacattgaccagagcacaggtgcctacaac tgaacagctctgacagccgagcagccatgtattactgtgagagccccctatagtagtggtg ggctctctactttaactgtggggcccaggcaccctggcattgtctctca </pre>
SEQ ID NO:10 anti DNP scFv (来自兔子的 VH 至 VL)	<pre> PGATFAQVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSES VYGN SRLAWYQ QKPGQSPKLLIYYASTLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECD AASYCQGGYYSGNLDALAFGGGTEVVRGGGGSGGGGSG GGGSQCQQLQSGGGAEGGLVKPGSLELCKASGFSLSYCI CWVRQAPGKLEWIGCIYAGSSGTYYSWVNGRFTLSRDIDQ STGCLQLNSLTAADTAMYYCARAPYSSGWVLYFNLWGPGLVI VSS </pre>

[0278] 在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和/或与CD83和/或CD3ζ胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3ζ和一部分4-1BB。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方法中,所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。在一些替代方式中,所述连接单元为核糖体跳跃序列。在一些替代方式中,所述核糖体跳跃序列为P2A、T2A、E2A或F2A。所述可裂解连接单元可以位于编码两种嵌合抗原受体的序列之间。此外,可在任何一种嵌合抗原受体和编码标记蛋白的序列之间使用可裂解连接单元。在一些替代方式中,本发明提供了一种或多种包

括本文所述任一替代方式的一种或多种核酸的载体。在一些替代方式中,本发明提供了由本文任一替代方式的核酸或本文任一替代方法的载体编码的嵌合抗原受体。

[0279] 在一些替代方式中,本发明提供了一种或多种用于表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的核酸,并且所述一种或多种核酸包括第一核酸,所述第一核酸包括编码第一嵌合抗原受体的第一序列,所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及第二核酸,所述第二核酸包括编码第二嵌合抗原受体的第二序列,所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对如下具有特异性:5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EPCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1或VEGF或其任意组合。在一些实施方式中,所述CAR可以与表1中列出的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述半抗原可以选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚和/或其衍生物。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域或第二配体结合结构域针对如下抗体或其结合片段具有特异性:5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EPCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1或VEGF或其任意组合。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(例如抗表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述第一细胞内信号传导结构域和/或第二细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和/或与CD83和/或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方法中,所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。在一些替代方式中,所述连接单元为核糖体跳跃序列。在一些替代方式中,所述核糖体跳跃序列为P2A、T2A、E2A或F2A。在一些替代方式中,本发明提供了一种或多种包括本文所述任一替代方式的一种或多种核酸的载体。在一些替代方式中,本发明提供了由本文任一替代方式的核酸或本文任一替代方法的载体编码的嵌合抗原受体。

[0280] 双特异性嵌合抗原受体

[0281] 在一些替代方式中,本发明提供了用于表达双特异性嵌合抗原受体的一种或多种核酸。在一些实施方式中,所述核酸包括编码对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原特异的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的序列。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对如下具有特异性:5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1、VEGF或其它癌症表达的抗原。在一些实施方式中,所述CAR可以与表1中列出的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述半抗原可以选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(抗针对表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和/或与CD83和/或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方法中,提供了一种或多种双特异性CAR表达载体,其包括本文任一替代方法中的一种或多种核酸。在一些替代方式中,提供了由本文任一替代方式的核酸或本文任一替代方式的载体编码的双特异性嵌合抗原受体。

[0282] 包括CAR或双特异性CAR的细胞

[0283] 在一些替代方式中,本发明提供了一种包括本文任一替代方式中的一种或多种核酸、本文任一替代方式中的一种或多种载体或本文任一替代方式中的双特异性嵌合抗原受体的细胞。可以在单个载体或多个载体内提供一种或多种核酸,以适应两种CAR的有效负载大小。一种或多种载体可包括本文提供的任一种替代方式所述的核酸。或者,可以使用转座子系统或整合酶系统整合核酸。所述一种或多种核酸可包括编码所述第一嵌合抗原受体的第一序列,其中所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及编码所述第二嵌合抗原受体的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方案中,提供了多种核酸,其中所述第一核酸包括编码所述第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第二多肽间隔子和第三多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域,以及第二核酸包括编码所述第二嵌合抗原受体的第二序列,其中所述第二嵌合抗原

受体包括第二配体结合结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对肿瘤细胞抗原具有特异性。在一些替代方式中,所述抗原包括5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1和/或VEGF或其任意组合。在一些实施方式中,所述CAR可以与表1中列出的半抗原特异性结合。在一些实施方式中,所述半抗原可以选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(例如抗表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和/或与CD83和/或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。在一些替代方式中,所述连接单元为核糖体跳跃序列。在一些替代方式中,所述核糖体跳跃序列为P2A、T2A、E2A或F2A。所述可裂解连接单元可以位于编码两种嵌合抗原受体的序列之间。此外,可在任何一种嵌合抗原受体和编码标记蛋白的序列之间使用可裂解连接单元。在一些替代方式中,本发明提供了一种或多种包括本文所述任一替代方式的一种或多种核酸的载体。在一些替代方式中,细胞包括由一种或多种核酸编码的双特异性嵌合抗原受体。用于双特异性嵌合抗原受体的一种或多种核酸包括编码对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的序列。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对如下具有特异性:5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1、VEGF或其它癌症表达的抗原。在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。在一些实施方式中,所述半聚糖可选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(例如抗表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核

酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和/或与CD83和/或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。在一些实施方式中,所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO+、CD62L+和CD8+呈阳性。在一些实施方式中,所述细胞为CD4+T辅助淋巴细胞,所述CD4+T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4+T细胞、中央记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和本体CD4+T细胞。在一些实施方式中,所述CD4+T辅助淋巴细胞为幼稚CD4+T细胞,并且其中所述幼稚CD4+T细胞对CD45RA+、CD62L+和CD4+呈阳性,并对CD45RO呈阴性。在一些替代方式中,所述细胞为前体T细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。

[0284] 制备包括两个CAR或双特异性CAR的细胞

[0285] 在本文的替代方式中,本发明提供了一种细胞的制备方法,所述细胞表达半抗原特异性的第一嵌合抗原受体和肿瘤抗原具有特异性的第二嵌合抗原受体。在一些情况下,所述方法包括在表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将本文任一替代方式所述的一种或多种核酸或本文任一替代方式所述的一种或者多种载体导入细胞。在一些替代方式中,本发明提供了一种细胞的制备方法,所述细胞表达对半抗原和肿瘤抗原具有特异性的双特异性嵌合抗原受体。所述方法包括在表达第一嵌合抗原受体和第二嵌合抗原受体的条件下,将本文任一替代方式所述的一种或多种核酸或本文任一替代方式所述的一种或者多种载体导入细胞。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+T细胞毒性淋巴细胞,所述CD8+T细胞毒性淋巴细胞选自幼稚CD8+T细胞、中央记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和本体CD8+T细胞。在一些实施方式中,所述CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中央记忆T细胞,并且其中所述中央记忆T淋巴细胞对CD45RO+、CD62L+和CD8+呈阳性。在一些实施方式中,所述细胞为CD4+T辅助淋巴细胞,所述CD4+T辅助淋巴细胞选自幼稚CD4+T细胞、中央记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和本体CD4+T细胞。在一些实施方式中,所述CD4+T辅助淋巴细胞为幼稚CD4+T细胞,并且其中所述幼稚CD4+T细胞对CD45RA+、CD62L+和CD4+呈阳性,并对CD45RO呈阴性。在一些替代方式中,所述细胞为前体T细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。所述一种或多种核酸包括第一核酸,其中所述第一核酸包括编码所述第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包括对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第二多肽间隔子和第三多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域,以及第二核酸包括编码所述第二嵌合抗原受体的第二序列,其中所述第二嵌合抗原受体包括第二配体结合结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对肿瘤细胞抗原具有特异性。在一些替代方式中,所述抗原包括5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、

纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1或VEGF或其任意组合。在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。在一些实施方式中,所述半聚糖可选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域和/或第二配体结合结构域包括抗体或其结合片段或scFv,特异于5T4、B7-H3、碳酸酐酶IX、癌胚抗原、CA-125、CD-3、CD-19、CD-20、CD-22、CD-30、CD-33、CD-38、CD-40、CD-51、CD-52、CD-56、CD-70、CD-74、CD-79b、CD-138、CD-221、CD-319、CD-326、细胞粘附分子5、CTLA-4、细胞角蛋白多肽、死亡受体2、DLL4、EGFL7、EGFR、内皮素、酸蛋白、EpCAM、FAP、FR- α 、纤维连接蛋白、卷曲受体、GD2、GPNMB、HER-1、HER-2、HER-3、IGF-IR、IGLF2、LOXL2、间皮素、MS4A1、粘蛋白5AC、MUC1、连接蛋白-4、神经纤毛蛋白、N-glycolil GM3、PSMA、SLAMF7、TAG-72、TRAIL、TYRP1或VEGF或其任意组合。在一些替代方式中,所述第二配体结合结构域包括抗体(例如抗表1中列出的半抗原的抗体或表2中列出的抗体)的结合片段。在一些替代方式中,所述第一多肽间隔子和/或第二多肽间隔子的长度为1-24、25-50、51-75、76-100、101-125、126-150、151-175、176-200、201-225、226-250或251-275个氨基酸。在一些替代方式中,所述核酸进一步包括前导序列。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83和/或CD3 ζ 胞质结构域特异性结合的配体。在一些替代方式中,所述细胞内信号传导结构域包括一部分CD3 ζ 和一部分4-1BB。在一些替代方式中,所述核酸还包括编码标记序列的序列。在一些替代方式中,所述标记物为EGFRt、CD19t或Her2tG。在一些替代方式中,所述第一跨膜结构域和/或第二跨膜结构域包括CD28的跨膜结构区。在一些替代方法中,所述核酸进一步包括编码可裂解连接单元的序列。在一些替代方式中,所述连接单元为核糖体跳跃序列。在一些替代方式中,所述核糖体跳跃序列为P2A、T2A、E2A或F2A。用于双特异性嵌合抗原受体的核酸包括编码对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原对具有特异性的第二配体结合结构域,多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的序列。在一些替代方式中,本发明提供了包括本文任一替代方式的一种或多种核酸的多个载体。

[0286] 可以根据已知技术收集T淋巴细胞,并通过已知技术(如通过与抗体的亲和结合、流式细胞术和/或免疫磁性选择)富集或去除T淋巴细胞。在富集和/或去除步骤之后,可以根据本领域技术人员显而易见的已知技术或其变形进行所需T淋巴细胞的体外扩增。在一些替代方式中,所述T细胞是从患者获得的自体T细胞。

[0287] 例如,可以通过以下方法扩增所需的T细胞群或亚群:在体外培养基中添加初始T淋巴细胞群,然后向培养基中加入饲养细胞,如非分裂外周血单个核细胞(PBMC), (例如,对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群包含至少5、10、20或40个或更多PBMC饲养细胞);并孵育培养物(例如,所述孵育的时间为足以扩增T细胞的数量)。所述非分裂饲养细胞可以包括 γ 射线辐照以防止细胞分裂的PBMC饲养细胞。在一些替代方式中,用3000rad至3600rad范围内的 γ 射线照射PBMC。在一些替代方式中,所述PBMC用3000rad、3100rad、3200rad、3300rad、3400rad、3500rad或3600rad或任何列出值的任意两个端点之间的任意rad值的 γ 射线照射,以防止细胞分裂。如果需要,可以颠倒向培养基中添加T细胞和饲养细胞的顺序。所述培养物通常可以在适合T淋巴细胞生长的温度等条件下孵育。例

如,对于人类T淋巴细胞的生长,所述温度通常为至少25℃,优选至少为30℃,更优选37℃。在一些替代方式中,人类T淋巴细胞生长的温度为22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃、34℃、36℃、37℃或任何列出值的任何两个端点之间的任何其它温度值。

[0288] 所述扩增的T淋巴细胞可以包括CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和CD4⁺辅助性T淋巴细胞,其对人类肿瘤或病原体上存在的抗原具有特异性。在一些替代方式中,所述细胞包括前体T细胞。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。

[0289] 在一些替代方式中,所述扩增方法可进一步包括添加非分裂的EBV转化的淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用6000rad至10000rad范围内的 γ 射线照射LCL。在一些替代方式中,用6000rad、6500rad、7000rad、7500rad、8000rad、8500rad、9000rad、9500rad或10000rad或在任何列出值的两个端点之间照射任意rad值的 γ 射线照射LCL。可以以任何合适的量提供所述LCL饲养细胞,例如所述LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比例为至少10:1。

[0290] 在一些替代方式中,所述扩增方法可进一步包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如浓度至少为0.5ng/ml)。在一些替代方式中,所述扩增方法可进一步包括向培养基中添加IL-2和/或IL-15(例如,其中所述IL-2的浓度至少为10个单位/ml)。分离T淋巴细胞后,可在扩增前或扩增后将细胞毒性T淋巴细胞和辅助性T淋巴细胞分为幼稚、记忆和效应T细胞亚群。

[0291] 也可以通过使用标准方法获得CD8⁺细胞。在一些替代方式中,通过与每种类型的CD8⁺细胞相关的细胞表面抗原的识别,将CD8⁺细胞进一步分类为幼稚、中央记忆和效应记忆细胞。在一些替代方式中,所述记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚群中。在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后,将PBMC分类为CD62L⁻CD8⁺和CD62L⁺CD8⁺部分。在一些替代方式中,所述中央记忆TCM的表型标记物的表达包括CD45RO⁻、CD62L⁺、CCR7⁺、CD28⁺、CD3⁺和/或CD127⁺,对颗粒酶B为阴性或较低水平。在一些替代方法中,所述中央记忆T细胞为CD45RO⁺、CD62L⁺和/或CD8⁺T细胞。在一些替代方式中,效应TE对CD62L⁺、CCR7⁺、CD28⁺和/或CD127⁺呈阴性,并对颗粒酶B和/或穿孔素呈阳性。在一些替代方式中,所述幼稚CD8⁺T淋巴细胞的特征在于幼稚T细胞的表型标记物(包括CD62L⁺、CCR7⁺、CD28⁺、CD3⁺、CD127⁺和/或CD45RA⁺)的表达。

[0292] 通过识别具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺T辅助细胞分类为幼稚、中央记忆和效应细胞。可以通过标准方法获得所述CD4⁺淋巴细胞。在一些替代方式中,所述幼稚的CD4⁺T淋巴细胞为CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺和/或CD4⁺T细胞。在一些替代方式中,所述中央记忆CD4⁺细胞为CD62L⁺和/或CD45RO⁺。在一些替代方式中,所述效应CD4⁺细胞为CD62L⁻和/或CD45RO⁻。

[0293] 可以借助用对表面标记物特异的抗体和同种型匹配的对照抗体进行的染色通过流式细胞术来确定细胞或细胞群是否对特定细胞表面标记物呈阳性。对标记物呈阴性的细胞群是指相比同种型对照没有特异性抗体对细胞群的显著染色,而呈阳性是指相比同种型对照存在细胞群的均匀染色。

[0294] 在一些替代方式中,一种或多种标记物的表达降低是指在与参考细胞群相比时,表现出标记物的细胞的平均荧光强度损失了1log10和/或百分比减少了至少细胞的20%、细胞的25%、细胞的30%、细胞的35%、细胞的40%、细胞的45%、细胞的50%、细胞的55%、细胞的60%、细胞的65%、细胞的70%、细胞的75%、细胞的80%、细胞的85%、细胞的90%、

细胞的95%和细胞的100%或20%到100%之间的任何百分比。在一些替代方式中,对一种或多种标记物呈阳性的细胞群是指在与参考细胞群相比时,表现出标记物的细胞的百分比为至少细胞的50%、细胞的55%、细胞的60%、细胞的65%、细胞的70%、细胞的75%、细胞的80%、细胞的85%、细胞的90%、细胞的95%或细胞的100%或者50%到100%之间的任何百分比。

[0295] 在一些替代方式中,可以通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞来获得抗原特异性的CD4⁺和CD8⁺群。例如,可以通过如下方式来产生针对巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆:从受感染的受试者分离T细胞并用相同的抗原在体外刺激细胞。也可以使用幼稚T细胞。可以将来自肿瘤细胞的任何数量的抗原用作引发T细胞应答的靶标。在一些替代方式中,过继细胞免疫疗法组合物可用于治疗包括实体瘤和/或血液系统恶性肿瘤在内的疾病或病症。

[0296] 还考虑了用于离体刺激细胞的其它方法。可在用作治疗方法之前将包含半抗原或与珠缀合的半抗原的细胞用于刺激细胞。可以使用带有半抗原的细胞来刺激带有CAR T的细胞;该带有半抗原的细胞通过标准的已知技术通过暴露于半抗原缀合的支持物(例如在珠、孔或皿上)制成。

[0297] 嵌合抗原受体的体内刺激

[0298] 还提供了在患有疾病(例如癌症)的受试者中刺激或再刺激带有嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法。该方法包括:将本文提供的任一替代方式的细胞提供给受试者;监测受试者中所述疾病的抑制;以及将半抗原呈递细胞(H-APC)提供给受试者,其中,任选地选择所述受试者来接受使用CAR T细胞的CAR T细胞疗法,该CAR T细胞具有对疾病相关抗原(例如肿瘤抗原)具有特异性的受体。该细胞可以包含本文任一替代方式的一种或多种载体或者一种或多种核酸或者本文任一替代方式的双特异性嵌合抗原受体。可以在单个载体内或在多个载体内提供一种或多种核酸,以适应两种CAR的有效负载大小。一种或多种载体可以包含本文提供的任一替代方式的核酸。或者,可以使用转座子系统或整合酶系统整合核酸。所述核酸可包含:编码第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包含对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及编码第二嵌合抗原受体的第二序列,其中,所述第二嵌合抗原受体包含对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,提供了多种核酸,其中,所述第一核酸包含编码第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包含对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;其中,所述第二核酸包含编码第二嵌合抗原受体的第二序列,其中,所述第二嵌合抗原受体包含对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对肿瘤细胞抗原具有特异性。在一些替代方式中,由核酸编码的双特异性嵌合抗原受体包括在细胞中。用于双特异性嵌合抗原受体的核酸包括编码对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原特异的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的序列。在一些替代方式中,H-APC为通过用半抗原体外标记健康细胞从受试者的健康细胞产生的。

[0299] H-APC由患者(例如人)的健康细胞或与所述患者相容的细胞产生,并用半抗原对细胞进行离体标记。所述半抗原的示例为荧光素、漆酚、醌或生物素。有多种用半抗原(例如化学物质、肽、适体、脂质或蛋白)标记细胞的方法。如何用半抗原负载细胞的例子包括使目的细胞与荧光素-脂质一起孵育过夜。使用荧光素作为半抗原的一个优点为其的荧光。因此,可以借助流式细胞术通过荧光素部分的荧光来监测半抗原的结合。因此,孵育后,可以去除多余的荧光素-脂质,对一部分细胞进行流动分析以分析半抗原结合,剩余细胞可用于向患者输注。患者输注后,如果没有被CART细胞靶向,H-APC将缓慢丧失半抗原(被代谢、从表面去除等),并恢复到其原始健康细胞形式,表明该方法具有一定安全性。所述半抗原可以与脂质结合以整合到细胞中,从而制备H-APC。

[0300] 在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。在一些实施方式中,所述半抗原可以选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚和/或其的衍生物。在一些替代方式中,包括重复监测和提供步骤。在一些替代方式中,所述受试者患有癌症。在一些替代方式中,所述癌症为实体瘤。在一些替代方式中,选择受试者来接受癌症疗法。在一些替代方式中,使受试者经受联合疗法,例如化学疗法或放射线疗法。

[0301] 细胞的体外刺激

[0302] 在一些替代方式中,提供了离体刺激或再刺激带有嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的方法。在一些情况下,所述方法包括提供本文任一替代方式的细胞;本发明提供半抗原呈递细胞(H-APC)或半抗原;将细胞和H-APC细胞混合,从而制备激活细胞;以及分离激活细胞。所述细胞可以包含本文任一替代方式的一种或多种载体或核酸或者本文任一替代方式的双特异性嵌合抗原受体。可以在单个载体内或在多个载体内提供一种或多种核酸,以适应两种CAR的有效负载大小。所述一种或多种载体可以包含本文提供的任一替代方式的核酸。或者,可以使用转座子系统或整合酶系统整合核酸。所述一种或多种核酸可包含:编码第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包含对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;以及编码第二嵌合抗原受体的第二序列,其中,所述第二嵌合抗原受体包含对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,本发明提供了多种核酸,其中,所述第一核酸包含编码第一嵌合抗原受体的第一序列,其中,所述第一嵌合抗原受体包含对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、第一多肽间隔子、第一跨膜结构域和第一细胞内信号传导结构域;其中,所述第二核酸包含编码第二嵌合抗原受体的第二序列,其中,所述第二嵌合抗原受体包含对半抗原具有特异性的第二配体结合结构域、第二多肽间隔子、第二跨膜结构域和第二细胞内信号传导结构域。在一些替代方式中,所述第一配体结合结构域对肿瘤细胞抗原具有特异性。在一些替代方式中,由核酸编码的双特异性嵌合抗原受体包含在细胞中。用于双特异性嵌合抗原受体的核酸包括包括编码对肿瘤抗原具有特异性的第一配体结合结构域、Gly-Ser连接单元、对半抗原特异的第二配体结合结构域、多肽间隔子、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的序列。在一些实施方式中,所述半抗原选自表1中列出的半抗原。在一些替代方式中,所述H-APC包括半抗原,其中所述半抗原选自表1中所列的半抗原。在一些实施方式中,所述半抗原可选自荧光素、漆酚、醌、生物素或二硝基苯酚或其衍生物。

[0303] 在一些替代方式中,分离激活细胞包括用半抗原复合亲和珠进行亲和分离。在一

些替代方式中,所述分离激活细胞包括用EGFRt、CD19t或Her2tG复合亲和珠进行亲和分离。

[0304] 在一些实施方式中,所述CAR可以具有以下结构:抗FL (FITC-E2) scFv-IgG4铰链-CH₂ (L235D,N297Q) -CH₃-CD28tm/41BB-ζ-T2A-EGFRt。表4中列出了可用于本文提供的方法和组合物的实施方式的示例氨基酸序列。

[0305] 表4

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO:11	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
GM-CSF	
scFv	参见表 3 中的示例
SEQ ID NO:12	ESKYGPPCPPCPAPEFDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ 间隔子 (长): IgG4 铰链 -CH ₂ (L235D)-CH ₃
	DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
SEQ ID NO:13	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS

[0306]

[0307]

间隔子 (中): IgG4 铰链-CH ₃	DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
SEQ ID NO:14 间隔子 (短): IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP
SEQ ID NO:15 CD28tm	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
SEQ ID NO:16 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
SEQ ID NO:17 CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
SEQ ID NO:18 T2A	GGGEGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:19 GM-CSF 受体 ss 至 EGFRt	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK NCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQV CHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKI PSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM

<p>SEQ ID NO:20</p> <p>DHFRdm</p>	<p>MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDFPWPPLRNESRYFQRMTTSSVEG KQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKN D</p>
<p>SEQ ID NO:21</p> <p>双重 CAR 序列: mAb806 VHVL scFv-IgG4 铰链 -CD28tm/CD28gg-ζ -T2A-EGFRt-P2-抗 FL(FITC-E2 Tyr100gAla)scFv-Ig G4 铰链 -CH2(L235D, N297Q)-CH3--CD2 8tm/41BB-ζ-T2A-D HFRdm-epHIV7.2</p>	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGY SITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRSITRDT KNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRGFPYWGQGLVTVSAGSTSGS GKPGSGEGSTKGDILMTQSPSSMSVSLGDTV SITCHSSQDINSNIGWL QQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSEDF DY YCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKRESKYGPPCPPMFWVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRLEGSGEGRGSL TCGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTV KEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN LLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG PHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFMGSGATNFSLLKQA GDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPSVLTQPSSVSAAPGQKV TISCSGSTS NIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSG SKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGKLTVLGG GGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSF SMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNKNS</p>

[0308]

[0309]

VYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFASYMDVWGQGL
 VTVSESKYGPPCPPAPEFDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
 KMFWVLLVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
 ELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
 GSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMVGSLLNCIVAVSQNMIGKNGDFPW
 PPLRNESRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRI
 NLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG
 SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPG
 VLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

[0310] 实施例

[0311] 实施例1制备具有连接半抗原的细胞

[0312] 通过整合磷脂或抗体将半抗原与荧光素 (FL) 连接到细胞以制备半抗原标记的细胞。用 $5\mu\text{M}$ FL-DHPE (图3B) 或用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗D19抗体将CD19+Raji细胞 (淋巴瘤细胞系) 孵育20分钟。对细胞进行洗涤、染色, 并通过流式细胞术分析是否存在FL。与未处理的对照细胞相比, 两种细胞的半抗原FL均显示正位移 (positive shift)。与用抗D19抗体处理的细胞相比, 用FL-DHPE处理的细胞的FL水平更高 (图4A)。这与在细胞表面提供不同水平半抗原的不同连接技术一致。

[0313] 在FBS的存在下 (这可以减少磷脂整合到细胞表面中的量) 将K562细胞 (白血病细胞系) 用 $0.5\mu\text{M}$ 或 $5\mu\text{M}$ FL-PLE (图3A) 孵育过夜。通过流式细胞术分析FL-PLE整合到细胞中的水平。与用 $0.5\mu\text{M}$ FL-PLE处理的细胞相比, 在用 $5\mu\text{M}$ FL-PLE处理的细胞中检测到较高的FL水平 (图4B)。与未处理的对照细胞相比, 在用 $0.5\mu\text{M}$ FL-PLE处理的细胞中检测到较高的FL水平。因此, 可以调节FL-PLE的浓度, 以改变细胞表面上的FL水平。通过改变连接剂 (例如FL-PLE) 的浓度, 也可以改变细胞表面上的半抗原 (例如FL) 的密度。

[0314] 将Be2细胞 (神经母细胞瘤细胞系)、U87细胞 (胶质母细胞瘤细胞系) 和daoy细胞 (髓母细胞瘤细胞系) 用 $5\mu\text{M}$ FL-PLE孵育过夜, 并通过流式细胞术进行分析。FL-PLE整合到每种细胞系中, 其中U87细胞和daoy细胞的FL水平高于Be2细胞 (图4C)。这证明了不同细胞类型掺入FL-PLE, 并且可以掺入不同水平的FL-PLE。

[0315] 实施例2连接半抗原的可及性

[0316] 为了确认在细胞上负载的半抗原的细胞外可及性, 将U87细胞用 $5\mu\text{M}$ FL-PLE孵育

过夜,然后通过共聚焦显微术进行成像以确认FL部分在细胞中的定位。用DAPI染色细胞核。在整个细胞表面观察到绿色荧光染色。因此,FL-PLE整合在整个细胞表面上(图5A)。左侧显示的是全叠加共聚焦图像。每个全叠加共聚焦图像的右侧是构成全叠加共聚焦图像的每一层((i)核和(ii)FL-PLE)的灰度图像。

[0317] 为了确定FL部分在细胞表面上的可及性,用缀合有Alexa Fluor 647荧光团的抗荧光素抗体对标记有FL-PLE的细胞进行染色。在整个细胞表面观察到抗荧光素抗体染色(图5B)。这证实了FL部分可与细胞外结合。左侧显示的是全叠加共聚焦图像。每个全叠加共聚焦图像的右侧是构成全叠加共聚焦图像的每一层((i)核、(ii)FL-PLE和(iii)抗荧光素-Alexa Fluor647抗体)的灰度图像。

[0318] 实施例3连接半抗原的细胞表面的保留

[0319] 将Be2细胞或U87细胞在5 μ M FL-DHPE或5 μ M FL-PLE存在下孵育过夜。洗涤细胞以除去任何残留的FL-DHPE或FL-PLE,然后在新鲜培养基中培养4天。通过流式细胞术分析细胞。用FL-DHPE或FL-PLE处理的细胞在至少4天的时间内保留FL(图6A和图6B)。与FL-DHPE处理的细胞相比,FL-PLE处理的细胞在第4天时具有更高的FL水平。这与为半抗原提供在细胞表面上不同的存在时间的磷脂等不同的连接剂相一致。

[0320] 实施例4连接半抗原的识别和抗半抗原CAR T细胞的激活

[0321] 制备半抗原标记的细胞。CD19+K562细胞用5 μ M FL-DHPE孵育过夜或用FITC标记的CD19抗体孵育20分钟。将半抗原标记的细胞与两种抗L-CAR T细胞(FITC-E2单链抗体或4M5.3单链抗体)中的任一个孵育。使用与Hudecek M等人(2013)中所述的方法基本相似的方法对CAR T细胞进行细胞毒性、细胞因子释放和增殖测定。Hudecek M, et al., (2013). Hudecek M, et al., (2013) Clin Cancer Res. 19:3153-64通过引用将其全文并入本文。

[0322] 使用铬释放测定法来确定抗FL CAR T细胞对半抗原标记的细胞的裂解能力。未标记的对照K562细胞并未诱导抗FL (FITC-E2) CAR T细胞或抗FL (4M5.3) CAR T细胞所致的裂解(图7A,左上图)。阳性对照(其包括使用可以通过TCR来激活T细胞的OKT3细胞)证明了对于抗FL (FITC-E2) CAR T细胞或抗FL (4M5.3) CAR T细胞可以诱导裂解(图7A,右上图)。两种半抗原标记的细胞均诱导了两种抗FL CAR T细胞中的每一种所致的裂解(图7A,下图)。

[0323] 测定抗FL CAR T细胞释放的细胞因子水平。两种半抗原标记的细胞在与抗FL (4M5.3) CAR T细胞接触时均诱导IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的释放(图7B)。对于与抗FL (4M5.3) CAR T细胞接触的半抗原标记细胞所释放的IFN- γ 和TNF- α 水平较低。此外,与用FITC标记的CD19抗体制备的半抗原标记细胞相比,用FL-DHPE制备的半抗原标记细胞具有诱导更高水平的细胞因子释放的趋势。

[0324] 实施例5连接半抗原的识别和抗半抗原CAR T细胞的激活

[0325] 制备半抗原标记的细胞。K562细胞用0.5 μ M或5 μ M FL-PLE孵育过夜。通过流式细胞术分析FL-PLE的细胞整合情况。将半抗原标记的细胞与抗L-CAR T细胞孵育,并测量半抗原标记细胞诱导抗FL CART淋巴细胞特异性裂解活性和细胞因子释放活性的能力。

[0326] 与用0.5 μ M FL-PLE处理的细胞或未处理的对照细胞相比,在用5 μ M FL-PLE处理的细胞中检测到更高水平的FL(图8A)。与用0.5 μ M FL-PLE处理的细胞或未处理的对照细胞相比,用5 μ M FL-PLE处理的细胞也观察到更高水平的裂解和细胞因子释放(图8B和图8C)。因此,具有连接细胞外FL部分的FL-PLE处理的细胞被抗FL CAR T细胞识别,并可激活抗FL

CART细胞。抗FL CAR T细胞激活水平可能与半抗原标记细胞表面的FL水平相关。

[0327] 实施例6抗半抗原CAR T细胞的体外扩增

[0328] 通过将载体转导到T细胞中而产生CD4⁺和CD8⁺抗FL CAR T细胞。18天后,使用标准快速扩增方案(REP)借助经辐照的TM-LCL和PBMC对转导的细胞进行第一次扩增。通过使用标准REP或荧光素REP(FREP)对扩增的细胞进行第二次扩增。对于FREP,将细胞与已用FL-*PLE*处理的饲养细胞一起孵育。第二次扩增14天后,通过流式细胞术、特异性裂解测定和细胞因子释放测定对细胞进行分析。对于特异性裂解测定和细胞因子释放测定,将扩增的抗FL CAR T细胞与已用FL-*PLE*孵育过夜的K562细胞一起孵育。通过流式细胞术分析FL-*PLE*的细胞整合(图9B)。

[0329] 用REP或FREP扩增的细胞表达相似的表型标志物(图9A)。已使用FREP扩增的CD8⁺抗FL CAR T细胞与已使用REP扩增的CD8⁺抗FL CAR T细胞具有基本相似的细胞毒性活性(图9C)。已使用FREP扩增的CD8⁺抗FL CAR T细胞与已使用REP扩增的CD8⁺抗FL CAR T细胞还具有基本相似的细胞因子释放活性(图9D)。已使用FREP扩增的CD4⁺抗FL CAR T细胞与已使用REP扩增的CD4⁺抗FL CAR T细胞也具有基本相似的细胞毒性活性和细胞因子释放活性。因此,用半抗原(例如FL)标记的细胞可以诱导CAR T细胞扩增,并且这种扩增的CAR T细胞与使用经辐照的TM-LCL和PBMC扩增的CAR T细胞具有基本相似的活性。

[0330] 实施例7使用DNP-*PLE*产生具有连接的细胞外暴露半抗原(特别是DNP)的细胞

[0331] 在完全培养基存在下将MDA-MB-231(腺癌)细胞用DNP-*PLE*孵育过夜。在用抗DNP-AlexaFluor 488抗体对暴露的DNP分子(DNP不具有荧光)进行细胞染色后,通过流式细胞术分析DNP-*PLE*的细胞整合。如图11A中的对照数据所示,在MDA-MB-231亲本和用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231细胞之间几乎没有观察到移位。这是意料之中的,因为没有DNP暴露在MDA-MB-231细胞的表面上。

[0332] 与对照MDA-MB-231亲本相比,用5 μ M DNP-*PLE*孵育并用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本有明显移位(图11B),而用50nM DNP-*PLE*孵育并用抗DNP-AlexaFluor 488抗体染色的MDA-MB-231亲本具有较小移位(图11D)。移位的差异对应于暴露于细胞表面以用于CAR T细胞识别的DNP的量的差异。通过更改化学物质(DNP)的浓度,细胞表面上半抗原的密度也可发生改变。用500nM DNP-*PLE*孵育的MDA-MB-231亲本细胞表面上暴露的DNP量介于用50nM和5 μ M的DNP-*PLE*孵育的MDA-MB-231亲本细胞表面上暴露的DNP量之间(图11C)。图11A-图11D中数据的直方图在图11E中示出。

[0333] 这些数据表明,使用DNP-*PLE*成功产生了具有连接的细胞外暴露半抗原(特别是DNP)的细胞。

[0334] 实施例8确认抗DNPCAR识别负载的DNP-*PLE*上的DNP的能力

[0335] 向MDA-MB-231(腺癌)细胞负载5 μ M DNP-*PLE*、1 μ M DNP-*PLE*或无DNP-*PLE*并过夜、洗涤,然后通过共聚焦显微术成像来确定DNP-*PLE*整合到细胞中的位置。用DAPI对细胞核进行染色(i)。用小麦胚芽凝集素(WGA)对细胞表面进行染色(ii)。由于DNP不具有荧光(如图12B所示),用抗DNP-Alexa Fluor 488抗体对DNP部分进行染色(iii)。在(iii)中观察到抗DNP抗体的荧光,并证实了DNP-*PLE*在整个细胞表面上整合(图12C、图12D)。这些图像表明了由于抗体能够结合,因此DNP部分对于结合而言是可及的。图12C比图12D更亮,这与表面上暴露的DNP的量有关。(图12A)示出了仅MDA-MB-231亲本细胞的对照图像,并且,如图像中没有染

色所显示的,抗DNP抗体无法结合-抗DNPAB无法染色,因为表面上没有DNP。在图12A-图12D中,左侧的图像示出了各自的图中的图像(i)-图像(iv)的全叠加共聚焦图像。每个全叠加共聚焦图像的右侧是构成全叠加共聚焦图像的每一层((i)核、(ii)细胞表面和(iii)DNP-PLE)的灰度图。

[0336] 因此,证实了抗DNP CAR细胞识别DNP-PLE负载DNP的能力。

[0337] 实施例9确认细胞上负载半抗原的细胞外可及性以及膜中负载PLE

[0338] 图13A示出了抗DNP CAR的第二代长CAR盒的示意图。所述第二代长CAR盒包含双突变的二氢叶酸还原酶的基因(所述基因允许对CAR阳性细胞的甲氨蝶呤选择)和EGFRt的基因(所述基因是与CAR阳性相关的表面标志物)。

[0339] 将图13A的质粒转导到H9细胞(对CD4⁺和CD3⁺呈阳性的皮肤T淋巴细胞)中,然后进行甲氨蝶呤筛选以得到纯抗DNP CAR群。利用表面标志物EGFRt的染色来确定抗DNP CAR H9细胞的纯度。在细胞染色后通过流式细胞术对细胞进行分析,流式图显示出92%阳性的抗DNP CAR H9细胞群。

[0340] 将MDA-MB-231(腺癌)细胞负载或不负载5 μ M DNP-PLE,洗涤,与纯抗DNP CAR H9细胞共培养,并通过共聚焦显微术成像来确定暴露在细胞表面上的DNP和抗DNP CAR之间是否存在识别(图13C和图13D)。该实验分为两组:与抗DNP CAR H9细胞共培养的MDA-MB-231细胞(图13C)和与抗DNP CAR H9细胞共培养负载有5 μ M DNP-PLE的MDA-MB-231细胞(图13D)。用DAPI对细胞核进行染色(i)。用小麦胚芽凝集素(WGA)对细胞表面进行染色(ii)。由于DNP不具有荧光,用抗DNP Alexa Fluor 488抗体对DNP部分进行染色((iii)和(iv))。为了从MDA-MB-231中确定CAR H9细胞,用抗CD3抗体对CAR H9细胞进行染色(红色)。每个彩色图像下面是构成全共聚焦图像的每一层((i)细胞核、(ii)细胞表面、(iii)和(iv)DNP-PLE,抗DNP CAR H9细胞)的灰度图像。图13C显示靶标和效应物之间没有结合。图13D显示了靶标和效应物之间的相互作用。在图13C中,左上方图像示出了图13C的图像(i)-图像(iv)的全叠加共聚焦图像。在图13D中,左上方图像示出了图13D的图像(i)-图像(iv)的全叠加共聚焦图像。这些图像显示了细胞间的突触形成,由此证实了抗DNP CAR对暴露于靶细胞表面上的DNP的识别。这在图13D(iv)中很清楚,其中可见突触延伸到靶细胞内部。

[0341] 因此,证实了细胞上负载半抗原的细胞外可及性以及PLE在膜中的负载。数据显示了抗DNP CAR的产生和使用抗DNP抗体在细胞表面上的DNP可及性,从而证明抗DNP CAR可以结合暴露于在细胞表面的DNP。

[0342] 实施例10 CD19 CAR转导的T细胞在体外针对多种靶标和非自体T-APC细胞因子的产生

[0343] 数据涉及诱导CD19 CAR T细胞激活与特异性细胞因子产生的相关性。对于细胞因子产生分析,将纯CD8⁺CD19 CAR T细胞和CD8⁺空白对照T细胞[在CD3 CD28微珠刺激继以快速扩增方案后8天使用细胞](效应物)相对于一组CD19特异性靶细胞以2:1的比例铺板,然后孵育24小时。靶细胞为K562亲本(阴性对照)、K562 OKT3(阳性对照)、K562 CD19和非自体的临床制备的混合CD4⁺/CD8⁺截短CD19(CD19t)转导的抗原呈递细胞(T-APC)(阳性靶标,与实施例11中使用的靶标相同)。分析上清液中是否存在细胞因子。进行BioPlex测定以确定IL-2、TNF- α 和IFN- γ 产生的水平。当与所有CD19特异性靶细胞(包括非自体CD4/CD8T-APC)共培养时,CD19 CAR T细胞均产生大量细胞因子。在不表达CD19的K562亲本细胞系中未检

测到细胞因子的产生。该实验表明,非自体T-APC可以通过产生特异性细胞因子来激活CD19CAR T细胞。

[0344] 因此,证实了CD19 CAR转导的T细胞从非自体T-APC产生细胞因子。

[0345] 实施例11自体T-APC体外激活

[0346] 将临床制备的混合CD4+/CD8+截短CD19 (CD19t) 转导的抗原呈递细胞 (T-APC) 染色,并通过流式细胞术分析细胞表面上的CD19t和截短EGFR (EGFRt) 的表达。CD19t T-APC对于CD19t为63%阳性,并且如所预料的,缺乏EGFRt表达,表明CAR阴性(图15A)。临床制备自体CD4+和CD8+转导的CD19 CAR T细胞,并借助快速扩增方案 (REP) 通过以下方式进行扩增:在存在rhIL-2和rhIL-15的情况下,以7:1的饲养细胞与T细胞比例,用经辐照的CD19+饲养细胞 (TM-LCL) 进行刺激。在扩增培养的第7天,将细胞染色并通过流式细胞术检查EGFRt表达。对于与CAR表达相关的EGFRt表达,CD4+和CD8+转导的CD19 CAR T细胞均显示出99.9%阳性(图15B)。

[0347] 在扩增培养的第7天,借助Bio-Rad公司生产的Bio-Plex分析试剂盒在共培养24小时之后通过评估效应物与靶标比例为2:1的上清液,检查了CD19t T-APC (图15A) 以及CD4+和CD8+CD19 CAR T细胞 (图15B) 的细胞因子产生。将CD4+和CD8+CD19 CAR T细胞以及CD4+/CD8+CD19t T-APC细胞与CD19t T-APC细胞、K562-CD19+ (将K562亲本修饰为表达CD19) 细胞、K562-OKT3 (将K562亲本修饰为表达激动剂OKT3scFv以用作通用阳性对照) 细胞以及K562亲本 (阴性靶标) 细胞共培养24小时。收集上清液并冷冻至分析细胞因子的存在 (图15C)。经过Bio-Plex分析后,CD4+和CD8+CD19 CAR T细胞显示出抗CD19特异性细胞因子产生,因为其仅在K562 CD19+细胞和CD19t T-APC细胞或K562 OKT3阳性对照细胞系存在时才能够产生细胞因子。正如预期的那样,CD4+/CD8+T-APC仅在K562 OKT3细胞系存在时才能够产生细胞因子。虽然CD19t T-APC与CD4+和CD8+CD19 CAR T细胞的共培养产生低水平的细胞因子,但其产生的水平有效激活了自体CD19 CART细胞并导致了巨大的临床成功 (参见实施例13和图17A-图17D)。

[0348] 这些数据表明自体T-APC可以在体外激活。

[0349] 实施例12自体半抗原-APC体外激活

[0350] 将K562白血病细胞 (图16A) 和原代CD8+T细胞 (图16B) 在有或没有5 μ M FL-PLE的情况下孵育过夜,并通过流式细胞术检测荧光。流式细胞术分析显示FL阳性,表明荧光素半抗原成功负载至细胞。用细胞因子释放测定测量了负载FL-PLE的细胞激活抗FL CAR T细胞的能力 (图16C)。将自体CD4+抗FL CAR效应T细胞或自体原代CD8+T细胞与一组负载有FL-PLE的细胞共培养24小时,并分析上清液中是否存在指定的细胞因子。在CD3 CD28微珠刺激和两种扩增方案后21天,使用自体CD8+T细胞和CD4+抗FL CAR T细胞。当与负载FL-PLE的K562细胞以及负载FL-PLE的自体CD8+细胞 (H-APC) 共培养时,抗FL CAR T细胞均产生细胞因子。如预期的那样,在未负载FL-PLE的K562亲本细胞系或缺乏CAR表达的CD8+T细胞的情况下未检测到细胞因子产生,而阳性对照细胞系K562 OKT3+ (非CAR、TCR介导的激活) 产生细胞因子。在体外,细胞因子的产生水平与体外转导的APC (T-APC) 的水平相当 (图15A-图15C), 其已证明对患者有效 (参见实施例13和图17A-图17D)。

[0351] 相信在动物模型和临床受试者/患者 (例如在临床试验和治疗中) H-APC将在体内表现出与T-APC相同的功效。

[0352] 这些数据表明,自体半抗原-APC可以在体外激活。

[0353] 实施例13外周血(PB)中的CART细胞持续性。

[0354] 研究了两名儿童ALL患者连续施用T-APC后,外周血(PB)中CAR T细胞的持久性。数值显示为淋巴细胞百分比(图17A)或细胞/ μ l(图17B)。患者在第0天接受CD19 CAR T细胞输注(空心三角形),并通过CAR转导标志物EGFRt的表面染色纵向监测持久性(实心圆)(图17A和图17B)。通过对CD19+B细胞进行染色监测ALL的量(空心菱形)。患者在第0天接受含有用于监测的表面标志物EGFRt的CD19 CAR T细胞(实心圆)。到第10天,ALL迅速消退至无法检测的量。到第10天(C1.D10),在PB中无法检测到CD19+B细胞,这似乎与CAR T细胞的快速植入有关。第10天后,CAR T细胞的持久性逐渐下降。由于CAR T细胞没有以足够高的水平持续,为了增强持久性,患者在指定时间点接受连续剂量的转导抗原呈递细胞(T-APC)(实心三角形)。T-APC为经工程化以表达CD19表面抗原的自体T细胞。患者接受了转导抗原呈递细胞(T-APC),其中自体T细胞表达CD19表面蛋白(CAR T细胞靶标)。T-APC表达在CD19+B细胞上未见的CD3抗原,从而可以区分两种CD19+群。该患者接受了五次T-APC输注。在每个剂量的T-APC后,CAR T细胞都会扩增,这转而又阻止了ALL的复发。随时间监测CD19+T-APC(半空心方块),并通过CD3表达将其与CD19+B细胞区分开。每次输注T-APC后观察到CD19 CAR T细胞的阵发性(episodic)扩增,这似乎与延长的CD19+B细胞发育不良有关。来自图17B中患者的患者外周血的多参数流式的实例显示了在第2次施用T-APC后在第1天检测CD19+T-APC(图17C)和在第3次施用T-APC后在第14天在PB中检测到的EGFR+CAR T细胞(图17D)。这些数据表明,患者的外周血(PB)中存在CAR T细胞。

[0355] 实施例14用FL-PLE标记外周血单个核细胞

[0356] 从血锥(blood cone)中分离外周血单个核细胞(PBMC)。依次通过的CD8+和CD4+磁珠分离从PBMC中去除T细胞。去除T细胞的PBMC如图18A和图18D所示。具体地,图18A显示了PBMC的细胞群,图18D显示了所述细胞上的FL-PLE的负载量。用5 μ M FL-PLE对分离“PBMC(大量减少T细胞)”中的一些剩余的PBMC细胞进行染色(图18B和图18E)。细胞染色后,通过流式细胞术分析所述细胞,并将所述负载FL-PLE的PBMC(大量减少T细胞)细胞在新鲜冷冻培养基中冷冻。随后,细胞冷冻后进行解冻,并通过流式细胞术对其进行分析(图18C和图18F)。用FL-PLE染色的两个样品(图18E和图18F)都显示出完全的蓝移,未染色的PBMC(大量减少T细胞)(图18D)未蓝移,表明用FL-PLE染色的两个样品中的FL-PLE结合到PBMC(大量减少T细胞)中。这表明细胞可以与FL-PLE结合并经历冻融循环,并且FL-PPE可以对PBMC的所有不同细胞群(大量减少T细胞)进行染色。因此,所述细胞可以用FL-PLE标记,经历冷冻和解冻后仍保持FL-PLE标记。

[0357] 实施例15半抗原特异性CAR T细胞的体外扩增

[0358] 用编码第二代抗荧光素(FL)CAR的多核苷酸基因盒转导实施例14中从PBMC分离的T细胞,所述多核苷酸基因盒包括一个长间隔子。使用了两种不同的抗FL CAR:FITC-E2和FITC-E2 Try100gAla。每个基因盒包括编码用于CAR阳性细胞的甲氨蝶呤选择的双突变二氢叶酸还原酶的可选择基因;和编码细胞表面选择标记物的基因,截短的CD19多肽(CD19t)。

[0359] 用甲氨蝶呤选择细胞,以获得CAR阳性细胞的同质群。使用经辐照的TM-LCL和PBMC对细胞进行标准快速扩增方案(REP)(图19A)。使用以7:1靶效应比负载5 μ M FL-PLE的辐照

TM-LCL进行荧光素REP (FREP) (图19B)。如图19C和图19D所示,分别使用以7:1或14:1的靶效应比负载5 μ M FL-PLE的辐照自体PBMC (大量减少T细胞) 进行FREP。如图19E所示,使用以7:1的靶效应比负载5 μ M FL-PLE的冷冻、解冻和辐照的自体PBMC (大量减少T细胞) 进行FREP。使用标准REP扩增抗FL CAR T细胞和模拟T细胞。然而,只有抗FL CAR T淋巴细胞能够使用FREP进行大规模地扩增,尤其是使用负载5 μ M FL-PLE的自体PBMC (大量减少T细胞)。该数据表明,用荧光素标记的自体细胞能够在体外产生抗FL CART细胞的扩增。

[0360] 实施例16通过半抗原-APC在体内扩增半抗原特异性CAR T细胞

[0361] 在第0天,向20只NSG小鼠静脉注射 (IV) 同种抗荧光素 (antiFL) CAR T细胞。所述CAR T淋巴细胞中约40%还含有编码mCherry和萤火虫荧光素酶 (mCherryffLuc) 融合蛋白的基因。所述融合蛋白可以用于生物发光成像定量跟踪T细胞的存在。生物发光信号的增加将指示抗FL CAR T细胞的扩增。将小鼠分为四组:(A) 仅接受抗FL CAR T细胞(对照组); (B) 在第1天、第4天和第10天接受抗L CAR T细胞和静脉注射 (IV) 20e6照射的TM-LCL; (C) 在第1天、第4天和第10天接受抗FL CAR T细胞和静脉注射 (IV) 负载5 μ M FL-PLE (半抗原-APC) 的5e6辐照TM-LCL; 和 (D) 在第1、4和10天接受静脉注射 (IV) 负载5 μ M FL-PLE (半抗原-APC) 的20e6辐照TM-LCL。两组 (A) 和 (B) 的抗FL CAR T细胞的扩增最少。B组未进行显著扩增的事实表明, TM-LCL细胞不能单独扩增CAR T细胞。(C) 组和 (D) 组在每次静脉注射 (IV) 半抗原-APC后表现出扩增。在第二次注射半抗原-APC后, (C) 和 (D) 两组均显示出扩增,随后为抗L-CAR T细胞的初始回归,随后是第三次注射半抗原-APC的亚序列的另一次扩增。结果如图20A-20E所示。该数据证明了半抗原-APC在体内重复扩增半抗原特异性CAR T细胞的能力。

[0362] 本文中使用的术语“包括”与“包含”、“含有”或“特征在于”为同义词,具有包括性或开放性,不排除其它未叙述的要素或方法步骤。

[0363] 上述描述公开了本发明的几种方法和材料。本发明允许对方法和材料进行修改,并允许改变制造方法和设备。通过考虑本公开或本文公开的发明的实践,此类修改对于本领域技术人员来是显而易见的。因此,本发明并不局限于本文公开的具体实施例,而是涵盖了落入本发明真实范围和精神范围内的所有修改和替代方式。

[0364] 本文引用的所有参考文献 (包括但不限于已公开和未公开的申请、专利和参考文献) 通过引用全部并入本文,并构成本说明的一部分。如果通过引用并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中包括的公开内容范围相矛盾时,本说明书旨在取代和/或优先于任何此类矛盾的材料。

Ser Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg
 210 215 220
 Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Gly His Phe Tyr Ser Tyr Met Asp
 225 230 235 240
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 245 250

<210> 2

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FITCE2 TyrH133Ala scFv

<400> 2

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

Ser Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg
 210 215 220
 Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Gly His Phe Ala Ser Tyr Met Asp
 225 230 235 240
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 245 250
 <210> 3
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FITCE2 HisH131Ala scFv
 <400> 3
 Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val
 1 5 10 15
 Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Glu
 85 90 95
 Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ser Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Leu Ser
 165 170 175

Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ser
210 215 220

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250

<210> 4
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4M5.3 scFv
<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala
115 120 125

Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ala Met Lys Leu Ser Cys Val
145 150 155 160

Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln
165 170 175

Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro
 180 185 190
 Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 195 200 205
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn
 210 215 220
 Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr
 225 230 235 240
 Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 245 250
 <210> 5
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 4D5Flu scFv
 <400> 5
 Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu
 20 25 30
 Val His Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gln Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 100 105 110
 Glu Leu Lys Arg Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 165 170 175

Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser
 210 215 220
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265

<210> 6

<211> 244

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4420

<400> 6

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

Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln
 165 170 175
 Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 180 185 190
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr
 195 200 205
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 7

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗DNP scFv

(来自兔子的VH 至VL)

<400> 7

cagtgtcagc agctggagca gtccggagga ggagccgaag gaggcctggt caagcctggg 60
 ggatccctgg aactctgctg caaagcctct ggattctccc tcagtagtag ctactgcata 120
 tgttgggtcc gccaggctcc agggaagggg ctggagtgga tcggatgcat ttatgctggt 180
 agtagtggtg gcacttacta cgcgagctgg gtgaatggcc gattcactct ctccagagac 240
 attgaccaga gcacaggttg cctacaactg aacagtctga cagccgcgga cacggccatg 300
 tattactgtg cgagagcccc ctatagtagt ggctgggtcc tctactttaa cttgtggggc 360
 ccaggcacc caggcattgt ctctcaggc ggagggggct ctggcggcgg aggatctggg 420
 ggagggggca gcccaggtgc cacatttgcc caagtgctga cccagactcc atcgccctgtg 480
 tctgcagctg tgggaggcac agtcaccatc agttgccagt ccagtgagag tgtttatggt 540
 aacagccgct tagcctggta tcagcagaaa ccagggcagt ctccaagct cctgatctat 600
 tatgcatcca ctctggcate tggggteect tcgcggtta aaggcagtgg atctgggaca 660
 cagttcactc tcaccattag cgacctggag tgtgacgatg ctgcctctta ctactgtcaa 720
 ggcggttatt atagtggtaa tcttgatgcg cttgctttcg gcggaggac cgaggtggtg 780
 gtcagaggt 789

<210> 8

<211> 161

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗DNP scFv

(来自兔子的VH 至VL)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗DNP scFv

(来自兔子的VH 至VL)

<400> 9

ccagtgcca catttgccca agtgctgacc cagactccat cgctgtgtc tgcagctgtg 60
 ggaggcacag tcaccatcag ttgccagtc agtgagagtg tttatggtaa cagccgctta 120
 gcctggatc agcagaaaacc agggcagtct cccaagctcc tgatctatta tgcattcact 180
 ctggcatctg gggtccttc gcggttcaaa ggcagtggat ctgggacaca gttcactctc 240
 accattagcg acctggagtg tgacgatgct gcctcttact actgtcaagg cggttattat 300
 agtggtaatc ttgatgcgct tgctttcggc ggagggaccg agtggtggt cagaggtggc 360
 ggaggggggct ctggcggcgg aggatctggg ggagggggca gccagtgtca gcagctggag 420
 cagtccggag gaggagccga aggaggcctg gtcaagcctg ggggatccct ggaactctgc 480

tgcaaagcct ctggattctc cctcagtagt agctactgca tatgttgggt ccgccaggct 540
 ccaggggaagg ggctggagtg gatcggatgc atttatgctg gtagtagtgg tagcacttac 600
 tacgcgagct gggatgaatgg ccgattcact ctctccagag acattgacca gagcacaggt 660
 tgccctacaac tgaacagtct gacagccgcg gacacggcca tgtattactg tgcgagagcc 720
 ccctatagta gtggctgggt cctctacttt aacttgtggg gcccaggcac cctggtcatt 780
 gtctcctca 789

<210> 10

<211> 263

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗DNP scFv

(来自兔子的VH 至VL)

<400> 10

Pro	Gly	Ala	Thr	Phe	Ala	Gln	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Pro	Val
1				5					10					15	
Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Gln	Ser	Ser	Glu
			20					25				30			
Ser	Val	Tyr	Gly	Asn	Ser	Arg	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
		35					40				45				
Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly
		50				55					60				
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu
65				70					75					80	
Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln
				85					90					95	
Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly
				100				105				110			
Thr	Glu	Val	Val	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
				115				120				125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Cys	Gln	Gln	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Gly
				130			135				140				
Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Cys
145					150					155				160	
Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Cys	Ile	Cys	Trp
				165						170				175	
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Cys	Ile	Tyr
				180				185					190		
Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Val	Asn	Gly	Arg

	195		200		205
Phe Thr Leu Ser Arg Asp Ile Asp Gln Ser Thr Gly Cys Leu Gln Leu					
210		215		220	
Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala					
225		230		235	240
Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Val Leu Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly					
	245		250		255
Thr Leu Val Ile Val Ser Ser					
	260				
<210> 11					
<211> 22					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> GM-CSF					
<400> 11					
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro					
1	5		10		15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro					
	20				
<210> 12					
<211> 229					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 间隔子 (长): IgG4铰链-CH2 (L235D) -CH3					
<400> 12					
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe					
1	5		10		15
Asp Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
	20		25		30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
	35		40		45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					
50		55		60	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser					
65		70		75	80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu					
	85		90		95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 间隔子 (中): IgG4 铰链-CH3
 <400> 13
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 20 25 30
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 17

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
1				5				10					15		
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
		50				55					60				
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65				70						75				80	
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85						90				95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
			100					105					110		

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 18

Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	Val	Glu
1				5				10					15		
Glu	Asn	Pro	Gly	Pro											
				20											

<210> 19

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GM-CSF受体ss至EGFRt

<400> 19

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5						10				15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly
				20						25				30	

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

	340	345	350
Ile Gly Leu Phe Met			
	355		
<210> 20			
<211> 187			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> DHFRdm			
<400> 20			
Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly			
1	5	10	15
Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ser			
	20	25	30
Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln			
	35	40	45
Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys			
	50	55	60
Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu			
65	70	75	80
Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp			
	85	90	95
Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met			
	100	105	110
Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His			
	115	120	125
Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu			
	130	135	140
Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu			
145	150	155	160
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile			
	165	170	175
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp			
	180	185	
<210> 21			
<211> 1751			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 双重CAR 序列: mAb806 VHVL
 scFv-IgG4铰链-CD28tm/CD28gg-Zeta-T2A-EGFRt-P2-抗FL (FITC-E2
 Tyr100gAla) scFv-IgG4铰链-CH2 (L235D,
 N297Q)-CH3--CD28tm/41BB-zeta-T2A-DHFRdm-epHIV7.2

<400> 21

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5						10				15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser
				20				25						30	
Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly
				35				40						45	
Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	Phe	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro
				50			55					60			
Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr
65					70					75				80	
Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr
					85					90				95	
Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ile	Glu	Asp
					100					105				110	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Thr	Ala	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Tyr	Trp
					115					120				125	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser
										135				140	
Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Met
145						150					155			160	
Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Thr	Val	Ser
						165					170			175	
Ile	Thr	Cys	His	Ser	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Asn	Ile	Gly	Trp	Leu
						180					185			190	
Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Ile	Tyr	His	Gly	Thr
														205	
Asn	Leu	Asp	Asp	Glu	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
											220				
Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala
225						230					235				240
Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Ala	Gln	Phe	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly
														255	
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
														270	

Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 275 280 285
 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 290 295 300
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 305 310 315 320
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 325 330 335
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 340 345 350
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 355 360 365
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 370 375 380
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 385 390 395 400
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 405 410 415
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 435 440 445
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Ser Gly Glu Gly
 450 455 460
 Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 465 470 475 480
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 485 490 495
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 500 505 510
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 515 520 525
 Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
 530 535 540
 Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 545 550 555 560
 Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 565 570 575
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

	580		585		590
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala					
	595		600		605
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu					
	610		615		620
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr					
625		630		635	640
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys					
	645		650		655
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly					
	660		665		670
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu					
	675		680		685
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys					
	690		695		700
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu					
705		710		715	720
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met					
	725		730		735
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala					
	740		745		750
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val					
	755		760		765
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His					
	770		775		780
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro					
785		790		795	800
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala					
	805		810		815
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly					
	820		825		830
Ile Gly Leu Phe Met Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys					
	835		840		845
Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val					
	850		855		860
Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile					
865		870		875	880
Pro Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln					
	885		890		895

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 900 905 910
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
 915 920 925
 Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 930 935 940
 Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln
 945 950 955 960
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 965 970 975
 Ser Glu Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 980 985 990
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 995 1000 1005
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 1010 1015 1020
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ser Met
 1025 1030 1035 1040
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly
 1045 1050 1055
 Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1060 1065 1070
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln
 1075 1080 1085
 Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 1090 1095 1100
 Arg Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Gly His Phe Ala Ser Tyr Met
 1105 1110 1115 1120
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Glu Ser Lys Tyr
 1125 1130 1135
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Asp Gly Gly Pro
 1140 1145 1150
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 1155 1160 1165
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 1170 1175 1180
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 1185 1190 1195 1200
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val

	1205	1210	1215
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	1220	1225	1230
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys			
	1235	1240	1245
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	1250	1255	1260
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
1265	1270	1275	1280
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	1285	1290	1295
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	1300	1305	1310
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys			
	1315	1320	1325
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	1330	1335	1340
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
1345	1350	1355	1360
Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr			
	1365	1370	1375
Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly			
	1380	1385	1390
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val			
	1395	1400	1405
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu			
	1410	1415	1420
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp			
1425	1430	1435	1440
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn			
	1445	1450	1455
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg			
	1460	1465	1470
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
	1475	1480	1485
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
	1490	1495	1500
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
1505	1510	1515	1520

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 1525 1530 1535
 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu
 1540 1545 1550
 Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Val Gly Ser
 1555 1560 1565
 Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn
 1570 1575 1580
 Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ser Arg Tyr Phe Gln
 1585 1590 1595 1600
 Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile
 1605 1610 1615
 Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu
 1620 1625 1630
 Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu Lys Glu Pro Pro
 1635 1640 1645
 Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp Ala Leu Lys Leu
 1650 1655 1660
 Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met Val Trp Ile Val
 1665 1670 1675 1680
 Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His Pro Gly His Leu
 1685 1690 1695
 Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu Ser Asp Thr Phe
 1700 1705 1710
 Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro
 1715 1720 1725
 Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile Lys Tyr Lys Phe
 1730 1735 1740
 Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp
 1745 1750

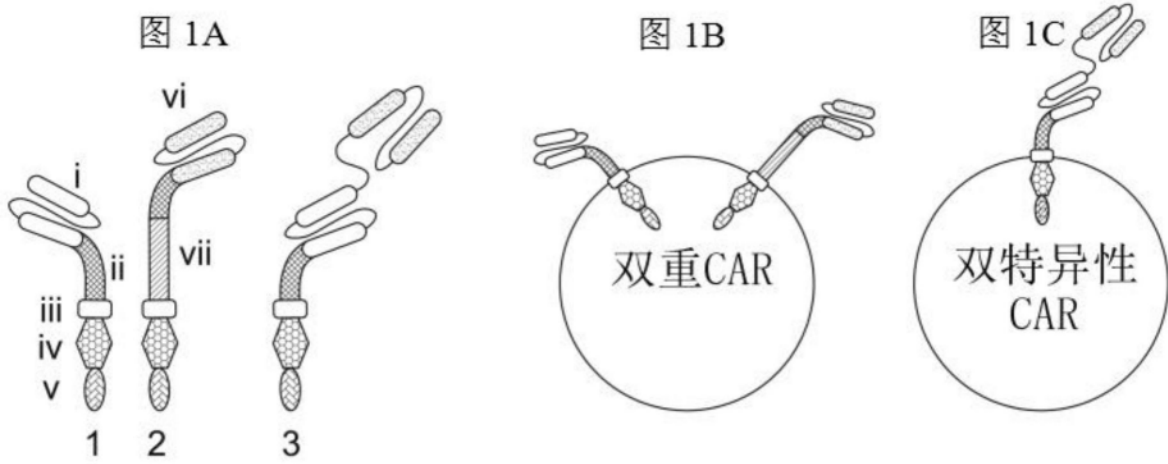


图1

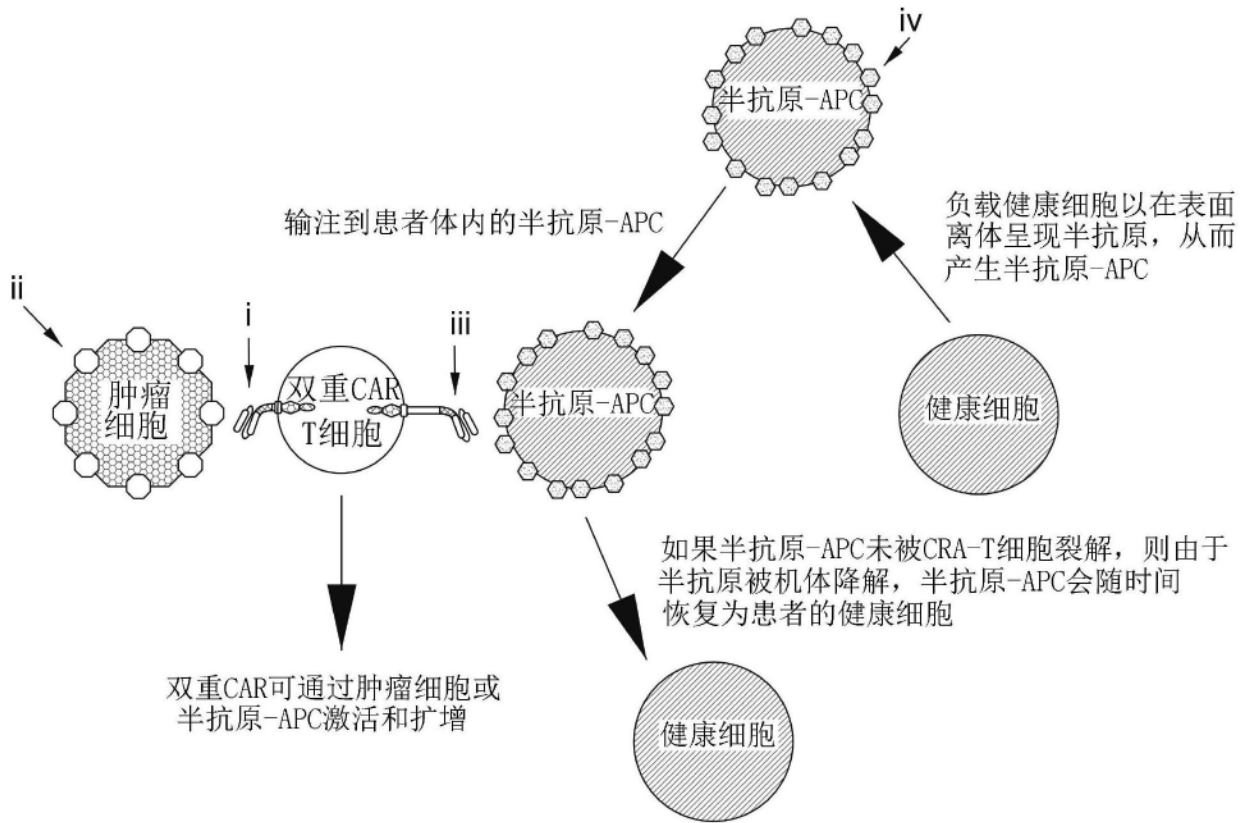


图2

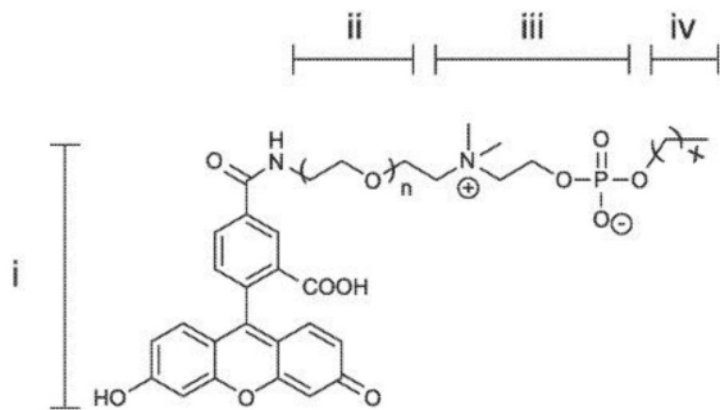


图3A

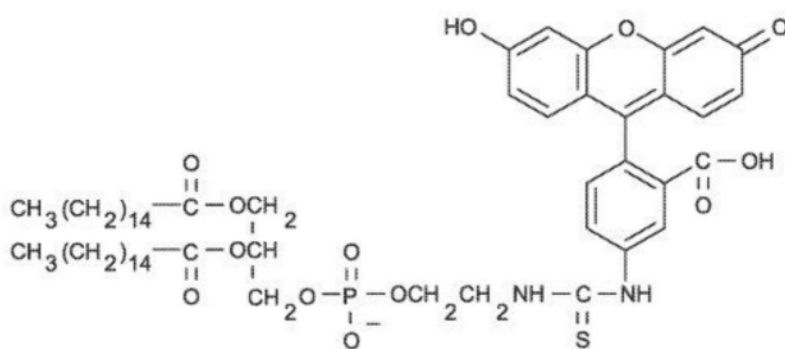


图3B

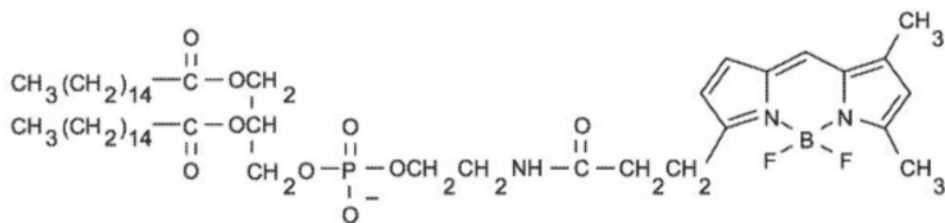


图3C

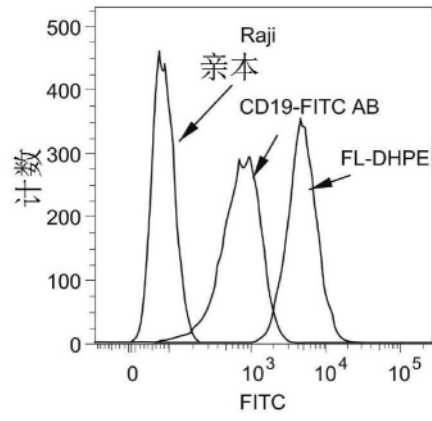


图4A

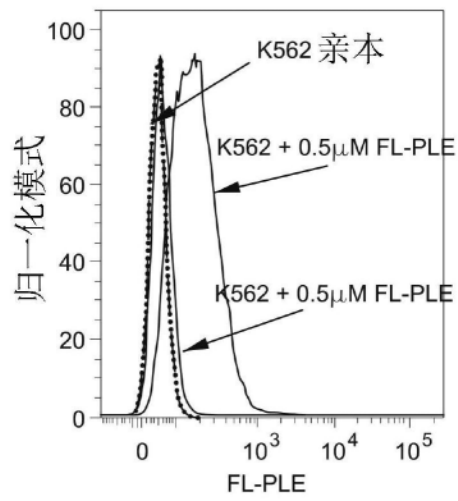


图4B

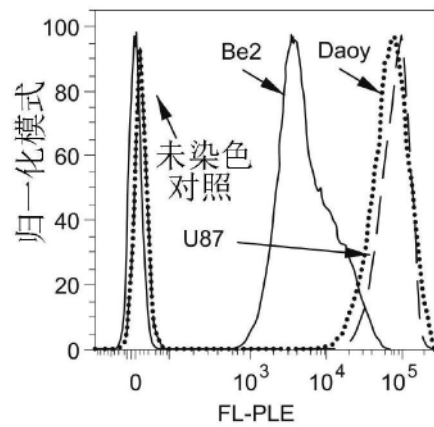


图4C

图 5A 膜整合

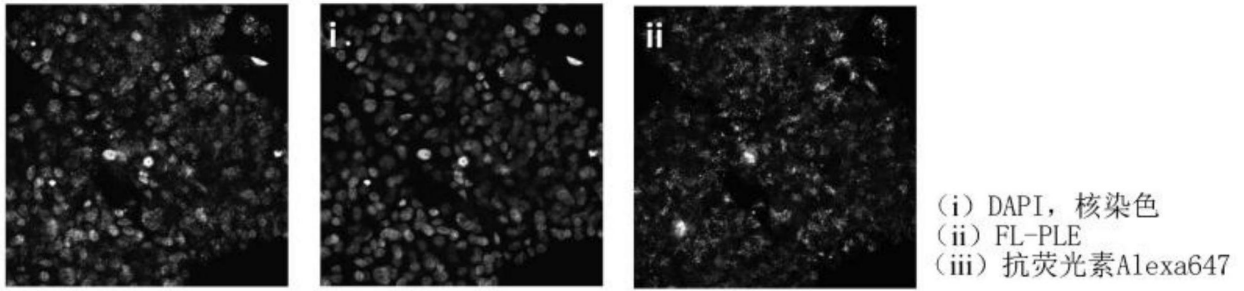


图 5B FL部分可用

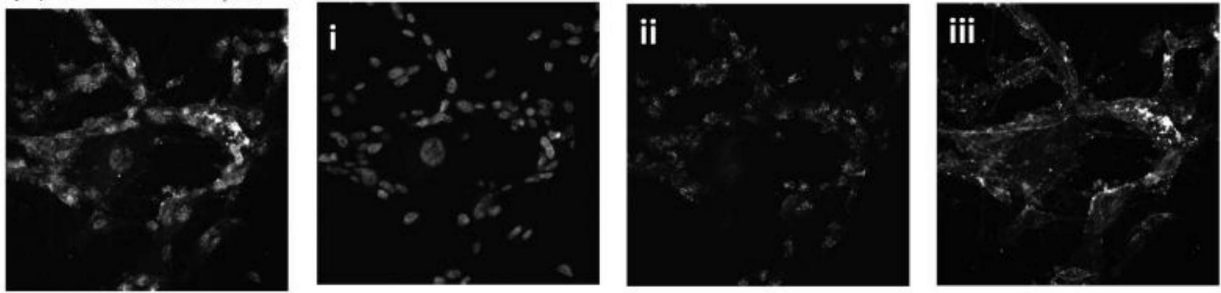


图5

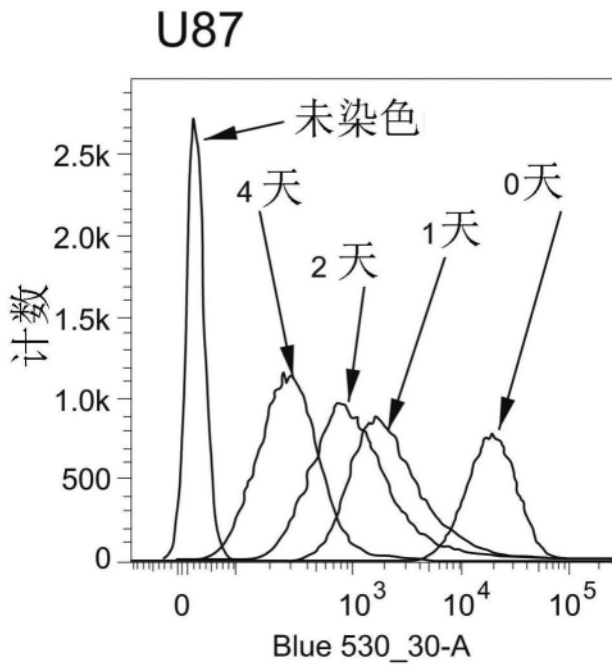
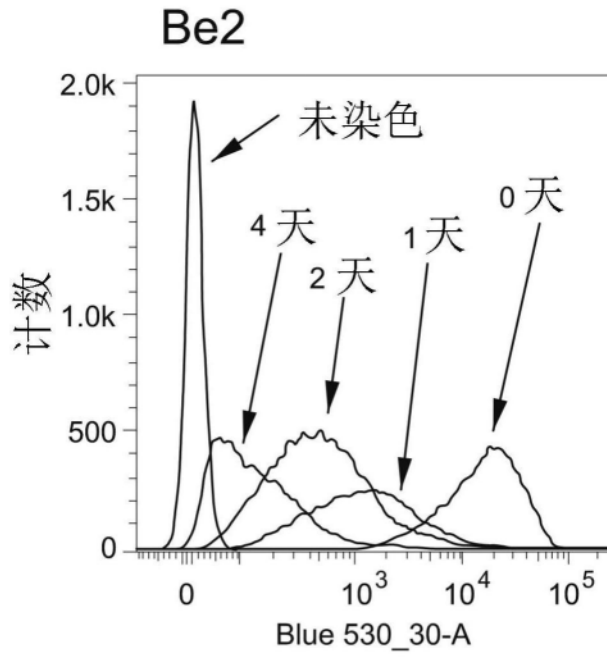


图6A

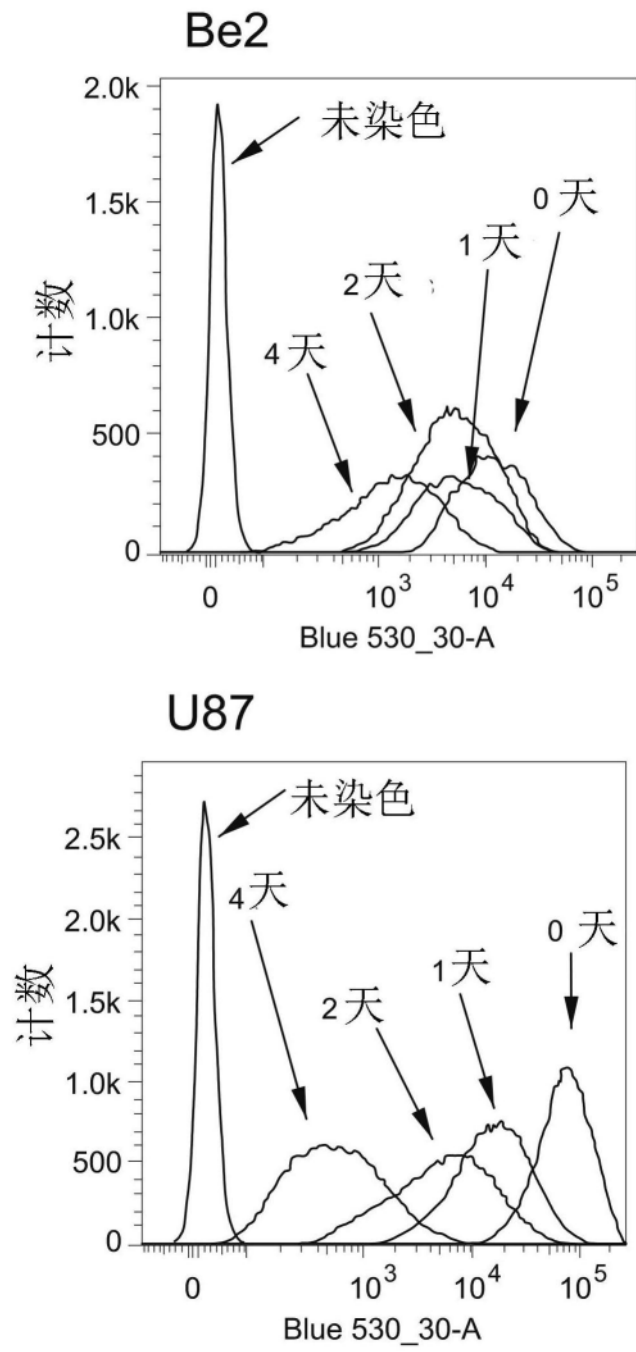


图6B

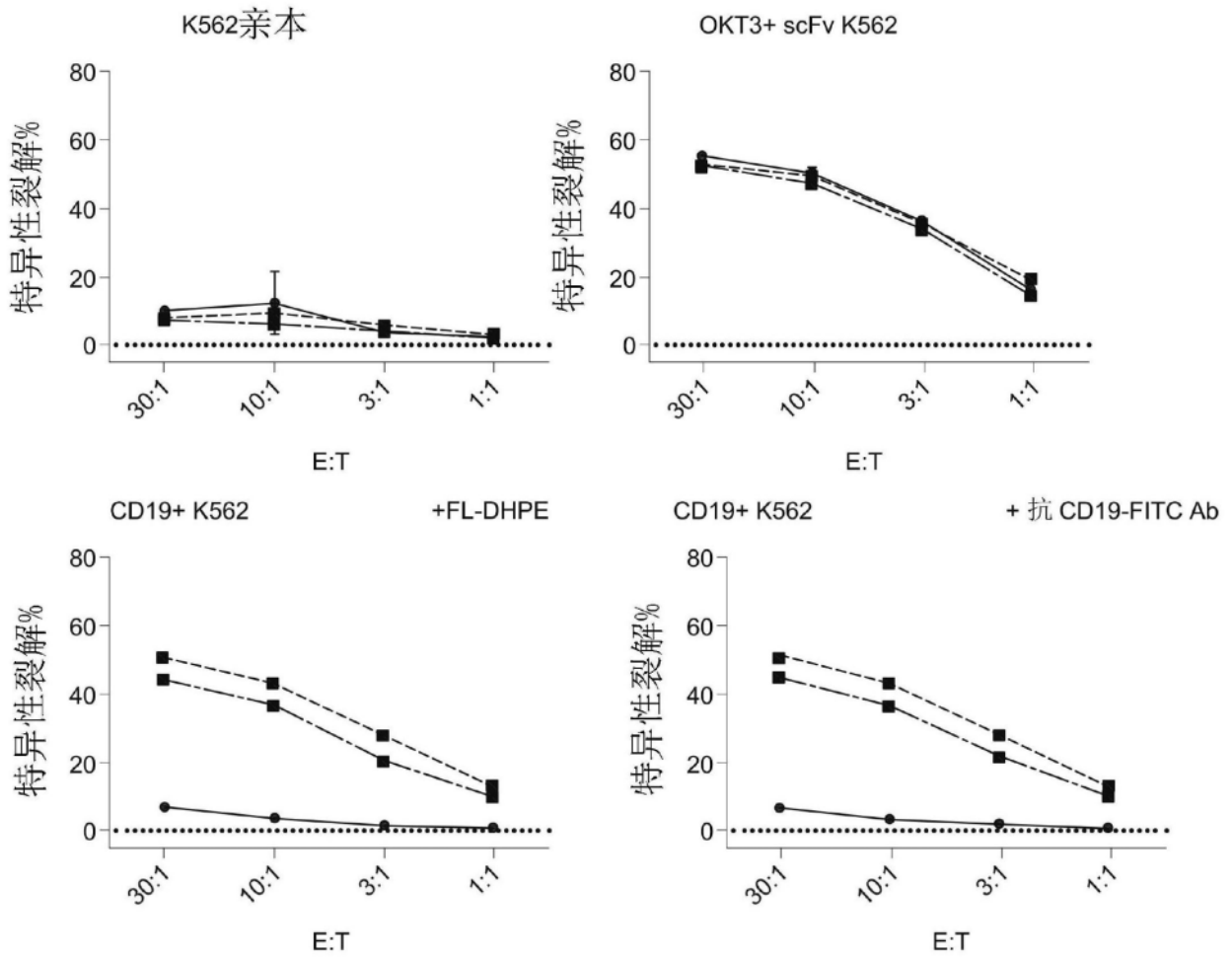


图7A

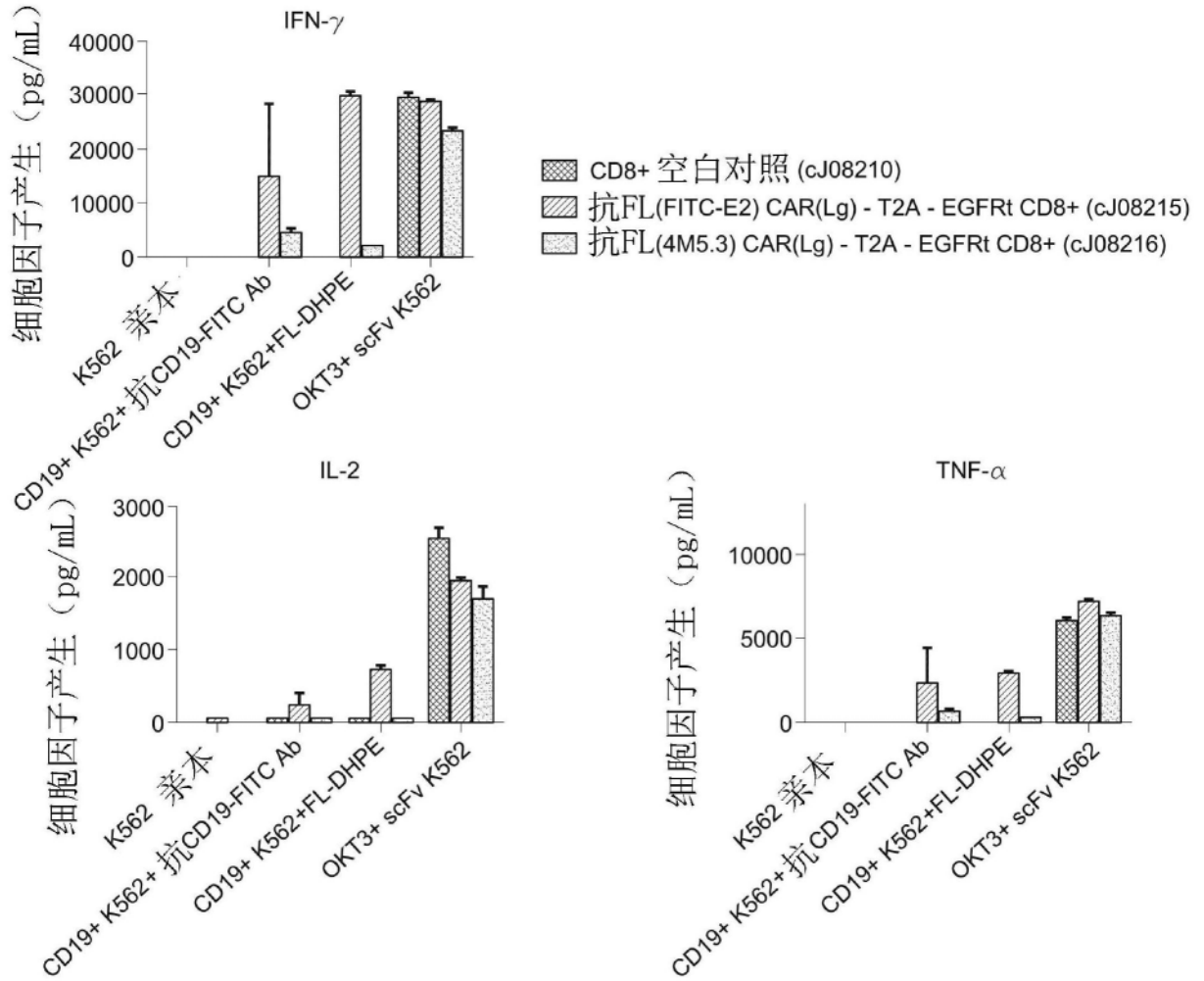


图7B

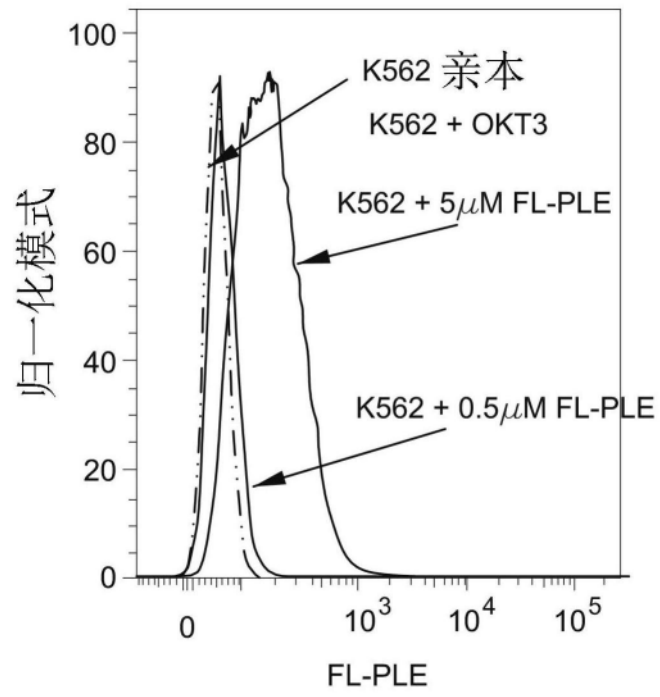


图8A

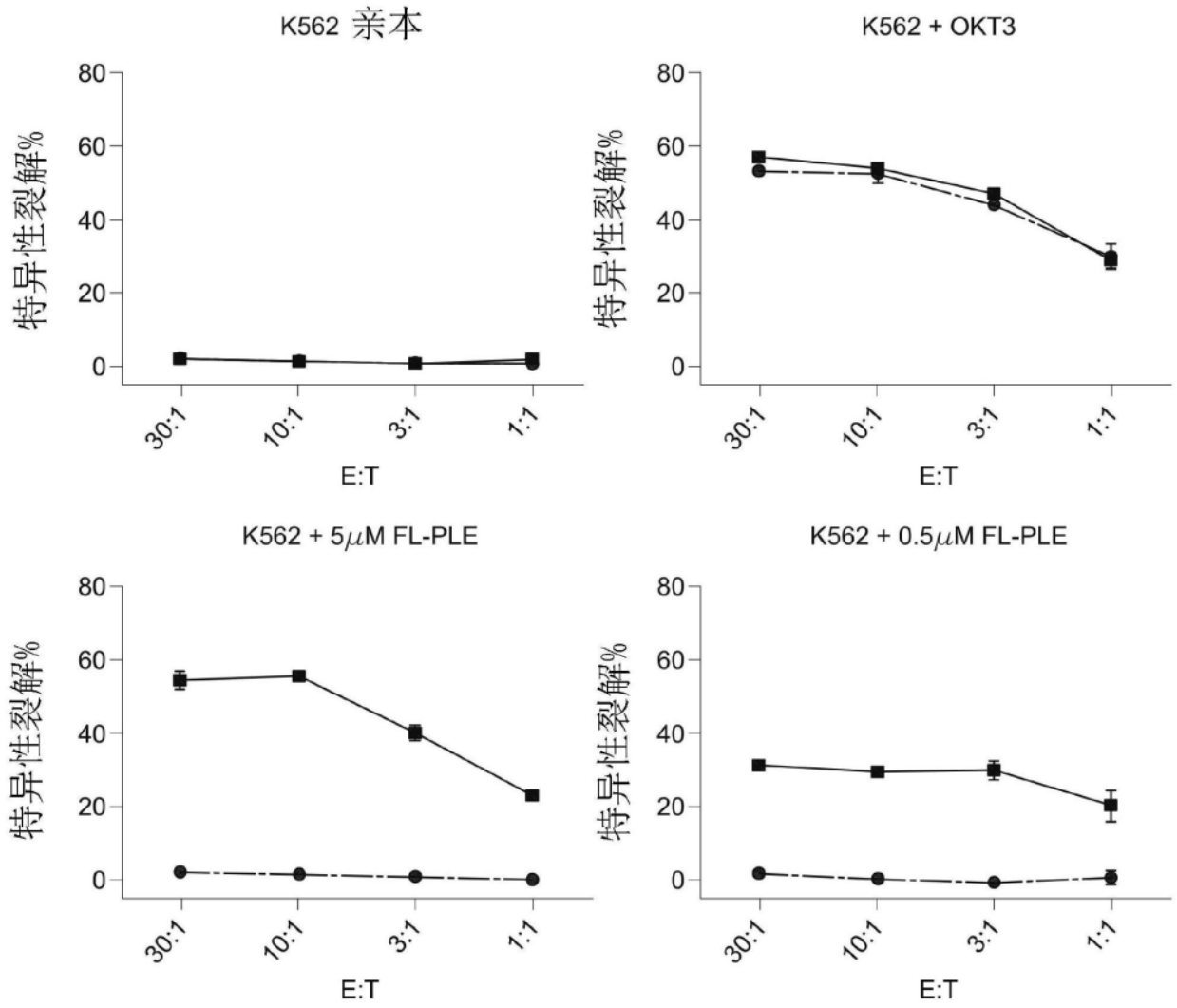


图8B

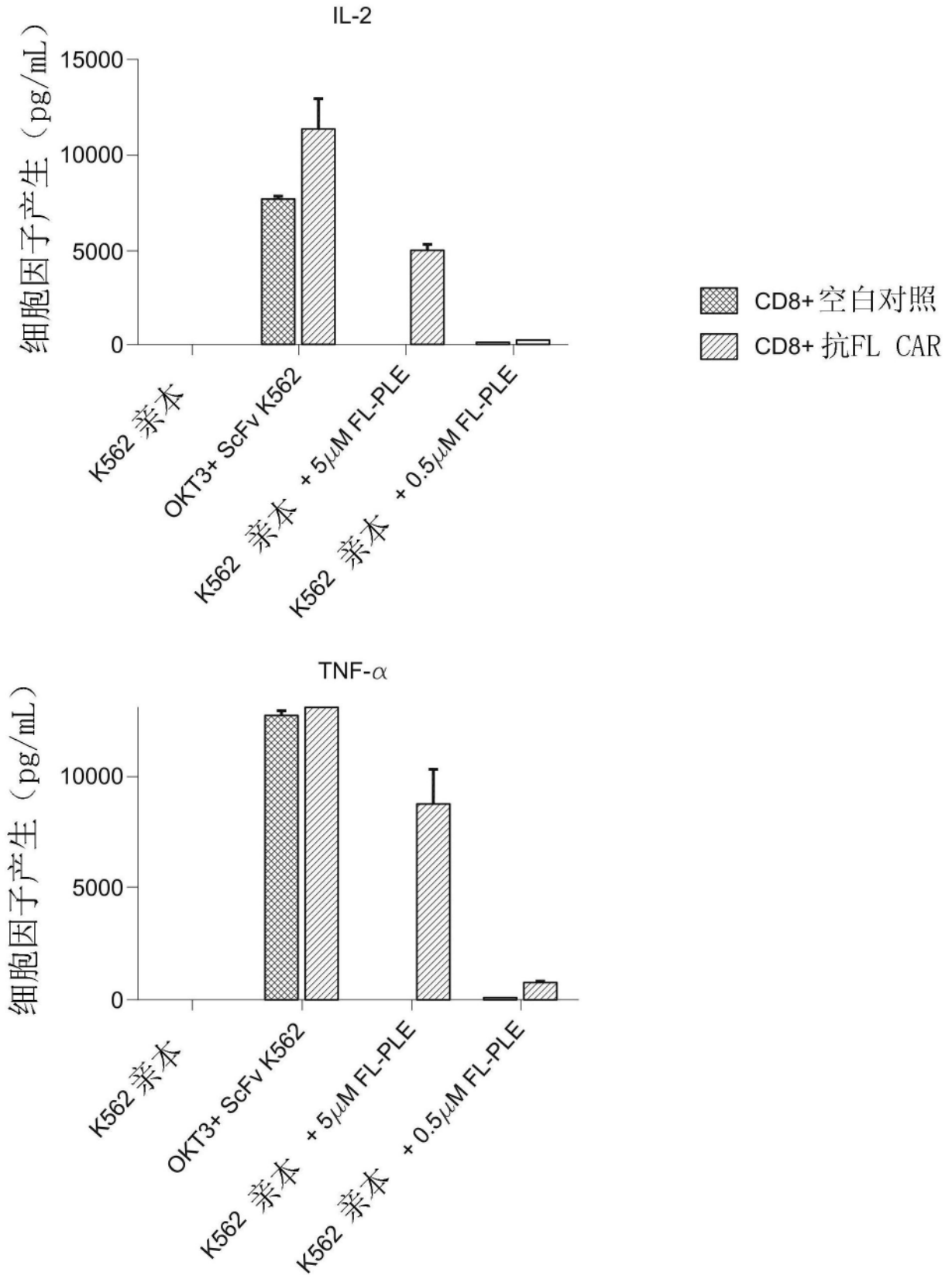


图8C

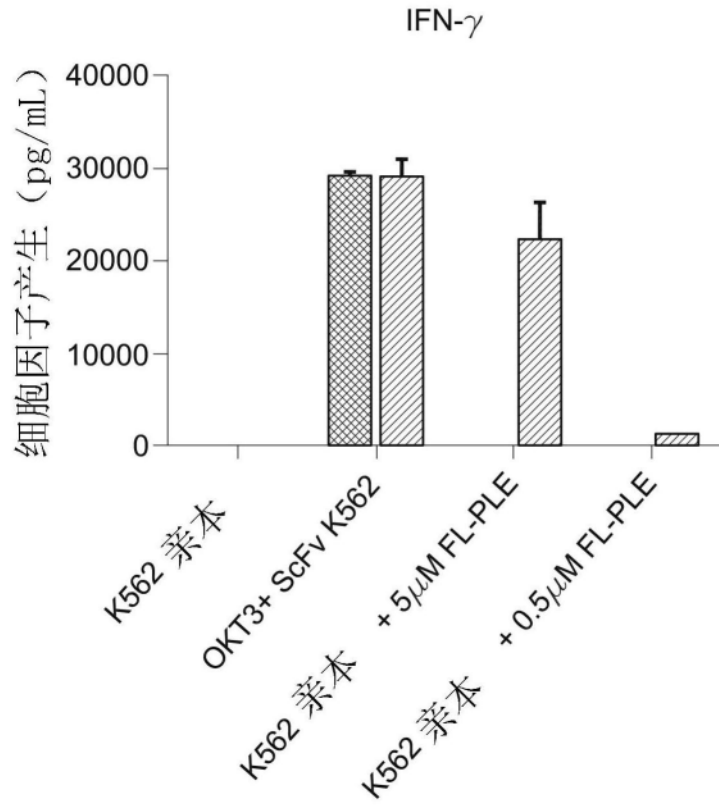


图8C (续)

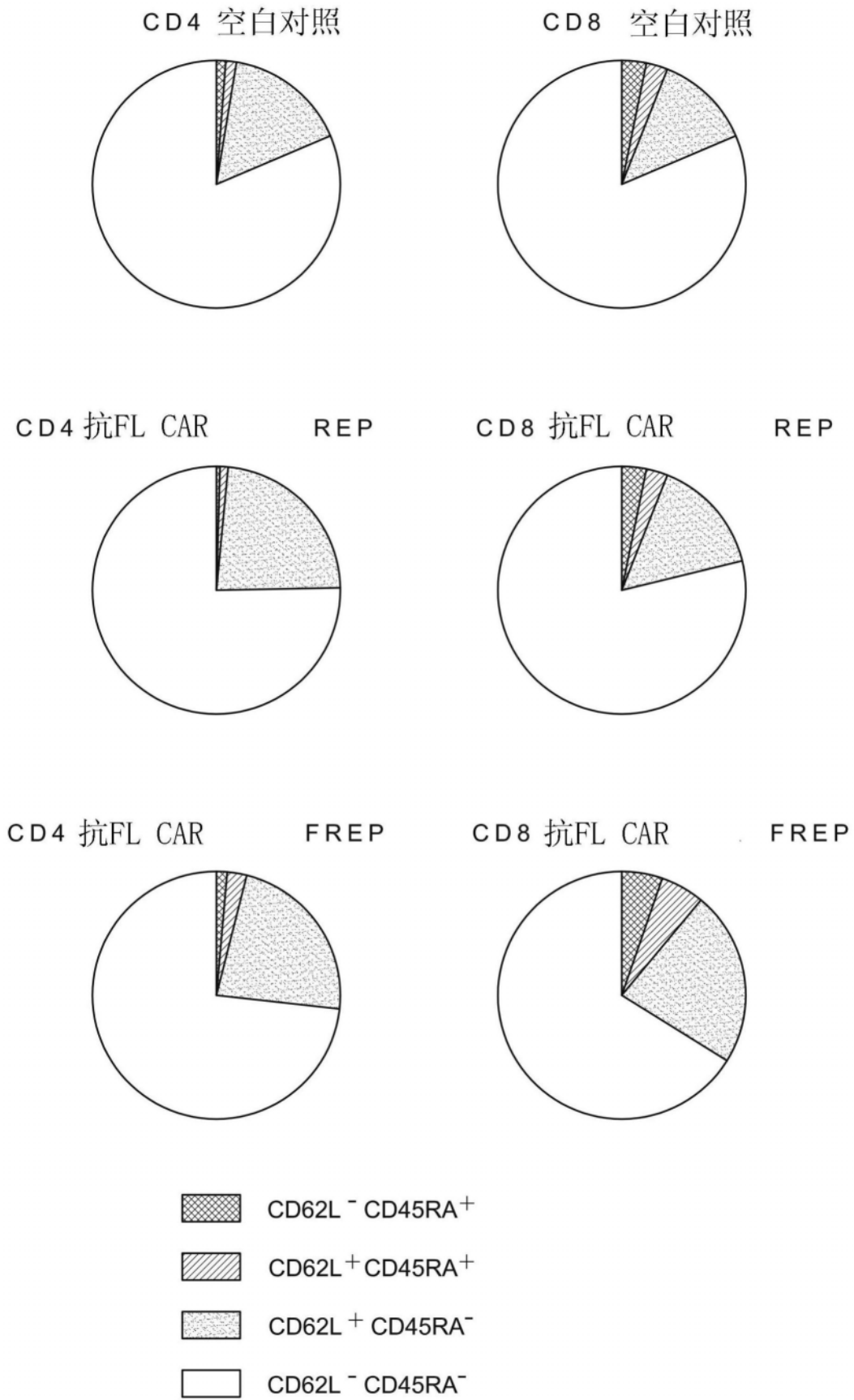


图9A

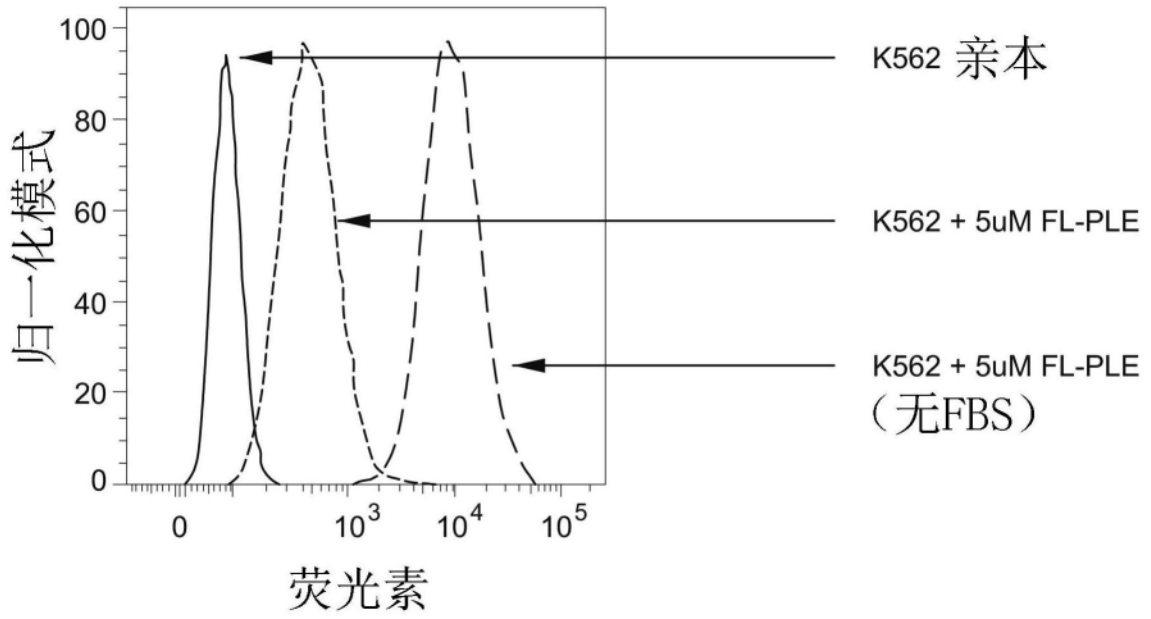


图9B

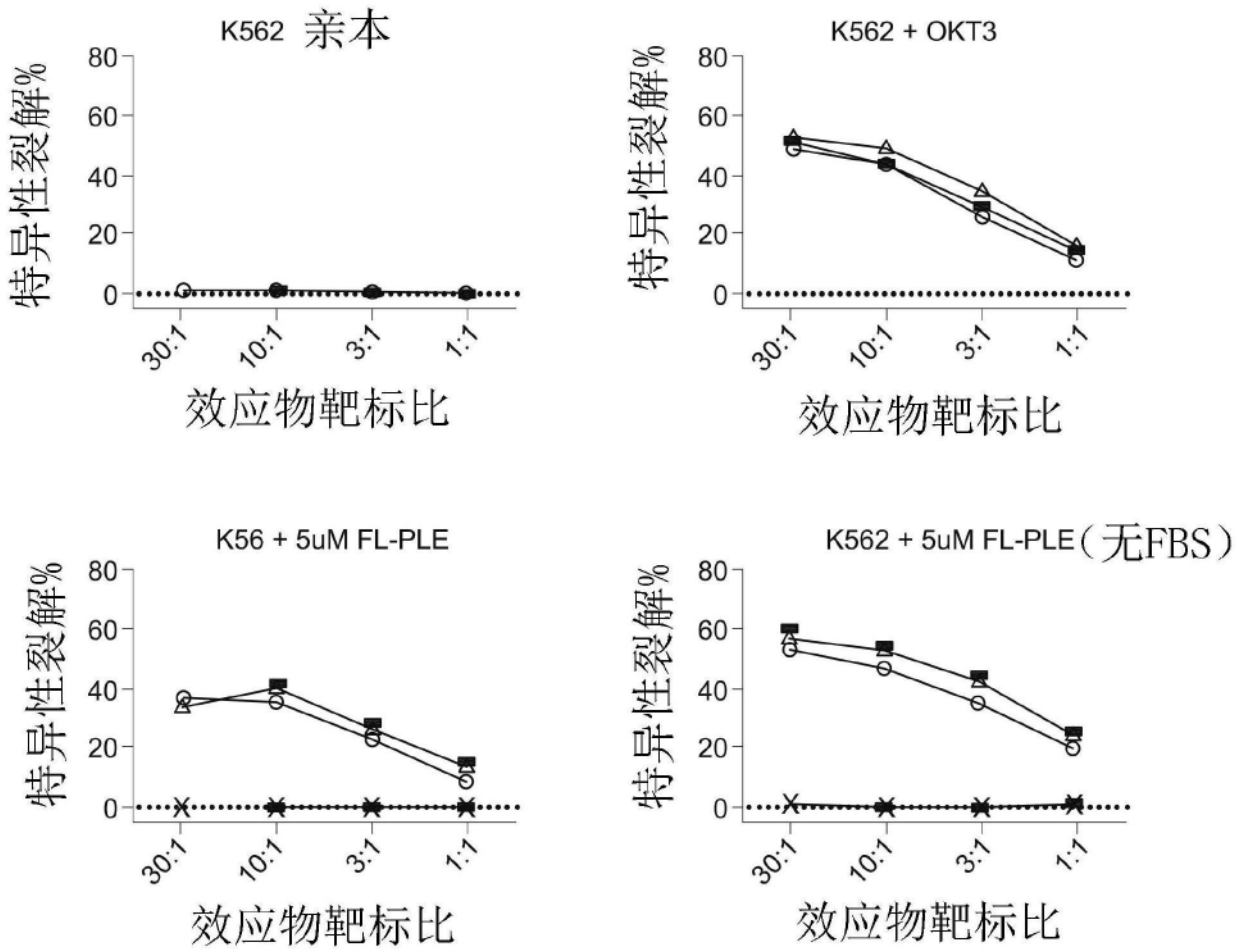


图9C

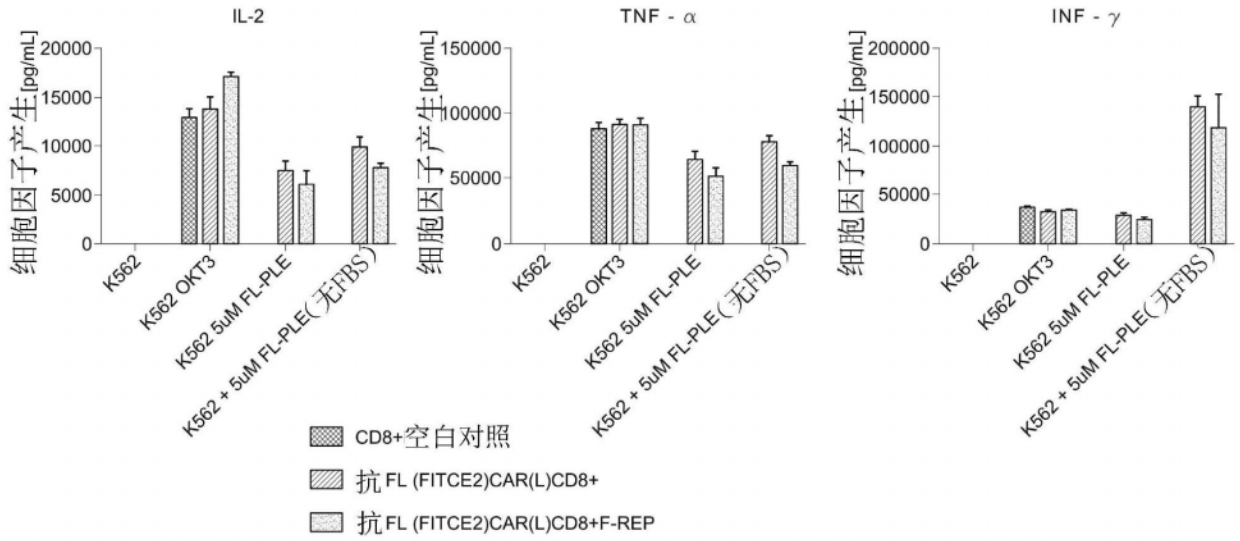
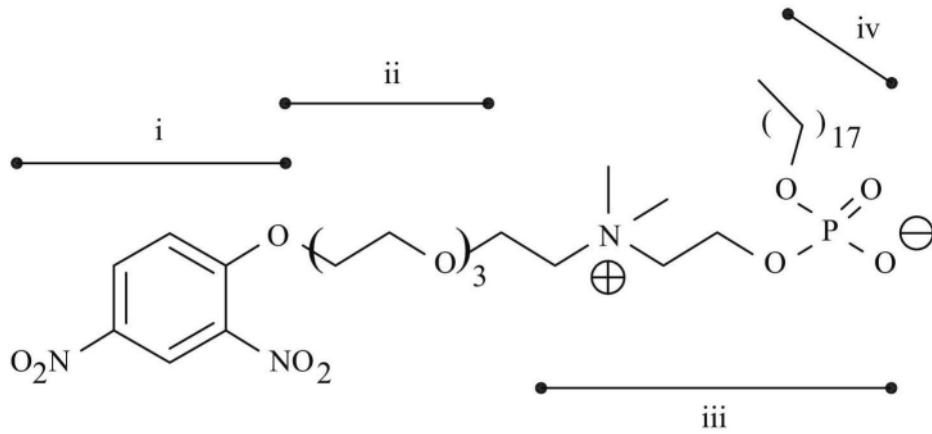


图9D



精确质量: 763.44

分子量: 763.90

图10A

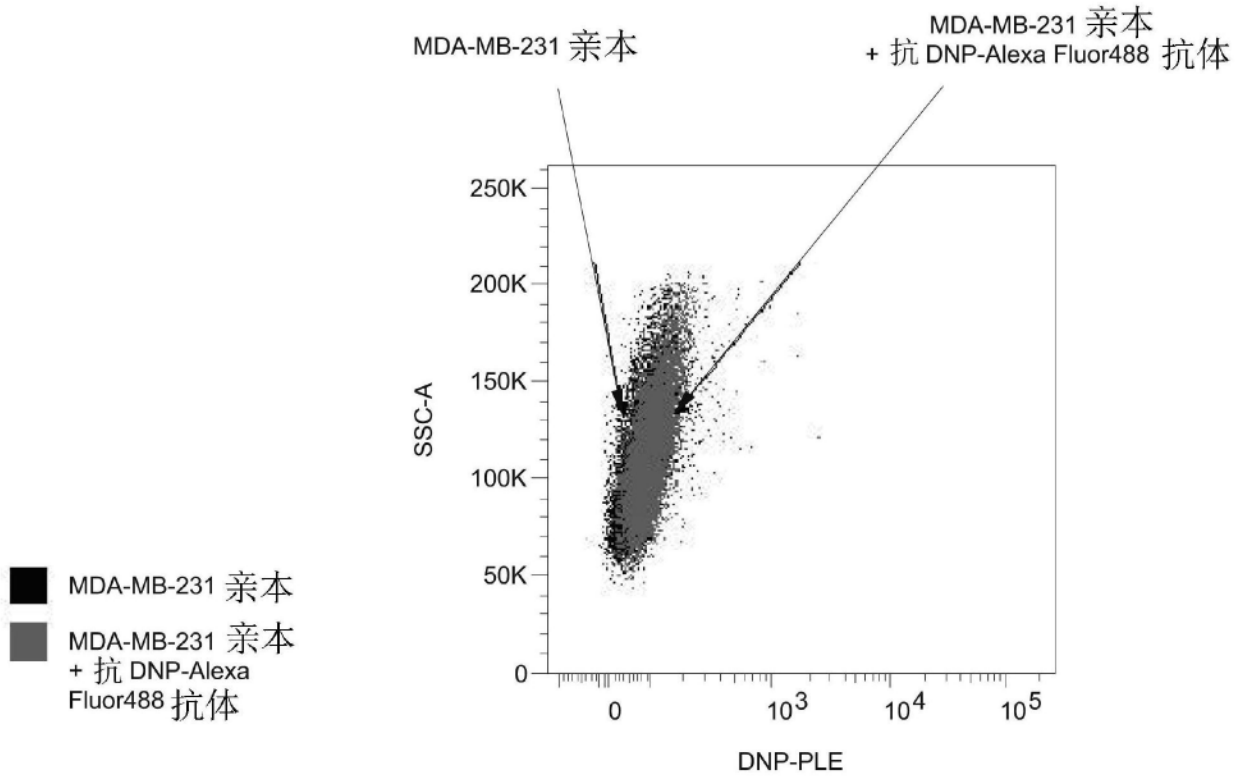


图11A

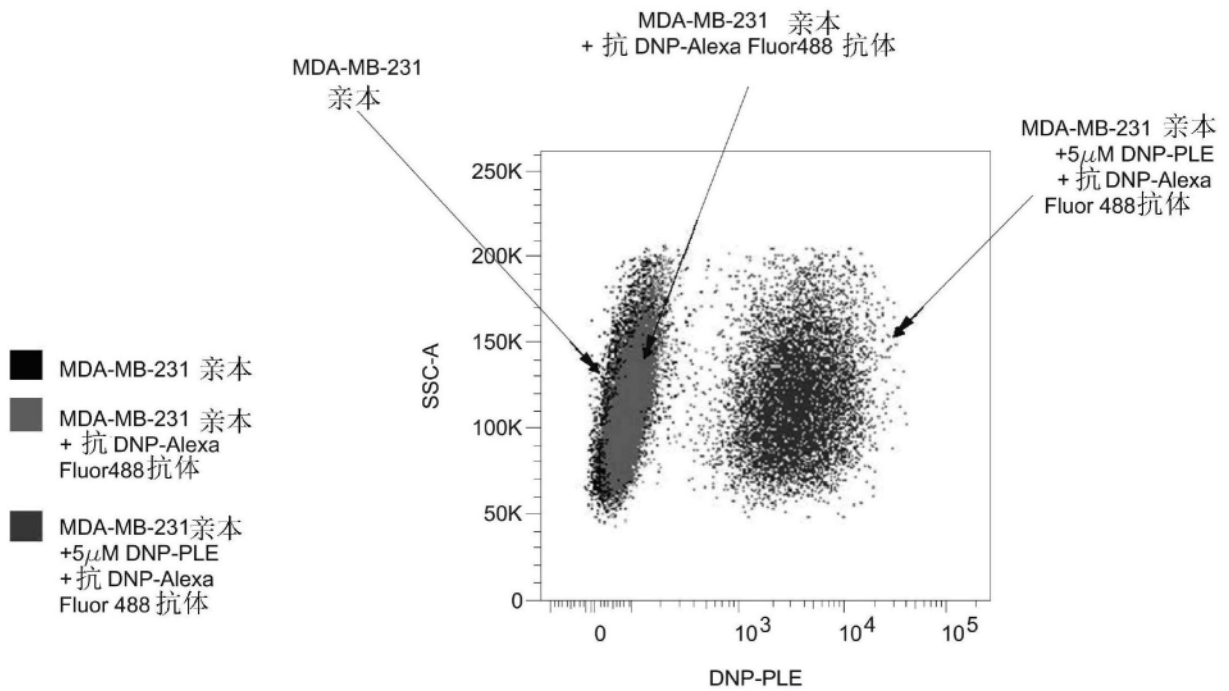


图11B

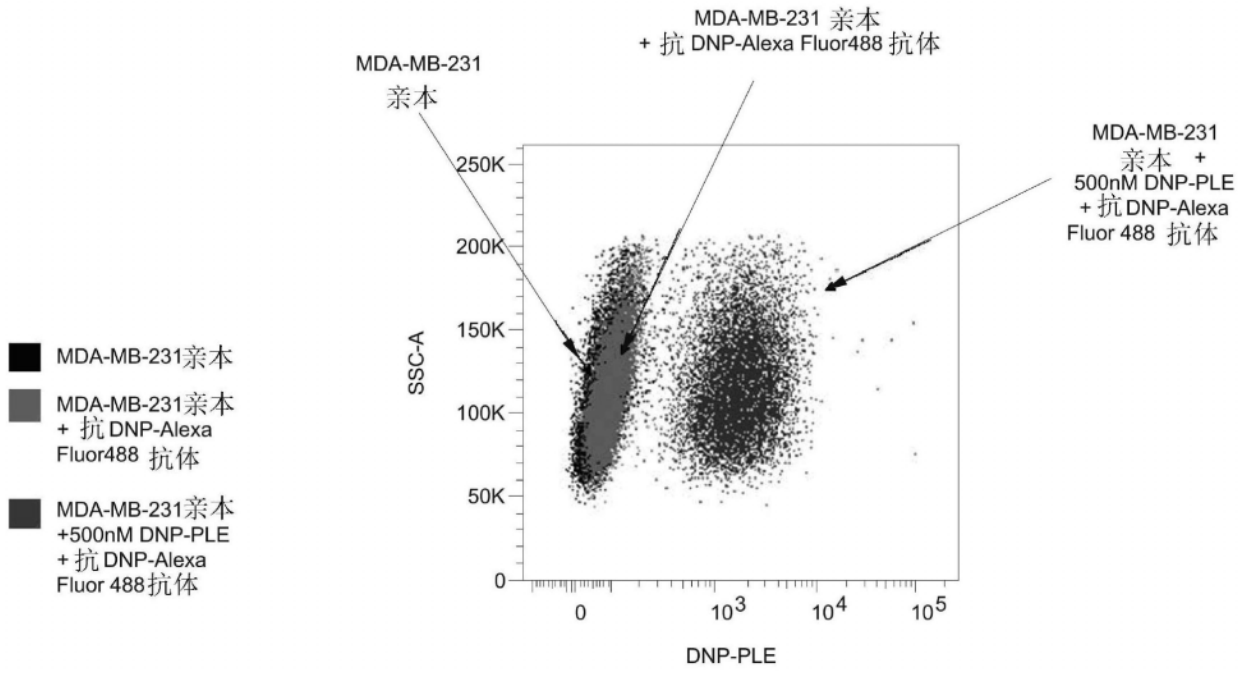


图11C

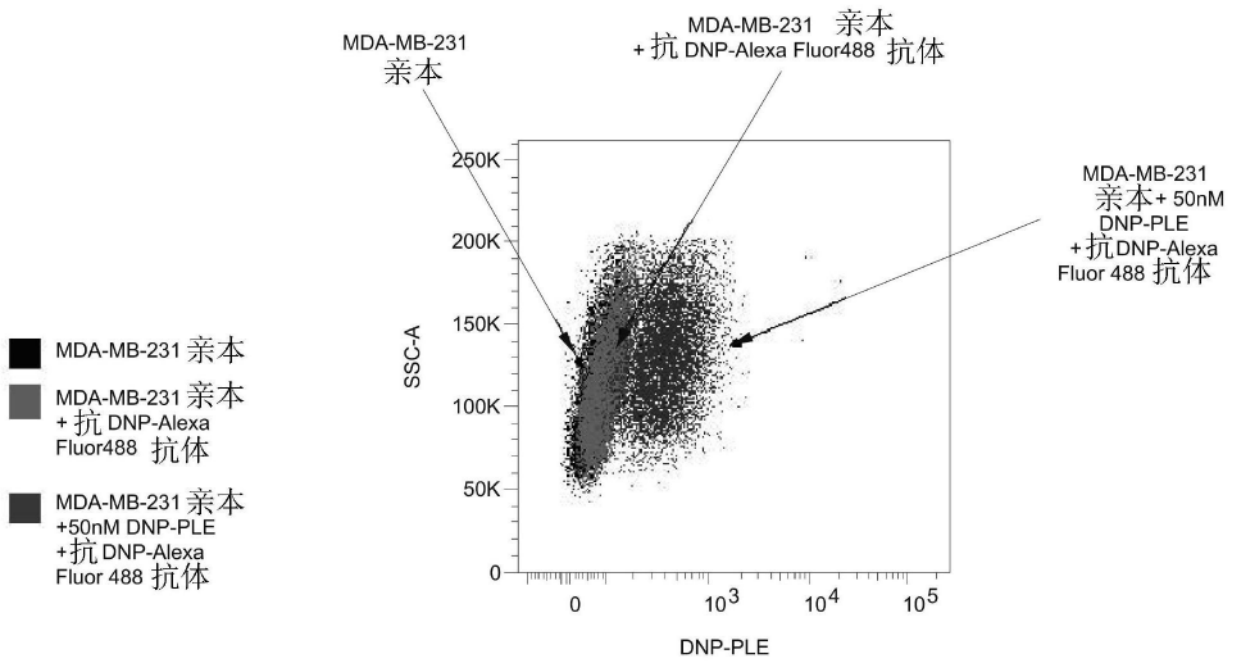


图11D

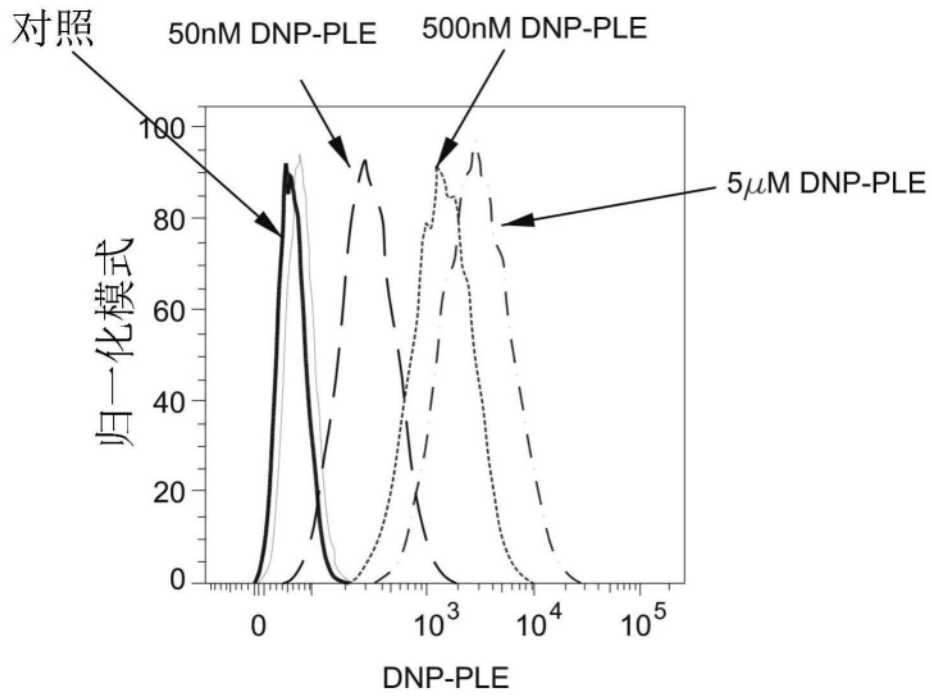


图11E

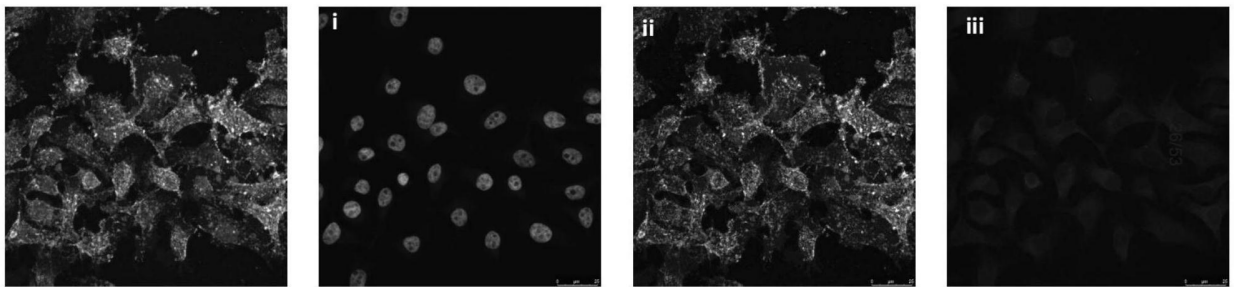


图12A

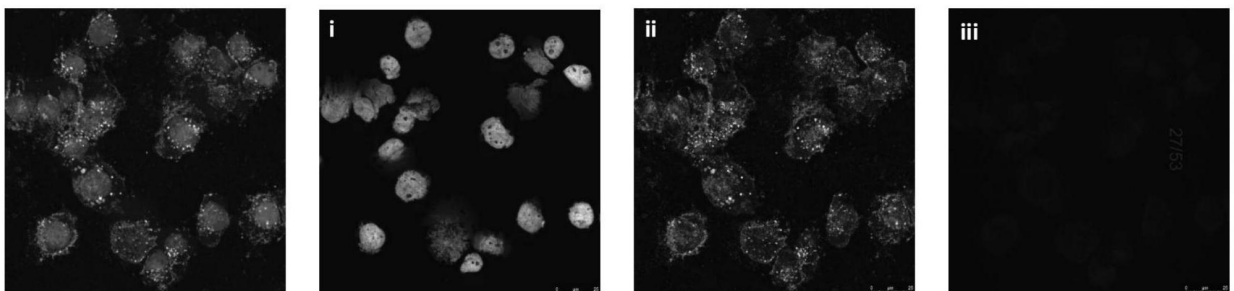


图12B

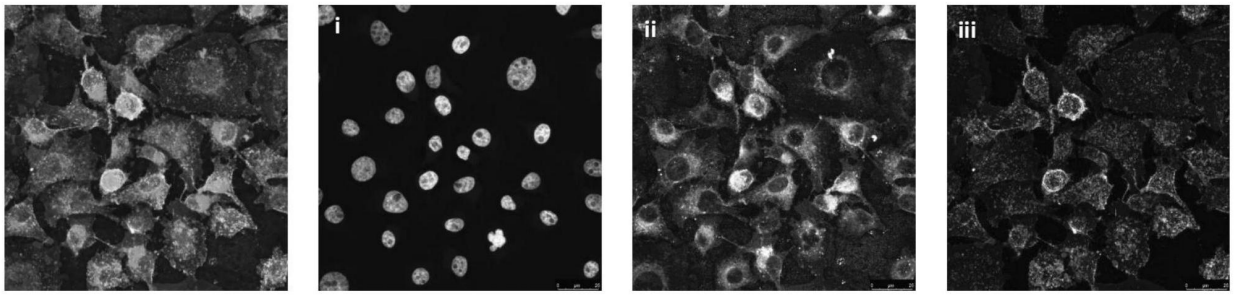


图12C

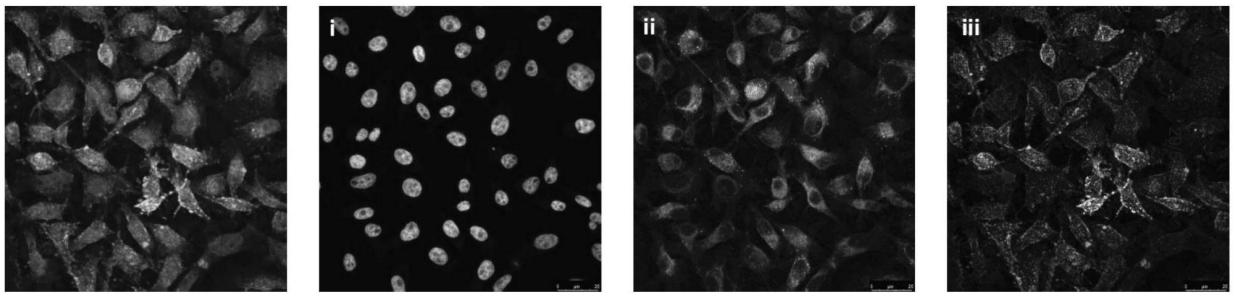


图12D

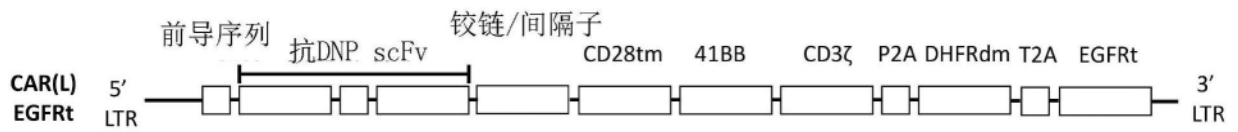


图13A

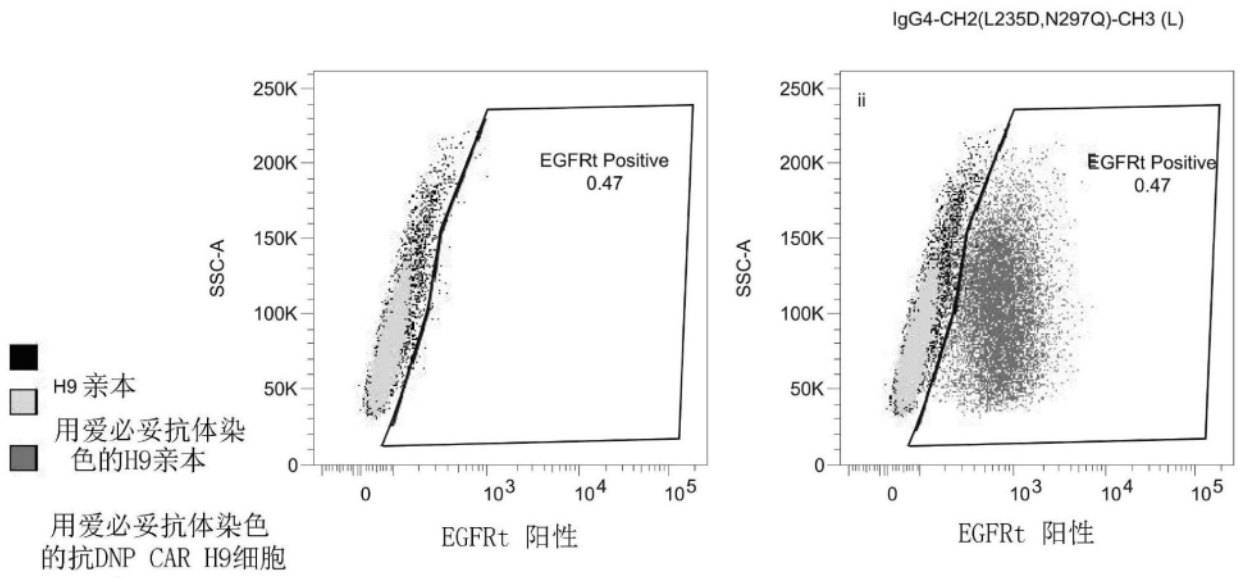


图13B

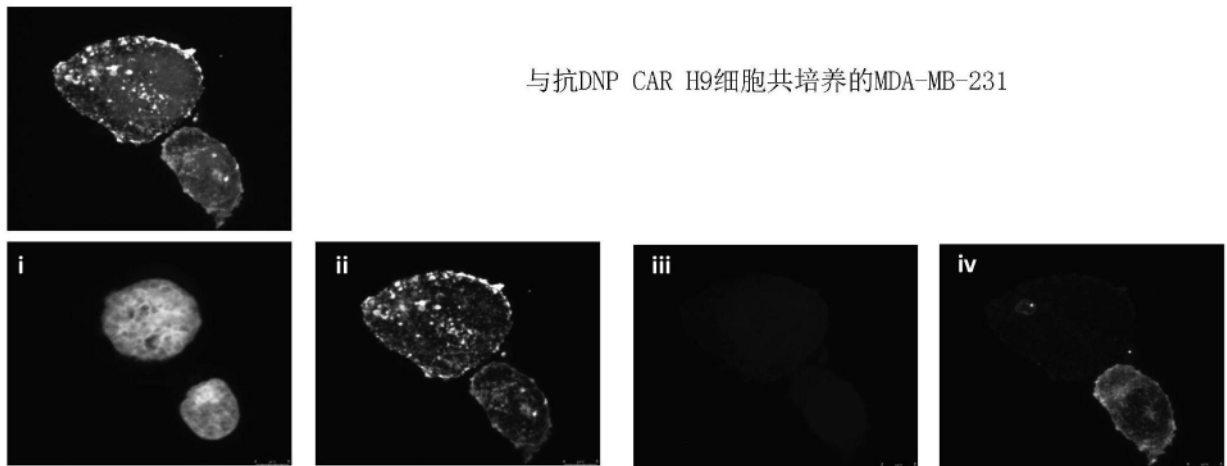
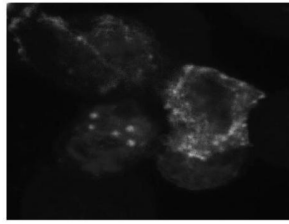


图13C



与抗DNP CAR H9细胞共培养的负载5μM DNP-PLE的MDA-MB-231

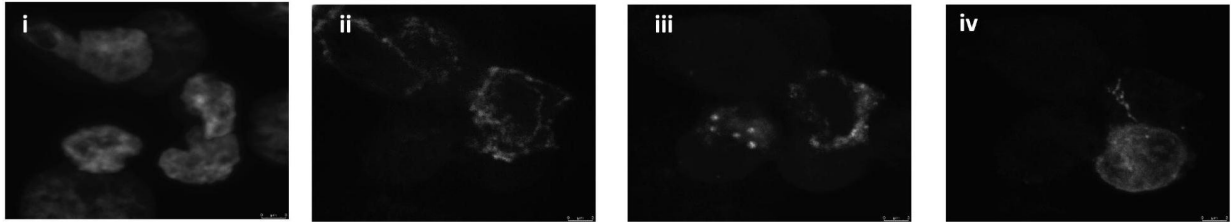


图13D

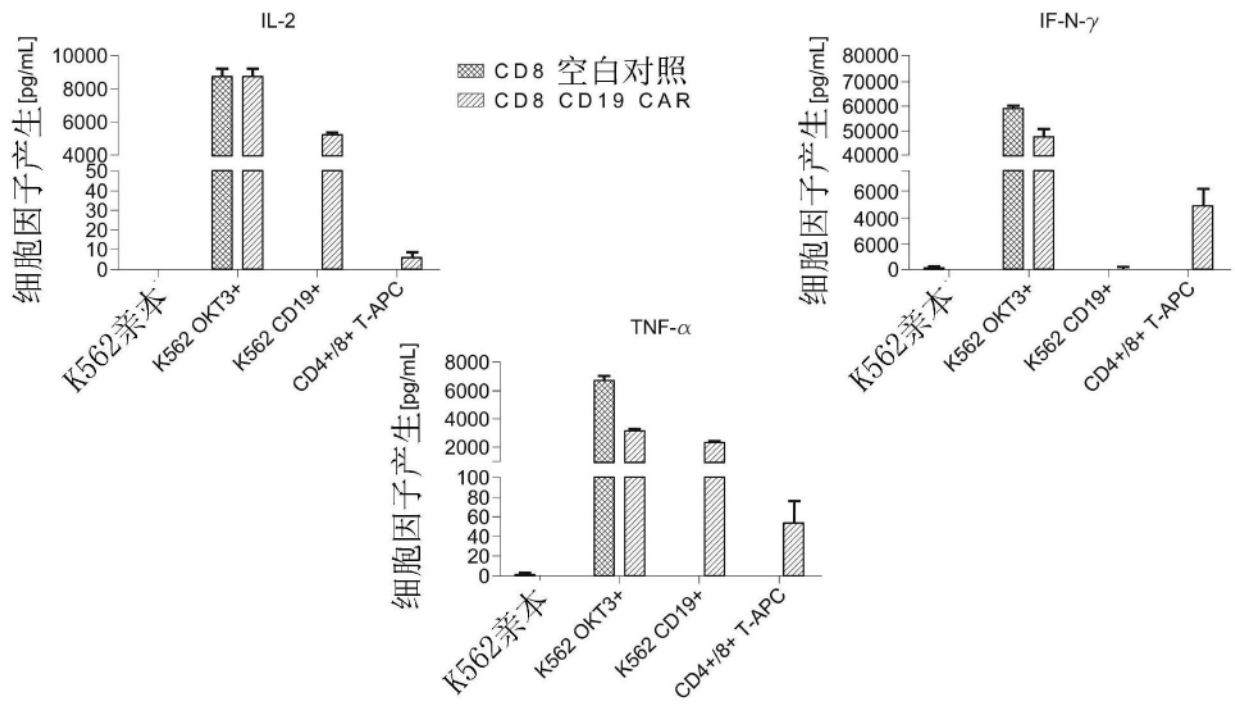


图14

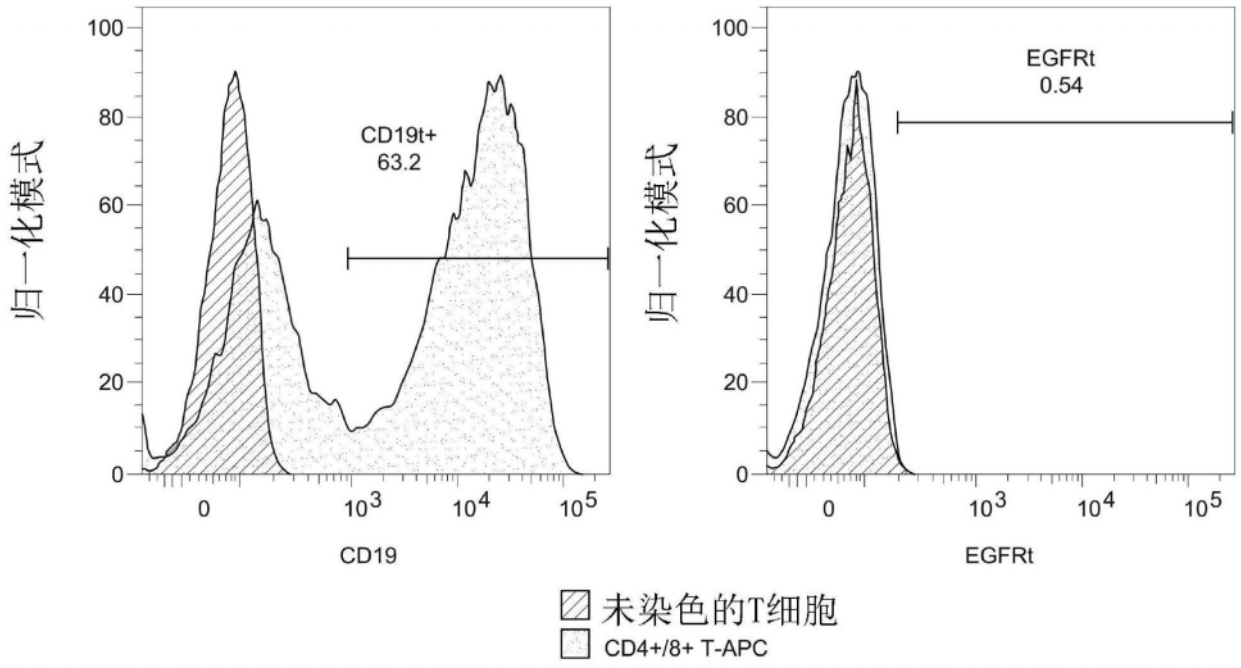


图15A

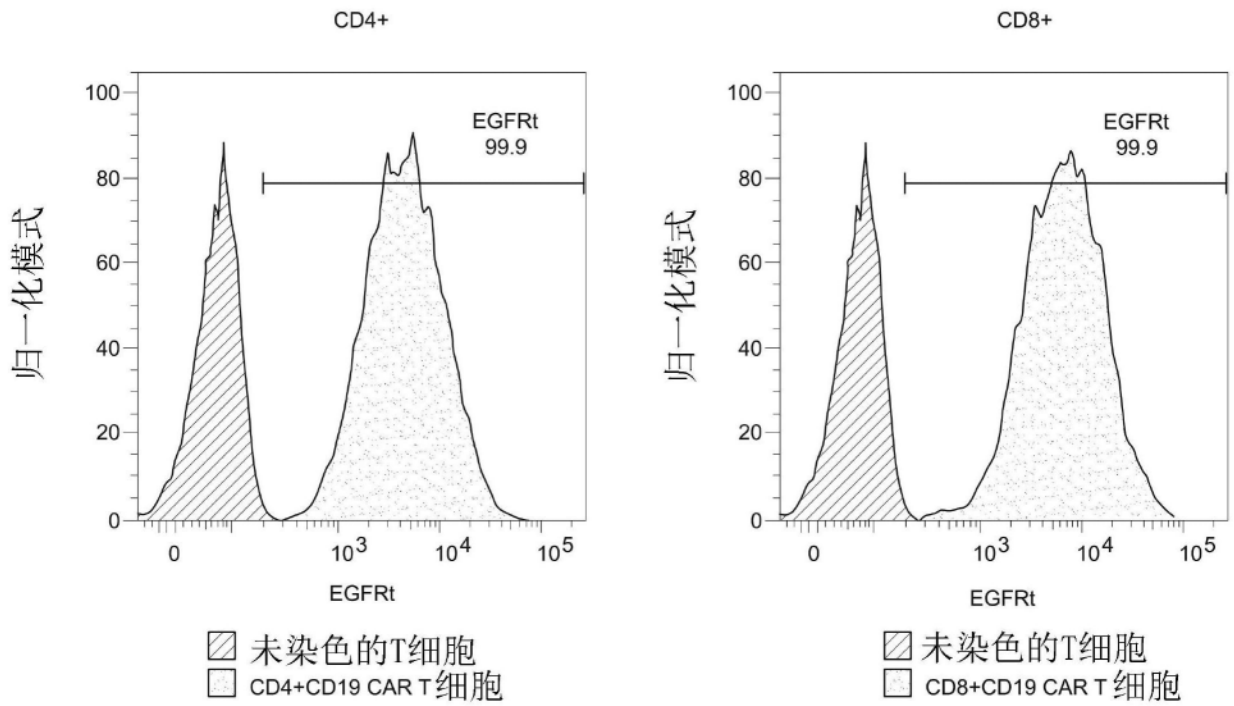


图15B

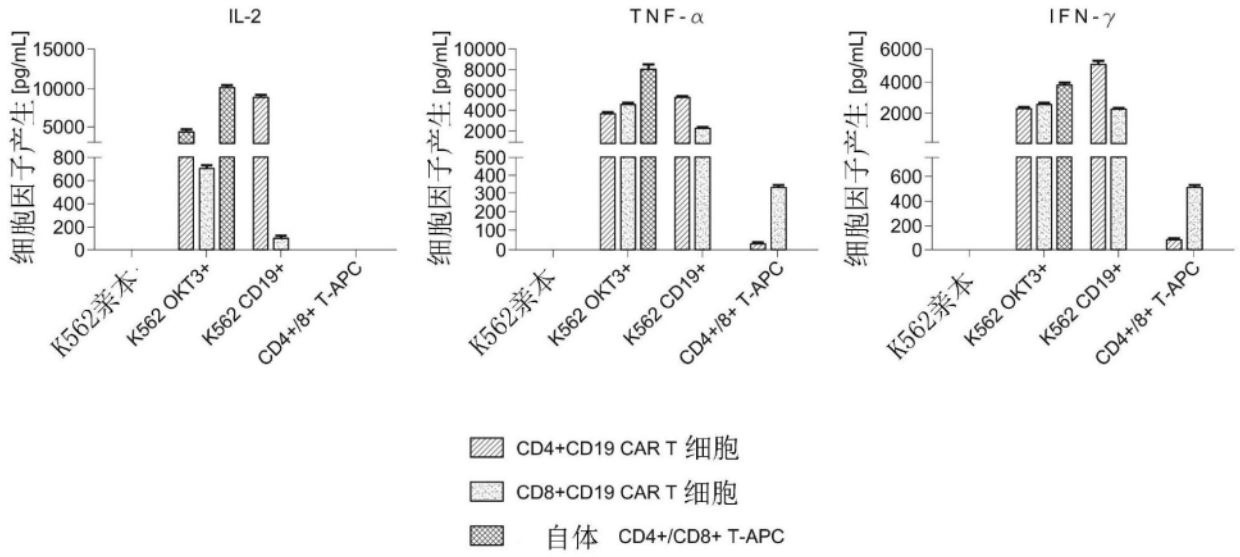


图15C

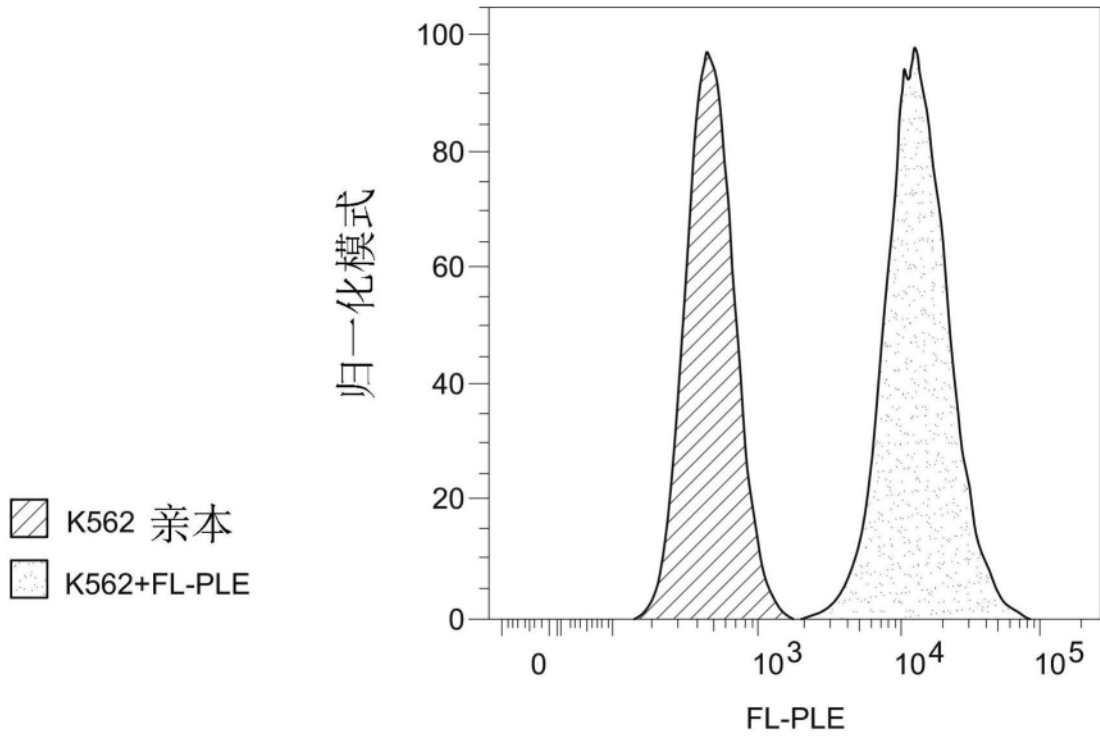


图16A

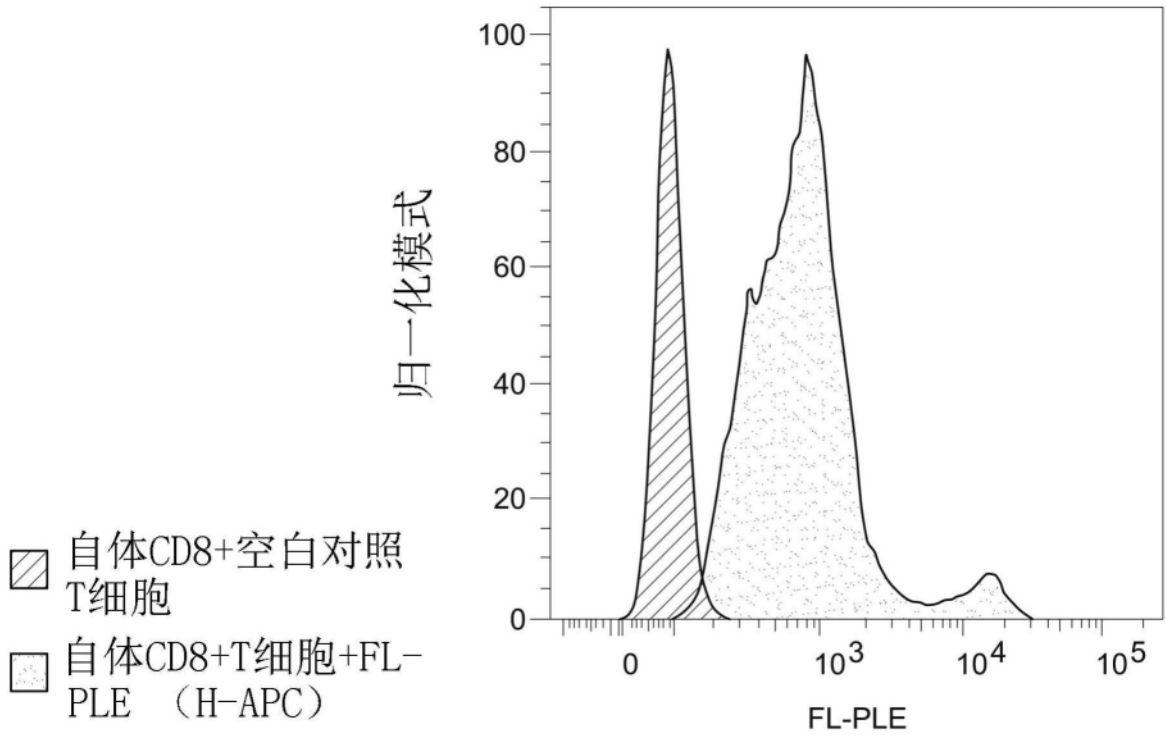


图16B

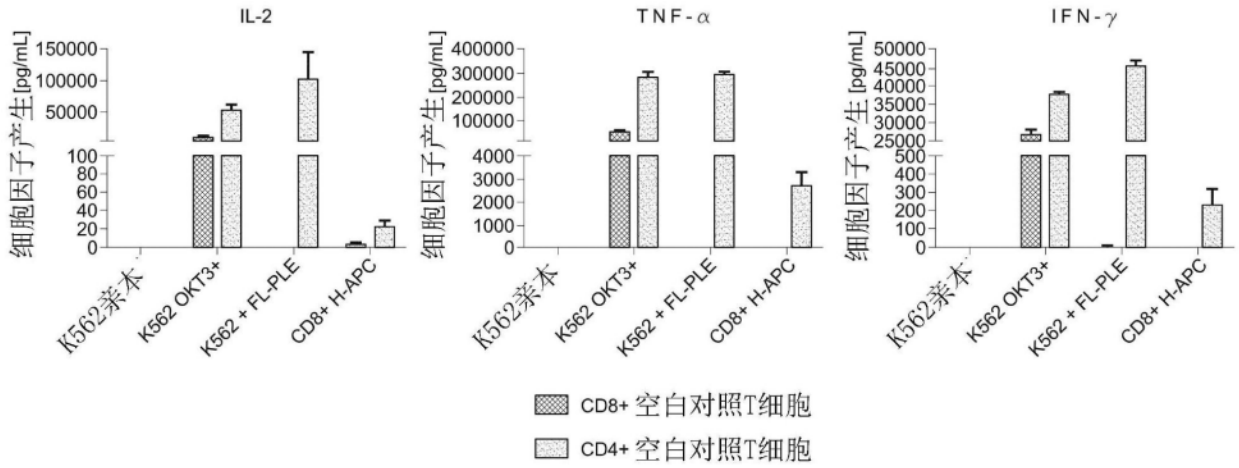


图16C

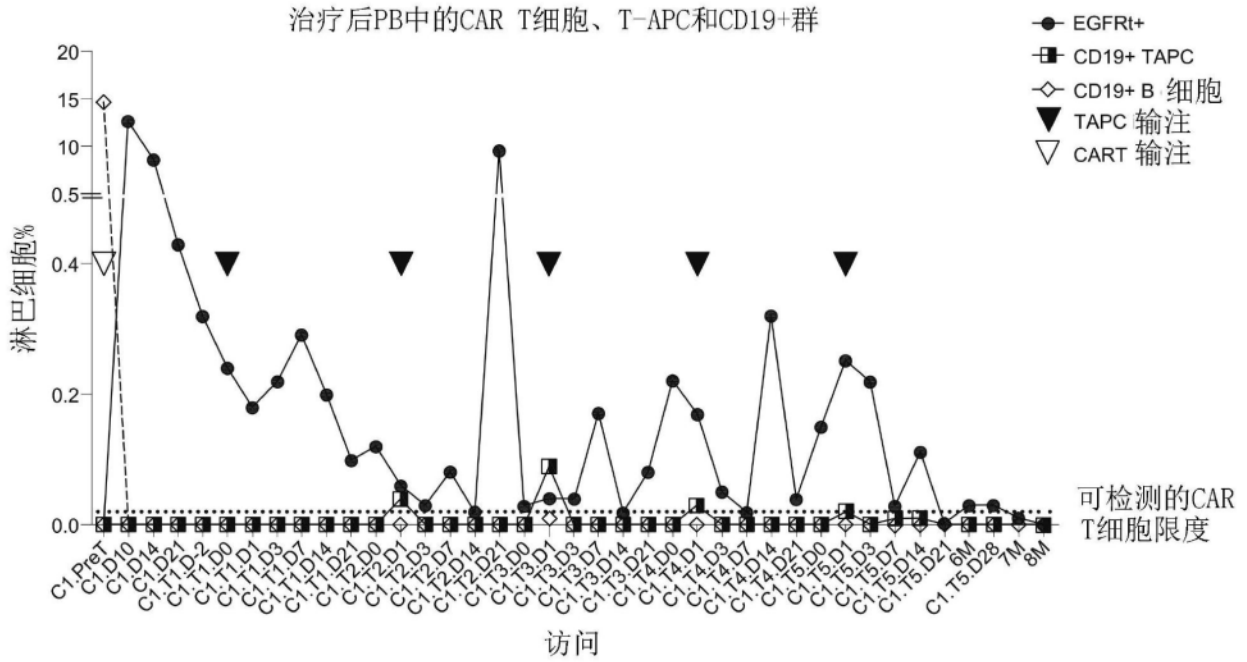


图17A

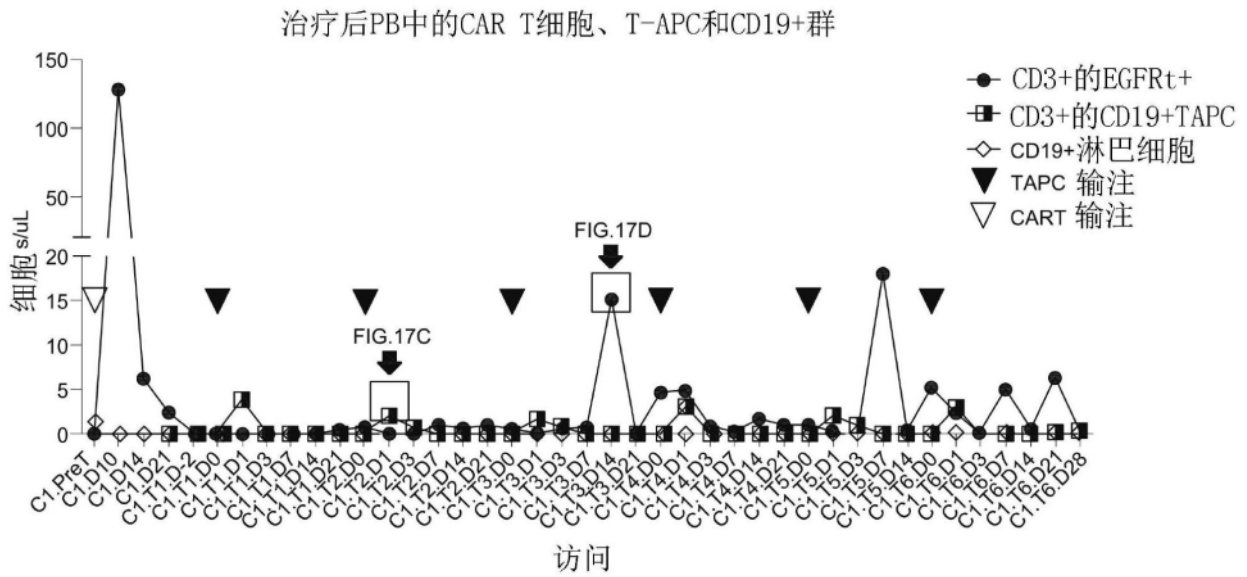


图17B

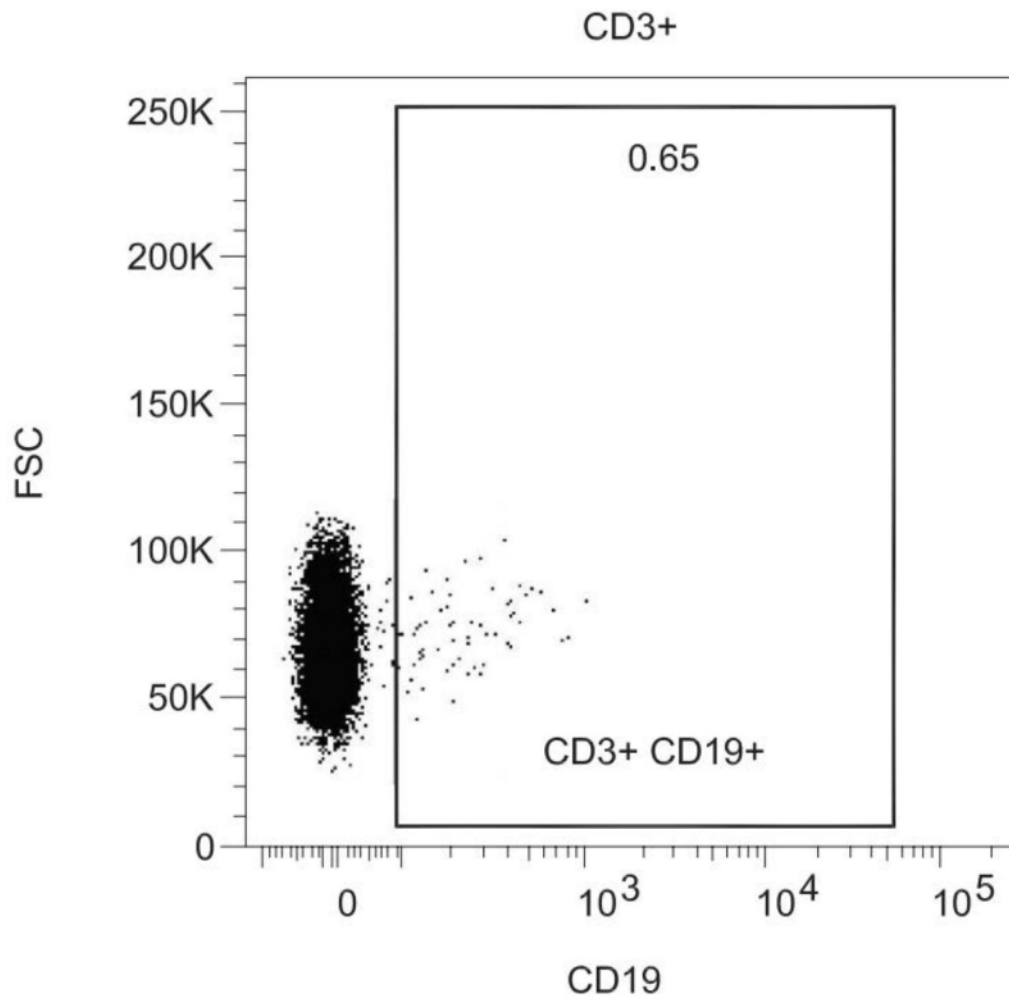


图17C

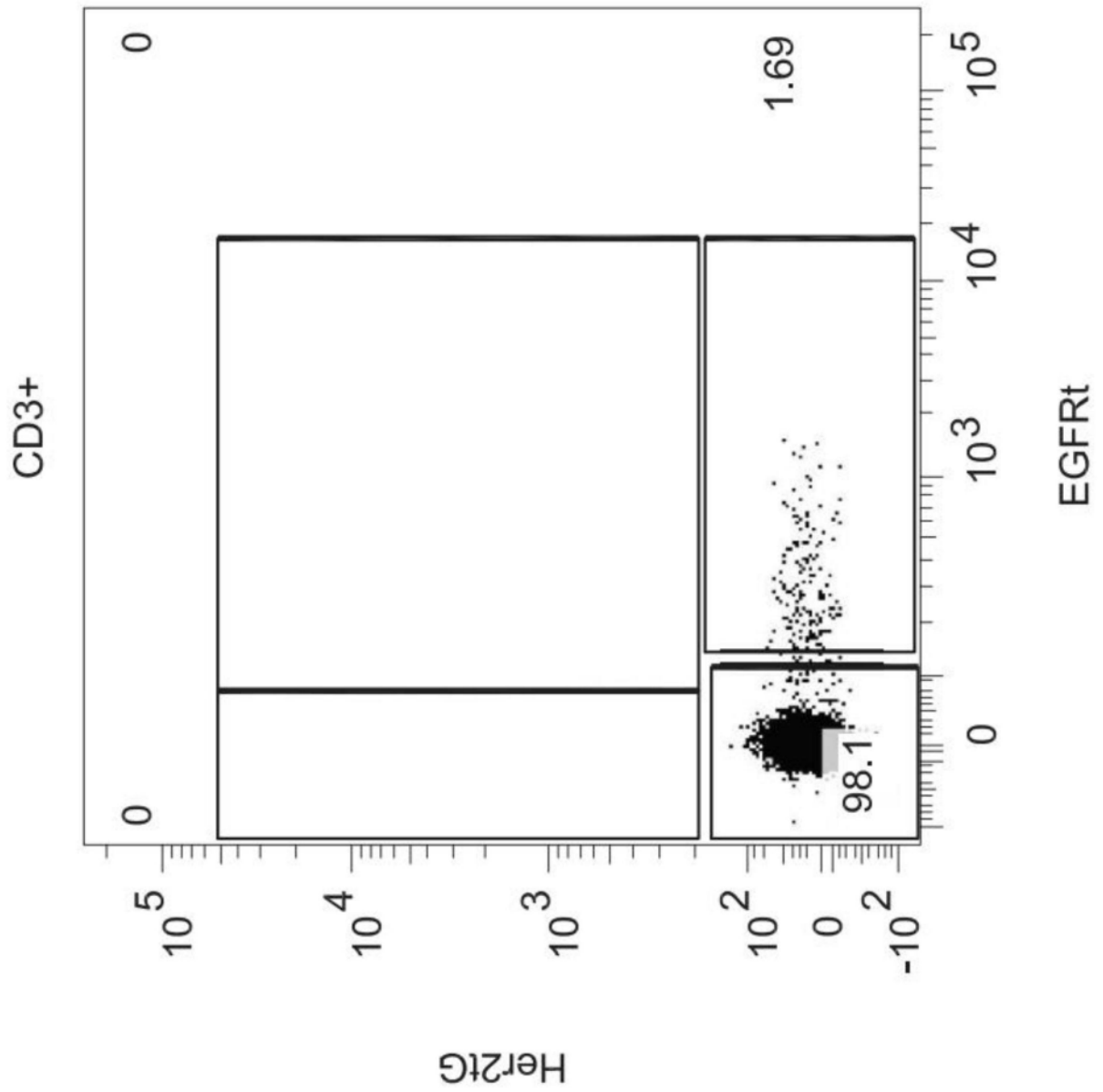


图17D

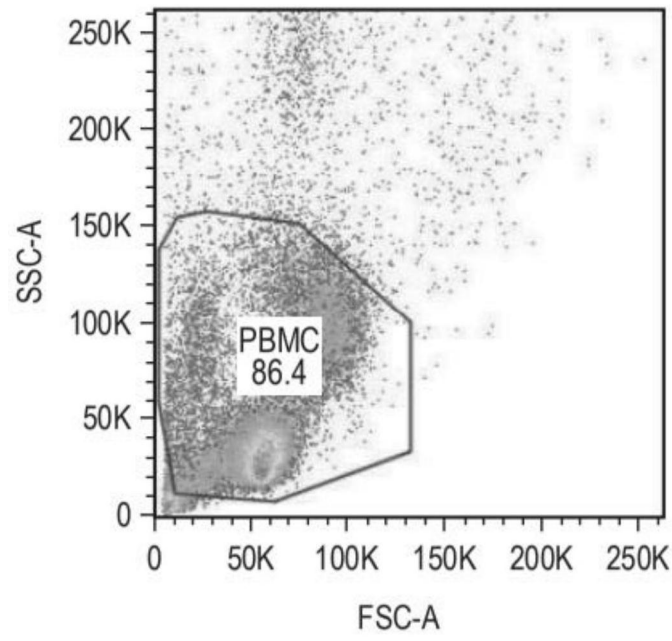


图18A

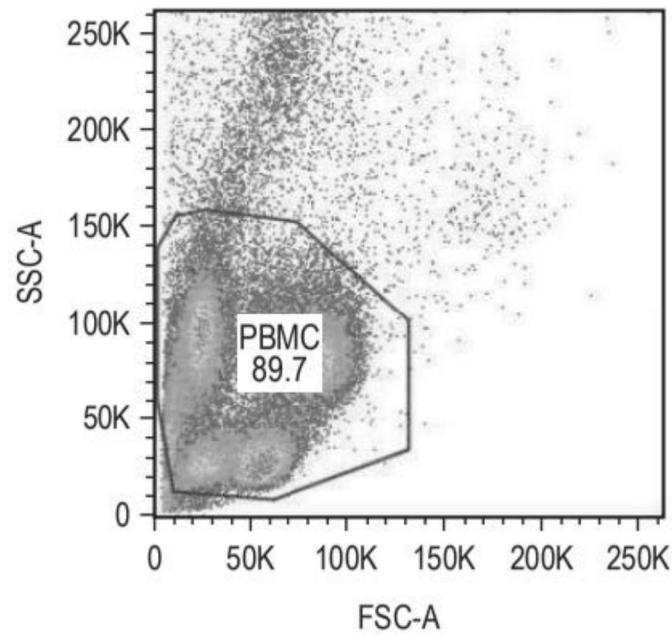


图18B

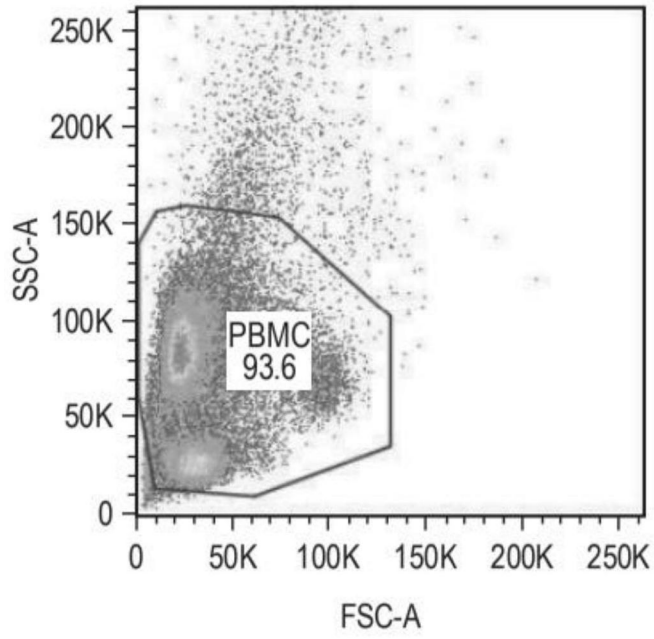


图18C

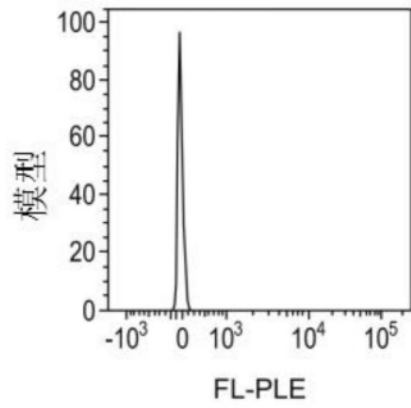


图18D

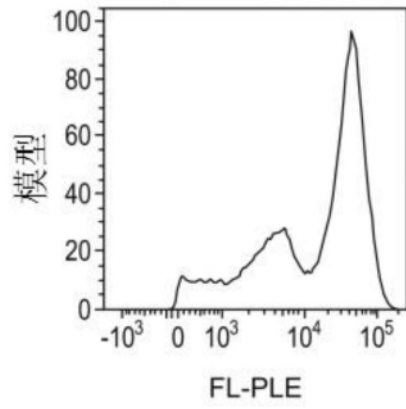


图18E

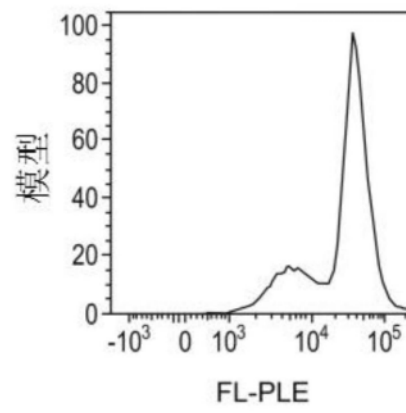


图18F

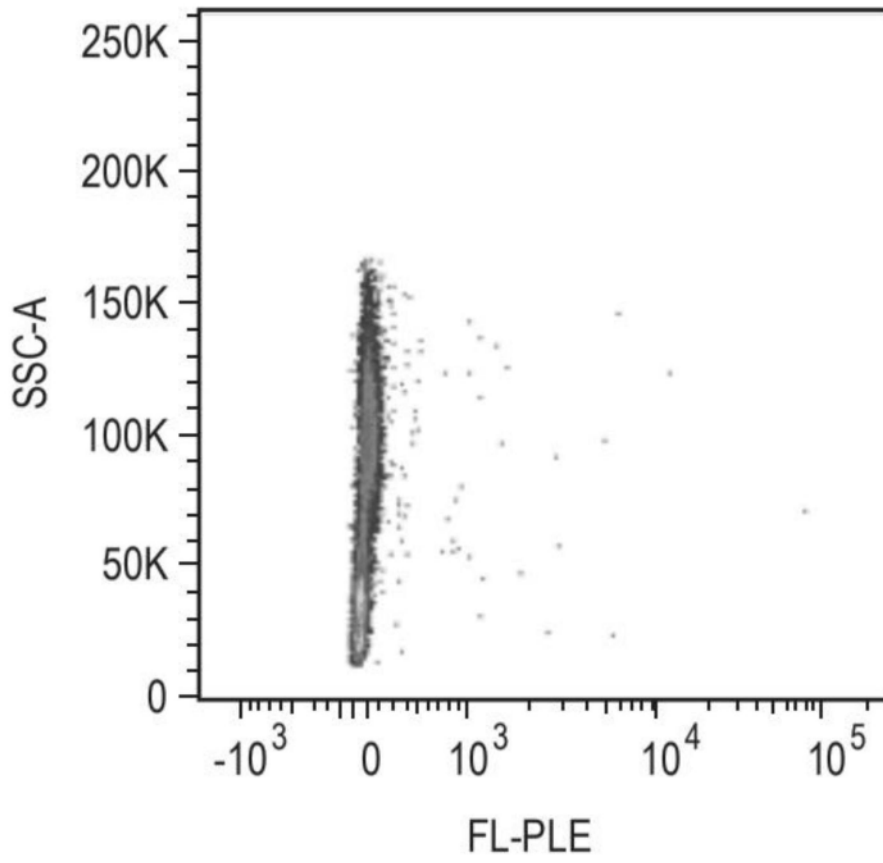


图18G

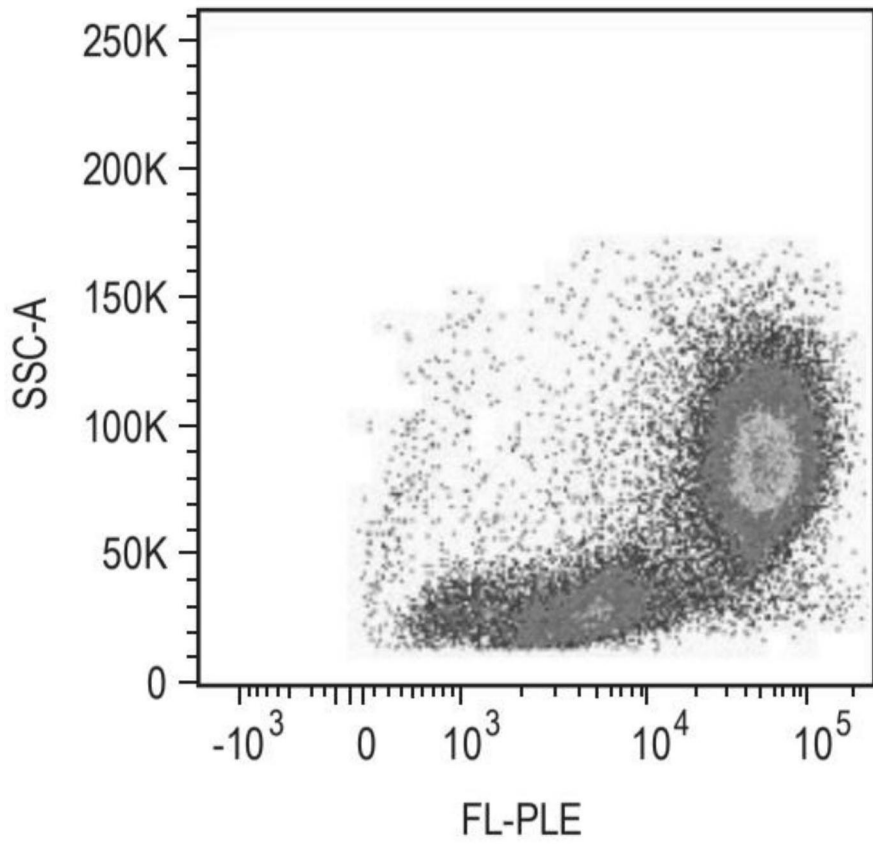


图18H

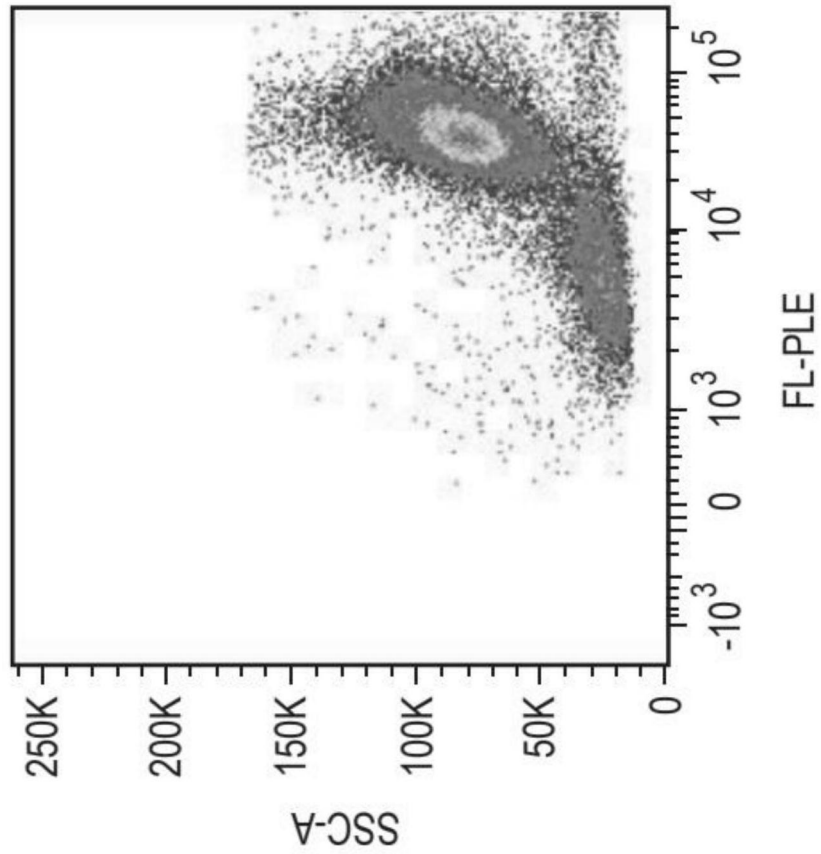


图18I

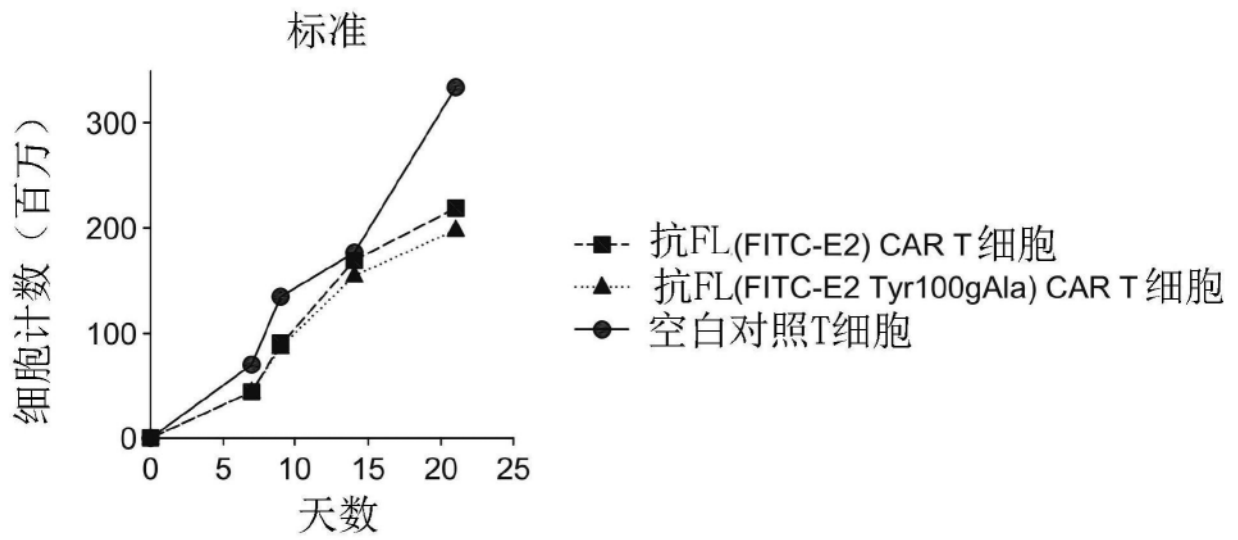


图19A

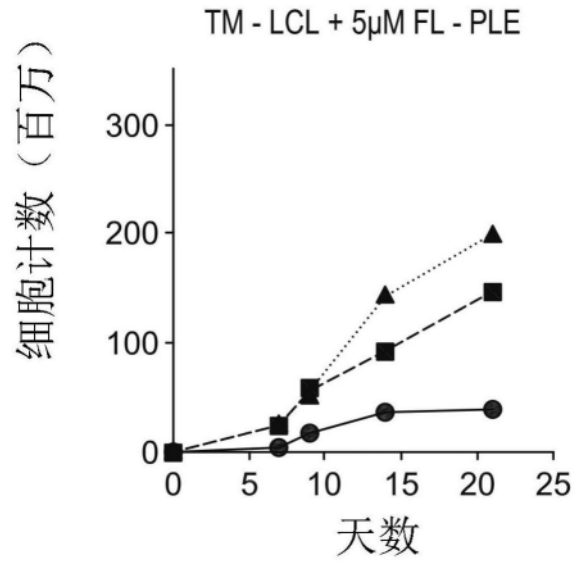


图19B

PBMC (大量减少T细胞) + 5 μ M FL - PLE (7:1)

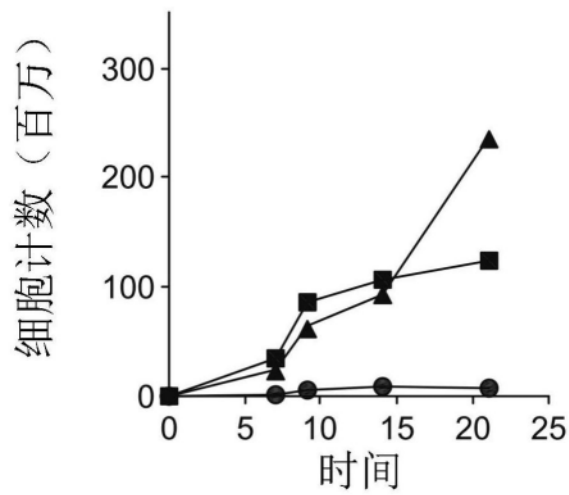


图19C

PBMC(大量减少T细胞) + 5 μ M FL - PLE (14:1)

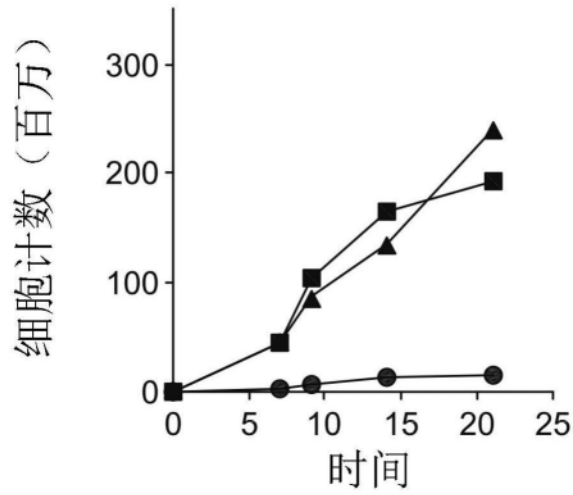


图19D

新鲜解冻的PBMC (大量减少T细胞)
+5 μ M FL-PLE (7:1)

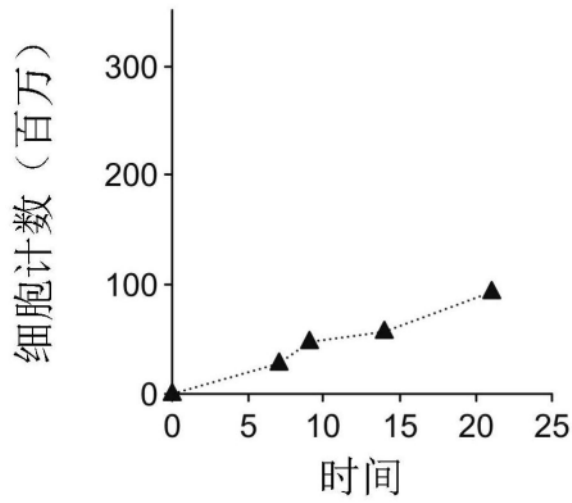


图19E

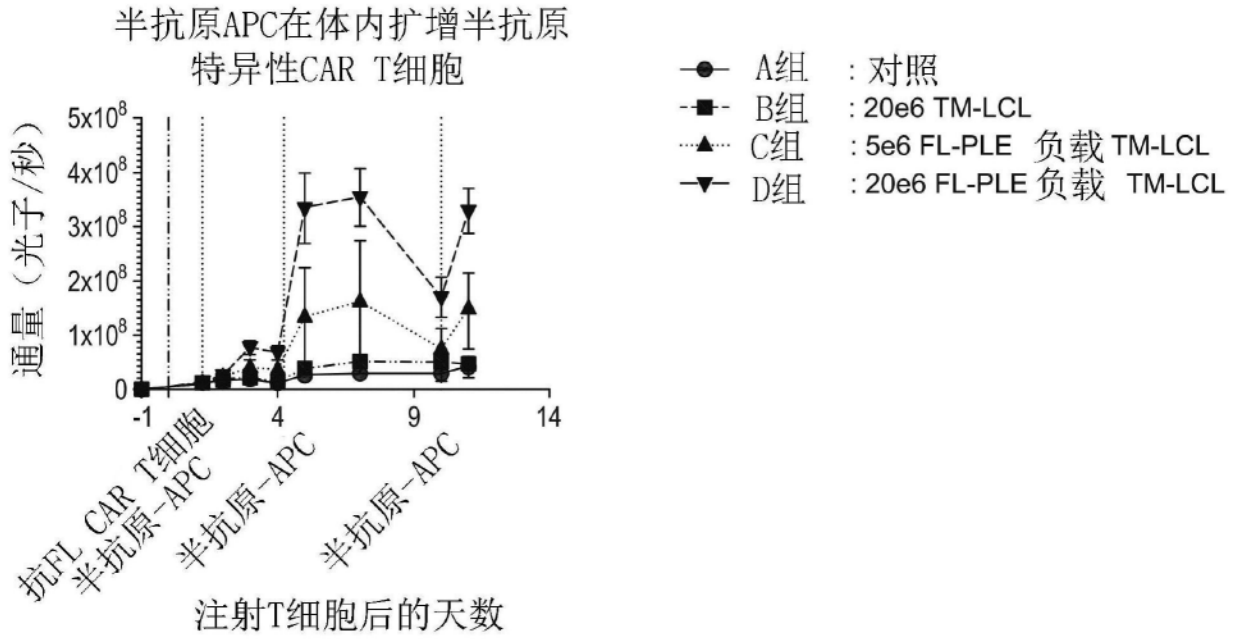


图20A

A组: 仅抗FL CAR T细胞

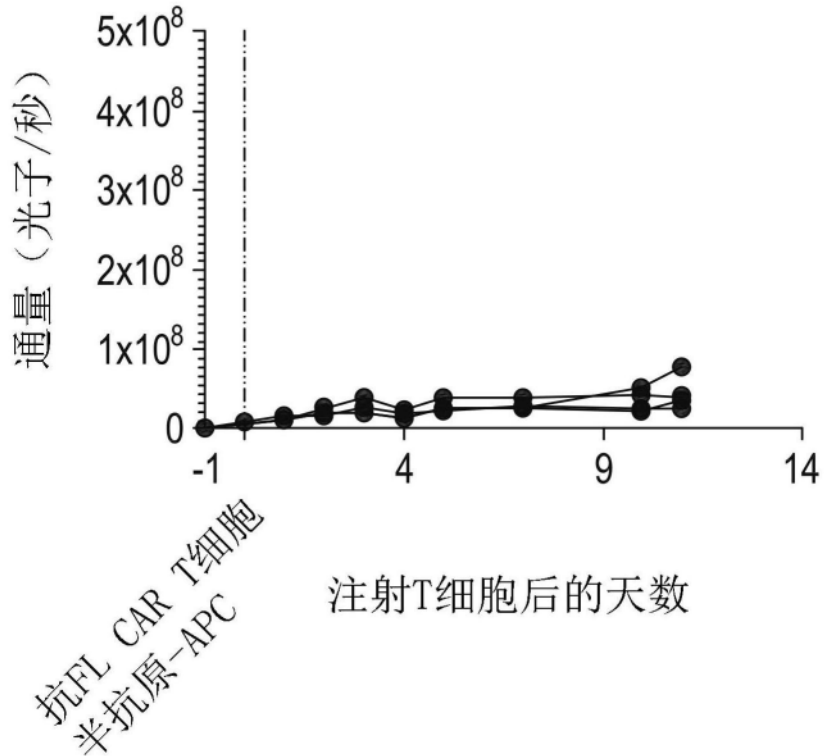


图20B

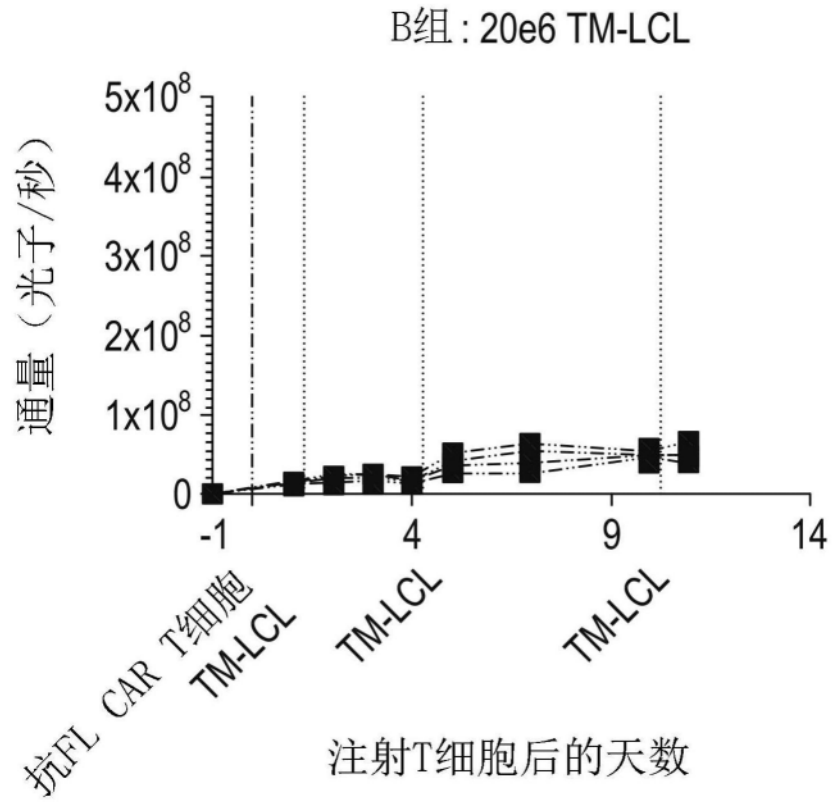


图20C

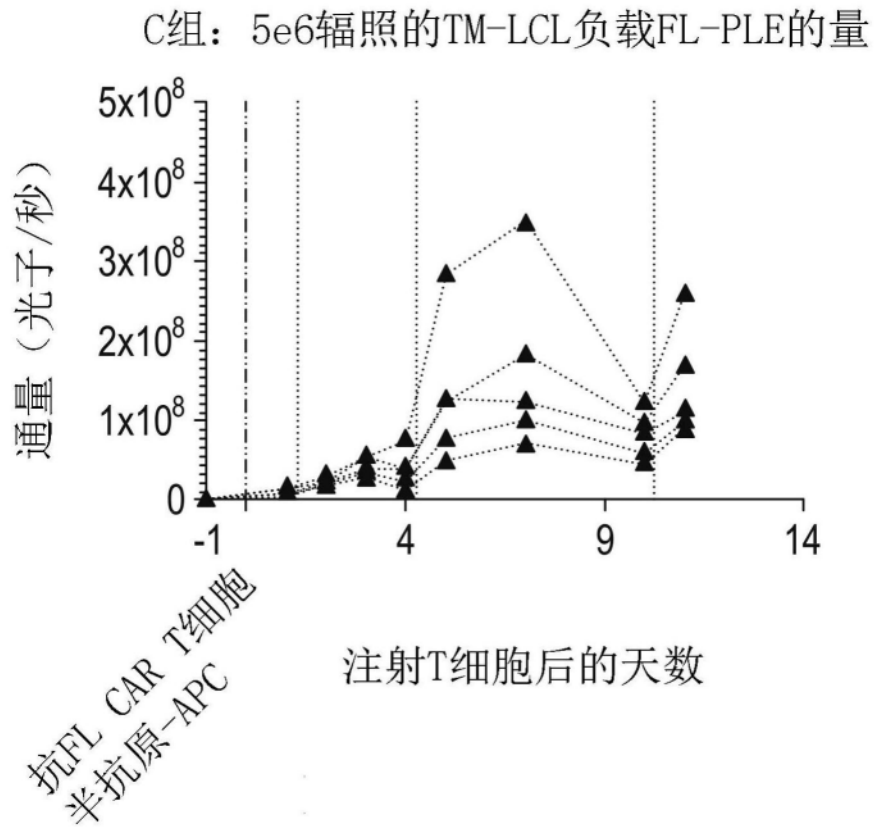


图20D

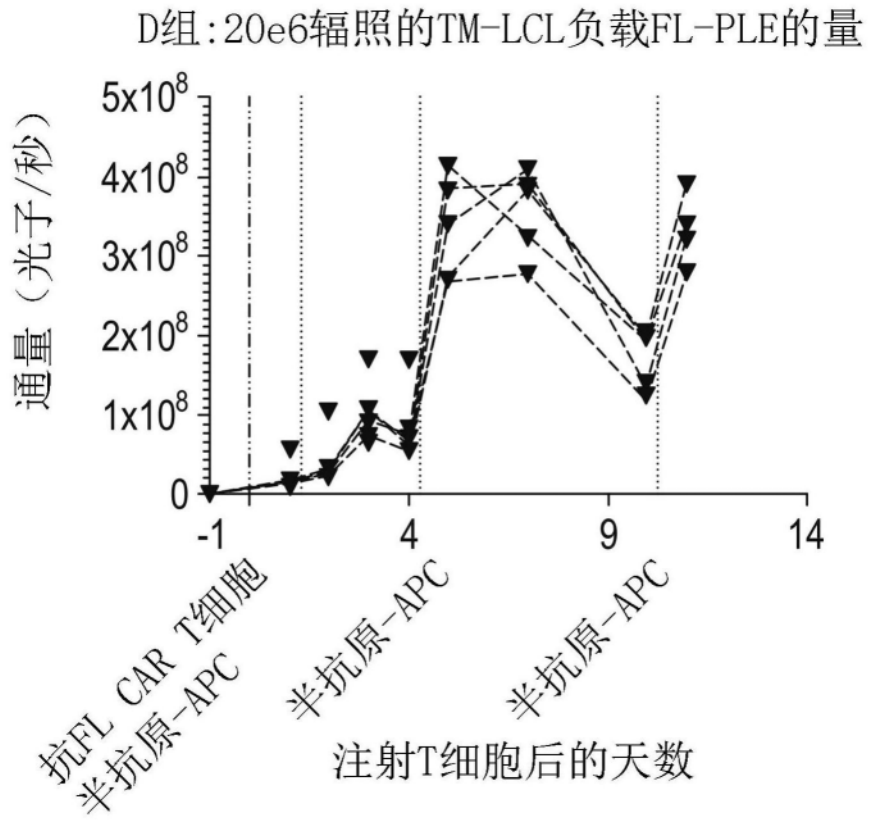


图20E