



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118726268 A

(43) 申请公布日 2024.10.01

(21) 申请号 202410855992.X

(22) 申请日 2016.04.15

(30) 优先权数据

62/149,249 2015.04.17 US

(62) 分案原申请数据

201680035218.8 2016.04.15

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士

申请人 宾夕法尼亚大学托管会

(72) 发明人 D·M·巴莱特 F·贝多亚

S·卡西米 C·H·琼

B·L·莱维内 J·J·梅勒霍斯特

M·C·米伦 D·J·小鲍威尔

N·A·辛格 Z·郑

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 胡志君 黄革生

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书199页

序列表(电子公布) 附图42页

(54) 发明名称

改善嵌合抗原受体表达细胞的功效和扩增的方法

(57) 摘要

本发明提供了能够被工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的制备方法,包含其的组合物和反应混合物,以及使用其进行治疗的方法。

1. 一种富集或制备适用于CAR治疗的免疫效应细胞(例如细胞群体)的方法,包括根据以下一个、两个、三个、四个、五个或更多(全部)获取(例如,获得或收获)免疫效应细胞:

(i) 从受试者(例如血液学癌症患者)获取免疫效应细胞的时机;

fii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机;

(iii) 化疗的类型;

fiv) 潜在的恶性肿瘤;

(v) 免疫效应细胞(例如T细胞)参数,例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一个或多个,

或者(i) - (v)中的两个、三个、四个或五个的组合,

从而富集或制备适用于CAR治疗的免疫效应细胞。

2. 包含表达CAR分子的免疫效应细胞(“CAR表达细胞”(例如细胞群体)的组合物,用于与化疗联合来治疗患有血液学癌症的受试者或向其提供抗肿瘤免疫,其中通过优化以下一个、两个、三个、四个或更多(全部),从受试者获取(例如获得或收获)免疫效应细胞:

(i) 从受试者(例如血液学癌症患者)获取免疫效应细胞的时机;

fii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机;

(iii) 化疗的类型;

fiv) 潜在的恶性肿瘤;

(v) 免疫效应细胞(例如T细胞)参数,例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一个或多个,

或者(i) - (v)中的两个、三个、四个或五个的组合,

f任选地),其中在引入CAR分子之前从受试者获取免疫效应细胞。

3. 一种治疗患有血液学癌症的受试者或向其提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括联合化疗向所述受试者施用有效量的表达CAR分子的免疫效应细胞(“CAR表达细胞”或“CAR治疗”(例如细胞群体),其中通过优化以下一个、两个、三个、四个或更多(全部),从受试者获取(例如获得或收获)免疫效应细胞:

(i) 从受试者(例如血液学癌症患者)获取免疫效应细胞的时机;

fii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机;

(iii) 化疗的类型;

(iv) 潜在的恶性肿瘤;

(v) 免疫效应细胞(例如T细胞)参数,例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一个或多个,

或者(i) - (v)中的两个、三个、四个或五个的组合,

(任选地),其中在引入CAR分子之前从受试者获取免疫效应细胞,

从而治疗血液学癌症或向血液学癌症提供抗肿瘤免疫。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中当(i) - (v)中的任一个被优化时,免疫效应细胞群体显示以下一种或多种的增加:免疫细胞群体的离体扩增,免疫细胞群体对治疗的功效或免疫细胞群体的产率。

5. 如权利要求2-4中任一项所述的方法,其中CAR表达细胞包含编码CAR的核酸,例如本文所述的CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR(例如CTL019)。

6. 一种免疫细胞制备物或反应混合物,例如根据本文所述的任何方法制备的包含免疫效应细胞群体(例如包含CAR分子或编码CAR分子的核酸)。

7. 如权利要求6的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其选自:

(i) 免疫效应细胞群体,包含至少20%幼稚T细胞,至少2%干中央记忆T细胞和/或至少4%中央记忆T细胞,和/或

(ii) 免疫效应细胞群体,包含至少400个细胞/微升的绝对T细胞计数,至少200个细胞/微升的绝对幼稚T细胞计数,至少20个细胞/微升的绝对干中央记忆T细胞计数,和/或至少40个细胞/微升的绝对中央记忆T细胞计数。

8. 如权利要求6所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其基于一种或多种标志物例如CCR7、CD62L、CD45RO和CD95的表达来选择,例如免疫效应细胞群体(例如T细胞)是CCR7<sup>+</sup>和CD62L<sup>+</sup>。

9. 如权利要求7所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其中幼稚T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45RO<sup>-</sup>、CD95<sup>-</sup>的表达模式鉴定,其中干中央记忆T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45RO<sup>-</sup>、CD95<sup>+</sup>的表达模式鉴定,并且其中中央记忆T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、CD95<sup>+</sup>的表达模式鉴定。

10. 如权利要求7-9中任一项所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其包含编码CAR的核酸,例如本文所述的CAR。

## 改善嵌合抗原受体表达细胞的功效和扩增的方法

[0001] 本申请是中国专利申请201680035218.8的分案申请,原申请的申请日是2016年4月15日,发明名称是“改善嵌合抗原受体表达细胞的功效和扩增的方法”。

[0002] 本申请要求2015年4月17日提交的美国序列号62/149,249的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并通过引用整体并入本文。所述ASCII拷贝创建于2016年4月14日,名称为N2067-7094WO\_SL.txt,大小为720,042字节。

### 发明领域

[0005] 本发明总体上涉及被工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞),包含它的组合物以及制备并使用它的方法。

### 发明背景

[0007] 采用自体T细胞,特别是采用嵌合抗原受体(CAR)转导的T细胞的继承性细胞转移(ACT)疗法已经在一些血液学癌症试验中显示出希望。尽管有这些有希望的结果,许多正在进行入组评估的患者(至少部分)由于临床上可行的制成品的产量不足而最终无法进行。临床上可行的制品的这种限制可能由于几个因素的结果而出现的,这些因素包括不能从患者收获充足和足够的淋巴细胞、收获的细胞的限制和有限的体外细胞扩增。

[0008] 因此,需要提高T细胞收获的效率 and 生长更大量的免疫效应细胞以产生临床级制品的能力。

### 发明概述

[0010] 本公开至少部分地涉及改善用于细胞治疗的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的功效和/或扩增(例如,离体扩增)的方法。在一些实施方案中,申请人已经发现了在诊断之后(例如,在治疗之前或在治疗过程的早期时间点之前)尽早从受试者(例如癌症患者)获取(例如收获)免疫细胞的显著益处。本文描述的一些实施方案提供了评估和/或优化用于细胞治疗(例如嵌合抗原受体(CAR)治疗)的免疫细胞适合性的标准。不希望被理论束缚,认为在诊断之后或在用所选化疗治疗之后尽早收获的免疫细胞包括较少分化的免疫效应细胞群体(例如幼稚T细胞和早期记忆性T细胞)。认为较少分化的免疫效应细胞群体具有较高的增殖、自我更新和/或存活能力,并因此具有较高的扩增能力和/或更高的抗肿瘤功效。

[0011] 因此,在实施方案中,本文公开的方法通过在诊断癌症之后早期(例如在化疗之前或在某些/多种化疗周期之前)从受试者获取细胞,有利地提高T细胞合适度(例如,用于细胞治疗的适合性)和功效。在实施方案中,本文公开的方法利用在含有T细胞消耗性药物的化疗周期之前从患者获取的(例如,在2、3、4或5个化疗周期之前获取的),或在延迟加剧或在巩固周期之前获取的细胞。在其他实施方案中,该方法通过包括例如基于恶性肿瘤的类型(例如,白血病与淋巴瘤)或疾病的严重性(例如,标准、高、或非常高风险)的患者选择,优

化免疫细胞的扩增张力和/或抗肿瘤功效。在又其他实施方案中,该方法通过包括细胞选择,例如选择具有较高绝对T细胞计数的细胞群体或更高百分比的较低分化T细胞,优化免疫细胞的扩增能力和/或抗肿瘤功效。因此,本文公开的方法可以用于优化细胞治疗用组合物和方法中的一种或多种,和/或制备免疫效应细胞群体(例如CAR表达细胞)的方法。

[0012] 因此,在一个方面,本发明的特征在于一种评估用于细胞治疗(例如CAR治疗(例如,癌症治疗))的免疫细胞(例如,免疫效应细胞或其群体)的适合性的方法。该方法包括获取以下一个、两个、三个、四个或更多(全部)的值:

[0013] (i) 来自受试者(例如癌症患者)的免疫细胞获取(例如,收获)的时机;

[0014] (ii) 治疗的时机,例如化疗,例如与免疫细胞获取(例如收获)相关;

[0015] (iii) 治疗类型,例如化疗;

[0016] (iv) 潜在的恶性肿瘤;

[0017] (v) 免疫细胞(例如,T细胞)参数,例如T细胞数目、T细胞表型或T细胞功能中的一种或多种,

[0018] 或(i) - (v)的组合,

[0019] 其中(i) - (v)中任一个的值指示免疫细胞用于细胞治疗(例如CAR治疗)的适合性。在一个实施方案中,(i) - (v)中任一个的值指示以下中的一种或多种:免疫细胞的扩增能力(例如,离体扩增)、免疫细胞用于治疗的功效、或免疫细胞的产量。

[0020] 另在一个方面,本发明的特征在于具有癌症的受试者的治疗或提供抗肿瘤免疫的方法。该方法包括与一种治疗(例如化疗)联合治疗向受试者施用有效量的能够表达CAR分子(“CAR表达细胞”或“CAR治疗”)的免疫细胞(例如免疫效应细胞或其群体)。在某些实施方案中,通过优化以下的一个、两个、三个、四个或更多个(全部)来获取(例如,取得或收获)免疫细胞(例如,免疫效应细胞或其群体):

[0021] (i) 从受试者(例如癌症患者)的免疫细胞获取(例如,收获)的时机;

[0022] (ii) 治疗的时机,例如化疗,例如与免疫细胞获取(例如收获)相关;

[0023] (iii) 治疗类型,例如化疗;

[0024] (iv) 潜在的恶性肿瘤;

[0025] (v) 免疫细胞(例如,T细胞)参数,例如T细胞数目、T细胞表型或T细胞功能中的一种或多种,

[0026] 或(i) - (v)的组合。

[0027] 在一个实施方案中,在引入CAR分子之前获取免疫细胞。在一个实施方案中,获取的免疫细胞在引入CAR分子之前被扩增。在其它实施方案中,在引入CAR分子后获取免疫细胞。在一个实施方案中,获取的免疫细胞在引入CAR分子后扩增。免疫细胞可以根据本文所述的任何方法进行扩增和/或活化。

[0028] 在实施方案中,当(i) - (v)中的任一个被优化时,免疫细胞显示下述一个或多个的增加:免疫细胞群体的扩增(例如,离体扩增)、免疫细胞群体用于治疗的功效或免疫细胞群体的产量。

[0029] 在一些实施方案中,该方法包括向获取的免疫细胞(例如,细胞群体)中引入编码CAR(例如本文所述的CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR(例如CTL019))的核酸。

[0030] 在又另在一个方面,本发明的特征在于一种富集或制备适用于CAR治疗(例如表达

CAR分子的细胞)的免疫细胞群体(例如,免疫效应细胞群体)的方法。该方法包括根据以下一个、两个、三个、四个或更多(全部),获取(例如,收获)免疫细胞群体:

[0031] (i) 来自受试者(例如癌症患者)的免疫细胞获取(例如,收获)的时机;

[0032] (ii) 治疗的时机,例如化疗,例如与免疫细胞获取(例如收获)相关;

[0033] (iii) 治疗类型,例如化疗;

[0034] (iv) 潜在的恶性肿瘤;

[0035] (v) 免疫细胞(例如,T细胞)参数,例如T细胞数目、T细胞表型或T细胞功能中的一种或多种,

[0036] 或(i) - (v)的组合。

[0037] 在一个实施方案中,在引入CAR分子之前获取免疫细胞群体。在一个实施方案中,获取的免疫细胞在引入CAR分子之前被扩增。在其它实施方案中,在引入CAR分子后获取免疫细胞。在一个实施方案中,获取的免疫细胞在引入CAR分子后扩增。免疫细胞可以根据本文所述的任何方法进行扩增和/或活化。

[0038] 在实施方案中,当(i) - (v)中的任一个被优化时,免疫细胞显示下述一个或多个的增加:免疫细胞群体的扩增(例如,离体扩增)、免疫细胞群体用于治疗的功效或免疫细胞群体的产量。

[0039] 在一些实施方案中,该方法还包括向获取的免疫细胞(例如,细胞群体)中引入编码CAR(例如本文所述的CAR分子,例如本文所述的CD19 CAR(例如CTL019))的核酸。

[0040] 另在一个方面,本发明的特征在于根据本文所述方法制备的免疫细胞制备物或反应混合物,例如包含免疫效应细胞群体(例如包含CAR分子或编码CAR分子的核酸)。

[0041] 任何上述方法、制备物和反应混合物的其它特征或实施方案包括以下一种或多种:

[0042] 受试者

[0043] 在一个实施方案中,受试者,例如获取免疫细胞的受试者和/或待治疗的受试者是人,例如癌症患者。在某些实施方案中,受试者是年龄为18岁的年轻人,例如,18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1岁或更小(如12个月、6个月、3个月或更小)。在一个实施方案中,受试者是儿科癌症患者。

[0044] 在其他实施方案中,受试者是成年人,例如,受试者年龄大于18岁(例如,18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80或更大)。在一个实施方案中,受试者是成年癌症患者。

[0045] 在某些实施方案中,受试者患有与肿瘤或癌相关抗原的表达相关的疾病(例如本文所述的疾病)。在一个实施方案中,受试者具有癌症,例如本文所述的癌症。

[0046] 在一个实施方案中,受试者具有选自血液癌、实体瘤或其转移性病变的癌症。示例性的癌症包括但不限于B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞早幼粒细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴细胞增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、浆细胞淋巴瘤、

浆细胞样树突状细胞肿瘤和瓦尔登氏巨球蛋白血症。在一个实施方案中,癌症是ALL。在另一个实施方案中,癌症是CLL。

[0047] 在实施方案中,受试者具有白血病,例如ALL。在实施方案中,受试者具有白血病,例如ALL,并且是儿科患者,例如年龄18岁的年轻人,例如,18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1岁或更小(例如12个月、6个月、3个月或更小)。

[0048] 在一个实施方案中,受试者具有ALL,例如被分类为具有标准风险、高风险或非常高风险ALL。在一个实施方案中,受试者具有ALL,例如被分类为具有标准风险、高风险或非常高风险的ALL,并且是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人。在一个实施方案中,受试者被分类为具有标准风险ALL。在实施方案中,受试者被分类为具有标准风险ALL,并且是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人。在另一个实施方案中,受试者不被分类为具有高风险或非常高风险的ALL。在实施方案中,受试者不被分类为具有高风险或非常高风险的ALL,并且是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人。

[0049] 在实施方案中,受试者不具有淋巴瘤,例如,受试者不具有非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在实施方案中,受试者是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人且不具有NHL。

[0050] 在其他实施方案中,受试者具有淋巴瘤,例如NHL。在实施方案中,受试者是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人且具有NHL。

[0051] 在实施方案中,受试者不具有复发性癌症。在实施方案中,受试者是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人且不具有复发性癌症。在其他实施方案中,受试者具有复发性癌症。在实施方案中,受试者是儿科受试者,例如年龄18岁的年轻人并具有复发性癌症。

[0052] 在一个实施方案中,免疫细胞(例如,免疫效应细胞群体)是从具有血液学癌症(例如白血病,例如CLL、ALL或淋巴瘤,例如MCL、NHL或HL)的受试者获取(例如取得)。

[0053] 化疗收获/给药时机

[0054] 在某些实施方案中,免疫细胞获得(例如收获)的早期时机(例如,诊断之后)指示免疫细胞用于细胞治疗(例如CAR治疗)的增加的适合性。在实施方案中,免疫细胞收获的早期时机增加了下述一种或多种的能力:免疫细胞扩增(例如离体扩增)、免疫细胞用于治疗的足够性或免疫细胞的生成产率。

[0055] 在一个实施方案中,在向受试者施用治疗(例如化疗)之前收获免疫细胞导致免疫细胞用于细胞治疗(例如CAR治疗)中的增加的适合性。在其他实施方案中,在治疗(例如化疗)过程中(例如,在受试者经历了2、3、4或5个周期的化疗之前)早期收获免疫细胞导致免疫细胞用于细胞治疗(例如CAR治疗)的增加的适合性。

[0056] 在本文公开的方法的实施方案中,免疫细胞收获发生在向受试者施用治疗(例如化疗)之前。在实施方案中,收获发生在对受试者的治疗(例如化疗)过程早期。在一个实施方案中,免疫细胞收获发生在受试者接受2、3、4或5个周期的化疗之前。在一个实施方案中,免疫细胞收获发生在受试者经历了1个化疗周期之后,但在受试者经历了超过1个周期(例如,超过1、2、3、4或5个周期)的化疗之前。

[0057] 在某些实施方案中,化疗或化疗周期包括诱导、巩固、临时维持、延迟增强或维持治疗周期中的一种或多种。在一个实施方案中,在受试者经历化疗的巩固周期或化疗的诱导周期之前从受试者收获免疫效应细胞。在实施方案中,在受试者经历化疗的巩固周期之前收获细胞。在实施方案中,受试者被分类为具有高风险或非常高风险的癌症(例如ALL),

并且在受试者经历巩固周期之前收获细胞。在另一个实施方案中,在受试者经历延迟增强周期之前从受试者收获免疫效应细胞。在实施方案中,受试者被分类为具有标准风险的癌症(例如ALL),并且在受试者经历延迟增强周期之前收获细胞。在实施方案中,化疗周期选自表8。

[0058] 在一些实施方案中,化疗包括选自表8的药物。在实施方案中,化疗包括表8中所述的药物和给药方案。在实施方案中,化疗可以包括长春新碱、地塞米松、PEG-L-天冬酰胺酶、柔红霉素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、阿糖胞苷、甲氨蝶呤、多柔比星、6-硫鸟嘌呤和/或泼尼松。

[0059] 在一些实施方案中,在受试者已经施用环磷酰胺和/或阿糖胞苷之前从受试者收获免疫效应细胞。

[0060] 免疫效应细胞参数

[0061] 在一些实施方案中,收获的免疫效应细胞包括更多数量的较低分化的T细胞,例如更多数量的一个或多个幼稚T细胞,干中央记忆T细胞和/或中央记忆T细胞,例如与参考值(例如,在稍后时间点或在暴露于额外轮的化疗后来自受试者的样品)相比。在一些实施方案中,收获的免疫效应细胞包括至少20%的幼稚T细胞、至少2%的干中央记忆T细胞和/或至少4%的中央记忆T细胞。

[0062] 在其它实施方案中,增加的绝对T细胞计数(ATC)指示用于细胞治疗(例如CAR治疗)的免疫细胞的增加的适合性。在一个实施方案中,收获的免疫效应细胞包含至少400个细胞/微升的绝对T细胞计数,至少200个细胞/微升的绝对幼稚T细胞计数,至少20个细胞/微升的绝对干中央记忆T细胞计数,和/或至少40个细胞/微升的绝对中央记忆T细胞计数。

[0063] 在实施方案中,基于一种或多种标志物(例如CCR7、CD62L、CD45RO和CD95)的表达来选择免疫效应细胞群体,例如,免疫效应细胞群体(例如,T细胞)是CCR7+和CD62L+。

[0064] 在实施方案中,基于CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95-的表达模式鉴定幼稚T细胞,其中根据CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95+的表达模式鉴定干中央记忆T细胞,以及其中基于CCR7+、CD62L+、CD45RO+、CD95+的表达模式鉴定中央记忆T细胞。

[0065] CAR分子

[0066] 根据本文所述的方法、制备物和反应混合物,免疫效应细胞(例如通过本文所述的方法获得的)可以被工程化以包含靶向一种或多种癌相关抗原的CAR分子(也称为“CAR”)。在一些实施方案中,癌相关抗原(肿瘤抗原)选自以下一种或多种:CD19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1(也被称为CD2子集1,CRACC,SLAMF7,CD319,和19A24);C型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1);CD33表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关的糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞粘附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白介素13受体亚基 $\alpha$ -2(IL-13Ra2或CD213A2);间皮素;白介素11受体 $\alpha$ (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21(Testisin或PRSS21);血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);路易斯(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ );阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 $\alpha$ ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);细胞表面相关的

粘蛋白1(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞粘附分子(NCAM);Prostate;前列腺酸性磷酸酶(PAP);突变的延伸因子2(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$ (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体),碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, $\beta$ 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和A1e1son鼠白血病病毒癌基因同源物1(AB1)组成的癌基因融合蛋白(bcr-ab1);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸基路易斯粘附分子(sLe);神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA);邻乙酰基GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 $\beta$ ;肿瘤血管内皮标记1(TEM1/CD248);肿瘤血管内皮标记7相关的(TEM7R);Claudin 6(CLDN6);促甲状腺激素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组,成员D(GPRC5D);X染色体开放阅读框61(CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶(ALK);聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH葡糖苷神经酰胺的己糖部分(GloboH);乳腺分化抗原(NY-BR-1);uroplakin 2(UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体 $\beta$ 3(ADRB3);pannexin 3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K9(LY6K);嗅觉受体51E2(OR5 1E2);TCR $\gamma$ 交替阅读框蛋白(TARP);肾母细胞瘤蛋白(WT1);癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2(LAGE-1A);黑素瘤相关抗原1(MAGE-A1);ETS易位变异基因6,位于染色体12p(ETV6-AML);精子蛋白17(SPA17);X抗原家族,成员1A(XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2(Tie2);黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2);FOS相关抗原1;肿瘤蛋白质p53(p53);p53突变体;prostelin;存活蛋白;端粒酶;前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1或半乳凝素8),由T细胞识别的黑素瘤抗原1(MelanA或MART1);大鼠肉瘤(Ras)突变体;人端粒酶逆转录酶(hTERT);肉瘤易位断点;细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶,丝氨酸2(TMPRS2)ETS融合基因);N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V(NA17);配对盒蛋白Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;V-myc鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN);Ras同源物家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2);细胞色素P450 1B1(CYP1B1);CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS或印记位点的调节物的兄弟),由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3);配对盒蛋白Pax-5(PAX5);顶体蛋白酶原结合蛋白sp32(OY-TESE1);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK);A激酶锚定蛋白4(AKAP-4);滑膜肉瘤,X断点2(SSX2);高级糖化终产物受体(RAGE-1);肾泛素1(RU1);肾泛素2(RU2);豆类蛋白酶;人类乳头瘤病毒E6(HPV E6);人类乳头瘤病毒E7(HPV E7);肠羧基酯酶;突变的热休克蛋白70-2(mut hosp 70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1);IgA受体的Fc片段(FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2(LILRA2);CD300分子样家族成员f(CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2(BST2);含有EGF样模块粘蛋白样激素受体样2(EMR2);淋巴细胞抗原75(LY75);磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3);Fc受体样5(FCRL5);与免疫球蛋白 $\lambda$ 样多肽1(IGLL1)。

[0067] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是CD19,例如本文所述的CD19 CAR(例如CTL019)。在一个实施方案中,CD19 CAR包含表4所示的氨基酸,或具有表4所示的核苷酸序列。

[0068] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是BCMA,例如本文所述的抗BCMA CAR。在一个实施方案中,抗BCMACAR包含表11所示的氨基酸,或具有表11所示的核苷酸序

列。

[0069] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是EGFRvIII,例如本文所述的抗EGFRvIII CAR,例如US2014/0322275A1中所述,其通过引用并入本文。在实施方案中,抗EGFRvIII CAR包含US2014/0322275A1中所示的氨基酸,或具有US2014/322275A1中所示的核苷酸序列,其通过引用并入本文。

[0070] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是CD123,例如本文所述的抗CD123CAR,例如US2014/0322212A1或US2016/0068601A1中所述,两者都通过引用并入本文。在实施方案中,抗CD123 CAR包含US2014/0322212A1或US2016/0068601A1中所示的氨基酸,或具有US2014/0322212A1或US2016/0068601A1中所示的核苷酸序列,其均通过引用并入本文。

[0071] 在一个实施方案中,CAR分子靶向的癌相关抗原是间皮素,例如本文所述的抗间皮素CAR,例如描述于WO 2015/090230中,其通过引用并入本文。在实施方案中,抗间皮素CAR包含WO 2015/090230中所示的氨基酸,或具有WO 2015/090230中所示的核苷酸序列,其通过引用并入本文。

[0072] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是间皮素,例如本文所述的抗CLL1 CAR,例如US2016/0051651A1中所述,其通过引用并入本文。在实施方案中,抗CLL1 CAR包含US2016/0051651A1中所示的氨基酸,或具有US2016/0051651A1中所示的核苷酸序列,其通过引用并入本文。

[0073] 在一个实施方案中,由CAR分子靶向的癌相关抗原是间皮素,例如本文所述的抗CD33 CAR,例如US2016/0096892A1中所述,其通过引用并入本文。在实施方案中,抗CD33 CAR包含US2016/0096892A1中所示的氨基酸,或具有US2016/0096892A1中所示的核苷酸序列,其通过引用并入本文。

[0074] 在一些实施方案中,所编码的CAR分子的抗原结合结构域包含抗体、抗体片段、scFv、Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、单结构域抗体(SDAB)、VH或VL结构域,或骆驼科VHH结构域。

[0075] 在一些实施方案中,CAR分子的跨膜结构域包含选自以下的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、或 $\zeta$ 的跨膜结构域、CD28、CD3  $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD160、CD19、IL2R  $\beta$ 、IL2R  $\gamma$ 、IL7R  $\alpha$ 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、和/或NKG2C的跨膜结构域。

[0076] 在某些实施方案中,CAR分子的跨膜结构域包含CD8跨膜结构域的氨基酸序列,其具有SEQ ID NO:6的至少一个、两个或三个修饰,但不超过20、10或5个修饰,或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的序列。

[0077] 在其他实施方案中,编码CD8跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:17的序列,或

与其具有95-99%同一性的序列。

[0078] 在某些实施方案中,抗原结合结构域由铰链区连接到所述跨膜结构域。在一个实施方案中,铰链区包含CD8铰链的氨基酸序列,例如,SEQ ID NO:2;或IgG4铰链的氨基酸序列,例如,SEQ ID NO:36,或与SEQ ID NO:2或36具有95-99%同一性的序列。在其他实施方案中,编码铰链区的核酸序列包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:37的序列,分别对应于CD8铰链或IgG4铰链,或与SEQ ID NO:13或37具有95-99%同一性的序列。

[0079] 在其他实施方案中,CAR包含胞内信号传导结构域,例如主信号传导结构域(primary signaling domain)和/或共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含主信号传导结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含主信号传导结构域和共刺激信号传导结构域。

[0080] 在某些实施方案中,主信号传导结构域包含选自CD3  $\zeta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3  $\delta$ 、CD3  $\epsilon$ 、常见FcR  $\gamma$  (FCER1G)、FcR  $\beta$  (Fc  $\epsilon$  R1b)、CD79a、CD79b、Fc $\gamma$  RIIa、DAP10和DAP12的蛋白质的功能信号传导结构域。

[0081] 在一个实施方案中,CAR分子的主信号传导结构域包含CD3 $\zeta$ 的功能信号传导结构域。CD3 $\zeta$ 主信号传导结构域可包含具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的至少1、2或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,主信号传导结构域包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的序列。在其他实施方案中,编码主信号传导结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。

[0082] 在一些实施方案中,CAR分子的胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。例如,胞内信号传导结构域可以包含主信号传导结构域和共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域包含选自如下一一种或多种的蛋白质的功能信号传导结构域:CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS,淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性结合CD83的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD160、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R  $\gamma$ 、IL7R  $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46或NKG2D。

[0083] 在一些实施方案中,CAR分子的共刺激信号传导结构域包含具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的至少1、2、或3个修饰但不超过20、10或5个修饰的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:16的氨基酸序列有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,编码的共刺激信号传导结构域包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:16的序列。在其他实施方案中,编码共刺激信号传导结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:15的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。

[0084] 在其他实施方案中,CAR分子的胞内结构域包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的

序列,和SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:16的序列,其中包含该胞内信号传导结构域的氨基酸序列在相同框内并且作为单个多肽链表达。

[0085] 在某些实施方案中,编码胞内信号传导结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:15的序列,或与其具有95-99%同一性的序列,和SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21的序列,或与其具有95-99%同一性的序列。

[0086] 在一些实施方案中,CAR还包含前导序列。在一个实施方案中,前导序列包含SEQ ID NO:1的序列。

[0087] 在某些实施方案中,CAR分子的抗原结合结构域具有 $10^{-4}$ M到 $10^{-8}$ M的结合亲和力KD。

[0088] 在一个实施方案中,CAR分子的抗原结合结构域是本文中所描述的抗原结合结构域,例如,本文描述的在上文提供的靶标的抗原结合结构域。

[0089] 在一些实施方案中,CAR包含CD19 CAR,例如本文所述的CD19 CAR。在实施方案中,CD19CAR包含本文所述的抗原结合结构域,例如表1或表4。

[0090] 治疗方法/联合疗法

[0091] 根据本文所述的治疗如本文所述的病症(例如癌症)和提供抗肿瘤免疫的方法,在一些实施方案中,所述方法包括通过本文所述的方法向受试者施用CAR分子或免疫效应细胞群体。在一些实施方案中,免疫效应细胞群体被工程化以表达CAR分子,例如本文描述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR。在实施方案中,所述方法还包括向受试者施用治疗,例如本文所述的化疗。

[0092] 本文还提供了包含免疫效应细胞(例如,免疫效应细胞群体)的组合物,其包含用于治疗具有与肿瘤抗原表达相关的疾病(例如本文所述的病症)的受试者的CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)。

[0093] 在一些实施方案中,同时施用化疗(例如,化疗周期)和CAR治疗。在其它实施方案中,化疗(例如,化疗周期)和CAR治疗依次施用,例如一个接一个地施用。在实施方案中,在化疗的施用(例如,化疗的周期)和CAR治疗中存在小于1周(例如,小于7、6、5、4、3、2或1天)的重叠。在实施方案中,在化疗施用(例如,化疗周期)和CAR治疗中存在至少1周(例如,至少1、2、3、4、5周,1、2、3、4、5、6个月或更多)的重叠。

[0094] 在一些实施方案中,CAR治疗在化疗之前施用,例如在化疗周期之前。在实施方案中,CAR治疗在化疗的第一周期、第二周期、第三周期、第四周期或第五周期之前施用。在实施方案中,CAR治疗在化疗的诱导周期、巩固周期、临时维持周期、延迟加强周期或维持周期之前施用。在实施方案中,CAR治疗在化疗(例如化疗周期)之前施用,包括本文所述的药物,例如表8中所述的药物。在实施方案中,CAR治疗的施用在化疗施用之前(例如,在化疗周期之前)开始,然后同时持续CAR治疗和化疗施用一段时间。

[0095] 在实施方案中,CAR治疗在化疗后施用,例如在化疗周期之后。在实施方案中,CAR治疗在化疗的第一周期、第二周期、第三周期、第四周期或第五周期之后施用。在实施方案中,CAR治疗在化疗的诱导周期、巩固周期、临时维持周期、延迟加强周期或维持周期之后施用。在实施方案中,CAR治疗在化疗(例如化疗周期)后施用,包括本文所述的药物,例如表8中所述的药物。在实施方案中,CAR治疗的施用在化疗施用后(例如,经过一个周期的化疗后)开始,然后同时持续CAR治疗和化疗施用一段时间。

[0096] 在一个实施方案中,癌症是血液学癌症,例如ALL或CLL。在一个实施方案中,癌症,例如本文所述的血液学癌症,例如白血病(例如ALL或CLL)或淋巴瘤(例如MCL、HL或NHL)。

[0097] 在一个实施方案中,与肿瘤抗原(例如本文所述的肿瘤抗原,例如CD19)相关的疾病选自增殖性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如骨髓增生异常、骨髓增生异常综合征或白血病前期或是与本文所述肿瘤抗原表达相关的非癌相关适应症。在一个实施方案中,疾病是本文所述的癌症,例如本文所述的与本文所述的靶标相关的癌症。在一个实施方案中,血液癌是白血病。在一个实施方案中,癌症选自一种或多种急性白血病,包括但不限于B-ALL、T-ALL、ALL;一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL);其他血液学癌症或血液病症,包括但不限于B细胞淋巴细胞性白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤,伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤,恶性淋巴细胞增生性疾病,MALT淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,边缘淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆细胞淋巴瘤,浆细胞样树突状细胞瘤,瓦尔登氏巨球蛋白血症和/或“白血病前期”(例如,通过髓样血细胞无效生产(或发育异常)联合在一起的血液病症的多样集合)。在某些实施方案中,与本文所述肿瘤抗原表达相关的疾病包括但不限于非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤,癌前病症或表达本文所述的肿瘤抗原的增殖性疾病;及其任何组合。

[0098] 在实施方案中,与肿瘤抗原表达相关的疾病选自与肿瘤抗原表达相关的增殖性疾病、癌前病症、癌症和非癌相关适应症。

[0099] 在另一个实施方案中,与本文所述的肿瘤抗原相关的疾病是实体瘤。在实施方案中,癌症选自结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、肺的非小细胞癌、小肠癌、食道癌、黑素瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部肿瘤、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肉瘤软组织、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中央神经系统肿瘤(CNS)、原发性中央神经系统淋巴瘤肺、血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症、所述癌症的组合和所述癌症的转移性病变。

[0100] 在任何上述方法或用途的某些实施方案中,与疾病相关的肿瘤抗原选自CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1(CLECL1)、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR- $\beta$ 、SSEA-4、CD20、叶酸受体 $\alpha$ 、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺炎、PAP、ELF2M、Ephrin B2、FAP、IGF-1受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe<sup>x</sup>、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰GD2、叶酸受体 $\beta$ 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostelin、存活素和端粒酶、PCTA-1/Galectin 8、MelanA/MART1、ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、

雄激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY- TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、豆荚蛋白酶、HPV E6、E7、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5和IGLL1。

[0101] 在一个实施方案中,细胞群体对于施用该群体的受试者是自体的。在一个实施方案中,细胞群体对施用群体的受试者是同种异体的。在一个实施方案中,受试者是人。

[0102] 在一个实施方案中,例如通过本文所述的方法扩增用编码CAR(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的核酸转导的免疫效应细胞群体。在一个实施方案中,将细胞扩增8天或更少的时间,例如7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,将细胞,例如本文所述的CD19 CAR细胞在培养物中扩增5天,并且所得细胞比在相同培养条件(例如,如在此所述)下在培养物中扩增9天的相同细胞更有效。

[0103] 在一个实施方案中,受试者以每kg体重的受试者施用 $10^4$ 至 $10^6$ 个免疫效应细胞。在一个实施方案中,受试者接受免疫效应细胞群体的初始施用(例如,每kg体重的受试者初始施用 $10^4$ 至 $10^6$ 个免疫效应细胞,例如,每kg体重的受试者初始施用 $10^4$ 至 $10^5$ 个免疫效应细胞),其中多个包含编码CAR(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的核酸,以及免疫效应细胞群体的一个或多个后续施用(例如,每kg体重的受试者 $10^4$ 至 $10^6$ 个免疫效应细胞的一个或多个后续施用,例如每kg体重的受试者 $10^4$ 至 $10^5$ 个免疫效应细胞,其中多个包含编码CAR(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的核酸。在一个实施方案中,一个或多个后续施用是在先前施用后小于15天,例如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3天或2天,例如,在上次施用后小于4、3、2天施用。在一个实施方案中,受试者在至少三次施用免疫效应细胞群体的过程中接受每kg体重的受试者总共约 $10^6$ 个免疫效应细胞,例如,受试者接受 $1 \times 10^5$ 个免疫效应细胞的初始剂量, $3 \times 10^5$ 个免疫效应细胞的第二次施用,以及 $6 \times 10^5$ 个免疫效应细胞的第三次施用,并且例如每次施用是在先前施用后少于4、3、2天施用。

[0104] 在某些实施方案中,所述方法或用途与增加免疫效应细胞的功效的药剂(例如本文所述的药剂)组合进行。

[0105] 方法、制备物和反应混合物的进一步实施方案

[0106] 根据本文所述的治疗和/或制备制备物和反应混合物的方法,在实施方案中,该方法还包括从免疫细胞群体中除去T调节细胞,例如CD25+ T细胞,从而例如提供适用于表达CAR的T调节性消耗细胞群体,例如CD25+消耗细胞。

[0107] 在一个实施方案中,T调节性消耗细胞的群体含有小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0108] 在一个实施方案中,免疫细胞群体包括具有癌症的受试者的细胞,例如具有表达CD25的癌症例如慢性淋巴细胞白血病(CLL)的受试者的细胞。在一个实施方案中,T调节性消耗细胞的群体含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞。

[0109] 在一个实施方案中,免疫细胞群体对于将被给予细胞用于治疗的受试者是自体的。在一个实施方案中,免疫效应细胞群体与将被给予细胞用于治疗的受试者是同种异体的。

[0110] 在一个实施方案中,使用抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体例如IL-2,从群体中除去T调节细胞,例如CD25+T细胞。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体与基质(例如珠)缀合,或以其它方式包被在基质(例如珠)上。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段与本文所述的基质缀合。

[0111] 在一个实施方案中,使用来自Miltenyi™的CD25消耗试剂从群体中除去T调节细胞,例如CD25+T细胞。在一个实施方案中,细胞与CD25消耗试剂的比例为1e7个细胞对20uL,或1e7个细胞对15μL,或1e7个细胞对10uL,或1e7个细胞对5uL,或1e7个细胞对2.5uL,或1e7个细胞对1.25uL。

[0112] 在一个实施方案中,T调节性消耗细胞,例如CD25+消耗细胞的群体适合于表达本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR。在一个实施方案中,T调节性消耗细胞的群体含有小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的白血病细胞,例如,CLL细胞,ALL细胞或淋巴瘤细胞,例如MCL细胞、NHL细胞或HL细胞。在一个实施方案中,从具有CLL的受试者获得免疫效应细胞群体,并且T调节性消耗细胞群体,例如CD25+消耗细胞的群体含有小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的白血病细胞,例如CLL细胞,并且适合于本文所述的CD19 CAR的表达。在一个实施方案中,T调节性消耗细胞的群体含有小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞,和小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,T调节性消耗细胞的群体含有小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞,和小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0113] 在实施方案中,从受试者的血液,例如外周血中收获免疫效应细胞。

[0114] 在一个实施方案中,免疫效应细胞群体是从外周血淋巴细胞分离的T细胞。在一个实施方案中,通过裂解红细胞和/或通过消耗单核细胞获得T细胞群体。在一个实施方案中,使用例如本文所述的方法从外周淋巴细胞分离T细胞群体。

[0115] 在一个实施方案中,免疫效应细胞群体可以从受试者的血液样品中获得,例如通过单采血液成分术获得。在一个实施方案中,通过单采血液成分术收集的细胞被洗涤以除去血浆部分,并且任选地,将细胞提供在适当的缓冲液或培养基中用于随后的加工步骤。在一个实施方案中,用缓冲液例如磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一个实施方案中,细胞在缺乏一种或多种二价阳离子(例如钙和镁)的洗涤溶液中洗涤。在一个实施方案中,将细胞在基本上不含二价阳离子的缓冲液中洗涤。

[0116] 在实施方案中,通过使用密度离心从血液中收获免疫效应细胞。

[0117] 在一个实施方案中,该制备方法还包括从表达肿瘤抗原(例如,不包含CD25,例如CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14或CD11b的肿瘤抗原)的群体移除细胞,从而提供T调节消耗的,例如CD25+消耗的群体,以及适合于表达CAR,例如本文所述的CAR的肿瘤抗原消耗的细胞。在一个实施方案中,肿瘤抗原表达细胞与T调节的,例如CD25+细胞被同时除去。例如,抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接到相同的基质,例如可用于除去细胞的珠,或者抗CD25抗体或其片段或抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接到分离的珠上,其混合物可用于除去细胞。在其它实施方案中,T调节细胞例如CD25+细胞的去除以及肿瘤抗原表达细胞的去除是顺序的,并且可以以任一顺序发生。

[0118] 在一个实施方案中,该制备方法还包括从群体中移除表达检查点抑制物,例如本

文所述的检查点抑制物的细胞,例如PD1+细胞,LAG3+细胞和TIM3+细胞中的一种或多种,从而提供T调节消耗的,例如CD25+消耗细胞和检查点抑制剂消耗的细胞,例如PD1+、LAG3+和/或TIM3+消耗的细胞的群体。在一个实施方案中,与T调节性例如CD25+细胞同时除去检查点抑制物表达细胞。例如,可以将抗CD25抗体或其片段和抗检查点抑制物抗体或其片段连接到可用于除去细胞的相同珠上,或者抗CD25抗体或其片段和抗检查点抑制剂抗体或其片段可以连接到分离的珠上,其混合物可用于除去细胞。在其它实施方案中,T调节细胞(例如CD25+细胞)的去除以及检查点抑制物表达细胞的去除是顺序的,并且可以以任一顺序发生。

[0119] 在一个实施方案中,要除去的细胞群体既不是调节性T细胞或肿瘤细胞,而是另外的负面影响CART细胞的扩增和/或功能的细胞,例如,表达CD14、CD11b、CD33、CD15或潜在免疫抑制细胞表达的其他标志物的细胞。在一个实施方案中,可以设想这样的细胞与调节性T细胞和/或肿瘤细胞同时除去,或者在所述消耗后除去,或以另一顺序除去。

[0120] 在一个实施方案中,该方法还包括从表达CD14的群体中移除细胞,从而提供T调节性消耗的,例如CD25+消耗细胞和CD14+消耗的细胞的群体。在一个实施方案中,CD14+细胞与T调节性例如CD25+细胞同时除去。例如,可以将抗CD25抗体或其片段和抗CD14抗体或其片段连接到可用于除去细胞的相同珠上;或抗CD25抗体或其片段和抗CD14抗体或其片段可以连接到分离的珠上,所述珠的混合物可用于除去细胞。在其他实施方案中,T调节细胞例如CD25+细胞的去除以及CD14+细胞的去除是顺序的,并且可以以任一顺序发生。

[0121] 在一个实施方案中,提供的免疫效应细胞群体已经基于一种或多种标志物,例如,CD3、CD28、CD4、CD8、CD27、CD127、CD45RA和CD45RO的表达来选择,例如所提供的免疫效应细胞群体(例如,T细胞)是CD3+和/或CD28+。

[0122] 在一个实施方案中,该方法还包括获得富集一种或多种标志物,例如CD3、CD28、CD4、CD8、CD27、CD127、CD45RA和CD45RO的表达的免疫效应细胞(例如T细胞)群体。在一个实施方案中,免疫效应细胞群体富集CD3+和/或CD28+细胞。例如,获得通过与抗CD3/抗CD28缀合的珠温育分离的T细胞。在一个实施方案中,所述方法还包括从T调节性消耗细胞例如CD25+消耗细胞群体中选择细胞,所述细胞表达一种或多种标志物例如,CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和CD45RO。

[0123] 在一个实施方案中,该方法还包括例如通过本文所述的方法活化T调节性消耗细胞,例如CD25+消耗细胞群体。

[0124] 在实施方案中,该方法还包括用包含编码本文所述的CAR的核酸(例如本文所述的CD19 CAR)的载体从免疫效应细胞群体转导细胞。在实施方案中,该方法还包括例如通过本文所述的方法扩增免疫效应细胞群体,例如经工程改造以表达CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR。在实施方案中,细胞群体在细胞因子例如IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)的存在下扩增。

[0125] 在一个实施方案中,该制备方法还包括用包含编码CAR(例如本文所述的CAR,例如,本文描述的CD19 CAR)的核酸的载体转导来自T调节性消耗细胞群体,例如CD25+消耗细胞群体的细胞。在一个实施方案中,载体选自DNA,RNA,质粒,慢病毒载体,腺病毒载体或逆转录病毒载体。在一个实施方案中,来自T调节性消耗细胞群体(例如CD25+消耗细胞的群体)的细胞用载体转导一次,例如在从受试者的血液样品中获得免疫效应细胞的群体(例如

通过单采血液成分术获得)后一天内。

[0126] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括从T调节性消耗细胞群体(例如CD25<sup>+</sup>消耗细胞群体)产生瞬时表达外源性RNA的RNA工程化细胞群体。该方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入来自所述群体的细胞中,其中所述RNA包含编码CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR的核酸。

[0127] 在一个实施方案中,例如通过本文所述的方法扩增用编码CAR(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的核酸转导的细胞。在一个实施方案中,细胞在培养中扩增数小时(例如约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21小时)至约14天(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)。在一个实施方案中,将细胞扩增4至9天。在一个实施方案中,将细胞扩增8天或更少的时间,例如7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,将细胞,例如本文所述的CD19 CAR细胞在培养物中扩增5天,并且所得细胞比在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞更有效。效力可以例如通过各种T细胞功能,例如,增殖、靶细胞杀伤、细胞因子产生、活化、迁移或其组合来定义。在一个实施方案中,与在相同培养条件下培养9天的相同细胞相比,扩增了5天的细胞,例如本文所述的CD19 CAR细胞,在抗原刺激时显示细胞倍增至少增加1倍、2倍、3倍或4倍。在一个实施方案中,将细胞,例如表达本文所述的CD19 CAR的细胞在培养物中扩增5天,并且与在相同培养条件下培养9天的相同细胞相比,所得细胞表现出更高的促炎细胞因子产生,例如IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平。在一个实施方案中,与在相同培养条件下培养9天的相同细胞相比,扩增了5天的细胞,例如本文所述的CD19 CAR细胞显示促炎细胞因子产生(以pg/ml计),例如,IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平的至少一倍、二倍、三倍、四倍、五倍、十倍或更多倍增加。

[0128] 在一个实施方案中,通过在刺激CD3/TCR复合体相关信号的试剂和刺激例如如本文所述细胞表面上的共刺激分子的配体存在下培养细胞来扩增细胞。在一个实施方案中,试剂是与抗CD3抗体或其片段和/或抗CD28抗体或其片段缀合的珠。

[0129] 在一个实施方案中,细胞在适当的培养基(例如,本文所述的培养基)中扩增,所述培养基可以任选地含有一种或多种增殖和/或活力因子,包括血清(如胎牛或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 或用于细胞生长的任何其它添加剂。

[0130] 在一个实施方案中,细胞在包括一种或多种白介素的合适培养基(例如,本文所述的培养基)中扩增,其导致在14天的扩增期内细胞的至少200倍(例如,200倍、250倍、300倍、350倍)的增加,例如,如通过本文所述的方法,如流式细胞术测量。在一个实施方案中,细胞在IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)的存在下扩增。

[0131] 在一个实施方案中,细胞在适当的扩增期后冷冻保存。在一个实施方案中,根据本文所述的方法将细胞冷冻保存。在一个实施方案中,将扩增的细胞在合适的培养基(例如不融合性(infusible)培养基)中冷冻保存,例如如本文所述。

[0132] 在一个实施方案中,该制备方法还包括使免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸接触。在一个实施方案中,核酸是DNA或RNA。

[0133] 在一个实施方案中,所述方法还包括在扩增之前从群体中除去T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>T细胞,从而提供待扩增的T调节性消耗细胞群体,例如CD25<sup>+</sup>消耗细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的方法除去T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>细胞。

[0134] 在一个实施方案中,该方法还包括在扩增之前从群体中除去T调节细胞,例如CD14+细胞,从而提供待扩增的CD14+细胞群体。在一个实施方案中,通过本文所述的方法除去T调节细胞,例如CD14+细胞。

[0135] 在一个实施方案中,所述方法还包括使免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸接触。在一个实施方案中,核酸是DNA或RNA。

[0136] 在实施方案中,该方法包括在允许CAR和端粒酶表达的条件下使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸和编码端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸接触。

[0137] 在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸是RNA。在另一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸是DNA。在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的核酸包含能够驱动端粒酶亚基表达的启动子。

[0138] 在实施方案中,该制备方法包括在允许CAR和端粒酶表达的条件下使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸和编码端粒酶亚基(例如hTERT)的RNA接触。

[0139] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸和编码端粒酶亚基的RNA是相同核酸分子的一部分。在一个实施方案中,编码CAR的核酸和编码端粒酶亚基的RNA是分离的核酸分子的一部分。

[0140] 在一个实施方案中,该方法包括基本上同时使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸和编码端粒酶亚基的RNA接触。在一个实施方案中,该制备方法包括在将免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基的RNA接触之前,使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸接触。在一个实施方案中,该方法包括在将免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基的RNA接触后,使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸接触。

[0141] 在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的RNA是mRNA。在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的RNA包含聚(A)尾。在一个实施方案中,编码端粒酶亚基的RNA包含5'帽结构。

[0142] 在一个实施方案中,该方法包括用编码端粒酶亚基的RNA转染免疫效应细胞。在一个实施方案中,该制备方法包括用编码端粒酶亚基的RNA转导免疫效应细胞。在一个实施方案中,该制备方法包括在允许CAR和端粒酶表达的条件下用编码端粒酶亚基的RNA电穿孔免疫效应细胞。

[0143] 在实施方案中,该方法包括提供表达CAR和/或包含编码CAR的核酸的免疫效应细胞群体(例如,T细胞或NK细胞);并在允许hTERT表达的条件下使免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸接触。

[0144] 在实施方案中,该方法包括提供表达编码端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)群体,并且在允许CAR表达的条件下使免疫效应细胞群体与编码CAR的核酸接触。

[0145] 免疫效应细胞制备物

[0146] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制备本文所述的免疫效应细胞制备物(例如,反应混合物或免疫效应细胞群体)。

[0147] 在实施方案中,免疫效应细胞制备物(例如反应混合物)选自:

[0148] (i) 免疫效应细胞群体包含至少20%的幼稚T细胞,至少2%的干中央记忆T细胞和/或至少4%的中央记忆T细胞,和/或

[0149] (ii) 免疫效应细胞群体包含至少400个细胞/微升的绝对T细胞计数,至少200个细

胞/微升的绝对幼稚T细胞计数,至少20个细胞/微升的绝对干中央记忆T细胞计数,和/或至少40个细胞/微升的绝对中央记忆T细胞计数。

[0150] 在实施方案中,已经基于一种或多种标志物(例如CCR7、CD62L、CD45RO和CD95)的表达来选择免疫效应细胞群体,例如,免疫效应细胞群体(例如,T细胞)是CCR7+和CD62L+。

[0151] 在实施方案中,基于CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95-的表达模式鉴定幼稚T细胞,其中根据CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95+的表达模式鉴定绝对干中央记忆T细胞,和其中基于CCR7+、CD62L+、CD45RO+、CD95+的表达模式鉴定中央记忆T细胞。

[0152] 在实施方案中,本文所述的免疫效应细胞制备物包含编码CAR(例如本文所述的CAR)的核酸。

[0153] 在实施方案中,本文所述的免疫效应细胞制备物包含编码外源端粒酶亚基(例如hTERT)的核酸。在一个实施方案中,编码外源端粒酶亚基的核酸是RNA,例如mRNA。

[0154] 在实施方案中,本文所述的免疫效应细胞制备物包含CAR,例如本文所述的CAR;和外源性端粒酶亚基,例如hTERT。在一个实施方案中,细胞不包含编码外源端粒酶亚基的DNA。例如,细胞可能已经与编码外源端粒酶亚基的mRNA接触。

[0155] 在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物是含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞的T调节性消耗细胞群体。在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物是含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞的T调节性消耗细胞群体。在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物含有小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物含有小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0156] 在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物是含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的表达检查点抑制物的细胞,例如PD1+细胞、LAG3+细胞或TIM3+细胞的T调节性消耗细胞群体。

[0157] 在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物是含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD14+细胞的T调节性消耗细胞群体。

[0158] 在实施方案中,本文所述的免疫效应细胞制备物包含自体免疫效应细胞群体,例如其中多种细胞已用包含编码CAR的核酸分子(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的载体转染或转导,其中免疫效应细胞制备物含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物含有小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,免疫效应细胞制备物含有小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0159] 在一个实施方案中,反应混合物可进一步包含活化和/或扩增群体细胞的试剂,例如刺激CD3/TCR复合体相关信号的试剂和/或刺激例如,如本文所述的细胞表面上共刺激分子的配体。在一个实施方案中,试剂是与抗CD3抗体或其片段和/或抗CD28抗体或其片段缀合的珠。

[0160] 在实施方案中,本文所述的反应混合物包含含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。在一个实施方案中,反应混合物包含含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,细胞群体含有小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。在一个实施方案中,细胞群体含有小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如表达CD25的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0161] 在一个实施方案中,反应混合物包含含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的表达检查点抑制物的细胞,例如PD1+细胞、LAG3+细胞或TIM3+细胞。反应混合物还可以包含缓冲液或其它试剂,例如含PBS的溶液。

[0162] 在一个实施方案中,反应混合物包含含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD14+细胞。反应混合物还可以包含缓冲液或其它试剂,例如含PBS的溶液。

[0163] 在一个实施方案中,反应混合物还包含一种或多种用于增殖和/或存活的因子,包括血清(例如胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 或用于细胞生长的任何其它添加剂。在一个实施方案中,反应混合物还包含IL-15和/或IL-7。

[0164] 在一个实施方案中,反应混合物中群体的多个细胞包含核酸分子,例如本文所述的核酸分子,其包含CAR编码序列,例如CD19 CAR编码序列,例如如本文所述。

[0165] 在一个实施方案中,反应混合物中群体的多个细胞包含载体,其包含编码CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR的核酸序列。在一个实施方案中,载体是本文所述的载体,例如选自DNA,RNA,质粒,慢病毒载体,腺病毒载体或逆转录病毒载体的载体。

[0166] 在一个实施方案中,反应混合物还包含冷冻保护剂或稳定剂,例如糖,寡糖,多糖和多元醇(例如海藻糖,甘露醇,山梨糖醇,乳糖,蔗糖,葡萄糖和葡聚糖),盐和冠醚。在一个实施方案中,冷冻保护剂是葡聚糖。

[0167] 在实施方案中,反应混合物包含免疫效应细胞群体,其中反应混合物中群体的多个细胞包含核酸分子,例如本文所述的核酸分子,其包含CAR编码序列,例如CD19 CAR编码序列,例如本文所述,以及IL-7和/或IL-15。

[0168] 在一个实施方案中,反应混合物中群体的多个细胞包含载体,其包含编码CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR的核酸序列。在一个实施方案中,载体是本文所述的载体,例如选自DNA,RNA,质粒,慢病毒载体,腺病毒载体或逆转录病毒载体的载体。

[0169] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但是合适的方法和材料在下面描述。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入本文。另外,材料、方法和实施例仅仅是说明性的而不是限制性的。

### 附图说明

[0170] 图1A-1D显示了 $\gamma_c$ 细胞因子和IL-18对CAR-T细胞积累的差异作用。图1A是C4-27z CAR载体的示意图。图1B是显示CAR-T细胞响应于各种细胞因子暴露的总体累积的图。将T细胞转导并从接下来的天(第0天)暴露于终浓度为10ng/mL的各种外源性细胞因子。基于T细胞数和CAR表达百分数计算CAR-T细胞数目。曲线是6个供体的代表。 $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ 。NC,无细胞因子。图1C是显示响应于各种细胞因子的T细胞增殖的直方图。慢病毒转导后第7天,NC组T细胞用CFSE (2.5 $\mu$ M)标记,然后暴露于多种细胞因子。七天后,通过流式细胞术分析T细胞的CFSE稀释。图1D是显示慢病毒转导后15天T细胞成活力的图。来自各种细胞因子组的T细胞用Annexin V和7-AAD染色,然后分析活细胞的比例(Annexin V和7-AAD阴性)。相对于IL-2组, $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  (n=6)。

[0171] 图2A-2F显示了CAR-T细胞的记忆T细胞亚组。图2A显示转导前T细胞的CD45RA+CD62L+亚群的CD95表达和在转导后15天CAR-T细胞的CD45RA+CD62L+亚群中的CD95表达。图2B和2C是显示慢病毒转导后CD4+ T细胞(图2B)和CD8+ T细胞(图2C)中记忆干T细胞(Tscm)比例增加的图。Tscm定义为CD45RA+CD62L+CD95+CCR7+T细胞亚组。图2D是显示转导前T细胞中幼稚T(Tn,定义为CD45RA+CD62L+CD95-亚群)的量与转导后CAR-T细胞中Tscm的比例之间的相关性的图(n=6)。左侧条形表示转导前CD4+和CD8+T细胞中Tn的百分比,右侧条形表示CD4+和CD8+CAR-T细胞中Tscm的百分比。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。图2E是显示不同亚组的CAR-T细胞的自我更新和分化的图表。暴露于IL-2 (10ng/mL)培养FACS分选的CAR+Tscm, Tcm, Tem和Temra细胞3天,然后基于CD45RA和CD62L表达(n=3)分析表型。图2F是直方图,显示响应IL-2的CAR-T细胞各种亚组的增殖。用CFSE (2.5 $\mu$ M)标记FACS分选的CAR+Tscm, Tcm, Tem和Temra细胞,然后暴露于IL-2 (10ng/mL)培养3天。三天后,分析T细胞的CFSE稀释。

[0172] 图3A-3B显示了CD45 RA表达与CFSE强度之间的相关性。图3A阐明CD45RA表达与CFSE强度成反相关。图3B显示,对于所有细胞因子组(IL-2, IL-7, IL-15, IL-18和IL-21), CD45RA+T细胞显示出比CD45RA暗和阴性T细胞低得多的CFSE水平,表明CD45RA+T细胞具有比CD45RA-T细胞更强的增殖活性。

[0173] 图4显示了暴露于不同细胞因子导致的CAR-T细胞的表型。图4是一系列图,显示了在指定的细胞因子组中CAR-T细胞表面上CD45RA、CD62L、CCR7、CD27、CD28和IL7R $\alpha$ 表达通过FACS的定量。直方图表示来自6个独立供体的表达水平的平均值 $\pm$ SEM。相对于IL-2组, $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

[0174] 图5A-5D显示了暴露于不同细胞因子的CAR-T细胞的功能分析。图5A、5B和5C是定量图,显示用于产生IFN $\gamma$ (图5A), TNF- $\alpha$ (图5B)和IL-2(图5C)的各种细胞因子组(n=6)中产生细胞因子的CAR-T细胞百分比。将慢病毒转导的T细胞暴露于指定的细胞因子14天,然后与SKOV3细胞共培养5小时,然后收获用于流式细胞术分析。图5D是显示CAR-T细胞的抗原特

异性细胞毒活性的图。在指示的细胞因子暴露后14天,以指定的E/T比与SKOV3共同培养18小时后,通过使用基于荧光素酶的测定法,来评估CAR-T细胞的细胞溶解能力。未转导的T细胞(UNT)用作阴性效应细胞对照。显示的数据是六次独立细胞溶解测定的平均值 $\pm$ SEM。

[0175] 图6A-6C显示了上述图5中所述的CAR-T细胞的表型和功能。图6A和6B显示当与CD62L-CAR-T细胞(Tem和Temra)相比时,CD62L+CAR-T细胞(Tscm和Tcm)表现出较少的细胞因子产生活性(图6A和6B)和较弱的细胞溶解能力(图6C)。

[0176] 图7A和7B显示了暴露于抗原攻击的CAR-T细胞的扩增和表型。图7A描绘了两个图,其显示了在抗原攻击后先前暴露于指定细胞因子的CAR-T的总累积和存活力。暴露于指定细胞因子的T细胞在第15天收获,然后与SKOV3以5:1的E/T比率共培养7天。计算CAR-T细胞的扩增,并在第七天评估T细胞的存活力。图7B是两个图,其显示各种细胞因子组中CD4+和CD8+CAR-T细胞的记忆T亚组的分布。N.S.,无统计学差异。

[0177] 图8A-8C显示了具有先前细胞因子暴露的各种CAR-T细胞的抗肿瘤活性。图8A显示了用各种细胞因子暴露的C4-27z CAR-T细胞,抗CD19-27z CAR-T细胞和未转导的T细胞处理的小鼠的肿瘤生长曲线。数据以平均值 $\pm$ SEM表示。箭头表示T细胞输注的时间。图8B是显示在第一次剂量的CAR-T细胞输注后15天小鼠外周血中循环的人CD4+和CD8+T细胞计数的定量图。图8C是显示小鼠血液中循环的人CD4+和CD8+T细胞上CAR表达的定量图。

[0178] 图9是来自单采血液成分术的细胞、用抗CD3/CD28选择的细胞、CD25消耗的细胞和富含CD25的细胞的一系列FACS图(顶部),显示了CD3和CD19群体;和直方图(底部),显示了CD14表达。

[0179] 图10A、10B和10C显示了CD3/CD28选择的细胞和CD25消耗的细胞之间的增殖能力的比较。图10A是显示培养中在指定日的总细胞数的图。图10B是显示培养中每个指定日的定量群体倍增的图。图10C显示培养中指定日的活细胞百分比。

[0180] 图11是一系列FACs图,显示了用指定的细胞因子补充剂IL-7、IL-15或IL-7和IL-15培养后未经操作的PBMC和CD25消耗的PBMC中CD3和CD19的分布。

[0181] 图12是一组图,示出已经用抗CD3和CD28珠刺激,并且保留为未经操作的(UTD)或用CD19CAR转导的(CD19.BBz),脱珠,然后在第5天和第9天收获的PBMC的群体倍增(左图)和平均大小(fL)(右图)的扩增谱。

[0182] 图13是一组图,包括将细胞毒性描绘为用PMBCs处理的表达CD19的K562细胞的百分比溶解,所述PMBCs已经用抗CD3和CD28珠刺激,并且保留为未经操作的(UTD)或用CD19CAR转导的(CD19.BBz),脱珠,然后在第5天和第9天收获。

[0183] 图14是一组图,描绘用抗CD3和CD28珠(3 $\times$ 28珠)刺激的PBMC,野生型K562细胞,表达CD19的K562细胞,ALL细胞(Na1m6)或CLL细胞(PI14)的增殖。将PBMC保持未经操作(UTD)或用CD19CAR(CART19)转导,脱珠,然后在第5天和第9天收获。

[0184] 图15是示例性制造方案的示意图。

[0185] 图16是示例性制造方案的示意图。

[0186] 图17是一组图,描绘两个不同制造批次的用CTL019 CAR转染的供体细胞,即CHP959-115和CHP959-121在0至9天期间扩增的细胞增殖水平的图。

[0187] 图18是一组图,显示在单采血液成分术后0至9天,两种不同制造批次的用CTL019 CAR转染并扩增的供体细胞(即CHP959-115)或用ss1-mesoCAR转染并扩增的供体细胞(即

CHP959-121)的促炎细胞因子:IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 和IL-4的产生的图。

[0188] 图19是一组图,描绘用抗CAR19独特型抗体珠或对照珠刺激,用CTL019 CAR转染并扩增5至9天的供体细胞中IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-2、IL-1 $\beta$ 、GM-CSF和IL-4的产生水平。用对照珠没有检测到细胞因子或检测到低细胞因子水平( $<200\text{pg/ml}$ )。

[0189] 图20是描述了使用Na1m6(ALL)细胞的荧光素酶测定法,基于保持未操作(UTD)或用CD19 CAR(CART19)转导,脱珠,然后在第5天和第9天收获的PBMC的总裂解物的细胞杀伤图。培养多种比例的PMBCs与Na1m6细胞(效应物(E):靶标(T))。如图所示,在第5天收获的CART19细胞具有更好的杀伤能力。

[0190] 图21是描绘未经操作(UTD)或用CD19 CAR(CART19)转导,脱珠,然后在第5天和第9天收获的PBMC的长期体内杀伤能力的图。将PBMC引入接种Na1m6细胞的非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷小鼠。

[0191] 图22A是显示通过ALL和NHL患者的测试扩增的外周血样品的百分比的柱状图。图22B是显示通过SR-ALL和HR/VHRALL患者的测试扩增的外周血样品百分比的柱状图。图22C是显示来自所有扩增大于(通过)或小于(未通过)5倍体外扩增阈值的患者的来自不同收集时间的外周血的绝对淋巴细胞计数的柱状图。图22D是显示来自所有通过或未通过通过5倍体外扩增阈值的患者的来自各种收集时间的外周血的绝对T细胞计数的柱状图。图22E是来自所有白血病或淋巴瘤的患者的来自各种收集时间的外周血的绝对淋巴细胞计数(以每微升的细胞数)的柱状图。图22F是显示来自白血病或淋巴瘤患者的来自各种收集时间的外周血的绝对T细胞计数(以每微升的细胞数)的柱状图。显著差异在每列上用“\*”表示,并代表 $P < 0.05$ 。统计分析可以见表12。

[0192] 图23A-23O是显示从经历化疗的患者的外周血中收获的T细胞的记忆表型的柱状图。绝对细胞计数从来自通过及未通过超过5倍扩增阈值的样品(图23A至图23E,列1),ALL或NHL患者[图23F至图23J,列2]和SR-和HR/VHR-ALL患者[图23K至图23O,列3]来阐述。显著差异用每列上的“\*”表示,并代表 $P < 0.05$ 。统计分析可以见表13,并且总结表可以见表9。

[0193] 图24是显示来自SR-或HR/VHR-ALL的所有患者的不同收集时间的外周血的绝对T细胞计数(以每微升的细胞数)的柱状图。显著差异在每列上用“\*”表示,并代表 $P < 0.05$ 。统计分析可以见表12。

[0194] 图25A和25B是显示IL-7和IL-15对T细胞表型和扩增的影响的柱状图。将收集的样品分成两个刺激培养物,如实施例4所述,其具有或者不具有IL-7和IL-15。图25A是显示用细胞因子培养后白血病和淋巴瘤患者的绝对记忆表型细胞计数百分比变化的柱状图。显著差异在每列上用“\*”表示,并代表 $P < 0.05$ 。图25B是显示在用或不用细胞因子培养后通过评估的测试扩增的样品百分比的柱状图。“所有样品”代表无细胞因子而扩增的每种样品,其中一些在分裂培养方案之前收集。统计分析可以见表14。

[0195] 图26是一组饼图,显示了样品通过和未通过测试扩增的扩增后表型。在测试扩增结束时评估表型。

## 发明详述

[0197] 本发明至少部分基于这样的发现,即用于细胞治疗(例如CAR治疗,如本文所述)的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)的适应性及包括化疗相对于从受试者获取细胞的时

机,向从其获取细胞的受试者施用的化学疗法的类型,受试者(从其获得细胞)的潜在恶性肿瘤,恶性肿瘤的严重程度(例如,标准风险、高风险或非常高风险的ALL),低分化T细胞(例如幼稚T细胞、干中央记忆T细胞或中央记忆T细胞)的百分比,末端效应T细胞的百分比,和从受试者获取的T细胞的数量(例如绝对T细胞计数)相关。

[0198] 如实施例中详细描述,使用早期在患者化疗期间从其获取的细胞(例如,在施用消耗具有高增殖能力的T细胞的化疗周期之后),观察到改善的T细胞扩增(例如,其可以指示用于细胞治疗的适合性)。不希望受理论束缚,相信早期在患者化疗期间从其获取细胞产生的细胞群体较少恶化,例如在其扩增能力方面。例如,使用在化疗的延迟增强周期或巩固周期之前从患者获取的细胞观察到改善的T细胞扩增。在实施方案中,疾病的严重程度影响细胞的恶化,例如细胞扩增能力。在实施方案中,从具有较不严重疾病(例如,标准风险ALL)的患者获取的细胞比从具有更严重疾病(例如高风险或非常高风险ALL)的患者获取的细胞扩增得更好。在实施方案中,与患有较不严重疾病的患者(例如,标准风险ALL)相比,患有更严重疾病(例如,高风险或非常高风险ALL)的患者可能需要在化疗早期(例如,在周期2或巩固周期之前)的细胞获取。在实施方案中,与患有更严重疾病的患者相比,能够在化疗晚期(例如,在周期4或延迟增强周期之前)中从患有较不严重疾病(例如,标准风险ALL)的患者获取能够扩增的细胞。在其他实施方案中,从白血病患者(例如ALL,例如小儿ALL)获取的细胞具有比从淋巴瘤患者(例如,NHL,例如小儿NHL)获取的细胞更好的扩增能力。此外,包含更高绝对T细胞计数的获取的细胞群体也倾向于比具有更低绝对T细胞计数的细胞群体更好地扩增。获取的包含较大百分比的较低分化的免疫效应细胞(例如较低分化的T细胞)的细胞群体(其倾向于具有较高的增殖和存活能力)也表现出较好的扩增能力。

[0199] 不希望受理论束缚,相信在一些化疗周期中使用的药物,例如环磷酰胺和阿糖胞苷显著消耗高度增殖的T细胞(例如,较低分化程度的T细胞),并且这种效应在具有更严重的疾病的患者中更明显。更长的暴露持续期或更高剂量的化疗药物可导致这些T细胞群体更多的消耗。而且,相信更大的较低分化的T细胞群体导致更大的T细胞扩增能力、持久性和作为抗癌T细胞治疗的功效。

[0200] 因此,在实施方案中,所述方法通过在诊断癌症后早期(例如在化学疗法之前或在某些/多个化疗周期之前)从受试者获取细胞而有利地改善T细胞适应性(用于细胞疗法的适合性)和功效。在实施方案中,所述方法利用在包含T细胞消耗药物的化疗周期之前从患者获取的,在2、3、4或5个化疗周期之前获取的,或在延迟的增强或巩固周期之前获取的细胞。在其他实施方案中,所述方法通过包括患者选择(例如基于恶性肿瘤的类型(例如,白血病与淋巴瘤)或疾病的严重性(例如标准的、高的或者非常高的风险)来优化免疫细胞的扩增能力和/或抗肿瘤功效。在又一些实施方案中,所述方法通过包括细胞选择,例如选择具有较高绝对T细胞计数的细胞群体,或较高百分比的较低分化的T细胞来优化免疫细胞的扩增能力和/或抗肿瘤功效。在此更详细地描述另外的实施方案。

[0201] 定义

[0202] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0203] 术语“一个”是指物品的语法对象中的一个或多于一个(即至少一个)。作为示例,“一个元素”是指一个元素或多于一个元素。

[0204] 当涉及可测量的值(例如量,持续时间等)时,术语“约”意在包括指定值的 $\pm 20\%$ 或在某些情况下 $\pm 10\%$ ,或在某些情况下 $\pm 5\%$ ,或在某些情况下为 $\pm 1\%$ ,或在某些情况下为 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适用于公开的方法。

[0205] 如本文所用的术语“获取”,是指通过“直接获取”或“间接获取”物理实体(例如样品、细胞或细胞群体、多肽、核酸或序列)或值(例如数值),而获得对物理实体或值的占有。在一个实施方案中,获取是指获得或收获细胞或细胞群体(例如如本文所述的免疫效应细胞或群体)。“直接获取”是指执行某个过程(例如,执行合成或分析或纯化方法)以获得物理实体或值。“间接取得”是指从另一方或另一来源(例如,直接获取物理实体或值的第三方实验室)接收物理实体或值。直接获取物理实体包括实施这样的过程,该过程包括某种物理物质(例如起始材料)的物理变化。示例性的变化包括从两种或更多种起始材料制造物理实体,剪切或断裂某种物质,分离或纯化某种物质,将两个或更多个分离的实体组合成混合物,进行包括破坏或形成共价或非共价键的化学反应。直接获取某个值包括执行这样的过程,该过程包括样品或其它物质的物理变化;例如执行包括在某种物质(例如样品、分析物、或试剂)中的物理变化的分析过程(有时在本文中称为“物理分析”),执行分析方法,例如包括以下中的一个或多个的方法:将物质(例如分析物、或其片段或其他衍生物)从另一物质中分离或纯化;将分析物或其片段或其它衍生物与另一种物质(例如缓冲液、溶剂或试剂)组合;或改变分析物或其片段或其它衍生物的结构,例如通过在分析物的第一个和第二个原子之间破坏或形成共价或非共价键;或者通过改变试剂的结构或其片段或其它衍生物,例如通过在试剂的第一个和第二个原子之间破坏或形成共价或非共价键。

[0206] 术语“生物等效”是指为了产生与参考化合物(例如RAD001)的参考剂量或参考量所产生的效果相当的效果,所需要的除参考化合物(例如,RAD001)之外的其它试剂的量。在一个实施方案中,效果是mTOR抑制水平,例如,如通过P70 S6激酶抑制测量的,例如,如在体内或在体外测定法中评估的,例如,如通过本文所述的测定法测量的,例如,布雷测定法,或通过免疫印迹测量磷酸化的S6水平。在一个实施方案中,效果是PD1阳性/PD1阴性T细胞比率的改变,如通过细胞分选测定的。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参考化合物的参考剂量或参考量所实现的P70 S6激酶抑制水平相同的量或剂量。在一个实施方案中,mTOR抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参考化合物的参考剂量或参考量所实现的PD1阳性/PD1阴性T细胞比率的改变相同水平的量或剂量。

[0207] 术语“嵌合抗原受体”或备选地“CAR”是指一组多肽,在最简单的实施方案中通常为两个多肽,当在免疫效应细胞中时,其提供细胞对靶细胞(通常为癌细胞)的特异性,并产生细胞内信号。在一些实施方案中,CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和胞质信号结构域(本文中也称为“胞内信号结构域”),其包含衍生自如下所定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能性信号结构域。在一些方面,该组多肽彼此连续,例如是在相同的多肽链中(例如,包含嵌合融合蛋白)。在一些实施方案中,该组多肽彼此不连续,例如在不同的多肽链中。在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,其在二聚化分子的存在下可将多肽彼此偶联,例如可将抗原结合结构域偶联至胞内信号结构域。在一个方面,刺激分子是与T细胞受体复合体结合的 $\zeta$ 链。在一个方面,胞质信号结构域包含衍生自如下定义的至少一种共刺激分子的一个或多个功能性信号结构域。在一个方面,共刺激分子选自本文所述的共刺激分子,例如4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28。在一个方面,CAR包含嵌合融合

蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和包含衍生自刺激分子的功能性信号结构域的胞内信号结构域。在一个方面,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和包含衍生自共刺激分子的功能性信号结构域和衍生自刺激分子的功能性信号结构域的胞内信号结构域。在一个方面,CAR包含嵌合融合蛋白,该嵌合融合蛋白包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和胞内信号结构域,该胞内信号结构域包含衍生自一个或多个共刺激分子的两个功能性信号结构域和衍生自刺激性的功能性信号结构域分子。在一个方面,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和胞内信号结构域,所述胞内信号结构域包含衍生自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号结构域和衍生自刺激分子的功能性信号结构域。在一个方面,CAR包含嵌合融合蛋白,其包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和胞内信号结构域,胞内信号结构域包含衍生自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号结构域和衍生自刺激分子的功能性信号结构域。在一个方面,CAR包含CAR融合蛋白的氨基末端(N末端)的任选的前导序列。在一个方面,CAR进一步包含在细胞外抗原结合结构域的N末端的前导序列,其中前导序列任选地在细胞加工过程中从抗原结合结构域(例如scFv)切割,并将CAR定位于细胞膜。

[0208] 包含靶向特定肿瘤抗原X(例如本文所述的那些)的抗原结合结构域(例如,scFv或TCR)的CAR也被称为XCAR。例如,将包含靶向CD19的抗原结合结构域的CAR称为CD19 CAR。

[0209] 术语“信号结构域”是指蛋白质的功能部分,其通过在细胞内传递信息来调节细胞活性而发挥作用,通过产生第二个信使或通过响应这样的信使作为效应子来发挥作用经由确定的信号途径而调节所述细胞活性。

[0210] 本文所用的术语“抗体”是指衍生自与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆,多链或单链或完整的免疫球蛋白,并且可以衍生自天然来源或重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0211] 术语“抗体片段”是指抗体的至少一部分,其保留与抗原表位特异性相互作用(例如通过结合、空间位阻、稳定/去稳定、空间分布)的能力。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv片段、scFv抗体片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、线性抗体、单结构域抗体例如sdAb(VL或VH)、骆驼VHH结构域、由抗体片段形成的多特异性抗体,例如包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,以及抗体的分离的CDR或其他表位结合片段。也可以将抗原结合片段掺入单结构域抗体、最大抗体、微型抗体、纳米抗体、胞内抗体、双体抗体(diabodies)、三体抗体(triabodies)、四体抗体(tetrabodies)、v-NAR和双scFv中(参见例如Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1136,2005)。抗原结合片段也可以移植到基于多肽例如III型纤连蛋白(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽微抗体)。

[0212] 术语“scFv”是指包含至少一个包含轻链可变区的抗体片段和至少一个包含重链可变区的抗体片段的融合蛋白,其中轻链和重链可变区例如通过合成接头,例如短的柔性多肽接头连续连接,并且能够表达为单链多肽,并且其中所述scFv保留其所源自的完整抗体的特异性。除非另有说明,如本文所使用的,scFv可以具有任何顺序的VL和VH可变区,例如相对于多肽的N末端和C末端,scFv可以包含VL-接头-VH或可以包含VH-接头-VL。

[0213] 包含抗体或其抗体片段的CAR的部分可以多种形式存在,其中抗原结合结构域被表达为连续多肽链的一部分,包括例如单结构域抗体片段(sdAb),单链抗体(scFv)和人源

化抗体 (Harlow等人,1999,在:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,在:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。在一个实施方案中,CAR的抗原结合结构域包含抗体片段。在另一个实施方案中,CAR包含含有scFv的抗体片段。可以使用许多众所周知的方案中的任一种来确定给定CDR的精确的氨基酸序列边界,包括由Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)描述的那些方案或它们的组合。

[0214] 如本文所用,术语“结合结构域”或“抗体分子”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。术语“结合结构域”或“抗体分子”包括抗体和抗体片段。在一个实施方案中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如,其包含多个免疫球蛋白可变结构域序列,其中所述多个序列的第一免疫球蛋白可变结构域序列具有针对第一表位的结合特异性并且所述多个序列的第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。

[0215] 本文所用的术语“互补决定区”或“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可变区内的氨基酸序列。例如,一般来说,在每个重链可变区(例如HCDR1、HCDR2和HCDR3)中有三个CDR,并且在每个轻链可变区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)中有三个CDR。给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用多种公知方案中的任何一种来确定,包括Kabat等人,(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD描述的那些方案(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)或其组合。根据Kabat编号方案,在一些实施方案中,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1),50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)和轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。根据Chothia编号方案,在一些实施方案中,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);VL中的CDR氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)。在组合的Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施方案中,CDR对应于作为Kabat CDR,Chothia CDR或两者的一部分的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,CDR对应于VH(例如哺乳动物VH,例如人VH)中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);和VL(例如哺乳动物VL,例如人VL)中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。

[0216] 包含抗体或其抗体片段的本发明的CAR的部分可以多种形式存在,其中抗原结合结构域被表达为连续多肽链的一部分,包括例如单结构域抗体片段(sdAb),单链抗体(scFv),人源化抗体或双特异性抗体(Harlow等人,1999,在:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,在:

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird等人, 1988, Science 242:423-426)。在一个方面, 本发明的CAR组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。另在一个方面, CAR包含含有scFv的抗体片段。

[0217] 术语“抗体重链”是指抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中较大的一个, 并且其通常决定抗体所属的类别。

[0218] 术语“抗体轻链”是指抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中较小的一个。 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0219] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体, 例如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语还应解释为通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体并且所述DNA分子表达抗体蛋白或限定所述抗体的氨基酸序列, 其中使用本领域可获得和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术获得所述DNA或氨基酸序列。

[0220] 术语“抗原”或“Ag”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫感受态细胞的活化, 或两者兼有。技术人员将理解, 任何大分子, 包括基本上所有的蛋白质或肽, 都可以用作抗原。此外, 抗原可以衍生自重组或基因组DNA。本领域技术人员将理解, 包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所用的术语“抗原”。此外, 本领域技术人员将理解, 抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。很明显, 本发明包括但不限于使用多于一种基因的部分核苷酸序列, 并且这些核苷酸序列以各种组合排列以编码引起所需免疫应答的多肽。此外, 本领域技术人员将理解, 抗原根本不需要由“基因”编码。很明显, 可以合成产生或可以从生物样品衍生出抗原, 或抗原可以是除了多肽以外的大分子。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品, 肿瘤样品, 细胞或具有其他生物组分的流体。

[0221] 术语“自体的”是指来自同一个体的任何材料, 所述材料后来被重新引入该个体。

[0222] 术语“同种异体的”是指衍生自与引入材料的个体相同物种的不同动物的任何材料。当一个或多个基因座的基因不相同, 两个或多个个体被认为是彼此同种异体的。在一些方面, 来自相同物种的个体的同种异体材料可能在遗传上充分不同而在抗原性上相互作用。

[0223] 术语“异种的”是指源自不同物种的动物的任何材料。

[0224] 术语“癌症”指以异常细胞的不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部分。各种癌症的实例在本文描述并且包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、等等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中可互换使用, 例如, 两个术语涵盖实体和液体肿瘤, 例如弥漫性或周期肿瘤。如本文所用, 术语“癌症”或“肿瘤”包括癌前病变以及恶性癌症和肿瘤。

[0225] 本文使用的术语“衍生自”表示第一和第二分子之间的关系。它通常是指第一分子和第二分子之间的结构相似性, 并且不意味着或包括衍生自第二分子的第一分子上的方法或源限制。例如, 在衍生自CD3 $\zeta$ 分子的胞内信号结构域的情况下, 胞内信号结构域保留足够的CD3 $\zeta$ 结构, 使其具有所需的功能, 即在适当条件下产生信号的能力。它不意味着或包括局

限于产生胞内信号结构域的特定方法,例如,这并不意味着提供胞内信号结构域,必须从CD3 $\zeta$ 序列开始并缺失不需要的序列,或者施加突变以到达胞内信号结构域。

[0226] 短语“与如本文所述的肿瘤抗原表达相关的疾病”包括但不限于与本文所述的肿瘤抗原的表达相关的疾病或与表达本文所述的肿瘤抗原的细胞相关的病症,包括,例如增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良,脊髓发育不良综合征或白血病前期;或与表达本文所述的肿瘤抗原的细胞相关的非癌症相关适应证。在一个实施方案中,与本文所述的肿瘤抗原表达相关的癌症是血液学癌症。在一个实施方案中,与本文所述的肿瘤抗原表达相关的癌症是实体癌。与本文所述的肿瘤抗原表达相关的其它疾病包括但不限于例如与本文所述的肿瘤抗原表达相关的非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病症或增生性疾病。与本文所述的肿瘤抗原表达相关的非癌症相关适应证包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮),炎症性疾病(变态反应和哮喘)和移植。在一些实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞表达或者在任何时间表达编码肿瘤抗原的mRNA。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞产生肿瘤抗原蛋白(例如野生型或突变体),并且肿瘤抗原蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞一度产生可检测水平的肿瘤抗原蛋白质,随后基本上不产生可检测的肿瘤抗原蛋白质。

[0227] 如本文所用,术语“CD19”是指分化簇19蛋白质,其是在白血病前体细胞上可检测的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot的公共数据库中找到。例如,人CD19的氨基酸序列可以以UniProt/Swiss-Prot登录号P15391找到,编码人CD19的核苷酸序列可以以登录号NM\_001178098找到。如本文所用,“CD19”包括包含突变(例如全长野生型CD19的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体)的蛋白质。CD19在大多数B谱系癌症上表达,包括例如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤。具有表达CD19的其他细胞在下文“与CD19表达相关的疾病”的定义中提供。它也是B细胞祖细胞的早期标志物。参见例如Nicholson等人,*Mol. Immun.* 34 (16-17):1157-1165 (1997)。在一个方面,CART的抗原结合部分识别并结合CD19蛋白胞外结构域内的抗原。在一个方面,CD19蛋白在癌细胞上表达。

[0228] 短语“与CD19表达相关的疾病”包括但不限于与CD19(例如野生型或突变CD19)表达相关的疾病或与表达或在任何时间表达的CD19(例如野生型或突变CD19)的细胞相关的病症,包括例如增生性疾病如癌症或恶性肿瘤或癌前病症如脊髓发育不良,脊髓发育不良综合征或白血病前期;或与表达CD19的细胞相关的非癌症相关适应证。为了避免疑义,与CD19表达相关的疾病可以包括与目前不表达CD19的细胞有关的疾病,例如,因为CD19表达已经下调,例如由于用靶向CD19但曾经表达CD19的分子例如CD19 CAR治疗。在一个方面,与CD19表达相关的癌症是血液学癌症。在一个方面,血液学癌症是白血病或淋巴瘤。在一个方面,与CD19的表达相关的癌症包括癌症和恶性肿瘤,包括但不限于例如一种或多种急性白血病,包括但不限于例如B细胞急性淋巴细胞性白血病(BALL),T细胞急性淋巴细胞性白血病(TALL),急性淋巴性白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性骨髓性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。与CD19表达相关的另外的癌症或血液病症包括但不限于,例如,B细胞幼淋巴细胞白血病,母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤,伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤,恶性淋巴增殖性病症,MALT淋巴瘤,套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨

髓发育不良和骨髓增生异常综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,母细胞性浆细胞样细胞淋巴瘤,浆细胞样树突状细胞瘤,瓦尔登氏巨球蛋白血症,和“白血病前期”,它们是通过髓样血细胞的无效生产(或发育不良)联合在一起的血液病症的多样集合,等。与CD19的表达相关的其它疾病包括但不限于例如与CD19表达相关的非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病症或增生性疾病。与CD19表达相关的非癌症相关适应证包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮),炎症性疾病(变态反应和哮喘)和移植。在一些实施方案中,表达CD19的细胞表达或在任何时间表达了CD19 mRNA。在一个实施方案中,表达CD19的细胞产生CD19蛋白(例如野生型或突变体),并且CD19蛋白可以以正常水平或降低的水平存在。在一个实施方案中,表达CD19的细胞在一个点产生可检测水平的CD19蛋白,且随后基本上不产生可检测的CD19蛋白质。

[0229] 术语“保守序列修饰”指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。这种保守修饰包括氨基酸取代,添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术,例如定点诱变和PCR介导的诱变,将修饰引入本发明的抗体或抗体片段中。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸,精氨酸,组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸,谷氨酸),不带电的极性侧链(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸,色氨酸),非极性侧链(例如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸), $\beta$ -分支侧链(例如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)的氨基酸。因此,本文所述的CAR内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其它氨基酸残基替代,并且可以使用本文所述的功能测定法来测试改变的CAR。

[0230] 术语“刺激”是指通过将刺激分子(例如TCR/CD3复合体或CAR)与其同源配体(或CAR的情况下的肿瘤抗原)结合诱导的初步应答,从而介导信号转导事件,例如但不限于通过TCR/CD3复合体的信号转导或通过适当的NK受体或CAR的信号结构域的信号转导。刺激可以介导某些分子的改变的表达。

[0231] 术语“刺激分子”是指由免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、B细胞)表达的分子,其提供胞质信号序列,所述胞质信号序列对于免疫细胞信号途径的一些方面以刺激方式调节免疫细胞的活化。在一个方面,信号是通过例如TCR/CD3复合体与装载有肽的MHC分子的结合引发的主信号,并且导致T细胞应答的介导,包括但不限于,增殖,激活,分化等。以刺激方式起作用的主要胞质信号序列(也称为“主信号结构域”)可以包含信号传导基序,该基序被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。在本发明中特别使用的包含胞质信号序列的ITAM的实例包括但不限于衍生自CD3 $\zeta$ ,共同FcR $\gamma$ (FCER1G),Fc $\gamma$ RIIa,FcR $\beta$ (Fc $\epsilon$ R1b),CD3 $\gamma$ ,CD3 $\delta$ ,CD3 $\epsilon$ ,CD79a,CD79b,DAP10和DAP12的那些。在本发明的特定CAR中,本发明的任何一种或多种CARS中的胞内信号结构域包含细胞内信号序列,例如CD3 $\zeta$ 的主信号序列。在本发明的特定CAR中,CD3 $\zeta$ 的主信号序列是作为SEQ ID NO:9提供的序列,或来自非人物种例如小鼠,啮齿动物,猴,猿等的等同残基。在本发明的特定CAR中,CD3 $\zeta$ 的主信号序列是SEQ ID NO:10中提供的序列,或来自非人物种,例如小鼠,啮齿动物,猴子,猿等的等同残基。

[0232] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指其表面上呈递与主要组织相容性复合体(MHC)的复合的外来抗原的免疫系统细胞,比如辅助细胞(例如,B-细胞、树突细胞等)。T细胞可

以使用其T细胞受体 (TCR) 识别这些复合体。APC加工抗原且将其呈递给T细胞。

[0233] 如本文所用的术语“胞内信号结构域”,是指分子的细胞内部分。胞内信号结构域产生促进含CAR细胞 (例如CART细胞) 的免疫效应子功能的信号。免疫效应子功能的实例 (例如在CART细胞中) 包括细胞溶解活性和辅助活性,包括细胞因子的分泌。在实施方案中,胞内信号结构域是蛋白质的部分,其转导效应子功能信号并指导细胞进行特化功能。虽然通常可以使用整个胞内信号结构域,但在许多情况下,不必使用整个链。就使用胞内信号结构域的截短部分而言,此类截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。术语胞内信号结构域因此意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号结构域的任何截短部分。

[0234] 在一个实施方案中,胞内信号结构域可以包括主胞内信号结构域。示例性的主胞内信号结构域包括来源于负责主要刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些。在一个实施方案中,胞内信号结构域可以包括共刺激胞内结构域。示例性的共刺激胞内信号结构域包括来源于负责共刺激信号或抗原独立的刺激的分子的那些。例如,在CART的情况下,主胞内信号结构域可以包含T细胞受体的胞质序列,并且共刺激胞内信号结构域可以包含来自共同受体或共刺激性分子的胞质序列。

[0235] 主胞内信号结构域可以包括被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。含有ITAM的主要胞质信号序列的实例包括但不限于来源于下述的那些:CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、和CD66d、CD278 (“ICOS”)、Fc $\epsilon$ RI、CD66d、CD32、DAP10和DAP12。

[0236] 术语“ $\zeta$ ”或备选地“ $\zeta$ 链”、“CD3 $\zeta$ ”或“TCR $\zeta$ ”定义为如GenBan Acc.No.BAG36664.1提供的蛋白质或来自非人类种类 (例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等) 的等同残基,且“ $\zeta$ 刺激结构域”或备选地“CD3 $\zeta$ 刺激结构域”或“TCR $\zeta$ 刺激结构域”定义为来自 $\zeta$ 链的胞质结构域的氨基酸残基,其足以在功能上传递T细胞活化所需的起始信号。在一个方面, $\zeta$ 的胞质结构域包括GenBank登录号BAG36664.1的残基52至164或作为其功能性同源物的来自非人类种类 (例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等) 的等同残基。在一个方面,“ $\zeta$ 刺激结构域”或“CD3 $\zeta$ 刺激结构域”是作为SEQ ID NO:9提供的序列。在一个方面,“ $\zeta$ 刺激结构域”或“CD3 $\zeta$ 刺激结构域”是如SEQ ID NO:10提供的序列。

[0237] 术语“共刺激分子”是指T细胞上的与共刺激配体特异性结合从而介导T细胞的共刺激反应 (例如但不限于增殖) 的相应结合配偶体。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的有助于有效免疫应答的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、

BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。共刺激胞内信号结构域是指共刺激分子的细胞内部分。胞内信号结构域可以包括分子的全部细胞内部分或全部天然胞内信号结构域、或其功能片段。

[0238] 术语“4-1BB”是指具有如GenBank登录号AAA62478.2提供的氨基酸序列的TNFR超家族的成员,或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基;并且“4-1BB共刺激结构域”被定义为GenBank登录号AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。在一个方面,“4-1BB共刺激结构域”为如SEQ ID NO:7提供的序列或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同残基。

[0239] 正如本文中使用的的那样,术语“免疫效应细胞”,是指参与免疫应答,例如,促进免疫效应子应答的细胞。免疫效应细胞的实例包括T细胞,例如, $\alpha/\beta$  T细胞和 $\gamma/\delta$  T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。

[0240] 正如本文中使用的的那样,术语“免疫效应子功能或免疫效应子应答”是指免疫效应细胞,例如增强或促进靶细胞的免疫攻击的功能或反应。例如,免疫效应子功能或应答是指促进靶细胞的杀伤或者抑制生长或增殖的T细胞或NK细胞的属性。在T细胞的情况下,主要刺激(primary stimulation)和共刺激是免疫效应子功能或应答的实例。

[0241] 术语“编码”是指多核苷酸比如基因、cDNA、或mRNA中的核苷酸的特异性序列在生物学过程中作为合成其它聚合物和大分子的模板的固有特性,该聚合物以及大分子具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列及由其得到的生物学特性。因此,如果与所述基因对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则基因、cDNA、或RNA编码蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常被提供在序列表中的编码链和用作转录基因或cDNA的模板的非编码链这两者都可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白或其他产物。

[0242] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括作为彼此的简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可以包括内含子,达到编码蛋白质的核苷酸序列可以在某些版本中含有内含子的程度。

[0243] 术语“内源的”是指来自或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何物质。

[0244] 术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何物质。

[0245] 术语“表达”是指由启动子驱动的特异性核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0246] 术语“转移载体”是指包括分离的核酸且可用于将所分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。大量载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物有关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应当被解释为进一步包括非质粒和促进核酸转移到细胞中的非病毒化合物,比如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒(lentiviral)载体等。

[0247] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些,包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆

转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0248] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。在能够感染非分裂细胞方面,慢病毒在逆转录病毒科病毒中是独特的;它们可以将大量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,因此它们是基因递送载体最有效的方法之一。HIV,SIV和FIV都是慢病毒的实例。

[0249] 术语“慢病毒载体”是指衍生自慢病毒基因组的至少一部分的载体,包括Milone等人,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009)中提供的自身灭活性慢病毒载体。可以在临床中使用的慢病毒载体的其它实例包括但不限于例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR®基因递送技术,来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也是可获得的,并且是本领域技术人员已知的。

[0250] 术语“同源的”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子之间,例如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子这两者中的亚基位置被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子的每一个中的位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源或同一的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数;例如,如果两个序列中的位置的一半(例如,长度为10个亚基的聚合物中的5个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配或同源的,则两个序列是90%同源的。

[0251] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其他抗原结合子序列,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。大多数情况下,人源化抗体和其抗体片段是人免疫球蛋白(受体抗体或抗体片段),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的具有所需的特异性、亲和力和能力的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应的非人残基替换。此外,人源化抗体/抗体片段可以包含既不在受体抗体中也不在输入的CDR或构架序列中发现的残基。这些修饰可以进一步改进和优化抗体或抗体片段性能。通常,人源化抗体或其抗体片段将包含基本上所有CDR区中至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且所有或重要部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区。人源化抗体或抗体片段可以还包含通常是人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。更多细节参见Jones等人,Nature,321:522-525,1986;Reichmann等人,Nature,332:323-329,1988;Presta,Curr. Op. Struct. Biol.,2:593-596,1992。

[0252] “完全人”免疫球蛋白是这样的免疫球蛋白,例如抗体或抗体片段,其中整个分子是人源的或由与人形式的抗体或免疫球蛋白相同的氨基酸序列组成。

[0253] 术语“分离的”意指从天然状态改变或除去。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境,例如宿主细胞中。

[0254] 在本发明的上下文中,使用通常出现的核酸碱基的以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶,“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,“U”是指尿苷。

[0255] 术语“有效连接的”或“转录控制”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接,导致异源核酸序列的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第

一核酸序列与第二核酸序列有效连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么启动子有效连接到编码序列。有效连接的DNA序列可以彼此连续,并且例如在必要时连接两个蛋白质编码区,在相同的可读框中。

[0256] 术语免疫原性组合物的“胃肠外”施用包括例如皮下(s.c.),静脉内(i.v.),肌肉内(i.m.)或胸骨内注射,瘤内或输注技术。

[0257] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其DNA或RNA的组合及其聚合物。术语“核酸”包括基因、cDNA或mRNA。在一个实施方案中,核酸分子是合成的(例如化学合成的)或重组的。除非特别限定,否则该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性并且以类似于天然存在的核苷酸的方式进行代谢。除非另有说明,特定的核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生这样的序列来实现,所述序列中一个或多个所选(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0258] 术语“肽”,“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对于包含蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括通过肽键彼此连接的包含两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链和长链,短链也在本领域中通常被称为肽,寡肽和寡聚体,长链在本领域中通常称为蛋白质,其存在很多类型。“多肽”包括例如生物活性片段,基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异源二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0259] 术语“启动子”是指由细胞的合成机器或引入的合成机器识别的DNA序列,需要其来启动多核苷酸序列的特异性转录。

[0260] 术语“启动子/调节序列”是指与启动子/调节序列可有效连接的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,并且在其他情况下,该序列也可以包括基因产物表达所需的增强子序列和其他调控元件。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0261] 术语“组成型”启动子是指核苷酸序列,其当与编码或指定基因产物的多核苷酸有效连接时,在细胞的大多数或所有生理条件下引起在细胞中产生基因产物。

[0262] 术语“诱导型”启动子是指核苷酸序列,其当与编码或指定基因产物的多核苷酸有效连接时,基本上只有当细胞中存在对应于启动子的诱导物时,才引起在细胞中产生基因产物。

[0263] 术语“组织特异性”启动子是指核苷酸序列,其当与编码基因或由基因指定的多核苷酸有效连接时,基本上只有当细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时,才引起在细胞中产生基因产物。

[0264] 术语“癌症相关抗原”或“肿瘤抗原”可互换地指与正常细胞相比,优选在癌细胞表面完全或作为片段(例如,MHC/肽)表达的分子(通常为蛋白质,碳水化合物或脂质),并且其可用于药理学试剂对癌细胞的优先靶向。在一些实施方案中,癌症相关抗原是与正常细胞

相比在癌细胞中过表达的细胞表面分子,例如与正常细胞相比1倍过表达、2倍过表达、3倍过表达或更多倍过表达。在一些实施方案中,癌症相关抗原是在癌细胞中不适当地合成的细胞表面分子,例如与正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施方案中,癌症相关抗原将仅在癌细胞的细胞表面完整表达或作为片段(例如MHC/肽)表达,并且不在正常细胞的表面上合成或表达。在一些实施方案中,本发明的CAR包括这样的CAR,其包含与MHC呈递的肽结合的抗原结合结构域(例如抗体或抗体片段)。通常,衍生自内源蛋白的肽填充了主要组织相容性复合体(MHC) I类分子的口袋,并被CD8+T淋巴细胞上的T细胞受体(TCR)识别。MHC I类复合体由所有有核细胞组成型表达。在癌症中,病毒特异性和/或肿瘤特异性肽/MHC复合体代表用于免疫疗法的独特类型的细胞表面靶标。已经描述了在人白细胞抗原(HLA)-A1或HLA-A2的上下文中靶向衍生自病毒或肿瘤抗原的肽的TCR样抗体(参见例如Sastry等人,J Virol. 201185(5):1935-1942; Sergeeva等人,Blood, 2011117(16):4262-4272; Verma等人,J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen等人, Gene Ther 2001 8(21):1601-1608; Dao等人, Sci Transl Med 2013 5(176):176ra33; Tassev等人, Cancer Gene Ther 201219(2):84-100)。例如,可以从筛选文库(例如人scFv噬菌体展示文库)鉴定TCR样抗体。

[0265] 在scFv的上下文中使用的术语“柔性多肽接头”或“接头”是指由氨基酸组成的肽接头,例如单独或组合使用的甘氨酸和/或丝氨酸残基,以连接可变重链区和可变轻链区。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:22)。其中n是等于或大于1的正整数。例如,n=1、n=2、n=3、n=4、n=5和n=6、n=7、n=8、n=9和n=10。在一个实施方案中,所述柔性多肽接头包括但不限于(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:27)或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:28)。在另一个实施方案中,接头包括多个重复的(Gly<sub>2</sub>Ser)、(GlySer)或(Gly<sub>3</sub>Ser)(SEQ ID NO:29)。在一个实施方案中,接头是GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:104)。还包括在本发明范围内的是W02012/138475中描述的接头,其通过引用并入本文)。

[0266] 如本文所用,5'帽(也称为RNA帽,RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m<sup>7</sup>G帽)是转录开始后不久已经添加到真核信使RNA的“前面”或5'末端的经修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽由与第一转录核苷酸连接的末端基团组成。其存在对于核糖体的识别和受保护免于RNA酶的作用至关重要。帽添加与转录相结合,并且与转录共同发生,使得每个都影响另一个。在转录开始后不久,正被合成的mRNA的5'末端被与RNA聚合酶结合的帽合成复合体结合。该酶复合体催化mRNA帽化所需的化学反应。合成作为多步生化反应进行。可以修饰帽化部分以调节mRNA的功能,例如其稳定性或翻译效率。

[0267] 如本文所用,“体外转录的RNA”是指已经在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA是从体外转录载体产生的。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0268] 如本文所用,“多聚(A)”是通过聚腺苷酸化连接到mRNA的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选的实施方案中,多聚A在50至5000(SEQ ID NO:30)之间,优选大于64,更优选大于100,最优选大于300或400个多聚(A)序列,其可通过化学或酶学方法修饰来调节mRNA功能,如定位,稳定性或翻译效率。

[0269] 如本文所用,“聚腺苷酸化”是指多聚腺苷酰部分或其修饰变体与信使RNA分子的共价连接。在真核生物中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端聚腺苷酸化。3'多聚(A)尾是

通过酶多聚腺苷酸聚合酶的作用而被加入前mRNA的腺嘌呤核苷酸(通常数百)的长序列。在高等真核生物中,将多聚(A)尾添加到含有特异性序列,即多聚腺苷酸化信号的转录物上。多聚(A)尾和与其结合的蛋白质有助于保护mRNA免受外切核酸酶的降解。多聚腺苷酸化对于转录终止,mRNA从核的输出和翻译也是重要的。多聚核糖核苷酸化在DNA转录成RNA之后立即发生在细胞核中,但另外也可以在胞质中发生。转录终止后,通过与RNA聚合酶相关的核酸内切酶复合体的作用将mRNA链切割。切割位点的特征通常是在切割位点附近存在碱基序列AAUAAA。在mRNA被切割后,将腺苷残基加入切割位点的游离3'末端。

[0270] 如本文所用,“瞬时”是指非整合转基因表达数小时、数天或数周,其中表达时间段少于如果整合到基因组中或包含在宿主细胞中的稳定的质粒复制子中时基因表达的时间段。

[0271] 单采血液成分术是将全血从个体中移出,分离成选择的组分,其余的回流到循环中的方法。一般来说,有两种分离血液成分的方法:离心和非离心方法。白细胞分离术导致患者白细胞的主动选择和移出。

[0272] 如本文所用,术语“治疗”是指减少或改善增生性病征的进展,严重性和/或持续时间,或改善由施用一种或多种疗法(例如,一种或多种治疗剂如本发明的CAR)引起的增生性病征的一种或多种症状(优选地,一种或多种明显的症状)。在具体实施方案中,术语“治疗”是指改善增生性病征的至少一种可测量的物理参数,例如肿瘤生长,其不一定被患者识别。在其它实施方案中,术语“治疗”指通过身体上(通过例如稳定可辨别的症状)或生理上(通过例如稳定身体参数)或两者来抑制增生性病征的进展。在其它实施方案中,术语“治疗”是指肿瘤大小或癌细胞计数的减少或稳定化。治疗不必是100%,并且在一些实施方案中,疾病或病征的至少一种症状减少或延迟至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%足以在这些术语内予以考虑。

[0273] 本文所用的“难治性”疾病是指对治疗无应答的疾病,例如癌症。在实施方案中,难治性癌症可以在治疗之前或开始时对治疗有抗性。在其他实施方案中,难治性癌症可以在治疗期间变得难治。

[0274] 本文所用的术语“复发”是指在初始应答期之后(例如,完全应答或部分应答)之后再出现疾病(例如癌症)。初始应答期可涉及癌细胞水平降到低于某一阈值,例如低于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。再次出现可涉及癌细胞的水平升高到某一阈值以上,例如高于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。可以例如使用Cheson等人,J Clin Oncol 17:1244(1999)和Cheson等人,“Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma”,J Clin Oncol 25:579-586(2007)(其全部内容通过引用并入本文)所述Cheson准则来鉴定复发。例如,在B-ALL的上下文中,再次出现可能涉及例如在完全应答之后在血液,骨髓(>5%)或任何髓外部位中胚细胞的再次出现。在这种情况下,完全的应答可能涉及<5%的BM胚细胞。更一般地,在一个实施方案中,应答(例如完全应答或部分应答)可以涉及不存在可检测的MRD(最小残留疾病)。在一个实施方案中,应答的初始时间持续至少1、2、3、4、5或6天;至少1、2、3或4周;至少1、2、3、4、6、8、10或12个月;或至少1、2、3、4或5年。

[0275] 术语“信号转导途径”是指在将信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中发挥作用的多种信号转导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞膜传递信号的分子和分子复合体。

[0276] 术语“受试者”意欲包括其中可引发免疫应答的活的生物体(例如哺乳动物,人)。

[0277] 术语“基本上纯化的”细胞指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与其通常与其天然存在状态相关的其它细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群体是指同源的细胞群体。在其它情况下,该术语简单地指已经与细胞分离的细胞,后者细胞在其天然状态下与前者细胞天然结合。在一些方面,细胞在体外培养。在其他方面,细胞不在体外培养。

[0278] 在本发明的上下文中,“肿瘤抗原”或“过度增生性病征抗原”或“与过度增生性病征相关的抗原”是指特定过度增生性病征常见的抗原。在某些实施方案中,肿瘤抗原衍生自癌症,包括但不限于原发性或转移性黑素瘤,胸腺瘤,淋巴瘤,肉瘤,肺癌,肝癌,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,白血病,子宫癌,宫颈癌,膀胱癌,肾癌和腺癌如乳腺癌,前列腺癌,卵巢癌,胰腺癌等。

[0279] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染,转化或转导的细胞。细胞包括原代受试细胞及其后代。

[0280] 术语“特异性结合”是指识别并结合存在于样品中的相应结合配偶体(例如在T细胞上存在的刺激和/或共刺激分子)蛋白的抗体或配体,但所述抗体或配体基本上不识别或结合样品中的其他分子。

[0281] 范围:在整个公开中,本发明的各个方面都可以以范围形式存在。应当理解,范围形式的描述仅仅为方便和简洁起见,而不应当被看作是对本发明的范围不可改变的限制。因此,范围的描述应当被认为特别地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,范围的描述比如从1至6就应当被认为具体地公开了子范围比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单独数值,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3、和6。作为另一个实例,95-99%同一性的范围包括具有95%,96%,97%,98%或99%同一性的内容,并且包括诸如96-99%,96-98%,96-97%,97-99%,97-98%和98-99%同一性的子范围。这无论范围的广度如何都适用。

[0282] 治疗方法

[0283] 在一个方面,本公开内容提供了用于治疗与本文描述的肿瘤抗原表达相关的疾病的方法。

[0284] 在一个方面,本公开内容提供了通过向有需要的受试者提供被工程化以表达CAR(例如本文所述的CAR)的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)来治疗癌症(例如,如ALL和CLL的血液学癌症)的方法。在一个实施方案中,待治疗的癌症是B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,待治疗的癌症是ALL(急性淋巴细胞性白血病)、CLL(慢性淋巴细胞性白血病)、DLBCL(弥漫性大B细胞淋巴瘤)、MCL(套细胞淋巴瘤或MM(多发性骨髓瘤))。

[0285] 在一个方面,本公开内容提供了通过向有需要的受试者提供被工程化以表达CAR(例如本文所述的CAR,例如CD19 CAR)的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)来治疗癌症(例如,血液学癌症,如ALL和CLL)的方法,其中癌细胞表达CD19。在一个实施方案中,待治疗的癌症是B细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中,待治疗的癌症是ALL(急性淋巴细胞性白血病)、CLL(慢性淋巴细胞性白血病)、DLBCL(弥漫性大B细胞淋巴瘤)、MCL(套细胞淋巴瘤)、霍奇金淋巴瘤或MM(多发性骨髓瘤)。

[0286] 本公开内容包括一类细胞疗法,其中免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)被遗传修饰(例如,经由慢病毒载体的转导)以表达CAR并且CAR表达细胞被输注至需要它的受体。输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,CAR修饰的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)能够在体内复制,造成可导致持续的肿瘤控制的长期持久性。使用慢病毒载体产生的CAR表达细胞(例如T细胞或NK细胞)将具有稳定的CAR表达。在多个方面,在向患者施用T细胞之后,向患者施用免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)或其后代在患者中持续至少四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、十三个月、十四个月、十五个月、十六个月、十七个月、十八个月、十九个月、二十个月、二十一个月、二十二个月、二十三个月、二年、三年、四年或五年。

[0287] 本发明还包括一类细胞疗法,其中免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)例如通过体外转录的RNA被修饰以瞬时表达CAR,并将CAR表达细胞输注至需要它的受体。通过CAR RNA转导(例如通过转染或电穿孔)产生的CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)在转导后4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15天瞬时表达RNA CARs。输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。因此,在各个方面,在向患者施用T细胞后,施用给患者的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)存在不到一个月,例如存在三周、两周、一周。

[0288] 在一个实施方案中,本公开内容提供了通过向有需要的受试者提供被工程化以表达CAR(其特异性靶向或结合本文所述的肿瘤抗原(或癌症相关抗原))的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)来治疗癌症(例如,如ALL和CLL的血液学癌症)的方法。在又一个实施方案中,治疗方法包括改变CAR表达细胞的制造以富集幼稚T细胞,例如如本文所述。

[0289] 在一个实施方案中,免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)被工程化以表达CD19 CAR,用于治疗具有癌症(例如,如ALL和CLL的血液学癌症)的受试者,其中癌细胞表达CD19。在一个实施方案中,待治疗的癌症是ALL或CLL。待在免疫效应细胞中表达的CD19 CAR分子可以包含本领域中的任何抗CD19抗原结合结构域(例如,表1或4中提供的那些)与本文所述的任何CAR结构域组合以产生完整的CAR构建体。例如,完整CAR构建体是表4中列出的CAR。表4提供了使用本文所述的各种CAR结构域(例如跨膜和胞内信号传导结构域)和在表1或4中列出的抗CD19抗原结合结构域产生的示例性全CD19 CAR构建体。氨基酸序列被命名为(aa),并且核酸序列命名为(nt)。

[0290] 在一个方面,本公开内容提供了用CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)疗法来治疗癌症例如与CD19表达相关的癌症的方法。示例性癌症包括但不限于例如一种或多种急性白血病,包括但不限于例如B-ALL、T-ALL、ALL;一种或多种慢性白血病,包括但不限于例如慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0291] 可以用本文描述的方法治疗的其他癌症或血液病症包括但不限于例如B细胞早幼粒细胞白血病,母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤,伯基特淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤,恶性淋巴细胞增生性疾病,MALT淋巴瘤,套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆细胞淋巴瘤,浆细胞样树突状细胞肿瘤,瓦尔登氏巨球蛋白血症,以及由髓样血细胞的无效产生(或发育异常)联合在一起的血液学疾病的多样性集合,即“白血病前期”等。

[0292] 上述血液学疾病可与CD19的表达有关。此外,与CD19表达相关的疾病包括但不限

于例如与CD19表达相关的非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前疾病或增殖性疾病。

[0293] 在一个实施方案中,本公开提供了治疗CLL的方法。

[0294] 在另一个实施方案中,本公开提供了治疗ALL的方法。

[0295] 在另一个实施方案中,本公开提供了治疗B细胞ALL的方法。

[0296] 在一个方面,本公开内容提供了用CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)(例如如本文所述的CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)(例如,CTL019)治疗具有癌症(例如,血液学癌症,如ALL和CLL)的受试者。在一个实施方案中,本公开提供了用CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)与另一种治疗剂(例如本文所述的另一种治疗剂(例如另一种CAR(例如本文所述的另一种CAR),抑制性CAR(例如本文所述的抑制性CAR),化学疗法;激酶抑制剂(例如本文所述的激酶抑制剂,例如mTOR抑制剂,BTK抑制剂),检查点抑制剂(例如本文所述的检查点抑制剂),护理疗法标准等)组合治疗受试者。该组合可以是例如与本文所述的任何药剂组合。

[0297] 在一些实施方案中,治疗受试者的癌症包括结合一个或多个化疗周期施用如本文所述的CAR治疗。在实施方案中,示例性的化疗周期包括诱导、巩固、临时维持、延迟增强和维持。

[0298] 在一些实施方案中,化疗的第一周期是诱导,其中目标是消除尽可能多的癌细胞。在实施方案中,在患有白血病(例如ALL)的受试者中,诱导周期包括用一种或多种药物如长春新碱、地塞米松和/或聚乙二醇(PEG)-L-天冬酰胺酶进行治疗。在一个实施方案中,在具有白血病(例如,ALL,例如标准风险ALL)的受试者中,诱导周期包括用长春新碱、地塞米松和PEG-L-天冬酰胺酶例如分别以 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $2500\text{U}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。在一个实施方案中,在患有白血病的受试者(例如ALL,例如高风险ALL)中,诱导周期包括用长春新碱、地塞米松、PEG-L-天冬酰胺酶和柔红霉素例如分别以 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 、和 $2500\text{U}/\text{m}^2$ 、和 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。

[0299] 在实施方案中,化疗的另一个周期是巩固,其中目标是破坏任何剩余的癌细胞。在一些实施方案中,在诱导周期后达到缓解后,给予受试者巩固周期。在实施方案中,在患有白血病(例如ALL)的受试者中,巩固周期包括用一种或多种药物例如长春新碱、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、阿糖胞苷和/或PEG-L-天冬酰胺酶进行治疗。在一个实施方案中,在患有白血病的受试者(例如,ALL,例如标准风险ALL)中,巩固周期包括用长春新碱和6-巯基嘌呤例如分别以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。在一个实施方案中,在患有白血病的受试者(例如ALL,例如高风险ALL)中,巩固周期包括用长春新碱、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、阿糖胞苷和PEG-L-天冬酰胺酶,例如,分别以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $1\text{g}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $2500\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。

[0300] 在实施方案中,化学疗法的另一个周期包括维持周期(其中目标是减少癌症复发的长期风险)或临时维持周期(其中目标是提供来自强化治疗的休息)。在实施方案中,临时维持周期在诱导之后执行,并且在一些情况下在巩固之后执行。在实施方案中,在延迟增强周期之前执行临时维持周期。在一些实施例中,在延迟增强周期之后执行临时维持周期。在实施方案中,维持周期是化疗的最后一个周期,例如在诱导、巩固、临时维持和/或延迟增强之后。在一些实施方案中,在患有白血病的受试者(例如,ALL,例如标准风险ALL)中,临时维持周期包括用长春新碱和甲氨蝶呤分别以 $7.5\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。在一些实施方案中,在患有白血病的受试者(例如,ALL,例如高风险ALL)中,临时维持周期包括用长春新

碱、甲氨蝶呤和6-巯基嘌呤例如分别以 $7.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。在实施方案中,在患有白血病的受试者(例如ALL,例如标准风险ALL)中,维持周期包括用长春新碱、地塞米松、6-巯基嘌呤和甲氨蝶呤例如分别以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。在实施方案中,在患有白血病的受试者(例如ALL,例如高风险ALL)中,维持周期包括用长春新碱、泼尼松、6-巯基嘌呤和甲氨蝶呤例如分别以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。

[0301] 在实施方案中,化疗的另一个周期包括延迟增强周期,其中目标是消除任何剩余的癌性细胞。在实施方案中,延迟增强周期在巩固周期之后并且例如在临时维持周期之后执行。延迟增强周期包括用长春新碱、地塞米松、多柔比星、PEG-L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷和6-硫代鸟嘌呤(例如,分别为 $4.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $2500\text{U}/\text{m}^2$ 、 $1\text{g}/\text{m}^2$ 、 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。延迟增强周期包括用长春新碱、地塞米松、多柔比星、PEG-L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷和6-硫鸟嘌呤(例如,分别以 $7.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $5000\text{U}/\text{m}^2$ 、 $1\text{g}/\text{m}^2$ 、 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量治疗。

[0302] 在一些实施方案中,基于风险测量,用不同强度的化疗方案治疗受试者,例如以使存活最大化,同时使毒性最小化。在实施方案中,例如基于白细胞计数和年龄,例如基于National Cancer Institute (NCI) 风险组分类将具有ALL(例如小儿ALL)的受试者分类为标准风险组或高风险组。参见例如Smith等人J.Clin.ONCOL.14.1(1996):18-24。例如,如果白细胞计数小于每微升50000个细胞并且受试者为1至10岁,则将受试者分类为标准风险组。例如,如果白细胞计数为每微升50000个细胞或更大和/或受试者年龄在10岁以上,则将受试者分类为高风险组。在实施方案中,例如具有ALL(例如小儿ALL)的受试者被分类为非常高风险的组,如Mörliche等人Blood 111.9(2008):4477-89;和Pui等人Blood 92.2(1998):411-5所述。例如,具有以下一个或多个特征的ALL受试者被分类为非常高风险的ALL:是婴儿的受试者;具有不良细胞遗传异常(例如t(9;22)、MLL基因重排和低亚二倍体(<44条染色体)的受试者;对初始治疗具有缓慢早期反应的受试者;在诱导周期结束时或在晚期周期中具有高微小残留疾病(MRD)水平的受试者;在诱导周期后患有形态学持续性疾病的受试者。

[0303] 在一个实施方案中,CLL护理标准包括但不限于本文描述的示例性疗法,例如表5中描述的疗法及其组合。

[0304] 表5:CLL的示例性疗法

[0305]

一线≥70 岁，具有合并症	w/o del (11q)或 del(17p)	del (17p)	del (11q)
奥比妥珠单抗(Obinutuzumab)+苯丁酸氮芥	X	X	X
利妥昔+ 苯丁酸氮芥	X		X
利妥昔	X		
苯丁酸氮芥	X		
氟达拉滨 ± 利妥昔	X	X	
克拉屈滨	X		
苯达莫司汀 ± 利妥昔	X		X
PCR (喷司他丁, 环磷酰胺, 利妥昔)	X		X
一线<70 岁，没有显著合并症			
FCR (氟达拉滨, 环磷酰胺, 利妥昔)	X	X	X
FR (氟达拉滨, 利妥昔)	X	X	
PCR	X		X
苯达莫司汀 ± 利妥昔	X		X
奥比妥珠单抗+苯丁酸氮芥	X	X	X
二线-复发/难治≥70 年			
依鲁替尼	X	X	X
减少剂量的 FCR	X		X
减少剂量的 PCRR	X		X
苯达莫司汀 ± 利妥昔	X		X
奥法木单抗	X	X	X
阿伦单抗+ 利妥昔	X	X	X
高剂量甲基强的松(HDMP)+利妥昔单抗	X	X	X
来那度胺+ 利妥昔	X	X	X
剂量密集的利妥昔单抗	X		X
二线-复发/难治<岁，没有显著合并症			
依鲁替尼	X	X	X
FCR (氟达拉滨, 环磷酰胺, 利妥昔)	X		X
PCR	X		X

[0306]	苯达莫司汀 ± 利妥昔	X		X
	氟达拉滨+阿仑单抗	X		X
	R-CHOP (利妥昔, 环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱, 泼尼松)	X	X	X
	奥法木单抗	X	X	X
	OFAR (奥沙利铂, 氟达拉, 阿糖胞苷, 利妥昔)	X	X	X
	HDMP+利妥昔单抗	X	X	X
	来那度胺+ 利妥昔	X	X	X

[0307] 在一个实施方案中,CLL的护理标准包括(1)放射疗法,(2)化学疗法,(3)外科手术(例如脾的移除),(4)靶向疗法,(5)干细胞移植及其组合。在一个实施例中,护理标准包括外部放射疗法。在一个实施方案中,护理标准包括内部放射疗法(例如密封在针、线或导管中的放射性物质,例如直接放置在癌症中或附近的放射性物质)。

[0308] 在一个实施方案中,ALL的护理标准包括但不限于本文描述的示例性治疗,例如表6中描述的疗法和其组合。

[0309] 表6:ALL的示例性疗法

[0310]	一线
	RCHOP(利妥昔, 环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱, 泼尼松)
	剂量密集的 RCHOP 14(3 类)
	剂量调整的 EPOCH(依托泊苷, 泼尼松, 长春新碱, 环磷酰胺, 多柔比星)+ 利妥昔
	一线治疗, 用于左心功能不全或非常虚弱的受试者
	RCEPP(利妥昔, 环磷酰胺, 依托泊苷, 泼尼松, 丙卡巴肼)
	RCEOP(利妥昔, 环磷酰胺, 依托泊苷, 长春新碱, 泼尼松)
	RCNOP(利妥昔, 环磷酰胺, 米托蒽醌, 长春新碱, 泼尼松)
	RCEOP(利妥昔, 环磷酰胺, 依托泊苷, 长春新碱, 泼尼松)
	剂量调整的 EPOCH(依托泊苷, 泼尼松, 长春新碱, 环磷酰胺, 多柔比星)+ 利妥昔
	二线-进行自体干细胞拯救的高剂量治疗
	DHAP(地塞米松, 顺铂, 阿糖胞苷)±利妥昔
	ESHAP(依托泊苷, 甲基泼尼松龙, 阿糖胞苷, 顺铂)±利妥昔
	GDP(吉西他滨, 地塞米松, 顺铂)±利妥昔
	GemOx(吉西他滨, 奥沙利铂)±利妥昔
ICE(异环磷酰胺, 卡铂, 依托泊苷)+ 利妥昔	
MINE(美司钠, 异环磷酰胺, 米托蒽醌, 依托泊苷)±利妥昔	
二线治疗(非高剂量治疗的候选人)	

[0311]

CEPP(环磷酰胺, 依托泊苷, 泼尼松, 丙卡巴肼)±利妥昔
CEOP(环磷酰胺, 依托泊苷, 长春新碱, 泼尼松)±利妥昔
DA-EPOCH±利妥昔
Revlimid±利妥昔
利妥昔
GemOx±利妥昔
GDP±利妥昔
苯达莫司汀+利妥昔

[0312] 在一个实施方案中, ALL的护理标准包括 (1) 化学疗法, (2) 放射疗法, (3) 干细胞移植, (4) 生物疗法, (5) 靶向疗法及其组合。

[0313] 在一个实施方案中, 护理标准包括但不限于氟达拉滨与环磷酰胺 (FC); 氟达拉滨与利妥昔单抗 (FR); 氟达拉滨, 环磷酰胺和利妥昔单抗 (FCR); 环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱和泼尼松 (CHOP); 及其组合。考虑使用的一般化学治疗剂包括但不限于阿那曲唑 (Arimidex®)、比卡鲁胺 (Casodex®)、硫酸博来霉素 (Blenoxane®)、白消安 (Myleran®)、白消安注射剂 (Busulfex®)、卡培他滨 (Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂 (Paraplatin®)、卡莫司汀 (BiCNU®)、苯丁酸氮芥 (Leukeran®)、顺铂 (Platinol®)、克拉屈滨 (Leustatin®)、环磷酰胺 (Cytosan® 或 Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖胞苷 (Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂 (DepoCyt®)、达卡巴嗪 (DTIC-Dome®)、更生霉素 (Actinomycin D、Cosmegen)、盐酸佐柔比星 (Cembidine®)、柠檬酸道诺霉素脂质体注射剂 (DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛 (Taxotere®, US2004073044)、盐酸多柔比星 (Adriamycin®, Rubex®)、依托泊苷 (Vepesid®)、磷酸从达拉滨 (Pludara®)、5-氟尿嘧啶 (Adrcil®, Efudex®)、氟他胺 (Eulexin®)、替扎他滨、吉西他滨 (二氟脱氧胞苷)、羟基脲 (Hydrea®)、伊达比星 (Idamyd®)、异环磷酰胺 (IFEX®)、伊立替康 (Camptosar®)、L-天冬酰胺酶 (ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑 (Alkeran®)、6-巯基嘌呤 (Purinethol®)、甲氨蝶呤 (Folex®)、米托蒽醌 (Novantrone®)、麦罗塔、紫杉醇 (Taxol®)、菲尼克斯 (phoenix) (钇90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生20和卡莫司汀植入剂 (Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬 (Nolvadex®)、替尼泊苷 (Vumon®)、6-巯鸟嘌呤、硫替派、替拉扎明 (Tirazone®)、注射用盐酸拓扑替康 (Hycamptin®)、长春碱 (Velban®)、长春新碱 (Oncovin®) 和长春瑞滨 (Navelbine®) 以及它们的组合。

[0314] 在一个实施方案中, 化学疗法包括抗代谢物, 包括但不限于叶酸拮抗剂 (在本文中还可称作抗叶酸剂)、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂): 甲氨蝶呤 (Rheumatrex®, Trexall®)、5-氟尿嘧啶 (Adrcil®, Efudex®, Fluoroplex®)、氟尿苷 (FUDF®)、阿糖胞苷 (Cytosar-U®, Tarabine PFS)、6-巯基嘌呤 (Puri-Nethol®)、6-巯鸟嘌呤 (Thioguanine Tabloid®)、磷酸氟达拉滨 (Fludara®)、喷司他丁 (Nipent®)、培美曲塞 (Alimta®)、雷替曲塞 (Tomudex®)、克拉屈滨 (Leustatin®)、氯法拉滨 (Clofarex®, Clolar®)、巯嘌呤 (Puri-Nethol®)、卡培他滨 (Xeloda®)、奈拉滨 (Arranon®)、阿扎胞苷 (Vidaza®) 以及吉

西他滨(Gemzar®)。优选的抗代谢物包括例如5-氟尿嘧啶(Admcil®、Efundex®、Fluoroplex®)、氟尿苷(FUDF®)、卡培他滨(Xeloda®)、培美曲塞(Alimta®)、雷替曲塞(Tomudex®)和吉西他滨(Gemzar®)以及其组合。在一个实施方案中,嘌呤类似物是氟达拉滨。

[0315] 在一个实施方案中,化疗剂包含烷化剂,包括但不限于氮芥类(nitrogen mustards),乙烯亚胺衍生物(ethylenimine derivatives),烷基磺酸盐类(alkyl sulfonates),亚基脲(nitrosoureas)和三氮烯类(triazenes):尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®),氮芥(chlormethine)(MIIStargen®),环磷酰胺(Cytosan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™),异环磷酰胺(ifosfamide)(Mitoxana®),美法仑(melphalan)(Alkeran®),苯丁酸氮芥(Chlorambucil)(Leikeran®),溴丙哌嗪(pipobroman)(Amedel®, Vercyte®),三亚胺嗪(triethylenemelamine)(Hemel®, Hexalen®, Hexastat®),三亚乙基硫代磷胺,替莫唑胺(Temodar®),塞替派(Thioplex®),白消安(Busilvex®, Myleran®),卡莫司汀(BiCNU®),洛莫司汀(CeeNU®),链脲霉素(Zanosar®),和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)及其组合。其它的示例性烷化剂包括但不限于奥沙利铂(Oxaliplatin)(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和 Temodal®);更生霉素(也称作放线菌素-D, Cosmegen®);美法仑(也称作L-PAM,1-沙可来新(sarcosylsin),和苯丙氨酸氮芥(phenylalaninemustard), AiktTan®);六甲蜜胺(Altretamine)(也称作六甲氮胺(hexamethylmelamine)(HMM), Hexalen®);卡莫司汀(BiCNU®);苯达莫司汀(Bendamustine)(Treanda®);白消安(Biisulfex®和 Myleran®);卡铂(Paraplatin®);洛莫司汀(也称作CCNU, CeeMU®);顺铂(也称作CDDP, Platinol®和 Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytosan®和 Neosar®);达卡巴嗪(也称作DTIC, DIC和甲嗪咪唑胺, DTIC-Dome®);六甲蜜胺(也称作六甲氮胺(HMM), Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);Prednumustine;丙卡巴嗪(Matulane®);氮芥(也称作nitrogenmustard, mustine和mechloroethamine hydrochloride, Mustargen®);链脲霉素(Zanosar®);塞替派(Thiotepa)(也称作三乙烯硫代磷酰胺, TESP A和 TSPA, Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®);和盐酸苯达莫司汀(Treanda®)及其组合。在一个实施方案中,烷化剂是苯达莫司汀。在一个实施方案中,烷化剂是环磷酰胺。

[0316] 在一个实施方案中,化学治疗剂是激酶抑制剂,例如酪氨酸激酶抑制剂,包括但不限于盐酸厄洛替尼(Tarceva);利尼伐尼(Linifanib)(N-[4-(3-氨基-1H-吡唑-4-基)苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基)脲,也称作ABT869,从Genentech可获得);苹果酸舒尼替尼(Sutent®);博舒替尼(4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)氨基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈,也称作SKI-606,并且在美国专利号6,780,996中描述);达沙替尼(Spryzel®);帕唑帕尼(Votrient®);索拉替尼(Nexavar®);Zactima(ZD6474);和伊马替尼或

甲磺酸伊马替尼 (Gilevec®和Gleevec®)。在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自依鲁替尼 (ibrutinib) (PCI-32765);GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059;CNX-774;和LFM-A13的BTK抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自如下的CDK4抑制剂:2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基-4-哌啶基]-4-苯并吡喃酮;crizotinib (PF-02341066);2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟甲基)-1-甲基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃 (P276-00);1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧基]N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺 (RAF265);indisulam (E7070);roscovitine (CYC202);帕博西尼 (PD0332991);dinaciclib (SCH727965);N-[5-[[[(5-叔丁基-甲基)硫代]噻唑-2-基]哌啶-4-甲酰胺 (BMS 387032);4-[[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并氮杂-2-基]氨基]苯甲酸 (MLN8054);5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡唑-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲胺 (AG-024322);4-(2,6-二氯苯甲酰氨基)-1H-吡唑-3-甲酸N-(哌啶-4-基)酰胺 (AT7519);4-[2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基]-N-[4-(甲基磺酰基)苯基]-2-嘧啶胺 (AZD5438);和XL281 (BMS908662),激酶抑制剂是选自CGP052088;4-氨基-3-(对-氟苯基氨基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶 (CGP57380);尾孢素酰胺 (cercosporamide);ETC-1780445-2;和4-氨基-5-(4-氟苯基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶的MNK抑制剂。

[0317] 在一个实施方案中,靶向疗法包括但不限于抗CD20抗体或其功能片段,例如利妥昔®和MabThera®;托西莫单抗(Bexxar®);和奥法木单抗(Arzerra®),以及它们的组合。在一个实施方案中,靶向疗法包括但不限于抗CD52抗体或其功能性片段,例如阿仑单抗 (Campath®)。

[0318] 在一个实施方案中,生物疗法包括免疫疗法。示例性的蒽环类抗生素包括但不限于多柔比星 (Adriamycin®和Rubex®);博来霉素(lenoxane®);柔红霉素 (盐酸柔红霉素,道诺霉素和盐酸红霉素, Cerubidine®);柔红霉素脂质体 (柠檬酸柔红霉素脂质体, DaunoXome®);米托蒽醌 (DHAD, Novantrone®);表柔比星 (E1lence™);伊达比星 (Idamycin®, Idamycin®);丝裂霉素C (mutamycin®);格尔德霉素;除莠霉素;ravidomycin;去乙酰基维霉素及其组合。

[0319] 在一个实施方案中,干细胞移植包含自体干细胞移植。在一个实施方案中,干细胞移植包含同种异体干细胞移植。在一个实施方案中,干细胞移植包括同种异体骨髓移植。在一个实施方案中,干细胞移植包括造血干细胞移植 (HSCT)。在一个实施方案中,造血干细胞来自各种组织,包括但不限于骨髓、外周血、脐带血及其组合。

[0320] 在一个方面,本公开提供了治疗与CD19表达相关的疾病的方法。在一个方面,本发明提供了治疗疾病的方法,其中部分肿瘤对CD19呈阴性,并且部分肿瘤对CD19呈阳性。例如,所提供的方法可用于治疗已经接受了与CD19表达升高有关的疾病的治疗的受试者,其中已经经历了升高水平的CD19治疗的受试者表现出与CD19水平升高相关的疾病。

[0321] 在一个方面,所提供的方法包括载体,所述载体包含与启动子有效连接以在哺乳动物细胞 (例如T细胞或NK细胞) 中表达的CD19 CAR。在一个方面,提供的方法包括表达CD19 CAR的重组细胞 (例如T细胞或NK细胞),用于治疗表达CD19的肿瘤,其中表达CD19 CAR的重组T细胞被称为CD19 CAR表达细胞。在一个方面,根据所提供的方法施用的表达CD19 CAR的细胞 (例如,T细胞、NK细胞) 能够使肿瘤细胞与其表面上表达的至少一种CD19 CAR接触,使

得CAR表达细胞靶向肿瘤细胞和肿瘤的生长受到抑制。

[0322] 在一个方面,本公开的特征在于抑制表达CD19的肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括使肿瘤细胞与本文所述的CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)接触,使得CAR表达细胞响应于抗原被激活并靶向癌细胞,其中肿瘤的生长受到抑制。

[0323] 在一个方面,本公开内容包括一类细胞疗法,其中T细胞被遗传修饰以表达CAR并且CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)被输注至有需要的受体。输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,CAR修饰的细胞(例如T细胞或NK细胞)能够在体内复制,造成可导致持续的肿瘤控制的长期持久性。在各个方面,在向患者施用T细胞之后,向患者施用的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)或其后代在患者中持续至少四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、十三个月、十四个月、十五个月、十六个月、十七个月、十八个月、十九个月、二十个月、二十一个月、二十二个月、二十三个月、二年、三年、四年或五年。

[0324] 本发明还包括一类细胞疗法,其中细胞(例如,T细胞、NK细胞)例如通过体外转录的RNA被修饰以瞬时表达嵌合抗原受体(CAR),并将CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)输注至需要它的受体。输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。因此,在各个方面,施用于患者的细胞在给予患者细胞(例如,T细胞、NK细胞)后存在不到一个月,例如存在三周、两周、一周。

[0325] 不希望受任何特定理论束缚,由CAR修饰的细胞(例如,T细胞、NK细胞)引发的抗肿瘤免疫应答可以是主动或被动免疫应答,或者备选地可以是由于直接对间接免疫反应。在一个方面,CAR转导的T细胞表现出特异的促炎细胞因子的分泌,并且响应于表达CD19的人类癌症细胞的强细胞溶解活性,抗可溶性CD19抑制,介导旁观者杀伤和介导已建立的人肿瘤的消退。例如,表达CD19的肿瘤的异源性区域内的无抗原的肿瘤细胞可能易受先前与邻近的抗原阳性癌细胞反应的CD19重定向T细胞的间接破坏。

[0326] 在一个方面,本文所述的全人CAR修饰的细胞(例如,T细胞、NK细胞)可以是用于哺乳动物离体(ex vivo)免疫和/或体内治疗的一类疫苗。在一个方面,哺乳动物是人。

[0327] 就离体免疫而言,在将细胞施用于受试者之前,体外发生以下至少之一:i)细胞的扩增,ii)将编码CAR的核酸导入细胞中,或iii)冷冻保存细胞。

[0328] 离体方法是本领域已知的,并在下文中更全面地讨论。简而言之,用表达本文公开的CAR的载体从受试者(例如人)中分离细胞并进行基因修饰(即,体外转导或转染)。可将CAR修饰的细胞施用于哺乳动物受体以提供治疗益处。哺乳动物受体可以是人,并且CAR修饰的细胞相对于受体可以是自体的。备选地,相对于受体,细胞可以是同种异体的、同基因的或异种的。

[0329] 血液学癌症

[0330] 血液学癌症疾病是癌症的类型,例如影响血液、骨髓和淋巴系统的白血病和恶性淋巴细胞增生性疾病状。

[0331] 白血病可分为急性白血病和慢性白血病。急性白血病可以进一步分类为急性髓细胞性白血病(AML)和急性淋巴性白血病(ALL)。慢性白血病包括慢性髓性白血病(CML)和慢性淋巴性白血病(CLL)。其他相关疾病包括骨髓增生异常综合征(MDS,以前称为“白血病前期”),其是髓样血细胞无效产生(或发育异常)联合在一起的血液学疾病的多样性集合,以

及转化为AML的风险。

[0332] 本公开提供了用于治疗癌症的组合物和方法。在一个方面,癌症是血液学癌症,包括但不限于白血病或淋巴瘤。在一个方面,本发明的CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)可以用于治疗癌症和恶性肿瘤,例如但不限于例如急性白血病,包括但不限于例如B-ALL、T-ALL、ALL;一种或多种慢性白血病,包括但不限于例如CML、CLL;包括但不限于例如B细胞早幼粒细胞白血病,母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤,伯基特氏淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞白血病,小细胞或大细胞-滤泡性淋巴瘤,恶性淋巴细胞增生性疾病,MALT淋巴瘤,套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,浆细胞淋巴瘤,浆细胞样树突状细胞瘤,瓦尔登氏巨球蛋白血症,和“白血病前期”(其是髓样血细胞无效产生(或发育异常)联合在一起的血液学疾病的多样性集合),等。

[0333] 本公开还提供了用于抑制表达CD19的细胞群体增殖或减少表达CD19的细胞群体的方法,所述方法包括使包含CD19表达细胞的细胞群体接触本文所述的结合CD19表达细胞的CD19CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一个具体的方面,本公开内容提供了抑制表达CD19的癌细胞增殖或减少表达CD19的癌细胞的方法,所述方法包括使表达CD19的癌细胞群体接触本文描述的结合CD19表达细胞的CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一个方面,本公开内容提供了用于抑制表达CD19的癌细胞的增殖或减少表达CD19的癌细胞群体的方法,所述方法包括使表达CD19的癌细胞群体接触本文描述的结合CD19表达细胞的CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在某些方面,在具有髓性白血病或另一种与CD19表达细胞相关的癌症的受试者或动物模型中,表达抗CD19 CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)将细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比相对于阴性对照而言,减少至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一个方面,受试者是人。

[0334] 本公开还提供用于预防、治疗和/或控制与表达CD19的细胞相关的疾病(例如,血液学癌症或表达CD19的非典型癌症)的方法,所述方法包括向需要的受试者施用本文所述的结合CD19表达细胞的表达CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一个方面,受试者是人。与表达CD19的细胞相关的病症的非限制性实例包括自身免疫病症(例如狼疮)、炎性病症(例如变态反应和哮喘)和癌症(例如血液学癌症或表达CD19的非典型癌症)。

[0335] 本公开还提供了用于预防、治疗和/或控制与表达CD19的细胞相关的疾病的方法,所述方法包括向需要的受试者施用本文所述的结合CD19表达细胞的表达CD19 CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一个方面,受试者是人。

[0336] 本公开内容提供了用于预防与表达CD19的细胞相关的癌症(例如,如ALL和CLL的血液学癌症)复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所述的结合CD19表达细胞的表达CD19 CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一个方面,所述方法包括联合有效量的另一种疗法,向有需要的受试者施用有效量的本文所述的结合CD19表达细胞的表达CD19 CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)。

[0337] 联合治疗

[0338] 应当理解,如上文和本文所述的任何癌症疗法可以与一种或多种另外的疗法联合施用以治疗和/或减轻本文所述的癌症症状。药物组合物可以与一种或多种其他额外的治

疗或治疗剂同时,在其之前或之后施用。在一个实施方案中,本文所述表达CAR的细胞可以与其它已知的作用剂和疗法联合使用。正如本文中使用的,“联合”施用是指在受试者受病症折磨的过程期间,向受试者递送两种(或多种)不同的治疗,例如在已经诊断受试者患有病症之后和在病症已经治愈或消除或治疗由于其它原因停止之前递送两种或多种治疗。在某些实施方案中,当递送第二种治疗开始时,一种治疗的递送仍然存在,因此施用方面存在重叠。这有时在本文称为“同时”或“同时递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一情形的某些实施方案中,因为联合施用,治疗更有效。例如,与如果在不存在第一种治疗时施用第二种治疗所看到的,或采用第一种治疗看到类似的情形相比,第二种治疗更有效,例如,使用更少的第二种治疗可看到同等效果,或第二种治疗更大程度地减轻症状。在某些实施方案中,递送使得症状减轻,或与病症有关的其他参数大于在不存在另一种治疗时用一种治疗观察的参数。两种治疗的效果可部分相加,完全相加或大于相加。递送可以使得当递送第二种时递送第一种治疗的效果仍然可检测到。

[0339] 本文所述的表达CAR的细胞和至少一种另外的治疗剂可以在相同的或不同的组合物中,同时施用或顺序施用。对于顺序施用,可以首先施用本文所述表达CAR的细胞,并接着施用另一种作用剂,或者可以颠倒施用顺序。

[0340] 在进一步的方面,本文所述表达CAR的细胞与如下联合用于治疗方案中:外科手术、化疗、放射、免疫抑制剂比如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯(mycophenolate)和FK506、抗体或其它免疫清除剂(immunoablative agent)比如CAMPATH、抗CD3抗体其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和照射。肽疫苗,比如在Izumoto等人2008 J Neurosurg 108:963-971中描述的那些。

[0341] 在一个实施方案中,本文所述表达CAR的细胞可以与化疗剂联合使用。示例性的化疗剂包括蒽环类(例如,多柔比星(例如,脂质体多柔比星))、长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)、烷化剂(例如,苯达莫司汀、环磷酰胺、达可巴嗪、美法仑、异环磷酰胺、替莫唑胺)、免疫细胞抗体(例如,alemtuzamab、吉姆单抗、利妥昔单抗(rituximab)、ofatumumab、托西莫单抗(tositumomab)、brentuximab)、抗代谢药(包括,例如叶酸拮抗药、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如氟达拉滨))、mTOR抑制剂、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A、胶霉毒素或硼替佐米)、免疫调节剂比如沙利度胺或沙利度胺衍生物(例如来那度胺(lenalidomide))及其组合。

[0342] 考虑用于联合疗法的一般化疗剂包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(bicalutamide)(Casodex®)、硫酸博来霉素盐(bleomycin sulfate)(Blenoxane®)、白消安(busulfan)(Myleran®)、白消安注射剂(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脱氧-5-氟胞嘧啶核苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖胞苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(Actinomycin D,Cosmegen)、柔红霉素盐酸盐(Cerubidine®)、柔

红霉素柠檬酸盐脂质体注射剂(DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛(Taxotere®)、多柔比星盐酸盐(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、氟达拉滨磷酸盐(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、tezacitibine、吉西他滨(二氟脱氧胞嘧啶核苷(difluorodeoxycytidine))、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、依立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、phoenix(Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生(polifeprosan) 20与卡莫司汀植入物(Gliadel®)、枸橼酸它莫西芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-硫代鸟嘌呤、塞替派(thiotepa)、替拉扎明(tirapazamine)(Tirazone®)、用于注射的托泊替康盐酸盐(Hycamptin®)、长春碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)。

[0343] 示例性的烷化剂包括但不限于:氮芥(nitrogen mustards)、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯;尿嘧啶氮芥(Aminouracil Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen mustard®、Uracillost®、Uracilmostaza®、Uramustin®、Uramustine®)、氮芥(chlormethine)(Mustargen®)、环磷酰胺(Cytoxan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、异环磷酰胺(Mitoxana®)、美法仑(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(pipobroman)(Amedel®、Vercyte®)、三乙撑三聚氰胺(triethylenemelamine)(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramine)、替莫唑胺(Temodar®)、塞替派(Thioplex®)、白消安(Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(BicNU®)、洛莫司汀(CeeNU®)、链佐星(streptozocin)(Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。另的的示例性的烷化剂包括,不限于奥沙利铂(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和Temodal®);更生霉素(也称为放线菌素-D, Cosmegen®);美法仑(也称为L-PAM、L-溶肉瘤素和苯基丙氨酸氮芥, Alkeran®);六甲蜜胺(也称为六甲蜜胺(HMM)、Hexalen®);卡莫司汀(BicNU®);苯达莫司汀(Bendamustine)(Treanda®);白消安(Busulfex®和Myleran®);卡铂(Paraplatin®);洛莫司汀(也称为CCNU、CeeNU®);顺铂(也称为CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytoxan®and Neosar®);达卡巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺、DTIC-Dome®);六甲蜜胺(也称为六甲蜜胺(HMM)、Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);Prednumustine;丙卡巴肼(Matulane®);氮芥(Mechlorethamine)(也称为氮芥(nitrogen mustard)、氮芥(mustine)和甲氯乙胺(mechloroethamine)盐酸盐、Mustargen®);链佐星(Zanosar®);塞替派(也称为硫代磷酰胺(thiophosphamide)、TESPA和TSPA, Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytosan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®);和苯达莫司汀HC1(Treanda®)及其组合。

[0344] 示例性的mTOR抑制剂包括但不限于RAD001,坦罗莫司;雷达罗莫司(ridaforolimus)(正式称为deferolimus、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧代-11,36--二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]六(三十烷)-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基亚膦酸酯,也称为AP23573和MK8669,且描述在PCT公开号WO 03/064383中);依维莫司(Afinitor®或RAD001);雷帕霉素(AY22989, Sirolimus®);simipimod(CAS 164301-51-3);emsirolimus, (5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502,CAS 1013101-36-4);和N<sup>2</sup>-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉鎓-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸基甘氨酸基-L-α-天冬氨酸基L-丝氨酸-(SEQ ID NO:356),内盐(SF1126,CAS 936487-67-1),XL765及其组合。

[0345] 示例性的免疫调节剂包括但不限于阿夫妥珠单抗(afutuzumab)(得自Roche®);乙二醇化非格司亭(pegfilgrastim)(Neulasta®);来那度胺(lenalidomide)(CC-5013, Revlimid®);沙利度胺(Thalomid®)、actimid(CC4047);和IRX-2(包括白介素1、白介素2和γ干扰素的人细胞因子的混合物,CAS 951209-71-5,得自IRX Therapeutics)及其组合。

[0346] 示例性的蒽环类包括但不限于多柔比星(Adriamycin®和Rubex®);博来霉素(lenoxane®);柔红霉素(daunorubicin)(柔红霉素盐酸盐、道诺霉素和红比霉素(rubidomycin)盐酸盐 Cerubidine®);柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体, DaunoXome®);米托蒽醌(DHAD, Novantrone®);表柔比星(Ellence™);伊达比星(Idamycin®, Idamycin PFS®);丝裂霉素C(Mutamycin®);格尔德霉素(geldanamycin);除莠霉素(herbimycin);ravidomycin和desacetylravidomycin及其组合。

[0347] 示例性的长春花生物碱包括但不限于长春瑞滨酒石酸盐(Navelbine®)、长春新碱(Oncovin®)和长春地辛(Eldisine®);长春碱(也称为硫酸长春碱、长春花碱和VLB、Alkaban-AQ®和Velban®);和长春瑞滨(Navelbine®)及其组合。

[0348] 示例性的蛋白体抑制剂包括但不限于硼替佐米(bortezomib)(Velcade®);卡非佐米(carfilzomib)(PX-171-007, (S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-吗琳子基乙酰氨基)-4-苯基丁酰氨基)-戊酰胺);marizomib(NPI-0052);ixazomib柠檬酸盐(MLN-9708);delanzomib(CEP-18770);和0-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酸-0-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酸酰胺(ONX-0912)及其组合。

[0349] 示例性的GITR激动剂包括但不限于GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如,二价抗GITR抗体),如例如美国专利号:6,111,090、欧洲专利号:090505B1、美国专利号:8,586,023、PCT公开号:WO 2010/003118和2011/090754中描述的GITR融合蛋白,或例如在美国专利号:7,025,962、欧洲专利号:1947183B1、美国专利号:7,812,135、美国专利号:8,388,967、美国专利号:8,591,886、欧洲专利号:EP 1866339、PCT公开号:WO 2011/028683、PCT公

开号:WO 2013/039954、PCT公开号:WO2005/007190、PCT公开号:WO 2007/133822、PCT公开号:WO2005/055808、PCT公开号:WO 99/40196、PCT公开号:WO 2001/03720、PCT公开号:WO99/20758、PCT公开号:WO2006/083289、PCT公开号:WO 2005/115451、美国专利号:7,618,632和PCT公开号:WO 2011/051726中所述的抗GITR抗体。

[0350] 在一个实施方案中,将本文所述的CAR表达细胞(诸如例如CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞),例如CTL019)与mTOR抑制剂(例如本文所述的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素信号传导途径的靶标,如RAD001)联合,施用于受试者,例如被鉴定为部分应答者或非应答者。在一个实施方案中,mTOR抑制剂在CAR表达细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,mTOR抑制剂可以在细胞成分分离术之前施用。在一个实施方案中,受试者患有癌症(例如,血液学癌症如ALL和CLL)。在一个实施方案中,受试者具有ALL。在一个实施方案中,受试者具有CLL。

[0351] 在一个实施方案中,将本文描述的CAR表达细胞(诸如例如CD19 CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞),例如CTL019)与GITR激动剂例如本文所述的GITR激动剂联合,施用于受试者,例如鉴定为部分应答者或非应答者。在一个实施方案中,GITR激动剂在CAR表达细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,GITR激动剂可以在细胞成分分离之前施用。在一个实施方案中,受试者患有癌症(例如,血液学癌症如ALL和CLL)。在一个实施方案中,受试者具有ALL。在一个实施方案中,受试者具有CLL。

#### [0352] 激酶抑制剂

[0353] 在一个实施方案中,本文所述的CAR表达细胞可以与激酶抑制剂例如,CDK4抑制剂、BTK抑制剂、MNK抑制剂、mTOR抑制剂、ITK抑制剂等联合用于治疗方案。在一个实施方案中,受试者是完全应答者,并且向受试者施用治疗方案,其包括例如以本文描述的剂量或给药方案,联合激酶抑制剂(例如本文所述的激酶抑制剂)施用本文所述的CAR表达细胞。在一个实施方案中,受试者是部分应答者或非应答者,并且向受试者施用治疗方案,所述治疗方案包括例如以本文所述的剂量或给药方案,施用本文所述的CAR表达细胞与激酶抑制剂(例如本文所述的激酶抑制剂)。

[0354] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂,例如,本文所述的CDK4抑制剂,例如,CDK4/6抑制剂,诸如,例如,6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮,盐酸盐(也称为帕博西尼或PD0332991)。在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如,本文中所描述的BTK抑制剂,如,例如,依鲁替尼。在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如,本文中所描述的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素,雷帕霉素类似物,OSI-027。mTOR抑制剂可以是,例如,mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂,例如,本文所述的mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂是MNK抑制剂,例如,本文所述的MNK抑制剂,诸如,例如,4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡啶子基[3,4-d]嘧啶。该MNK抑制剂可以是,例如,MNK1a,MNK1b,MNK2a和/或MNK2b抑制剂。

[0355] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂,其选自aloesine A,黄酮吡多或HMR-1275,2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基-4-哌啶基]-4-色酮; crizotinib(PF-02341066);2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟甲基)-1-甲基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃-4-酮盐酸盐(P276-00);1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧基]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺(RAF265);吲地

磺胺 (E7070); roscovitine (CYC202); 帕博西尼 (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[[(5-叔丁基噁唑-2-基)甲基]硫代]噁唑-2-基]哌啶-4-甲酰胺 (BMS 387032); 4-[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并氮杂-2-基]氨基]-苯甲酸 (MLN8054); 5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡唑-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲胺 (AG-024322); 4-(2,6-二氯苯甲酰氨基)-1H-吡唑-3-羧酸N-(哌啶-4-基)酰胺 (AT7519); 4-[2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基]-N-[4-(甲磺酰基)苯基]-2-嘧啶胺 (AZD5438); 和 XL281 (BMS908662)。

[0356] 在一个实施方案中, 激酶抑制剂是CDK4抑制剂, 例如, 帕博西尼 (PD0332991), 并且帕博西尼以每日约50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg (例如, 75mg、100mg或125mg) 的剂量施用一段时间, 例如, 在28天周期的14-21天每天施用, 或在21天周期的7-12天每天施用。在一个实施方案中, 施用帕博西尼的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期。

[0357] 在一个实施方案中, 激酶抑制剂是选自依鲁替尼 (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; 和 LFM-A13 的 BTK 抑制剂。

[0358] 在一个实施方案中, 所述激酶抑制剂是 BTK 抑制剂, 例如, 依鲁替尼 (PCI-32765), 并且依鲁替尼以约250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg (例如, 250mg、420mg或560mg) 的日剂量施用一段时间, 例如, 21天周期的每天, 或28天周期的每天。在一个实施方案中, 施用依鲁替尼的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期。

[0359] 在一个实施方案中, 激酶抑制剂是选自坦罗莫司; ridaforolimus (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2-[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1, 18-二羟基-19, 30-二甲氧基-15, 17, 21, 23, 29, 35-六甲基-2, 3, 10, 14, 20-五氧代-11, 36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]三十六-16, 24, 26, 28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环丙基二甲基磷, 也称为 AP23573 和 MK8669; 依维莫司 (RAD001); 雷帕霉素 (AY22989); simapimod; (5-{2, 4-二[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2, 3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基) 甲醇 (AZD8055); 2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2, 3-d]嘧啶-7(8H)-酮 (PF04691502); 和 N<sup>2</sup>-[1, 4-二氧化-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸-L-丝氨酸- (SEQ ID NO: 356), 内盐 (SF1126); 和 XL765 的 mTOR 抑制剂。

[0360] 在一个实施方案中, 所述激酶抑制剂是 mTOR 抑制剂, 例如雷帕霉素, 并且雷帕霉素以每日约3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg (例如6mg) 的剂量施用一段时间, 例如, 21天周期的每天, 或28天周期的每天。在一个实施方案中, 施用雷帕霉素的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期。在一个实施方案中, 激酶抑制剂是 mTOR 抑制剂, 例如, 依维莫司并且依维莫司以约2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg (例如10mg) 的日剂量施用一段时间, 例如, 28天周期每天。在一个实施方案中, 施用依维莫司的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期。

[0361] 在一个实施方案中, 激酶抑制剂是 MNK 抑制剂, 其选自 CGP052088; 4-氨基-3-(对氟苯基氨基)-吡唑并[3, 4-d]嘧啶 (CGP57380); cercosporamide; ETC-1780445-2; 和 4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡唑并[3, 4-d]嘧啶。

[0362] 与低剂量的mTOR抑制剂组合

[0363] 本文所述的方法使用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂,例如,变构性mTOR抑制剂,包含雷帕霉素类似物如RAD001。施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,该剂量不足以完全抑制免疫系统,但足以改善免疫功能)可以优化受试者中免疫效应细胞(例如,T细胞或表达CAR的细胞)的性能。2014年11月13日申请的美国专利申请号2015/01240036中描述了用于测量mTOR抑制作用的方法、剂量、治疗方案和合适的药物组合物,所述文献因而通过引用的方式并入。

[0364] 在一个实施方案中,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以导致以下一个或多个结果:

[0365] i) PD1阳性免疫效应细胞数目减少;

[0366] ii) PD1阴性免疫效应细胞数目增加;

[0367] iii) PD1阴性免疫效应细胞/PD1阳性免疫效应细胞的比率增加;

[0368] iv) 幼稚T细胞数目增加;

[0369] v) 以下一种或多种标志物的表达增加:CD62L<sup>高</sup>、CD127<sup>高</sup>、CD27<sup>+</sup>和BCL2,例如,在记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上的CD62L<sup>高</sup>、CD127<sup>高</sup>、CD27<sup>+</sup>和BCL2;

[0370] vi) 记忆T细胞(例如,记忆T细胞前体)上KLRG1的表达减少;或

[0371] vii) 记忆T细胞前体的数目增加,所述记忆T细胞前体例如是具有以下特征的任一个或其组合的细胞:CD62L<sup>高</sup>增加、CD127<sup>高</sup>增加、CD27<sup>+</sup>增加、KLRG1减少和BCL2增加;

[0372] 并且其中例如,如与未治疗的受试者相比,前述任一项例如i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)或vii)的情形出现,例如,至少暂时出现。

[0373] 在另一个实施方案中,例如,如与未处理的表达CAR的细胞或未治疗的受试者相比,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂导致(例如,在培养物中或在受试者中)表达CAR的细胞的增殖增加或延长。在实施方案中,增加的增殖与表达CAR的细胞的数目增加相关。在另一个实施方案中,例如,如与未处理的表达CAR的细胞或未治疗的受试者相比,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂导致(例如,在培养物中或在受试者中)表达CAR的细胞增加癌细胞杀伤作用。在实施方案中,增加的癌细胞杀伤作用与肿瘤体积缩减相关。

[0374] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如,本文所述的CAR分子)的细胞与免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,变构性mTOR抑制剂,例如,RAD001或催化性mTOR抑制剂)联合施用。例如,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以在施用本文所述的表达CAR的细胞之前启动;在施用本文所述的表达CAR的细胞之前完成;与施用本文所述的表达CAR的细胞同时启动;与施用本文所述的表达CAR的细胞重叠;或在施用本文所述的表达CAR的细胞后继续。

[0375] 备选地或额外地,施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂可以优化待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞。在这类实施方案中,从受试者收获待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞)之前,启动或完成了免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂(例如,变构抑制剂(例如,RAD001)或催化性抑制剂)的施用。

[0376] 在另一个实施方案中,待工程化以表达本文所述的CAR分子的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),例如,从受试者收获后,或表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞或NK细胞),例如,在施用至受试者之前,可以在存在免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂时培养。

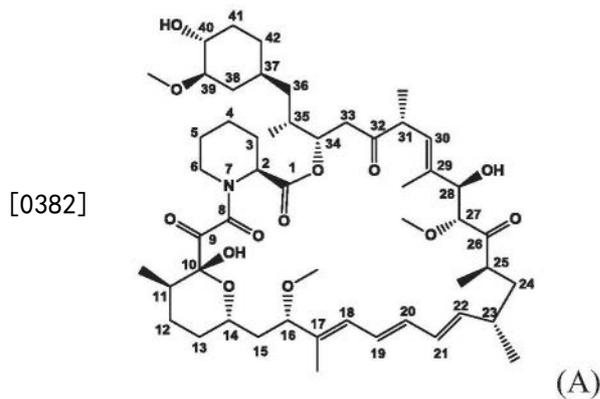
[0377] 在一个实施方案中,向受试者施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂包括例如每周一次,例如,在速释剂型中施用0.1至20、0.5至10、2.5至7.5、3至6或约5mg RAD001,或其生物等效剂量。在一个实施方案中,向受试者施用免疫增强性低剂量的mTOR抑制剂包括例如每周一次,例如,在缓释剂型中施用0.3至60、1.5至30、7.5至22.5、9至18或约15mg RAD001,或其生物等效剂量。

[0378] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与至少5%但是不多于90%、至少10%但是不多于90%、至少15%但是不多于90%、至少20%但是不多于90%、至少30%但是不多于90%、至少40%但是不多于90%、至少50%但是不多于90%、至少60%但是不多于90%、至少70%但是不多于90%、至少5%但是不多于80%、至少10%但是不多于80%、至少15%但是不多于80%、至少20%但是不多于80%、至少30%但是不多于80%、至少40%但是不多于80%、至少50%但是不多于80%、至少60%但是不多于80%、至少5%但是不多于70%、至少10%但是不多于70%、至少15%但是不多于70%、至少20%但是不多于70%、至少30%但是不多于70%、至少40%但是不多于70%、至少50%但是不多于70%、至少5%但是不多于60%、至少10%但是不多于60%、至少15%但是不多于60%、至少20%但是不多于60%、至少30%但是不多于60%、至少40%但是不多于60%、至少5%但是不多于50%、至少10%但是不多于50%、至少15%但是不多于50%、至少20%但是不多于50%、至少30%但是不多于50%、至少40%但是不多于50%、至少5%但是不多于40%、至少10%但是不多于40%、至少15%但是不多于40%、至少20%但是不多于40%、至少30%但是不多于40%、至少35%但是不多于40%、至少5%但是不多于30%、至少10%但是不多于30%、至少15%但是不多于30%、至少20%但是不多于30%、或至少25%但是不多于30%的mTOR抑制作用相关或提供这种mTOR抑制作用。

[0379] mTOR抑制作用的程度可以表述为或对应于P70 S6激酶抑制作用的程度,例如,mTOR抑制作用的程度可以通过P70 S6激酶活性下降的水平(例如,通过P70 S6激酶底物的磷酸化下降)来确定。可以通过多种方法评价mTOR抑制作用的水平,如通过Boulay测定法测量P70 S6激酶活性,如美国专利申请号2015/01240036中描述,所述文献因而通过引用的方式并入,或如美国专利号7,727,950中描述,所述文献因而通过引用的方式并入;通过蛋白质印迹法测量磷酸化S6的水平;或评价PD1阴性免疫效应细胞对PD1阳性免疫效应细胞比率的变化。

[0380] 如本文所用,术语“mTOR抑制剂”指在细胞中抑制mTOR激酶的化合物或配体、或其可药用盐。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构抑制剂。变构性mTOR抑制剂包括中性三环状化合物雷帕霉素(西罗莫司(sirolimus))、雷帕霉素相关化合物,所述雷帕霉素相关化合物是与雷帕霉素具有结构和功能相似性的化合物,例如包括雷帕霉素衍生物、雷帕霉素类似物(也称作雷帕类似物)和抑制mTOR活性的其他大环内酯类化合物。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化性抑制剂。

[0381] 雷帕霉素是吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的已知大环内酯类抗生素,其具有式A中所示的结构。



[0383] 参见例如McAlpine, J.B. 等人, *J. Antibiotics* (1991) 44:688; Schreiber, S.L 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113:7433; 美国专利号3,929,992。存在针对雷帕霉素提出的多种编号方案。为避免混淆,当本文中命名特定雷帕霉素类似物时,参考使用式A编号方案的雷帕霉素给出名称。

[0384] 可用于本发明中的雷帕霉素类似物例如是O-取代的类似物,其中雷帕霉素的环己基环上的羟基由其中R<sub>1</sub>是羟烷基、羟烷氧基烷基、酰氨基烷基或氨基烷基的OR<sub>1</sub>替换;例如,如US 5,665,772和WO 94/09010中所述的RAD001,也称作依维莫司,所述每篇文献的内容通过引用的方式并入。其他合适的雷帕霉素类似物包括在26-或28-位置处取代的那些。雷帕霉素类似物可以是上文提到的类似物的差向异构体,特别地,在位置40、28或26取代的类似物的差向异构体,并且可以任选地进一步氢化,例如,如US6,015,815、WO 95/14023和WO 99/15530中所述,所述文献的内容通过引用的方式并入,例如ABT578,也称作佐他莫司或在US 7,091,213、WO 98/02441和WO 01/14387中描述的雷帕霉素类似物,所述文献的内容通过引用的方式并入,例如,AP23573,也称作地磷莫司。

[0385] 来自US 5,665,772的适用于本发明中的雷帕霉素类似物的实例包括但不限于40-O-苄基-雷帕霉素、40-O-(4'-羟甲基)苄基-雷帕霉素、40-O-[4'-(1,2-二羟乙基)]苄基-雷帕霉素、40-O-烯丙基-雷帕霉素、40-O-[3'-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4(S)-基)-丙-2'-烯-1'-基]-雷帕霉素、(2'E,4'S)-40-O-(4',5'-二羟戊-2'-烯-1'-基)-雷帕霉素、40-O-(2-羟)乙氧羰基甲基-雷帕霉素、40-O-(2-羟)乙基-雷帕霉素、40-O-(3-羟)丙基-雷帕霉素、40-O-(6-羟)己基-雷帕霉素、40-O-[2-(2-羟)乙氧基]乙基-雷帕霉素、40-O-[(3S)-2,2-二甲基二氧戊环-3-基]甲基-雷帕霉素、40-O-[(2S)-2,3-二羟丙-1-基]-雷帕霉素、40-O-(2-乙酰氧)乙基-雷帕霉素、40-O-(2-尼克酰基氧)乙基-雷帕霉素、40-O-[2-(N-吗啉代)乙酰氧]乙基-雷帕霉素、40-O-(2-N-咪唑基乙酰氧)乙基-雷帕霉素、40-O-[2-(N-甲基-N'-哌嗪基)乙酰氧]乙基-雷帕霉素、39-O-去甲基-39,40-O,0-亚乙基-雷帕霉素、(26R)-26-二氢-40-O-(2-羟)乙基-雷帕霉素、40-O-(2-氨基乙基)-雷帕霉素、40-O-(2-乙酰氨基乙基)-雷帕霉素、40-O-(2-尼克酰胺基乙基)氨基甲酸-雷帕霉素、40-O-(2-(N-甲基咪唑-2'-基)乙氧羰基酰胺基)乙基-雷帕霉素、40-O-(2-乙氧羰基氨基乙基)-雷帕霉素、40-O-(2-甲基苯基亚磺酰氨基乙基)-雷帕霉素和40-O-[2-(4',5'-二羰乙氧基-1',2',3'-三唑-1'-基)-乙基]-雷帕霉素。

[0386] 可用于本发明中的其他雷帕霉素类似物是这些类似物,其中雷帕霉素的环己基环上的羟基和/或在28位置处的羟基替换为羟基酯基团,例如,US RE44,768中存在的雷帕霉

素类似物,例如坦罗莫司。

[0387] 可用于前述发明中的其他雷帕霉素类似物包括那些类似物,其中在16位置处的甲氧基替换为另一个取代基,优选地(任选地羟基取代的)炔氧基、苄基、邻甲氧苄基或氯苄基和/或其中删除在39位置处的甲氧基连同39碳,从而雷帕霉素的环己基环变成缺少39位置甲氧基的环戊基环;例如,如W0 95/16691和W0 96/41807中所述,所述文献的内容通过引用的方式并入。可以进一步修饰类似物,从而在雷帕霉素的40位置处的羟基被烷基化和/或32-羰基被还原。

[0388] 来自W0 95/16691的雷帕霉素类似物包括但不限于16-去甲氧基-16-(戊-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(丁-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(炔丙基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-(4-羟-丁-2-炔基)氧-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-苄氧基-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-苄氧基-雷帕霉素、16-去甲氧基-16-邻-甲氧苄基-雷帕霉素、16-去甲氧基-40-0-(2-甲氧乙基)-16-戊-2-炔基)氧-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-甲酰基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-羟甲基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-羧基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-(4-甲基-哌嗪-1-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-(吗啉-4-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素、39-去甲氧基-40-去氧-39-[N-甲基,N-(2-吡啶-2-基-乙基)]氨甲酰基-42-去甲-雷帕霉素和39-去甲氧基-40-去氧-39-(对甲苯磺酰脲甲基)-42-去甲-雷帕霉素。

[0389] 来自W0 96/41807的雷帕霉素类似物包括但不限于32-去氧-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-去氧-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-去氧-40-0-(2-羟-乙基)-雷帕霉素、16-0-戊-2-炔基-32-(S)-二氢-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、32(S)-二氢-40-0-(2-甲氧基)乙基-雷帕霉素和32(S)-二氢-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素。

[0390] 另一个合适的雷帕霉素类似物是如US2005/0101624中所述的啞他莫司,所述文献的内容通过引用的方式并入。

[0391] RAD001,另外称作依维莫司(**Afinitor®**),具有化学名称(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-二羟-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟乙氧基)-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基}-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂-三环并[30.3.1.04,9]三十七碳-16,24,26,28-四烯-2,3,10,14,20-五酮。

[0392] 变构性mTOR抑制剂的其他实例包括西罗莫司(sirrolimus)(雷帕霉素、AY-22989)、40-[3-羟-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸酯]-雷帕霉素(也称作坦罗莫司或CCI-779)和地磷莫司(AP-23573/MK-8669)。变构性mTOR抑制剂的其他实例包括佐他莫司(ABT578)和啞他莫司。

[0393] 备选地或额外地,已经发现ATP竞争性催化性mTOR抑制剂直接靶向mTOR激酶结构域并靶向mTORC1和mTORC2-二者。也有比这类变构性mTOR抑制剂如雷帕霉素更有效的mTORC1抑制剂,因为它们调节雷帕霉素耐药性mTORC1输出,如4EBP1-T37/46磷酸化和帽依赖性翻译。

[0394] 催化性抑制剂包括:BEZ235或2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基-2,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-苯基]-丙腈或单甲苯磺酸盐形式(BEZ235的合成在W0 2006/122806中描述;CCG168(另外称作AZD-8055,Chresta,C.M.等人,Cancer Res,2010,70

(1), 288-298); 其具有化学名称 {5-[2,4-双-((S)-3-甲基-吗啉-4-基)-吡啶并[2,3d]嘧啶-7-基]-2-甲氧基-苯基}-甲醇; 3-[2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N-甲基苯甲酰胺 (WO 09104019); 3-(2-氨基苯并[d]咪唑-5-基)-1-异丙基-1H-吡唑[3,4-d]嘧啶-4-胺 (WO 10051043和WO 2013023184); A N-(3-(N-(3-((3,5-二甲氧苯基)氨基)喹啉-2-基)氨磺酰)苯基)-3-甲氧基-4-甲基苯甲酰胺 (WO 07044729和WO 12006552); PKI-587 (Venkatesan, A.M., J. Med. Chem., 2010, 53, 2636-2645), 其具有化学名称 1-[4-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-羰基]苯基]-3-[4-(4,6-二吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), 其具有化学名称 2,4-二氟-N-{2-甲氧基-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺; 5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺 (WO 10114484); 和 (E)-N-(8-(6-氨基-5-(三氟甲基)吡啶-3-基)-1-(6-(2-氰丙-2-基)吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-亚基)单氰胺 (WO 12007926)。

[0395] 催化性mTOR抑制剂的其他实例包括8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮 (WO 2006/122806) 和 Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM 等人, Biochem J., 2009, 421(1), 29-42)。Ku-0063794 是雷帕霉素的哺乳动物靶 (mTOR) 的特异性抑制剂。WYE-354 是催化性mTOR抑制剂的另一个实例 (Yu K 等人, (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15):6232-6240)。

[0396] 根据本发明可用的mTOR抑制剂还包括前述任一者的前药、衍生物、可药用盐或其类似物。

[0397] 可以配制mTOR抑制剂, 如RAD001, 以基于本文所述的特定剂量, 基于本领域充分建立的方法递送。特别地, 美国专利号6,004,973 (通过引用的方式并入本文) 提供了随本文所述的mTOR抑制剂可用的制剂的实例。

[0398] 进一步的联合治疗可以包括抗过敏剂、镇吐药、镇痛药、辅助疗法,

[0399] 一些患者可在施用期间或之后对本文所述的治疗和/或其他抗癌药出现过敏反应; 因此, 经常施用抗过敏药以使过敏反应的风险最小化。合适的抗过敏药包括皮质类固醇类, 如地塞米松 (例如, Decadron®)、倍氯米松 (例如, Beclovent®)、氢化可的松 (也称作可的松、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松磷酸钠, 并且以商品名称Ala-Cort®, 磷酸氢化可的松, Solu-Cortef®; Hydrocort Acetate® 和 Lanacort® 出售)、泼尼松龙 (prednisolone) (以商品名称Delta-Cortel®, Orapred®, Pediapred® 和 Prelone® 出售)、泼尼松 (以商品名称Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® 和 Orasone® 出售)、甲基泼尼松龙 (也称作6-甲基泼尼松龙、醋酸甲泼尼龙、甲泼尼龙琥珀酸钠, 以商品名称

Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® 和 Solu-Medrol® 出售); 抗组胺药, 如苯海拉明 (例如, Benadryl®)、安泰乐和赛庚啶; 及支气管扩张药, 如β-肾上腺素能药受体激动剂、沙丁胺醇 (albuterol) (例如, Proventil®) 以及特布他林 (Brethine®)。

[0400] 一些患者可在施用本文所述的治疗和/或其他抗癌药期间和之后出现恶心; 因此,

使用镇吐药防止恶心(反胃)和呕吐。合适的镇吐药包括阿瑞吡坦(Emend®)、昂丹司琼(Zofran®)、HCl 格拉司琼(Kytril®)、劳拉西泮(Ativan®)、地塞米松(Decadron®)、乙二磺酸(Compazine®)、卡索匹坦(Rezonic®和Zunrisa®)及其组合。

[0401] 在治疗阶段期间,经常开具减轻疼痛体验的药物以令患者更舒适。经常使用常见的非处方镇痛药,如Tylenol®。然而,阿片类镇痛药物如氢可酮/扑热息痛(paracetamol)或氢可酮/对乙酰氨基酚(例如, Vicodin®)、吗啡(例如, Astramorph®或Avinza®)、羟考酮(例如, OxyContin®或Percocet®)、盐酸羟吗啡酮(Opana®)和芬太尼(例如, Duragesic®)也可用于中度或重度疼痛。

[0402] 为了努力保护正常细胞免受治疗毒性并限制器官毒性,细胞保护药(如神经保护药,自由基清除剂,心脏保护剂(cardioprotectors), 葱环类溢出中和剂,营养剂等)可以作为辅助疗法使用。合适的细胞保护药包括氨磷汀(Ethyol®)、谷氨酰胺、地美司钠(dimesna)(Tavocept®)、美司钠(mesna)(Mesnex®)、右雷佐生(Zincard®或Totect®)、扎利罗登(Xapрила®)和亚叶酸(leucovorin)(也称作钙亚叶酸(leucovorin)、嗜橙菌因子和亚叶酸)。

[0403] 通过代码、通用名或商标标识的活性化合物的结构可以取自标准概要“默克索引”实际版或取自数据库,例如国际专利(例如IMS World Publications)。

[0404] 可以与本发明化合物联合使用的上文提到的化合物可以如本领域(如上文援引的文件中)所述那样制备并作施用。

[0405] 在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的至少一种化合物(例如,本发明化合物)或其可药用盐连同适于单独或与其他抗癌药一起施用至人类或动物受试者的可药用载体的药物组合物。

[0406] 在一个实施方案中,本发明提供治疗患有细胞增生性疾病,如癌症的人类或动物受试者的方法。本发明提供治疗需要这种治疗的人或动物受试者的方法,所述方法包括向受试者单独或与其他抗癌药一起施用治疗有效量的本发明的化合物(例如,本发明化合物)或其可药用盐。

[0407] 特别地,各组合物将作为联合疗法配制在一起施用或分别地施用。

[0408] 在联合疗法中,本发明的化合物和其他抗癌药可以同时、同步或无特定时间限制下依次施用,其中这类施用在患者身体内提供治疗有效水平的两种化合物。

[0409] 在一个优选的实施方案中,本发明的化合物和其他抗癌药通常以任何顺序通过输注或口服依次施用。给药方案可以取决于疾病阶段、患者的身体健康状况、各个药物的安全特征和各个药物的耐受性以及施用该组合的主治医生和医疗执业者熟知的其他标准而不同。本发明的化合物和其他抗癌药可以彼此间隔数分钟、数小时、数天或甚至数周施用,这取决于正在用于治疗的特定周期。此外,该周期可能包括在治疗周期期间将一种药物比另一种更经常地施用及每次施用药物时以不同剂量施用。

[0410] 在本发明的另一个方面,提供试剂盒,所述试剂盒包括本发明的一种或多种化合物和如本文中公开的组合配偶体。代表性试剂盒包括(a)本发明的化合物或其可药用盐,(b)至少一种组合配偶体,例如,如上文所示,因而这类试剂盒可以包含包装插页或其他标示,包括施用说明。

[0411] 本发明的化合物也可以与已知的治疗方法组合用来例如有助于施用激素或尤其放疗。本发明的化合物尤其可以作为放射增敏剂使用,特别用于治疗对放疗法显示低劣敏感性的肿瘤。

[0412] 免疫效应细胞的制造及制备免疫效应细胞的方法

[0413] 本文提供了制备可以用CAR(例如本文所述的CAR)进行工程化的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的方法,以及包含此类细胞的反应混合物和组合物。

[0414] 在一个方面,本公开的特征在于工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞),其中工程化的免疫效应细胞表现出抗肿瘤特性。优选的抗原是本文所述的癌症相关抗原(即肿瘤抗原)。在一个方面,用CAR转化细胞,并且在细胞表面上表达CAR。在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞、NK细胞)用编码CAR的病毒载体转导。在一些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在一些这样的实施方案中,细胞可以稳定地表达CAR。在另一个实施方案中,用编码CAR的核酸例如mRNA,cDNA,DNA转染细胞(例如,T细胞、NK细胞)。在一些这样的实施方案中,细胞可以瞬时表达CAR。

[0415] 此外,本发明提供CART组合物及其在用于治疗涉及表达本文所述的肿瘤抗原的细胞或组织的癌症或任何恶性肿瘤或自身免疫性疾病等疾病的药物或方法中的用途。

[0416] 在一个方面,本发明的CAR可用于根除表达本文所述的肿瘤抗原的正常细胞,从而可应用于用作细胞移植前的细胞调理疗法。

[0417] 免疫效应细胞的来源

[0418] 在实施方案中,在扩增和遗传修饰或其它修饰之前,可以从受试者获取(例如获得)细胞来源,例如T细胞或天然杀伤(NK)细胞,例如T细胞或NK细胞的群体。术语“受试者”旨在包括可以引发免疫反应的活生物体(例如哺乳动物)。受试者的实例包括人、猴、黑猩猩、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。

[0419] 在一些实施方案中,细胞群体(例如收获的细胞群体)包含例如处于不同分化阶段的T细胞或T细胞群体。T细胞分化阶段从最少到最多分化包括幼稚T细胞、干中央记忆T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞和末端效应T细胞。抗原暴露后,幼稚T细胞增殖并分化成记忆T细胞,例如干中央记忆T细胞和中央记忆T细胞,然后分化成效应记忆T细胞。记忆T细胞在接受适当的T细胞受体、共刺激和炎症信号后,进一步分化成末端效应T细胞。参见例如Restifo.Blood.124.4(2014):476-77;和Joshi等人,J.Immunol.180.3(2008):1309-15。

[0420] 幼稚T细胞( $T_N$ )由以下细胞表面标志物的表达模式表征:CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95-。干细胞中央记忆T细胞( $T_{SCM}$ )的特征在于以下细胞表面标志物的表达模式:CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95+。中央记忆T细胞( $T_{CM}$ )的特征在于细胞表面标志物的以下表达模式:CCR7+、CD62L+、CD45RO+、CD95+。效应记忆T细胞( $T_{EM}$ )的特征在于以下细胞表面标志物的表达模式:CCR7-、CD62L-、CD45RO+、CD95+。末端效应T细胞( $T_{Eff}$ )的特征在于细胞表面标志物的以下表达模式:CCR7-、CD62L-、CD45RO-、CD95+。参见例如Gattinoni等人,Nat.Med.17(2011):1290-7;和Flynn等人,Clin.Translat.Immunol.3(2014):e20。

[0421] 在本公开的某些方面,可以使用技术人员已知的任何数量的技术,例如Ficoll™分离,从受试者收集的血液单位获得免疫效应细胞例如T细胞。在一个优选的方面,通过单采

血液成分术获得来自个体的循环血液的细胞。单采血液成分术制品通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个方面,可以洗涤通过单采血液成分术采集收集的细胞以除去血浆级分,并且任选地将细胞置于合适的缓冲液或培养基中以用于随后的加工步骤。在一个实施方案中,用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一个备选的实施方案中,洗涤溶液缺乏钙并且可能缺少镁,或者可能缺少许多(如果不是全部)二价阳离子。

[0422] 在不存在钙的情况下的初始活化步骤可导致放大的活化。如本领域普通技术人员将容易理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来实现,例如通过使用半自动化的“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)根据生产商的说明书进行。洗涤后,细胞可以重新悬浮在各种生物相容的缓冲液中,例如无Ca,无Mg的PBS,PlasmaLyte A或其他含或不含缓冲剂的盐溶液。备选地,可以除去单采血液成分术样品的不期望的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0423] 认识到本申请的方法可以利用包含5%或更少,例如2%人AB血清的培养基条件,并且使用已知的培养基条件和组合物,例如Smith等人,“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement”*Clinical&Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31中描述的那些培养基条件和组合物。

[0424] 在一个方面,通过裂解红细胞并消耗单核细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析从外周血淋巴细胞中分离T细胞。

[0425] 本文描述的方法可以包括例如使用例如本文所描述的负选择技术来选择免疫效应细胞的特定亚群,例如作为T调节细胞消耗的群体的T细胞,即CD25+消耗的细胞。优选地,T调节性消耗细胞的群体含有少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0426] 在一个实施方案中,使用抗CD25抗体或其片段,或CD25结合配体,例如IL-2,从群体中除去T调节细胞,例如CD25+T细胞。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体与基质(例如珠)缀合,或者另外包被在基质(例如珠)上。在一个实施方案中,抗CD25抗体或其片段与本文所述的基质缀合。

[0427] 在一个实施方案中,使用来自Miltenyi™的CD25消耗试剂从群体中除去T调节细胞,例如CD25+T细胞。在一个实施方案中,细胞与CD25消耗试剂的比例为1e7细胞对20uL,或1e7细胞对15μL,或1e7细胞对10uL,或1e7细胞对5uL,或1e7细胞对2.5uL,或1e7细胞对1.25uL。在一个实施方案中,例如对于T调节细胞,例如CD25+消耗,使用大于5亿个细胞/ml。另在一个方面,使用6、7、8或9亿个细胞/ml的细胞浓度。

[0428] 在一个实施方案中,要消耗的免疫效应细胞群体包括约 $6 \times 10^9$ 个CD25+T细胞。在其他方面,要消耗的免疫效应细胞群体包括约 $1 \times 10^9$ 至 $1 \times 10^{10}$ 个CD25+T细胞,以及其间的任何整数值。在一个实施方案中,所产生的T调节性消耗细胞群体具有 $2 \times 10^9$ 个T调节细胞,例如CD25+细胞或更少(例如, $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$ 或更少的CD25+细胞)。

[0429] 在一个实施方案中,使用具有消耗管设置(例如管道162-01)的CliniMAC系统从群体中除去T调节细胞,例如CD25+细胞。在一个实施方案中,CliniMAC系统在诸如例如DEPLETION2.1的消耗设置上运行。

[0430] 不希望被特定理论束缚,在单采血液成分术前或在制备表达CAR的细胞产物的过程中降低免疫细胞的负调节物的水平(例如,减少不需要的免疫细胞,例如 $T_{REG}$ 细胞的数量),显著降低受试者复发的风险。例如,消耗 $T_{REG}$ 细胞的方法是本领域已知的。降低 $T_{REG}$ 细胞的方法包括但不限于环磷酰胺,抗GITR抗体(本文所述的抗GITR抗体),CD25消耗及其组合。

[0431] 在一些实施方案中,制备方法包括在制备表达CAR的细胞之前减少(例如,消耗) $T_{REG}$ 细胞的数目。例如,制造方法包括将样品(例如,单采血液成分术样品)与抗GITR抗体和/或抗CD25抗体(或其片段,或CD25结合配体)接触,例如以在制备CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)产物前消耗 $T_{REG}$ 细胞。

[0432] 在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,用一种或多种减少 $T_{REG}$ 细胞的疗法对受试者进行预处理,从而降低受试者对CAR表达细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,减少 $T_{REG}$ 细胞的方法包括但不限于向受试者施用环磷酰胺,抗GITR抗体,CD25消耗或其组合中的一种或多种。施用环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25消耗或其组合中的一种或多种可以在表达CAR的细胞产物的输注之前、期间或之后发生。

[0433] 在一个实施方案中,在收集用于CAR表达细胞产物制造的细胞之前,将受试者用环磷酰胺预处理,从而降低受试者对CAR表达细胞治疗复发的风险。在一个实施方案中,在收集用于表达CAR的细胞产物制造的细胞之前,用抗GITR抗体预处理受试者,从而降低受试者对CAR表达细胞治疗复发的风险。

[0434] 在一个实施方案中,要除去的细胞群体既不是调节性T细胞也不是肿瘤细胞,而是以其他方式负面影响CART细胞的扩增和/或功能的细胞,例如,表达CD14、CD11b、CD33、CD15或潜在免疫抑制细胞表达的其他标志物的细胞。在一个实施方案中,可以设想此类细胞与调节性T细胞和/或肿瘤细胞同时去除,或者在所述消耗后去除,或者以另一顺序去除。

[0435] 在一个实施方案中,改变CAR表达细胞(例如,T细胞、NK细胞)制备方法以在制备表达CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)产物(例如CTL019产物)之前消耗 $T_{REG}$ 细胞。在一个实施方案中,在制备表达CAR的细胞(例如,T细胞、NK细胞)产物(例如CTL019产物)之前,使用CD25消耗来消耗 $T_{REG}$ 细胞。

[0436] 本文描述的方法可以包括多于一个选择步骤,例如多于一个消耗步骤。可以通过负选择来富集T细胞群体,例如,使用针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体的组合。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行的细胞分选和/或选择,其使用针对存在于负选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过负选择来富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物可以包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0437] 本文所述的方法还可以包括从表达肿瘤抗原的群体,例如,不包含CD25,例如CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14或CD11b的肿瘤抗原的群体中移除细胞,从而提供T调节性消耗的,例如CD25<sup>+</sup>消耗的群体,以及适合于表达CAR,例如本文所述的CAR的肿瘤抗原消耗的细胞。在一个实施方案中,肿瘤抗原表达细胞与T调节性,例如CD25<sup>+</sup>细胞同时去除。例如,可以将抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段连接到相同的基质,例如珠上,所述基质可用于除去细胞或抗CD25抗体或其片段,或抗肿瘤抗原抗体或其片段可以连接到分离的珠上,其混合物可用于除去细胞。在其他实施方案中,T调节细胞例如CD25<sup>+</sup>细胞的去除以及肿瘤抗原表达细胞的去除是顺序的,并且可以以任何顺序发生。

[0438] 还提供了包括从表达检查点抑制物(例如本文所述的检查点抑制物)的群体中除去细胞(例如PD1+细胞,LAG3+细胞和TIM3+细胞中的一种或多种)的方法,从而提供T调节性消耗的,例如CD25+消耗的细胞和检查点抑制物消耗的细胞,例如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR(例如TGFRβ),例如,如本文所述。在一个实施方案中,检查点抑制物表达细胞与T调节细胞(例如CD25+细胞)同时除去。例如,可以将抗CD25抗体或其片段和抗检查点抑制物抗体或其片段连接到可用于除去细胞的相同珠上,或者抗CD25抗体或其片段以及抗检查点抑制物抗体或其片段可以连接到分离的珠上,其混合物可用于除去细胞。在其他实施方案中,除去T调节细胞,例如CD25+细胞,以及除去表达检查点抑制物的细胞是顺序的,并且可以以任何顺序发生。

[0439] 本文描述的方法可以包括正选择步骤。例如,可以通过与抗CD3/抗CD28(例如3×28)缀合的珠,例如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T温育足够用于期望的T细胞的正选择的时间段来分离T细胞。在一个实施方案中,时间段为约30分钟。在另一个实施方案中,时间段的范围为30分钟至36小时或更长,以及其间的所有整数值。在另一个实施方案中,时间段至少为1、2、3、4、5或6个小时。在另一个实施方案中,时间段为10至24小时,例如24小时。在与其他细胞类型相比有较少T细胞的任何情况下,例如在从肿瘤组织或免疫受损个体分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的情况下,更长的温育时间可用于分离T细胞。此外,使用更长的温育时间可以提高CD8+T细胞捕获的效率。因此,通过简单地缩短或延长T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或通过增加或减少珠与T细胞的比例(如本文进一步描述),在培养开始时或在该过程的其他时间点可以优先选择支持或反对的T细胞的亚群。此外,通过增加或减少珠或其他表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比例,可以在培养起始时或在其它期望的时间点优先选择支持或反对的T细胞的亚群。

[0440] 在一个实施方案中,可以选择表达IFN-γ、TNFα、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、端粒酶B、和穿孔素或其它合适的分子,例如其它细胞因子中的一种或多种的T细胞群体。用于筛选细胞表达的方法可以例如通过PCT公开号WO 2013/126712中描述的方法来确定。

[0441] 为了通过正或负选择分离所需细胞群体,可以改变细胞和表面(例如颗粒如珠)的浓度。在某些方面,可能需要显著降低其中珠和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个方面,使用浓度为100亿细胞/ml、90亿/ml、80亿/ml、70亿/ml、60亿/ml或50亿/ml的浓度。在一个方面,使用浓度为10亿个细胞/ml。在一个方面,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在另外的方面,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。

[0442] 使用高浓度可导致细胞产量的增加、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞或从存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病,肿瘤组织等)中捕获所述弱表达目的靶抗原的细胞。这样的细胞群体可能具有治疗价值,并且可以希望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0443] 在相关方面,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗

粒如珠)的混合物,颗粒和细胞之间的相互作用被最小化。这选择表达大量要结合到颗粒上的所需抗原的细胞。例如,CD4+T细胞表达较高水平的CD28,并在稀释浓度比CD8+T细胞更有效地捕获。在一个方面,所用细胞的浓度为 $5 \times 10^6$ /ml。在其它方面,所使用的浓度可以为约 $1 \times 10^5$ /ml至 $1 \times 10^6$ /ml,和其间的任何整数值。

[0444] 在其他方面,细胞可以在2-10℃或室温下以不同的速度在旋转器上温育不同时间长度。

[0445] 在一个实施方案中,群体的多个免疫效应细胞不表达双甘油激酶(DGK),例如是DGK缺陷型。在一个实施方案中,群体的多个免疫效应细胞不表达Ikaros,例如是Ikaros缺陷型。在一个实施方案中,群体的多个免疫效应细胞不表达DGK和Ikaros,例如是DGK和Ikaros缺陷的。

[0446] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻。希望不受理论束缚,冻结和随后的解冻步骤通过去除细胞群体中的粒细胞和某种程度的单核细胞来提供更均匀的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,细胞可以悬浮在冷冻溶液中。虽然本领域已知许多冷冻溶液和参数是已知的,并且在本文中将是有益的,但是一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%葡萄糖,20%人血清白蛋白和7.5%DMSO,或31.25%Plasmalyte-A,31.25%葡萄糖5%,0.45%NaCl,10%葡聚糖40和5%葡萄糖,20%人血清白蛋白和7.5%DMSO或其他合适的含有例如Hespan和PlasmaLyte A的细胞冷冻介质的细胞培养基,然后将细胞以每分钟1°的速度冷冻至-80℃,并储存在液氮储存罐的气相中。可以使用其他控制冷冻的方法,也可以在-20℃或液氮中立即进行不受控制的冷冻。

[0447] 在某些方面,如本文所述将冷冻保存的细胞解冻和洗涤,并在活化前使用本发明的方法在室温下静置1小时。

[0448] 在本发明的上下文中还考虑到在可能需要本文描述的扩增的细胞之前的时间段收集来自受试者的血液样品或单采血液成分术制品。因此,可以在必要的任何时间点收集要扩增的细胞来源,并且分离和冷冻所需的细胞,例如T细胞,用于随后用于任何数量的疾病或病症的免疫效应细胞疗法中,所述疾病或病症,如本文所述的那些疾病或病症将从免疫效应细胞疗法中获益。在一个方面,血液样品或单采血液成分术样品从通常健康的受试者取得。在一个方面,血液样品或单采血液成分术样品从通常健康的受试者取得,所述受试者有患病风险,但尚未患病,感兴趣的细胞被分离并冷冻供以后使用。在某些方面,T细胞可以在以后的时间被扩增,冷冻和使用。在某些方面,如本文所述但在任何治疗之前,在诊断特定疾病后不久从患者收集样品。在另一方面,在任何数量的相关治疗方式之前,从血液样品或受试者的单采血液成分术样品分离细胞,所述治疗方式包括但不限于用活性剂诸如那他珠单抗,依非珠单抗,抗病毒剂,化学疗法,辐射,免疫抑制剂,如环孢菌素,硫唑嘌呤,甲氨蝶呤,霉酚酸酯和FK506,抗体或其他免疫消蚀剂如CAMPATH,抗CD3抗体,环磷酰胺,氟达拉滨,环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228和辐射进行治疗。

[0449] 在本发明的在另一方面,T细胞是直接在治疗后从患者获得的,所述治疗给受试者留下功能性T细胞。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗之后,特别是用破坏免疫系统的药物治疗不久之后,在患者通常正在从治疗中恢复的时期内,获取的T细胞的质量可能是最佳的或者其离体扩增的能力得到改善。同样,在使用本文所述的方法的离体操作之后,这些细胞可能处于用于增强移植和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的上下文中,考虑在该

恢复期期间收集血细胞,包括造血谱系的T细胞,树突状细胞或其他细胞。此外,在某些方面,动员(例如,使用GM-CSF动员)和调节方案可以用于在受试者中产生一种情形,其中特定细胞类型的再增殖,再循环,再生和/或扩增是有利的,特别是在治疗后限定的时间窗口内。阐述性细胞类型包括T细胞,B细胞,树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0450] 在一个实施方案中,表达CAR分子,例如本文所述的CAR分子的免疫效应细胞从已经接受低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂的受试者获得。在一个实施方案中,在足够的时间之后或在充足剂量的低的免疫增强剂量的mTOR抑制剂之后收获待工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如,T细胞)的群体,使得已经将受试者中或从受试者收获的PD1阴性免疫效应细胞(例如,T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)在比例至少暂时增加了。

[0451] 在其它实施方案中,具有或将被工程化以表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞)的群体可以通过与一定量的mTOR抑制剂接触离体处理,所述mTOR抑制剂增加PD1阴性免疫效应细胞例如T细胞的数量,或增加PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比例。

[0452] 认识到本申请的方法可以利用包含5%或更少,例如2%人AB血清的培养基条件,并且使用已知的培养基条件和组合物,例如Smith等人,“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement”*Clinical&Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31中描述的那些。

[0453] 在一个实施方案中,T细胞群体是缺乏二甘油激酶(DGK)的。DGK缺陷型细胞包括不表达DGK RNA或蛋白质或具有降低或抑制的DGK活性的细胞。可通过遗传方法产生DGK缺陷细胞,例如,施用RNA干扰剂,例如siRNA、shRNA、miRNA,以减少或防止DGK表达。备选地,通过用本文所述的DGK抑制剂处理可以产生DGK缺陷细胞。

[0454] 在一个实施方案中,T细胞群体为Ikaros缺陷型。Ikaros缺陷型细胞包括不表达Ikaros RNA或蛋白质的细胞,或具有降低或抑制的Ikaros活性的细胞,Ikaros缺陷型细胞可以通过遗传方法产生,例如,施用RNA干扰剂,例如siRNA、shRNA、miRNA,以减少或防止Ikaros表达。备选地,Ikaros缺陷型细胞可以通过用Ikaros抑制剂例如来那度胺处理来产生。

[0455] 在实施方案中,T细胞群体是DGK缺陷型和Ikaros缺陷型的,例如不表达DGK和Ikaros,或已经减少或抑制DGK和Ikaros活性。可以通过本文所述的任何方法产生这样的DGK和Ikaros缺陷型细胞。

[0456] 在一个实施方案中,从受试者获得NK细胞。在另一个实施方案中,NK细胞是NK细胞系,例如NK-92细胞系(Conkwest)。

[0457] 同种异体CAR

[0458] 在本文所述的实施方案中,免疫效应细胞可以是同种异体免疫效应细胞,例如T细胞或NK细胞。例如,细胞可以是同种异体T细胞,例如缺乏功能性T细胞受体(TCR)和/或人白细胞抗原(HLA)表达的同种异体T细胞,例如HLA I类和/或HLA II类。

[0459] 缺乏功能性TCR的T细胞可以例如被工程化为使得所述细胞在其表面上不表达任何功能性TCR,被工程化为使得其不表达包含功能性TCR的一个或多个亚基(例如,经工程化

使其不表达(或表现出降低的表达)TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TCR $\gamma$ 、TCR $\delta$ 、TCR $\epsilon$ 和/或TCR $\zeta$ )或被工程化,使得其在其表面上产生非常少的功能性TCR。备选地,T细胞可以表达实质上受损的TCR,例如通过TCR的一个或多个亚基的突变或截短形式的表达。术语“实质上受损的TCR”是指该TCR不会在宿主中引起不利的免疫反应。

[0460] 本文描述的T细胞可以例如被工程化,使得其表面上不表达功能性HLA。例如,本文描述的T细胞可以进行工程化,使得细胞表面表达HLA,例如HLA I类和/或HLA II类被下调。在一些实施方案中,HLA的下调可以通过减少或消除 $\beta$ -2微球蛋白(B2M)的表达来实现。

[0461] 在一些实施方案中,T细胞可缺乏功能性TCR和功能性HLA,例如HLA I类和/或HLA II类。

[0462] 缺乏功能性TCR和/或HLA表达的修饰的T细胞可以通过任何合适的方法获得,包括TCR或HLA的一个或多个亚基的敲除或敲减。例如,T细胞可以包括使用siRNA,shRNA,聚集的规则间隔的短回文重复(CRISPR),转录活化子样效应核酸酶(TALEN)或锌指内切核酸酶(ZFN)敲减TCR和/或HLA。

[0463] 在一些实施方案中,同种异体细胞可以是不表达或以低水平表达(例如,通过本文所述的任何方法)抑制性分子的细胞。例如,细胞可以是不表达或以低水平表达抑制性分子的细胞,例如所述抑制性分子可以降低CAR表达细胞引起免疫效应应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。对抑制性分子的抑制(例如通过DNA,RNA或蛋白质水平上的抑制)可以优化CAR表达细胞的性能。在实施方案中,可以使用抑制性核酸,例如如本文所述的抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,聚集的规则间隔的短回文重复(CRISPR),转录活化子样效应核酸酶(TALEN)或锌指内切核酸酶(ZFN)。

[0464] siRNA和shRNA抑制TCR或HLA

[0465] 在一些实施方案中,可以在细胞如T细胞中使用靶向编码TCR和/或HLA和/或本文所述的抑制性分子的核酸的siRNA或shRNA来抑制TCR表达和/或HLA表达,所述抑制性分子为例如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR $\beta$ )。

[0466] 用于siRNA和shRNA以及示例性shRNA的表达系统描述于例如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第649和650段,其全部内容通过引用并入本文。

[0467] CRISPR抑制TCR或HLA

[0468] 本文所用的“CRISPR”或“针对TCR和/或HLA的CRISPR”或“CRISPR抑制TCR和/或HLA”是指一组聚集的规则间隔的短回文重复序列,或包含这样一组重复序列的系统。本文所用的“Cas”是指CRISPR相关蛋白。“CRISPR/Cas”系统是指衍生自CRISPR和Cas的系统,其可用于在细胞,如T细胞中沉默或突变TCR和/或HLA基因和/或本文所述的抑制性分子(例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR $\beta$ )。

[0469] CRISPR/Cas系统及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请W02015/

142675的第651-658段中,其全部内容通过引用并入本文。

[0470] TALEN抑制TCR和/或HLA

[0471] “TALEN”或“针对HLA和/或TCR的TALEN”或“TALEN抑制HLA和/或TCR”是指一种人工核酸酶:转录活化子样效应核酸酶,其可用于在细胞中,例如T细胞中编辑HLA和/或TCR基因和/或本文所述的抑制性分子(例如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如CEACAM-1, CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR $\beta$ )。

[0472] TALEN及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第659-665段,其全部内容通过引用并入本文。

[0473] 锌指核酸酶抑制HLA和/或TCR

[0474] “ZFN”或“锌指核酸酶”或“针对HLA和/或TCR的ZFN”或“ZFN抑制HLA和/或TCR”是指锌指核酸酶,其是一种人工核酸酶,可用于编辑细胞中,例如T细胞中HLA和/或TCR基因和/或本文所述的抑制性分子(例如PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如CEACAM-1, CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR $\beta$ )。

[0475] ZFN及其用途描述于例如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第666-671段,其全部内容通过引用并入本文。

[0476] 端粒酶表达

[0477] 端粒在体细胞持久性中起关键作用,其长度由端粒酶(TERT)维持。CLL细胞中的端粒长度可能非常短(Roth等人,“Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia”British Journal of Haematology,143,383-386.,2008年8月28日),并且在制备的CAR表达细胞(例如CART19细胞)中可能更短,限制了其在过继转移到患者之后的扩增潜力。端粒酶表达可以从复制性消耗中拯救CAR表达细胞。

[0478] 虽然不希望受任何特定理论的束缚,但在一些实施方案中,由于T细胞中缩短的端粒,治疗性T细胞在患者中具有短期持续性;因此,用端粒酶基因转染可以延长T细胞的端粒,并改善患者中T细胞的持久性。参见Carl June,“Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic”,Journal of Clinical Investigation,117:1466-1476(2007)。因此,在一个实施方案中,免疫效应细胞,例如T细胞,异位表达端粒酶亚基,例如端粒酶的催化亚基,例如TERT,例如hTERT。在一些方面,本公开提供了产生CAR表达细胞的方法,其包括使细胞与编码端粒酶亚基(例如端粒酶的催化亚基,例如TERT,例如hTERT)的核酸接触。细胞可以在与编码CAR的构建体接触之前,同时或之后与核酸接触。

[0479] 端粒酶表达可以是稳定的(例如,核酸可以整合入细胞的基因组)或短暂的(例如,核酸不整合,并且表达在一段时间后,例如几天后下降)。通过用编码端粒酶亚基和可选择标记的DNA转染或转导细胞,并选择稳定的整合体,可以实现稳定的表达。备选地或组合地,可以通过位点特异性重组,例如使用Cre/Lox或FLP/FRT系统来实现稳定表达。

[0480] 瞬时表达可能涉及用核酸例如DNA或RNA如mRNA转染或转导。在一些实施方案中,

瞬时mRNA转染避免了有时与用TERT稳定转染相关的遗传不稳定性。外源端粒酶活性的瞬时表达描述于例如国际申请W02014/130909中,其通过引用整体并入本文。在实施方案中,根据由Moderna Therapeutics商业化的信使RNA Therapeutics™平台进行端粒酶亚基的基于mRNA的转染。例如,该方法可以是美国专利号8710200、8822663、8680069、8754062、8664194或8680069中描述的方法。

[0481] 在一个实施方案中,hTERT具有GenBank蛋白ID AAC51724.1的氨基酸序列(Meyerson等人,“hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization”Cell Volume 90,Issue 4,1997年8月22日,第785-795页):

```

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDP
AAFRLVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFA
LLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPA
PGARRRGGSSASRSLPLPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPA
RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLLYS
SGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPrRLPRLPQRYWQMRPL
FLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGQSVAAPEEEDTDPRLVQ
LLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQEL
TWKMSVRGCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTET
[0482] TFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFI
PKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERARRPGLLGASVLG
LDDIHRWRTFVLRVRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYC
VRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSL
NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAG
IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVPEDEAL
GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRR
KLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPT
FFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVT
YVPLLGSRLTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAAANPALPSDFKTILD(SEQ ID NO: 5)

```

[0483] 在一个实施方案中,hTERT具有与SEQ ID NO:5的序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的序列。在一个实施方案中,hTERT具有SEQ ID NO:5的序列。在一个实施方案中,hTERT包含在N末端,C末端或这两端的缺失(例如,不超过5、10、15、20或30个氨基酸)。在一个实施方案中,hTERT包含N-末端,C-末端或这两端的转基因氨基酸序列(例如,不超过5、10、15、20或30个氨基酸)。

[0484] 在一个实施方案中,hTERT由GenBank登录号AF018167的核酸序列编码(Meyerson等人,“hEST2,the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene,Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization”Cell Volume 90,Issue 4,1997年8月22日,第785-795页):

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc  
61 cgcgcgctcc ccgtgccga gccgtgeget ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc  
121 tgccgctgge cacgttcgtg cggcgccctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg  
[0485] 181 gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg ccagtgctt ggtgtgctg ccctgggacg  
241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgic ctgcctgaag gagctggtgg  
301 cccgagtgtc gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg  
361 cgctgctgga cggggccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct  
421 acctgccc aa cacggtgacc gacgcaactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc

481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg  
 541 tggtcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgcccgt gtaccagctc ggcgctgcca  
 601 ctgaggeccg gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg  
 661 cctggaacca tagcgtcagg gagccggggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcca  
 721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg  
 781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga  
 841 cgcgtggacc gactgaccgt ggtttctgtg ttggtgcacc tgccagacct gccgaagaag  
 901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacctatcc gtgggcccgc  
 961 agcaccacgc gggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgc  
 1021 ccccgtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactctc aggcgacaag gacgagctgc  
 1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgagcc ccagcctgac tggecgtcgg aggcctgtg  
 1141 agaccatctt tetgggttcc aggccttggg tgccagggac tccccgcagg ttccccgc  
 1201 tgcccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc  
 1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgcg gtcaccccag  
 1321 cagccgggtg ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggggcccccc gaggaggagg  
 1381 acacagacc cctgcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt  
 1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc ttggtgcccc aggcctctgg gctccaggc  
 1501 acaacgaacg ccgcttctc aggaacacca agaagtcat ctccctgggg aagcatgcca  
 1561 agctctcgtc gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct ttgctgcga  
 1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg  
 1681 ccaagttcct gcaactggctg atgagtgtg acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt  
 1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga  
 1801 gcaagtgcga aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt  
 1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg tccagactcc  
 [0486] 1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag  
 1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagaggcccg agcgtctcac ctgcagggtg aaggcactgt  
 2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggccc tctgtgctgg  
 2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttctgtct gcgtgtgctg gccaggacc  
 2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc  
 2221 aggacaggct cacggaggtc atgccagca tcatcaaac ccagaacacg tactgctgct  
 2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggcccgc atgggcacgt ccgcaaggcc tcaagagcc  
 2341 acgtctctac cttgacagac ctccagcctg acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg  
 2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca  
 2461 gcagtggcct ctctgacgct ttctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcctcaggg  
 2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatec cgcagggtc catectctcc acgtgctct  
 2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc  
 2641 tgctctcgcg tttggtggat gatttcttgt ttggtgacacc tcacctacc cacgcgaaaa  
 2701 ccttctcag gacctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtgggt aactgcgga  
 2761 agacagtggg gaacttcct gtagaagacg aggccttggg ttgacagct tttgttcaga  
 2821 tgccggcca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg acctggagg  
 2881 tgcagagcga ctactccagc tatgccgga cctccatcag agccagtctc acctcaacc  
 2941 gcggttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gaaactctt tggggtcttg cggtgaagt  
 3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggatg acagcctcca gacggtgtgc accaacatct  
 3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttacgcctg tgtgctgcag ctccatttc  
 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatctt tctgctgct catctctgac acggcctccc  
 3181 tctgtactc catcctgaaa gccagaacg cagggatgct gctgggggccc aaggcgccc  
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc  
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctgggggtc actcaggaca gccagacgc  
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgcct ggaggcccga gccaacccgg  
 3421 cactgcctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc accgcccac agccaggccc

3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc  
 3541 ccacaccag gccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct  
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc  
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcaact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc  
 [0487] 3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtcacatc  
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctgcgcc tgccctcctt tgccctccac ccccaccatc  
 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa ttggagtga ccaaaggtgt  
 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt cctgtgggt caaattgggg  
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa  
 4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 8)

[0488] 在一个实施方案中,hTERT由具有与SEQ ID NO:8的序列有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的核酸编码。在一个实施方案中,hTERT由SEQ ID NO:8的核酸编码。

[0489] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0490] 本发明提供免疫效应细胞 (例如,T细胞、NK细胞),其被工程化以包含将免疫效应细胞引导至癌症的一种或多种CAR。这通过对癌症相关抗原特异性的CAR上的抗原结合结构域来实现。有两类可以被本文所述的CAR靶向的癌症相关抗原 (肿瘤抗原): (1) 在癌细胞表面上表达的癌症相关抗原;和 (2) 本身是细胞内的癌症相关抗原,然而,这种抗原 (肽) 的片段通过MHC (主要组织相容性复合体) 呈递在癌细胞的表面上。

[0491] 因此,例如通过本文所述的方法获得的免疫效应细胞可被工程化以含有靶向下列癌症相关抗原 (肿瘤抗原) 之一的CAR:CD19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1 (也被称为CD2子集1,CRACC,SLAMF7,CD319,和19A24);C型凝集素样分子-1 (CLL-1或CLECL1);CD33;表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII);神经节苷脂G2 (GD2);神经节苷脂GD3 (aNeu5Ac (2-8) aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer);TNF受体家族成员B细胞成熟 (BCMA);Tn抗原 ((Tn Ag) 或 (GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原 (PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1);Fms样酪氨酸激酶3 (FLT3);肿瘤相关的糖蛋白72 (TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原 (CEA);上皮细胞粘附分子 (EPCAM);B7H3 (CD276);KIT (CD117);白介素13受体亚基 $\alpha$ -2 (IL-13Ra2或CD213A2);间皮素;白介素11受体 $\alpha$  (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原 (PSCA);蛋白酶丝氨酸21 (Testisin或PRSS21);血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2);路易斯 (Y) 抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 $\beta$  (PDGFR- $\beta$ );阶段特异性胚胎抗原-4 (SSEA-4);CD20;叶酸受体 $\alpha$ ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2 (Her2/neu);细胞表面相关的粘蛋白1 (MUC1);表皮生长因子受体 (EGFR);神经细胞粘附分子 (NCAM);Prostate;前列腺酸性磷酸酶 (PAP);突变的延伸因子2 (ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞活化蛋白 $\alpha$  (FAP);胰岛素样生长因子1受体 (IGF-I受体),碳酸酐酶IX (CAIX);蛋白酶体 (Prosome,Macropain) 亚基, $\beta$ 型,9 (LMP2);糖蛋白100 (gp100);由断点簇区 (BCR) 和A1elson鼠白血病病毒癌基因同源物1 (AB1) 组成的癌基因融合蛋白 (bcr-ab1);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2 (EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸基路易斯粘附分子 (sLe);神经节苷脂GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDGalp (1-4) bDG1cp (1-1) Cer);转谷氨酰胺酶5 (TGS5);高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA);邻乙酰基GD2神经节苷脂 (OAcGD2);叶酸受体 $\beta$ ;肿瘤血管内皮标记1 (TEM1/CD248);肿瘤血管内皮标记7相关的 (TEM7R);Claudin 6 (CLDN6);促甲状腺激素受体 (TSHR);G蛋白偶联受体C类5组,成员D (GPC5D);X染色体开放阅读框61 (CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶 (ALK);聚唾液酸;胎盘特异性1

(PLAC1); globoH葡糖苷神经酰胺的己糖部分(GloboH); 乳腺分化抗原(NY-BR-1); uroplakin 2(UPK2); 甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1); 肾上腺素受体 $\beta$ 3(ADRB3); pannexin 3(PANX3); G蛋白偶联受体20(GPR20); 淋巴细胞抗原6复合物, 基因座K9(LY6K); 嗅觉受体51E2(OR51E2); TCR $\gamma$ 交替阅读框蛋白(TARP); 肾母细胞瘤蛋白(WT1); 癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1); 癌症/睾丸抗原2(LAGE-1A); 黑素瘤相关抗原1(MAGE-A1); ETS易位变异基因6, 位于染色体12p(ETV6-AML); 精子蛋白17(SPA17); X抗原家族, 成员1A(XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体2(Tie2); 黑素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1); 黑素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2); FOS相关抗原1; 肿瘤蛋白质p53(p53); p53突变体; prostein; 存活蛋白; 端粒酶; 前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1或半乳凝素8), 由T细胞识别的黑素瘤抗原1(MelanA或MART1); 大鼠肉瘤(Ras)突变体; 人端粒酶逆转录酶(hTERT); 肉瘤易位断点; 细胞凋亡的黑素瘤抑制剂(ML-IAP); ERG(跨膜蛋白酶, 丝氨酸2(TMPS2)ETS融合基因); N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V(NA17); 配对盒蛋白Pax-3(PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白B1; V-myc鸟髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN); Ras同源物家族成员C(RhoC); 酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2); 细胞色素P450 1B1(CYP1B1); CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS或印记位点的调节物的兄弟), 由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3); 配对盒蛋白Pax-5(PAX5); 顶体蛋白酶原结合蛋白sp32(OY-TES1); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK); A激酶锚定蛋白4(AKAP-4); 滑膜肉瘤, X断点2(SSX2); 高级糖化终产物受体(RAGE-1); 肾泛素1(RU1); 肾泛素2(RU2); 豆荚蛋白酶; 人类乳头瘤病毒E6(HPV E6); 人类乳头瘤病毒E7(HPV E7); 肠羧基酯酶; 突变的热休克蛋白70-2(mut hosp 70-2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1); IgA受体的Fc片段(FCAR或CD89); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2(LILRA2); CD300分子样家族成员f(CD300LF); C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原2(BST2); 含有EGF样模块粘蛋白样激素受体样2(EMR2); 淋巴细胞抗原75(LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3); Fc受体样5(FCRL5); 以及免疫球蛋白 $\lambda$ 样多肽1(IGLL1)。

[0492] 在一个实施方案中, 多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。在一个实施方案中, 第一和第二表位在相同的抗原上, 例如相同的蛋白(或多聚体蛋白的亚基)上。在一个实施方案中, 第一和第二表位重叠。在一个实施方案中, 第一和第二表位不重叠。在一个实施方案中, 第一和第二表位在不同的抗原上, 例如不同的蛋白质(或多聚体蛋白质的不同亚基)上。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体和对第二表位具有结合特异性的半抗体。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段和对第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的scFv或其片段, 和对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。

[0493] 在某些实施方案中, 抗体分子是多特异性(例如, 双特异性或三特异性)抗体分子。用于产生双特异性或异二聚体抗体分子以及双特异性抗体分子的各种构型的方案描述于

例如2015年3月13日提交的W02015/142675的第455-458段中,其全部内容通过引用并入本文。

[0494] 在一个方面,双特异性抗体分子的特征在于第一免疫球蛋白可变结构域序列,例如scFv,其对CD19具有结合特异性,例如包含本文所述的scFv,或包含来自本文所述的scFv的轻链CDR和/或重链CDR以及对不同抗原上的第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。

[0495] 嵌合TCR

[0496] 在一个方面,本发明的抗体和抗体片段(例如,CD19抗体和片段)可以被移植到T细胞受体(“TCR”)链,例如TCR $\alpha$ 或TCR  $\beta$ 链的一个或多个恒定结构域,以产生嵌合TCR。不受理论的束缚,据信嵌合TCR将在抗原结合时通过TCR复合体发出信号。例如,本文公开的scFv可以移植到例如TCR链,例如TCR $\alpha$ 链和/或TCR $\beta$ 链的恒定结构域,例如,细胞外恒定结构域的至少一部分,跨膜结构域和胞质结构域。作为另一个实例,抗体片段,例如本文所述的VL结构域可以移植到TCR $\alpha$ 链的恒定结构域,并且抗体片段,例如本文所述的VH结构域可以移植到TCR $\beta$ 链的恒定结构域(或者,VL结构域可以被移植到TCR $\beta$ 链的恒定结构域,并且VH结构域可以被移植到TCR $\alpha$ 链上)。作为另一个实例,抗体或抗体片段的CDR可以移植到TCR $\alpha$ 和/或 $\beta$ 链中以产生嵌合TCR。例如,本文公开的LCDR可以移植到TCR $\alpha$ 链的可变结构域中,并且本文公开的HCDR可以移植到TCR $\beta$ 链的可变结构域,反之亦然。这样的嵌合TCR可以例如通过本领域已知的方法产生(例如,Willemsen RA等人,Gene Therapy 2000;7:1369-1377;Zhang T等人,Cancer Gene Ther 2004;11:487-496;Aggen等人,Gene Ther.2012 Apr;19(4):365-74)。

[0497] 非抗体支架

[0498] 在实施方案中,抗原结合结构域包含非抗体支架,例如纤连蛋白,锚蛋白,结构域抗体,脂质运载蛋白,小模块免疫药物,maxybody,蛋白A或affilin。非抗体支架具有结合细胞上的靶抗原的能力。在实施方案中,抗原结合结构域是在细胞上表达的天然存在的蛋白质的多肽或其片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含非抗体支架。可以使用多种非抗体支架,只要所得多肽包含至少一个特异性结合靶细胞上的靶抗原的结合区域即可。

[0499] 非抗体支架包括:纤连蛋白(Novartis,MA),锚蛋白(Molecular Partners AG,苏黎世,瑞士),结构域抗体(Domantis,Ltd.,Cambridge,MA和Ablynx nv,Zwijnaarde,Belgium),脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG,Freising,Germany),小模块免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc.,Seattle,WA),maxybodies(Avidia,Inc.,Mountain View,CA),蛋白A(Affibody AG,Sweden)和affilin( $\gamma$ -晶状体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH,Halle,Germany)。

[0500] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含结合靶细胞表面上的反配体的分子的胞外结构域或其反配体(counter ligand)结合片段。

[0501] 免疫效应细胞可以包含含有编码CAR的序列的重组DNA构建体,其中CAR包含特异性结合肿瘤抗原,例如本文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域(例如,抗体或抗体片段,TCR或TCR片段)和胞内信号结构域。胞内信号结构域可以包含共刺激信号结构域和/或主信号结构域,例如 $\zeta$ 链。共刺激信号传导结构域是指包含共刺激分子的胞内结构域的至少一部分的CAR的一部分。如其他地方所述,本文所述的方法可包括用编码CAR,例如本文描述的CAR

的核酸转导细胞,例如来自T调节性消耗细胞群体的细胞。

[0502] 在具体方面,CAR包含scFv结构域,其中scFv之前可以是任选的如SEQ ID NO:1中提供的前导序列,然后是任选的如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:23中提供的铰链序列,如SEQ ID NO:6中提供的跨膜区,包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:16的胞内信号结构域和包括SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的CD3 $\zeta$ 序列,例如,其中结构域相邻并且在相同可读框内以形成单个融合蛋白。

[0503] 在一个方面,示例性CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细胞外抗原结合结构域(例如本文所述的抗原结合结构域),铰链(例如本文所述的铰链区),跨膜结构域(例如,本文所述的跨膜结构域)和细胞内刺激结构域(例如,本文所述的细胞内刺激结构域)。在一个方面,示例性CAR构建体包含任选的前导序列(例如,本文所述的前导序列),细胞外抗原结合结构域(例如本文所述的抗原结合结构域),铰链(例如本文所述的铰链区),跨膜结构域(例如,本文所述的跨膜结构域),细胞内共刺激信号结构域(例如,本文所述的共刺激信号结构域)和/或细胞内主信号结构域(例如,本文所述的主信号结构域)。

[0504] 示例性前导序列如SEQ ID NO:1提供。示例性的铰链/间隔序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:23提供。示例性跨膜结构域序列如SEQ ID NO:6提供。4-1BB蛋白的胞内信号结构域的示例性序列如SEQ ID NO:7提供。CD27的胞内信号结构域的示例性序列如SEQ ID NO:16提供。示例性的CD3 $\zeta$ 结构域序列如SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10提供。

[0505] 在一个方面,免疫效应细胞包含重组核酸构建体,其包含编码CAR的核酸分子,其中所述核酸分子包含编码抗原结合结构域的核酸序列,其中所述序列与编码胞内信号结构域的核酸序列相邻并且在相同的可读框中。可以在CAR中使用的示例性胞内信号结构域包括但不限于例如CD3 $\zeta$ 、CD28、CD27、4-1BB等的一个或多个胞内信号结构域。在一些情况下,CAR可以包含CD3 $\zeta$ 、CD28、4-1BB等的任何组合。

[0506] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过从表达核酸分子的细胞中筛选文库,通过从已知包括该核酸分子的载体衍生出核酸分子,或通过使用标准技术从包含其的细胞和组织直接分离。备选地,感兴趣的核酸可以合成,而不是克隆产生。

[0507] 可以使用例如逆转录病毒或慢病毒载体构建体将编码CAR的核酸引入免疫效应细胞。

[0508] 编码CAR的核酸也可以使用例如可直接转染入细胞的RNA构建体引入免疫效应细胞。用于产生用于转染的mRNA的方法涉及使用特别设计的引物体外转录(IVT)模板,随后加入多聚A以产生含有3'和5'非翻译序列("UTR")的构建体(例如,本文所述的3'和/或5'UTR),5'帽(例如,本文所述的5'帽)和/或内部核糖体进入位点(IRES)(例如,本文所述的IRES),待表达的核酸和多聚A尾,长度通常为50-2000个碱基(例如,本文所描述的,例如SEQ ID NO:35)。如此生产的RNA可以有效地转染不同种类的细胞。在一个实施方案中,模板包括CAR的序列。在一个实施方案中,通过电穿孔将RNA CAR载体转导入细胞例如T细胞中。

[0509] 抗原结合结构域

[0510] 在一个方面,多个免疫效应细胞,例如T调节性消耗细胞的群体,包括编码CAR的核酸,其包含靶特异性结合元件,所述靶特异性结合元件也被称为抗原结合结构域。结合元件

的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数目。例如,可以选择抗原结合结构域以识别配体,所述配体作为与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物。因此,可以充当本文所述的CAR中的抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒,细菌和寄生虫感染,自身免疫疾病和癌细胞相关的那些细胞表面标志物。

[0511] 在一个方面,包含抗原结合结构域的CAR部分包含靶向肿瘤抗原,例如本文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域。

[0512] 抗原结合结构域可以是与抗原结合的任何结构域,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,重组抗体,人抗体,人源化抗体及其功能片段,包括但不限于单结构域抗体,例如重链可变结构域(VH),轻链可变结构域(VL)和骆驼衍生的纳米抗体的可变结构域(VHH),以及本领域已知的用作抗原结合结构域的备选支架,例如重组纤连蛋白结构域,T细胞受体(TCR)或其片段,例如单链TCR等。在一些情况下,抗原结合结构域来源于与CAR最终将被用于其中的物种相同的物种是有益的。例如,对于在人类中使用,对于CAR的抗原结合结构域可能有益的是包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人或人源化残基。

[0513] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含抗CD19抗体或其片段,例如scFv。例如,抗原结合结构域包含表1中列出的可变重链和可变轻链。连接可变重链和可变轻链的接头序列可以是例如本文所述的任何接头序列,或者备选地,可以为GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:104)。

[0514] 表1:抗CD19抗体结合结构域

[0515]			SEQ ID NO:
--------	--	--	---------------

[0516]

CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQ APRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFA VYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLE WIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTA DTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	107
CD19	huscFv2	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik <u>gggsgggsgggsgggsgvql</u> qesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaa dtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss	108
CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirppg kglewigviwgsettyysss lksrvtiskdnskqvslklss vtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss <u>gggsg</u> <u>gggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl</u> <u>nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl ti</u> <u>sslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik</u>	109
CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirppg kglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklss vtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss <u>gggsg</u> <u>gggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl</u> <u>nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl ti</u> <u>sslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik</u>	110
CD19	huscFv5	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik <u>gggsgggsgggsgggsgggg</u> <u>sqvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirpp</u> <u>gkglewigviwgsettyysss lksrvtiskdnskqvslkl s</u> <u>svtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss</u>	111
CD19	huscFv6	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik <u>gggsgggsgggsgggsgggg</u> <u>sqvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirpp</u> <u>gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslkl s</u> <u>svtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss</u>	112
CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirppg kglewigviwgsettyysss lksrvtiskdnskqvslklss vtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss <u>gggsg</u> <u>gggsgggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasq</u> <u>iskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtd</u> <u>ytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik</u>	113
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirppg kglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklss vtaadtavyycahyyygggyamdywgqgtlvtvss <u>gggsg</u> <u>gggsgggsggggseivmtqspatls slspgeratls crasq</u> <u>iskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtd</u> <u>ytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgtkleik</u>	114
CD19	huscFv9	Eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfa	115

[0517]

		vyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgggg sqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppp gkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslkls svtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqggtlvtvss	
CD19	Hu scFv10	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppp kglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslkls vtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqggtlvtvssggggsg ggsgggggseivmtqspatlslpgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtd ytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik	116
CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatlslpgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgq aprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggsgggsgggsgvql qesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkle wigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklsvtaa dtavyycakhyyyggsyamdywgqggtlvtvss	117
CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppp kglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslkls vtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqggtlvtvssggggsg ggsgggggseivmtqspatlslpgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlti sslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik	118
CD19	muCTL 019	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdg tvklliyhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqedia tyfcqqgntlpytfgggkkleitggggsgggsgggsgsevkl qesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirpprkgle wlgviwgsettyynsalksrliikdnsksgvflkmnslqtd dtaiyycakhyyyggsyamdywgqggtsvtvss	119
抗体		VH 序列	VL 序列
SSJ25-C1		QVQLLESGAELVLRPGSSVKISCKASGYA FSSYWMNWVKQRPGGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYSCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVT	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQN VGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNS GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLA DYFYFCQYNRYPYTSGGGTKLEIKRRS
SEQ ID NO:	ID	120	121

[0518] 包含人源化抗CD19scFv结构域的CD19 CAR构建体描述于PCT公开W02014/153270中,其通过引用并入本文。

[0519] 抗CD19 scFv结构域的鼠和人源化CDR序列的序列在表7中示出重链可变结构域和表8中示出轻链可变结构域。“ID”代表每个CDR的相应SEQ ID NO。

[0520] 表7. CD19抗体的重链可变结构域CDR (Kabat)

候选物	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
鼠_CART19		GVSLPDYGVS	122	VIWGSETTYNSALKS	123	HYYYGGSYAMDY	127
人源化_CART19	VH4	GVSLPDYGVS	122	VIWGSETTYSSSLKS	124	HYYYGGSYAMDY	127

[0521]

	a						
[0522]	人源化_CART19						
	b	VH4	GVSLPDYGV	122	VIWGSETTYYS	125	HYYYGGSYAMDY 127
	人源化_CART19						
	c	VH4	GVSLPDYGV	122	VIWGSETTYYN	126	HYYYGGSYAMDY 127

[0523] 表8. CD19抗体的轻链可变结构域CDR(Kabat)

候选物	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
鼠_CART19		RASQDISKYL	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
[0524] 人源化_CART19 a	VK3	RASQDISKYL	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
人源化_CART19 b	VK3	RASQDISKYL	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
人源化_CART19 c	VK3	RASQDISKYL	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130

[0525] 可以根据本公开使用本领域任何已知的CD19 CAR,例如任何已知CD19 CAR的CD19抗原结合结构域。例如, LG-740;在美国专利号8,399,645;美国专利号7,446,190;Xu等人, Leuk Lymphoma.201354(2):255-260(2012);Cruz等人, Blood 122(17):2965-2973(2013); Brentjens等人, Blood, 118(18):4817-4828(2011); Kochenderfer等人, Blood 116(20):4099-102(2010); Kochenderfer等人, Blood 122(25):4129-39(2013);和16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther(ASGCT)(May 15-18, Salt Lake City)2013, Abst 10中描述的CD19 CAR。

[0526] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含抗BCMA抗体或其片段,例如scFv。例如,抗原结合结构域包含表11中列出的可变重链和可变轻链。连接可变重链和可变轻链的接头序列可以是例如本文所述的任何接头序列。包含抗BCMA scFv结构域的抗BCMA CAR构建体在本文中描述,例如在表11中或在US2016/0046724A1中,其通过引用并入本文。

[0527] 在实施方案中,抗原结合结构域包含EGFRvIII抗体或其片段,例如scFv。例如, US2014/0322275A1中描述的抗原结合结构域包含可变重链和可变轻链。包含抗EGFRvIII scFv结构域的抗EGFRvIIICAR构建体在本文中描述例如在US2014/0322275A1中,其通过引用并入本文。在实施方案中,抗原结合结构域包含CD123抗体或其片段,例如scFv。例如,抗原结合结构域包含US2014/0322212A1或US2016/0068601A1中描述的可变重链和可变轻链。含有抗CD123scFv结构域的抗CD123CAR构建体在本文中描述,例如在US2014/0322212A1或US2016/0068601A1中,两者都通过引用并入本文。

[0528] 在实施方案中,抗原结合结构域包含抗间皮素抗体或其片段,例如scFv。例如,抗原结合结构域包含W0 2015/090230中描述的可变重链和可变轻链。包含抗间皮素scFv结构域的抗间皮素CAR构建体在本文中描述,例如在W02015/090230中,其通过引用并入本文。

[0529] 在实施方案中,抗原结合结构域包含抗CLL1抗体或其片段,例如scFv。例如, US2016/0051651A1中描述的抗原结合结构域包含可变重链和可变轻链。包含抗CLL1 scFv结构域的抗CLL1 CAR构建体在本文中描述,例如在US2016/0051651A1中,其通过引用并入本文。

[0530] 在实施方案中,抗原结合结构域包含抗CD33抗体或其片段,例如scFv。例如,抗原

结合结构域包含US2016/0096892A1中描述的可变重链和可变轻链。包含抗CD33scFv结构域的抗CD33CAR构建体在本文中描述,例如在US2016/0096892A1中,其通过引用并入本文。

[0531] 在一个实施方案中,抗原结合结构域包含来自上述抗体的一个,两个,三个(例如全部三个)重链CDR:HC CDR1,HC CDR2和HC CDR3,和/或来自上述抗体的一个,二个,三个(例如,全部三个)轻链CDR:LC CDR1,LC CDR2和LC CDR3。在一个实施方案中,抗原结合结构域包含上文列出或描述的抗体的重链可变区和/或可变轻链区。

[0532] 在一个方面,抗肿瘤抗原结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)。在一个方面,如本文所述的抗癌症相关抗原结合结构域是Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>或双功能(例如双特异性)杂交抗体(例如,Lanzavecchia等人,Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))。在一个方面,本发明的抗体及其片段与本文所述的癌症相关抗原结合,具有野生型或增强的亲和力。

[0533] 在一些情况下,scFv可以根据本领域已知的方法制备(参见例如Bird等人,(1988) Science 242:423-426和Huston等人,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。可以通过使用柔性多肽接头将VH和VL区域连接在一起来产生ScFv分子。scFv分子包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的接头(例如,Ser-Gly接头)。接头长度可以极大地影响scFv的可变区域如何折叠和相互作用。事实上,如果使用短多肽接头(例如,5-10个氨基酸之间),则可防止链内折叠。还需要链间折叠以使两个可变区在一起形成功能性表位结合位点。接头取向和尺寸的实例参见例如Hollinger等人,1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448,美国专利申请公开号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794和PCT公开号W02006/020258和W02007/024715,其通过引用并入本文。

[0534] scFv可以在其VL和VH区之间包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸残基的接头。接头序列可以包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一个实施方案中,接头序列包含甘氨酸和丝氨酸重复序列的集合,例如(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO:26)。在一个实施方案中,接头可以是(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:27)或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:28)。接头长度的变化可能会保留或增强活性,从而在活性研究中产生出色的功效。

[0535] 在另一方面,抗原结合结构域是T细胞受体("TCR")或其片段,例如单链TCR(scTCR)。制备此类TCR的方法是本领域已知的。参见例如Willemsen RA等人, Gene Therapy 7:1369-1377 (2000); Zhang T等人, Cancer Gene Ther 11:487-496 (2004); Aggen等人, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012) (将参考文献全部并入本文)。例如,可以改造scTCR,其含有来自通过接头(例如,柔性肽)连接的T细胞克隆的V $\alpha$ 和V $\beta$ 基因。这种方法对于本身是细胞内的癌相关靶标非常有用,然而,这种抗原(肽)的片段通过MHC呈递在癌细胞的表面上。

#### [0536] 跨膜结构域

[0537] 关于跨膜结构域,在各种实施方案中,可以将CAR设计为包含连接于CAR细胞外结构域的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括与跨膜区相邻的一个或多个另外的氨基酸,例如与衍生跨膜的蛋白质的细胞外区域相关的一个或多个氨基酸(例如,细胞外区的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,多达15个氨基酸)和/或一个或多个与衍生跨膜蛋白的蛋白质的细胞内区域相关的另外的氨基酸(例如,细胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,多达15个氨基酸)。在一个方面,跨膜结构域是与CAR的其他结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结

构域可以通过氨基酸取代来选择或修饰,以避免这些结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域的结合,例如使与受体复合体的其它成员的相互作用最小化。在一个方面,跨膜结构域能够与CAR表达细胞的细胞表面上的另一CAR同源二聚化。在不同的方面,可以修饰或取代跨膜结构域的氨基酸序列,以便与存在于相同CART中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。

[0538] 跨膜结构域可以衍生自天然或重组来源。如果来源是天然的,则该结构域可以衍生自任何膜结合的或跨膜蛋白。在一个方面,每当CAR结合到靶标上时,跨膜结构域能够向细胞内结构域发信号。本发明特别有用的跨膜结构域可至少包括例如T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD27、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的跨膜区。在一些实施方案中,跨膜结构域可以至少包括例如KIR2DS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R  $\beta$ 、IL2R  $\gamma$ 、IL7R  $\alpha$ 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C的跨膜区。

[0539] 在一些情况下,跨膜结构域可以通过铰链(例如来自人类蛋白质的铰链)连接到CAR的细胞外区域,例如CAR的抗原结合结构域。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链或CD8a铰链。在一个实施方案中,铰链或间隔区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列(例如由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成)。在一个方面,跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的跨膜结构域(例如由SEQ ID NO:6的跨膜结构域组成)。

[0540] 在一个方面,铰链或间隔区包含IgG4铰链。例如,在一个实施方案中,铰链或间隔区包含氨基酸序列

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG

[0541] VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKM (SEQ ID NO:36)

的铰链。在一些实施方案中,铰链或间隔区包含由以下核苷酸序列编码的铰链:

[0542] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCC  
 AGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAG  
 GTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC  
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAG  
 CACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA  
 ATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA  
 AGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAG  
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATC  
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT  
 GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTG  
 GCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC  
 CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:37)。

[0543] 在一个方面,铰链或间隔区包括IgD铰链。例如,在一个实施方案中,铰链或间隔区包含氨基酸序列

[0544] RWPEPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPE  
 CPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLE  
 RHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSD  
 PPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVENTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPS  
 PQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH (SEQ ID NO:23)的铰链。在一

些实施方案中,铰链或间隔区包含由以下核苷酸序列编码的铰链

[0545] AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCAGGCA  
 GAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGC  
 GGGGAGGAGAAGAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAG  
 ACCCCTGAATGTCCATCCCATAACCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTAC  
 AGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAA  
 GGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAG  
 GGTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGA  
 GATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCC  
 ACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAA  
 TCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGG  
 CTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAG  
 CGGCTTCGCTCCAGCCCGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGT  
 GTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCC  
 ATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTG  
 ACCATT (SEQ ID NO:24)。

[0547] 在一个方面,跨膜结构域可以是重组的,在这种情况下,它将主要包含疏水残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一个方面,可以在重组跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0548] 任选地,长度为2至10个氨基酸的短的寡肽或多肽接头可以形成CAR的跨膜结构域

和胞质区之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。例如,在一个方面,接头包含GGGSGGGGS (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头由GGTGGCGAGGTTCTGGAG GTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:19)的核苷酸序列编码。

[0549] 在一个方面,铰链或间隔区包含KIR2DS2铰链。

[0550] 胞质结构域

[0551] CAR的胞质结构域或区域包括胞内信号结构域。胞内信号结构域通常负责激活已经引入CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此术语“胞内信号结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特定功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用整个胞内信号结构域,但在许多情况下,不必使用整个链。就使用胞内信号结构域的截短部分而言,此类截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。术语胞内信号结构域因此意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号结构域的任何截短部分。

[0552] 用于本文所述的CAR的胞内信号结构域的实例包括T细胞受体 (TCR) 的胞质序列和发挥协同作用以在抗原受体衔接后启动信号转导的共同受体,以及这些的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何重组序列。

[0553] 已知通过TCR单独生成的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次要和/或共刺激信号。因此,T细胞活化可以说是由两种不同类型的胞质信号序列介导的:通过TCR (主胞内信号结构域) 引发抗原依赖性主要激活的那些和以抗原独立的方式起作用以提供次要或共刺激信号 (次级胞质结构域,例如共刺激结构域) 的那些。

[0554] 主信号结构域以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合体的主要激活。以刺激方式起作用的主胞内信号结构域可能含有已知为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0555] 在本发明中特别有用的含有主胞内信号结构域的ITAM的实例包括TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个实施方案中,本发明的CAR包含胞内信号结构域,例如CD3 $\zeta$ 的主信号结构域,例如本文所述的CD3 $\zeta$ 序列。

[0556] 在一个实施方案中,主信号结构域包含经修饰的ITAM结构域,例如与天然ITAM结构域相比,具有改变 (例如,增加或减少) 活性的突变的ITAM结构域。在一个实施方案中,主信号结构域包含经修饰的含ITAM的主胞内信号结构域,例如优化和/或截短的含有ITAM的主胞内信号结构域。在一个实施方案中,主信号结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0557] CAR胞内信号结构域本身可以包含CD3 $\zeta$ 信号结构域,或者可以与在本发明的CAR的上下文中有用的任何其它所需的胞内信号结构域组合。例如,CAR的胞内信号结构域可以包含CD3 $\zeta$ 链部分和共刺激信号结构域。共刺激信号结构域是指包含共刺激分子的胞内信号结构域的一部分。共刺激分子是除了抗原受体或配体之外的细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的。这些分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。例如,CD27共刺激已被证明可以增强体外人类CART细胞的扩增,效应子功能和存活,并增强体内人类T细胞的持续性和抗肿瘤活性 (Song等人, Blood. 2012; 119

(3):696-706)。此类共刺激分子的其它实例包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、NKG2D、NKG2C和PAG/Cbp。

[0558] CAR胞质部分内的细胞内信号序列可以以随机或指定的顺序相互连接。任选地,短的寡肽或多肽接头,例如长度在2至10个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)之间的接头可以在细胞内信号序列之间形成连接。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸,甘氨酸可用作合适的接头。

[0559] 在一个方面,胞内信号结构域被设计为包含两个或多个,例如2、3、4、5或更多个共刺激信号结构域。在一个实施方案中,两个或多个,例如2、3、4、5或更多个共刺激信号结构域通过接头分子,例如本文所述的接头分子分开。在一个实施方案中,胞内信号结构域包含两个共刺激信号结构域。在一些实施方案中,接头分子是甘氨酸残基。在一些实施方案中,接头是丙氨酸残基。

[0560] 在一个方面,胞内信号结构域被设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号结构域和CD28的信号结构域。在一个方面,胞内信号结构域被设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号结构域和4-1BB的信号结构域。在一个方面,4-1BB的信号结构域是SEQ ID NO:7的信号结构域。在一个方面,CD3的信号结构域是SEQ ID NO:9的信号结构域。

[0561] 在一个方面,胞内信号结构域被设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号结构域和CD27的信号结构域。在一个方面,CD27的信号结构域包含QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKP EPACSP(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列。在一个方面,CD27的信号结构域由AGGAGTAAGAGGAG CAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT GCCCACCACGCGACTTCGAGCCTATCGCTCC(SEQ ID NO:15)的核酸序列编码。

[0562] CAR与其他分子或药剂的共表达

[0563] 第二CAR的共表达

[0564] 在一个方面,本文所述的CAR表达细胞可以进一步包含第二CAR,例如第二CAR,其包括不同的抗原结合结构域,所述不同的抗原结合结构域例如针对相同的靶标(例如CD19)或不同的靶标(例如不是本文描述的癌相关抗原,例如不是CD19,或者是本文描述的一个不同的癌相关抗原)。在一个实施方案中,第二CAR包括针对癌症相关抗原相同的癌细胞类型表达的靶标的靶抗原结合结构域。在一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CAR,其靶向第一抗原并且包括具有共刺激信号结构域但不是主信号结构域的胞内信号结构域,和第二CAR,其靶向第二种不同抗原并且包括具有主信号结构域但不是共刺激信号结构域的胞内信号结构域。虽然不希望受理论束缚,但是将共刺激信号结构域(例如4-1BB、CD28、CD27、ICOS或OX-40)放置在第一CAR上,并且将主信号结构域例如CD3 $\zeta$ 放置在第二CAR上可以将CAR活性限制在表达两个目标的细胞上。在一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一癌症相

关抗原CAR,其包括结合本文所述的靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激结构域,以及第二CAR,其靶向不同靶抗原的(例如,与第一靶抗原在相同的癌细胞类型上表达的抗原)并且包括抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号结构域。在另一个实施方案中,CAR表达细胞包含第一CAR,其包括结合本文所述的靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号结构域,以及第二CAR,其靶向除第一靶抗原之外的抗原(例如,与第一靶抗原在相同的癌细胞类型上表达的抗原)并且包括针对抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号结构域。

[0565] 在一个实施方案中,CAR表达细胞包含本文所述的XCAR和抑制性CAR。在一个实施方案中,抑制性CAR包含抗原结合结构域,其结合在正常细胞但不是癌细胞(例如也表达X的正常细胞)上发现的抗原。在一个实施方案中,抑制性CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和抑制性分子的胞内结构域。例如,抑制性CAR的胞内结构域可以是PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷或TGFR(例如TGFR $\beta$ )的胞内结构域。

[0566] 在一个实施方案中,当CAR表达细胞包含两种或更多种不同的CAR时,不同CAR的抗原结合结构域可以使得抗原结合结构域彼此不相互作用。例如,表达第一和第二CAR的细胞可以具有第一CAR的抗原结合结构域,例如,不与第二CAR的抗原结合结构域形成结合的片段,例如scFv,例如,第二CAR的抗原结合结构域是VHH。

[0567] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单结构域抗原结合(SDAB)分子,包括其互补决定区是单结构域多肽的一部分的分子。实例包括但不限于重链可变结构域,天然缺乏轻链的结合分子,衍生自常规4-链抗体的单结构域,工程化结构域和除抗体衍生的那些支架以外的单结构域支架。SDAB分子可以是本领域任何一种,或任何未来的单结构域分子。SDAB分子可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、骆马(llama)、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。该术语还包括来自骆驼科和鲨鱼以外的物种的天然存在的单结构域抗体分子。

[0568] 在一个方面,SDAB分子可以衍生自在鱼中发现的免疫球蛋白的可变区,例如衍生自在鲨鱼血清中发现的称为新型抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型的SDAB分子。产生衍生自NAR可变区(“IgNAR”)的单结构域分子的方法描述于WO 03/014161和Streltsov(2005) Protein Sci.14:2901-2909。

[0569] 根据在另一方面,SDAB分子是天然存在的单结构域抗原结合分子,已知是无轻链的重链。这样的单结构域分子公开在WO 9404678和Hamers-Casterman,C.等人,(1993) Nature 363:446-448。为了清楚起见,衍生自天然缺乏轻链的重链分子的这种可变结构域在本文中称为VHH或纳米抗体,以将其与四链免疫球蛋白的常规VH区分开。这样的VHH分子可以衍生自骆驼科(Camelidae)物种,例如骆驼、骆马、单峰骆驼、羊驼和大羊驼。除骆驼科之外的其他物种可能产生天然缺乏轻链的重链分子;这样的VHH在本发明的范围内。

[0570] SDAB分子可以是重组的、CDR-移植的、人源化的、骆驼化的、去免疫的和/或体外产生的(例如通过噬菌体展示来选择)。

[0571] 还已经发现,具有多个嵌合膜包埋的受体(所述受体包含在所述受体的抗原结合结构域之间的相互作用的抗原结合结构域)的细胞可能是不期望,例如因为其抑制一种或

多种抗原结合结构域结合其相应抗原的能力。因此,本文公开了具有第一和第二非天然存在的嵌合膜包埋的受体的细胞,所述受体包含使这种相互作用最小化的抗原结合结构域。本文还公开了编码第一和第二非天然存在的嵌合膜包埋的受体的核酸,所述受体包含使这种相互作用最小化的抗原结合结构域,以及制备和使用这些细胞和核酸的方法。在一个实施方案中,第一和第二非天然存在的嵌合膜包埋的受体之一的抗原结合结构域包含scFv,另一个包含单个VH结构域,例如骆驼科动物、鲨鱼或七鳃鳗单个VH结构域,或衍生自人或小鼠序列的单个VH结构域。

[0572] 在一些实施方案中,细胞包含第一和第二CAR,其中第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域不包含可变轻链结构域和可变重链结构域。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域是scFv,另一个不是scFv。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含单个VH结构域,例如骆驼科动物、鲨鱼或七鳃鳗单个VH结构域,或来源于人或小鼠序列的单个VH结构域。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含纳米抗体。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含骆驼科VHH结构域。

[0573] 在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,另一个包含单个VH结构域,例如骆驼科动物、鲨鱼或七鳃鳗单个VH结构域,或衍生自人或小鼠序列的单个VH结构域。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,另一个包含纳米抗体。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR之一的抗原结合结构域包含scFv,另一个包含骆驼科VHH结构域。

[0574] 在一些实施方案中,当存在于细胞表面时,第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原的结合基本上不因第二CAR的存在而降低。在一些实施方案中,在第二CAR的存在下,第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原的结合是在第二CAR不存在下第一CAR的抗原结合结构域与其相应抗原结合的85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0575] 在一些实施方案中,当存在于细胞表面时,第一CAR和第二CAR的抗原结合结构域彼此相互缔合要少于两者都是scFv抗原结合结构域的情况。在一些实施方案中,第一CAR和第二CAR的抗原结合结构域彼此相互缔合比两者都是scFv抗原结合结构域的相互缔合少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0576] 增强CAR活性的药剂的共表达

[0577] 在另一方面,本文所述的CAR表达细胞可以进一步表达另一种药剂,例如增强CAR表达细胞活性的药剂。

[0578] 例如,在一个实施方案中,所述药剂可以是抑制调控或调节(例如抑制)T细胞功能的分子的药剂。例如,在一个实施方案中,所述药剂可以是抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如PD1可以降低CAR表达细胞产生免疫效应物应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、从2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM或CD270)、KIR、A2aR、I类MHC、II类MHC、GAL9、腺苷或TGFR $\beta$ 。

[0579] 在一个实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,成簇的规则间隔的短回文重复序列(CRISPR),转录激活剂如效应核酸酶(TALEN)或锌指内切核酸酶(ZFN)(例如,如本文所述)可用于抑制调控或调节,例如抑制CAR表达细胞

中的T细胞功能的分子的表达。在一个实施方案中,所述药剂是shRNA,例如本文所述的shRNA。在一个实施方案中,调控或调节例如抑制T细胞功能的药剂在CAR表达细胞内被抑制。例如,抑制调控或调节例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子与编码CAR的组分(例如所有组分)的核酸连接。

[0580] 在一个实施方案中,编码抑制调控或调节例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子有效连接到启动子,例如H1-或U6衍生的启动子,使得抑制调控或调节例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子被表达,例如在表达CAR的细胞内表达。参见例如Tiscornia G,“Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA,”第3章,在Gene Transfer:Delivery and Expression of DNA and RNA(Friedmann and Rossi编).Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA,2007;Brummelkamp TR等人,(2002)Science 296:550-553;Miyagishi M等人,(2002)Nat.Biotechnol.19:497-500。在一个实施方案中,编码抑制调控或调节,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子存在于相同的载体上,例如包含编码CAR的组分,例如所有组件的核酸分子的慢病毒载体上。在这样的实施方案中,编码抑制调控或调节,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子位于载体上,例如慢病毒载体上,编码CAR的组分,例如所有组件的核酸的5'-或3'。编码抑制调控或调节,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子可以以与编码CAR的组分,例如所有组件的核酸相同或不同的方向转录。在一个实施方案中,编码抑制调节或调整,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子存在于除包含编码CAR的组分,例如所有组件的核酸分子的载体之外的载体上。在一个实施方案中,编码抑制调节或调整,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子在表达CAR的细胞内瞬时表达。在一个实施方案中,编码抑制调节或调整,例如抑制T细胞功能的分子表达的dsRNA分子的核酸分子稳定地整合到CAR表达细胞的基因组中。在一个实施方案中,调节或调整例如抑制T细胞功能的分子是PD1。

[0581] 在一个实施方案中,抑制抑制性分子的药剂包含与第二多肽结合的第一多肽,例如抑制性分子,所述第二多肽向细胞提供阳性信号,例如,本文所述的胞内信号结构域。在一个实施方案中,该药剂包含例如抑制性分子的第一多肽,所述抑制性分子为例如PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷或TGF $\beta$ 或这些任何一种的片段(例如,这些任一个的细胞外结构域的至少一部分),和第二多肽,尤其是本文所述的胞内信号结构域(例如,包含共刺激结构域(例如,41BB、CD27或CD28,例如本文所述)和/或主信号结构域(例如本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域)。在一个实施方案中,所述药剂包含PD1的第一多肽或其片段(例如,PD1的细胞外结构域的至少一部分)和本文所述的胞内信号结构域的第二多肽(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域)。PD1是受体CD28家族的抑制性成员,该家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata等人,1996Int.Immunol 8:765-75)。已经显示PD1的两个配体PD-L1和PD-L2在结合PD1后下调T细胞活化(Freeman等人,2000J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人,2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter等人,2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中是丰富的(Dong等人,2003 J Mol Med 81:281-7;Blank等人,2005 Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人,2004 Clin

Cancer Res 10:5094)。通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制。

[0582] 在一个实施方案中,所述药剂包含抑制性分子(例如程序性死亡1(PD1))的胞外结构域(ECD),其与跨膜结构域和胞内信号传导结构域如41BB和CD3ζ(在本文中也称为PD1 CAR)融合。在一个实施方案中,当与本文所述的XCAR组合使用时,PD1 CAR改善了T细胞的持久性。在一个实施方案中,CAR是包含SEQ ID NO:105中下划线所示的PD1的胞外结构域的PD1 CAR。在一个实施方案中,PD1 CAR包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列。

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatfcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqp  
gqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprprptpaptiasq  
[0583] plslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpeeeeggcelrvkfsr  
sadapaykqqnqlynelnlgrreedyvldkrrrdpempgkprknpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstat  
kdydalhmqalppr (SEQ ID NO:105)。

[0584] 在一个实施方案中,PD1 CAR包含下面提供的氨基酸序列(SEQ ID NO:106)。

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatfcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpqdcfrvtqlpngrdfhms  
vvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr  
[0585] gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpeeeeggcelrvkfsradapaykqqnqlynel  
nlgrreedyvldkrrrdpempgkprknpqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr  
(SEQ ID NO:106)。

[0586] 在一个实施方案中,所述药剂包含编码PD1 CAR,例如本文所述的PD1 CAR的核酸序列。在一个实施方案中,PD1 CAR的核酸序列如下所示,其中PD1 ECD在下面的SEQ ID NO:103中加下划线。

atggcctccctgtcactgccctgcttccccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggttctggaactcctccggatcgc  
ccgtggaatcccccaacctctcaccggcactcttggtgtgactgaggcgataatgacacctcactgctcgttccaacacctccgaatcattc  
gtgctgaactggtaccgatgagcccgtaaacagaccgacaagctcggcgttccggaagatcgctcgaaccgggacagattgctgggt  
ccgctgactcaactgccgaatggcagagactccacatgagcgtggtccgctagcgaaacgactccgggacactctgctggagccatct  
[0587] cgctggcgccctaaaggcccaaatcaaaagagagctgagggccgaactgagagtaccgagcgcagagctgaggtccaactgcacatccatccc  
atcgctcctggcctcggggcagttcagacctggtcagcaccactcggcgccgcgccaccgactccggcccaactatcgagaccagccc  
ctgtcgtgaggccggaagcatgccgccctgccgccggaggtgctgtgcataccggggattggacttcgatcgacatctacattgggctcctc  
tcgccggaactgtggcgtgctccttctgctccctggtcatcacctgtactgcaagcggggtcgaaaaagcttctgtacatttcaagcagccctcat  
gaggccctgcaaacaccaccaggaggaggacggtgctcctcgggttccccgaagaggaagaaggaggtgagctgcgcgtgaagtctcc  
cggagcgcggcagccccgcctataagcaggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgctgga  
caagcggcgcggcgggacccccgaaatggcgggaagcctagaagaaagaacctcagggaagcctgtataacgagctgcagaaggacaag  
[0588] atggccgaggcctactccgaaattgggatgaaggagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgcccac  
caaggacacatacagatgccctgcacatgcaggccctccccctcgc (SEQ ID NO:103)。

[0589] 在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是例如结合抑制性分子的抗体或抗体片段。例如,所述作用剂可以为结合PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4的抗体或抗体片段(例如ipilimumab(也称为MDX-010和MDX-101,且作为Yervoy®销售;Bristol-Myers Squibb;替西木单抗(Tremelimumab)(IgG2单克隆抗体,得自Pfizer,之前被称为ticilimumab,CP-675,206))。在一个实施方案中,作用剂是结合TIM3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,作用剂是结合LAG3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,作用剂是结合CEACAM(例如,

CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)的抗体或抗体片段。在实施方案中,增强CAR表达细胞的活性的药剂(例如抑制性分子抑制剂)与同种异体CAR(例如本文所述的同种异体CAR)(例如本文同种异体CAR部分)联合施用。

[0590] PD1为CD28受体家族的抑制性成员,该受体家族也包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata等人1996 Int.Immunol 8:765-75)。PD1的两个配体PD-L1和PD-L2已经显示出当结合PD1时下调T细胞活化(Freeman等人,2000 J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人2001 Nat Immunol 2:261-8;Carter等人2002 EurJ Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中丰富地存在(Dong等人2003J Mol Med 81:281-7;Blank等人2005 Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人2004Clin Cancer Res 10:5094)。可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用来逆转免疫抑制。

[0591] 抗体、抗体片段及PD1、PD-L1和PD-L2的其它抑制剂是本领域已知,并且可以与本文所述的CD19 CAR联合使用。例如,nivolumab(也称为BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是一种完全人类IgG4单克隆抗体,其特异性地阻断PD1。Nivolumab(克隆5C4)及特异性地结合PD1的其他人类单克隆抗体公开在US 8,008,449和WO2006/121168中。Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)是一种结合PD1的人源化的IgG1k单克隆抗体。Pidilizumab及其它人源化的抗PD1单克隆抗体公开在WO2009/101611中。Pembrolizumab(之前称为lambrolizumab,也称为Keytruda,MK03475;Merck)是一种结合PD1的人源化的IgG4单克隆抗体。pembrolizumab及其它人源化的抗PD1抗体公开在US 8,354,509和WO2009/114335中。MEDI4736(Medimmune)是一种人类单克隆抗体,其结合PDL1,并且抑制配体与PD1的相互作用。MDPL3280A(Genentech/Roche)是一种结合PD-L1的人类Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A及其它针对PD1的人类单克隆抗体公开在美国专利号:7,943,743和美国公开号:20120039906中。其它抗PD-L1结合剂包括YW243.55.S70(重链和轻链可变区显示在WO2010/077634中的SEQ ID NOs 20和21中)和MDX-1105(也称为BMS-936559,及例如WO2007/005874中公开的抗PD-L1结合剂)。AMP-224(B7-DCIg;Amplimmune;例如WO2010/027827和WO2011/066342中公开的)是一种阻断PD1和B7-H1之间的相互作用的PD-L2 Fc融合可溶性受体。其它抗PD1抗体包括AMP 514(Amplimmune)等,尤其例如US 8,609,089、US 2010028330和/或US 20120114649中公开的抗PD1抗体。

[0592] 在一些实施方案中,本文所述的PD1抑制剂(例如,PD1抗体,例如本文所述的PD1抗体)与本文所述的CD19 CAR联合用于治疗与CD19表达相关的疾病。在一些实施方案中,本文所述的PD-L1抑制剂(例如,PD-L1抗体,例如本文所述的PD-L1抗体)与本文所述的CD19 CAR联合用于治疗与CD19表达相关的疾病。该疾病可以是例如淋巴瘤如包括原发性DLBCL或继发性DLBCL的DLBCL。在一些实施方案中,受试者具有或被鉴定为具有至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的癌细胞,例如DLBCL细胞,其是CD3+/PD1+。在一些实施方案中,受试者具有或被鉴定为具有在癌症(例如癌症微环境)中基本上不重叠的CD19+细胞和PD-L1+细胞群体。例如,在一些实施方案中,癌症(癌症微环境)中小于20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的细胞,对于CD19和PD-L1是双重阳性的。

[0593] 在一些实施方案中,用CD19 CAR、PD1抑制剂和PD-L1抑制剂的组合治疗受试者。在一些实施方案中,用CD19 CAR、PD1抑制剂和CD3抑制剂的组合治疗受试者。在一些实施方案

中,用CD19 CAR、PD1抑制剂、PD-L1抑制剂和CD3抑制剂的组合治疗受试者。

[0594] 在一些实施方案中,本文的方法包括测定生物样品(例如包含DLBCL细胞的样品)中的细胞的CD3和/或PD-1(例如,CD3和/或PD-1表达)的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括测定生物样品(例如包含DLBCL细胞的样品)中的细胞的CD19和/或PD-L1(例如CD19和/或PD-L1表达)的步骤。在一些实施方案中,所述方法包括例如提供包含癌细胞的样品,并且例如通过免疫组织化学对CD3、PD-1、CD19或PD-L1中的一种或多种进行检测步骤。该方法可以包括推荐或施用治疗的另一个步骤,例如包含CD19 CAR的治疗。

[0595] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体或其片段是抗PD-1抗体分子在US2015/0210769中描述,名称为“Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof”,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包括来自选自以下的任何抗体的抗体的重链和轻链可变区的至少1、2、3、4、5或6个CDR(或合起来全部CDR):BAP049-hum01,BAP049-hum02,BAP049-hum03,BAP049-hum04,BAP049-hum05,BAP049-hum06,BAP049-hum07,BAP049-hum08,BAP049-hum09,BAP049-hum10,BAP049-hum11,BAP049-hum12,BAP049-hum13,BAP049-hum14,BAP049-hum15,BAP049-hum16,BAP049-Clone-A,BAP049-Clone-B,BAP049-Clone-C,BAP049-Clone-D,或者BAP049-Clone-E;或如US2012/0210769的表1中所述,或由表1中的核苷酸序列编码,或与任何上述序列基本上同一(例如,至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高的同一性);或紧密相关的CDR,例如相同或具有至少一个氨基酸改变但不超过2、3或4个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0596] 在又一实施方案中,抗PD-1抗体分子包含来自本文所述的抗体的至少一个、两个、三个或四个可变区,例如,选自以下任何抗体BAP049-hum01,BAP049-hum02,BAP049-hum03,BAP049-hum04,BAP049-hum05,BAP049-hum06,BAP049-hum07,BAP049-hum08,BAP049-hum09,BAP049-hum10,BAP049-hum11,BAP049-hum12,BAP049-hum13,BAP049-hum14,BAP049-hum15,BAP049 B160-Clone-A,BAP049-Clone-B,BAP049-Clone-C,BAP049-Clone-D或BAP049-Clone-E;或如US2012/0210769的表1所述,或由表1中的核苷酸序列编码;或与任何上述序列基本上同一(例如,至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性)的序列。

[0597] TIM-3(T细胞免疫球蛋白-3)也负向调节T细胞功能,特别是在IFN- $\gamma$ -分泌CD4<sup>+</sup> T辅助细胞1和CD8<sup>+</sup> T细胞毒1细胞中,并且在T细胞消耗中起关键作用。抑制TIM3及其配体(例如半乳凝素-9(Gal9)、磷脂酰丝氨酸(PS)和HMGB1)之间的相互作用可以提高免疫应答。TIM3及其配体的抗体、抗体片段及其它抑制剂是本领域可获得的,并且可以与本文所述CD19 CAR联合使用。例如,靶向TIM3的抗体、抗体片段、小分子或肽抑制剂结合TIM3的IgV结构域,以抑制与其配体的相互作用。抑制TIM3的抗体和肽公开在W02013/006490和US20100247521中。其它抗TIM3抗体包括RMT3-23的人源化形式(公开在Ngiow等人,2011,Cancer Res,71:3540-3551中)和克隆8B.2C12(公开在Monney等人,2002,Nature,415:536-541)中。抑制TIM3和PD1的双特异性抗体公开在US20130156774中。

[0598] 在一个实施方案中,抗TIM3抗体或其片段是标题为“Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof”的美国专利2015/0218274(其全部内容通过引用并入本文)中所述的抗TIM3抗体分子。在一个实施方案中,抗TIM3抗体分子包括来自抗体的重链和轻链可变区的至少一个,二个,三个,四个,五个或六个CDR(或统称为所有CDR),所述抗体选自

ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABTIM3-hum08、ABTIM3-hum09、ABTIM3-hum10、ABTIM3-hum11、ABTIM3-hum12、ABTIM3-hum13、ABTIM3-hum14、ABTIM3-hum15、ABTIM3-hum16、ABTIM3-hum17、ABTIM3-hum18、ABTIM3-hum19、ABTIM3-hum20、ABTIM3-hum21、ABTIM3-hum22、ABTIM3-hum23的任一个；或如US 2015/0218274的表1-4所述；或由表1-4中的核苷酸序列编码；或与任何前述序列基本上同一（例如至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性）的序列或密切相关的CDR，例如，相同或具有至少一个氨基酸改变但不超过两个、三个或四个改变（例如，取代、缺失或插入，例如保守取代）的CDR。

[0599] 在另一个实施方案中，抗TIM3抗体分子包含来自本文所述抗体的至少一个、两个、三个或四个可变区，所述抗体例如选自ABTIM3、ABTIM3-hum01、ABTIM3-hum02、ABTIM3-hum03、ABTIM3-hum04、ABTIM3-hum05、ABTIM3-hum06、ABTIM3-hum07、ABTIM3-hum08、ABTIM3-hum09、ABTIM3-hum10、ABTIM3-hum11、ABTIM3-hum12、ABTIM3-hum13、ABTIM3-hum14、ABTIM3-hum15、ABTIM3-hum16、ABTIM3-hum17、ABTIM3-hum18、ABTIM3-hum19、ABTIM3-hum20、ABTIM3-hum21、ABTIM3-hum22、ABTIM3-hum23的任一个；或如US 2015/0218274的表1-4所述；或由表1-4中的核苷酸序列编码；或与前述任何序列基本上同一（例如，至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性）的序列。

[0600] 在其它实施方案中，提高表达CAR的细胞的活性的作用剂是CEACAM抑制剂（例如，CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5抑制剂）。在一个实施方案中，CEACAM的抑制剂是抗CEACAM抗体分子。示例性的抗CEACAM抗体分子被描述在WO 2010/125571、WO 2013/082366、WO 2014/059251和WO 2014/022332中，例如单克隆抗体34B1、26H7和5F4；或其重组形式，如被描述在例如US2004/0047858、US 7,132,255和WO 99/052552中。在其它实施方案中，抗CEACAM抗体结合CEACAM-5，如在例如Zheng等人，PLoS One.2010Sep 2;5(9).pii:e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146)中所述，或与CEACAM-1和CEACAM-5交叉反应，如在例如WO 2013/054331和US2014/0271618中所述。

[0601] 不希望受到理论的束缚，癌胚抗原细胞粘附分子（CEACAM）比如CEACAM-1和CEACAM-5被认为至少部分地介导、抑制抗肿瘤免疫应答（参见，例如Markel等人，J Immunol.2002年3月15日；168(6):2803-10；Markel等人，J Immunol.2006Nov 1;177(9):6062-71；Markel等人，Immunology.2009Feb;126(2):186-200；Markel等人，Cancer Immunol Immunother.2010Feb;59(2):215-30；Ortenberg等人，Mol Cancer Ther.2012 Jun;11(6):1300-10；Stern等人，J Immunol.2005 Jun 1;174(11):6692-701；Zheng等人，PLoS One.2010 Sep 2;5(9).pii:e12529）。例如，CEACAM-1已经被描述为TIM-3的异嗜性配体且在TIM-3-介导的T细胞耐受性和消耗中起作用（参见，例如WO 2014/022332；Huang等人（2014）Nature doi:10.1038/nature13848）。在实施方案中，在异种移植结肠直肠癌模型中，CEACAM-1和TIM-3的共同阻断已经显示出增强抗肿瘤免疫应答（参见，例如WO 2014/022332；Huang等人，（2014），同上）。在其它实施方案中，CEACAM-1和PD1的共同阻断减低了T细胞耐受性，如例如WO 2014/059251中所述。因此，CEACAM抑制剂可以与本文所述其它免疫调节剂（例如，抗PD1和/或抗TIM-3抑制剂）一起用于增强针对癌症，例如黑素瘤、肺癌（例如NSCLC）、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌及如本文所述的其它癌症的免疫应答。

[0602] LAG-3（淋巴细胞活化基因-3或CD223）是在活化的T细胞和B细胞上表达的细胞表

面分子,其已经显示在CD8+ T细胞消耗中起作用。LAG-3及其配体的抗体、抗体片段及其它抑制剂是本领域可获得的,并且可以与本文所述CD19 CAR联合使用。例如,BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb)是一种靶向LAG-3的单克隆抗体。IMP701 (Immutep)是一种拮抗剂LAG3抗体,并且IMP731 (Immutep和GlaxoSmithKline)是一种消耗LAG-3的抗体。其它LAG-3抑制剂包括IMP321 (Immutep),其为LAG3和Ig的可溶性部分的重组融合蛋白,其结合II类MHC分子且活化抗原呈递细胞(APC)。其它抗体被公开在例如W02010/019570中。

[0603] 在一个实施方案中,抗LAG3抗体或其片段是如名称为“Antibody Molecules to LAG3 and Uses Thereof”的US2015/0259420中所述的抗LAG3抗体分子,其通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,抗LAG3抗体分子包含来自选自以下的抗体的重链和轻链可变区的至少一个,两个,三个,四个,五个或六个CDR(或合起来全部CDR):BAP050-hum02,BAP050-hum03,BAP050-hum04,BAP050-hum05,BAP050-hum06,BAP050-hum07,BAP050-hum08,BAP050-hum09,BAP050-hum10,BAP050-hum11,BAP050-hum12,BAP050-hum13,BAP050-hum14,BAP050-hum15,BAP050-hum16,BAP050-hum17,BAP050-hum18,BAP050-hum19,BAP050-hum20,huBAP050(Ser)(例如BAP050-hum01-Ser,BAP050-hum02-Ser,BAP050-hum03-Ser,BAP050-hum04-Ser,BAP050-hum05-Ser,BAP050-hum06-Ser,BAP050-hum07-Ser,BAP050-hum08-Ser,BAP050-hum09-Ser,BAP050-hum10-Ser,BAP050-hum11-Ser,BAP050-hum12-Ser,BAP050-hum13-Ser,BAP050-hum14-Ser,BAP050-hum15-Ser,BAP050-hum18-Ser,BAP050-hum19-Ser或BAP050-hum20-Ser),BAP050-Clone-F,BAP050-Clone-G,BAP050-Clone-H,BAP050-Clone-I或BAP050-Clone-J;或如US2015/0259420的表1中所述;或由表1中的核苷酸序列编码;或与任何上述序列基本上同一(例如,至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性)或紧密相关的CDR例如,相同或者具有至少一个氨基酸改变但不超过2、3或4个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0604] 在又一个实施方案中,抗LAG3抗体分子包含来自本文所述抗体的至少一个、两个、三个或四个可变区,例如选自BAP050-hum01,BAP050-hum02,BAP050-hum03,BAP050-hum05,BAP050-hum06,BAP050-hum07,BAP050-hum08,BAP050-hum09,BAP050-hum10,BAP050-hum11,BAP050-hum12,BAP050-hum13,BAP050-hum14,BAP050-hum15,BAP050-hum16,BAP050-hum01-Ser,BAP050-hum02-Ser,BAP050-hum03-Ser,BAP050-hum04-Ser,BAP050-hum04,BAP050-hum17,BAP050-hum18,BAP050-hum19,BAP050-hum20,huBAP050-hum05-Ser,BAP050-hum06-Ser,BAP050-hum07-Ser,BAP050-hum08-Ser,BAP050-hum09-Ser,BAP050-hum10-Ser,BAP050-hum11-Ser,BAP050-hum12-Ser,BAP050-hum13-BAP050-hum14-Ser,BAP050-hum15-Ser,BAP050-hum18-Ser,BAP050-hum19-Ser或BAP050-hum20-Ser),BAP050-Clone-F,BAP050-Clone-G,BAP050-Clone-H,BAP050-Clone-I或BAP050-Clone-J;或如US2015/0259420的表1中所述;或由表1中的核苷酸序列编码;或与任何上述序列基本上同一(例如,至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性)的序列。

[0605] 在另一个实例中,在一个实施方案中,增强CAR表达细胞活性的试剂可以是共刺激分子或共刺激分子配体。共刺激分子的实例包括MHC I类分子,TNF受体蛋白,免疫球蛋白样蛋白,细胞因子受体,整联蛋白,信号转导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白),激活NK细胞受体,

BTLA, Toll配体受体, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-CD278, GIIR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL2R $\beta$ , IL2R $\gamma$ , IL7R $\alpha$ , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, S LP-76, PAG/Cbp, CD19a和与CD83特异性结合的配体, 例如如本文所述。共刺激分子配体的实例包括CD80、CD86、CD40L、ICOSL、CD70、OX40L、4-1BBL、GITRL和LIGHT。在实施方案中, 共刺激分子配体是不同于CAR的共刺激分子结构域的共刺激分子的配体。在实施方案中, 共刺激分子配体是与CAR的共刺激分子结构域相同的共刺激分子的配体。在一个实施方案中, 共刺激分子配体是4-1BBL。在一个实施方案中, 共刺激配体是CD80或CD86。在一个实施方案中, 共刺激分子配体是CD70。在实施方案中, 可以进一步改造本文所述的表达CAR的免疫效应细胞以表达一种或多种另外的共刺激分子或共刺激分子配体。

[0606] 在另一方面, 本公开特征在于CAR表达细胞的群体, 例如CART细胞的群体。在一些实施方案中, CAR表达细胞群体包含表达不同CAR的细胞的混合物。

[0607] 例如, 在一个实施方案中, CART细胞群体可以包括表达具有针对本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的CAR的第一细胞和表达具有不同抗原结合结构域的CAR的第二细胞, 所述不同抗原结合结构域为例如针对本文所述的不同的癌症相关抗原的抗原结合结构域, 例如针对本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域, 该抗原结合结构域与由第一细胞表达的CAR的抗原结合结构域结合的癌症相关抗原不同。

[0608] 作为另一个实例, CAR表达细胞的群体可以包括表达CAR的第一细胞, 该CAR包括针对本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域, 以及表达CAR的第二个细胞, 该CAR包含针对不同于本文所述的癌症相关抗原的靶标的抗原结合结构域。在一个实施方案中, CAR表达细胞的群体包括例如第一细胞和第二细胞, 第一细胞表达包含主胞内信号结构域的CAR, 第二细胞表达包含次要信号结构域的CAR。

[0609] 在另一方面, 本公开特征在于细胞群体, 其中群体中的至少一个细胞表达具有针对本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的CAR, 以及表达另一种药剂, 例如增强CAR表达细胞的活性的药剂的第二细胞。例如, 在一个实施方案中, 所述药剂可以是抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中, 抑制性分子例如PD-1可以降低CAR表达细胞引起免疫效应应答的能力。抑制性分子的实例包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGF $\beta$ 。在一个实施方案中, 抑制抑制性分子的药剂包含第一多肽 (例如抑制性分子), 其与向细胞提供阳性信号的第二多肽 (例如, 本文所述的胞内信号结构域) 结合。在一个实施方案中, 该药剂包含第一多肽, 例如抑制性分子如PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3、和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGF $\beta$ , 或这些任何一种的片段的第一多肽, 以及作为本文所述胞内信号结构域的第二多肽 (例如, 包含共刺激结构域 (例如, 41BB, CD27, OX40或CD28, 例如本文所述) 和/或主信号结构域 (例如, 本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域)。在一个实施方案中, 该药剂包含PD-1的第一多肽或其片段, 和本文描述的胞内信号

结构域的第二多肽(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域)。

#### [0610] 编码CAR的核酸构建体

[0611] 本发明还提供免疫效应细胞,例如通过本文所述的方法制备的免疫效应细胞,其包括编码本文所述的一种或多种CAR构建体的核酸分子。在一个方面,提供核酸分子作为信使RNA转录物。在一个方面,提供核酸分子作为DNA构建体。在一个方面,核酸分子作为DNA构建体提供。本文所述的核酸分子可以是DNA分子、RNA分子或其组合。在其他实施方案中,核酸分子是包括任何前述核酸分子的载体。

[0612] 在一个方面,本发明的CAR的抗原结合结构域(例如,scFv)由核酸分子编码,其序列已被密码子优化用于在哺乳动物细胞中表达。在一个方面,本发明的整个CAR构建体由核酸分子编码,其整个序列已被密码子优化以在哺乳动物细胞中表达。密码子优化是指发现编码DNA中同义密码子(即编码相同氨基酸的密码子)的发生频率在不同物种中是有偏好的。这种密码子简并允许相同的多肽由多种核苷酸序列编码。多种密码子优化方法是本领域已知的,并且包括例如至少在美国专利号5,786,464和6,114,148中公开的方法。

[0613] 因此,在一个方面,例如通过本文所述的方法制备的免疫效应细胞包括编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸分子,其中CAR包含与本文所述的肿瘤抗原结合的抗原结合结构域,跨膜结构域(例如,本文所述的跨膜结构域)以及包含刺激结构域的胞内信号结构域(例如,本文所述的胞内信号结构域),例如共刺激信号结构域(例如,本文所述的共刺激信号结构域)和/或主信号结构域(例如,本文描述的主信号结构域,例如本文所述的 $\zeta$ 链)。

[0614] 本发明还提供载体,其中插入了编码CAR的核酸分子(例如本文所述的核酸分子)。衍生自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体相对于衍生自癌逆转录病毒例如鼠白血病病毒的载体具有附加的优点,因为它们可以转导非增殖细胞,例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的附加优点。逆转录病毒载体也可以是例如 $\gamma$ 逆转录病毒载体。 $\gamma$ 逆转录病毒载体可以包括例如启动子,包装信号( $\psi$ ),引物结合位点(PBS),一个或多个(例如两个)长末端重复序列(LTR)和感兴趣的转基因,例如编码CAR的基因。 $\gamma$ 逆转录病毒载体可能缺乏病毒结构,如gag、pol和env。示例性的 $\gamma$ 逆转录病毒载体包括鼠白血病病毒(MLV),脾脏病灶形成病毒(SFFV)和骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)以及由其衍生的载体。其他 $\gamma$ 逆转录病毒载体描述于例如Tobias Maetzig等人,“Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application”*Viruses*. 2011 Jun; 3(6): 677-713。

[0615] 在另一个实施方案中,包含编码所需CAR的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,编码CAR的核酸的表达可以使用转座子如睡美人(sleeping beauty), crisper, CAS9和锌指核酸酶来完成。参见June等人, 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716, 其通过引用并入本文。

[0616] 载体还可以包括例如促进分泌的信号序列,聚腺苷酸化信号和转录终止子(例如,来自牛生长激素(BGH)基因)),允许在原核生物中进行附加型复制和复制的元件(例如SV40原点 and Co1E1或本领域已知的其他元件)和/或允许选择的元件(例如,氨基青霉素抗性基因和/或zeocin标记)。

[0617] 总之,编码CAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸有效连接至启动子,并将构建体掺入表达载体中来实现。载体可以适用于复制和整合真核

生物。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子,引发序列和可用于调节所需核酸序列表达的启动子。

[0618] 核酸可以克隆到多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体,复制载体,探针产生载体和测序载体。

[0619] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是众所周知的,并且描述于例如Sambrook等人,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,1-4册,Cold Spring Harbor Press,NY)和其他病毒学和分子生物学手册。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒,腺病毒,腺伴随病毒,疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含在至少一个生物体中起作用的复制起点,启动子序列,方便的限制性内切核酸酶位点和一个或多个可选择标记(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0620] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便利的平台。可以使用本领域已知的技术将所选择的基因插入载体并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以将重组病毒分离并在体内或离体递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0621] 额外的启动子元件,例如增强子调节转录起始的频率。通常,它们位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管许多启动子也显示在起始位点的下游含有功能元件。启动子元件之间的间隔通常是柔性的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能被保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间距可以增加至50bp。取决于启动子,似乎单个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。示例性启动子包括CMV IE基因、EF-1 $\alpha$ 、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在一个实施方案中,启动子是PGK启动子,例如本文所述的截短的PGK启动子。

[0622] 能够在哺乳动物T细胞中表达CAR编码核酸分子的启动子的实例是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动延伸因子-1复合体的 $\alpha$ 亚基的表达,所述复合体负责将氨酰基tRNA酶促递送至核糖体。EF1a启动子已被广泛用于哺乳动物表达质粒,并且已被证明能有效驱动克隆到慢病毒载体中的核酸分子的CAR表达。参见,例如,Milone等人,Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)。在一个方面,EF1a启动子包含实施例提供的序列。

[0623] 启动子的另一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动与其有效连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。然而,也可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EB病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子,以及人基因启动子,例如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1  $\alpha$ 启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。也可以考虑诱导型启动子作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,当期望这种表达时,所述分子开关能够启动有效连接的多核苷酸序列的表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0624] 启动子的另一个实例是磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子。在实施方案中,可能想要的是截短的PGK启动子 (例如,当与野生型PGK启动子序列比较时,具有一个或多个,例如1、2、5、10、100、200、300或400个核苷酸缺失的PGK启动子)。示例性PGK启动子的核苷酸序列在下面提供。WT PGK启动子:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTC  
CGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGG  
GGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGG  
CGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCA  
[0625] GACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGG  
CGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTCCTCA  
TCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGC  
CGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCC  
GACGGAACCTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO:357)

[0626] 示例性截短的PGK启动子:

[0627] PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTC  
[0628] CGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG (SEQ  
ID NO: 358)

[0629] PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTC  
CGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGG  
[0630] GCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGG  
CGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG (SEQ ID NO:359)

[0631] PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTC  
CGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGG  
GGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGG  
[0632] CGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCA  
GACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGG  
CGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCG (SEQ ID NO:360)

[0633] PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGG  
CCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG  
TGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTC  
GGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGG  
[0634] CAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTT  
GGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTC  
CATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCA  
GCCG (SEQ ID NO:361)

[0635] 载体还可以包括例如促进分泌的信号序列,聚腺苷酸化信号和转录终止子(例如,来自牛生长激素(BGH)基因)),允许在原核生物中进行附加型复制和复制的元件(例如SV40原点和ColE1或本领域已知的其他元件)和/或允许选择的元件(例如,氨苄青霉素抗性基因和/或zeocin标记)。

[0636] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,待引入细胞的表达载体还可以含有选择性标记基因或报告基因或这两者,以便于从细胞群体中鉴定和选择试图通过病毒载体转染或感染的表达细胞。在其他方面,选择标记可以携带在单独的DNA片段上并用于共转染过程。选择性标记和报告基因均可以在侧翼有适当的调控序列以使得能够在宿主细胞中表达。有用的选择标记包括例如抗生素抗性基因,例如neo等。

[0637] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评估调节序列的功能性。通常,报告基因是不存在于受体生物或组织中或不由受体生物或组织表达的基因,并且其编码多肽,该多肽的表达由一些易于检测的性质(例如酶活性)表现。在DNA被引入受体细胞后的合适时间内测定报告基因的表达。合适的报告基因可以包括编码萤光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000 FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的,并且可以使用已知技术制备或从商业上获得。通常,具有显示报告基因最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区域可以连接到报告基因,并用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0638] 在实施方案中,载体可以包含两个或更多个核酸序列,其编码CAR,例如本文所述的CAR,例如CD19 CAR;和第-二CAR,例如抑制性CAR或特异性结合CD19以外的抗原的CAR。在这样的实施方案中,编码CAR的两个或多个核酸序列由相同框中的单个核酸分子编码和作为单个多肽链编码。在这方面,两个或更多个CAR可以例如被一个或多个肽切割位点分开(例如,自身切割位点或细胞内蛋白酶的底物)。肽切割位点的实例包括T2A,P2A,E2A或F2A位点。

[0639] 将基因导入细胞和在其中表达的方法是本领域已知的。在表达载体的上下文中,可以通过本领域任何方法,将载体容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可以通过物理、化学或生物学方式转移到宿主细胞中。

[0640] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、微粒轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。参见例如Sambrook等人,2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,1-4册,Cold Spring Harbor Press,NY)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选的方法是磷酸钙转染。

[0641] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入到哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可衍生自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等。参见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0642] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,例如大分子复合体、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统、包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。在体外和体内用作递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如,人造膜囊泡)。核酸的当前的靶向递送的其他方法是可获得的,例如用靶向纳米颗粒或其它合适的亚微米尺寸的递送系统递送多核苷酸。

[0643] 在使用非病毒递送系统的情况下, 示例性递送载体是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外, 离体或体内)。在另一方面, 核酸可以与脂质结合。与脂质结合的核酸可以包封在脂质体的水性内部, 散布在脂质体的脂质双层内, 通过与脂质体和寡核苷酸相关联的连接分子连接到脂质体上, 截留在脂质体中, 与脂质体复合, 分散在含脂质的溶液中, 与脂质混合, 与脂质组合, 作为悬浮液包含在脂质中, 包含在胶束中或与胶束复合, 或以其它方式与脂质相关联。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如, 它们可以存在于双层结构中, 如胶束或具有“塌陷”结构。它们也可以简单地散布在溶液中, 可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是可能是天然存在的或合成的脂质的脂肪物质。例如, 脂质包括天然存在于胞质中的脂肪液滴以及含有长链脂肪族烃及其衍生物如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类别。

[0644] 可以从商业来源获得适合使用的脂质。例如, 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma, St. Louis, MO获得; 磷酸鲸蜡酯(“DCP”)可从K&K Laboratories(Plainview, NY)获得; 胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得; 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以在约-20°C下储存。使用氯仿作为唯一的溶剂, 因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语, 包括通过产生封闭的脂质双层或聚集体形成的各种单层和多层脂质载体。脂质体可以表征为具有磷脂双层膜和内水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过水性介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时, 它们自发形成。脂质组分在闭合结构形成之前经历自我重排, 并将水和溶解的溶质截留在脂质双层之间(Ghosh等人, 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。然而, 也包括在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如, 脂质可以呈现胶束结构, 或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了脂转染胺(lipofectamine)-核酸复合体。

[0645] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法, 为了确认宿主细胞中重组核酸序列的存在, 可以进行多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定, 例如Southern和Northern印迹, RT-PCR和PCR; “生物化学”测定, 例如通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)检测特定肽的存在或不存在, 或通过本文所述的测定来鉴定属于本发明范围内的物质。

[0646] 调节嵌合抗原受体的策略

[0647] 在一些实施方案中, 可以控制CAR活性的可调节CAR(RCAR)是期望的, 以优化CAR疗法的安全性和功效。有多种方式可以调节CAR活性。例如, 使用例如融合到二聚化结构域的胱天蛋白酶(见例如, Di Stasa等人, *N Engl. J. Med.* 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683), 诱导性凋亡可以在本发明的CAR疗法中用作安全开关。在一个实施方案中, 表达本发明的CAR的细胞(例如, T细胞或NK细胞)还包含可诱导的凋亡开关, 其中人胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶9)或修饰的形式融合到人类FKB蛋白的修饰形式, 其允许条件二聚化。在小分子如rapalog(例如AP 1903, AP20187)的存在下, 可诱导的胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶9)被激活并导致表达本发明的CAR的细胞(例如, T细胞或NK细胞)的快速凋亡和死亡。基于胱天蛋白酶的可诱导凋亡开关(或这种开关的一个或多个方面)的实例已经在例如US2004040047; US20110286980; US20140255360; W01997031899; W02014151960; W02014164348; W02014197638; W02014197638中进行了描述; 所有这些都通过引用并入本文。

[0648] 在另一个实例中, CAR表达细胞还可以表达诱导型胱天蛋白酶-9 (iCaspase-9) 分子, 其在施用二聚体药物 (例如, rimiducid (也称为AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) 或 AP20187 (Ariad)) 时导致胱天蛋白酶-9 的激活和细胞凋亡。iCaspase-9 分子含有在CID存在下介导二聚化的二聚化 (CID) 结合结构域的化学诱导剂。这导致CAR表达细胞的可诱导和选择性消耗。在一些情况下, iCaspase-9 分子由与CAR编码载体分开的核酸分子编码, 在一些情况下, iCaspase-9 分子由与CAR编码载体相同的核酸分子编码。iCaspase-9 可以提供安全开关, 以避免CAR表达细胞的任何毒性。参见例如Song等人, *Cancer Gene Ther.* 2008; 15 (10): 667-75; *Clinical Trial Id.No.* NCT02107963; 和Di Stasi等人, *N.Engl. J. Med.* 2011; 365: 1673-83。

[0649] 用于调节本发明的CAR疗法的备选策略包括利用失活或关闭CAR活化的小分子或抗体, 例如, 通过缺失CAR表达细胞, 例如通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。例如, 本文所述的CAR表达细胞还可以表达由能够诱导细胞死亡, 例如ADCC或补体诱导的细胞死亡的分子识别的抗原。例如, 本文所述的CAR表达细胞也可以表达能够被抗体或抗体片段靶向的受体。这些受体的实例包括EpCAM、VEGFR、整联蛋白 (例如整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I3/4\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v$ )、TNF受体超家族成员 (例如TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7和EGFR及其截短形式 (例如, 保留一个或多个细胞外表位但缺少胞质结构域内一个或多个区域的形式)。

[0650] 例如, 本文所述的CAR表达细胞还可以表达截短的表皮生长因子受体 (EGFR), 其缺少信号传导能力, 但保留由能够诱导ADCC的分子 (例如西妥昔单抗 (ERBITUX®)) 识别的表位, 使得施用西妥昔单抗诱导ADCC并随后消耗CAR表达细胞 (参见例如W02011/056894和Jonnalagadda等人, *Gene Ther.* 2013; 20 (8) 853-860)。另一个策略包括表达高度紧密的标记/自杀基因, 该基因将结合利妥昔单抗的本文描述的CAR表达细胞中的CD32和CD20抗原的靶表位组合, 导致CAR表达细胞的选择性消耗, 例如通过ADCC (参见例如Philip等人, *Blood.* 2014; 124 (8) 1277-1287)。用于消耗本文所述的CAR表达细胞的其它方法包括施用CAMPATH, 其是单克隆抗CD52抗体, 该抗体选择性结合并靶向成熟淋巴细胞例如CAR表达细胞, 例如通过诱导ADCC进行破坏。在其它实施方案中, 可以使用CAR配体例如抗独特型抗体选择性靶向CAR表达细胞。在一些实施方案中, 抗独特型抗体可以引起效应细胞活性, 例如ADCC或ADC活性, 从而减少CAR表达细胞的数量。在其它实施方案中, CAR配体, 例如抗独特型抗体可以偶联至诱导细胞杀伤的试剂, 例如毒素, 从而减少CAR表达细胞的数量。备选地, CAR分子本身可以被配置为使得可以调节活性, 例如开启和关闭活性, 如下所述。

[0651] 在其它实施方案中, 本文所述的CAR表达细胞还可以表达由T细胞消耗剂识别的靶蛋白。在一个实施方案中, 靶蛋白是CD20, T细胞消耗剂是抗CD20抗体, 例如利妥昔单抗。在这样的实施方案中, 一旦需要减少或消除CAR表达细胞, 例如减轻CAR诱导的毒性, 则施用T细胞消耗剂。在其它实施方案中, T细胞消耗剂是抗CD52抗体, 例如阿仑珠单抗。

[0652] 在一个方面, RCAR包括一组多肽, 其在最简单的实施方案中通常为两个多肽, 其中

本文描述的标准CAR的组分,例如抗原结合结构域和胞内信号结构域在分离的多肽或成员上分配。在一些实施方案中,该组多肽包括二聚化开关,其在二聚化分子的存在下可将多肽彼此偶联,例如可将抗原结合结构域偶联至胞内信号结构域。在一个实施方案中,本发明的CAR利用二聚化开关,如在例如W02014127261中所描述的,其通过引用并入本文。本文和例如2015年3月13日提交的国际公开号W0 2015/090229的第527-551段提供了这种可调节CAR的附加描述和示例性结构,其全部内容通过引用并入本文。

[0653] 二聚化开关

[0654] 二聚化开关可以是非共价的或共价的。在一个非共价的二聚化开关中,二聚化分子促进开关结构域之间的非共价相互作用。在共价的二聚化开关中,二聚化分子促进开关结构域之间的共价相互作用。

[0655] 在一个实施方案中,RCAR包含基于FKBP/FRAP或FKBP/FRB的二聚化开关。FKBP12 (FKBP或FK506结合蛋白)是充当天然产物免疫抑制药物雷帕霉素的初始细胞内靶的丰富的胞质蛋白。雷帕霉素结合FKBP和所述大的PI3K同源物FRAP (RAFT、mTOR)。FRB为FRAP的93个氨基酸的部分,其足以结合FKBP-雷帕霉素复合体 (Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E. J. & Schreiber, S.L (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51.)。

[0656] 在实施方案中,基于FKBP/FRAP,例如FKBP/FRB的开关可以使用二聚化分子,例如雷帕霉素或雷帕霉素类似物。

[0657] FKBP的氨基酸序列如下:

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCV  
VHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMS  
 [0658] VGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETSY (SEQ  
 ID NO: 131)

[0659] 在实施方案中,FKBP开关结构域可以包含FKBP的片段,其在雷帕霉素或雷帕系物存在下具有结合FRB或其片段或类似物的能力,例如,SEQ ID NO:131的加下划线的部分,其是:

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDR  
 [0660] NKPFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG  
HPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 132)

[0661] FRB的氨基酸序列如下:

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF  
 [0662] NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (SEQ ID NO: 133)

[0663] 在本文中使用的术语“基于FKBP/FRAP,例如,基于FKBP/FRB的开关”是指一种二聚化开关,包括:第一开关结构域和第二开关结构域,第一开关结构域包含FKBP片段或其类似物,具有在雷帕霉素或雷帕系物例如,RAD001存在下与FRB或其片段或类似物结合的能力,并且与SEQ ID NO:131或132的FKBP序列具有至少70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性,或相差不超过30、25、20、15、10、5、4、3、2或1个氨基酸残基;第二开关结构域包含

FRB片段或其类似物,具有在雷帕霉素或雷帕系物存在下与FRB或其片段或类似物结合的能力,并且与SEQ ID NO:133的FRB序列具有至少70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%的同一性,或相差不超过30、25、20、15、10、5、4、3、2或1个氨基酸残基。在一个实施方案中,本文所述的RCAR包含含有SEQ ID NO:131所公开的氨基酸残基(或SEQ ID NO:132)的一个开关结构域,以及含有SEQ ID NO:133所公开的氨基酸残基的一个开关结构域。

[0664] 在实施方案中,FKBP/FRB二聚化开关包含修饰的FRB开关结构域,其显示出在基于FRB的开关结构域,例如,修饰的FRB开关结构域,基于FKBP的开关结构域和二聚化分子,例如,雷帕霉素或雷帕系物,例如RAD001之间改变的,例如,增强的复合体形成。在一个实施方案中,修饰的FRB开关结构域包含一个或更多个突变,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个以上选自在氨基酸位置L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105和F2108的突变,其中所述野生型氨基酸突变成任何其它天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,突变体FRB包括在E2032的突变,其中E2032突变成苯丙氨酸(E2032F)、甲硫氨酸(E2032M)、精氨酸(E2032R)、缬氨酸(E2032V)、酪氨酸(E2032Y)、异亮氨酸(E2032I),例如SEQ ID NO:134,或亮氨酸(E2032L),例如SEQ ID NO:135。在一个实施方案中,突变体FRB包含在T2098处的突变,其中T2098突变成苯丙氨酸(T2098F)或亮氨酸(T2098L),例如SEQ ID NO:136。在一个实施方案中,突变体FRB包含在E2032和T2098处的突变,其中E2032突变成任何氨基酸,且其中T2098突变成任何氨基酸,例如SEQ ID NO:137。在一个实施方案中,突变体FRB包含E2032I和T2098L突变,例如SEQ ID NO:138。在一个实施方案中,突变体FRB包含E2032L和T2098L突变,例如SEQ ID NO:139。

[0665] 表10.具有对于二聚化分子增加的亲和力的示例性的突变体FRB

FRB 突变体	氨基酸序列	SEQ ID NO:
E2032I 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVF RRISKTS	134
E2032L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVF RRISKTS	135
T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVF RRISKTS	136
E2032, T2098	ILWHEMWHEGLXEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT	137
突变体	LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVF RRISKTS	
E2032I, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVF RRISKTS	138
E2032L, T2098L 突变体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQT LKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVF RRISKTS	139

[0668] 天然杀伤细胞受体(NKR) CAR

[0669] 在一个实施方案中,本文所述的CAR分子包含天然杀伤细胞受体(NKR)的一种或多种组分,从而形成NKR-CAR。NKR组分可以是以下任何天然杀伤细胞受体的跨膜结构域,铰链结构域或胞质结构域:杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),例如KIR2DL1、KIR2DL2/L3、

KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1和KIR3DP1；天然细胞毒性受体 (NCR)，例如NKp30、NKp44、NKp46；免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM) 家族，例如CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME和CD2F-10；Fc受体 (FcR)，例如CD16和CD64；和Ly49受体，例如LY49A、LY49C。本文所述的NKR-CAR分子可与衔接分子或胞内信号结构域例如DAP12相互作用。包含NKR组分的CAR分子的示例性构型和序列描述在国际公开号W02014/145252中，其内容通过引用并入本文。

[0670] 分裂CAR(split CAR)

[0671] 在一些实施方案中，CAR表达细胞使用分裂CAR。分裂CAR方法在出版物W02014/055442和W02014/055657中有更详细的描述。简而言之，分裂CAR系统包括表达具有第一抗原结合结构域和共刺激结构域(例如，41BB)的第一CAR的细胞，并且该细胞还表达具有第二抗原结合结构域和胞内信号结构域的第二CAR(例如，CD3 $\zeta$ )。当细胞遇到第一抗原时，共刺激结构域被激活，并且细胞增殖。当细胞遇到第二抗原时，胞内信号结构域被激活，细胞杀伤活性开始。因此，CAR表达细胞仅在两种抗原存在下完全活化。

[0672] 免疫效应细胞

[0673] 本文还描述了含有本文所述的CAR分子或如本文所述的编码CAR的核酸的细胞。本文还描述了用本文所述的核酸例如编码CAR的核酸转染或转化的细胞，例如如本文所述。在一个实施方案中，细胞是本文描述的细胞，例如人T细胞，例如本文所述的人T细胞，或人NK细胞，例如本文所述的人NK细胞。在一个实施方案中，人T细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中，细胞对待用细胞治疗的受试者是自体的。在一些实施方案中，细胞对待用细胞治疗的受试者是同种异体的。

[0674] 在一个方面，本文描述的CAR表达细胞可以进一步包含第二CAR，例如这样的第二CAR，其包含例如针对相同靶标或不同靶标的不同抗原结合结构域(例如除本文描述的肿瘤抗原以外的靶标或与本文描述的不同的肿瘤抗原)。在一个实施方案中，第二CAR包含针对表达与肿瘤抗原相同的癌细胞类型的靶标的抗原结合结构域。在一个实施方案中，CAR表达细胞包含第一CAR和第二CAR，第一CAR靶向第一抗原并且包含具有共刺激信号传导结构域但不是主信号传导结构域的胞内信号传导结构域，第二CAR靶向第二不同的抗原并且包括具有主信号传导结构域但不具有共刺激信号传导结构域的胞内信号传导结构域。虽然不希望受到理论的束缚，但将共刺激信号传导结构域(例如4-1BB、CD28、ICOS、CD27或OX-40)置于第一CAR和主信号传导结构域(例如CD3 $\zeta$ )第二CAR可以将CAR活性限制在两个靶标都被表达的细胞中。在一个实施方案中，CAR表达细胞包含第一肿瘤抗原CAR，其包含结合本文所述靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激结构域，以及靶向不同靶抗原(例如在与第一靶抗原相同的癌细胞类型上表达的抗原)的第二CAR，其包括抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号传导结构域。在另一个实施方案中，CAR表达细胞包含第一CAR，其包含结合本文所述的靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号传导结构域，以及靶向除第一靶抗原以外的抗原(例如，在与第一靶抗原相同的癌细胞类型上表达的抗原)的第二CAR，其包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号传导结构域。

[0675] 在另一方面，本发明提供了表达CAR的细胞群体，例如其中至少一种或多种包含本文所述的核酸分子。在一些实施方案中，CAR表达细胞群体包含表达不同CAR的细胞的混合

物。

[0676] 例如,在一个实施方案中,CART细胞群体可包括表达具有本文所述肿瘤抗原的抗原结合结构域的CAR的第一细胞和表达具有不同抗原结合结构域的CAR的第二细胞,例如本文所述的不同肿瘤抗原的抗原结合结构域(例如与由第一细胞表达的CAR的抗原结合结构域所结合的肿瘤抗原不同的本文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域)。

[0677] 作为另一个实例,表达CAR的细胞群体可以包括表达CAR的第一细胞,所述CAR包含本文所述的肿瘤抗原的抗原结合结构域,和表达CAR的第二细胞,所述CAR包含除本文所述的肿瘤抗原以外的靶标的抗原结合结构域。在一个实施方案中,CAR表达细胞群体包括例如表达包含主胞内信号传导结构域的CAR的第一细胞和表达包含次级信号传导结构域的CAR的第二细胞。

[0678] 在另一方面,本公开特征在于细胞群体,其中群体中的至少一个细胞表达具有针对本文所述的癌症相关抗原的抗原结合结构域的CAR,以及表达另一种药剂,例如增强CAR表达细胞的活性的药剂的第二细胞。在一个实施方案中,所述药剂可以是抑制抑制性分子的药剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如PD-1可以降低CAR表达细胞引起免疫效应应答的能力。抑制性分子的实例包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFR (例如TGFR $\beta$ )。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的药剂包含第一多肽(例如抑制性分子),其与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号结构域)结合。在一个实施方案中,该药剂包含第一多肽,例如抑制性分子如PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ ,或这些任何一种的片段的第一多肽,以及作为本文所述胞内信号结构域的第二多肽(例如,包含共刺激结构域(例如,41BB、CD27、OX40或CD28,例如本文所述)和/或主信号结构域(例如,本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域))。在一个实施方案中,该药剂包含PD-1的第一多肽或其片段,和本文描述的胞内信号结构域的第二多肽(例如,本文所述的CD28信号结构域和/或本文所述的CD3 $\zeta$ 信号结构域)。

[0679] RNA转染

[0680] 本文公开了用于产生体外转录的RNA CAR的方法。本文所述的方法可以包括引入可以直接转染到细胞中的编码CAR的RNA构建体。用于产生用于转染的mRNA的方法可包括体外转录 (IVT) 具有特别设计的引物的模板,接着加入聚A,得到含有3'和5'非翻译序列 (“UTR”)、5'帽和/或内部核糖体进入位点 (IRES)、待表达的核酸和通常长度为50-2000个碱基 (SEQ ID NO:35) 的聚A尾的构建体。如此产生的RNA可以有效地转染不同类型的细胞。在一个方面,模板包括用于所述CAR的序列。

[0681] 免疫效应细胞可以包括由信使RNA (mRNA) 编码的CAR。在一个方面,将编码本文所述的CAR的mRNA引入例如通过本文所述的方法制备的免疫效应细胞,用于产生CAR表达细胞。

[0682] 在一个实施方案中,体外转录的RNA CAR可以作为瞬时转染的形式引入细胞。通过使用聚合酶链反应 (PCR) 生成的模板通过体外转录产生RNA。使用合适的引物和RNA聚合酶,来自任何来源的目的DNA可以通过PCR直接转化成用于体外mRNA合成的模板。DNA的来源可

以是例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其它合适的DNA来源。用于体外转录的所需模板是本文所述的CAR。例如, RNA CAR的模板包含细胞外区域,其包含针对本文所述的肿瘤相关抗原的抗体的单链可变结构域;铰链区(例如,本文所述的铰链区),跨膜结构域(例如本文所述的跨膜结构域,例如CD8a的跨膜结构域);以及胞质区域,其包括胞内信号结构域,例如本文所述的胞内信号结构域,例如包含CD3 $\zeta$ 的信号结构域和4-1BB的信号结构域。

[0683] 在一个实施方案中,用于PCR的DNA含有可读框。该DNA可以来自生物体基因组的天然存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可以包括一些或所有的5' 和/或3' 非翻译区(UTR)。核酸可以包括外显子和内含子。在一个实施方案中,用于PCR的DNA为人核酸序列。在另一个实施方案中,用于PCR的DNA为包括5' 和3' UTR的人核酸序列。DNA可以备选地为通常在天然存在生物体中不表达的人工DNA序列。示例性的人工DNA序列为含有连接在一起形成编码融合蛋白的可读框的基因部分的序列。连接在一起的DNA部分可以来自单个生物体或多于一个生物体。

[0684] PCR用于产生用于转染的mRNA的体外转录的模板。进行PCR的方法是本领域所熟知的。把用于PCR的引物设计成具有与用作PCR模板的DNA的区域基本上互补的区域。如本文所用的“基本上互补的”是指核苷酸的序列,其中引物序列中大多数或所有的碱基都是互补的或一个或更多个碱基是非互补的或错配的。基本上互补的序列能够与目标DNA靶在用于PCR的退火条件下退火或杂交。可以把引物设计成与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,可以把引物设计成扩增在细胞中通常转录的核酸的部分(可读框),包括5' 和3' UTR。也可以把引物设计成扩增编码目的特定结构域的核酸的部分。在一个实施方案中,把引物设计成扩增人cDNA的编码区,包括5' 和3' UTRs的全部或部分。可以通过本领域熟知的合成方法产生用于PCR的引物。“正向引物”是含有与要被扩增的DNA序列上游的DNA模板上的核苷酸基本上互补的核苷酸区域的引物。“上游的”在本文用于指相对于编码链的待扩增的DNA序列的5' 位。“反向引物”为含有与要被扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本上互补的核苷酸区域的引物。“下游的”在本文用于指相对于编码链的要扩增的DNA序列的3' 位。

[0685] 用于PCR的任何DNA聚合酶都可以用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶为从多个来源市售获得的。

[0686] 也可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。优选地, RNA具有5' 和3' UTR。在一个实施方案中,5' UTR的长度在1个和3000个核苷酸之间。可以通过不同的方法改变添加到编码区的5' 和3' UTR序列的长度,所述方法包括但不限于设计用于退火到UTR的不同区域的PCR引物。使用该方法,本领域普通技术人员可以改变在转染转录的RNA之后获得最佳翻译效率所需的5' 和3' UTR长度。

[0687] 5' 和3' UTR可以是对于目的核酸来说天然存在的、内源性的5' 和3' UTR。备选地,可以通过将UTR序列掺入到正向和反向引物中或通过模板的任何其它修饰加入不是目的核酸内源的UTR序列。使用不是目的核酸内源的UTR序列可以用于改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,众所周知3' UTR序列中的富含AU的元件可以降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域熟知的UTR的性质来选择或设计3' UTR以提高转录的RNA的稳定性。

[0688] 在一个实施方案中,5' UTR可含有内源性核酸的Kozak序列。备选地,当通过如上所述PCR加入不是目的核酸内源的5' UTR时,可以通过加入5' UTR序列来重新设计共有Kozak序

列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但是似乎并非是确保所有RNA有效翻译所需的。本领域已知许多mRNA需要Kozak序列。在其它实施方案中,5' UTR可以是RNA病毒的5' UTR,所述病毒的RNA基因组在细胞中是稳定的。在其它实施方案中,多种核苷酸类似物可用于3' 或5' UTR中以阻止mRNA的核酸外切酶降解。

[0689] 为了能够在不需基因克隆下从DNA模板合成RNA,应当把转录的启动子连接到待转录的序列的DNA模板上游。当把充当RNA聚合酶启动子的序列添加到正向引物的5' 端时, RNA聚合酶启动子变得掺入待转录的可读框的PCR产物上游中。在一个优选的实施方案中,启动子为如本文在别处描述的T7聚合酶启动子。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。用于T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0690] 在一个优选的实施方案中,mRNA具有决定核糖体结合、翻译起始和细胞中mRNA稳定性的5' 端和3' 聚(A)尾部上的帽。在环状DNA模板上,例如质粒DNA上, RNA聚合酶产生不适于真核细胞中表达的多联体产物。在3' UTR末端线性化的质粒DNA的转录产生正常尺寸mRNA,其即使在转录后聚腺苷酸化,在真核转染中也不是有效的。

[0691] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以使转录物的3' 端延伸超出模板的最后一个碱基(Schenbom and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003))。

[0692] 将一段聚A/T序列整合到DNA模板中的常规方法为分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的聚A/T序列可以引起质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞得到的质粒DNA模板通常是高度污染的,具有缺失及其它畸变。这使得克隆过程不仅费力而且费时,但通常不可靠。这就是为什么非常期望一种允许用一段聚A/T 3' 序列而非克隆来构建DNA模板的方法的原因。

[0693] 可以通过使用含有聚T尾(例如100T尾部)(SEQ ID NO:31)的反向引物(尺寸可以为50-5000T(SEQ ID NO:32)),或在PCR之后通过任何其它方法(包括但不限于DNA连接或体外重组),在PCR期间产生所述的转录DNA模板的聚A/T段。聚(A)尾也给RNA提供稳定性并且减少其降解。通常,聚(A)尾部的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,聚(A)尾在100和5000个腺苷(例如,SEQ ID NO:30)之间。

[0694] 可以在体外转录之后,使用聚(A)聚合酶比如大肠杆菌聚(A)聚合酶(E-PAP),进一步延伸RNA的聚(A)尾部。在一个实施方案中,聚(A)尾部的长度从100个核苷酸增加至在300至400个核苷酸(SEQ ID NO:34)之间,导致RNA的翻译效率提高约两倍。另外,将不同的化学基团连接至3' 端可以提高mRNA稳定性。这样的连接可以含有修饰的/人工的核苷酸、适体及其它化合物。例如,可以使用聚(A)聚合酶将ATP类似物掺入到聚(A)尾部中。ATP类似物可以进一步提高RNA的稳定性。

[0695] 5' 帽也给RNA分子提供稳定性。在一个实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5' 帽。使用本领域已知的(Cougot等人, *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski等人, *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango等人, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))和本文所述的技术提供5' 帽。

[0696] 通过本文公开的方法产生的RNA也可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒、染色体或人工设计的序列,其引发帽独立性核糖体结合于mRNA和促进翻译的起始。可以包括适于细胞电穿孔的任何溶质,其可以含有有助于细胞渗透性

和生存力的因子,比如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0697] 可以使用大量不同方法中的任一种将RNA引入到靶细胞中,所述方法为例如市售可获得的方法,其包括但不限于电穿孔(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)或Gene Pulser II(BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator(Eppendorf, Hamburg Germany)、使用脂质转染的阳离子脂质体介导的转染、聚合物包封、肽介导的转染、或生物弹微粒递送系统比如“基因枪”(参见例如Nishikawa等人, Hum Gene Ther., 12(8):861-70(2001))。

[0698] 非病毒递送方法

[0699] 在一些方面中,非病毒方法可用于递送编码本文所述的CAR的核酸到细胞或组织或受试者中。

[0700] 在一些实施方案中,非病毒方法包括使用转座子(也称为转座元件)。在一些实施方案中,转座子是一段DNA,其可以自身插入在基因组中的位置,例如,能够自我复制和插入其拷贝到基因组的一段DNA,或一段DNA片段,其可以从更长的核酸剪接出来并插入在基因组中另一个地方。例如,转座子包含由用于转座的基因侧翼的反向重复序列组成的DNA序列。

[0701] 使用转座子的核酸递送的示范性方法包括睡美人转座子系统(SBTS)和piggyBac(PB)转座子系统。参见,例如,Aronovich等人, Hum. Mol. Genet. 20. R1(2011):R14-20; Singh等人, Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang等人, Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija等人, Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei等人, Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell等人, Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65;以及Ding等人, Cell. 122.3(2005):473-83,所有这些都通过引用并入本文。

[0702] 所述SBTS包括两个组件:1)含有转基因的转座子和2)转座酶的来源。转座酶可以将来自载体质粒(或其他供体DNA)的转座子转座到靶DNA,诸如宿主细胞染色体/基因组。例如,转座酶结合至所述载体质粒/供体DNA,从质粒中切割出转座子(包括转基因),并将其插入到宿主细胞的基因组中。见,例如,Aronovich等人,如上。

[0703] 示例性转座子包括基于pT2的转座子。参见,例如,Grabundzija等人, Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47;和Singh等人, Cancer Res. 68.8(2008):2961-2971,所有这些都通过引用并入本文。示例性转座酶包括Tc1/mariner型转座酶,例如,SB10转座酶或SB11转座酶(超活性转座酶,其可以例如,从巨细胞病毒启动子表达)。参见,例如,Aronovich等人;Kebriaei等人;和Grabundzija等人,所有这些都通过引用并入本文。

[0704] 使用所述SBTS允许转基因,例如,编码本文中所述的CAR的核酸有效整合和表达。本文提供了例如,使用转座子系统如SBTS,产生细胞,例如,T细胞或NK细胞的方法,所述细胞稳定表达本文所述的CAR。

[0705] 根据本文所述方法,在一些实施方案中,将含有SBTS组件的一种或多种核酸,例如,质粒递送到细胞(例如,T细胞或NK细胞)。例如,通过标准的核酸(例如,质粒DNA)递送方法,例如,本文描述的方法,例如,电穿孔,转染或脂转染递送核酸。在一些实施方案中,核酸含有包含转基因,例如,编码本文中所述的CAR的核酸的转座子。在一些实施方案中,核酸含有包含转基因的转座子(例如,编码本文中所述的CAR的核酸)以及编码转座酶的核酸序列。

在其他实施方案中,提供有两个核酸的系统,例如,双质粒系统,例如,其中第一质粒含有包含转基因的转座子,并且第二质粒含有编码转座酶的核酸序列。例如,第一和第二核酸共同递送到宿主细胞中。

[0706] 在一些实施方案中,通过使用SBTS的基因插入与使用核酸酶的基因编辑(例如,锌指核酸酶(ZFN),转录活化子样效应核酸酶(TALENS),CRISPR/Cas系统或工程化的大范围核酸酶重新工程化的归巢内切核酸酶)的组合,产生表达本文所述的CAR的细胞,例如,T或NK细胞。

[0707] 在一些实施方案中,使用递送的非病毒方法允许细胞例如,T细胞或NK细胞重新编程,并指导细胞输注到受试者。非病毒载体的优点包括但不限于容易和相对低成本产生满足患者群体所需的足够量,贮存过程中的稳定性和缺失免疫原性。

[0708] 免疫效应细胞(例如,T细胞)的活化和扩增

[0709] 通常可以使用例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利公开号20060121005中所述的方法进行免疫效应细胞如T细胞的活化和扩增。

[0710] 通常,免疫效应细胞群体,例如T调节细胞消耗的细胞通过与连接有刺激CD3/TCR复合体相关的信号的作用剂和刺激T细胞表面上的共刺激性分子的配体的表面接触进行扩增。特别地,可以如本文所述的刺激T细胞群体,比如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段、或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过钙离子载体协同与蛋白激酶C活化剂(例如苕藓抑素)接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适于刺激T细胞增殖的条件下,使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,可以使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。可以如本领域已知的其它常用方法那样使用抗CD28抗体的实例,包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diacclone, Besançon, France)(Berg等人,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人,J.Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0711] 在某些方面,可以通过不同的方案提供用于T细胞的初次刺激信号和共刺激信号。例如,提供每种信号的作用剂可以在溶液中被偶联至表面。当与表面偶联时,可以把所述作用剂偶联到相同的表面(即,“顺式”形式)或单独的表面(即,“反式”形式)。备选地,可以把一种作用剂偶联到表面,且另一种作用剂可以在溶液中。在一个方面,提供共刺激信号的作用剂与细胞表面结合,且提供主要活化信号的作用剂在溶液中被偶联至表面。在某些方面,两种作用剂都可以在溶液中。在一个方面,作用剂可以呈可溶性形式,然后被交联至表面,比如表达将会与该作用剂结合的Fc受体或抗体或其它结合剂的细胞。在这点上,关于人工抗原呈递细胞(aAPCs),参见例如美国专利申请公开号:20040101519和20060034810,考虑其在本发明中用于活化和扩增T细胞。

[0712] 在一个方面,把两种作用剂都固定在珠上,其中固定在相同的珠上,即“顺式”,或固定在不同的珠上,即“反式”。例如,提供主要活化信号的作用剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且提供共刺激信号的作用剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段;并且两种作用剂以等同的分子数量被共同固定在相同珠上。在一个方面,使用与所述珠结合的每种抗体的1

:1的比率,用于CD4+T细胞扩增和T细胞生长。在本发明的某些实施方案,使用与所述珠结合的抗CD3:CD28抗体的比率,使得与使用1:1的比率观察的扩增相比,观察到T细胞扩增的增加。在一个特别的方面,与使用1:1的比率观察的扩增相比,观察到约1至约3倍的增加。在一个方面,与所述珠结合的CD3:CD28抗体的比率范围为100:1至1:100及其中所有整数值。在一个方面,与微粒结合的抗CD28抗体比抗CD3抗体多,即CD3:CD28的比率少于1。在某些方面,与珠结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比率大于2:1。在一个特别的方面,使用1:100的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在另一方面,使用1:75的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在一个进一步的方面,使用1:50的与珠结合的抗体CD3:CD28比率。在另一个实施方案,使用1:30的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在一个方面,使用1:10的与珠结合的抗体的CD3:CD28比率。在一个优选的方面,使用的与珠结合的抗体的1:3 CD3:CD28比率。在还有一个方面中,使用3:1的与珠结合的抗体CD3:CD28比率。

[0713] 可以使用1:500至500:1及其间任何整数值微粒与细胞的比率来刺激T细胞或其它靶细胞。正如本领域普通技术人员可以容易地理解的那样,微粒与细胞的比率可以取决于相对于靶细胞的微粒尺寸。例如,小尺寸珠可能仅结合少数细胞,而较大珠可结合许多细胞。在某些方面,细胞与微粒的比率范围为1:100至100:1及其中任何整数值,并且在进一步的方面,也可以使用包括1:9至9:1的及其中任何整数值比率来刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗CD3-和抗CD28偶联的微粒与T细胞的比率可以如上所述变化,然而某些优选的值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1,一个优选的比率为至少1:1的微粒/T细胞。在一个方面,使用1:1或更小的微粒与细胞的比率。在一个特别的方面,优选的微粒:细胞比率为1:5。在进一步的方面,微粒与细胞的比率可以根据刺激的天数变化。例如,在一个方面,在第一天,微粒与细胞的比率为1:1至10:1,并且此后每天或每隔一天向细胞中加入另外的微粒,直到10天,最终比率为1:1至1:10(基于加入当天的细胞计数)。在一个特别的方面,在刺激的第一天,微粒与细胞的比率为1:1,并在刺激的第三天和第五天调节为1:5。在另一方面,以每日或每隔一天为基准加入微粒至刺激的第一天最终比为1:1,且在刺激的第三天和第五天为1:5。在一个特别的方面,在刺激的第一天,微粒与细胞的比率为2:1,并在刺激的第三天和第五天调节为1:10。在一个方面,以每日或每隔一天为基准加入微粒至刺激的第一天最终比为1:1,且在刺激的第三天和第五天为1:10。本领域技术人员应当理解多种其它比率都可以适用于本发明。特别地,比率将根据粒径及细胞尺寸和类型而变化。在一个方面,在第一天,最典型的使用比率为约1:1、2:1和3:1左右。

[0714] 在进一步的方面,将细胞比如T细胞与作用剂包被的珠混合,接着分离珠和细胞,然后培养细胞。在备选的方面,在培养之前,作用剂-包被的珠和细胞没有分离,而是一起培养。在一个进一步的方面,首先通过施加力(比如磁力)浓缩珠和细胞,导致细胞表面标志物的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0715] 例如,可以通过允许附着了抗CD3和抗CD28的顺磁性的珠(3x28珠)与T细胞接触来连接细胞表面蛋白。在一个方面,将细胞(例如 $10^4$ 至 $10^9$ 个T细胞)和珠(例如,比率1:1的DYNABEADS®M-CD3/CD28 T顺磁性的珠)在缓冲液中混合,缓冲液例如为PBS(不含二价阳离子,比如钙和镁)。此外,本领域普通技术人员可以容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如,样品中靶细胞可能非常少,且仅占样品的0.01%,或全部样品(即,100%)可以包含目

的靶细胞。因此,任何细胞数量都在本发明的上下文之内。在某些方面,可能期望显著减少其中微粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和微粒的最大接触。例如,在一个方面,使用约100亿细胞/ml、90亿/ml、80亿/ml、70亿/ml、60亿/ml、50亿/ml或20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方面,使用大于1亿个细胞/ml的浓度。在另一方面,使用1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0千万个细胞/ml的浓度。在仍然一个方面,使用从7.5、8、8.5、9、9.5或10千万个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的方面,可以使用1.25亿或1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以引起细胞产率提高、细胞活化和细胞扩增。进一步,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞,比如CD28-阴性T细胞。这样的细胞群体可以具有治疗价值,并且在某些方面将是期望得到的。例如,使用高浓度的细胞能够更有效地选择通常具有弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0716] 在一个实施方案中,通过例如本文所述的方法扩增用编码CAR,例如,本文所述的CAR,例如,本文所述的CD19 CAR的核酸转导的细胞。在一个实施方案中,将细胞在培养中扩增几个小时(例如,约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21小时)到约14天(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)。在一个实施方案中,细胞被扩增4至9天。在一个实施方案中,细胞被扩增8天或更短,例如,7、6或5天。在一个实施方案中,所述细胞在培养中扩增5天,所得细胞比相同的培养条件下培养扩增9天的相同的细胞更有效。效力可以通过例如,由不同的T细胞的功能,例如增殖、靶细胞杀伤、细胞因子的产生、活化、迁移或它们的组合来定义。在一个实施方案中,相比于在相同培养条件下扩增9天的相同细胞,扩增了5天的细胞,例如,本文所述的CD19 CAR细胞显示细胞倍增的至少1、2、3或4倍增加。在一个实施方案中,所述细胞,例如,表达本文所述的CD19 CAR的细胞培养扩增了5天,并且相比于在相同培养条件下扩增9天的相同细胞,所得的细胞显示出更高的促炎细胞因子产生,例如,IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF的水平。在一个实施方案中,相比于在相同培养条件下扩增9天的相同细胞,扩增了5天的细胞,例如,本文所述的CD19 CAR细胞显示出促炎细胞因子产生,例如,IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF的水平以pg/ml计至少1、2、3、4、5、10倍或更多倍的增加。

[0717] 也可能需要几个刺激循环,使得T细胞的培养时间可以为60天或以上。适于T细胞培养的条件包括合适的培养基(例如,极限必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15(Lonza)),其可以含有增殖和生存所必需的因子,包括血清(例如胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 或本领域技术人员已知用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、plasmanate和还原剂比如N-乙酰基半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,具有加入的氨基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或补充有适合量的血清(或血浆)或定义的激素组、和/或足以使T细胞生长和扩增的量的细胞因子。抗生素,例如青霉素和链霉素,仅包括在实验培养物中,而不在待输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞保持在支持生长必需的条件下,例如适合的温度(例如37 $^{\circ}$ C)和气氛(例如,空气加5%CO<sub>2</sub>)。

[0718] 在一个实施方案中,将细胞在合适的培养基(如,本文中所描述的培养基)中扩增,所述培养基包括导致细胞在14天的扩增期间增加至少200倍(例如,200倍、250倍、300倍、350倍)的一种或多种白介素,例如,如通过本文所述的方法如流式细胞术测定。在一个实施方案中,将细胞在IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)存在下扩增。

[0719] 已经暴露于不同刺激时间的T细胞可以显示出不同的特征。例如,典型的血液或单采血液成分术前外周血单个核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制T细胞群体(TC, CD8+)的辅助T细胞群体(TH, CD4+)。通过刺激CD3和CD28受体的离体T细胞扩增产生T细胞群体,该细胞群体在约第8-9天前主要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,T细胞群体包括越来越大的TC细胞群体。因此,根据治疗的目的,向受试者输注主要包括TH细胞的T细胞群体可能是有利的。类似地,如果已经分离了TC细胞的抗原特异性亚组,则使该亚组在更大程度上扩增可能是有益的。

[0720] 进一步,除了CD4和CD8标志物之外,其它表型标志物显著变化,但大部分在细胞扩增过程中可再重现。因此,这样的可重现性使能够针对特定目的裁剪活化的T细胞产物。

[0721] 一旦构建了本文描述的CAR,可以使用各种测定法来评估分子的活性,例如但不限于在抗原刺激后扩增T细胞的能力,在没有再刺激的情况下维持T细胞扩增,和在适当的体外和动物模型中的抗癌活性。评价本发明的CAR的效果的测定法在下面进一步详细说明。

[0722] 可以使用对初级T细胞中CAR表达的蛋白质印迹分析来检测单体和二聚体的存在。参见,例如Milone等人, *Molecular Therapy* 17(8):1453-1464(2009)。非常简要地,使表达CAR的T细胞(CD4+和CD8+ T细胞的1:1混合物)在体外扩增超过10天,随后在还原条件下进行裂解和SDS-PAGE。使用针对TCR  $\zeta$ 链的抗体,通过蛋白质印迹来检测含有全长TCR  $\zeta$ 胞质结构域和内源性TCR  $\zeta$ 链的CAR。在非还原条件下,使用相同T细胞亚组进行SDS-PAGE分析,以允许评价共价二聚体形成。

[0723] 抗原刺激后CAR<sup>+</sup>T细胞的体外扩增可以通过流式细胞术测定。例如,用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aAPCs刺激CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,随后用在待分析启动子控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括CMV IE基因,EF-1 $\alpha$ 、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。通过流式细胞术在CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞亚群中培养的第6天评估GFP荧光。参见例如Milone等人, *Molecular Therapy* 17(8):1453-1464(2009)。备选地,在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠刺激CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,并在第1天用CAR转导,使用表达CAR以及使用2A核糖体跳跃序列的eGFP的双顺反子慢病毒载体。培养物用本文所述的癌症相关抗原+K562细胞(表达本文所述的癌症相关抗原的K562),野生型K562细胞(K562野生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞,在抗CD3和抗CD28抗体(K562-BBL-3/28)存在下再刺激培养物,然后洗涤。每隔一天以100IU/ml将外源IL-2加入到培养物中。使用基于珠的计数通过流式细胞术列举GFP<sup>+</sup>T细胞。参见例如Milone等人, *Molecular Therapy* 17(8):1453-1464(2009)。

[0724] 也可以测量在没有再刺激的情况下持续的CAR<sup>+</sup>T细胞扩增。参见例如Milone等人, *Molecular Therapy* 17(8):1453-1464(2009)。简而言之,在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠刺激之后,在第1天用所示的CAR转导,使用Coulter Multisizer III颗粒计数器Nexcelom Cellometer Vision或Millipore Scepter在培养的第8天测量平均T细胞体积(f1)。

[0725] 也可以使用动物模型来测量表达CAR的细胞活性,例如,如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第698段所述,其全部内容通过引用并入本文。可以评估剂量依赖性CAR治疗应答,例如,如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第699段所述,其全部内容通过引用并入本文。之前已经描述了细胞增殖和细胞因子产生的评估,例如,如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第700段所述,其全部内容通过引用并入

本文。细胞毒性可以通过标准的<sup>51</sup>Cr释放测定来评估,例如,如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的第701段所述,其全部内容通过引用并入本文。成像技术可用于评估荷瘤动物模型中CAR的特异性运输和增殖,例如,如2015年3月13日提交的国际申请W02015/142675的段落702所述,其全部内容通过引用并入本文。其他测定法,包括本文实施例部分中描述的那些以及本领域已知的那些也可用于评估本文所述的CAR。

[0726] 备选地或与本文公开的方法组合,公开了用于以下一种或多种的方法和组合物:检测和/或定量CAR表达细胞(例如体外或体内(例如临床监测));免疫细胞扩增和/或活化;和/或CAR特异性选择,其涉及使用CAR配体。在一个示例性实施方案中,CAR配体是结合CAR分子的抗体,例如结合CAR的细胞外抗原结合结构域的抗体(例如,结合抗原结合结构域的抗体,例如抗独特型抗体;或结合细胞外结合结构域的恒定区的抗体)。在其它实施方案中,CAR配体是CAR抗原分子(例如本文所述的CAR抗原分子)。

[0727] 在一个方面,公开了一种用于检测和/或定量CAR表达细胞的方法。例如,CAR配体可用于在体外或体内检测和/或定量CAR表达细胞(例如,临床监测患者中CAR表达细胞或对患者给药)。该方法包括:

[0728] 提供CAR配体(任选地,标记的CAR配体,例如包括标签、珠、放射性或荧光标记的CAR配体);

[0729] 获取CAR表达细胞(例如,获取含有CAR表达细胞的样品,例如制造样品或临床样品);

[0730] 在发生结合的条件下使CAR表达细胞与CAR配体接触,从而检测存在的CAR表达细胞的水平(例如,量)。CAR表达细胞与CAR配体的结合可以使用标准技术如FACS,ELISA等检测。

[0731] 在另一方面,公开了扩增和/或激活细胞(例如免疫效应细胞)的方法。该方法包括:

[0732] 提供CAR表达细胞(例如,第一CAR表达细胞或瞬时表达CAR细胞);

[0733] 在发生免疫细胞扩增和/或增殖的条件下使所述CAR表达细胞与CAR配体例如本文所述的CAR配体接触,从而产生活化和/或扩增的细胞群体。

[0734] 在某些实施方案中,CAR配体存在于(例如,固定化或连接到)基质,例如非天然存在的基质上。在一些实施方案中,基质是非细胞基质。非细胞基质可以是选自例如平板(例如,微量滴定板),膜(例如硝酸纤维素膜),基质,芯片或珠的固相支持体。在实施方案中,CAR配体存在于基质(例如,在基质表面上)。CAR配体可以固定,附着或共价或非共价结合(例如交联)至基质。在一个实施方案中,将CAR配体连接(例如共价连接)到珠上。在上述实施方案中,免疫细胞群体可以在体外或离体扩增。该方法还可以包括在CAR分子的配体存在下培养免疫细胞群体,例如使用本文所述的任何方法。

[0735] 在其它实施方案中,扩增和/或活化细胞的方法还包括添加第二刺激分子例如CD28。例如,CAR配体和第二刺激分子可固定在基质例如一个或多个珠上,从而提供增加的细胞扩增和/或活化。

[0736] 在另一方面,提供了一种用于选择或富集CAR表达细胞的方法。该方法包括使CAR表达细胞与本文所述的CAR配体接触;并基于CAR配体的结合选择细胞。

[0737] 在其它实施方案中,提供了用于消耗、减少和/或杀死CAR表达细胞的方法。该方法

包括使CAR表达细胞与本文所述的CAR配体接触；并基于CAR配体的结合靶向细胞，从而减少CAR表达细胞的数量和/或杀死CAR表达细胞。在一个实施方案中，CAR配体与毒性剂（例如毒素或细胞消融性药物）偶联。在另一个实施方案中，抗独特型抗体可以引起效应细胞活性，例如ADCC或ADC活性。

[0738] 可以在本文公开的方法中使用的示例性抗CAR抗体描述于例如WO 2014/190273和J Jena等人，“Chimeric Antigen Receptor (CAR) -Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials”，PLoS March 20138:3e57838，其内容通过引用并入。

[0739] 在一些方面和实施方案中，本文的组合物和方法针对T细胞的特定子集进行了优化，例如WO2016/019300中所述，其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中，与对照T细胞（例如表达相同构建体的不同类型的T细胞（例如，CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>））相比，T细胞的优化子集显示增强的持续性。

[0740] 在一些实施方案中，CD4<sup>+</sup>T细胞包含本文所述的CAR，所述CAR包含适于CD4<sup>+</sup>T细胞（例如，为导致在CD4<sup>+</sup>T细胞中增强的持久性而优化）的胞内信号结构域，例如ICOS结构域。在一些实施方案中，CD8<sup>+</sup>T细胞包含本文所述的CAR，所述CAR包含适于CD8<sup>+</sup>T细胞（例如，为导致CD8<sup>+</sup>T细胞增强的持久性而优化）的胞内信号结构域，例如4-1BB结构域，CD28结构域或ICOS结构域以外的另一共刺激结构域。在一些实施方案中，本文所述的CAR包含本文所述的抗原结合结构域，例如包含抗原结合结构域的CAR。

[0741] 在一个方面，本文描述了治疗受试者，例如患有癌症的受试者的方法。该方法包括向所述受试者施用有效量的：

[0742] 1) 包含CAR的CD4<sup>+</sup>T细胞 (CARCD4<sup>+</sup>)

[0743] 其包含：

[0744] 抗原结合结构域，例如本文所述的抗原结合结构域；

[0745] 跨膜结构域；和

[0746] 胞内信号结构域，例如第一共刺激结构域，例如ICOS结构域；和

[0747] 2) 包含CAR的CD8<sup>+</sup>T细胞 (CARCD8<sup>+</sup>)，其包含：

[0748] 抗原结合结构域，例如本文所述的抗原结合结构域；

[0749] 跨膜结构域；和

[0750] 胞内信号结构域，例如第二共刺激结构域，例如4-1BB结构域，CD28结构域或除ICOS结构域之外的另一共刺激结构域；

[0751] 其中CARCD4<sup>+</sup>和CARCD8<sup>+</sup>彼此不同。

[0752] 任选地，所述方法还包括施用：

[0753] 3) 包含CAR的第二CD8<sup>+</sup>T细胞 (第二CARCD8<sup>+</sup>)，其包含：

[0754] 抗原结合结构域，例如本文所述的抗原结合结构域；

[0755] 跨膜结构域；和

[0756] 胞内信号结构域，其中第二CARCD8<sup>+</sup>包含不存在于CARCD8<sup>+</sup>上的胞内信号结构域，例如共刺激信号结构域，并且任选地不包含ICOS信号结构域。

[0757] 本文所述的任何方法可以进一步包括施用如本文所述的BTK抑制剂。

[0758] 生物聚合物递送方法

[0759] 在一些实施方案中,通过生物聚合物支架,例如,生物聚合物植入物可以对受试者施用或递送如本文所公开的一种或多种CAR表达细胞。生物聚合物支架可以支持或增强本文所描述的CAR表达细胞的递送,扩增和/或分散。生物聚合物支架包括生物相容(例如,基本上不诱导炎症或免疫应答)和/或可生物降解的聚合物,其可以是天然存在的或合成的。因此,在一些实施方案中,本文的制备方法包括将CAR表达细胞与生物聚合物(例如本部分的生物聚合物)接触的步骤。

[0760] 合适的生物聚合物的实例包括但不限于琼脂,琼脂糖,藻酸盐,藻酸盐/磷酸钙粘固剂(CPC), $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -GAL)(1,2,3,4,6-五乙酰 $\alpha$ -D-半乳糖),纤维素,壳多糖,脱乙酰壳多糖,胶原,弹性蛋白,明胶,透明质酸胶原蛋白,羟基磷灰石,聚(3-羟基丁酸酯-共-3-羟基己酸酯)(PHBHHx),聚(丙交酯),聚(己内酯)(PCL),聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG),聚环氧乙烷(PEO),聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA),聚环氧丙烷(PPO),聚乙烯醇(PVA),丝,大豆蛋白和大豆蛋白分离物,单独或在任意的浓度和任意比率与任何其他聚合物组合。生物聚合物可用粘附或迁移促进分子,例如,结合于淋巴细胞的胶原受体的胶原模拟肽,和/或刺激分子增强或修饰,以提高待递送细胞的递送、扩增或功能,例如,抗癌活性。生物聚合物支架可以是可注射的,例如,凝胶或半固体或固体组合物。

[0761] 在一些实施方案中,本文描述的CAR表达细胞被递送到受试者之前接种到生物聚合物支架。在实施方案中,生物聚合物支架还包含一种或多种本文中所描述的另外的治疗剂(例如,另一种CAR表达细胞、抗体或小分子)或增强例如,掺入或缀合到支架的生物聚合物的CAR表达细胞的活性的作用剂。在实施方案中,生物聚合物支架被注入,例如,瘤内,或通过外科手术在肿瘤植入或足以介导抗肿瘤作用的肿瘤附近。生物聚合物组合物及其递送方法的其他实例在Stephan等人,Nature Biotechnology,2015,33:97-101;和WO2014/110591中描述。

[0762] 制造/生产方法

[0763] 在一些实施方案中,本文公开的方法还包括在用细胞(例如本文所述的免疫效应细胞,例如本文所述的表达CAR的免疫效应细胞)处理后施用T细胞消耗剂,从而减少(例如,消耗)CAR表达细胞(例如,CD19 CAR表达细胞)。这样的T细胞消耗剂可用于有效地消耗CAR表达细胞(例如CD19 CAR表达细胞)以减轻毒性。在一些实施方案中,根据本文的方法制备CAR表达细胞,例如根据本文方法测定(例如,在转染或转导之前或之后)。

[0764] 在一些实施方案中,在施用细胞(例如本文所述的免疫效应细胞群体)后一、二、三、四或五周施用T细胞消耗剂。

[0765] 在一个实施方案中,T细胞消耗剂是例如通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体诱导的细胞死亡而消耗CAR表达细胞的试剂。例如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达由能够诱导细胞死亡,例如ADCC或补体诱导的细胞死亡的分子识别的抗原(例如,靶抗原)。例如,本文所述的CAR表达细胞还可以表达能够被抗体或抗体片段靶向的靶蛋白(例如受体)。这些靶蛋白的实例包括但不限于EpCAM、VEGFR、整联蛋白(例如整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3、 $\alpha$ 4、 $\alpha$ I3/4 $\beta$ 3、 $\alpha$ 4 $\beta$ 7、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1、 $\alpha$ v $\beta$ 3、 $\alpha$ v)、TNF受体超家族的成员(例如TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/1gE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、

CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7和EGFR及其截短形式(例如,保留一个或多个胞外表位但是缺乏胞质结构域内的一个或多个区域的形式)。

[0766] 在一些实施方案中,CAR表达细胞共表达CAR和靶蛋白,例如天然表达靶蛋白或被工程化以表达靶蛋白。例如,细胞,例如免疫效应细胞群体可以包括包含CAR核酸(例如本文所述的CAR核酸)和编码靶蛋白的核酸的核酸(例如载体)。

[0767] 在一个实施方案中,T细胞消耗剂是CD52抑制剂,例如抗CD52抗体分子,例如阿仑珠单抗。

[0768] 在其它实施方案中,细胞,例如免疫效应细胞群体表达如本文所述的CAR分子(例如CD19 CAR)和由T细胞消耗剂识别的靶蛋白。在一个实施方案中,靶蛋白是CD20。在靶蛋白是CD20的实施方案中,T细胞消耗剂是抗CD20抗体,例如利妥昔单抗。

[0769] 在任何上述方法的进一步实施方案中,所述方法还包括将细胞例如造血干细胞或骨髓移植到哺乳动物中。

[0770] 在另一方面,本发明的特征在于在细胞移植之前调节哺乳动物的方法。该方法包括向哺乳动物施用有效量的包含CAR核酸或多肽例如CD19 CAR核酸或多肽的细胞。在一些实施方案中,细胞移植是干细胞移植,例如造血干细胞移植或骨髓移植。在其它实施方案中,在细胞移植之前调节受试者包括减少受试者中表达靶标的细胞,例如表达CD19的正常细胞或表达CD19的癌细胞的数目。

[0771] 药物组合物和治疗

[0772] 本文所述的方法还可包括将CAR表达细胞配制在药物组合物中。药物组合物可以包含与一种或多种药学上可接受的或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的表达CAR的细胞,例如,许多表达CAR的细胞(正如本文中描述的那样)。这样的组合物可以包含缓冲液例如中性的缓冲盐水、磷酸缓冲盐水以及诸如此类;碳水化合物例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。组合物可以配制成例如用于静脉内施用。

[0773] 在一个实施方案中,所述的药物组合物基本上不含有污染物,例如,没有可检测到的水平的污染物,例如,该污染物选自由下列组成的组:内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被的珠、小鼠抗体、汇合的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、包装载体的细胞或质粒组件、细菌和真菌。在一个实施方案中,所述的细菌是选自由下列组成的组的至少一种:粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、白念珠菌(*Candida albicans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitides*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)、和酿脓链球菌A群(*Streptococcus pyogenes* group A)。

[0774] 当谈及“免疫学上有效量”、“抗癌有效量”、“抑制癌有效量”或“治疗有效量”时,将要被施用的组合物的精确数量可以由医师在考虑个体在年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度以及患者(受试者)的状况的情况下确定。一般地可以声明:可以以 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞/kg体重(在一些情况下 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞/kg体重,包括这些范围内所有的整数值)的剂量,施用包含本文中描述的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的药物组合物。也可以在这些剂

量下多次施用T细胞组合物。可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用细胞。

[0775] 在一些实施方案中, CAR细胞的剂量包含约 $1 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1.8 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个细胞/kg。在一些实施方案中, CAR细胞(例如, CD19CAR细胞)的剂量包含至少约 $1 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1.8 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个细胞/kg。在一些实施方案中, CAR细胞(例如, CD19CAR细胞)的剂量包含多达约 $1 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1.8 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个细胞/kg。在一些实施方案中, CAR细胞(例如CD19CAR细胞)的剂量包含约 $1.1 \times 10^6$ - $1.8 \times 10^7$ 细胞/kg。在一些实施方案中, CAR细胞(例如, CD19 CAR细胞)的剂量包含约 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 或 $5 \times 10^9$ 个细胞。在一些实施方案中, CAR细胞(例如, CD19 CAR细胞)的剂量包含至少约 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 或 $5 \times 10^9$ 个细胞。在一些实施方案中, CAR细胞(例如, CD19CAR细胞)的剂量包含多达约 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 或 $5 \times 10^9$ 个细胞。

[0776] 将要向患者施用的治疗的剂量将会随被治疗的状况的精确性质和所述治疗的接受者而变化。可以根据本领域公认的实践进行用于人施用的剂量的定标。例如, 对于成年患者, CAMPATH剂量一般将会在1至大约100mg的范围, 通常每日施用, 持续1至30天的一段时间。合适的每日剂量是1至10mg/天, 然而在一些实例中, 可以使用最多40mg/天的更大剂量(在美国专利号6, 120, 766中描述的)。

[0777] 在某些方面, 可能需要向受试者施用活化的免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞), 然后随后重新抽取血液(或进行单采血液成分术), 活化免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞), 并且用这些活化和扩增的免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞)再次输注患者。这个过程可以每几周进行多次。在某些方面, 免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞)可以从10cc至400cc的抽血活化。在某些方面, 免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞)从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中活化。

[0778] 主题组合物的施用可以以任何方便的方式进行。本文所述的组合物可以经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、淋巴结内、髓内、肌肉内、静脉内(i.v.)注射或腹膜内注射, 例如通过皮内或皮下注射施用于患者。免疫效应细胞(例如, T细胞、NK细胞)的组合物可以直接注射到肿瘤, 淋巴结或感染部位。

[0779] 根据本文方法制造的免疫效应细胞可以与降低 $T_{REG}$ 细胞群体的分子联合施用于受试者。减少(例如消耗) $T_{REG}$ 细胞数量的方法是本领域已知的, 包括例如CD25消耗、环磷酸胺施用和调节性GITR功能。不希望受理论束缚, 相信在单采血液成分术之前或在施用本文所述的CAR表达细胞之前减少受试者中 $T_{REG}$ 细胞的数目减少了在肿瘤微环境中不需要的免疫细胞(例如Treg)并降低了受试者复发的风险。在一个实施方案中, 向受试者施用本文所述的表达CAR的细胞与靶向GITR的分子和/或调节GITR功能的分子(例如GITR激动剂和/或消耗调节性T细胞(TREG)的GITR抗体)组合。在实施方案中, 表达本文所述的CAR细胞与环磷酸胺联合施用于受试者。在一个实施方案中, GITR结合分子和/或调节GITR功能的分子(例如, GITR激动剂和/或Treg消耗GITR抗体)在CAR表达细胞之前施用。例如, 在一个实施方案中, GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。在实施方案中, 在施用(例如, 输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血液成分术之前将环磷酸胺施用于受试者。在实

施方案中,在施用(例如,输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血液成分术前将环磷酰胺和抗GITR抗体施用于受试者。在一个实施方案中,受试者患有癌症(例如,实体癌症或诸如ALL或CLL的血液学癌症)。在一个实施方案中,受试者患有CLL。在一个实施方案中,受试者患有ALL。在实施方案中,受试者患有实体癌,例如,本文所述的实体癌。示例性的GITR激动剂包括例如GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如,二价抗GITR抗体),比如例如美国专利号:6,111,090、欧洲专利号:090505B1、美国专利号:8,586,023、PCT公开号:WO 2010/003118和2011/090754中描述的GITR融合蛋白,或例如在美国专利号:7,025,962、欧洲专利号:1947183B1、美国专利号:7,812,135、美国专利号:8,388,967、美国专利号:8,591,886、欧洲专利号:EP 1866339、PCT公开号:WO 2011/028683、PCT公开号:WO 2013/039954、PCT公开号:WO2005/007190、PCT公开号:WO 2007/133822、PCT公开号:WO2005/055808、PCT公开号:WO 99/40196、PCT公开号:WO 2001/03720、PCT公开号:WO99/20758、PCT公开号:WO2006/083289、PCT公开号:WO 2005/115451、美国专利号:7,618,632和PCT公开号:WO 2011/051726中所述的抗GITR抗体。

[0780] 在一个实施方案中,本文所述的表达CAR的细胞与减少Treg细胞群体的分子联合施用于受试者。减少Treg细胞的数量(例如,消耗)的方法在本领域中是已知的,并且包括例如CD25消耗、环磷酰胺施用和调节性GITR功能。不希望受理论束缚,相信在单采血液成分术之前或在施用本文所述的CAR表达细胞之前减少受试者中T<sub>REG</sub>细胞的数目减少了在肿瘤微环境中不需要的免疫细胞(例如Treg)并降低了受试者复发的风险。

[0781] 在一个实施方案中,向受试者施用本文所述的表达CAR的细胞的疗法与靶向GITR的分子和/或调节GITR功能的分子(例如GITR激动剂和/或消耗调节性T细胞(TREG)的GITR抗体)组合。在实施方案中,表达本文所述的CAR细胞与环磷酰胺联合施用于受试者。在一个实施方案中,GITR结合分子和/或调节GITR功能的分子(例如,GITR激动剂和/或Treg消耗GITR抗体)在CAR表达细胞之前施用。例如,在一个实施方案中,GITR激动剂可以在细胞的单采血液成分术之前施用。在实施方案中,在施用(例如,输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血液成分术之前将环磷酰胺施用于受试者。在实施方案中,在施用(例如,输注或再输注)CAR表达细胞之前或在细胞的单采血液成分术前将环磷酰胺和抗GITR抗体施用于受试者。在一个实施方案中,受试者患有癌症(例如,实体癌症或诸如ALL或CLL的血液学癌症)。在一个实施方案中,受试者患有CLL。在一个实施方案中,受试者患有ALL。在实施方案中,受试者患有实体癌,例如,本文所述的实体癌。

[0782] 在一个实施方案中,将本文所述表达CAR的细胞与GITR激动剂(例如,本文所述GITR激动剂)联合施用给受试者。在一个实施方案中,在表达CAR的细胞之前,施用GITR激动剂。例如,在一个实施方案中,可以在细胞的单采血液成分术之前,施用GITR激动剂。在一个实施方案中,受试者患有CLL。

[0783] 示例性的GITR激动剂包括例如GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如,二价抗GITR抗体),比如例如美国专利号:6,111,090、欧洲专利号:090505B1、美国专利号:8,586,023、PCT公开号:WO 2010/003118和2011/090754中描述的GITR融合蛋白,或例如在美国专利号:7,025,962、欧洲专利号:1947183B1、美国专利号:7,812,135、美国专利号:8,388,967、美国专利号:8,591,886、欧洲专利号:EP 1866339、PCT公开号:WO 2011/028683、PCT公开号:WO 2013/039954、PCT公开号:WO2005/007190、PCT公开号:WO 2007/133822、PCT公开号:

W02005/055808、PCT公开号:W0 99/40196、PCT公开号:W0 2001/03720、PCT公开号:W099/20758、PCT公开号:W02006/083289、PCT公开号:W0 2005/115451、美国专利号:7,618,632和PCT公开号:W0 2011/051726中所述的抗GITR抗体。

[0784] 在一个实施方案中,将与本文所述的BTK抑制剂联合的本文所述表达CAR的细胞与GITR激动剂(例如,本文所述GITR激动剂)联合施用给受试者。在一个实施方案中,在表达CAR的细胞之前,施用GITR激动剂。例如,在一个实施方案中,可以在细胞的单采血液成分术之前,施用GITR激动剂。在一个实施方案中,受试者患有CLL。

[0785] 示例性的CAR构建体

[0786] 表1中提供了抗CD19结合结构域的序列。表11中提供了抗BCMA结合结构域的序列。完整CAR构建体可使用表1或表11中所述的任何抗原结合结构域与下面提供的一个或多个额外的CAR组分产生。

[0787] • 前导序列(氨基酸序列)(SEQ ID NO:1)

[0788] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0789] • 前导序列(核酸序列)(SEQ ID NO:12)

[0790] ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC

[0791] • CD8铰链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:2)

[0792] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0793] • CD8铰链(核酸序列)(SEQ ID NO:13)

[0794] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

[0796] • CD8跨膜(氨基酸序列)(SEQ ID NO:6)

[0797] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0798] • 跨膜(核酸序列)(SEQ ID NO:17)

[0799] ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC

[0800] • 4-1BB胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:7)

[0801] KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

[0802] • 4-1BB胞内结构域(核酸序列)(SEQ ID NO:18)

[0803] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0804] • ICOS胞内结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:364)

[0805] T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L

[0806] • ICOS胞内结构域(核酸序列)(SEQ ID NO:365)

[0807] ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

[0808] • CD3 $\zeta$ 结构域(氨基酸序列)(SEQ ID NO:9)

[0809] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- [0810] • CD3 $\zeta$  (核酸序列) (SEQ ID NO:20)  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG
- [0811] GCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTAC  
AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA  
GCGCCGGAGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG  
ACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0812] • CD3 $\zeta$ 结构域 (氨基酸序列;NCBI参考序列NM\_000734.3) (SEQ ID NO:10)
- [0813] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNE  
LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0814] • CD3 $\zeta$  (核酸序列;NCBI参考序列NM\_000734.3); (SEQ ID NO:21)  
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG  
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
- [0815] AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG  
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC  
ACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- [0816] IgG4铰链 (氨基酸序列) (SEQ ID NO:36)  
ESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
- [0817] REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM
- [0818] IgG4铰链 (核苷酸序列) (SEQ ID NO:37)
- [0819] GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCC  
AGCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAG  
GTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC  
GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAG  
CACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA  
ATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCA  
AGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAG
- [0820] ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATC  
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT  
GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTG  
GCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC  
CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG
- [0821] EF1 $\alpha$ 启动子

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGT  
 TGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG  
 GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATA  
 AGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTA  
 AGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTT  
 GAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGG  
 GTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGC  
 CTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC  
 TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCT  
 GGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGG  
 CCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTG  
 CGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTG  
 CCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCA  
 CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGG  
 AGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT  
 TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTC  
 GATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGA  
 TGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT  
 AATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACA  
 GTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGA (SEQ ID NO: 11)

[0822]

[0823] Gly/Ser (SEQ ID NO:25)

[0824] GGGGS

[0825] Gly/Ser (SEQ ID NO:363) :此序列可包含1-6个“Gly Gly Gly Gly Ser”重复单元

[0826] GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

[0827] Gly/Ser (SEQ ID NO:27)

[0828] GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

[0829] Gly/Ser (SEQ ID NO:28)

[0830] GGGGSGGGGS GGGGS

[0831] Gly/Ser (SEQ ID NO:29)

[0832] GGGGS

[0833] 多聚A (SEQ ID NO:30)

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
[0834] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300

aaaaaaaa	360
aaaaaaaa	420
aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	1140
aaaaaaaa	1200
aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	1560
aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	1680
[0835] aaaaaaaaa	1740
aaaaaaaa	1800
aaaaaaaa	1860
aaaaaaaa	1920
aaaaaaaa	1980
aaaaaaaa	2040
aaaaaaaa	2100
aaaaaaaa	2160
aaaaaaaa	2220
aaaaaaaa	2280
aaaaaaaa	2340
aaaaaaaa	2400
aaaaaaaa	2460
aaaaaaaa	2520
aaaaaaaa	2580
aaaaaaaa	2640
aaaaaaaa	2700
aaaaaaaa	2760
aaaaaaaa	2820
aaaaaaaa	2880
aaaaaaaa	2940
aaaaaaaa	3000
aaaaaaaa	3060
aaaaaaaa	3120











[0851] aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

[0852] Gly/Ser (SEQ ID NO:38) :此序列可包含1-10个“Gly Gly Gly Ser”重复单元

[0853] GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS

[0854] 表4中示出了可用于本文所述方法中的示例性CD19 CAR构建体:

[0855] 表4:CD19 CAR构建体

名称	SEQ ID	序列
CAR 1		
CAR1 scFv 结构域	39	EIVMTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS
103101 CAR1 可溶的 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctca aaataccttaattgggtatcaacagaagcccggacaggetcctcgcctctg atctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcgggt agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaaggggaacaccctgcoctacacctt ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt ggggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggt cttgtgaagccatcagaaactcttccactgacttgtagctgtgagcggagtg tctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggggt ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttca tccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg tcaactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgctgtactattgc gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggtactctggtcaccggtgccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 可溶的 scFv - aa	64	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatls slspgeratls crasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpssetls lctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyss slksrvtiskdnsknqvs lklssvtaadtavyyca khyyyyggsyamdywgq gtlvtvsshhhhhhh
104875 CAR 1 - 全长 - nt	90	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctca

[0857]

		<p>aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacacctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagcggagtg  tctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttca  tcctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgc  gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  ggtactctgggcaccgtgtccagcaccactaccaccagcaccgggaccacc  accccggtcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca  ttagaccgcagctgggtggggcctgcataaccggggctcttgacttcgcc  tgcgatatctacatttgggcccctctggctgggtacttgccgggctctgctg  ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggagaagctgctg  tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag  gacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg  cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag  aaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagagaggagtacgacgtg  ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgcaga  agaatccccagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca  gaagcctatagcagagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggc  cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac  gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
104875 CAR 1 - 全长 - aa	77	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatls slspgeratls crasqdis  kyl nwyqqkpgqaprrlliyhtsr l hsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg  lvkpsetls l tctvsgvslpdygvswirqppgkglewivgviwgsettyyss  slksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgq  gtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa  cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqttee  dgcscr fpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedydv  ldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkg  hdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CAR 2		
CAR2 scFv 结构域	40	<p>eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgqaprrlliyht  sr l hsgiparfsgsgsgtdytl t isslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt  kleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls l tctvsgvslpd  ygvswirqppgkglewivgviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslkl  ssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgqgtlvtvss</p>
103102 CAR2 - 可 溶的 scFv - nt	53	<p>atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctcccagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacacctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgactgtgagcggagtg  tctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatca  tcctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgc  gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  ggtactctgggcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>

[0858]

<p>103102 CAR2 - 可 溶的 scFv - aa</p>	<p>65</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyqs slksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvsshhhhhhh</p>
<p>104876 CAR 2 - 全长 - nt</p>	<p>91</p>	<p>atggcctcctgtcaccgcctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctt tcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagcctcccaagacatctca aaataccttaattggatcaacagaagcccggacaggtcctcgccttctg atctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcggg agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacacccctgcctacacctt ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggagg gggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccggg cttgtgaagccatcagaaactcttccactgacttgactgtgagcggagtg tctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactaccaatca tccctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg tactgaaactgtcatctgtgaccgagccgacaccgccgtgactattgc gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggtactctgggcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacc accccggtcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgctcgggaggca tgtagaccgcagctggggggcgtgcataaccgggtcttgacttcgccc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtagcttggcggggtcctgctg ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgggtcggaagaagctgctg tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtagcagctg ctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcccgaagccgcgcaga aagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgcgcctcgg</p>
<p>104876 CAR 2 - 全长 - aa</p>	<p>78</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyqs slksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydv ldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk hdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR 3</p>		
<p>CAR3 scFv 结构域</p>	<p>41</p>	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigvi wgsettyysssllksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatlslspger atlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgt dytltlisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik</p>
<p>103104 CAR 3 - 可溶的 scFv - nt</p>	<p>54</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttccac gccgctcggcccagaactccagcttcaagaatcagggcctggctggtgaag ccatctgagactctgtccctcacttgaccggtgagcggagtgccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg atcggagtgatttggggtagcgaaaccactactattcatctccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgattactgtgccaagcat</p>

[0859]

		tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagggaaactctggtcactgtgtcatctgggtggaggaggttagcggaggagcgggagcgggtggaagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaa tacctcaattgggatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatac taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc cagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3 - 可溶的 scFv - aa	66	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywqggtlvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfg qgtkleikhhhhhhhh
104877 CAR 3 - 全长 - nt	92	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcac gccgctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctgggtgaag ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgctccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg g atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcgctgacaccgcgctgtattactgtgccaagcat tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagggaaactctg gtcactgtgtcatctgggtggaggaggttagcggaggagcgggagcgggtgga ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct cccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaa tacctcaattgggatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatac taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc cagggcaccaagcttgagatcaaaaaccactactcccgtccaaggccaccc acccctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgctcgggagggca t gtagaccgcagctgggtggggccgctgcataaccgggggtcttgacttcgcc tgcgatatactacatttgggcccctctggctggtagcttgcgggggtcctgctg ctttactcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctg tacatctttaaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcaga aagaatccccaaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcagattgggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
104877 CAR 3 - 全长 - aa	79	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywqggtlvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhsgiparfsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfg qgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttee dgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyd vldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk ghdglyqqglstatkdydalhmqalppr
CAR 4		
CAR4 scFv 结构域	42	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigvi wgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyy gsyamdywqggtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispger

		atlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgt dytltisslqpedfavvfccqgntlpytfgqggtkleik
103106 CAR4 - 可溶的 scFv - nt	55	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcaac gcccgtcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggggaag ccatctgagactctgtccctcacttgaccctgagcggagtgccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgtattactgtgccaagcat tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggaactctg gtcactgtgtcatctgggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct cccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaa tacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatac taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac ttcgccgtctacttctgcccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc cagggcaccagcttgagatcaaacatcaccaccatcaccatcac
103106 CAR4 - 可溶的 scFv - aa	67	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavvfccqgntlpytfg qgtkleikhhhhhhh
104878 CAR 4 - 全长 - nt	93	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcaac gcccgtcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggggaag ccatctgagactctgtccctcacttgaccctgagcggagtgccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgtattactgtgccaagcat tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggaactctg gtcactgtgtcatctgggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct cccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaa tacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatac taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac ttcgccgtctacttctgcccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc cagggcaccagcttgagatcaaaaaccactactcccgtccaaggccaccc accctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgctgctcggaggca tgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataaccggggtcttgacttcgcc tgcatatctacatttgggcccctctggctggtacttgccggggtcctgctg cttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcggagaagaagctgctg tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgcccgttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtaacgactg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgcaga aagaatccccagagggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcagattgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggc cacgacggactgtaccaggactcagcaccgccccaaggacacctatgac gctcttccatgacaggccctgccgctcgg
104878 CAR 4 - 全长 - aa	80	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavvfccqgntlpytfg

[0860]

[0861]

		qgkkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreedyv ldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkg hdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 5		
CAR5 scFv 结构域	43	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyht srhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt kleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsg vslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnskq vslklssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgggtlvtvss
99789 CAR5 - 可 溶的 scFv - nt	56	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccat gcccgtcggcctgagatcgtcatgacccaaagcccgcctaccctgtccctg tcacccggcgagagggcaaccctttcatgacagggccagccaggacatttct aagtacctcaactggatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctg atctaccacaccagccgctccacagcggatccccgcagatttccggg agcgggtctggaaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccag gatttcgcccgtctatttctgccagcaggggaatactctgccgtacacctc ggcaaggtaccaagctggaaatcaagggagggcaggatcagcgggtggc ggaagcggaggagggtggctccggaggaggagggttccaagtgcagcttcaa gaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgt accgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagctctctggattcggcag cctccgggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagact acttactactcttcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaaagataat agcaagaaccaagtgctcacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacacc gccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggtcttatgctatg gactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcac caccatcatcac
99789 CAR5 - 可 溶的 scFv -aa	68	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyysssllksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyyggsyam dywgggtlvtvssshhhhhhhh
104879 CAR 5 - 全长 -nt	94	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gcccgtcggcccgaattgtgatgaccagtcacccgcccactcttagcett tcacccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccagacatctca aaataccttaattggatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg atctaccacaccagccggctocattctggaatccctgccaggttcagcggg agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaaacacctgcctacacctt ggacagggcaccgaagctcgagattaaaggtggagggtggcagcggaggagg gggtccggcgggtggagggaagcggcggaggcgggagccaggtccaactcaa gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt actgtgagcggaggtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacag ccaccgggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagact acttactactcttcatccctcaagtacgcgctcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacaggggtactctgggtcaccgtgtccagcaccactacccca gcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgctcgggaggtatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccgg ggctcttgacttcgcccgcgatatctacatttgggcccctctggctggact tgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgggt cggagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacgggtgttcatgcccgttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga

		gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggggc gggaagccgcgcagaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
104879 CAR 5 - 全长 - aa	81	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlspsgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyysslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyam dywgqgtlvtvsssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr glfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklliyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrffeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 6		
CAR6 scFv 结构 域	44	eivmtqspatlspsgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyht srhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt kleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsg vslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskq vslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99790 CAR6 - 可 溶的 scFv - nt	57	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttccat gccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctg tcaccggcgagagggcaaccctttcatgcaggggcagccaggacatttct aagtacctcaactggatcagcagaagccagggcaggtcctcgcctgctg atctaccacaccagccgctccacagcggatccccgccagattttccggg agcgggtctggaaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccag gatttcgcgctctatttctgccagcaggggaatactctgccgtacacctc ggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcggaggatcagggcgggtggc ggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggtccccagtgacgttcaa gaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgt accgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcag cctccggggaagggcttgaatggattgggggtgattggggatcagagact acttactaccagtcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataat agcaagaaccaagtgctacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacacc gccgtgtactattgtgccaacattactattacggagggctcttatgtatg gactactggggacaggggaccctgggtgactgtcttagccatcaccatcac caccatcatcac
99790 CAR6 - 可 溶的 scFv - aa	69	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlspsgeratlscrasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyam dywgqgtlvtvssshhhhhhh
104880 CAR6 - 全长 - nt	95	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaatgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagcctcccaagacatctca aaataccttaattgggtatcaacagaagcccggacaggtcctcgcctctg atctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcggg agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaaacacctgccctacacctt ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt gggtccggcgggtggaggaagcggagggcggagggagccaggtccaactcaa gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacag ccaccggggaagggcttgaatggattggagtgattggggctctgagact acttactaccaatcatccctcaagtcacgctcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc

[0862]

[0863]

		gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcggggagctacgcaatg gattactggggacaggggtactctgggtcaccgtgtocagcaccactacccca gcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtcc ctgctccggaggcatgtagaccgcagctggggtggggccgtgcatacccg gggtcttgacttcgctgcatatctacatttggggccctctggctgggtact tgcggggctcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcgg cgaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaa ggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttgggctggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcgggagaggacgggaccagaaatggg gggaagccgcagaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
104880 CAR6 - 全长 - aa	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsctasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsdtlytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlq esggplvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgqgltlvsvsttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr glfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvq ttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 7		
CAR7 scFv 结构域	45	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigvi wgsettyysssksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgltlvsvsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatls spgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsg sgsdtlytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik
100796 CAR7 - 可 溶的 scFv - nt	58	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcat gccgccaggcccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggggaag cctctgagactctctcactgacttgaccgtcagcggcgtgtccctcccc gactacggagtgtcatggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatgg attgggtgcatctgggggtctgaaaccactactactcactcttccctgaag tccaggggtgacctagcaaggataattccaagaaccagggtcagccttaag ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgctgtattactgcgccaagcac tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc gtgactgtgagcagcggcgggtggaggggtctggaggtggaggatccgggtgg gggggtcaggcggaggaggagcagagattgtgatgactcagtcaccagcc acctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagagccagc caggacatttctaagtacctcaactggatcagcaaaaaccggggcaggcc cctgcctcctgatctaccatacctcacgccttactctgggtatccccgt cggtttagcggatcaggatctgggtaccgactacactctgaccatttccagc ctgcagccagaagatttgcagtgatttctgccagcagggcaataacctt ccttacacctcgggtcagggaaccaagctcgaatcaagcaccatcaccat catcaccaccat
100796 CAR7 - 可 溶的 scFv - aa	70	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp dygvswirppgkglewigviwgsettyysssksrvtiskdnskqvslkl lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgltlvsvsgggsgggsgg ggsgggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqa prlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsdtlytlitisslqpedfavyfcqqgntl pytfgggtkleikhhhhhhhh
104881 CAR 7 全长 - nt	96	atggctctgccggtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcac gccgctcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctggtggaag ccatctgagactctgtccctcacttgaccggtgagcggagtgccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg

[0864]

		atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaaagcat tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggactctg gtcactgtgtcatctgggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga ggtagctccggaggtggcgaagcgaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtcccttctcccggggaacgggctacccttcttctgggcatca caagatatctcaaaatacctcaattgggtatcaacagaagccgggacaggcc cctaggcttcttctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgca cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatct ctccagcccaggacttccgctctacttctgccagcagggtaacacctg ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc gctccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagcgcgttcc ctgctcgggaggtatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgg ggcttgacttcgctgcatatctacatttggggccctctggctgggtact tgccgggtcctgctgcttccactcgtgatcactcttactgtaagcgcgt cggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcagagattgggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
104881 CAR 7 全长 - aa	83	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg gsggggseivmtqspatlsispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqa prlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcccgntl pytfgqgkkleiktpprppptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR 8		
CAR8 scFv 结构域	46	qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirpppgkglewigvi wgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatls ispgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsg sgsgtdytlitisslqpedfavyfcccgntlpytfgqgkkleik
100798 CAR8 - 可 溶的 scFv - nt	59	atggcactgcctgtcactgcccctcctgctgctcctggccctccttctgcat gccgccaggccccaaagtcagctgcaagagtcaggaccggcactgggtgaag ccgtctgagactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccc gactacggagtgcatggatccgccaaacctcccgggaaagggcttgaatgg attgggtgtcatctgggggtctgaaaccacctactaccagcttctccctgaag tccagggtgaccatcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaag ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgccgtgtattactgcgccaagcac tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc gtgactgtgagcagcggcgggtggagggctctggaggtggaggatccgggtgt ggtagggcaggcggaggaggagcagagattgtgatgactcagtcaccagcc acccttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccagc caggacatttctaagtaacctcaactggatcagcaaaaaccggggcaggcc cctcgctcctgatctaccataacctcagccttactctgggtatccccgct cggtttagcggatcaggatctggtagcactacactctgaccatttccagc ctgcagccagaagatttcgagtgatcttctgccagcagggcaataacctt ccttacaccttcggtcagggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccat catcatcaccac

[0865]

<p>100798 CAR8 - 可 溶的 scFv - aa</p>	<p>71</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslp dygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgg ggsggggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgga prllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlstlsslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgtkleikhhhhhhhh</p>
<p>104882 CAR 8 - 全长 - nt</p>	<p>97</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcac gccgctcgcccacaagtcacagcttcaagaatcagggcctggctggtgaag ccatctgagactctgtccctcacttgaccgctgagcggagtgtccctcca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtgg atcggagtgtattggggtagcgaaccacttactatcaatcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgattactgtgccaagcat tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagggaactctg gtcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga gggtggctccggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatca caagatatctcaaaatacctcaattgggtatcaacagaagccgggacaggcc cctaggcttcttctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgca cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgacctctcatct ctccagcccaggacttcgcccgtctacttctgccagcagggtaacaccctg ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc gctccaagggcaccaccctgcccggaccatcgctctcagccgctttcc ctgctccggaggcatgtagaccgagctgggtggggcggctgatacccgg ggctctgacttcgctcgcgatctacatttggggcccctctggctgggtact tgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgggt cggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgca actactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaaccagctctacaacgaactcaatcttggctgggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcgggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcagaaagaatccccagaggccctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcagagattgggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaagggccacgagcggactgtaccagggactcagcaccggccacc aaggacacctatgacgctcttccatgacggccctcggccctcgg</p>
<p>104882 CAR 8 - 全长 - aa</p>	<p>84</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslp dygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgg ggsggggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgga prllyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlstlsslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgtkleikttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR 9</p>		
<p>CAR9 scFv 结构域</p>	<p>47</p>	<p>eivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpggaprlliyht srhsgiparfsgsgsgtdytlstlsslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt kleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstlctvsg vslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskq vslklssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgggtlvtvss</p>
<p>99789 CAR9 - 可 溶的 scFv - nt</p>	<p>60</p>	<p>atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctcctcctcgcacttcttctccat gccgctcgccctgagatcgtcatgacccaaagcccgcctaccctgtccctg tcacccggcgagagggaacccttctcatgacggggccagccaggacatttct aagtacctcaactggatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctg atctaccacaccagcccgcctccacagcgggtatccccgccagattttccggg agcgggtctggaaccgactacaccctcaccatctcttctctgagcccag gatttcgcccgtctatttctgccagcaggggaataactctgcccgtacacctc</p>

[0866]

		gggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgaggatcaggcggtggc ggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaa gaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgt accgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgccag cctccggggaagggcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagact acttactacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataat agcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgcegtgacacc gccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggtcttatgctatg gactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcac caccatcatcac
99789 CAR9 - 可 溶的 scFv - aa	72	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgggtlvtvsshhhhhhhh
105974 CAR 9 - 全长 - nt	98	atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagacctccaagacatctca aaataccttaattgggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggttcagcggg agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacaccctgcccactacactt ggacagggcaccagctcgagattaaagggtggagggtggcagcagggaggt gggtccggcgggtggaggaagcggaggcgggtgggagccaggtccaactcca gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcagacag ccaccggggaagggcttggaaatggattggagtgatttggggctctgagact acttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgacgcgacacc gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacaggggtactctgggtcaccgtgtccagcaccactacccca gcaccgaggccaccaccggctcctaccatcgccctccagcctctgtcc ctgctcgggagggatgtagaccgcagctgggtggggcgggtgcatacccg ggcttgacttcgctcgcgatctacatttgggcccctctggctgggtact tgcgggggtcctgctgcttctcactcgtgatcactcttactgtaagcgcgg cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgcccgggtcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaaaggggctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcagagattgggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgcccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg
105974 CAR 9 - 全长 - aa	85	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdis kylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam dywgggtlvtvsssttpprppptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
CAR10		
CAR10 scFv 结构	48	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigvi wgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyg

[0867]

域		gsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatls1 spgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsg sgsgtdytltlisslqpedfavfyfcqqgntlpytfqggtkleik
100796 CAR10 - 可溶的 scFv - nt	61	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcat gccgccaggcccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggggaag ccgtctgagactctctcactgacttgtaccgtcagcggcggtgtccctcccc gactacggagtgatggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatgg attgggtgcatctgggggtctgaaaccacctactacaactcttccctgaag tccagggtgaccatcagcaaggataattccaagaaccagggtcagccttaag ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgctgtattactgcccagcagc tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc gtgactgtgagcagcggcggtggagggctctggagggtggaggatccgggtgg ggggggcaggcgggagggaggcagagattgtgatgactcagtcaccagcc accctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagagccagc caggacatttctaagtacctcaactgggatcagcaaaaaccggggcaggcc cctcgccctcctgatctaccataacctcagccttactctgggatccccgct cggtttagcggatcaggatctgggtaccgactacactctgaccatttccagc ctgcagccagaagatttcgcagtgatttctgccagcagggcaataaccctt ccttacacctcgggtcaggggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccat catcaccaccat
100796 CAR10 - 可溶的 scFv - aa	73	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslp dygvswirpppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg ggsggggseivmtqspatls1spgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqa prlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavfyfcqqgntl pytfqggtkleikhhhhhhhh
105975 CAR 10 全长 - nt	99	atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccggccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaacctgtcttgagagcctcccagacatctca aaataccttaattgggtatcaacagaagcccgacaggtcctcgctctctg atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggttcagcgg agcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacacctgccctacacctt ggacagggcaccagctcgagattaaagggtggaggtggcagcgggaggggt gggtccggcgggtggaggaagcggagggcgggtgggagccaggtccaactcca gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaactcttctactgacttgt actgtgagcggagtgctctctccccgattacggggtgtcttggatcagacag ccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagact acttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac tctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg gattactggggacaggggtactctggtcaccggtccagcaccactacccca gcaccgaggccaccaccggctcctaccatcgccctcccagcctctgtcc ctgctccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcctgcataccgg ggctctgacttcgctgcgatatactacatttggggccctctggctgggtact tgccgggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgggt cggagaagctgctgtacatctttaaagcaaccttcatgaggcctgtgag actactcaagaggaggacggctgttcatgcccgggtcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcgggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgagaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcagagattgggtatgaaaggggaaagc agaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccggccacc aaggacacctatgacgctcttccatgacagccctgccgctcgg
105975 CAR 10	86	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDTYTLTISSLQPE

全长 - aa		DFAVYFCQQGNTLPHYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQ ESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSET TYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAM DYWGQGLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRR EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CAR11		
CAR11 scFv 结构 域	49	eivmtqspatlspsgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyht srlhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt kleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpd ygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvsllk ssvtaadtavyycahyyygggyamdywgqglvtvss
103101 CAR11 - 可溶的 scFv - nt	62	Atggcctccctgtcaccgacctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagacctcccaagacatctca aaataccttaattgggtatcaacagaagcccgacaggtcctcgcctctg atctaccacaccagcggctccattctggaatccctgccaggttcagcggg agcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctattctgtcagcaaggggaacacctgcccacacctt ggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt gggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaagcggagccgggt cttgtgaagccatcagaaactcttccactgacttgactgtgagcggagtg tctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaattca tccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgactattgc gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggactctgggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR11 - 可溶的 scFv - aa	74	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlspsgeratlsctasqdis kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpe dfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyns slksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycahyyygggyamdywgq glvtvsshhhhhhhh
105976 CAR 11 全 长 - nt	100	atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcac gccgctcggccacaagtcacgcttcaagaatcagggcctggctggtgag ccatctgagactctgtccctcacttgaccgctgagcggagtgccctccca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtg atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactataactcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgtattactgtgccaagcat tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggaaactctg gtcactgtgtcatctgggtggaggaggttagcggaggagggcggagcgggtgga gggtggctccggaggtggcgggaagcgaatcgtgatgaccagagccctgca accctgtcccttctcccgggggaacgggctacccttcttctgctgggcatca caagatatctcaaaatacctcaattgggtatcaacagaagccgggacagggc cctaggcttcttactaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgca cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatct ctccagcccaggaacttcgcccgtctacttctgccagcagggtaacacctg ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc gctccaaggccacccaccctgccccgaccatcgccctctcagccgctttcc ctgctcggaggtatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccgg ggctctgacttcgctgcatatctacatttggggcccctctggctgggtact tgccgggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgggt cggagaagctgctgtacatctttaaagcaacccttcatgaggcctgtgcag

[0868]

[0869]

		actactcaagaggaggacggctgttcatgcccgttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaaagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgcagattggatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgcagcggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 全 长 - aa	87	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQA PRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAVYFCQQGNTL PYTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR12		
CAR12 scFv 结构 域	50	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigvi wgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahhyyyg gsyamdywgqglvtvssggggsggggseivmtqspatlsispger atlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgst dytltissslqpedfavyfcaqqgntlpytfqggtkleik
103104 CAR12 - 可溶的 scFv - nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcac gcccgtcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctggtggaag ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctccca gactacggagtgcgctggattagacagcctcccggaaagggactggagtgg atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactataactcttccctgaag tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcccgtgtattactgtgccaagcat tactactatggagggctctacgccatggactactggggccagggaactctg gtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagcctgcaaccctgccccttct cccggggaacgggctacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaaaa tacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatc taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggagc ttcgccgtctacttctgcccagcagggtaacaccctgcccgtacaccttcggc cagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccaccatcaccatcac
103104 CAR12 - 可溶的 scFv - aa	75	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslp dygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycahhyyyggsyamdywgqglvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlsqrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlli yhtsrlhsgiparfsgsgstdytltissslqpedfavyfcaqqgntlpytfq ggtkleikhhhhhhhh
105977 CAR 12 - 全长 - nt	101	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgcttccgctggctcttctgctccac gcccgtcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgacagagcctcccagacatctca aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctg atctaccacaccagcggctccattctggaatccctgccaggttcagcggg agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag gacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgcctacacctt ggacagggcaccagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggt gggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggt cttgtgaagccatcagaaactcttctcactgacttgtactgtgagcggagtg

[0870]

		tctctccccgattacgggggtgctcttgatcagacagccaccggggaaggggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaactcattccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgctgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgagggccacccaccccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgctgctcgaggccaagttagacccgcagctgggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgccctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgccggggctctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggaagcggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagggcggctgccaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgcagaagaatcccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaagggcacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg
105977 CAR 12 - 全长 - aa	88	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFAVYFCQQGNTLPLYTFGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYNS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVVYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
CTL019		
CTL019 - 可溶的 scFv-Hista g - nt	362	atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgcctctgcttcttcatgcagcaaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgccctctctggagacaggggtgaccatttcttctgctgcgcccagccaggacatcagcaagtatctgaaactggatcagcagagaagccggaaaccgtgaagctctgatactaccatacctctcgcctgcatagcggcgtgccctcagcgttctctggaagcggatcaggaaccgattattctctcactatttcaaactcttgagcaggaa gatattgccacctatttctgccagcagggtaataacctgccctacacctcggaggagggaccaagctcgaaatcaccgggtggaggaggcagcggcgggtgga gggctctggagggtgggtctgagggtgaagctgcaagaatcagggcctgga cttgtggccccttcacagtcctgagcgtgacttgaccgtgctcggagctc cccctgcccgactacggagtgatggatcagacaacctccacggaaagga ctggaatggctcgggtgctctggggtagcgaactacttactacaattca gccctcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaagtc tttcttaagatgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgt gctaagcactactactacggaggatcctacgctatggattactggggacaa ggtacttccgtcactgtctcttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - 可溶的 scFv-Hista g - aa	76	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIS KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPLYTFGGTKLEITGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPG LVAPQSLSVTCVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYNS ALKSRLTIKDNSKQVFLKMNLSLQDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSSHSHHHHHH
CTL019 全长 - nt	102	atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctgctccacgccgcccaggccggacatccagatgacacagactacatcctcctgctgctgctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctg

[0871]

		atctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaagggttcagtggc agtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaa gatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgtctccgtacacggtc ggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcggtggctcggcggtggt gggtcgggtggcgggcggtatctgaggtgaaactgcaggagtccagacctggc ctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtc tcattaccggactatgggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggt ctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattca gctctcaaattccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtt ttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatttactactgt gccaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggccaa ggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccacca acaccggcgccccaccatcgctgcagccctgtccctgcgcccagaggcg tgccggccagcgcgggggggcgagtgacacgagggggctggacttcgcc tgtgatctacatctggcgcccttggccgggacttgtggggctccttctc ctgtcactgggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctg tatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaa gatggctgtagctgcccatttccagaagaagaaggaggatgtgaact agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagcaggccag aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtt ttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaagg aagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcg gaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaagggg cacgatggccttaccagggctcagtacagccaccaaggacacctacgac gcccttcacatgcaggccctgccccctcgc
CTL019 全长 - aa	89	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdis kylnwyqqkpdgtvkllyhtsrlhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqe diatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpg lvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyyns alksrltiikdnksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgq gtsvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedyv ldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkq hdglyqglstatkdydalhmqalppr
CTL019 scFv 结构 域	51	diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyht srlhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggt kleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslp ygvswirpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflkm nslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvss

[0872] 可用于本文所述方法中的示例性抗BCMA CAR构建体 (例如, scFv结构域和CAR分子的氨基酸和核酸序列) 在表11中示出。重链HC CDR (HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3) 和LC CDR (LC CDR1、LC CDR2、LCCDR3) 加下划线。还提供了每个scFv的氨基酸序列可变重链和可变轻链序列。

[0873] 表11. 抗BCMA scFv结构域和抗BCMA CAR分子的氨基酸和核酸序列

名称/描述	SEQ ID NO:	序列
139103		
[0874] 139103- aa ScFv 结构域	140	<u>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWVSGIS</u> <u>RSGENTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHYY</u> <u>GGMDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASGGGSGGRASGGGSDIVLTQSPGTL</u> <u>SLSPGERA</u> <u>TLSCRASQSISSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTD</u> <u>FTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKLEIK</u>
139103- nt ScFv 结构域	141	CAAGTGCAACTCGTGGAAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGAAGATCGC TTAGACTGTCGTGTGCCGCCAGCGGGTTCACCTTCTCGAACTACGCGATGTC

[0875]

		CTGGGTCCGCCAGGCACCCGGAAAGGGACTCGGTTGGGTGTCCGGCATTTC CGGTCCGGCGAAAATACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCA TCTCAAGGGACAACAGCAAAAACACCCTGTACTTGCAAATGAACTCCCTGCG GGATGAAGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTTCGCCTGCCATTACTAC GGCGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGAACCACTGTGACTGTGACGAGCGCGT CGGGTGGCGCGCGCTCAGGGGGTCCGGCCCTCCGGGGGGGAGGGTCCGACAT CGTGCTGACCCAGTCCCCGGGAACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGAGAGCGCGG ACCCTGTCATGCCGGGCATCCCAGAGCATTAGCTCCTCCTTTCTCGCCTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCGAGGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAG AAGGGCTACCGGAATCCCAGACCGGTTCTCCGGCTCCGGTCCGGGACCGAT TTCACCCTTACTATCTCGCGCTGGAACCTGAGGACTCCGCCGTCTACTACT GCCAGCAGTACCCTCATCCCCGTCTGGACGTTCCGACAGGGCACCAAGCT GGAGATTAAG
139103- aa VH	142	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWVSGIS RSGENTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRDEDTAVYYCARSPAHHY GGMDVWGQGTITVTVSS
139103- aa VL	143	DIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGT KLEIK
139103- aa 全长 CAR	144	MALPVTALLLPLALLLHAARPOVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSN YAMSWVRQAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRDEDTAVYYCARSPAHHYGGMDVWGQGTITVTVSSASGGGSGGRASGGG GSDIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQKPGQAPRLLIY GASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQ GTKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEDVLDKR RGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR
139103- nt 全长 CAR	145	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAACTCGTGGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACC CGGAAGATCGCTTAGACTGTCGTGTGCCGCCAGCGGGTTCACTTTCTCGAAC TACGCGATGTCTGGGTCCGCCAGGCACCCGGAAAGGGACTCGGTTGGGTGT CCGGCATTTCGGGTCGGCGAAAATACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGG CCGCTTACCATCTCAAGGGACAACAGCAAAAACACCCTGTACTTGCAAATG AACTCCCTGCGGGATGAAGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTTCGCCTG CCCATTACTACGGCGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGAACCACTGTGACTGT CAGCAGCGCGTCCGGTGGCGCGGCTCAGGGGGTCCGGCCCTCCGGGGGGGA GGTCCGACATCGTGCTGACCCAGTCCCCGGGAACCCCTGAGCCTGAGCCCG GAGAGCGCGCACCCCTGTCTATGCCGGGCATCCCAGAGCATTAGCTCCTCCTT TCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCGAGGCTGCTGATCTAC GGCGTAGCAGAAGGGCTACCGGAATCCCAGACCGGTTCTCCGGCTCCGGTT CCGGGACCGATTTACCCTTACTATCTCGCGCTGGAACCTGAGGACTCCGC CGTCTACTACTGCCAGCAGTACCCTCATCCCCGTCTGGACGTTCCGGACAG GGCACCAGCTGGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACCGCTGT TCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGGAGGAGGAGGAGG CAACGAATCAATCTTGGTCGGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG

[0876]

139105		
139105- aa ScFv 结构域	146	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS WNSGSI <del>GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN</del> SLRAEDTALYYCSVHSFLAY WGQGT <del>LVT</del> VSSASGGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLPVTPEP <del>ASISCR</del> SSQSL <del>LHS</del> NGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN <del>RASGVPDR</del> FSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGT <del>KVEIK</del>
139105- nt ScFv 结构域	147	CAAGTGCAACTCGTCGAATCCGGTGGAGGTCTGGTCCAACCTGGTAGAAGCC TGAGACTGTCGTGTGCGGCCAGCGGATTCACCTTTGATGACTATGCTATGCA CTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCGGGAATTAGC TGGAACTCCGGGTCCATTGGCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCA TCTCCC <del>CGACAACGCAAAGA</del> ACTCCCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTCAG GGCTGAGGATACCGCGCTGTACTACTGCTCCGTGCATTCCCTTCCGGCCTAC TGGGGACAGGGA <del>ACTCTGGT</del> CACCGTGTGCGAGCGCTCCGGCGGGGGGCT CGGGTGGACGGGCTCGGGCGGAGGGGGTCCGACATCGTGATGACCCAGAC CCCGCTGAGCTTGCCCGTGA <del>CTCCCGGAGAGCCTGCATCCATCTCCTGCCGG</del> TCATCCCAGTCCCTTCTCCACTCCAACGGATACA <del>ACTACCTCGACTGGTACC</del> TCCAGAAGCCGGACAGAGCCCTCAGCTTCTGATCTACCTGGGGTCAAATAG AGCCTCAGGAGTGCCGGATCGGTT <del>CAGCGGATCTGGTTCGGGA</del> ACTGATTTT ACTCTGAAGATTTCCCGCGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGTA TGCAGGCGCTGCAGACCCCTATACTTCGGCCAAGGGACGAAAGTGGAGAT CAAG
139105- aa VH	148	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS WNSGSI <del>GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN</del> SLRAEDTALYYCSVHSFLAY WGQGT <del>LVT</del> VSS
139105- aa VL	149	DIVMTQTPLSLPVTPEP <del>ASISCR</del> SSQSL <del>LHS</del> NGYNYLDWYLQKPGQSPQLL IYLGSN <del>RASGVPDR</del> FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFG QGT <del>KVEIK</del>
139105- aa 全长 CAR	150	MALPVTALLPLALLLHAARPVQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSI <del>GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN</del> NSLRAEDTALYYCSVHSFLAYWGQGT <del>LVT</del> VSSASGGGGSGGRASGGGSDIV MTQTPLSLPVTPEP <del>ASISCR</del> SSQSL <del>LHS</del> NGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSN <del>RASGVPDR</del> FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGT KVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL <del>YNELNLGRREEYDVL</del> DKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGK <del>HDGLYQG</del> LSTATKDTYDALHMQALPPR
139105- nt 全长 CAR	151	ATGGCCCTCCCTGTCA <del>CCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG</del> CCGCTCGGCCCAAGTGA <del>CTCGTCAATCCGGTGGAGGTCTGGTCCAACC</del> TGGTAGAAGCCTGAGACTGTCGTGTGCGGCCAGCGGATTCACCTTTGATGAC TATGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGT CGGGAATTAGCTGGA <del>ACTCCGGTCCATTGGCTACGCCGACTCCGTGAAGGG</del> CCGCTTCA <del>CATCTCCCGCACAACGCAAAGA</del> ACTCCCTGTACTTGCAAATG AACTCGCTCAGGGCTGAGGATACCGCGCTGTACTACTGCTCCGTGCATTCCCT TCCTGGCCTACTGGGGACAGGGA <del>ACTCTGGTCA</del> CCGTGTCGAGCGCCTCCGG CGGCGGGGGCTCGGGTGGACGGGCTCGGGCGGAGGGGGTCCGACATCGTG ATGACCCAGACCCCGCTGAGCTTGCCCGTGA <del>CTCCCGGAGAGCCTGCATCCA</del> TCTCCTGCCGGTCATCCCAGTCCCTTCTCCACTCCAACGGATACA <del>ACTACCT</del> CGACTGGTACCTCCAGAAGCCGGGACAGAGCCCTCAGCTTCTGATCTACCTG GGTCAAATAGACCTCAGGAGTGCCGGATCGGTT <del>CAGCGGATCTGGTTCGG</del> GAACTGATTTCACTCTGAAGATTTCCCGCGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGT CTACTACTGTATGCAGGCGCTGCAGACCCCTATACTTCGGCCAAGGGACG AAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTC CTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGC AGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGA TCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCA ACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCAATGC

		CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGA ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGA CGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCC TGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGG TATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGC CGCTCGG
139111		
139111- aa ScFv 结构域	152	EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRLS</sup> CAVSGFALS <sup>NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV</sup> YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>SRNTLYLQMN</sup> SLRPEDTAIYYCSA <sup>HGGESDV</sup> WGQGT <sup>TVT</sup> VSSASGGGSGGRASGGGSDIVMTQ <sup>TPLSLSVTPGQPASISCK</sup> SSQSLLRNDGK <sup>TPLYWYLQKAGQPPQLLIYE</sup> VSNR <sup>FSGV</sup> PDRF <sup>SGSGTDF</sup> TLKISRVEAEDV <sup>GAYYCMQNIQF</sup> PSFGG <sup>GTKLEIK</sup>
139111- nt ScFv 结构域	153	GAAGTGCAATTGTTGGAATCTGGAGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGATCAC TGAGACTTTCGTGTGCGGTGTCAGGCTTCGCCCTGAGCAACCACGGCATGAG CTGGGTGCGGAGAGCCCCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGTCGGGATCGTC TACTCCGGTTCAACTTACTACGCCGCAAGCGTGAAGGGTTCGCTTCACCATTT CCCGCGATAACTCCCGGAACACCCCTGTACCTCCAAATGAACTCCCTGCGGCC CGAGGACACCGCCATCTACTACTGTTCCGCGCATGGAGGAGAGTCCGATGTC TGGGGACAGGGCACTACCGTGACCGTGTCCGAGCGCCTCGGGGGGAGGAGGCT CCGGCGGTTCGCGCCTCCGGGGGGGGTGGCAGCGACATTGTGATGACGCAGAC TCCACTCTCGCTGTCCGTGACCCCGGGACAGCCCGCTCCATCTCGTGCAAG AGCTCCCAGAGCCTGCTGAGGAACGACGGAAAGACTCCTCTGTATTGGTACC TCCAGAAGGCTGGACAGCCCCGCAACTGCTCATCTACGAAGTGTCAAATCG CTTCTCCGGGGTCCCGGATCGGTTTTCCGGCTCGGGATCGGGCACCAGACTTC ACCCTGAAAATCTCCAGGGTCGAGGCCGAGGACGTGGGAGCCTACTACTGCA TGCAAAACATCCAGTTCCCTTCCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATTAA G
139111- aa VH	154	EVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRLS</sup> CAVSGFALS <sup>NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV</sup> YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>SRNTLYLQMN</sup> SLRPEDTAIYYCSA <sup>HGGESDV</sup> WGQGT <sup>TVT</sup> VSS
139111- aa VL	155	DIVMTQ <sup>TPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLRNDGK</sup> TPLYWYLQKAGQPPQLL IYEVS <sup>NR</sup> FSGV <sup>PDRF</sup> SGSG <sup>TDF</sup> TLKISRVEAEDV <sup>GAYYCMQNIQF</sup> PSFGG G <sup>GTKLEIK</sup>
139111- aa 全长 CAR	156	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLES <sup>GGGLVQPGGSLRLS</sup> CAVSGFALS <sup>N</sup> HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>SRNTLYLQMN</sup> SLRPEDTAIYYCSA <sup>HGGESDVWGQGT</sup> TVT <sup>VSSASGGGSGGRASGGGSDIV</sup> MTQ <sup>TPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLRNDGK</sup> TPLYWYLQKAGQPPQLLIYE VSNR <sup>FSGV</sup> PDRF <sup>SGSGTDF</sup> TLKISRVEAEDV <sup>GAYYCMQNIQF</sup> PSFGG <sup>GTK</sup> LEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGYQL STATKDTYDALHMQLPPR
139111- nt 全长 CAR	157	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGTTGGAATCTGGAGGAGGACTTGTGCAGCC TGGAGGATCACTGAGACTTTCGTGTGCGGTGTCAGGCTTCGCCCTGAGCAAC CACGGCATGAGCTGGGTGCGGAGAGCCCCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGT CCGGGATCGTCTACTCCGGTTCAACTTACTACGCCGCAAGCGTGAAGGGTTCG CTTACCATTTC <sup>CCGCGATAACTCCCGGAACACCC</sup> TGACCTCCAAATGAACTCCCTGCGGCCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGTTCCGCGCATGGAGGAG AGTCCGATGTCTGGGGACAGGGCACTACCGTGACCGTGTCCGAGCGCCTCGGG GGGAGGAGGCTCCGGCGGTTCGCGCCTCCGGGGGGGGTGGCAGCGACATTGTG ATGACGCAGACTCCACTCTCGCTGTCGCTGACCCCGGGACAGCCCGCTCCA TCTCGTGCAAGAGCTCCAGAGCCTGCTGAGGAACGACGGAAAGACTCCTCT GTATTGGTACCTCCAGAAGGCTGGACAGCCCCGCAACTGCTCATCTACGAA GTGTCAAATCGCTTCTCCGGGTGCCGATCGGTTTTCCGGCTCGGGATCGG

[0877]

[0878]

		GCACCGACTTCACCCTGAAAATCTCCAGGGTCGAGGCCGAGGACGTGGGAGC CTACTACTGCATGCAAAACATCCAGTTCCCTTCCCTCGGCGGGCCACAAAAG CTGGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAGGCATGTAGACCCGCAGC TGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATT TGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTCTACTCGTGATCA CTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGG TTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTCCGCGTGAAATTCAGCCGCA GCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACT CAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGG GACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGT ACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTAT GAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTC AGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCG CTCGG
139100		
139100- aa ScFv 结构域	158	QVQLVQSGAEVRKTGASVKVSKASGYIFDNFGINWVRQAPGGLEWMGWIN PKNNNTNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGPYYYQ SYMDVWGQGTMTVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLPVTPEP SISCRSSQSLLSHNGYNYLNWYLQKPGQSPQLLIYLGSKRASGVPDRFSGS SGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK
139100- nt ScFv 结构域	159	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGCGCAGAAGTCAGAAAAACCGGTGCTAGCG TGAAAGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACATTTTCGATAACTTCGGAATCAA CTGGGTGACACAGGCCCGGGCCAGGGGCTGGAATGGATGGATGGATCAAC CCCAAGAACAACAACCAACTACGCACAGAAGTCCAGGGCCGCGTGACTA TCACCGCCGATGAATCGACCAATACCGCCTACATGGAGGTGTCTCCCTGCG GTCGGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCGCGAGGGGCCATACTACTACCAA AGCTACATGGACGTCTGGGGACAGGGAACCATGGTGACCGTGTCTCCGCT CCGGTGGTGGAGGCTCCGGGGGGGGGGCTTCAGGAGCGGAGGAAGCGATAT TGTGATGACCCAGACTCCGCTTAGCCTGCCCGTACTCCTGGAGAACCGGCC TCCATTTCTGCGGGTCTCGCAATCACTCCTGCATTCACACGGTTTACA ACCTGAATTGGTACCTCCAGAAGCCTGGCCAGTCGCCCAAGTTGCTGACTA TCTGGGCTCGAAGCGCGCCTCCGGGGTGCCTGACCGGTTTAGCGGATCTGGG AGCGGCACGGACTTCACTCTCCACATCACCCGCGTGGGAGCGGAGGACGTGG GAGTGACTACTGTATGCAGGCGCTGCAGACTCCGTACACATTCGGACAGGG CACCAAGCTGGAGATCAAG
139100- aa VH	160	QVQLVQSGAEVRKTGASVKVSKASGYIFDNFGINWVRQAPGGLEWMGWIN PKNNNTNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGPYYYQ SYMDVWGQGTMTVTVSS
139100- aa VL	161	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLNWYLQKPGQSPQLL IYLGSKRASGVPDRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPYTFG QGTKLEIK
139100- aa 全长 CAR	162	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVRKTGASVKVSKASGYIFDN FGINWVRQAPGGLEWMGWINPKNNNTNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMEV SSLRSEDTAVYYCARGPYYYQSYMDVWGQGTMTVTVSSASGGGGSGGRASGG GSDIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLNWYLQKPGQSPQ LLIYLGSKRASGVPDRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPY TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHD GLYQGLSTATKTDYDALHMALPPR
139100- nt 全长 CAR	163	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGCGCAGAAGTCAGAAAAAC CGGTGCTAGCGTGAAAGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACATTTTCGATAAC TTCGGAATCAACTGGGTGACACAGGCCCGGGCCAGGGGCTGGAATGGATGG GATGGATCAACCCCAAGAACAACAACCAACTACGCACAGAAGTTCCAGGG

[0879]

		CCGCGTACTATCACCGCCGATGAATCGACCAATACCGCCTACATGGAGGTG TCCTCCCTGCGGTTCGGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCGCGAGGGGCCAT ACTACTACCAAAGCTACATGGACGTCTGGGGACAGGGAACCATGGTGACCGT GTCATCCGCTCCGGTGGTGGAGGCTCCGGGGGGCGGCTTCAGGAGGCGGA GGAAGCGATATTGTGATGACCCAGACTCCGCTTAGCCTGCCCGTGACTCCTG GAGAACCAGCCTCCATTTCCGCGGTCCCTCGCAATCACTCCTGCATTCCAA CGGTTACAACCTACCTGAATTGGTACCTCCAGAAGCCTGGCCAGTCGCCCCAG TTGCTGATCTATCTGGGCTCGAAGCGCGCCTCCGGGGTGCTGACCGGTTTA GCGGATCTGGGAGCGGCACGGACTTACTCTCCACATCACCCGCGTGGGAGC GGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGTATGCAGGGCTGCAGACTCCGTACACA TTCGGACAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCG CACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGA GGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTC GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTG TGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGGAAGAAGCTGCT GTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAG GACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTCGCAACTGC GCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAA CCAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG GACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGGAGCCGCGCAGAAAGA ATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGC CTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGAC GGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACTATGACGCTCTTC ACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
139101		
139101- aa ScFv 结构域	164	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWVSVIS GSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLDSSGY YYARGPRYWQGTTLVTVSSASGGGSGGRASGGGSDIQLTQSPSSLASVSG DRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYGASTLASGVPARFSGSGS GTHFTLTINSLQSEDSATYYCQQSYKRASFGQGTKEIK
139101- nt ScFv 结构域	165	CAAGTGCAACTTCAAGAATCAGGCGGAGGACTCGTGACCCCGGAGGATCAT TGCGGCTCTCGTGCGCCGCTCCGGGCTTACCTTCTCGAGCGACGATGAC CTGGGTCCGCCAGGCCCGGGGAGGGGCTGGAATGGTGTCTGTGATTTCC GGCTCCGGGGGAACACTACTACTACGCCGATTCGCGTAAAGTTCGCTTACTA TCTCCCGGGACAACAGCAAGAACACCCCTTTATCTGCAAAATGAATCCCTCCG CGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTGGACTCCTCGGGCTAC TACTATGCCCGGGTCCGAGATACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACCGTGT CCTCCGCGTCCGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGGCGGGCCTCCGGCGGCGGCGG TTCGGACATCCAGCTGACCCAGTCCCATCCTCACTGAGCGCAAGCGTGGGC GACAGAGTACCATTACATGCAGGGCGTCCCAGAGCATCAGCTCCTACCTGA ACTGGTACCAACAGAAGCCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGTTGATCTACGGGGC TTCGACCCTGGCATCCGGGGTGCCCGGAGGTTTAGCGGAAGCGGTAGCGGC ACTCACTTCACTCTGACCATTAACAGCCTCCAGTCCGAGGATTAGCCACTT ACTACTGTGAGCAGTCTACAAGCGGGCCAGCTTCGGACAGGGCACTAAGGT CGAGATCAAG
139101- aa VH	166	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWVSVIS GSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKLDSSGY YYARGPRYWQGTTLVTVSS
139101- aa VL	167	DIQLTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYGAS TLASGVPARFSGSGTHFTLTINSLQSEDSATYYCQQSYKRASFGQGTKEI K
139101- aa 全长 CAR	168	MALPVTALLLPLALLLHAARPOVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS DAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKLDSSGYYYARGPRYWQGTTLVTVSSASGGGSGGRAS GGGSDIQLTQSPSSLASVSGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLL IYGASTLASGVPARFSGSGTHFTLTINSLQSEDSATYYCQQSYKRASFGQ GTHFTLTITPAPRPTTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLIVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGC

[0880]

		SCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
139101- nt 全长 CAR	169	ATGGCCCTCCCTGTCCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGAACCTCAAGAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAGCC CGGAGGATCATTGCGGCTCTCGTGCGCCGCCCTCGGGCTTACCTTCTCGAGC GACGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCCCGGGGAAGGGCTGGAATGGGTGT CTGTGATTTCCGGCTCCGGGGGAACACTACGTACTACGCCGATTCCTGAAAGG TCGCTTCACTATCTCCCGGACAACAGCAAGAACCCTTTATCTGCAAATG AATTCCTCCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCTGGACT CCTCGGGTACTACTATGCCCCGGGTCCGAGATACTGGGGACAGGGAAACCT CGTGACCGTGTCTCCGCGTCCGGCGGAGGAGGTCCGGAGGGCGGGCCTCC GGCGGGCGGTTCCGACATCCAGCTGACCCAGTCCCATCCTCACTGAGCG CAAGCGTGGGCGACAGAGTACCATTACATGCAGGGCGTCCAGAGCATCAG CTCCTACCTGAACTGGTACCAACAGAAGCCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGTTG ATCTACGGGGCTTCGACCTGGCATCCGGGGTGCCCGGAGGTTTAGCGGAA GCGGTAGCGGCACTCACTTCACTCTGACCATTAACAGCCTCCAGTCCGAGGA TTCAGCCACTTACTACTGTCAGCAGTCTACAAGCGGGCCAGCTTCGGACAG GGCACTAAGGTCGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTA CAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCCTCGG
139102		
139102- aa ScFv 结构域	170	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWIS AYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPYYYY MDVWGKGTMTVTVSSASGGGSGGRASGGGSEIVMTQSPSLPVTPEPASIS SCRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGS TDFKLRISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSPYSGQGTGKVEIK
139102- nt ScFv 结构域	171	CAAGTCCAAGTGGTCCAGAGCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCG TGAAAGTGTCTGCAAGGCTTCCGGGTACACCTTCTCCAAGTACGGCATCAC TTGGGTGCGCCAGGCCCGGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGGTGGATTTCC GCGTACAACGGCAATACGAACTACGCTCAGAAGTCCAGGGTAGAGTGACCA TGACTAGGAACACCTCCATTTCCACCGCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCG GAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCCGGGACCATACTACTACTAC ATGGATGTCTGGGGGAAGGGACTATGGTCAACCGTGTCTCCGCTCGGGAG GCGGCGGATCAGGAGGACGCGCCTCTGGTGGTGGAGGATCGGAGATCGTGAT GACCCAGAGCCCTCTCTCCTTGCCCGTACTCCTGGGGAGCCCGCATCCATT TCATGCCGGAGCTCCAGTCACTTCTCTACTCCAACGGCTATAACTACGTGG ATTGGTACCTCCAAAAGCCGGCCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCTGGG CTCGAACAGGGCCAGCGGAGTGCCTGACCGGTCTCCGGGTCCGGGAAGCGGG ACCGACTTCAAGCTGCAAATCTCGAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGAATCT ACTACTGTATGCAGGGCCGCCAGTTTCCGTACTCGTTCGGACAGGGCACCAA AGTGGAAATCAAG
139102- aa VH	172	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWIS AYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPYYYY MDVWGKGTMTVTVSS
139102- aa VL	173	EIVMTQSPSLPVTPEPASISCRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVDPDRFSGSGSMTDFKLRISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSPY

[0881]

		QGTKVEIK
139102- aa 全长 CAR	174	MALPVTALLLPLALLLHAARPOVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSN YGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGPYYYMDVWGKTMVTVSSASGGGGSGGRASGGGGS EIVMTQSPSLPVTPEGPASISCRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFKQLQISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSFG QGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGKHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
139102- nt 全长 CAR	175	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTCCAACCTGGTCCAGAGCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCC CGGAGCGAGCGTGAAAGTGTCTTCAAGGCTTCCGGGTACACCTTCTCCAAC TACGGCATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGACAGGGCCTGGAATGGATGG GGTGGATTTCCGCGTACAACGGCAATACGAACCTACGCTCAGAAGTTCCAGGG TAGAGTGACCATGACTAGGAACACCTCCATTTCCACCGCTACATGGAACCTG TCCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCCGGGGACCAT ACTACTACTACATGGATGTCTGGGGGAAGGGGACTATGGTCACCGTGTTCATC CGCTCGGGAGGCGGGGATCAGGAGGACGCGCTTCTGGTGGTGGAGGATCG GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTCTCTCTTGGCCGTGACTCCTGGGGAGC CCGCATCCATTTTCATGCCGGAGCTCCAGTCACTTCTTACTCCAACGGCTA TAACTACGTGGATTGGTACCTCCAAAAGCCGGGCCAGAGCCCGCAGCTGCTG ATCTACCTGGGCTCGAACAGGGCCAGCGGAGTGCCTGACCGGTTCTCCGGGT CGGGAAGCGGGACCGACTTCAAGCTGCAAATCTCGAGAGTGGAGGCCGAGGA CGTGGGAATCTACTACTGTATGCAGGGCCGCCAGTTTCCGTACTCGTTCCGA CAGGGCACCAAAGTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCA CCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATG TAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGC GATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCAGGGTCTGCTGCTTT CACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCGTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGC TGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAATGCGCGTGA AATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCT CTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCC AAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAG CGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACCGACTG TACCAGGACTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCCAGATCG AGGCCCTGCCGCTCGG
139104		
139104- aa ScFv 结构域	176	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNLTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>SDV</sup> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSSASGGGGSGGRASGGGSEIVLTQSPATLSVSPGESATLSR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRASGIPDRFSGSGSGTDF <sup>FTL</sup> TI <sup>S</sup> SLQAEDVAVYYCQQYGS <sup>SLT</sup> FGGGTKVEIK
139104- nt ScFv 结构域	177	GAAGTGCAATTGCTCGAACTGGAGGAGTCTGGTGCAACCTGGAGGATCAC TTCGCCTGTCTGCGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCTGGAATGATC CTGGGTCCGCCGCGCCGGGAAGGGCCTCGAATGGGTGTCCGGCATCGG TACTCCGGCTCCACCTACTACGCCGCTCCGTGAAGGGCCGGTTACGATTT CACGGGACAACCTCGCGGAACACCTGTACCTCCAAATGAATTCCTTCGGCC GGAGGATACTGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGTGGCGAATCCGACGTC TGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCGCGTCCGGGGGAGGAGGAA GCGGGGGTAGAGCATCGGGTGGAGGCGGATCAGAGATCGTGCTGACCCAGTC CCCCGCCACCTTGAGCGTGTACCAGGAGAGTCCGCCACCTGTCTATGCCGC GCCAGCCAGTCCGTGTCTCCAACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGC AGGCCCTAGACTCCTGATCTATGGGGCGTCCAGCCGGCATCTGGAATTC CGATAGGTTTACGCGGATCGGGCTCGGGCACTGACTTCACTCTGACCATCTCC

[0882]

		TCGCTGCAAGCCGAGGACGTGGCTGTGTACTACTGTACGACGTACGGAAGCT CCCTGACTTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTCGAGATTAAG
139104- aa VH	178	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNLTLYLQMNLSLRPETAIIYYCSAHGGESDV WGQGTITVTVSS
139104- aa VL	179	EIVLTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYGSLLTFGGGTKVEI K
139104- aa 全长 CAR	180	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNLTLYLQMN SLRPETAIIYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIV LTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYGSLLTFGGGTKVEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMG GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQLPPR
139104- nt 全长 CAR	181	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGCTCGAAACTGGAGGAGGTCTGGTGCAACC TGGAGGATCACTTCGCCTGTCTGCGCCGTGTCGGGCTTTGCCCTGTCCAAC CATGGAATGAGCTGGGTCCGCCGCGCCGGGAAGGGCCTCGAATGGGTGT CCGGCATCGTCTACTCCGGCTCCACCTACTACGCCGCGTCCGTGAAGGGCCG GTTACAGATTTACGGGACAACCTCGCGGAACACCCTGTACCTCCAAATGAAT TCCCTTCGGCCGGAGGATACTGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGTGGCG AATCCGACGTCTGGGGCCAGGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCGCGTCCGG GGGAGGAGGAAGCGGGGGTAGAGCATCGGGTGGAGGCGGATCAGAGATCGTG CTGACCCAGTCCCCCGCCACCTTGAGCGTGTACCAGGAGAGTCCGCCACCC TGTCATGCCGCGCCAGCCAGTCCGTGTCTCCAACCTGGCTTGGTACCAGCA GAAGCCGGGGCAGGCCCTAGACTCCTGATCTATGGGGCGTCCAGCCGGGCA TCTGGAATTCGGATAGGTTTCCAGCGGATCGGGCTCGGGCACTGACTTCACTC TGACCATCTCCTCGCTGCAAGCCGAGGACGTGGCTGTGTACTACTGTACGAG GTACGGAAGCTCCCTGACTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTCGAGATTAAGACC ACTACCCAGCACCCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGC CTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCA TACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGCGGGTCTGTGCTTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGC GCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGT GCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAG GAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAG CCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGGAG AGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGC GGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAA AGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAG AAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
139106		
139106- aa ScFv 结构域	182	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNLTLYLQMNLSLRPETAIIYYCSAHGGESDV WGQGTITVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSKLAWYQQKPGQAPRLLMYGASIRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKEIK
139106- nt ScFv 结构域	183	GAAGTGCAATTGGTGGAAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCAT TGAGACTGAGCTGCGCAGTGTCCGGATTCCGCCCTGAGCAACCATGGAATGTC CTGGGTGAGAAGGGCCCTGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGTGAGGGATCGTG TACTCCGGTTCCTACTACTACGCCGCTCCGTGAAGGGGCGCTTCACTATCT CACGGGATAACTCCCGCAATACCCTGTACCTCCAAATGAACAGCCTGCGGCC GGAGGATACCGCCATCTACTACTGTTCCGCCACGGTGGAGAGTCTGACGTC

[0883]

		TGGGGCCAGGGAACCTACCGTGACCGTGTCTCCGCGTCCGGCGGTGGAGGGA GCGGCGGCCGCGCCAGCGGGCGGAGGCTCCGAGATCGTGATGACCCAGAG CCCCGCTACTCTGTCCGGTGTGCGCCGGAGAAAGGGCGACCCTGTCTGCCGG GCGTCGCAGTCCCGTGAGCAGCAAGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCC AGGCACCACGCCTGCTTATGTACGGTGCCATTCGGGCCACCGGAATCCC GGACCCGGTTCTCGGGTCCGGGTCCGGTACCGAGTTCACACTGACCATTTCC TCGCTCGAGCCCCGAGGACTTTGCCGTCTATTACTGCCAGCAGTACGGCTCCT CCTCATGGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAGGTCGAAATCAAG
139106- aa VH	184	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNRLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGTTVTVSS
139106- aa VL	185	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQQKPGQAPRLLMYGAS IRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKV EIK
139106- aa 全长 CAR	186	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSN HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNRLYLQMN SLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGSGGRASGGGGSEIV MTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQQKPGQAPRLLMYGASIRA TGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKVEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP GGKPRRNPKQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRKGKHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQLPPR
139106- nt 全长 CAR	187	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGGTGGAAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACC TGGAGGATCATTGAGACTGAGCTGCGCAGTGTCCGGATTCGCCCTGAGCAAC CATGGAATGTCTGGGTGAGAAGGGCCCTGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGT CAGGGATCGTGTACTCCGGTTCACCTTACTACGCCGCTCCGTGAAGGGGCG CTTCACTATCTCACGGGATAACTCCCGCAATACCCTGTACCTCCAAATGAAC AGCCTGCGGCCGAGGATACCGCCATCTACTACTGTCCGCCACCGGTGGAG AGTCTGACGTCTGGGGCCAGGAACTACCCTGACCGTGTCTCCGCGTCCGG CGGTGGAGGGAGCGGGCGCCGCGCAGCGGCGGAGGCTCCGAGATCGTG ATGACCCAGAGCCCCGCTACTCTGTCCGTGTCCGCCGGAGAAAGGGCGACC TGTCTGCGGGCGTCCGAGTCCGTGAGCAGCAAGCTGGCTTGGTACCAGCA GAAGCCGGGCCAGGCACCACGCTTATGTACCGTGCCTCCATTCCGGGCC ACCGGAATCCCGGACCGGTTCTCGGGGTCCGGGTACCGAGTTACAC TGACCATTTCTCGCTCGAGCCCGAGGACTTTGCCGTCTATTACTGCCAGCA GTACGGCTCCTCCTCATGGACGTTCCGCCAGGGGACCAAGGTCGAAATCAAG ACCACTACCCAGCACCAGGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTA AGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCCTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTATGCCGGTCCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCGAAGTCCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTC CAGCCTACAAGCAGGGGACAGCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACCGACTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCCG
139107		
139107- aa ScFv 结构域	188	EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRNRLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGTTVTVSSASGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK

[0884]

139107- nt ScFv 结构域	189	GAAGTGCAATTGGTGGAGACTGGAGGAGGAGTGGTGCACCTGGAGGAAGCC TGAGACTGTCATGCGCGGTGTCTGGGCTTCGCCCTCTCCAACCACGGAATGTC CTGGGTCCGCCGGGCCCTGGGAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCGTG TACTCGGGTCCACCTACTACGCGGCCTCAGTGAAGGGCCGGTTTACTATTA GCCGCGACAACCTCCAGAAACACACTGTACCTCCAAATGAACTCGCTGCGGCC GGAAGATAACCGCTATCTACTACTGCTCCGCCATGGGGGAGAGTCCGACGTC TGGGGACAGGGCACCCTGTCACTGTGTCCAGCGCTTCCGGCGGTGGTGGAA GCGGGGGACGGGCCCTCAGGAGGCGGTGGCAGCGAGATTGTGCTGACCCAGTC CCCCGGGACCCTGAGCCTGTCCCCGGGAGAAAGGGCCACCCTCTCCTGTCCGG GCATCCCAGTCCGTGGGGTCTACTAACCTTGCATGGTACCAGCAGAAGCCCCG GCCAGGCCCCCTCGCCTGCTGATCTACGACGCGTCCAATAGAGCCACCGGCAT CCCGGATCGCTTCAGCGGAGGCGGATCGGGCACCCTTCCACCTCACCATT TCAAGGCTGGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTATGGTT CGTCCCCACCCTGGACGTTTCGGCCAGGGGACTAAGGTCGAGATCAAG
139107- aa VH	190	EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNLSRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>SDV</sup> WGQGT <sup>TVTVSS</sup>
139107- aa VL	191	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY <sup>YCCQY</sup> YGS <sup>SP</sup> PWTFGQGT KVEIK
139107- aa 全长 CAR	192	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSN HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN SLRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>SDV</sup> WGQGT <sup>TVTVSS</sup> ASGGGSGGRASGGGGSEIV LTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY <sup>YCCQY</sup> YGS <sup>SP</sup> PWTFGQGT <sup>KVE</sup> IKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQLST ATKDTYDALHM <sup>QALPPR</sup>
139107- nt 全长 CAR	193	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGGTGGAGACTGGAGGAGGAGTGGTGCACCC TGGAGGAAGCCTGAGACTGTCATGCGCGGTGTCTGGGCTTCGCCCTCTCCAAC CACGGAATGTCTGGGTCCGCCGGGCCCTGGGAAAGGACTTGAATGGGTGT CCGGCATCGTGTACTCGGGTTCACCTACTACGCGGCCTCAGTGAAGGGCCG GTTTACTATTAGCCGCGACAACCTCCAGAAACACACTGTACCTCCAAATGAAC TCGCTGCGGCCGGAAGATAACCGCTATCTACTACTGCTCCGCCCATGGGGGAG AGTCGGACGTCTGGGGACAGGGCACCCTGTCACTGTGTCCAGCGCTTCCGG CGGTGGTGAAGCGGGGACGGGCCCTCAGGAGGCGGTGGCAGCGAGATTGTG CTGACCCAGTCCCCGGGACCCTGAGCCTGTCCCCGGGAGAAAGGGCCACCC TCTCCTGTCTGGGCATCCCAGTCCGTGGGGTCTACTAACCTTGATGGTACCA GCAGAAGCCCCGGCCAGGCCCTCGCCTGCTGATCTACGACGCGTCCAATAGA GCCACCGGCATCCCGGATCGCTTACGCGGAGGCGGATCGGGCACCAGCTTCA CCCTCACCATTTCAAGGCTGGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGTATGGTTTCGTCCCCACCCTGGACGTTTCGGCCAGGGGACTAAGGTCGAG ATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGG GGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTACTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCC <sup>TT</sup> CAT GAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTT <sup>CAT</sup> GCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGA <sup>ACT</sup> GCGCGTGA <sup>AAT</sup> CAGCCGAGCGCAG ATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGA <sup>ACT</sup> CAATCT TGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG

[0885]

139108		
139108- aa ScFv 结构域	194	QVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLRLS <sup>CA</sup> ASGFTFS <sup>D</sup> YYMSWIRQAPGKGLEWVSYIS SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN <sup>SL</sup> RAEDTAVYYCARESGDGM DVWGQGT <sup>TV</sup> VSSASGGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD <sup>RV</sup> TIT CRASQSISSYL <sup>NW</sup> YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD <sup>FT</sup> LT ISSLQPEDFATYYCQQSYTLAFGQGT <sup>KV</sup> DIK
139108- nt ScFv 结构域	195	CAAGTGCAACTCGTGGAAATCTGGTGGAGGACTCGTGAAACCTGGAGGATCAT TGAGACTGTCATGCGCGGCCCTCGGGATTACAGTTCTCCGATTACTACATGAG CTGGATTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCTACATTTCC TCATCCGGCTCCACCATCTACTACGCGGACTCCGTGAAGGGGAGATTACACCA TTAGCCGCGATAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTTCAGATGAACTCCCTGCG GGCTGAAGATACTGCCGTCTACTACTGCGCAAGGGAGAGCGGAGATGGGATG GACGTCTGGGGACAGGGTACCCTGTGACCGTGTGTCGCGCCTCCGGCGGAG GGGGTTCGGGTGGAAGGGCCAGCGGCGGGGAGGCAGCGACATCCAGATGAC CCAGTCCCCCTCATCGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTCACCATCACA TGCCGGGCCTCACAGTCGATCTCCTCCTACCTCAATTGGTATCAGCAGAAGC CCGGAAGGCCCTAAGCTTCTGATCTACGCAGCGTCTCCTGCAATCCGCGG GGTCCCATCTCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGACTTCACTCTGACC ATCTCGAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCCACTTACTACTGTGAGCAAAGCT ACACCCTCGCGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGACATCAAG
139108- aa VH	196	QVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLRLS <sup>CA</sup> ASGFTFS <sup>D</sup> YYMSWIRQAPGKGLEWVSYIS SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN <sup>SL</sup> RAEDTAVYYCARESGDGM DVWGQGT <sup>TV</sup> VSS
139108- aa VL	197	DIQMTQSPSSLSASVGD <sup>RV</sup> TITCRASQSISSYL <sup>NW</sup> YQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD <sup>FT</sup> LT ISSLQPEDFATYYCQQSYTLAFGQGT <sup>KV</sup> DI K
139108- aa 全长 CAR	198	MALPVTALLLPLALLLHAARPVQVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLRLS <sup>CA</sup> ASGFTFS <sup>D</sup> YYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARESGDGM <sup>D</sup> VWGQGT <sup>TV</sup> VSSASGGGGSGGRASGGGSD IQMTQSPSSLSASVGD <sup>RV</sup> TITCRASQSISSYL <sup>NW</sup> YQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTD <sup>FT</sup> LT ISSLQPEDFATYYCQQSYTLAFGQGT <sup>KV</sup> DIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL <sup>YN</sup> ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK <sup>GH</sup> DGLYQGLSTAT KDTYDALHM <sup>Q</sup> ALPPR
139108- nt 全长 CAR	199	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAACTCGTGGAAATCTGGTGGAGGACTCGTGAAACC TGGAGGATCATTGAGACTGTCATGCGCGGCCCTCGGGATTACGTTCTCCGAT TACTACATGAGCTGGATTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGACTGGAATGGGTGT CCTACATTTCTCATCCGGCTCCACCATCTACTACGCGGACTCCGTGAAGGG GAGATTACCATTAGCCGCGATAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTCAGATG AACTCCCTGCGGGCTGAAGATACTGCCGTCTACTACTGCGCAAGGGGAGAGAG GAGATGGGATGGACGTCTGGGGACAGGGTACCCTGTGACCGTGTGTCGTCGCG CTCCGGCGGAGGGGGTTCGGGTGGAAGGGCCAGCGCGCGGAGGCAGCGAC ATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCATCGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCG TCACCATCACATGCCGGGCCCTCACAGTCGATCTCCTCCTACCTCAATTGGTA TCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTTCTGATCTACGCAGCGTCTCTCC CTGCAATCCGGGGTCCCATCTCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGACT TCACTCTGACCATCTCGAGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCCACTTACTACTG TCAGCAAAGCTACACCCTCGCGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGACATCAAG ACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCCTGATCACTCTTTACTGTGTA AGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTC

[0886]

		CAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
139109		
139109- aa ScFv 结构域	200	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGT <sup>T</sup> TVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGD <sup>RVT</sup> TITCR ASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSR <sup>F</sup> SGSGSGTD <sup>F</sup> TLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
139109- nt ScFv 结构域	201	GAAGTGCAATTGGTGGAAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGATCGC TGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCACGGGATGTC CTGGGTCCGCCGCGCGCCTGGAAAGGGCCTCGAATGGGTGTCCGGTATTGTG TACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAGGGGAGATTACCATCA GCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCTCAAATGAATTCGCTGAGGCC AGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGCATGGCGGAGAGTCCGACGTC TGGGGACAGGGGACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCGTCCGGCGGAGGCGGCA GCGGGGGTCCGGCATCAGGGGGCGGCGGATCGGACATCCAGCTCACCCAGTC CCCGAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTCACCATCACGTGCCGC GCCAGCCAGTCGATTTCTCTACCTGAACCTGGTACCAACAGAAGCCCGGAA AAGCCCCGAAGCTTCTCATCTACGCCGCTCGAGCCTGCAGTCAGGAGTGCC CTCACGGTTCTCCGGCTCCGGTTCGGTACTGATTTACCCCTGACCATTTCC TCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTA <sup>CT</sup> CCA CCCCCTACACTTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG
139109- aa VH	202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS
139109- aa VL	203	DIQLTQSPSSLSASVGD <sup>RVT</sup> TITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAAS SLQSGVPSR <sup>F</sup> SGSGSGTD <sup>F</sup> TLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIK
139109- aa 全长 CAR	204	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSN HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN SLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT <sup>T</sup> TVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQ LTQSPSSLSASVGD <sup>RVT</sup> TITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQ SGVPSR <sup>F</sup> SGSGSGTD <sup>F</sup> TLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR
139109- nt 全长 CAR	205	ATGGCCCTCCCTGTACC <sup>CG</sup> CCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGGTGGAAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCC TGGAGGATCGCTGAGACTGTCATGTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAAC CACGGGATGTCCTGGGTCCGCCGCGCCCTGGAAAGGGCCTCGAATGGGTGT CGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAGGGGAG ATTACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCTCAAATGAAT TCGCTGAGGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGCATGGCGGAG AGTCCGACGTCTGGGGACAGGGGACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCGTCCGG CGGAGGCGGCAGCGGGGTCCGGCATCAGGGGGCGGCGGATCGGACATCCAG CTCACCCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTACCA TCAGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTTCTCTACCTGAACTGGTACCAACA GAAGCCCGGAAAAGCCCCGAAGCTTCTCATCTACGCCGCTCGAGCCTGCAG TCAGGAGTGCCCTCAGGTTCTCCGGCTCCGGTTCGGTACTGATTTACACC TGACCATTTCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCA GTCGTA <sup>CT</sup> CCACCCCTACACTTTCGGACAAGGCACCAAGGTCGAAATCAAG ACC <sup>ACT</sup> ACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCCTCCC

[0887]

		AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTTTACTGTA AGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTAAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTC CAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCCCTCGG
139110		
139110- aa ScFv 结构域	206	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYIS SSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARSTMVRE DYWGQGTTLVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIVLVTQSPSLPVTLGQPASIS CKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPQSPRRLIYEVSNRDSGVPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPGTFGQGTKLEIK
139110- nt ScFv 结构域	207	CAAGTGCAACTGGTGCAAAGCGGAGGAGGATTGGTCAAACCCGGAGGAAGCC TGAGACTGTCATGCGCGGCCTCTGGATTACCTTCTCCGATTACTACATGTC ATGGATCAGACAGGCCCGGGGAAGGGCCTCGAATGGGTGTCTACATCTCG TCCTCCGGGAACACCATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTTACCA TTTCCCGCGACAACGCAAAGAAGCTCGCTGTACCTCAGATGAATTCCTGCG GGCTGAAGATAACCGCGGTGTACTATTGCGCCCGGTCCACTATGGTCCGGGAG GACTACTGGGGACAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCAGCGCGAGCGGGGGTG GAGGCAGCGGTGGACGCGCCTCCGGCGGCGGGCGGTTCAGACATCGTGCTGAC TCAGTCGCCCCGTGTCGCTGCCGGTCAACCTGGGCCAACCGGCCTCAATTAGC TGCAAGTCCTCGGAGAGCCTGGTGCACAACCTCAGGAAAGACTTACCTGAAC GGTTCATCAGCGGCCTGGACAGTCCCCACGGAGGCTCATCTATGAAGTGTG CAACAGGGATTCCGGGGGTGCCCGACCCTTCACTGGCTCCGGGTCCGGCACC GACTTACCTTAAAATCTCCAGAGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACT ACTGTATGCAGGGTACCCACTGGCCTGGAACCTTTGGACAAGGAACTAAGCT CGAGATTAAG
139110- aa VH	208	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYIS SSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARSTMVRE DYWGQGTTLVTVSS
139110- aa VL	209	DIVLVTQSPSLPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPQSPRRL IYEVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPGTFG QGTKLEIK
139110- aa 全长 CAR	210	MALPVTALLLPLALLLHAARPVQVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARSTMVREYWGQGTTLVTVSSASGGGGSGGRASGGGSD IVLVTQSPSLPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPQSPRRLI YEVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPGTFGQ GTKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR
139110- nt 全长 CAR	211	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAACTGGTGCAAAGCGGAGGAGGATTGGTCAAACC CGGAGGAAGCCTGAGACTGTCATGCGCGCCTCTGGATTACCTTCTCCGAT TACTACATGTCATGGATCAGACAGGCCCGGGGAAGGGCCTCGAATGGGTGT CCTACATCTCGTCTCCGGGAACACCATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGG CCGCTTTACCATTTCCCGCGACAACGCAAAGAAGCTCGCTGTACCTTCAGATG AATTCCTGCGGGCTGAAGATAACCGCGGTGTACTATTGCGCCCGGTCCACTA TGGTCCGGGAGGACTACTGGGGACAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCAGCGC GAGCGGGGGTGGAGGACGGGTGGACGCGCCTCCGGCGGCGGGTTCAGAC

[0888]

		ATCGTGCTGACTCAGTCGCCCTGTGCTGCCGGTACCCTGGGCCAACCGG CCTCAATTAGCTGCAAGTCCTCGGAGAGCCTGGTGCACTCAGGAAAGAC TTACCTGAACTGGTTCCATCAGCGGCCGGACAGTCCCACGGAGGCTCATC TATGAAGTGTCCAACAGGGATTTCGGGGGTGCCGACCGCTTCACTGGCTCCG GGTCCGGCACCAGCTTACCTTGAAAATCTCCAGAGTGGAAAGCCGAGGACGT GGGCGTGTACTACTGTATGCAGGGTACCCACTGGCCTGGAACCTTTGGACAA GGAATAAGCTCGAGATTAAGACCCTACCCAGCACCCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGAATTCGCCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGGTCTGTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTA CAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG
139112		
139112- aa ScFv 结构域	212	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS <sup>1</sup> NHGMSWVRRAPGKLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>2</sup> SRNTLYLQMN <sup>3</sup> SLRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>4</sup> SDV WGQGT <sup>5</sup> TVT <sup>6</sup> VSSASGGGGSGGRASGGGGSDIRL <sup>7</sup> TQSP <sup>8</sup> SPLSASVGD <sup>9</sup> RV <sup>10</sup> TITCQ ASEDINKFLN <sup>11</sup> WYHQ <sup>12</sup> TPGKAPKLLIYDAS <sup>13</sup> TLQ <sup>14</sup> TGVPSRFSGSG <sup>15</sup> SGTDF <sup>16</sup> TLTIN SLQPEDIGTY <sup>17</sup> CQQYESL <sup>18</sup> PLTFGGG <sup>19</sup> TKVEIK
139112- nt ScFv 结构域	213	CAAGT <sup>1</sup> GCAACTCGT <sup>2</sup> GGAATCTGGT <sup>3</sup> GGAGGACTCGT <sup>4</sup> GCAACCCGGT <sup>5</sup> GGAAGCC TTAGGCTGTCGT <sup>6</sup> GCGCCGT <sup>7</sup> CAGCGGGTTGCT <sup>8</sup> TGAGCAACCATGGAATGTC CTGGGTCCGCCGGGCACC <sup>9</sup> GGGAAAAGGGCTGGAATGGGTGTCCGGCATCGTG TACAGCGGGTCAACCTATTACGCCCGTCCGTGAAGGCAGATTCATATCT CAAGAGACAACAGCCGGAACACCCTGTACTT <sup>13</sup> GCAAATGAAT <sup>14</sup> CCCTGCGCCC CGAGGACACCGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGAGGAGAGTCCGGACGTG TGGGGCCAGGGAACGACTGTGACTGTGTCCAGCGCATCAGGAGGGGGTGGT CGGGCGCCGGGCTCGGGGGGAGGAGGTTCCGACATTCGGCTGACCCAGTC CCCGTCCCCACTGTCGGCCTCCGTCCGGCACC <sup>23</sup> CGTGACCATCACTTGT <sup>24</sup> CAG GCGTCCGAGGACATTAACAAGTTCCTGAACTGGTACCACCAGACCCCTGGAA AGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGATGCCTCGACCCTCAA <sup>31</sup> ACTGGAGTGCC TAGCCGGTTCTCCGGTCCGGCTCCGGCACTGATTTACTCTGACCATCAAC TCATTGACCCGGAAGATATCGGGACCTACTATTGCCAGCAGTACGAATCCC TCCCGCTCACATTCGGCGGGGAACCAAGGTCGAGATTAAG
139112- aa VH	214	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS <sup>1</sup> NHGMSWVRRAPGKLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>2</sup> SRNTLYLQMN <sup>3</sup> SLRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>4</sup> SDV WGQGT <sup>5</sup> TVT <sup>6</sup> VSS
139112- aa VL	215	DIRL <sup>1</sup> TQSP <sup>2</sup> SPLSASVGD <sup>3</sup> RV <sup>4</sup> TITCQASEDINKFLN <sup>5</sup> WYHQ <sup>6</sup> TPGKAPKLLIYDAS TLQ <sup>7</sup> TGVPSRFSGSG <sup>8</sup> SGTDF <sup>9</sup> TLTINSLQPEDIGTY <sup>10</sup> CQQYESL <sup>11</sup> PLTFGGG <sup>12</sup> TKV EIK
139112- aa 全长 CAR	216	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS <sup>1</sup> N HGMSWVRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN <sup>2</sup> SRNTLYLQMN <sup>3</sup> SLRPEDTAIYYCSAHGGE <sup>4</sup> SDVWGQGT <sup>5</sup> TVT <sup>6</sup> VSSASGGGGSGGRASGGGGSDIR LTQSP <sup>7</sup> SPLSASVGD <sup>8</sup> RV <sup>9</sup> TITCQASEDINKFLN <sup>10</sup> WYHQ <sup>11</sup> TPGKAPKLLIYDAS <sup>12</sup> LQ TGVPSRFSGSG <sup>13</sup> SGTDF <sup>14</sup> TLTINSLQPEDIGTY <sup>15</sup> CQQYESL <sup>16</sup> PLTFGGG <sup>17</sup> TKVEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSL <sup>23</sup> VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVK <sup>24</sup> FSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVL <sup>25</sup> DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGK <sup>26</sup> HDGLYQGLSTAT KDTYDALHM <sup>27</sup> QALPPR
139112- nt 全长 CAR	217	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGT <sup>1</sup> GCAACTCGT <sup>2</sup> GGAATCTGGT <sup>3</sup> GGAGGACTCGT <sup>4</sup> GCAACC

[0889]

		CGGTGGAAGCCTTAGGCTGTCTGCGCCGTCAGCGGGTTTGGCTCTGAGCAAC CATGGAATGTCTGGGTCCGCCGGGCACCGGAAAAGGGCTGGAATGGGTGT CCGGCATCGTGTACAGCGGGTCAACCTATTACGCCCGCTCCGTGAAGGGCAG ATTCATCTCTCAAGAGACAACAGCCGGAACACCTGTACTTGCAAATGAAT TCCCTGCGCCCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGAGGAG AGTCGGACGTGTGGGGCCAGGGAACGACTGTGACTGTGTCCAGCGCATCAGG AGGGGGTGGTTCGGGCGGCCGGGCTCGGGGGAGGAGGTTCCGACATTCCGG CTGACCCAGTCCCCGTCCCCACTGTGCGCCCTCCGTCCGGCAGCCGCTGACCA TCACTTGTGAGGCGTCCGAGGACATTAACAAGTTCCTGAACTGGTACCACCA GACCCCTGGAAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGATGCCTCGACCCCTCAA ACTGGAGTGCCTAGCCGGTTCCTCGGGTCCGGCTCCGGCACTGATTTCACTC TGACCATCAACTCATTGCAGCCGGAAGATATCGGGACCTACTATTGCCAGCA GTACGAATCCCTCCCGCTCACATTCGGCGGGGGAACCAAGGTCGAGATTAAG ACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTA AGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTC CAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTTCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGACTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCCG	
	139113		
	139113- aa ScFv 结构域	218	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN <sup>SLR</sup> PEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGT <sup>TVTVSS</sup>
	139113- nt ScFv 结构域	219	GAAGTGCAATTGGTGGAAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCAT TGCGGCTCTCATGCGCTGTCTCCGGCTTCGCCCTGTCAAATCACGGGATGTC GTGGGTGACACGGGCCCCGGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCGGGATTGTG TACAGCGGCTCCACCTACTACGCCGCTTCGGTCAAGGGCCGCTTCACTATTT CACGGGACAACAGCCGCAACACCCCTCTATCTGCAAATGAACTCTCTCCGCCC GGAGGATACCGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGCGGCAATCCGACGTCG TGGGACAGGGAACCACTGTACCCGTGTCGTCCGCATCCGGTGGCGGAGGAT CGGGTGGCCGGGCTCCGGGGGCGGGCAGCGAGACTACCCTGACCCAGTC CCCTGCCACTCTGTCCGTGAGCCCGGAGAGAGAGCCACCCCTAGCTGCCGG GCCAGCCAGAGCGTGGGCTCCAACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGAC AGGGTCCCAGGCTGCTGATCTACGGAGCCTCCACTCGCGCAGCCGGCATCCC CGCAGGTTCTCCGGTCCGGTTCGGGACCGAGTTCACCCGACCATCTCC TCCCTCCAACCGGAGGACTTCGCGGTGTACTACTGTGACGAGTACAACGATT GGCTGCCCGTGACATTTGGACAGGGGACGAAGGTGAAATCAA
	139113- aa VH	220	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN <sup>SLR</sup> PEDTAIYYCSAHGGESDV WGQGT <sup>TVTVSS</sup>
	139113- aa VL	221	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCQQYNDWLPVTFGQGTK VEIK
	139113- aa 全长 CAR	222	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS N <sup>HGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV</sup> YSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN <sup>SLR</sup> PEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT <sup>TVTVSS</sup> ASGGGSGGRASGGGGSETT LTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCQQYNDWLPVTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA

[0890]

		LAGTCGVL <del>LL</del> SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKD <del>TY</del> DALHM <del>Q</del> ALPPR
139113- nt 全长 CAR	223	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCCGAAGTGCAATTGGTGGAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACC TGGAGGATCATTGCGGCTCTCATGCGCTGTCTCCGGCTTCGCCCTGTCAAAT CACGGGATGTCGTGGGTGACACGGGCCCCGGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGT CGGGGATTGTGTACAGCGGCTCCACCTACTACGCCGCTTCGGTCAAGGGCCG CTTCACTATTTACGGGACAACAGCCGCAACACCTCTATCTGCAAATGAAC TCTCTCCGCCCCGAGGATAACCGCATCTACTACTGCTCCGCACACGGCGGGC AATCCGACGTGTGGGGACAGGGAACCACTGTACCGTGTCTCCGCATCCGG TGGCGGAGGATCGGGTGGCCGGGCTCCGGGGCGGGCGGAGAGACTACC CTGACCCAGTCCCCTGCCACTCTGTCCGTGAGCCCGGAGAGAGACCCACC TTAGCTGCCGGGCCAGCCAGAGCGTGGGCTCCAACCTGGCCTGGTACCAGCA GAAGCCAGGACAGGGTCCCAGGCTGCTGATCTACGGAGCCTCCACTCGCCG ACCGCATCCCCGCGAGGTTCTCCGGTTCGGGTTCCGGGACCGAGTTCACCC TGACCATCTCCTCCCTCCAACCGGAGGACTTCGCGGTGTACTACTGTACGCA GTACAACGATTGGCTGCCCGTGACATTTGGACAGGGGACGAAGGTGGAAATC AAAACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCT CCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAATGAGACCCGCGAGCTGGTGGGGC CGTGCATACCCGGGCTTGTACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCT CTGGCTGGTACTTGCGGGCTCCTGCTGCTTCACTCTGATCACTCTTTACT GTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAG GCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTCATGCCGGTTCACAGAG GAGGAGGAAGCGGGTGCGAAGTGCAGGAAATTCAGCCGCGAGCGCAGATG CTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGG TCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAA ATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGC TCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGA ACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCC ACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
139114		
139114- aa ScFv 结构域	224	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <del>SRNT</del> LYLQMN <del>SLR</del> PEDTAIYYCSAHGGE <del>SDV</del> WGQGT <del>TVTVSS</del> ASQSIGSSSLAWYQ <del>QKPGQ</del> APRLLMYGASSRASGIPDRFSGSGSGTDFTLT <del>I</del> SRLEPEDFAVYYCQ <del>QYAGS</del> PPFTFGQGT <del>KVEIK</del>
139114- nt ScFv 结构域	225	GAAGTGCAATTGGTGGAACTCGGTGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCAC TGAGACTGTGATGCGCGGTGTCCGGTTTTGCCCCGAGCAATCATGGGATGTC GTGGGTCCGGCGCGCCCCGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCGGTATCGTC TACTCCGGGAGCACTTACTACGCCGCGAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCATTT CCCGCGATAACTCCCGCAACACCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTCCGGCC TGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGAGGAGAATCCGACGTG TGGGGCCAGGGA <del>ACT</del> ACCGTGACCGTCAGCAGCGCCTCCGGCGGGGGGGCT CAGGCGGACGGGCTAGCGGCGGGTGGCTCCGAGATCGTGCTGACCCAGTC GCCTGGCACTCTCTCGCTGAGCCCCGGGAAAGGGCAACCTGTCTGTCTCGG GCCAGCCAGTCCATTGGATCATCTCCCTCGCCTGGTATCAGCAGAAACCGG GACAGGCTCCGCGGCTGCTTATGTATGGGGCCAGCTCAAGAGCCTCCGCAT TCCCAGCCGGTTCTCCGGTCCGGTCCGGCACCGATTTACCCCTGACTATC TCGAGGCTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGCGG GGTCCCCGCCGTTACGTTCCGACAGGGAACCAAGGTCGAGATCAAG
139114- aa VH	226	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIV YSGSTYYAASVKGRFTISRDN <del>SRNT</del> LYLQMN <del>SLR</del> PEDTAIYYCSAHGGE <del>SDV</del> WGQGT <del>TVTVSS</del>
139114- aa VL	227	EIVLTQSPGTL <del>SLSPGERATL</del> SCRASQSIGSSSLAWYQ <del>QKPGQ</del> APRLLMYGA SSRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ <del>QYAGS</del> PPFTFGQGT KVEIK

[0891]

139114-aa 全长 CAR	228	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFALSN HGMSWVRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMN SLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGGQTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIV LTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSR ASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYQCQQYAGSPFFTFGQGTKE IKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQLPPR
139114-nt 全长 CAR	229	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGC AATTGGTGGAATCTGGTGAGGACTTGTGCAACC TGGAGGATCACTGAGACTGT CATGCGCGGTGTCGGTTTTTGCCCTGAGCAAT CATGGGATGTCGTGGGTCCGGCGCGCCCCGGAAAGGTCTGGAATGGGTGT CGGGTATCGTCTACTCCGGGAGCACTTACTACGCCGCGAGCGTGAAGGGCCG CTTACCATTTCGGCGATAACTCCCGCAACACCCTGTACTGCAAATGAAC TCGCTCCGGCCTGAGGACACTGCCATCTACTACTGCCACACGGAGGAG AATCCGACGTGTGGGGCCAGGAACTACCGTGACCGTCAAGCAGCGCTCCGG CGGGGGGGCTCAGGGCGACGGGCTAGCGCGCGCGGTGGCTCCGAGATCGTG CTGACCCAGTCGCTGGCACTCTCTCGCTGAGCCCGGGGAAAGGGCAACCC TGTCTGTGCGGGCCAGCCAGTCCATTGGATCATCTCCCTCGCCTGGTATCA GCAGAAACCGGGACAGGCTCCGCGGCTGCTTATGTATGGGGCCAGCTCAAGA GCCTCCGGCATTCCCGACCGGTTCTCCGGGTCGGGCACCGATTTC CCCTGACTATCTCGAGGCTGGAGCCAGAGGACTTCGCGGTGTA TACTGCCA GCAGTACGCGGGTCCCGCGCTTACGTTCCGACAGGGAACCAAGGTGCGAG ATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGG GGCCGTGCATACCCGGGTTCTGACTTCGCTCGGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTCCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCAT GAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGGCGGTGAAATTCAGCCGACGCGCAG ATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCT TGGTTCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
149362		
149362-aa ScFv 结构域	230	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKLEWIGS IYYSGSAYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEW PDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSETLLTQSPAFMSATPGDKVI TSCKASQDIDDAMNWKQKPEAPLFIIQSATSPVPGIPPRFSGSGFGTDFS LTINNI ESEDAAYYFCLQHDNFPLTFGQGTKLEIK
149362-nt ScFv 结构域	231	CAAGTGCAGCTTCAGGAAAGCGGACCGGGCCTGGTCAAGCCATCCGAAACTC TCTCCCTGACTTGCCTGTGTCTGGCGGTTCCATCTCATCGTCTACTACTA CTGGGGCTGGATTAGGCAGCCGCCCGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGAAGC ATCTACTATTCCGGCTCGGCGTACTACAACCCTAGCCTCAAGTCGAGAGTGA CCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTTCCCTGCGCCTGAGCTCCGT GACCGCCGCTGACACCGCCGTGTA TACTGTGCTCGGCATTGGCAGGAATGG CCCGATGCCTTCGACATTTGGGGCCAGGGCACTATGGTCACTGTGTATCCG GGGGTGGAGGCAGCGGGGGAGGAGGTCCGGGGGGGAGGTTTCAGAGACAAC CTTGACCCAGTCACCCGATTCATGTCCGCCACTCCGGGAGACAAGGTCATC ATCTCGTGCAAAGCGTCCAGGATATCGACGATGCCATGAATGGTACCAGC AGAAGCCTGGCGAAGCGCCGCTGTTTATTATCCAATCCGCAACCTCGCCCGT GCCTGGAATCCCACCGGTTTACGCGGCAGCGGTTTCGGAACCGACTTTTCC CTGACCATTAACAACATTGAGTCCGAGGACGCCGCTACTACTTCTGCTGC AACACGACAACCTCCCTCTACGTTTCGGCCAGGGAACCAAGCTGGAAATCAA

		G
149362-aa VH	232	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKLEWIGS IYYSGSAYYNPSLRSRVTIISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEW PDAFDIWGQGMVTVSS
149362-aa VL	233	ETTLTQSPAFMSATPGDKVIISCKASQDIDDAMNWyQQKPEAPLFI IQSAT SPVPGIIPRFSGSGFGTDFSLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFPLTFGQGTKL EIK
149362-aa 全长 CAR	234	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISS SYWGWIRQPPGKLEWIGSIYYSGSAYYNPSLRSRVTIISVDTSKNQFSLR LSSVTAADTAVYYCARHWQEWDPDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SETTLTQSPAFMSATPGDKVIISCKASQDIDDAMNWyQQKPEAPLFI IQSA TSPVPGIIPRFSGSGFGTDFSLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFPLTFGQGTK LEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQLPPR
149362-nt 全长 CAR	235	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTTCAGGAAAGCGGACCGGGCCTGGTCAAGCC ATCCGAACTCTCTCCCTGACTTGCCTGTGTCTGGCGGTTCCATCTCATCG TCGTACTACTACTGGGGCTGGATTAGGCAGCCGCCGGAAAGGGACTGGAGT GGATCGGAAGCATCTACTATTCGGCTCGGCGTACTACAACCTAGCCTCAA GTCGAGAGTGACCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTCCTCCGCGC CTGAGCTCCGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTACTACTGTGCTCGGCATT GGCAGGAATGGCCCGATGCCTTCGACATTTGGGGCCAGGGCACTATGGTCAC TGTGTATCCGGGGGTGGAGGCAGCGGGGAGGAGGTCCGGGGGGGGAGGT TCAGAGACAACCTTGACCCAGTCACCCGCATTCATGTCCGCCACTCCGGGAG ACAAGGTCATCTCGTGCAAAGCGTCCAGGATATCGACGATGCCATGAA TTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCGAAGCGCCGCTGTTTATTATCCAATCCGCA ACCTCGCCCGTGCCTGGAATCCACCGCGGTTTCAGCGCAGCGGTTTCGGAA CCGACTTTTCCCTGACCATTAACAACATTGAGTCCGAGGACGCCGCTACTA CTTCTGCCTGCAACACGACAACCTCCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGAACCAAG CTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGC TGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATT TGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCA CTCTTTACTGTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACC CTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTATCGCCG TTCCAGAGGAGGAGGAAGCGCGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGCA GCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTCTACAACGAACT CAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGG GACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGT ACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTAT GAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTC AGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCG CTCGG
149363		
149363-aa ScFv 结构域	236	VNLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRTSGMCSWIRQPPGKALEWLARI DWDEDKFYSTSLKTRLTISKDTSNQQVLRMTNMDPADTATYYCARSGAGGT SATAFDIWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQDIYNNLAWFQLKPGSAPRSLMYAANKSQSGVPSRFSGSASGTF TLTISSLQPEDFATYYCQHYYRFPYSFGQGTKLEIK
149363-nt ScFv 结构域	237	CAAGTCAATCTGCGCGAATCCGGCCCCGCTTGGTCAAGCCTACCCAGACCC TCACTCTGACCTGTACTTTCTCCGGCTTCTCCCTGCGGACTTCCGGGATGTG CGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCGGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTCGCTCGC ATTGACTGGGATGAGGACAAGTTCTACTCCACCTCACTCAAGACCAGGCTGA CCATCAGCAAAGATACCTCTGACAACCAAGTGGTGCTCCGCATGACCAACAT GGACCCAGCCGACACTGCCACTTACTACTGCGCGAGGAGCGGAGCGGGCGGA

[0892]

[0893]

		ACCTCCGCCACCGCCTTCGATATTTGGGGCCCGGGTACCATGGTCACCGTGT CAAGCGGAGGAGGGGGTCCGGGGCGGCGGTCCGGGGGAGGCGGATCGGA CATTTCAGATGACTCAGTCACCATCGTCCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGA GTGACAATCACTTGCCGGGCATCCCAGGACATCTATAACAACCTTGCGTGGT TCCAGCTGAAGCCTGGTCCGCACCGCGGTCACTTATGTACGCCGCAACAA GAGCCAGTCGGGAGTCCCGTCCCGTTCGGTTCGGCTCGGCAACTGAC TTCACCCTGACGATCTCCAGCCTGCAACCCGAGGATTCGCCACCTACTACT GCCAGCACTACTACCGCTTCCCTACTCGTTCGGACAGGGAACCAAGCTGGA AATCAAG
149363-aa VH	238	QVNLRESGPALVKPTQTLTTLTCTFSGFSLRTSGMCSVSWIRQPPGKALEWLR IDWDEDKFYSTSLKTRLTISKDTSNQVVLRTMNDPADTATYYCARS <u>GAGG</u> TSATAFDIWGPGTMVTVSS
149363-aa VL	239	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIYNNLAWFQPKGSAPRSLMYAAN KSQSGVPSRFRSGSASGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYYRFPYSFGQGTKL EIK
149363-aa 全长 CAR	240	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVNLRESGPALVKPTQTLTTLTCTFSGFSLRT SGMCSVSWIRQPPGKALEWLRIDWDEDKFYSTSLKTRLTISKDTSNQVVLRT MTNMDPADTATYYCARSAGGTSATAFDIWGPGTMVTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIYNNLAWFQPKGSAPRSLMY AANKSQSGVPSRFRSGSASGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYYRFPYSFGQ TKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQLPPR
149363-nt 全长 CAR	241	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTCAATCTGCGCGAATCCGGCCCCGCTTGGTCAAGCC TACCAGACCCTCACTCTGACCTGTACTTTCTCCGGCTTCTCCCTGCGGACT TCCGGGATGTGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCGGGAAAGGCCCTGGAGT GGCTCGCTCGCATTGACTGGGATGAGGACAAGTTCTACTCCACCTCACTCAA GACCAGGCTGACCATCAGCAAAGATACCTCTGACAACCAAGTGGTGTCCGC ATGACCAACATGGACCCAGCCGACACTGCCACTTACTACTGCGCGAGGAGCG GAGCGGGCGGAACCTCCGCCACCGCCTTCGATATTTGGGGCCCGGGTACCAT GGTCACCGTGTCAAGCGGAGGAGGGGGTCCGGGGCGCGGTTCCGGGGGA GGCGGATCGGACATTCAGATGACTCAGTCACCATCGTCCCTGAGCGCTAGCG TGGGCGACAGAGTGACAATCACTTGCCGGGCATCCAGGACATCTATAACAA CCTTGCGTGGTTCAGCTGAAGCCTGGTTCGGCACCGCGGTCACTTATGTAC GCCGCCAACAAAGAGCCAGTCGGGAGTGCCGTCCCGTTTTCCGGTTCGGCCT CGGGAACCTGACTTCAACCTGACGATCTCCAGCCTGCAACCCGAGGATTTCCG CACCTACTACTGCCAGCACTACTACCGCTTCCCTACTCGTTCGGACAGGGA ACCAAGCTGGAAATCAAGACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGG CTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACC CGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATC TACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCG TGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAA GCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCA TGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGGAAATTC GCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAGAACCAGCTTACAA CGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGA GGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGG GCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGAT TGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAG GGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCC TGCCGCCTCGG
149364		
149364-aa ScFv 结构域	242	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTIAAVY AFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPSLPVTPEEPASIS

[0894]

		CRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK
149364-nt ScFv 结构域	243	GAAGTGCAGCTTGTCTGAATCCGGGGGGGGACTGGTCAAGCCGGGCGGATCAC TGAGACTGTCCTGCGCCGCGAGCGGCTTACGTTCTCCTCCTACTCCATGAA CTGGGTCCGCCAAGCCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCTCTATCTCC TCGTGTCGTCTACATCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGAAGATTACCA TTTCCCGCGACAACGCAAAGAACTCACTGTACTTGCAAATGAACTCACTCCG GGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAAGACTATTGCCCGCTCTAC GCTTTTCGACATCTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACTGTGTGCTCCGGTGGTG GTGGCTCGGGCGGAGGAGGAAGCGGCGGGGGGGTCCGAGATTGTGCTGAC CCAGTCGCCACTGAGCCTCCCTGTGACCCCCGAGGAACCCGCCAGCATCAGC TGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGCTCCACTCCAACGGATACAATTACCTCGATT GGTACCTTCAGAAGCCTGGACAAAGCCCCGAGCTGCTCATCTACTTGGGATC AAACCGCGCTCAGGAGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACC GATTTACCCTGAAAATCTCCAGGGTGGAGGCAGAGGACGTGGGAGTGTATT ACTGTATGCAGGCGCTGCAGACTCCGTACACATTTGGGCAGGGCACCAAGCT GGAGATCAAG
149364-aa VH	244	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKTIAAVY AFDIWGQGTITVTVSS
149364-aa VL	245	EIVLTQSPSLPVTPEEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPYTFG QGTKLEIK
149364-aa 全长 CAR	246	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSS YSMNWRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKTIAAVYAFDIWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPSLPVTPEEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQALQTPYTFGQ GTKLEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDR RGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR
149364-nt 全长 CAR	247	ATGGCCCTCCCTGTCACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTTGTCTGAATCCGGGGGGGGACTGGTCAAGCC GGGCGGATCACTGAGACTGTCTGCGCCGCGAGCGGCTTACGTTCTCCTCC TACTCCATGAACTGGGTCCGCCAAGCCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGT CCTCTATCTCCTCGTGTCTCTACATCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGG AAGATTACCATTTCCCGCGACAACGCAAAGAACTCACTGTACTTGCAAATG AACTCACTCCGGGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAAGACTATTG CCGCCGTCTACGCTTTCGACATCTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACTGTGTC GTCCGGTGGTGGTGGCTCGGGCGGAGGAGGAAGCGGCGGGGGGGTCCGAG ATTGTGCTGACCCAGTCGCCACTGAGCCTCCCTGTGACCCCCGAGGAACCCG CCAGCATCAGCTGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGCTCCACTCCAACGGATACAA TTACCTCGATTGGTACCTTCAGAAGCCTGGACAAAGCCCCGAGCTGCTCATC TACTTGGGATCAAACCGCGCGTCAGGAGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCGG GCAGCGGTACCGATTTACCCTGAAAATCTCCAGGGTGGAGGCAGAGGACGT GGGAGTGTATTACTGTATGCAGGCGCTGCAGACTCCGTACACATTTGGGCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCCAACTGCGCGTGAAT TCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTA CAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCCAGAAAGAATCCCCAAG

[0895]

		AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG
149365		
149365-aa ScFv 结构域	248	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> LSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKLEWVSYIS SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARDLRGAF DIWQGTMTVTVSSGGGGSGGGSSSYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGG NNIGTKSVHWYQQKPGQAPLLVIRDDSVRPSKIPGRFSGSNSGNMATLTISG VQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGTKLTVL
149365-nt ScFv 结构域	249	GAAGTCCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGAGGCCTTGTGAAGCCTGGAGGTTCGC TGAGACTGTCCTGCGCCGCTCCGGCTCACCTTCTCCGACTACTACATGTC CTGGATCAGACAGGCCCGGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCG TCATCGGGCAGCACTATCTACTACGCGGACTCAGTGAAGGGCGGTTACCA TTTCCCGGGATAACGCGAAGA <sup>A</sup> ACTCGCTGTATCTGCAAATGAACTCACTGAG GGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGATCTCCGCGGGGCATTT GACATCTGGGGACAGGGAACCATGGTCACAGTGTCCAGCGGAGGGGGAGGAT CGGGTGGCGGAGGTTCCGGGGGTGGAGGCTCCTCTACGTGCTGACTCAGAG CCCAAGCGTCAGCGCTGCGCCCGGTTACACGGCAACCATCTCTGTGGCGGA AACAACATTGGGACCAAGTCTGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCGGGCCAAG CTCCCCTGTTGGTGATCCGCGATGACTCCGTGCGGCCTAGCAAAATTCGGGG ACGGTTCTCCGGCTCCAACAGCGGCAATATGGCCACTCTCACCATCTCGGGA GTGCAGGCCGGAGATGAAGCCGACTTCTACTGCCAAGCTGGGACTCAGACT CCGAGCATGTGGTGTTCGGGGGCGGAACCAAGCTGACTGTGCTC
149365-aa VH	250	EVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> LSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKLEWVSYIS SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN <sup>S</sup> LR <sup>A</sup> EDTAVYYCARDLRGAF DIWQGTMTVTVSS
149365-aa VL	251	SYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPLLVIRDDSV RPSKIPGRFSGSNSGNMATLTISGVQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGTK LTVL
149365-aa 全长 CAR	252	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLV <sup>K</sup> PGGSLR <sup>L</sup> LSCAASGFTFSD YYMSWIRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN NSLR <sup>A</sup> EDTAVYYCARDLRGAFDIWQGTMTVTVSSGGGGSGGGSSSYV LTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQQKPGQAPLLVIRDDSVRPS KIPGRFSGSNSGNMATLTISGVQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGTKLTV LTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRVQTTQEEDGCSRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL <sup>Y</sup> NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTA TKD <sup>T</sup> YDALHM <sup>Q</sup> ALPPR
149365-nt 全长 CAR	253	ATGGCCCTCCCTGTCCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTCCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGAGGCCTTGTGAAGCC TGGAGGTTGCTGAGACTGTCTGCGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCGAC TACTACATGTCTGGATCAGACAGGCCCGGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGT CCTACATCTCGTCATCGGGCAGCACTATCTACTACGCGGACTCAGTGAAGGG GCGGTTACCATTTCCCGGGATAACGCGAAGA <sup>A</sup> ACTCGCTGTATCTGCAAATG AACTCACTGAGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGATCTCC GCGGGGCATTTGACATCTGGGGACAGGGAACCATGGTCAAGTGTCCAGCGG AGGGGGAGGATCGGGTGGCGGAGGTTCCGGGGGTGGAGGCTCCTCCTACGTG CTGACTCAGAGCCCAAGCGTCAGCGCTGCGCCCGTTACACGGCAACCATCT CCTGTGGCGGAAACAACATTTGGGACCAAGTCTGTGCACTGGTATCAGCAGAA GCCGGGCCAAGCTCCCCTGTTGGTGATCCGCGATGACTCCGTGCGGCCTAGC AAAATTCGGGACGGTTCTCCGGCTCCAACAGCGGCAATATGGCCACTCTCA CCATCTCGGGAGTGCAGGCCGGAGATGAAGCCGACTTCTACTGCCAAGTCTG GGACTCAGACTCCGAGCATGTGGTGTTCGGGGGCGGAACCAAGCTGACTGTG CTCACCCTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCCT CCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGC CGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCT

[0896]

		CTGGCTGGTACTTGCAGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACT GTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAG GCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATG CTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGG TCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAA ATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGC TCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGA ACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCC ACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
149366		
149366-aa ScFv 结构域	254	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKPSGYTVTSHYIHWVRRAPQGQLEWMGMIN PSGGVTAYSQTLQGRVTMTSDTSSSTVYME <sup>1</sup> LSSLRSED <sup>2</sup> TAMYYCAREGSGSG WYFD <sup>3</sup> FWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVSPGQTASIT CSGDGLS <sup>4</sup> SKKYVSWYQQKAGQSPVVLISRDKERPSGIPDRFSGSNSADTATLT ISGTQAMDEADY <sup>5</sup> YCQAWDDTTVVF <sup>6</sup> GGGTKLTVL
149366-nt ScFv 结构域	255	CAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCTCCG TGAAAGTGTCTGTCAAGCCTTCGGGATACACCGTGACCTCCCCTACATTCA TTGGGTCCGCCGCGCCCCGGCCAAGGACTCGAGTGGATGGGCATGATCAAC CCTAGCGGCGGAGTGACCGCGTACAGCCAGACGCTGCAGGGACCGGTGACTA TGACCTCGGATACCTCCTCCTCCACCGTCTATATGGAAGTGTCCAGCCTGCG GTCCGAGGATACCGCCATGTACTACTGCGCCCGGAAGGATCAGGCTCCGGG TGGTATTTGACTTCTGGGGAAGAGGCACCTCGTGACTGTGTCACTGCGGG GAGGGGGTTCGGTGGTGGCGGATCGGGAGGAGCGGTTCACTACGTGCT GACCCAGCCACCTCCGTGTCCGTGAGCCCCGCCAGACTGCATCGATTACA TGTAGCGGCGACGGCCTCTCCAAGAAATACGTGTCGTGGTACCAGCAGAAGG CCGGACAGAGCCCGTGGTGTGATCTCAAGAGATAAGGAGCGGCCTAGCGG AATCCCGACAGGTTCTCGGGTCCAACTCCGCGGACACTGCTACTCTGACC ATCTCGGGACCCAGGCTATGGACGAAGCCGATTACTACTGCCAAGCCTGGG ACGACACTACTGTCTGTTTGGAGGGGGCACCAAGTTGACCGTCTCT
149366-aa VH	256	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKPSGYTVTSHYIHWVRRAPQGQLEWMGMIN PSGGVTAYSQTLQGRVTMTSDTSSSTVYME <sup>1</sup> LSSLRSED <sup>2</sup> TAMYYCAREGSGSG WYFD <sup>3</sup> FWGRGTLVTVSS
149366-aa VL	257	SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLS <sup>4</sup> SKKYVSWYQQKAGQSPVVLISRDKE RPSGIPDRFSGSNSADTATLTISGTQAMDEADY <sup>5</sup> YCQAWDDTTVVF <sup>6</sup> GGGTKLTVL
149366-aa 全长 CAR	258	MALPVTALLLPLALLLHAARPVQQLVQSGAEVKKPGASVKVSKPSGYTVTS HYIHWVRRAPQGQLEWMGMINPSGGVTAYSQTLQGRVTMTSDTSSSTVYME <sup>1</sup> L SSLRSED <sup>2</sup> TAMYYCAREGSGWYFD <sup>3</sup> FWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLS <sup>4</sup> SKKYVSWYQQKAGQSPVVLISRDKE RPSGIPDRFSGSNSADTATLTISGTQAMDEADY <sup>5</sup> YCQAWDDTTVVF <sup>6</sup> GGGTKLTVL VLTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKF <sup>7</sup> SRADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVL <sup>8</sup> DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
149366-nt 全长 CAR	259	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCC GGGAGCCTCCGTGAAAGTGTCTTCAAGCCTTCGGGATACACCGTGACCTCC CACTACATTCAATGGGTCCGCCGCGCCCCGGCCAAGGACTCGAGTGGATGG GCATGATCAACCCTAGCGGCGGAGTGACCGCGTACAGCCAGACGCTGCAGGG ACGCGTGACTATGACCTCGGATACCTCCTCCTCCACCGTCTATATGGAAGT TCCAGCCTGCGGTCCGAGGATACCGCCATGTACTACTGCGCCCGGGAAGGAT CAGGCTCCGGGTGGTATTTGACTTCTGGGGAAGAGGCACCTCGTGACTGT GTCATCTGGGGAGGGGTTCCGGTGGTGGCGGATCGGGAGGAGGCGGTTCA TCCTACGTGCTGACCCAGCCACCTCCGTGTCCGTGAGCCCCGGCCAGACTG CATCGATTACATGTAGCGGCGACGGCCTCTCCAAGAAATACGTGTCTGGTA CCAGCAGAAGGCCGACAGAGCCCGTGGTGTGATCTCAAGAGATAAGGAG

[0897]

		CGGCCTAGCGGAATCCCGGACAGGTTCTCGGGTTCCTCAACTCCGCGGACACTGCTACTCTGACCATCTCGGGGACCCAGGCTATGGACGAAGCCGATTACTACTGCCAAGCCTGGGACGACACTACTGTCTGTTTGGAGGGGGACCAAGTTGACC GTCCTTACCCTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCAGGGTCTGCTGCTTCTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGAAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
149367		
149367-aa ScFv 结构域	260	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRIITCRASQGI RNWLAWYQQKPKAPNLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYN SAPFTFGPGTKVDIK
149367-nt ScFv 结构域	261	CAAGTGCAGCTTCAGGAGAGCGGCCCGGACTCGTGAAGCCGTCACAGACCTGTCCTGACTTGCACCGTGTCTGGGAGGAAGCATCTCGAGCGGAGGCTACTATTGGTCGTGGATTCCGGCAGCACCCTGGAAAGGGCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCGACCTACTACAACCCATCGCTGAAGTCCAGAGTGA CAATCTCAGTGGACACGTCCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTCTCTCCGTGACTGCGGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCAGCGCTGGAATTGCCGCCCGGCTGAGGGGTGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACCATGGTCACCGTGT CCTCCGGCGGGGAGGTTCCGGGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGGGGTCCGACATCGTCATGACTCAGTCGCCCTCAAGCGTCAGCGCTCCGTCGGGGACAGAGTGATCATCACCTGTCTGGGCGTCCCAGGGAATTCGCAACTGGCTGGCCTGGT ATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCCCAACCTGTTGATCTACGCCGCTCAAACTCCAATCCGGGTGCCGAGCCGCTTCAGCGGCTCCGTTCCGGTTCGGGTGCCGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAACCTGAAGATGTGGCTACCTACTACT GCCAAAAGTACAACCTCCGCACCTTTTACTTTTCGACCGGGGACCAAGTGGACATTAAG
149367-aa VH	262	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGQGMVTVSS
149367-aa VL	263	DIVMTQSPSSVSASVGDRIITCRASQGI RNWLAWYQQKPKAPNLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYN SAPFTFGPGTKVDIK
149367-aa 全长 CAR	264	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRIITCRASQGI RNWLAWYQQKPKAPNLLIYAASNLSQGVPSRFSGSGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYN SAPFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
149367-nt 全长 CAR	265	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTTCAGGAGAGCGGCCCGGACTCGTGAAGCGTCCCAGACCCTGTCCCTGACTTGCACCGTGTCTGGGAGGAAGCATCTCGAGCGGAGGCTACTATTGGTCGTGGATTCCGGCAGCACCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCGACCTACTACAACCCATCGCTGAA

[0898]

		GTCCAGAGTGACAATCTCAGTGGACACGTCCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAG CTCTCTTCCGTGACTGCGGCCGACACCGCCGTGACTACTGCGCACGCGCTG GAATTGCCGCCCGGCTGAGGGGTGCCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACCAT GGTCACCGTGTCTCCGGCGGGGAGGTTCCGGGGGTGGAGGCTCAGGAGGA GGGGGTCCGACATCGTCATGACTCAGTCGCCCTCAAGCGTCAGCGCGTCCG TCGGGGACAGAGTGATCATCACCTGTGCGGCGTCCCAGGGAATTCGCAACTG GCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCAACCTGTTGATCTAC GCCGCTCAAACCTCCAATCCGGGGTCCGAGCCGCTTCAGCGCTCCGGTT CGGGTGCCGATTTCACTCTGACCATCTCCTCCCTGCAACCTGAAGATGTGGC TACCTACTACTGCCAAAAGTACAACCTCCGCACCTTTTACTTTTCGGACCGGG ACCAAAGTGGACATTAAGACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGG CTCCTACCATCGCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCGGAGGCATGTAGACC CGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATC TACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCG TGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAA GCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCA TGCCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCTGAAATTCA GCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAA CGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGA GGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGG GCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGAT TGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAG GGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGACGCCC TGCCGCTCGG
149368		
149368-aa ScFv 结构域	266	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI I PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGYQL LRWDVGLLRSAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYVLTQPPSVSV APGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVFLVLYGKNNRPSGVPDRFSGS RSGTTASLTITGAQAEDEADYCYSSRDSSGDHLRVFGTGTKVTVL
149368-nt ScFv 结构域	267	CAAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGGAGCTCTG TGAAAGTGTCTGCAAGGCCCTCCGGGGGCACCTTTAGCTCCTACGCCATCTC CTGGGTCCGCCAAGCACCAGGCTCAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGAATTATC CCTATCTTCGGCACTGCCAACTACGCCCAGAAGTTCAGGGACCGCTGACCA TTACCGCGGACGAATCCACCTCCACCGCTTATATGGAGCTGTCCAGCTTGCG CTCGGAAGATAACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAGGGGTGGATAACCAGCTG CTGAGATGGGACGTGGGCCTCCTGCGGTCCGGCTTCGACATCTGGGGCCAGG GCACTATGGTCACTGTGTCCAGCGGAGGAGCGGATCGGGAGGCGCGGATC AGGGGGAGGCGGTTCCAGCTACGTGCTTACTCAACCCCTTCGGTGTCCGTG GCCCCGGGACAGACCGCCAGAATCACTTCCGGAGGAAACAACATTGGGTCCA AGAGCGTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTGCTGGTGTCT CTACGGGAAGAACAATCGGCCAGCGGAGTGCCGGACAGGTTCTCGGGTTCA CGCTCCGGTACAACCGCTTCACTGACTATCACCGGGGCCAGGCAGAGGATG AAGCGGACTACTACTGTTCCCTCCCGGATTCATCCGGCGACCACCTCCGGGT GTTCCGAACCGGAACGAAGGTCACCGTGCTG
149368-aa VH	268	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI I PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGYQL LRWDVGLLRSAFDIWGQGMVTVSS
149368-aa VL	269	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVFLVLYGKNN RPSGVPDRFSGSRSGTTASLTITGAQAEDEADYCYSSRDSSGDHLRVFGTGT KVTVL
149368-aa 全长 CAR	270	MALPVTALLLPLALLLHAARPVQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSS YAI SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARRGGYQLLRWDVGLLRSAFDIWGQGMVTVSSGGGGSG GGSGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VFLVLYGKNNRPSGVPDRFSGSRSGTTASLTITGAQAEDEADYCYSSRDSSGD HLRVFGTGTKVTVLTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT

[0899]

		TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRVFSRSADAPAYKQGGQNLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
149368-nt 全长 CAR	271	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGCGCCGAGGTCAAGAAGCC CGGGAGCTCTGTGAAAGTGTCTTCAAGGCCCTCCGGGGGCACCTTTAGCTCC TACGCCATCTCCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCCTGGAGTGGATGG GGGAATTATCCCTATCTTCCGGCACTGCCAACTACGCCCAGAAGTTCAGGG ACGCGTGACCATTACCGCGGACGAATCCACCTCCACCGCTTATATGGAGCTG TCCAGCTTGCCTCGGAAGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAGGGGTG GATACCAGCTGCTGAGATGGGACGTGGGCCTCCTGCGGTTCGGCGTTTCGACAT CTGGGGCCAGGGCACTATGGTCACTGTGTCCAGCGGAGGAGGCGGATCGGGA GGCGGCGGATCAGGGGGAGGCGGTTCAGCTACGTGCTTACTCAACCCCTT CGGTGTCCGTGGCCCCGGGACAGACCGCCAGAATCACTTGGGAGGAAACAA CATTGGGTCCAAGAGCGTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCT GTGCTGGTGTCTACGGGAAGAACAATCGGCCAGCGGAGTCCCGGACAGGT TCTCGGGTTCACGCTCCGGTACAACCGCTTCACTGACTATCACCGGGGCCCA GGCAGAGGATGAAGCGGACTACTACTGTTCCCTCCCGGATTTCATCCGGCGAC CACCTCCGGGTGTTCCGAACCGGAACGAAGTCCACCGTGTGACTACTACCC CAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTG CCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGG GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTT GCGGGTCTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTG GAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCTGTGCAGACT ACTCAAGAGGAGGACCGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCG GCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAA GCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTGGAGAGAGGAG TACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGC CGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAA GATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGC AAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCT ATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
149369		
149369-aa ScFv 结构域	272	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR TYRYSKWSFYAISLKSRI I INPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSP EGLFLYWFDPWGQGLVTVSSGGDGSGGGSSGGSSSELTQDPAVSVALGQ TIRITCQGDSLGNYYATWYQQKPGQAPVLIYGTNNRPSGIPDRFSASSSGN TASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGHLLLFGTGKVTVL
149369-nt ScFv 结构域	273	GAAGTGCAGCTCCAACAGTCAGGACCGGGCTCGTGAAGCATCCAGACCC TGTCCTGACTTGTGCCATCTCGGGAGATAGCGTGTGCATCGAACTCCGCCGC CTGGAAGTGGATTCCGGCAGAGCCCGTCCCGCGGACTGGAGTGGCTTGAAGG ACCTACTACCGGTCCAAGTGGTACTCTTTCTACGGCATCTCGCTGAAGTCCC GCATTATCATTAAACCCTGATACCTCCAAGAATCAGTTCTCCCTCCAAGTAA ATCCGTACCCCCGAGGACACAGCAGTGTATTACTGCGCACGGAGCAGCCCC GAAGGACTGTTCCCTGTATTGGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGGACTCTTGTA CCGTGTGAGCGGCGGAGATGGGTCCGGTGGCGGTGGTTCGGGGGGCGGCGG ATCATCATCCGAAGTACCCAGGACCCGGCTGTGTCCGTGGCGCTGGGACAA ACCATCCGCATTACGTGCCAGGGAGACTCCCTGGGCAACTACTACGCCACTT GGTACCAGCAGAAGCCGGCCAAAGCCCTGTGTTGGTCACTACGGGACCAA CAACAGACCTTCCGGCATCCCCAGCGGTTACGCGCTTCGTCTCCGGCAAC ACTGCCAGCCTGACCATCACTGGAGCGCAGGCCGAAGATGAGGCCGACTACT ACTGCAACAGCAGAGACTCCTCGGGTCATCACCTCTTGTTCGGAAGTGAAC CAAGGTACCCGTGCTG
149369-aa VH	274	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR TYRYSKWSFYAISLKSRI I INPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSP EGLFLYWFDPWGQGLVTVSS
149369-aa VL	275	SSELTQDPAVSVALGQTIRITCQGDSLGNYYATWYQQKPGQAPVLIYGTNN RPSGIPDRFSASSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGHLLLFGTGK

[0900]

		VTVL
149369-aa 全长 CAR	276	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQOSGPGPLVKPSQTL <del>SLTCAISGDSVSS</del> NSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSFYAISLKSRIIINPDT <del>SKNQFS</del> LQLKSVTPEDTAVYYCARSSPEGLF <del>LYWFDPWGQTLVTVSSGGDGS</del> GGGGSSSELTQDPAVSVALGQ <del>TIRITCQGDSLGNYYATWYQQKPGQAPV</del> LVIYGTNNRPSGIPDRFSASSSGNTASLTITGAQAEDEADY <del>CNSRDS</del> SGHLLFGTGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPT <del>IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA</del> CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ <del>TTQEED</del> GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQ <del>LYNELNLGRREEYD</del> VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK <del>GHDG</del> LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
149369-nt 全长 CAR	277	ATGGCCCTCCCTGTACC <del>CGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG</del> CCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCCAACAGTCAGGACC <del>GGGCTCGTGAAGCC</del> ATCCCAGACCCTGTCCCTGACTTGTGCCATCTCGG <del>GAGATAGCGTGT</del> CATCGAACTCCGCCCTGGA <del>ACTGGATTCGGCAGAGCCCGTCCCGCGGACTGGAGT</del> GGCTTGAAGGACCTACTACCGGTCCAAGTGGTACTCT <del>TTTCTACGCGATCTC</del> GCTGAAGTCCCGATTATCATTAAACCCTGATACCTCA <del>AGAATCAGTTCTCC</del> CTCCA <del>ACTGAAATCCGTCACCCCGAGGACACAGCAGTGTATTACTGCGCAC</del> GGAGCAGCCCCGAAGGACTGTTCCCTGTATTGGTTT <del>GACCCCTGGGGCCAGGG</del> GACTCTTGTGACCGTGTGAGCGGGCGGAGATGGGTCC <del>GGTGGCGGTGGTTCCG</del> GGGGGCGGCGGATCATCATCCGA <del>ACTGACCCAGGACCCGGCTGTGTCCGTGG</del> CGCTGGGACAAACCATCCGCATTACGTGCCAGGGAG <del>ACTCCCTGGGCAACTA</del> CTACGCCACTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCCAAGCC <del>CGCTGTGTGGTCATC</del> TACGGGACCAACAACAGACCTTCCGGCATCCCCGAC <del>CGGTTACGCGCTTCGT</del> CCTCCGGCAACACTGCCAGCCTGACCATCACTGGAG <del>CGCAGGCCGAAGATGA</del> GGCCGACTACTACTGCAACAGCAGAGACTCCTCGG <del>GTGCATCACCTCTTGTTC</del> GGA <del>ACTGGAACCAAGGTCACCGTGTGACCACTACCCAGCACCAGGCCCAC</del> CCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGT <del>CCTGCGTCCGGAGGC</del> ATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCC <del>GGGTCTTGACTTCGCC</del> TGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTT <del>GCGGGGTCTGCTGC</del> TTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGT <del>CGGAAGAAGCTGCTGTA</del> CATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCGTGTCAGACT <del>ACTCAAGAGGAGGAC</del> GGCTGTTTCATGCCGGTTC <del>CCAGAGGAGGAGGAAGGCCGCTGCCAATGCGCG</del> TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACA <del>AGCAGGGGCAGAACCA</del> GCTCTACAACGA <del>ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC</del> AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAG <del>CCGCGCAGAAAGAATC</del> CCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATA <del>AGATGGCAGAAGCCTA</del> TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAG <del>GCAAAGGCCACGACGGA</del> CTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCT <del>TATGACGCTCTTACACA</del> TGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1978-A4		
BCMA EBB -C1978-A4 - aa ScFv 结构域	278	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <del>CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIS</del> GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN <del>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVEGSGS</del> LDYWGQGT <del>LVTVSSGGGSGGGGSGGGSEIVMTQSPGTLSPGERATLSC</del> RASQSVSSAYLAWYQQKPGQPPRL <del>LISGASTRATGIPDRF</del> GGSGSGTDFLTLISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGSS <del>LFTFGQTRLEIK</del>
BCMA EBB -C1978-A4 - nt ScFv 结构域	279	GAAGTGCAGCTCGTGGAGTCA <del>GAGAGCGGCCCTGGTCCAGCCGGGAGGGTCCC</del> TTAGACTGTATGCGCCGCAAGCGGATCACTTTCTC <del>CTCTATGCCATGAG</del> CTGGGTCCGCCAAGCCCCGGAAAGGGACTGGAAT <del>GGGTGTCCGCCATCTCG</del> GGGTCTGGAGGCTCAACTTACTACGCTGACTCCG <del>TGAAGGGACGGTTACCA</del> TTAGCCGCGACA <del>ACTCCAAGAACACCCTCTACCTCCAAATGAACTCCCTGCG</del> GGCCGAGGATACCGCGTCTACTACTGCGCCAAAG <del>TGGAAGGTTTACAGGATCG</del> CTGGACTACTGGGGACAGGGTACTCTCGTGACCG <del>TGTCATCGGGCGGAGGAG</del> GTTCCGGCGGTGGCGGCTCCGGCGGCGGAGGGT <del>CGGAGATCGTGATGACCCA</del> GAGCCCTGGTACTCTGAGCCTTTCGCGGGGAGAA <del>AGGGCCACCCGTCTCTGC</del> CGCGCTTCCCAATCCGTGTCTCCGCGTACTTGG <del>CGTGGTACCAGCAGAAGC</del> CGGGACAGCCCCCTCGGCTGCTGATCAGCGGGG <del>CCAGCACCCGGGCAACCGG</del> AATCCAGACAGATTCGGGGGTTCCGGCAGCGGC <del>CACAGATTTACCCCTGACT</del>

		ATTTTCGAGGTTGGAGCCCCGAGGACTTTGCGGTGTATTACTGTCCAGCACTACG GGTCGTCTTTAATGGCTCCAGCCTGTTACGTTCCGACAGGGGACCCCGCT GGAAATCAAG
BCMA_EBB -C1978-A4 - aa VH	280	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKVEGSGS LDYWGGQTLTVTVSS
BCMA_EBB -C1978-A4 - aa VL	281	EIVMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPPRLLISGA STRATGIPDRFGGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGLFTF GQGRLEIK
BCMA_EBB -C1978-A4 - aa 全长 CART	282	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKVEGSGSLDYWGQTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEI VMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPPRLLISGAST RATGIPDRFGGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGLFTF GQGRLEIKTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR
BCMA_EBB -C1978-A4 - nt 全长 CART	283	ATGGCCCTCCCTGTCCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGAGCGGCCCTGGTCCAGCC GGGAGGGTCCCTTAGACTGTCTGCGCCGCAAGCGGATTCACTTTCTCTCC TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCCCCGAAAAGGACTGGAATGGGTGT CCGCCATCTCGGGGTCTGGAGGCTCAACTTACTACGCTGACTCCGTGAAGGG ACGGTTCACCATTAGCCGCGACAACCTCCAAGAACACCCTTACCTCCAAATG AACTCCCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGCCAAAGTGGAA GTTTACAGGATCGCTGGACTACTGGGGACAGGGTACTCTCGTGACCGTGT CATC GGGCGGAGGAGGTTCCGGCGGTGGCGGCTCCGGCGCGGAGGGTCCGAGATC GTGATGACCCAGAGCCCTGGTACTCTGAGCCTTTCGCGGGGAGAAAGGGCCA CCCTGTCTGCGCGCTTCCCAATCCGTGTCTCCGCGTACTTGGCGTGGTA CCAGCAGAAGCCGGGACAGCCCCCTCGCTGCTGATCAGCGGGGCCAGCACC CGGGCAACCGGAATCCAGACAGATTCCGGGGGTCCGGCAGCGGCACAGATT TCACCCTGACTATTTTCGAGGTTGGAGCCCGAGGACTTTGCGGTGTATTACTG TCAGCACTACGGGTCTCCTTTAATGGCTCCAGCCTGTTACGTTCCGGACAG GGGACCCGCTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAGGCATGTAG ACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCTTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTA CAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCGCCTCGG
BCMA_EBB-C1978-G1		
BCMA_EBB -C1978-G1 - aa ScFv 结构域	284	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRYPMWVRQAPGKLEW VSGISDSGVSTYYADSAKGRFTISRDNKNTLFLQMSLRLRDEDTAVYYC VTRAGSEASDIWQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATL SLSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQQFGTSSGLTFGGGKLEIK
BCMA_EBB -C1978-G1 -	285	GAAGTGCAACTGGTGGAAACCGGTGGCGGCTGGTGCAGCCTGGAGGATCAT TGAGGCTGTCTGCGCGGCCAGCGGTATTACCTTCTCCCGGTACCCCATGTC

[0901]

[0902]

nt ScFv 结构域		CTGGGTGACACAGGCCCGGGGAAAGGGCTTGAATGGGTGTCCGGGATCTCG GACTCCGGTGTGACACTTACTACGCCGACTCCGCCAAGGGACGCTTCACCA TTTCCCGGGACAACCTCGAAGAACACCCCTGTTCTCCAAATGAGCTCCCTCCG GGACGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGTGACCCGCGCCGGGTCCGAGGCG TCTGACATTTGGGGACAGGGCACTATGGTCACCGTGTCTGTCGGCGGAGGGG GCTCGGGAGGCGGTGGCAGCGGAGGAGGAGGGTCCGAGATCGTGTGACCCA ATCCCCGGCCACCCTCTCGCTGAGCCCTGGAGAAAGGGCAACCTTGTCTGT CGCGGAGCCAGTCCGTGAGCAACTCCCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCG GACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGACGCTTCGAGCCGGGCCACTGGAAT CCCCACCCTTTTCGGGGTCCGGCTCAGGAACCGATTTACCCCTGACAATC TCACGGCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCATCTATTACTGCCAGCAGTTCGGTA CTTCTCCGGCCTGACTTTCGGAGGCGGCACGAAGCTCGAAATCAAG
BCMA_EBB -C1978-G1 - aa VH	286	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRYPMWVRQAPGKLEWVSGIS DSGVSTYYADSAKGRFTISRDNKNTLFLQMSLRDEDTAVYYCVTRAGSEA SDIWQGTMVTVSS
BCMA_EBB -C1978-G1 - aa VL	287	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS SRATGIPDRFSGSGSDTFTLTISRLEPEDFAIYYCQQFGTSSGLTFGGGTK LEIK
BCMA_EBB -C1978-G1 - aa 全长 CART	288	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGI TFSRYPMWVRQAPGKLEWVSGISDSGVSTYYADSAKGRFTISRDN KNTLFLQMSLRDEDTAVYYCVTRAGSEASDIWQGTMVTVSSGGGG SGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSDTFTLTISRLEPEDFAIYYCQ QFGTSSGLTFGGGTKLEIKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
BCMA_EBB -C1978-G1 - nt 全长 CART	289	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAACTGGTGAAACCGGTGGCGGCTGGTGCAGCC TGGAGGATCATTGAGGCTGTATGCGCGGCCAGCGGTATTACCTTCTCCCGG TACCCCATGTCTGGGTGACACAGGCCCGGGGAAAGGGCTTGAATGGGTGT CCGGGATCTCGACTCCGGTGTGACACTTACTACGCCGACTCCGCCAAGGG ACGCTTACCATTTCCCGGGACAACCTCGAAGAACACCCCTGTTCTCCAAATG AGCTCCCTCCGGGACGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGTGACCCGCGCGG GGTCCGAGGCGTGTGACATTTGGGGACAGGGCACTATGGTCAACCGTGTCTG CGCGGAGGGGGCTCGGGAGGCGGTGGCAGCGGAGGAGGGTCCGAGATC GTGCTGACCAATCCCGGCCACCCTCTGCTGAGCCCTGGAGAAAGGGCAA CCTTGTCTGTGCGCGGAGCCAGTCCGTGAGCAACTCCCTGGCCTGGTACCA GCAGAAGCCCGGACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGACGCTTCGAGCCGG GCCACTGGAATCCCCGACCCTTTTCGGGGTCCGGCTCAGGAACCGATTTC CCCTGACAATCTCACGGCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCATCTATTACTGCCA GCAGTTCGGTACTTCTCCGGCCTGACTTTCGGAGGCGGCACGAAGCTCGAA ATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGG GGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGGGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCAT GAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGGCGGTGAAATTCAGCCGAGCGCAG ATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTTACAACGAACCTCAATCT TGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC

[0903]

		GCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1979-C1		
BCMA EBB -C1979-C1 - aa ScFv 结构域	290	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAIYYCARATYKRE LRYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTVSLSPGE RATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFGQGTGLEIK
BCMA EBB -C1979-C1 - nt ScFv 结构域	291	CAAGTGCAGCTCGTGAATCGGGTGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGCTCAC TTAGACTGTCTCGCGCGCCAGCGGATCACTTTCTCCTCCTACGCCATGTC CTGGGTGAGACAGGCCCTGGAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCAATCAGC GGCAGCGGCGGCTCGACCTATTACGCGGATTCAGTGAAGGGCAGATTCACCA TTTCCCGGACAAACGCCAAGAACTCCTTGTACCTCAAATGAACTCCCTCG CGCGAAGATAACCGCAATCTACTACTGCGCTCGGGCCACTTACAAGAGGGAA CTGCGCTACTACTACGGGATGGACGTCTGGGGCCAGGGAACCATGGTCAACG TGTCCAGCGGAGGAGGAGGATCGGGAGGAGGCGGTAGCGGGGGTGGAGGGTC GGAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGGCACTGTGTGCTGTCCCCCGGCGAA CGGGCCACCCTGTGATGTCGGGCCAGCCAGTCAAGTGTGTCGTCGCTGCTCG CCTGGTACCAGCAGAAACCGGGACAAGCTCCCCGCTGCTGATCTACGGAGC CAGCAGCCGGGCCACCGGTATTCCTGACCGGTTCTCCGGTTCGGGGTCCGGG ACCGACTTTACTCTGACTATCTCTCGCCTCGAGCCAGAGGACTCCGCCGTGT ATTACTGCCAGCAGTACCCTCCTCCCCGTCTGGACGTTTCGGACAGGGCAC AAGGCTGGAGATTAAG
BCMA EBB -C1979-C1 - aa VH	292	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAIYYCARATYKRE LRYYYGMDVWGQGTMTVTVSS
BCMA EBB -C1979-C1 - aa VL	293	EIVMTQSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFGQGT RLEIK
BCMA EBB -C1979-C1 - aa 全长 CART	294	MALPVTALLLPLALLLHAARPOVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN NSLRAEDTAIYYCARATYKRELRYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVMTQSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTF GQGTGLEIKTTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLG KRRGRDPMEGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDG LYQGLSTATKDYDALHMQLPPR
BCMA EBB -C1979-C1 - nt 全长 CART	295	ATGGCCCTCCCTGTCAACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTCGTGAATCGGGTGGCGGACTGGTGCAGCC GGGGGGCTCACTTAGACTGTCTGCGCGGCCAGCGGATCACTTTCTCCTCC TACGCCATGTCTGGGTGAGCAGGCCCTGGAAGGGCCTGGAATGGGTGT CCGCAATCAGCGGCAGCGCGGCTCGACCTATTACGCGGATTCAGTGAAGGG CAGATTCACCATTTCCCGGGACAACGCCAAGAAGTCTTGTACCTCAAATG AACTCCCTCCGCGCGGAAGATAACCGCAATCTACTACTGCGCTCGGGCCACTT ACAAGAGGGAAGTGCCTACTACTACGGGATGGACGTCTGGGGCCAGGGAAC CATGGTCAACCGTGTCCAGCGGAGGAGGAGGATCGGGAGGAGCGGTAGCGGG GGTGGAGGGTCCGAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGGCCTGCTGCTGT CCCCCGGCAACGGGCCACCCTGTGATGTCGGGCCAGCCAGTCAAGTGTGCTC AAGCTTCTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCGGGACAAGCTCCCCGCTGCTG ATCTACGGAGCCAGCAGCCGGGCCACCGGTATTCTGACCGGTTCTCCGGTT CGGGGTCCGGGACCGACTTTACTCTGACTATCTCTCGCCTCGAGCCAGAGGA CTCCGCCGTGATTACTGCCAGCAGTACCCTCCTCCCCGCTTGGACGTTTC GGACAGGGCACAAGGCTGGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCAC CCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCC

		TGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGC TTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTA CATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTTCATGCCGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCA GCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGGAAAGCCGCGCAGAAAGAATC CCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAAGGCAAAGGCCACGACGGA CTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACA TGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1978-C7		
BCMA EBB -C1978-C7 - aa ScFv 结构域	296	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLTAKAEDTAVYYCARATYKRE LRYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSTLSLSPGE SATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSNRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTFGQGTKVEIK
BCMA EBB -C1978-C7 - nt ScFv 结构域	297	GAGGTGCAGCTTGTGGAACCGGTGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCC TCAGGCTGTCTGCGCCGCGTCCGGCTTCACCTTCTCCTCGTACGCCATGTC CTGGGTCCGCCAGGCCCGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCT GGAAGCGGAGGTTCCACGTACTACGCGGACAGCGTCAAGGGAAGGTTACAAA TCTCCCGCGATAATTGAAGAACACTCTGTACCTTCAAATGAACACCCTGAA GGCCGAGGACACTGCTGTGTACTACTGCGCACGGGCCACCTACAAGAGAGAG CTCCGGTACTACTACGGAATGGACGCTCTGGGGCCAGGGAAGTACTGTGACCG TGTCTCGGGAGGGGTGGCTCCGGGGGGGCGGCTCCGGCGGAGGCGGTTTC CGAGATTGTGCTGACCCAGTCACTTCAACTCTGTGCTGTCCCCGGGAGAG AGCGTACTCTGAGCTGCCGGGCCAGCCAGTCCGTGTCCACCACCTTCTCTCG CCTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGCAGGCACCACGGCTCTTGATCTACGGGTC AAGCAACAGAGCGACCGGAATTCCTGACCGCTTCTCGGGGAGCGGTTACGGC ACCGACTTCAACCCTGACTATCCGGCGCTGGAACCCGAAGATTTCCCGTGT ATTACTGTCAACAGTACCCTCCTCGCCGCTCTGGACCTTTGGCCAAGGAAC CAAAGTGGAAATCAAG
BCMA EBB -C1978-C7 - aa VH	298	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLTAKAEDTAVYYCARATYKRE LRYYYGMDVWGQGTITVTVSS
BCMA EBB -C1978-C7 - aa VL	299	EIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLLIYGS SNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTFGQGT KVEIK
BCMA EBB -C1978-C7 - aa 全长 CART	300	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NTLKAEDTAVYYCARATYKRELRYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLL IYGSSNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTF GQGTKVEIKTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
BCMA EBB -C1978-C7 - nt 全长 CART	301	ATGGCCCTCCCTGTACCAGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAGGTGCAGCTTGTGAAACCGGTGGCGGACTGGTGCAGCC CGGAGGAAGCCTCAGGCTGTCTGCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCG TACGCCATGTCTGGGTCCGCCAGGCCCGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGT CCGCCATCTGGAAGCGGAGGTTCCACGTACTACGCGGACAGCGTCAAGGG AAGGTTACAATCTCCCGCGATAATTGAAGAACACTCTGTACCTTCAAATG AACACCCTGAAGGCCGAGGACACTGCTGTGTACTACTGCGCACGGGCCACCT ACAAGAGAGAGCTCCGGTACTACTACGGAATGGACGCTCTGGGGCCAGGGAAC

[0904]

[0905]

		TACTGTGACCGTGTCTCGGGAGGGGGTGGCTCCGGGGGGGGCGGCTCCGGC GGAGGCGGTTCCGAGATTGTGCTGACCCAGTCACCTTCAACTCTGTGCTGT CCCCGGGAGAGAGCGCTACTCTGAGCTGCCGGGCCAGCCAGTCCGTGTCCAC CACCTTCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGCAGGCACCACGGCTCTTG ATCTACGGGTCAAGCAACAGAGCGACCGGAATTCCTGACCGCTTCTCGGGGA GCGGTTTCAGGCACCGACTTACCCTGACTATCCGGCGCCTGGAACCCGAAGA TTTCGCCGTGTATTACTGTCAACAGTACCCTCCTCGCCGTCTGGACCTTT GGCCAAGGAACCAAAGTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGGCCAC CCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCC TGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGTC TTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGCTGTA CATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCGTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGCGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCA GCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAGCCGCGCAGAAAGAATC CCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGA CTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACA TGCAGGCCCTGCCGCTCGG
<b>BCMA EBB-C1978-D10</b>		
BCMA EBB -C1978-D10 - aa ScFv 结构域	302	<u>EVQLVETGGGLVQPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS</u> <u>WNSGSI</u> <u>GYADSVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQMN</u> <u>SLRDEDTAVYYCARV</u> <u>GKAVP</u> <u>DVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSGGGGSGGGGSGGGSDI</u> <u>VMTQT</u> <u>PSSLSASV</u> <u>GDRV</u> <u>TITCR</u> <u>ASQSI</u> <u>SSYLNWYQQK</u> <u>PGKAPKLLIYA</u> <u>ASSLQ</u> <u>SGVPSRF</u> <u>SGSG</u> <u>SGTDF</u> <u>TLTIS</u> <u>SLQPEDFATYYCQQSYSTPYS</u> <u>FGQ</u> <u>TRLEIK</u>
BCMA EBB -C1978-D10- nt ScFv 结构域	303	GAAGTGCAGCTCGTGGAAACTGGAGGTGGACTCGTGCAGCCTGGACGGTCCG TGCGGCTGAGCTGCGCTGCATCCGGCTTACCTTCGACGATTATGCCATGCA CTGGGTGAGACAGGCGCCAGGGAAGGGACTTGAGTGGGTGTCCGGTATCAGC TGGAATAGCGGCTCAATCGGATACGCGGACTCCGTGAAGGGAAGGTTACCA TTTCCCAGCAACGCCAAGAACTCCCTGACTTGCAAAATGAACAGCCTCCG GGATGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCTCGGAAAAGCTGTGCC GACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTGTGACCGTGTCCAGCGGGGGTGGAT CGGGCGGTGGAGGGTCCGGTGGAGGGGGCTCAGATATTGTGATGACCCAGAC CCCCTCGTCCCTGTCCGCCTCGGTCCGCGACCGGTGACTATCACATGTAGA GCCTCGCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGA AGGCCCCGAAGCTCCTGATCTACGCGGCATCATCACTGCAATCGGGAGTGCC GAGCCGGTTTTCCGGGTCCGGTCCGGCACCGACTTCAAGCTGACCATTTCT TCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCA CCCCTTACTCCTTCGGCCAAGGAACCAGGCTGGAAATCAAG
BCMA EBB -C1978-D10 - aa VH	304	<u>EVQLVETGGGLVQPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS</u> <u>WNSGSI</u> <u>GYADSVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQMN</u> <u>SLRDEDTAVYYCARV</u> <u>GKAVP</u> <u>DVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSS</u>
BCMA EBB -C1978-D10- aa VL	305	<u>DIVMTQT</u> <u>PSSLSASV</u> <u>GDRV</u> <u>TITCR</u> <u>ASQSI</u> <u>SSYLNWYQQK</u> <u>PGKAPKLLIYA</u> <u>AS</u> <u>SLQ</u> <u>SGVPSRF</u> <u>SGSG</u> <u>SGTDF</u> <u>TLTIS</u> <u>SLQPEDFATYYCQQSYSTPYS</u> <u>FGQ</u> <u>TRL</u> <u>EIK</u>
BCMA EBB -C1978-D10 - aa 全长 CART	306	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRDEDTAVYYCARVGVKAVPDVWGQGTTVTSSGGGGSGGGGSDIV MTQTTPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYSFGQTRLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHDGLYQGLSTAT

[0906]

		KD TYDALHMQALPPR
BCMA EBB -C1978-D10 - nt 全长 CART	307	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTGGAACTGGAGGTGGACTCGTGCAGCC TGGACGGTTCGCTGCGGCTGAGCTGCGTGCATCCGGCTTACCTTCGACGAT TATGCCATGCACTGGGTGAGACAGGCGCCAGGGAAGGGACTTGAGTGGGTGT CCGGTATCAGCTGGAATAGCGGCTCAATCGGATACGCGGACTCCGTGAAGGG AAGGTTACCATTTCCCGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACTTGCAAATG AACAGCCTCCGGGATGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCTCGGAA AAGCTGTGCCCGACGTCTGGGGCCAGGGAACCACTGTGACCGTGTCCAGCGG CGGGGGTGGATCGGGCGGTGGAGGGTCCGGTGGAGGGGGCTCAGATATTGTG ATGACCCAGACCCCTCGTCCCTGTCCGCTCGGTCCGGCAGCCGCTGACTA TCACATGTAGAGCCTCGCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCA GAAGCCGGGAAGGCCCGAAGCTCCTGATCTACGCGGCATCATCACTGCAA TCGGGAGTGCCGAGCCGTTTCCGGTCCGGTCCGGCACCAGCTTACCGC TGACCATTTCTTCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCA GTCCTACTCCACCCCTTACTCCTTCGGCCAAGGAACCAGGTGGAAATCAAG ACCCTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCCCTCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTTACTGTA AGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCCAAGTGCAGCTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTC CAGCCTACAAGCAGGGGACAGAACAGCTCTACAACGAAGTCAATCTTGGTCC GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCC AAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCCACC AAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1979-C12		
BCMA EBB -C1979-C12- aa ScFv 结构域	308	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPKGLEWVASIN WKGNSLAYGDSVKGRFAISRDNKNTVFLQMNSLRTEDEVAVYYCASHQGVAY YNYAMDVWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERA TLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASQRATGIPDRFSGRGS GTDFTLTI SRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQGTKVEIK
BCMA EBB -C1979-C12 - nt ScFv 结构域	309	GAAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGAGGATTGGTGCAGCCCGAAGGTCCC TGCGGCTCTCCTGCACTGCGTCTGGCTTACCTTCGACGACTACGCGATGCA CTGGGTGAGACAGCCCGGGAAAGGGCTGGAATGGGTGCGCTCAATCAAC TGGAAGGGAACTCCCTGGCCTATGGCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCGCCA TTTTCGCGCACAACGCCAAGAACACCGTGTCTTCTGCAAAATGAATCCCTGCG GACCGAGGATACCGTGTGTACTACTGCGCCAGCCACCAGGGCGTGGCATA TATAACTACGCCATGGACGTGTGGGAAGAGGGACGCTCGTCAACCGTGTCT CCGGGGCGGTGGATCGGGTGGAGGAGGAAGCGGTGGCGGGGACGCGAAAT CGTGCTGACTCAGAGCCCGGGAACCTTTCACTGTCCCGGAGAAACGGGCC ACTCTCTCGTGCCGGGCCACCCAGTCCATCGGCTCCTCCTTCTTGCCTGGT ACCAGCAGAGGCCAGGACAGGCGCCCCGCTGCTGATCTACGGTGTCTCCCA ACGCGCCACTGGCATTCCTGACCGGTTACGCGGACAGGGTCCGGAAACCGAT TTCACACTGACCATTTCCCGGTGGAGCCCGAAGATTCCGGCAGTCTACTACT GTCAGCATTACGAGTCTCCCTTCATGGACCTTCGGTCAAGGGACCAAAGT GGAGATCAAG
BCMA EBB -C1979-C12 - aa VH	310	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPKGLEWVASIN WKGNSLAYGDSVKGRFAISRDNKNTVFLQMNSLRTEDEVAVYYCASHQGVAY YNYAMDVWGRGTLVTVSS
BCMA EBB -C1979-C12 - aa VL	311	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGA SQRATGIPDRFSGRGSQDFTLTI SRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQGT KVEIK

[0907]

BCMA_EBB -C1979-C12 - aa 全长 CART	312	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDD YAMHWVRQRPKGLEWVASINWKGNLAYGDSVKGRFAISRDNANTVFLQM NSLRTEDTAVYYCASHQGVAYYNYAMDVWGRGTLVTVSSGGGGSGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPGQAPRLLIY GASQRATGIPDRFSGRSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQ GTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQLPPR
BCMA_EBB -C1979-C12 - nt 全长 CART	313	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGAGGATTGGTGCAGCC CGGAAGGTCCCTGCGGCTCTCCTGCACTGCGTCTGGCTTCACTTCGACGAC TACGCGATGCACTGGGTGACAGCGCCCGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGCG CCTCAATCAACTGGAAGGGAACTCCCTGGCTATGGCGACAGCGTGAAGGG CCGCTTCGCCATTTGCGCGGACAACGCCAAGAACACCGTGTCTGCAAATG AATTCCCTGCGGACCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGCCACAGG GCGTGGCATACTATAACTACGCCATGGACGTGTGGGGAAGAGGGACGCTCGT CACCGTGTCTCCGGGGGCGGTGGATCGGGTGGAGGAGGAAGCGGTGGCGGG GGCAGCGAAATCGTGTGACTCAGAGCCCGGAACTCTTCACTGTCCCCGG GAGAACGGGCCACTCTCTCGTGCCGGGCCACCCAGTCCATCGGCTCCTCCTT CCTTGCCTGGTACCAGCAGAGGCCAGGACAGGCGCCCCGCTGCTGATCTAC GGTGCTTCCCAACGCGCCACTGGCATTCTTGACCGGCTACGCGCAGAGGGT CGGGAACCGATTTCACTGACCATTTCCCGGGTGGAGCCCGAAGATTGCGC AGTCTACTACTGTGAGCATTACGAGTCTCCCTTCATGGACCTTCGGTCAA GGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGCTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAATGCGCGTGAAT TCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCTCTA CAACGAATCAATCTTGGTGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG
BCMA_EBB-C1980-G4		
BCMA_EBB - C1980-G4- aa ScFv 结构域	314	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKVVVDGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPRFTFGPGTKVDIK
BCMA_EBB - C1980-G4- nt ScFv 结构域	315	GAGGTGCAGTTGGTCAAAGCGGGGGCGGGCTTGTGCAGCCTGGCGGATCAC TGCGGCTGTCTGCGCGGCATCAGGCTTCACGTTTTCTTCTTCTACGCCATGTC CTGGGTGCGCCAGGCCCCGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCGATTTTCG GGGTCCGGCGGGAGCACCTACTACCGGATTCGGTGAAGGGCCGCTTCACTA TCTCGCGGACAACCTCAAAGAACACCCCTTACCTCCAAATGAATAGCCTGCG GGCCGAGGATACCGCGTCTACTATTGCGCTAAGGTGCTGCGCGACGGAATG GACGTGTGGGACAGGGTACCACCGTGACAGTGTCTCGGGGGGAGGCGGTA GCGGCGGAGGAGGAAGCGGTGGTGGAGGTTCCGAGATTGTGCTGACTCAATC ACCCGCGACCTGAGCCTGTCCCCGGCGAAAGGGCCACTCTGTCTGTCTCGG GCCAGCCAATCAGTCTCTCTCGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAG GACAGGCTCCGAGACTCCTTATCTATGGCGCATCTCCCGGCCACCGGAAT CCCGGATAGGTTCTCGGAAACGGATCGGGGACCGACTTCACTCTCACCATC TCCCGGCTGGAACCGGAGGACTTCCGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGGCA

		GCCCCCTAGATTCACTTTCGGCCCCGGCACCAAAGTGGACATCAAG
BCMA EBB - C1980-G4- aa VH	316	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVVRDGM DVWGQGTITVTVSS
BCMA EBB - C1980-G4- aa VL	317	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG SSRATGIPDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPRFTFGPGT KVDIK
BCMA EBB - C1980-G4- aa 全长 CART	318	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVVRDGMVWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSPPRFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
BCMA EBB - C1980-G4- nt 全长 CART	319	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCCGAGGTGCAGTTGGTCGAAAGCGGGGGCGGGCTTGTGCAGCC TGGCGGATCACTGCGGCTGTCTCGCGGCAACAGGCTTACGTTTTCTTCC TACGCCATGTCTCGGGTGCGCCAGGCCCTGAAAGGGACTGGAATGGGTGT CCGCGATTTCCGGGTCCGGCGGGAGCACCTACTACCGGATTCCGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCGCGGACAACCTCCAAGAACACCTCTACCTCCAAATG AATAGCCTGCGGGCCGAGGATAACCGCCGTCTACTATTGCGCTAAGGTCTGTC GCGACGGAATGGACGTGTGGGGACAGGTACCACCGTGACAGTGTCTCGGG GGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGTGGTGGAGGTTCCGAGATTGTG CTGACTCAATCACCCGCGACCTGAGCCTGTCCCCCGCGAAAGGGCCACTC TGTCTGTGCGGGCCAGCCAATCAGTCTCCTCCTCGTACCTGGCCTGGTACCA GCAGAAGCCAGGACAGGCTCCGAGACTCCTTATCTATGGCGCATCCTCCCGC GCCACCGAATCCCGGATAGGTTCTCGGAAACGGATCGGGGACCGACTTCA CTCTACCATCTCCCGGTGGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGTACGGCAGCCCGCTAGATTCACTTTCGGCCCCGGCACCAAAGTGGAC ATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCG CCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGG GGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCAT GAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTGATGCCGGTTCCTCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGTGAATTCAGCCGAGCGCAG ATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTTACAACGAACCAATCT TGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGG GGAACGAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1980-D2		
BCMA EBB - C1980-D2- aa ScFv 结构域	320	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKIPQTGT FDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQGRLEIK
BCMA EBB - C1980-D2- nt ScFv 结构域	321	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGCGGTGGATTGGTGCAACCGGGGGGATCGC TCAGACTGTCTGTGCGGCGTCAGGCTTACCTTCTCGAGCTACGCCATGTC ATGGGTGAGACAGGCCCTGGAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCGCATTTCC GGGAGCGGGGGATCTACATACTACCCGATAGCGTGAAGGGCCGCTTACCA

[0908]

[0909]

		TTTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACTCTCTATCTGCAAAATGAACTCCCTCCG CGCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAATCCCTCAGACCGGCACC TTCGACTACTGGGGACAGGGGACTCTGGTCACCGTCAGCAGCGGTGGCGGAG GTTCCGGGGGAGGAGGAAGCGGCGGCGGAGGGTCCGAGATTGTGCTGACCCA GTCACCCGGCACTTTGTCCCTGTGCGCTGGAGAAAAGGCCACCCTTTCTGC CGGGCATCCCAATCCGTGTCTCCTCGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAGGC CCGGACAGGCCCCACGGCTTCTGATCTACGGAGCAAGCAGCCGCGGACCGG TATCCCGGACCGGTTTTCCGGCTCGGGCTCAGGAACTGACTTACCCTCACC ATCTCCCGCTGGAACCCGAAGATTTGCTGTGTATTACTGCCAGCACTACG GCAGCTCCCCGTCTGGACGTTCCGGCCAGGGAACCTCGGCTGGAGATCAAG
BCMA EBB - C1980-D2- aa VH	322	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKIPQTGT FDYWGQGLVTVSS
BCMA EBB - C1980-D2- aa VL	323	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQORPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQGT RLEIK
BCMA EBB - C1980-D2- aa 全长 CART	324	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKIPQTGTFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQORPGQAPRLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQGT EIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCR PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLS TATKDTYDALHMQLPPR
BCMA EBB - C1980-D2- nt 全长 CART	325	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGCGGTGGATTGGTGCAACC GGGGGATCGCTCAGACTGTCTGTGCGGCTCAGGCTTCACTTCTCGAGC TACGCCATGTATGGGTGAGACAGGCCCCTGAAAGGGTCTGGAATGGGTGT CCGCCATTTCCGGGAGCGGGGATCTACATACTACGCCGATAGCGTGAAGGG CCGCTTACCATTTCCCGGGACAACCTCCAAGAACAACCTCTATCTGCAAATG AACTCCCTCCGCGCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAATCCCTC AGACCGGCACCTTCGACTACTGGGGACAGGGGACTCTGGTCACCGTCAGCAG CGGTGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGAGGAAGCGGCGGCGGAGGGTCCGAGATT GTGCTGACCCAGTCACCCGGCACTTTGTCCCTGTGCGCTGGAGAAAGGGCCA CCCTTCTGCGGGCATCCCAATCCGTGTCTCCTCGTACCTGGCTGGTA CCAGCAGAGGCCCGGACAGGCCCCACGGCTTCTGATCTACGGAGCAAGCAGC CGCGGACCGGTATCCCGGACCGGTTTTCCGGCTCGGGCTCAGGAACTGACT TCACCCTCACCATCTCCCGCCTGGAACCCGAAGATTTGCTGTGTATTACTG CCAGCACTACGGCAGCTCCCCGTCTGGACGTTCCGGCCAGGGAACCTCGGCTG GAGATCAAGACCCTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTCCTACCA TCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCATATCTACATTTGG GCCCCCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTC TTTACTGTAAGCGCGGTGCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTT CATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTC CCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTGAGCCGAGCG CAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAACTCAA TCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGAC CCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACA ACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAA AGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGC ACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTC GG
BCMA EBB-C1978-A10		

[0910]

BCMA_EBB - C1978-A10- aa ScFv 结构域	326	<u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW</u> <u>VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVY</u> <u>YCARANYKRELRYYYGMDVWVGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG</u> <u>EIVMTQSPGTL</u> <u>SLSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKPGQAPSLLI</u> <u>SGASSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLAI</u> <u>SRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSW</u> <u>TFGQGTKVEIK</u>
BCMA_EBB - C1978-A10- nt ScFv 结构域	327	GAAGTGCAACTGGTGGAAACCGGTGGAGGACTCGTGCAGCCTGGCGGCAGCC TCCGGCTGAGCTGCGCCGCTTCGGGATTCACCTTTTCTCTCTACGCGATGTC TTGGGTGAGACAGGCCCGCGAAAGGGGCTGGAATGGGTGTGAGCCATCTCC GGCTCCGGCGGATCAACGTACTACGCCGACTCCGTGAAAGGCCGGTTACCA TGTCGCGCGAGAATGACAAGAACTCCGTGTTCTGCAAAATGAACTCCCTGAG GGTGGAGGACACCGGAGTGTACTATTGTGCGCGCGCCAACTACAAGAGAGAG CTGCGGTACTACTACGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGAATATGGTGACCG TGTCATCCGGTGGAGGGGGAAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGGGCGGGGGTTC AGAAATTGTGATGACCCAGTCCCCGGAACTCTTTCCCTCTCCCCGGGGAA TCCGCGACTTTGTCTGCGGGGCCAGCCAGCGCGTGGCCTCGAACTACCTCG CATGGTACCAGCATAAGCCAGGCCAAGCCCTCCCTGCTGATTTCCGGGC TAGCAGCCGCGCCACTGGCGTGCCGGATAGGTTCTCGGGAAGCGGCTCGGGT ACCGATTTACCCCTGGCAATCTCGCGGCTGGAACCGGAGGATTGCGCCGTGT ACTACTGCCAGCACTATGACTCATCCCCCTCTGGACATTTCGGACAGGGCAC CAAGGTCGAGATCAAG
BCMA_EBB - C1978-A10- aa VH	328	<u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS</u> <u>GSGGSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVYYCARANYKRE</u> <u>LRYYYYGMDVWVGQGTMTVTVSS</u>
BCMA_EBB - C1978-A10- aa VL	329	<u>EIVMTQSPGTL</u> <u>SLSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKPGQAPSLLI</u> <u>SGA</u> <u>SSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLAI</u> <u>SRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGT</u> <u>KVEIK</u>
BCMA_EBB - C1978-A10- aa 全长 CART	330	<u>MALPVTALLLPLALLH</u> <u>AARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGF</u> <u>TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTMSREN</u> <u>DKNSVFLQMNSLRVEDTGVYYCARANYKRELRYYYGMDVWVGQGTMT</u> <u>VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTL</u> <u>SLSPGESATLSCRASQRV</u> <u>ASNYLAWYQHKPGQAPSLLI</u> <u>SGASSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLAI</u> <u>SR</u> <u>LEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGTKVEIKTTTT</u> <u>PAPRPPTPAPTIASQP</u> <u>LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL</u> <u>LLSLVITLY</u> <u>CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC</u> <u>SCRFEHEEGGCELRVKFSR</u> <u>SADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVL</u> <u>DKRRGRDPEMGGKPRRK</u> <u>NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR</u> <u>GKGHDLGQLSTATKD</u> <u>TYDALHMQALPPR</u>
BCMA_EBB - C1978-A10- nt 全长 CART	331	ATGGCCCTCCCTGTCAACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTGCAACTGGTGGAAACCGGTGGAGGACTCGTGCAGCC TGGCGGCAGCCTCCGGCTGAGCTGCGCCGCTTCGGGATTCACCTTTTCTCTCC TACGCGATGTCTTGGGTGAGACAGGCCCGCGAAAGGGGCTGGAATGGGTGT CAGCCATCTCCGGCTCCGGCGGATCAACGTACTACGCCGACTCCGTGAAAGG CCGGTTCACCATGTGCGCGGAGAATGACAAGAACTCCGTGTTCTGCAAAATG AACTCCCTGAGGGTGGAGGACACCGGAGTGTACTATTGTGCGCGCGCCAAT ACAAGAGAGAGCTGCGGTACTACTACGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGAAC TATGGTGACCGTGTGATCCGGTGGAGGGGGAAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGG GGCGGGGGTTCAGAAATTGTGATGACCCAGTCCCCGGAACTCTTTCCCTCT CCCCGGGGAATCCGCGACTTTGTCTGCGGGGCCAGCCAGCGCGTGGCCTC GAACTACCTCGCATGGTACCAGCATAAGCCAGGCCAAGCCCTTCCCTGCTG ATTTCCGGGGCTAGCAGCCGCGCCACTGGCGTGCCGGATAGGTTCTCGGGAA GCGGCTCGGGTACCGATTTACCCCTGGCAATCTCGCGGCTGGAACCGGAGGA TTCGGCCGTGTACTACTGCCAGCACTATGACTCATCCCCCTCTGGACATTTC GGACAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCAC

[0911]

		CCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCC TGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGC TTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTA CATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCGTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGGCGG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCA GCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAC AAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAGCCGCGCAGAAAGAATC CCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGA CTGTACCAGGACTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACA TGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1978-D4		
BCMA EBB - C1978-D4- aa ScFv 结构域	332	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKALVGAT GAFDIWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPGTLTSLSPGERATL SCRASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLLIYGASNWATGTPDRFSGSGSGTDFT LTITRLEPEDFAVYYCQYYGTSMPYTFGQGTKVEIK
BCMA EBB - C1978-D4- nt ScFv 结构域	333	GAAGTGCAGCTGCTCGAAACCGGTGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCCC TGAGGCTTTCATGCGCCGCTAGCGGATTCCTCTCTCCTCTTACGCCATGTC GTGGGTCCGCCAAGCCCCGGAAAAGCCGTGAATGGGTGTCCGCGATTTCC GGGAGCGGAGGTTTCGACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGCTTTACCA TCTCCCGGGATAACTCCAAGAACAACCTGTACCTCCAAATGAACTCGCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCGAAGCGCTGGTCCGGCGGACT GGGGCATTTCGACATCTGGGGACAGGGAACCTTGTGACCGTGTGCGAGCGGAG GCGGCGGCTCCGGCGGAGGAGGGAGCGGGGGCGGTGGTCCGAAATCGTGT GACTCAGTCCCCGGGAACCCGTAGCTTGTACCCGGGAGCGGGCCACTCTC TCCTGTGCGCCTCCCAATCGCTCTCATCCAATTTCTGGCCTGGTACCAGC AGAAGCCCGGACAGGCCCGGGCCTGCTCATCTACGGCGCTCAAACCTGGGC AACGGGAACCCCTGATCGGTTTCAGCGGAAGCGGATCGGGTACTGACTTTACC CTGACCATCACCAGACTGGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGCCAGT ACTACGGCACCTCCCCATGTACACATTCGGACAGGTTACCAAGGTCGAGAT TAAG
BCMA EBB - C1978-D4- aa VH	334	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKALVGAT GAFDIWGQGLTVTVSS
BCMA EBB - C1978-D4- aa VL	335	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLLIYGA SNWATGTPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQYYGTSMPYTFGQGT KVEIK
BCMA EBB - C1978-D4- aa 全长 CART	336	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKALVGATGAFDIWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLLIYGA SNWATGTPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQYYGTSMPYTFGQGT KVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRR RDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
BCMA EBB - C1978-D4- nt 全长 CART	337	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGCTCGAAACCGGTGGAGGGCTGGTGCAGCC AGGGGGCTCCCTGAGGCTTTCATGCGCCGCTAGCGGATTCCTCTCTCCTCT TACGCCATGTCGTGGGTCCGCCAAGCCCCGGAAAAGCCCTGGAATGGGTGT CCGCGATTTCCGGGAGCGGAGGTTTCGACCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGG CCGCTTTACCATCTCCCGGGATAACTCCAAGAACAACCTGTACCTCCAAATG

[0912]

		AACTCGCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCGAAGGCGCTGG TCGGCGCGACTGGGGCATTTCGACATCTGGGGACAGGGAACCTCTGTGACCGT GTCGAGCGGAGGCGGCGGCTCCGGCGGAGGAGGAGCGGGGGCGGTGGTTCC GAAATCGTGTGACTCAGTCCCCGGGAACCTGAGCTTGTACCCCGGGGAGC GGGCCACTCTCTCTGTGCGGCCTCCCAATCGCTCTCATCCAATTTCTGGC CTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCGGGCTGCTCATCTACGGCGCT TCAAACCTGGGCAACGGGAACCCCTGATCGGTTACGCGGAAGCGGATCGGGTA CTGACTTTACCCTGACCATCACCAGACTGGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTA CTACTGCCAGTACTACGGCACCTCCCCATGTACACATTCGGACAGGGTACC AAGGTCGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCAGGACCACCCACCCCGGCTC CTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGC AGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCATATCTAC ATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGCTCTGCTGCTTTCACTCGTGA TCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCA ACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCACTCTACAACGA ACTCAATCTTGGTCGGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGA CGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCC TGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAACCTATAGCGAGATTGG TATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGC CGCTCGG
BCMA EBB-C1980-A2		
BCMA EBB - C1980-A2- aa ScFv 结构域	338	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVLWFGEGF DPWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCR SSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTF TLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGTKVDIK
BCMA EBB - C1980-A2- nt ScFv 结构域	339	GAAGTGCAGCTGCTTGAGAGCGGTGGAGGTCTGGTGCAGCCGGGGGATCAC TGCGCCTGTCTGTGCCGCTCCGTTTCTACTTCTCCTCGTACGCCATGTC GTGGGTGAGACAGGACCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGTGAGCCATTTCCG GGTTCGGGGGGCAGCACCTACTAGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TTTCCCGCGACAACCTCAAGAACACCTTGTACTCCAAATGAACTCCCTGCG GGCCGAAGATACCGCGTGTATTACTGCGTGTGTTGCGGAGAGGGATTTC GACCCGTGGGGACAAGGAACACTCGTACTGTGTCATCCGGCGGAGGCGGCA GCGGTGGCGGCGGTTCCGGCGGCGGGATCTGACATCGTGTGAGCCAGTC CCCTCTGAGCCTGCCGGTCACTCCTGGCGAACCAGCCAGCATCTCCTGCCGG TCGAGCCAGTCCCTCCTGCACTCCAATGGGTACAACCTCGATTGATTGATC TGCAAAGCCGGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCTTGGGTCAAACCG CGTTCCGGGGTGCCTGATAGATTCTCCGGGTCCGGGAGCGGAACCGACTTT ACCCTGAAAATCTCGAGGGTGGAGGCCGAGGACGTCCGGAGTGTACTACTGCA TGCAGGCGCTCCAGACTCCCCGACCTTCGGAGGAGGAACGAAGGTGACAT CAAGA
BCMA EBB - C1980-A2- aa VH	340	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVLWFGEGF DPWQGTLVTVSS
BCMA EBB - C1980-A2- aa VL	341	DIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLL IYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTFITLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFG GGTKVDIK
BCMA EBB - C1980-A2- aa 全长 CART	342	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCVLWFGEGFDPWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIV LTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRSAGVPDRFSGSGSDTFITLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGT KVDIKTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGAVHTRGLDFACDIY

[0913]

		IWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRFPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPMEGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
BCMA EBB - C1980-A2- nt 全长 CART	343	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCCAAGTGCAGCTGCTTGAGAGCGGTGGAGGTCTGGTGCAGCC CGGGGGATCACTGCGCCTGTCTGTGCCGCTCCGGTTTCACTTTCTCCTCG TACGCCATGTCGTGGGTGACACAGGCACCGGAAAGGGACTGGAATGGGTGT CAGCCATTTCCGGTTCCGGGGGCGAGCACCTACTACGCTGACTCCGTGAAGGG CCGGTTACCATTTCCCGCGACAACCTCCAAGAACACCTTGTACCTCCAAATG AACTCCCTGCGGGCCGAAGATAACCGCCGTGTATTACTGCGTGTGTGGTTCG GAGAGGGATTTCGACCCGTGGGGACAAGGAACACTCGTGACTGTGTATCCGG CGGAGGCGGACGCGGTGGCGGGGTTCCGGCGGCGCGGATCTGACATCGTG TTGACCCAGTCCCCTCTGAGCCTGCCGCTACTCTGGCGAACAGCCAGCA TCTCCTGCCGGTCGAGCCAGTCCCTCCTGCACTCCAATGGGTACAACCTACCT CGATTGGTATCTGCAAAAGCCGGGGCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCTT GGGTCAAACCGCGCTTCCGGGGTGCCTGATAGATTCTCCGGTCCGGGAGCG GAACCGACTTTACCCTGAAAATCTCGAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGCGAGT GTACTACTGCATGCAGGCGCTCCAGACTCCCCTGACCTTCGGAGGAGGAACG AAGGTGCAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTC CTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGC AGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGA TCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCA ACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGC CGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGGGTCCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGA ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGA CGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCC TGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGG TATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGA CTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGC CGCTCGG
BCMA EBB-C1981-C3		
BCMA EBB - C1981-C3- aa ScFv 结构域	344	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAIS</u> <u>GSGGSTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKVG</u> <u>YDSS</u> <u>GYRDRYYGMDVWQG</u> <u>TTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVL</u> <u>TQSPGTL</u> <u>SLSP</u> <u>GERATLSCRASQSVSSYLAWYQ</u> <u>KPGQAPRLLIYGTSSRATGISDR</u> <u>FSGSG</u> <u>SGTDFTLTISRLEPEDFAVY</u> <u>YQCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIK</u>
BCMA EBB - C1981-C3- nt ScFv 结构域	345	CAAGTGCAGCTCGTGGAGTCAAGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGGGCTCCC TGAGACTTTTCTGCGCGGCATCGGGTTTTACCTTCTCCTCCTATGCTATGTC CTGGGTGCGCCAGGCCCGGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCAATCAGC GGTAGCGGGGGCTCAACATACTACGCCGACTCCGTCAAGGGTGCCTTCACTA TTTCCCGGACAACCTCAAGAATACCCTGTACCTCCAAATGAACAGCCTCAG GGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAGTCGGATAACGATAGCTCC GGTTACTACCGGGACTACTACGGAATGGACGTGTGGGACAGGGCACCACCG TGACCGTGTCAAGCGGCGGAGGCGGTTCAAGAGGGGAGGCTCCGGCGGTGG AGGGTCCGAAATCGTCTGACTCAGTCGCCTGGCACTCTGTCTGTGTCCTCCG GGGAGCGCGCTACCCTGTCTGTGTCGGGCGTCGACGTCCTGTGTCGAGCTCCT ACCTCGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCTAGACTTCTGATCTA CGGCACTTCTTACGCGCCACCGGGATCAGCGACAGGTTACGCGGCTCCGGC TCCGGGACCGACTTCAACCCTGACCATTAGCCGGCTGGAGCCTGAAGATTTCCG CCGTGTATTACTGCCAACACTACGGAAACTCGCCGCCAAAGTTCACGTTCCGG ACCCGGAACCAAGCTGGAATCAAG
BCMA EBB - C1981-C3- aa VH	346	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAIS</u> <u>GSGGSTYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKVG</u> <u>YDSS</u> <u>GYRDRYYGMDVWQG</u> <u>TTVTVSS</u>

[0914]

BCMA EBB - C1981-C3- aa VL	347	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGISDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIK
BCMA EBB - C1981-C3- aa 全长 CART	348	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVG YDSSGYRDIYGM DVWGQGT VTVVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGISDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
BCMA EBB - C1981-C3- nt 全长 CART	349	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGCCGAGGACTGGTGCAGCCCGGGGCTCCCTGAGACTTTCTCGCGGCATCGGGTTTTACCTTCTCTCTCC TATGCTATGCTCCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCAATCAGCGGTAGCGGGGCTCAACATACTACGCCGACTCCGTCAAGGTCGCTTCACTATTTCCCGGACAACCTCCAAGATACCTGTACCTCCAAATGAACAGCCTCAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAGTCGGATACGATAGCTCCGGTTACTACCGGACTACTACGGAATGGACGTGTGGGGACAGGGCACCACCGTGACCGTGTCAAGCGGCGGAGGGCGGTTCAGGAGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGAGGGTCCGAAATCGTCTGACTCAGTCGCTGGCACTCTGTGCTTGTCCCGGGGAGCGCGCTACCCTGTGCTGTGGGGCGTCGAGTCCGTGTCGAGCTCCTACCTCGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCTTAGACTTCTGATCTACGGCACTTCTTACGCGCCACCGGGATCAGCGACAGGTTACGCGGCTCCGGCTCCGGGACCGACTTCACTCCGCTGACCATTAGCCGGCTGGAGCCTGAAGATTTCCCGTGTATTACTGCCAACACTACGGAAACTCGCCGCCAAAGTTCACGTTCCGACCCGGAACCAAGCTGGAATCAAGACACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGCTTACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGTTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGGAAGAA GCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAA GAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGA ACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGCAGAACACGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAATGGGCGGGAAGCCGCGCA GAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAGAGGCAAGGC CACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG
BCMA EBB-C1978-G4		
BCMA EBB - C1978-G4- aa ScFv 结构域	350	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGFADIWGQGT VTVVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPRLTFGGGTKVDIK
BCMA EBB - C1978-G4- nt ScFv 结构域	351	GAAGTCCAACCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGGCTCGTGCAGCCCGGAGGCAGCCTTCGGCTGTGCTGCGCCGCTCCGGGTTACGTTCTCATCTACGCGATGCTGTGGGTGAGACAGGCACCAGGAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGCTCCGGCGGTAGCACCTACTATGCCGACTCAGTGAAGGGAAGGTTCACTA TCTCCCGCGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACTCTCTGCGGGCCGAGGATACCGCGGTGTACTATTGCGCCAAGATGGGTTGGTCCAGCGGATACTTGGGAGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACTACTGTGACCGTGTCTCCGGGGGTGGCGGATCGGGAGGCGGCGGCTCGGTTGGAGGGGTTCCGAAATCGTGTGACCCAGTACCAGGAAACCCTCTCGCTGTCCCGGGGAGAAGCGGCT

		ACACTGTCATGTAGAGCGTCCCAGTCCGTGGCTTCTCGTTCCTGGCCTGGT ACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCACCCCGCTGCTCATCTACGGAGCCAGCGG CCGGGCGACCCGGCATCCCTGACCGCTTCTCCGGTCCGGCTCGGGCACCGAC TTTACTCTGACCATTAGCAGGCTTGAGCCCGAGGATTTTGCCGTGTACTACT GCCAACACTACGGGGGAGCCCTCGCCTGACCTTCGGAGCGGAACTAAGGT CGATATCAAAA
BCMA EBB - C1978-G4- aa VH	352	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKMGWSSG YLGAFDIWGQGTITVTVSS
BCMA EBB - C1978-G4- aa VL	353	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGS <del>PRLT</del> FGGGT KVDIK
BCMA EBB - C1978-G4- aa 全长 CART	354	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGAFDIWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIY GASGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGS <del>PRLT</del> FGG GTKVDIKTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFVRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEDVLDKDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGDL YQLSTATKDTYDALHMQALPPR
[0915] BCMA EBB - C1978-G4- nt 全长 CART	355	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTTCTCTGCTCCACG CCGCTCGGCCCGAAGTCCAACCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGGCTCGTGCAGCC CGGAGGCAGCCTTCGGCTGTCGTGCGCCCGCTCCGGGTTACGTTCTCATCC TACGCGATGTCGTGGTTCAGACAGGCACCAGAAAGGGACTGGAATGGGTGT CCGCCATTAGCGGCTCCGGCGGTAGCACCTACTATGCCGACTCAGTGAAGGG AAGGTTCACTATCTCCCGCACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTCCAAATG AACTCTCTGCGGGCCGAGGATACCGCGGTGTACTATTGCGCCAAGATGGGT GGTCCAGCGGATACTTGGGAGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACTAGT GACCGTGTCTCCGGGGTGGCGGATCGGGAGGCGCGGCTCGGGTGGAGGG GGTCCGAAATCGTGTGACCCAGTCACCGGGAACCTCTCGCTGTCCCCGG GAGAACGGGCTACACTGTCATGTAGAGCGTCCCAGTCCGTGGCTTCTCGT CCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCACCCCGCTGCTCATCTAC GGAGCCAGCGCCGGGCGACCGGCATCCCTGACCGCTTCTCCGGTTCGGCT CGGGCACCGACTTTACTCTGACCATTAGCAGGCTTGAGCCCAGGATTTTGC CGTGTACTACTGCCAACACTACGGGGGAGCCCTCGCTGACCTTCGGAGGC GGAACAAAGGTCGATATCAAACCCTACCCAGCACCAGGACCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTCGCTCCGGAGGCATGTAG ACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT ATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTTAC TCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGT TCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAAT TCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAAACCAGCTCTA CAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGG AGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGG CCCTGCCGCTCGG

[0916] 本发明的实施方案

[0917] 1. 一种富集或制备适用于CAR治疗的免疫效应细胞 (例如细胞群体) 的方法, 包括根据以下一个、两个、三个、四个、五个或更多 (全部) 获取 (例如, 获得或收获) 免疫效应细胞:

[0918] (i) 从受试者 (例如血液学癌症患者) 获取免疫效应细胞的时机;

[0919] (ii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机;

[0920] (iii) 化疗的类型;

[0921] (iv) 潜在的恶性肿瘤;

[0922] (v) 免疫效应细胞 (例如T细胞) 参数, 例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一

个或多个，

[0923] 或者 (i) - (v) 中的两个、三个、四个或五个的组合，

[0924] 从而富集或制备适用于CAR治疗的免疫效应细胞。

[0925] 2. 包含表达CAR分子的免疫效应细胞 (“CAR表达细胞”) (例如细胞群体) 的组合物，用于与化疗联合来治疗患有血液学癌症的受试者或向其提供抗肿瘤免疫，其中通过优化以下一个、两个、三个、四个或更多 (全部)，从受试者获取 (例如获得或收获) 免疫效应细胞：

[0926] (i) 从受试者 (例如血液学癌症患者) 获取免疫效应细胞的时机；

[0927] (ii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机；

[0928] (iii) 化疗的类型；

[0929] (iv) 潜在的恶性肿瘤；

[0930] (v) 免疫效应细胞 (例如T细胞) 参数，例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一个或多个，

[0931] 或者 (i) - (v) 中的两个、三个、四个或五个的组合，

[0932] (任选地)，其中在引入CAR分子之前从受试者获取免疫效应细胞。

[0933] 3. 一种治疗患有血液学癌症的受试者或向其提供抗肿瘤免疫的方法，所述方法包括联合化疗向所述受试者施用有效量的表达CAR分子的免疫效应细胞 (“CAR表达细胞”或“CAR治疗”) (例如细胞群体)，其中通过优化以下一个、两个、三个、四个或更多 (全部)，从受试者获取 (例如获得或收获) 免疫效应细胞：

[0934] (i) 从受试者 (例如血液学癌症患者) 获取免疫效应细胞的时机；

[0935] (ii) 与免疫效应细胞获取相关的化疗的时机；

[0936] (iii) 化疗的类型；

[0937] (iv) 潜在的恶性肿瘤；

[0938] (v) 免疫效应细胞 (例如T细胞) 参数，例如T细胞数、T细胞表型或T细胞功能中的一个或多个，

[0939] 或者 (i) - (v) 中的两个、三个、四个或五个的组合，

[0940] (任选地)，其中在引入CAR分子之前从受试者获取免疫效应细胞，

[0941] 从而治疗血液学癌症或向血液学癌症提供抗肿瘤免疫。

[0942] 4. 如实施方案1-3中任一项所述的方法，其中当 (i) - (v) 中的任一个被优化时，免疫效应细胞群体显示以下一种或多种的增加：免疫细胞群体的离体扩增，免疫细胞群体对治疗的功效或免疫细胞群体的产率。

[0943] 5. 如实施方案2-4中任一项所述的方法，其中CAR表达细胞包含编码CAR的核酸，例如本文所述的CAR分子，例如本文所述的CD19 CAR (例如CTL019)。

[0944] 6. 如实施方案2-5中任一项所述的方法，还包括向免疫效应细胞群体中引入编码CAR的核酸，例如本文所述的CAR分子，例如本文所述的CD19 CAR (例如CTL019)。

[0945] 7. 如实施方案5或6所述的方法，其中CAR分子包含根据表1或表4的序列。

[0946] 8. 如实施方案1-7中任一项所述的方法，其中从其获得免疫细胞的受试者和/或待治疗的受试者是人癌症患者。

[0947] 9. 如实施方案8所述的方法，其中受试者是年龄18岁的年轻人 (例如18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1岁或更小)。

- [0948] 10. 如实施方案8所述的方法,其中受试者年龄大于18岁。
- [0949] 11. 如实施方案1-10中任一项所述的方法,其中受试者患有与肿瘤或癌症相关抗原表达相关的疾病。
- [0950] 12. 如实施方案1-11中任一项所述的方法,其中血液学癌症选自以下一种或多种: B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞早幼粒细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴细胞增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、浆细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤和瓦尔登氏巨球蛋白血症。
- [0951] 13. 如实施方案1-11中任一项所述的方法,其中血液学癌症是白血病,例如CLL、ALL或淋巴瘤,例如MCL、NHL或HL。
- [0952] 14. 如实施方案1-9或11-13中任一项所述的方法,其中受试者患有白血病,并且是儿科患者如年龄为18岁的年轻人。
- [0953] 15. 如实施方案1-14中任一项所述的方法,其中受试者被分类为具有标准风险、高风险或非常高风险的ALL。
- [0954] 16. 如实施方案1-14中任一项所述的方法,其中受试者不患有淋巴瘤,例如受试者不患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)。
- [0955] 17. 如实施方案1-16中任一项所述的方法,其中受试者不患有复发的癌症。
- [0956] 18. 如实施方案1-17中任一项所述的方法,其中免疫效应细胞群体获取发生在向受试者施用化疗之前。
- [0957] 19. 如实施方案1-17中任一项所述的方法,其中免疫效应细胞群体获取发生在受试者已经经历了2、3、4或5个化疗周期之前。
- [0958] 20. 如实施方案1-17中任一项所述的方法,其中免疫效应细胞群体获取发生在受试者已经经历1个化疗周期之后,但是在受试者已经经历多于1个化疗周期之前(例如,多于1、2、3、4或5个周期)。
- [0959] 21. 如实施方案1-20中任一项所述的方法,其中化疗或化疗周期包括诱导、巩固、临时维持、延迟增强或维持治疗周期中的一个或多个。
- [0960] 22. 如实施方案21所述的方法,其中在受试者经历化疗的巩固周期或化疗的诱导周期之前,从受试者获取免疫效应细胞群体。
- [0961] 23. 如实施方案21所述的方法,其中在受试者经历化疗的巩固周期之前从受试者获取免疫效应细胞群体。
- [0962] 24. 如实施方案21所述的方法,其中受试者被分类为具有高风险或非常高风险的癌症(例如,ALL),并且在受试者经历巩固周期之前收获所述细胞。
- [0963] 25. 如实施方案21所述的方法,其中在受试者经历延迟增强周期之前从受试者获取免疫效应细胞群体。
- [0964] 26. 如实施方案21所述的方法,其中受试者被分类为具有高风险或非常高风险的癌症(例如,ALL),并且在受试者经历延迟增强周期之前收获所述细胞。

- [0965] 27. 如实施方案1-26中任一项所述的方法,其中从表8选择一种或多种化疗周期或药物。
- [0966] 28. 如实施方案1-27中任一项所述的方法,其中化疗包括表8中所述的药物和给药方案。
- [0967] 29. 如实施方案1-27中任一项所述的方法,其中化疗包括长春新碱、地塞米松、PEG-L-天冬酰胺酶、柔红霉素、6-巯嘌呤、环磷酰胺、阿糖胞苷、甲氨蝶呤、多柔比星、6-硫鸟嘌呤和/或泼尼松。
- [0968] 30. 如实施方案1-27中任一项所述的方法,其中免疫效应细胞群体是在受试者已经施用环磷酰胺和/或阿糖胞苷之前从受试者获取的。
- [0969] 31. 如实施方案1-30中任一项所述的方法,所获取的免疫效应细胞群体包含较高数量的较低分化的T细胞,例如较高数量的一种或多种的:幼稚T细胞、干中央记忆T细胞和/或中央记忆T细胞,例如与参考值(例如,在稍后时间点或在暴露于另外轮次化疗之后来自受试者的样品)相比较。
- [0970] 32. 如实施方案231所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体包括至少20%幼稚T细胞、至少2%干中央记忆T细胞和/或至少4%中央记忆T细胞。
- [0971] 33. 如实施方案31或32所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体包括至少50%的中央记忆T细胞。
- [0972] 34. 如实施方案31或32所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体包括小于55%的效应记忆和末端效应T细胞的组合。
- [0973] 35. 如实施方案31所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体与参考值(例如,在稍后的时间点或在暴露于另外轮次化疗之后来自所述受试者的样品)显示增加的绝对T细胞计数(ATC)。
- [0974] 36. 如实施方案31所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体包含至少400个细胞/微升的绝对T细胞计数,至少200个细胞/微升的绝对幼稚T细胞计数,至少20个细胞/微升的绝对干中央记忆T细胞计数,和/或至少40个细胞/微升的绝对中央记忆T细胞计数。
- [0975] 37. 如实施方案1-36中任一项所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体是基于一种或多种标志物例如CCR7、CD62L、CD45RO和CD95的表达来选择的,例如免疫效应细胞(例如T细胞)群体是CCR7+和CD62L+。
- [0976] 38. 如实施方案32所述的方法,其中幼稚T细胞是基于CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95-的表达模式来鉴定,其中干中央记忆T细胞是基于CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95+的表达模式来鉴定,并且其中中央记忆T细胞是基于CCR7+、CD62L+、CD45RO+、CD95+的表达模式来鉴定的。
- [0977] 39. 如实施方案1-38中任一项所述的方法,其中免疫细胞群体是从患有血液学癌症例如白血病例如CLL、ALL或淋巴瘤例如MCL、NHL或者HL的受试者获得的。
- [0978] 40. 如实施方案1-39中任一项所述的方法,所述方法还包括从所获取的免疫细胞群体中移除T调节细胞,例如CD25+ T细胞,从而提供T调节消耗细胞群体,例如CD25+消耗细胞。
- [0979] 41. 如实施方案40所述的方法,其中T调节消耗细胞群体含有小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0980] 42. 如实施方案1-41中任一项所述的方法,其中所获取的免疫效应细胞群体是患有癌症的受试者的细胞,例如患有表达CD25的癌症例如慢性淋巴细胞白血病(CLL)的受试者。

[0981] 43. 如实施方案41所述的方法,其中T调节消耗细胞群体含有小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞。

[0982] 44. 如实施方案40所述的方法,其中使用抗CD25抗体或其片段从所获取的免疫效应细胞群体中移除T调节细胞,例如CD25+ T细胞。

[0983] 45. 如实施方案44所述的方法,其中将抗CD25抗体或其片段缀合至底物,例如珠。

[0984] 46. 如实施方案43所述的方法,其中T调节消耗细胞群体含有小于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%白血病细胞,例如CLL细胞、ALL细胞或淋巴瘤细胞,例如MCL细胞、HL细胞。

[0985] 47. 如实施方案43所述的方法,其中T调节消耗细胞群体含有小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0986] 48. 如实施方案43所述的方法,其中T调节消耗细胞群体含有小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞和小于10%、5%、4%、3%、2%、1%的肿瘤细胞,例如CLL细胞。

[0987] 49. 如实施方案1至48中任一项所述的方法,还包括:

[0988] 从获取的表达肿瘤抗原(例如不包括CD25的肿瘤抗原,例如CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14或CD11b)的免疫效应细胞群体中除去细胞,从而提供T调节消耗(例如CD25+消耗)和适于表达CAR(例如本文所述的CAR)的肿瘤抗原消耗细胞的群体。

[0989] 50. 如实施方案1-48中任一项所述的方法,还包括从所获取的免疫效应细胞群体中去除细胞,所述免疫效应细胞群体表达检查点抑制物,例如本文所述的检查点抑制物,例如PD1+细胞、LAG3+细胞和TIM3+细胞中的一种或多种,从而提供T调节消耗细胞(例如CD25+消耗细胞)和检查点抑制物消耗细胞(例如PD1+、LAG3+和/或TIM3+消耗细胞)的群体。

[0990] 51. 如实施方案1至48中任一项所述的方法,其中基于一种或多种标志物例如CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和CD45RO的表达来选择所获取的免疫效应细胞群体,例如所提供的免疫效应细胞群体(例如T细胞)是CD3+和/或CD28+。

[0991] 52. 如前述实施方案中任一项所述的方法,还包括:激活T调节消耗细胞群体,例如CD25+消耗细胞。

[0992] 53. 如前述实施方案中任一项所述的方法,还包括:用包含编码CAR(例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR)的核酸的载体转导来自免疫效应细胞群体的细胞。

[0993] 54. 如实施方案53所述的方法,还包括例如通过本文所述的方法扩增免疫效应细胞群体,例如工程化以表达CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR。

[0994] 55. 如前述实施方案中任一项所述的方法,还包括:使用包含编码CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR的核酸的载体,转导来自T调节消耗细胞群体的细胞,例如CD25+消耗细胞群体的细胞。

[0995] 56. 如实施方案55所述的方法,还包括例如通过本文所述的方法扩增T调节消耗细胞的群体,例如工程化以表达CAR,例如本文所述的CAR,例如本文所述的CD19 CAR。

- [0996] 57. 如实施方案54或56所述的方法,其中细胞群体扩增8天或更少,例如7、6或5天。
- [0997] 58. 如实施方案54或56所述的方法,其中细胞群体在培养物中扩增5天,并且所得细胞比在培养物中在相同培养条件下扩增9天的相同细胞更有效。
- [0998] 59. 如实施方案58所述的方法,其中与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞相比,扩增5天的细胞显示在抗原刺激时细胞倍增增加至少1、2、3或4倍。
- [0999] 60. 如实施方案58所述的方法,其中细胞在培养物中扩增5天,并且所得细胞比在培养物中在相同培养条件下扩增9天的相同细胞表现出更高的促炎细胞因子产生,例如更高的IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平。
- [1000] 61. 如实施方案54或56所述的方法,其中通过在刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激细胞表面上的共刺激分子的配体存在下培养细胞来扩增细胞群体,例如如本文所述,在一个实施方案中,所述试剂是与抗CD3抗体或其片段和/或抗CD28抗体或其片段缀合的珠。
- [1001] 62. 如实施方案54-61-55中任一项所述的方法,其中细胞群体在包括一种或多种导致在14天扩增期间细胞增加至少200倍(例如,200倍、250倍、300倍、350倍)的白细胞介素的适当培养基(例如本文所述的培养基)中扩增,例如通过本文所述的方法如流式细胞术测量。
- [1002] 63. 如实施方案62所述的方法,其中细胞群体在细胞因子例如IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)的存在下扩增。
- [1003] 64. 如实施方案54-63中任一项所述的方法,其中细胞群体在扩增期间后冷冻保存。
- [1004] 65. 如前述实施方案中任一项所述的方法,还包括使免疫效应细胞群体与编码端粒酶亚基例如hTERT的核酸接触。
- [1005] 66. 一种免疫细胞制备物或反应混合物,例如根据本文所述的任何方法制备的包含免疫效应细胞群体(例如包含CAR分子或编码CAR分子的核酸)。
- [1006] 67. 如实施方案66的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其选自:
- [1007] (i) 免疫效应细胞群体,包含至少20%幼稚T细胞,至少2%干中央记忆T细胞和/或至少4%中央记忆T细胞,和/或
- [1008] (ii) 免疫效应细胞群体,包含至少400个细胞/微升的绝对T细胞计数,至少200个细胞/微升的绝对幼稚T细胞计数,至少20个细胞/微升的绝对干中央记忆T细胞计数,和/或至少40个细胞/微升的绝对中央记忆T细胞计数。
- [1009] 68. 如实施方案66所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其基于一种或多种标志物例如CCR7、CD62L、CD45R0和CD95的表达来选择,例如免疫效应细胞群体(例如T细胞)是CCR7<sup>+</sup>和CD62L<sup>+</sup>。
- [1010] 69. 如实施方案67所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其中幼稚T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45R0<sup>-</sup>、CD95<sup>-</sup>的表达模式鉴定,其中干中央记忆T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45R0<sup>-</sup>、CD95<sup>+</sup>的表达模式鉴定,并且其中中央记忆T细胞是基于CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45R0<sup>+</sup>、CD95<sup>+</sup>的表达模式鉴定。
- [1011] 70. 如实施方案67-69中任一项所述的免疫效应细胞制备物(例如反应混合物),其包含编码CAR的核酸,例如本文所述的CAR。

## 实施例

[1012] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。这些实施例仅是为了说明的目的而提供的,除非另有说明,否则不是限制性的。因此,本发明绝不应被解释为限于以下实施例,而应理解为包括由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有的变型。

### [1013] 实施例1:用外源性细胞因子优化CAR-T生产

[1014] 细胞因子具有与T细胞扩增、分化、存活和内稳态相关的重要功能。临床使用的最重要的细胞因子家族之一是常见的 $\gamma$ 链( $\gamma$ c)家族细胞因子,其包括白介素(IL)-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21(Liao等人,2013,Immunity,38:13-25)。IL-2作为癌症的免疫治疗剂被广泛研究。临床试验中IL-2的补充增强了抗CD19 CAR-T细胞的抗肿瘤能力(Xu等人,2013,Lymphoma,54:255-60)。然而,IL-2的施用受到副作用和调节性T细胞扩增倾向以及活化的诱导的细胞死亡(AICD)的影响的限制(Malek等人,2010,Immunity,33:153-65;和Lenardo等人,1999,Annu Rev Immunol,17:221-53)。IL-7,IL-15和IL-21各自可以提高过继性免疫疗法的有效性,并且与IL-2相比似乎毒性较低(Alves等人,2007,Immunol Lett,108:113-20)。尽管对上述细胞因子的作用进行了广泛的临床前和临床研究,但是缺乏对多种外源 $\gamma$ c细胞因子对CAR-T细胞过继疗法的作用的多参数比较研究。

[1015] 除了 $\gamma$ -链细胞因子外,IL-18是调节免疫应答的另一种免疫刺激细胞因子,其增强T细胞的IFN- $\gamma$ 产生,增加CTL的细胞溶解活性(Srivastava等人,2010,Curr Med Chem,17:3353-7)。即使剂量高达1000 $\mu$ g/kg,IL-18的施用也是安全和良好耐受的(Robertson等人,2006,Clin Cancer Res,12:4265-73)。因此,IL-18可能是用于增强CAR-T细胞抗肿瘤活性的另一种候选物。

[1016] 在该实施例中,检查了不同外源细胞因子的施用对T细胞和叶酸受体 $\alpha$ (FR $\alpha$ ) CART细胞的扩增,表型,体外效应子功能和体内抗肿瘤功效的影响。

[1017] 在本实施例中描述的实验中使用以下材料和方法。

### [1018] CAR构建和慢病毒制备

[1019] pELNS-C4-27z CAR载体如前所述构建(评审中的手稿)。简言之,将含有抗FR $\alpha$  C4/AFRA4scFv的pHEN2质粒用作C4片段的PCR扩增模板,使用引物5'-ataggatcccagctggtggagtctgggggagggc-3'(SEQ ID NO:3)和5'-atagcttagcacctaggacggctcagcttggtccc-3'(SEQ ID NO:4)(BamHI和NheI加下划线)。PCR产物和第三代自灭活慢病毒表达载体pELNS用BamHI和NheI消化。然后将消化的PCR产物插入含有CD27-CD3z T细胞信号结构域的pELNS载体,该载体中延伸因子-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )启动子驱动转基因的表达。

[1020] 通过使用如前所述的Express In(Open Biosystems),用四种质粒(pVSV-G、pRSV.REV、pMDLg/p.RRE和pELNS-C4-27z CAR)转染人胚胎肾细胞系293T(293T)细胞产生高滴度复制缺陷型慢病毒。转染后24h和48h收集上清液,并通过超速离心浓缩。通过使用有限稀释法,基于慢病毒向SupT1细胞的转导效率确定病毒滴度。

### [1021] T细胞和细胞系

[1022] 根据美国宾夕法尼亚大学的大学机构审查委员会批准的方案在知情同意后,从健康供体获得外周血淋巴细胞。通过阴性选择纯化后,原代T细胞购自人类免疫学核心(Human Immunology Core)。将T细胞在完全培养基(补充有10%FBS,100U/mL青霉素,100 $\mu$ g/mL硫酸链霉素的RPMI 1640)中培养,并用1:1比例的抗CD3和抗CD28 mAb包被的珠(Invitrogen)按

照说明书刺激。活化后24小时,细胞用慢病毒以5的M01转导。从第二天向转导的T细胞中加入终浓度为10ng/mL的所示细胞因子。细胞因子每3天更换一次。

[1023] 用于慢病毒包装的293T细胞和用于慢病毒滴定的SupT1细胞从ATCC获得。将已建立的卵巢癌细胞系SKOV3 (FR $\alpha$ +) 和C30 (FR $\alpha$ -) 用作细胞因子分泌和细胞毒性测定的靶细胞。对于生物发光测定,用慢病毒转导SKOV3以表达萤火虫萤光素酶 (fLuc)。

[1024] 流式细胞分析和细胞分选

[1025] 在BD FACSCanto上进行流式细胞术。抗人CD45 (HI30)、CD3 (HIT3a)、CD8 (HIT8a)、CD45RA (HI100)、CD62L (DREG-56)、CCR7 (G043H7)、IL-7R $\alpha$  (A019D5)、CD27 (M-T271)、CD28 (CD28.2)、CD95 (DX2)、TNF- $\alpha$  (MAb11)、IFN- $\gamma$  (4S.B3)、IL-2 (MQ1-17H12)、穿孔素 (B-D48)、粒酶-B (GB11) 从Biolegend获得。生物素-SP缀合的兔抗人IgG (H+L) 购自Jackson Immunoresearch, APC缀合的链霉抗生物素蛋白购自Biolegend。抗人Bcl-x1 (7B2.5) 购自SouthernBiotech。细胞凋亡试剂盒和TruCount管从BD Bioscience获得。对于外周血T细胞计数,通过眶后取血获得血液,并染色确定人CD45, CD3, CD4和CD8 T细胞的存在。按照制造商的说明书,用TruCount管定量人CD45+门控的, CD3+, CD4+和CD8+亚组。

[1026] 过继细胞疗法的体内研究

[1027] 从宾夕法尼亚大学艾布拉姆森癌症中心的干细胞和异种移植中心 (Stem Cell and Xenograft Core of the Abramson Cancer Center, University of Pennsylvania) 获得8至12周龄的雌性非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷/ $\gamma$ 链<sup>-/-</sup> (NSG) 小鼠。在第0天将小鼠肋皮下接种 $3 \times 10^6$ 个fLuc<sup>+</sup>SKOV3细胞。在治疗前,每组4只或5只小鼠随机分组。肿瘤变得可触知后,如前所述活化并转导人原代T细胞。T细胞在IL-2 (5ng/mL) 存在下扩增约2周。当肿瘤负荷为 $\sim 250-300\text{mm}^3$ ,向小鼠静脉内注射 $5 \times 10^6$ 个CAR-T细胞或100 $\mu$ l盐水,然后每日腹腔内注射5 $\mu$ g IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21或磷酸缓冲溶液 (PBS) 7天。用卡尺测量肿瘤尺寸,用下列公式计算肿瘤体积:肿瘤体积 = (长 $\times$ 宽<sup>2</sup>)/2。眶后取血后通过流式细胞术测定受体小鼠血液中转移的T细胞的数量和表型。当肿瘤体积大于2000 $\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死,并立即切除肿瘤进行进一步分析。

[1028] 统计分析

[1029] 使用Prism 5 (GraphPad软件) 和IBM SPSS Statistics 20.0软件进行统计分析。除非明确指出,数据显示为平均值 $\pm$ SEM。配对样品t检验或非参数Wilcoxon秩检验用于比较两组,并使用重复测量ANOVA或Friedman检验来检验三组或更多组之间差异的统计学显著性。当P值小于0.05时,结果被认为是统计学显著的。

[1030] 结果

[1031] 1. 抗FR $\alpha$  C4 CAR的构建和表达

[1032] pELNS-C4-27z CAR包含与CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜区连接的抗FR $\alpha$ C4 scFv,接着是与CD27细胞内信号传导基序串联的CD3 $\zeta$ 信号传导部分 (图1A)。原代人T细胞用C4 CAR慢病毒载体有效转导,在转导后48h检测到转导效率为43% $\sim$ 65%。CAR表达水平在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞之间是相当的 ( $52.6 \pm 10.2\%$  vs.  $49.5 \pm 17.1\%$ ,  $P=0.713$ )。

[1033] 2. 细胞因子对CAR转导的T (CAR-T) 细胞扩增的影响

[1034] 研究了各种 $\gamma$ c细胞因子和IL-18存在下,CAR-T细胞的扩增和积累。在暴露于培养物中不同细胞因子三周后,已经在IL2、IL-7或IL-5存在下培养的CAR-T细胞扩增了1000-

2000倍。在IL-18、IL-21或NC(对照,无细胞因子)存在下培养的CAR-T细胞显示少于200倍的扩增(图1B)。

[1035] 分析了导致CAR-T细胞较高积累的原因,特别地,评估了T细胞的增殖和凋亡。通过监测培养7天的CFSE标记的T细胞的细胞分裂来测量增殖反应。如图1C所示,用IL-2和IL-15培养的T细胞显示出最高的增殖能力,其次是IL-7;而IL-21和IL-18是不太有效的促有丝分裂刺激物。使用Annexin-V染色测试在不同细胞因子中培养的T细胞的凋亡。结果表明,与NC、IL-18和IL-21组相比,用IL-2、IL-7和IL-15培养的T细胞经历较少凋亡(图1D)。这些结果表明,在细胞因子例如IL-2、IL-7或IL-15的存在下扩增的T细胞的增加的积累可能由增殖增加和例如通过Bcl-x1抗凋亡途径的活化引起的凋亡减少这两者所造成。

[1036] 3. 细胞因子对CAR-T细胞表型的影响

[1037] 接下来,检查在存在外源性细胞因子的情况下扩增的CAR-T细胞的表型。来自健康供体的新鲜T细胞通常基于CD45RA和CD62L表达分为四个亚组:1) 幼稚T细胞(CD45RA+CD62L+,称为Tn),2) 中央记忆T细胞(CD45RA-CD62L+,称作Tcm),3) 效应记忆T细胞(CD45RA-CD62L-,称为Tem)和4) CD45RA阳性效应T细胞(CD45RA+CD62L-,简称Temra)。然后进一步评估每个亚组CCR7、CD27、CD28和CD95的表达。在慢病毒转导后CD95表达显著上调。后三种T细胞亚群对CD95阳性,而仅有一小部分Tn表达CD95(CD4+中为 $3.6 \pm 1.4\%$ ,CD8+T细胞中为 $3.7 \pm 1.3\%$ )。这个小群体也共表达CD27、CD28和CCR7,被认为是记忆干细胞(Tscm)。然而,在用CAR进行慢病毒转导前后用抗CD3/CD28珠刺激后,CD95在该群体中极大地上调到接近100%(图2A)。与新鲜T细胞相比,在CD4+和CD8+T和CAR-T细胞中抗CD3/CD28珠刺激后,CD45RA+CD62L+CD95+T细胞的百分比大大增加(图2B和2C)。该群体同时高水平表达CD27、CD28和CCR7,表明其可以定义为Tscm。此外,CD8+CAR-T细胞具有较高百分比的Tscm细胞,这可能与起始的CD8+T细胞中Tn的较高比例有关(图2D)。

[1038] 与各种细胞因子共培养后14天,通过测量CD45RA、CD62L和CD95的表达来研究CAR-T细胞的T细胞亚群的比例。在CD4+CAR-T细胞中,与IL-2组相比,IL-7组中存在显著较高百分比的Tscm细胞,而无细胞因子(NC)和IL-18组存在较低百分比的Tscm,但较高百分比的Tcm。IL-15组中T细胞亚群的分布与IL-2组相似,而IL-21组呈现Tcm百分比较高,而Tscm百分比与IL-2组相当。对于每个细胞因子施用组的四种T细胞亚群的分化和分布,CD8+CAR-T细胞表现出与CD4+CAR-T细胞相似的趋势,CD8+CAR-T细胞的相应组中与CD4+CAR-T细胞相比,Tscm的比例较高。

[1039] 进一步研究了各种CAR-T细胞亚群自我更新和分化成其他细胞类型的能力。基于CAR、CD45RA和CD62L表达对CAR-T细胞的四个亚组进行分选,并在含有IL-2的培养基中分别培养3天。如图2E所示,Tscm亚组能够分化为所有其他三个亚组,Tcm和Temra亚组能够分化为Tem。这些结果表明CD62L+和CD45RA+T细胞能分别分化成CD62L和CD45RA-T细胞。通过CFSE稀释法评估四个亚组的增殖能力,然后进行比较。结果表明,Tscm表现出比其他亚组更强的增殖能力(图2F)。此外,CD45RA表达与CFSE强度呈负相关,而CD62L和CCR7表达与增殖直接相关。在所有细胞因子组中,CD45RA+T细胞表现出比CD45RA-和阴性T细胞低得多的CFSE水平(图3A-3B),表明CD45RA+T细胞具有比CD45RA-T细胞更强的增殖活性。因此,在IL-2、IL-7和IL-15存在下生长的T细胞的增加的积累可能与CD45RA+T细胞(其增殖能力增加)的增加了的比例有关(图4)。

[1040] 对于CAR-T细胞的表型, CAR-T细胞表现出较低的CD45RA、CD62L、CD27和CD28的表达,但在T细胞表面上CCR7的表达较高。基于以下表面标志物:CD27、CD28、CD62L、CCR7和IL7R $\alpha$ 的表达,进一步评估细胞因子对CAR-T细胞表型的影响。在IL-18存在下生长的CAR-T细胞与不补充细胞因子而生长的细胞呈非常相似的表达模式。与NC对照相比,IL-2显著下调CD27、CD28、CD62L、CCR7和IL7R $\alpha$ 的表达。其他 $\gamma$ c细胞因子中,与IL-2暴露的CAR-T细胞相比,IL-7暴露的CAR-T细胞呈现更高的CD62L、CD27和CD28表达,但显著降低的CCR7表达;IL-15组CAR-T细胞呈现更高的CD27和CD28表达;IL-21暴露的CAR-T细胞呈现更高的CD62L、CCR7、CD27和CD28表达,表明IL-2暴露诱导具有比所有其他组更成熟的T细胞表型的T细胞亚群的扩增(图4)。

[1041] 4. 细胞因子对CAR-T细胞效应子功能的影响

[1042] 为了研究细胞因子对CAR-T细胞效应子功能的影响,评估了用表达FR $\alpha$ 的SKOV3细胞刺激后CAR-T细胞的细胞因子产生能力。刺激5小时后,在CAR-T细胞的胞质中可检测到TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2,其中41.5-54.0%的CAR-T细胞产生TNF- $\alpha$ 、12.4-15.3%的CAR-T细胞产生IFN $\gamma$ ,4.3-6.5%的CAR-T细胞产生IL-2(图5A-5C)。在扩增期间IL-2、IL-7和IL-15暴露促进CAR-T细胞产生TNF- $\alpha$ ,而产生IFN- $\gamma$ 和IL-2的CAR-T细胞数目在所有细胞因子组中相当(图5A、5B、和5C)。接下来,比较响应CAR-T细胞的分数及其多功能性。与扩增期间暴露于IL-2相比,在扩增期间暴露于IL-18、IL-21或无细胞因子暴露诱导了较少的产生细胞因子的CAR-T细胞,而较少的CAR-T细胞具有被靶细胞刺激时产生多种细胞因子的能力。这些结果与如下表型一致:IL-18、IL-21和NC组中的CAR-T细胞比IL-2暴露组中的CAR-T细胞分化程度低。

[1043] 然后,确定扩增期间细胞因子暴露对抗原刺激后细胞溶解分子穿孔素和粒酶B的表达的影响。与TNF- $\alpha$ 生产类似,暴露于IL-2、IL-7和IL-15的CAR-T细胞与暴露于NC、IL-18和IL-21的CAR-T细胞相比,表现出增加的穿孔素表达。然而,尽管暴露于IL-21的CAR-T细胞产生较少的TNF- $\alpha$ 和穿孔素,但它们产生最高水平的粒酶-B。在扩增期间暴露于IL-2和IL-15的CAR-T细胞中观察到下一个最高水平的粒酶-B产生。IL-18组中的CAR-T细胞在抗原刺激后呈现最少量的穿孔素和粒酶-B表达。

[1044] 最后,通过萤光素酶测定法定量暴露于多种细胞因子的CAR-T细胞在暴露期间的肿瘤裂解活性。如图5D所示,与IL-2和IL-15共培养的CAR-T细胞比与NC和IL-18共培养的那些CAR-T细胞更有效地裂解SKOV3(这两者都 $P < 0.05$ )。

[1045] CAR-T细胞表型与其功能之间的关联被进一步证实。在基于CAR和CD62L表达的慢病毒转导后14天分选T细胞。与CD62L-CAR-T细胞(Tem和Temra)相比,CD62L+CAR-T细胞(Tscm和Tcm)表现出较少的细胞因子产生活性和较弱的细胞溶解能力(图6A-6C)。在这个角度来看,暴露于IL-2和IL-15的CAR-T细胞产生更多的细胞因子并呈现更强的肿瘤裂解活性,这可能部分归因于这些组中Tem和Temra的较高比例。

[1046] 5. 抗原攻击后CAR-T细胞的扩增和表型

[1047] 为了研究细胞因子对特定抗原攻击下CAR-T细胞扩增的影响,将暴露于IL-2两周的CAR-T细胞与SKOV3(FR $\alpha$ +)或C30(FR $\alpha$ -)细胞在指示的细胞因子存在下共培养7天。类似于无抗原的情况,暴露于IL-2、IL-7和IL-15的CAR-T细胞比暴露于其它细胞因子的CAR-T细胞呈现更高倍数的扩增。在扩增期间暴露于IL-21的CAR-T细胞更可能经历细胞凋亡。然而,当

暴露于指定的细胞因子两周的CAR-T细胞与SKOV3或C30细胞在没有另外的细胞因子补充情况下共同培养7天时,所有组中CAR-T细胞的积累是相当的,暴露于IL-15和IL-18的那些细胞经历最少量的凋亡(图7A)。也分析CAR-T细胞的表型。对于记忆T细胞的四个亚组,结果不同于无抗原研究:Tscm是罕见的,并且Tem在无细胞因子、IL-18和IL-21的所有组中都占50%以上。细胞因子对记忆T亚组的组成没有显著影响,IL-7暴露不利于Tscm的增加(图7B)。

#### [1048] 6. 在动物模型中各种细胞因子的抗肿瘤功效

[1049] 为了评估CAR-T细胞的离体(ex vivo)扩增过程中各种细胞因子对体内CAR-T细胞功效的影响,采用NSG小鼠卵巢癌异种移植模型研究了CAR-T细胞的持续性及其结果。用两次剂量的 $5 \times 10^6$  C4-27z CAR-T细胞静脉内注射带有皮下SKOV3肿瘤的小鼠,所述CAR-T细胞之前已经离体暴露于指定的细胞因子2周。与注射未转染的T细胞和抗CD19 CAR-T细胞的那些小鼠相比,接受C4-27z CAR-T细胞输注的所有小鼠呈现较少的肿瘤负担(图8A)。在各种细胞因子组中,接受先前IL-2暴露的CAR-T细胞的小鼠显示出最高的肿瘤负担,与这些小鼠中循环的人T细胞的最少量一致。NC、IL-7、IL-15、IL-18和IL-21组中肿瘤均被显著抑制甚至消失,肿瘤大小无统计学差异。在过继转移后15天和32天确定外周血中转移的T细胞的持续性。接受IL-7和IL-21处理的CAR-T细胞的小鼠在第+15天在外周血中似乎具有比其他组更高量的人T细胞,而接受IL-2处理的CAR-T细胞的小鼠具有最低数目的人T细胞(图8B-8C)。对于不同的CAR-T细胞群体的百分比,与IL-2组相比,NC、IL-15、IL-18和IL-21暴露组均呈现较高的CD4+CAR-T细胞,而CD8+CAR-T细胞的百分比在所有组中是相当的。在T细胞表型中,CD62L、CD27和CD28仅在大约5-10%的T细胞上表达,并且在所有组中都是相当的,例外是IL-21组中的CD8+T细胞表达比IL-2和NC组中更高的CD28(这两者都 $P < 0.05$ )。在第+32天,除了IL-2组外,所有CAR-T细胞组中循环的人T细胞显著扩增,平均T细胞计数为14907个/ $\mu$ l至19651个/ $\mu$ l(而IL-2组中仅242个/ $\mu$ l)。虽然肿瘤消退,但是两只老鼠死亡。

#### [1050] 讨论

[1051] IL-2是用于过继性免疫疗法产生淋巴细胞的最常用的细胞因子。它促进T细胞的存活和扩增,增强T细胞的肿瘤杀伤能力。然而,IL-2的作用是受限的,因为它导致T细胞的活化诱导的细胞死亡(AICD)和调节性T细胞的发育(Malek等人,Immunity,2010,33:153-65;和Lenardo等人,Annu Rev Immunol,1999,17:221-53)。在这个实施例中,IL-2显著增加了CAR-T细胞的积累及其细胞毒性能力,但IL-2暴露的CAR-T细胞在过继转移后呈现较低的抗肿瘤免疫。这一发现证明了体外肿瘤裂解和体内肿瘤根除之间的反比关系。IL-2暴露的CAR-T细胞表现出相对成熟的表型,CD62L、CCR7、CD27和CD28的表达低,体内持久性较差(Yang等人,Cancer Immunol Immunother,2013,62:727-36)。最近的研究表明,较低分化的T细胞的过继转移与优良的肿瘤消退相关,这支持了IL-2暴露的CAR-T细胞比其他组更低效的发现(Gattinoni等人,Nat Med,2011,17:1290-7;和Markley等人,Blood,2010,115:3508-19)。

[1052] IL-15呈现与IL-2相似的刺激CAR-T细胞扩增和肿瘤裂解功能的表现,但诱导较少分化的表型(CD27和CD28的较高表达)。因此,IL-15支持在体内CAR-T细胞的持续性,并且在动物模型中显示出更好的抗肿瘤免疫。

[1053] 与IL-2和IL-15相比,IL-7显示出促进CAR-T细胞扩增的相似能力,但诱导更高水

平的CD62L表达,并且在无抗原环境中表现出最高比例的CAR-Tscm细胞。因此,与暴露于IL-2的CAR-T细胞相比,没有抗原攻击的IL-7的离体暴露增强了CAR-T细胞的抗肿瘤功效。由于在抗原攻击下CAR-T细胞的扩增较少,IL-7暴露的CAR-T细胞与IL-2暴露的CAR-T细胞相比没有导致更好的体内抗肿瘤功效并且功效弱于IL-15。

[1054] IL-21对CAR-T细胞的积累几乎没有影响,因为它不能例如通过促进Bcl-xL表达增强抗细胞凋亡能力。然而,即使在抗原攻击的情况下,IL-21也诱导较少分化的CAR-T细胞的扩增,具有高表达CD62L、CCR7、CD27和CD28的表型。因此,IL-21暴露的CAR-T细胞在体内的动物模型和IL-21注射中表现出最佳的持续性,并且在促进肿瘤根除方面表现出比除了IL-15之外的其它细胞因子组更好的功效。这些结果与先前发现一致:较少分化的CAR-T细胞与优异的肿瘤消退相关。

[1055] IL-18是属于IL-1家族的促炎细胞因子,其通过在体内激活单核细胞,NK细胞和T细胞以及产生IFN- $\gamma$ 以及其他细胞因子来调节先天和适应性免疫应答(Srivastava等人,Curr Med Chem,2010,17:3353-7)。本文提出的结果表明,IL-18在离体实验中对CAR-T细胞的扩增,表型和功能影响不大,因为IL-18组的大部分结果与NC组相似和相当。与对照(NC)组相比,IL-18促进了T细胞的少量增殖,并且在抗原攻击下维持更多的T细胞存活。体内研究表明,与没有细胞因子补充的小鼠相比,IL-18对CAR-T细胞功效没有显著影响。

[1056] 总之,这些实验的发现表明,尽管广泛使用,但离体用于CAR-T细胞扩增的IL-2补充物不是最佳策略。对于IL-18、IL-21或没有细胞因子补充物,尽管它们可能诱导相对有效的CAR-T细胞,但它们不足够有效地促进CAR-T细胞的扩增,使得可以制备足够的CAR-T细胞在有限的扩增时间内用于临床使用。因此,IL-15和IL-7可能是更好的CAR-T细胞扩增剂。此外,IL-7和IL-15补充物的组合指示产生Tscm,其有益于产生更多的“年轻”CAR-T细胞。关于体内细胞因子注射,所有 $\gamma$ c细胞因子补充物增强抗肿瘤功效,因为所述 $\gamma$ c细胞因子有利于CAR-T细胞的扩增,IL-15呈现最佳效果。通过注射接受IL-15暴露的CAR-T细胞的小鼠具有增加的功效,部分是由于肿瘤治疗期间CAR-T细胞的扩增能力增加和持续性增加。因此,这些实验的结果表明,IL-7和IL-15显示出促进CAR-T细胞扩增的前景,并诱导对治疗性治疗最有效的T细胞表型。

[1057] 实施例2:CD25消耗对细胞生长和转导效率的影响

[1058] 白介素-2a链,也称为CD25,由调节性T细胞(Treg)表达,但也在慢性B细胞白血病(CLL)细胞(大于85%的CLL患者)中观察到。Treg具有免疫抑制功能,并且可以阻止免疫治疗的功效,例如通过抑制T细胞增殖。当前通过单采血液成分术从CLL患者中分离或富集T细胞通常含有显著增加比例的Treg和CLL细胞。通过CD25消耗方法在起始物质中消耗Treg和CLL细胞可显著改善效应T细胞的纯度,从而增加表达CAR19的T细胞(例如CART19细胞)的效力。

[1059] 优化CD25消耗

[1060] 使用CliniMACS系统中Miltenyi的CD25试剂进行验证实验以从两名患者的单采血液成分术的CD25消耗中鉴定最佳条件。使用制造商建议量的100%,70%和30%的CD25消耗试剂来鉴定是否通过使用较少的试剂可以获得相同的消耗效率。还测试了两个来自Miltenyi的不同试管组。消耗是按照制造商的指示进行的。实验结果如下表所示。对于对照,使用抗CD3/CD28免疫磁珠进行选择。

[1061] 表2.CD25消耗的实验结果。

CD25消耗臂		100%	70%	30%
Miltenyi管组	161-01			
CliniMACS程序	ENRICHMENT 1.1			
患者细胞	UPCC04409-15			
%CD45+CD25+细胞	83.56%			
%CD45+CD3+细胞	8.66%			
%CD45+CD3+CD25-细胞	5.70%			
针对靶标的CD25+细胞数目		2.E+09	2.E+09	2.E+09
用于CD25消耗的单采血液		2.39E+09	3.41E+09	7.97E+09

[1062]

成分术细胞数目				
使用的CD25珠体积(mL)		2.5	2.5	2.5
CD25消耗的级分中细胞数		1.05E+09	1.86E+09	3.36E+09
CD25富集的级分中细胞数		2.05E+08	2.58E+08	5.19E+08
预期的CD25-T细胞产量		1.36E+08	1.95E+08	4.54E+08
消耗的级分中%T细胞		6.26%	4.06%	2.50%
CD25-T细胞的观测产量		6.57E+07	7.55E+07	8.40E+07
作为预期%的CD3+CD25-的产率		48%	39%	18%
消耗的级分中%B细胞		90.50%	91.6%	95.30%
CD25+级分活力		94.4%	96.2%	91.1%
CD25-级分活力		95.8%	95.0%	99.0%

[1063]

[1064] 预期的CD25- (CD25阴性) T细胞产量代表通过假设相应操作中的100%效率计算的理论CD25-T细胞产量。CD25-T细胞的观测产量表示各个操作后CD25-T细胞的数目。如表2所示,使用比制造商推荐的更少的试剂没有导致CD25消耗中相同的效率。使用不同的管导致T细胞富集增加一个对数。

[1065] 图9显示代表性流式细胞术分析图,表明与来自单采血液成分术的总细胞、对照CD3/CD28选择的细胞,CD25消耗细胞和富含CD25的细胞相比,CD25消耗的效率。细胞群体的单核细胞含量,如通过CD3-CD19-亚组的CD14表达所确定。这些结果表明有效的CD25消耗,并且CD25消耗也导致显著的单核细胞含量(相比来自单采血液成分术的总细胞、对照和富含CD25的细胞中少于2%而言,61.1%的CD14表达细胞)。

[1066] CD25消耗对T细胞群体和增殖的影响

[1067] 接下来,通过测定CD4+和CD8+T细胞的比例和增殖能力来评估CD25消耗后T细胞产物的质量。

[1068] 为了确定特定T细胞群体的比例,如上所述,通过抗CD3/CD28或CD25消耗选择后9天通过流式细胞术分析细胞。结果显示,与CD25消耗细胞相比,CD3/CD28选择的T细胞具有更大比例的CD4+T细胞(84.6%,相比46.8%的CD4+T细胞)。相反,与CD3/CD28选择的细胞相比,CD25消耗细胞具有更大比例的CD8+T细胞(与11.5%的CD8+T细胞相比为47.2%的CD8+T细胞)。因此,CD25消耗导致具有较大比例的CD8+T效应细胞的T细胞。

[1069] 还在对照(CD3/CD28选择的细胞)和CD25消耗细胞中评估增殖能力和细胞成活力。将来自对照和CD25消耗细胞的 $1.6 \times 10^7$ 个细胞平板接种,并在10-13天测定细胞数量和成活力。图10A显示了随时间的总细胞数,图10B显示了计算的群体倍增(从总细胞数计算)。结果表明CD25消耗细胞表现出与对照细胞相似的生长特征。图10C显示了活细胞的百分比,并且结果显示对照和CD25消耗细胞之间的成活力也是相似的。

[1070] CD25消耗对慢病毒转导效率的影响

[1071] 通过测定转导后CAR的表达来评估CD25消耗对慢病毒转导效率的影响。如上所述,用CD25细胞消耗患者单采血液。流式细胞仪分析图显示了CD25消耗的效率,比较了(单采血液成分术样品)前和CD25消耗后(CD25消耗的级分)CD25表达细胞群体。CD25消耗后,CD25消耗的级分含有约59.2%的CD25阴性细胞和仅10.3%的CD25阳性细胞。

[1072] CD25消耗的级分用编码CAR19的慢病毒构建体转导。培养11天后,通过流式细胞术评价CAR表达。未转导的细胞和转导的CD3选择的细胞用作对照。与CD3选择的细胞相比,CD25消耗细胞中CAR19表达显著较高(相比12.8%,为51.4%)。该结果表明CD25消耗细胞具有改善的慢病毒转导效率,这对于改善CART疗法的治疗效果可能是重要的。

[1073] 实施例3:对CD25消耗细胞使用细胞因子

[1074] 在该实施例中,检查了在培养物扩增期间CD25消耗与细胞因子补充物的作用。从患者中分离出外周血单个核细胞(PBMC),如实施例2所述,将它们不经操作或者被消耗表达CD25的细胞。通过用抗CD3和CD28包被的珠刺激来实现T细胞富集。立即在补充有10ng/ml IL-7,10ng/ml IL-15,或者10ng/ml IL-7和10ng/ml IL-15的组的培养基中培养T细胞。在第3天,添加相同的细胞因子来改变培养基。在第5天,加入含有100IU IL-2/ml的培养基,细胞共培养10天。

[1075] 流式细胞术分析显示在IL7, IL-15,或者IL7和IL15存在下培养后,与未经操作的PBMC(标准CD3/CD28选择)相比,CD25消耗细胞中CD3和CD19细胞的分布的变化。评估起始群体中CD3、CD19和CD25表达细胞的分布(例如,在CD25消耗之前和用补充细胞因子培养之前)。起始群体具有高比例的CD3-CD19+细胞(~97.2%)和高比例的CD25表达细胞(~94.5%CD25+CD3-;和~93.8%CD25+CD19+)。在操作(CD25消耗)和用细胞因子培养后,分布如图11所示改变。与未操作的细胞相比,CD25消耗细胞总体显示出CD19表达细胞更大的减少。

[1076] 还通过在用抗CD3和抗CD28包被的珠刺激后第10天,测定培养物中的细胞总数来评估相同细胞样品的增殖能力。每个细胞样品的细胞数目如下。

[1077] 表3. 体外扩增

	细胞	加入的细胞因子	培养物中的细胞数目
[1078]	未操作的	IL-7	$1.24 \times 10^6$
		IL-15	$0.92 \times 10^6$
		IL-7+IL-15	$0.52 \times 10^6$
	CD25 消耗的	IL-7	$0.93 \times 10^6$
[1079]		IL-15	$1.95 \times 10^6$
		IL-7+IL-15	$3.03 \times 10^6$

[1080] 这些结果表明,与未经操作的细胞相比,在CD25消耗的T细胞培养过程中补充IL-15导致增加的扩增。在培养过程中培养基中IL-7和IL-15的添加导致与未操作的细胞相比,并且与独立添加细胞因子IL-7或IL-15相比,扩增显著增加。因此,IL-7和IL-15补充的组合导致增殖能力增加最多的T细胞。

[1081] 实施例4:用于细胞疗法的T细胞的适合性

[1082] 在过去的五年中,工程化细胞疗法的使用已经显示出显著的成功,特别是在用靶向CD19的嵌合抗原受体(CAR) T细胞靶向B细胞恶性肿瘤的临床试验中。尽管这些结果令人满意,许多接受评估的患者由于缺乏足够的细胞产物而最终无法继续进行。这种限制是由于不能从外周血中收获充足的淋巴细胞,或者由于离体细胞扩增失败所致,其中所述细胞扩增是细胞制造的组成部分和体内活性的预测物。在评估许多患者时,超过30%的患者没有足够的细胞材料用于细胞治疗产品的成功临床制造。这个实施例描述了可能影响外周T细胞收获的因素的确定,例如可能影响T细胞计数的收获和化疗的时机。随着CART细胞的试验变得更大和更多,这些因素具有重要的临床意义。特别是调查了在ALL和NHL儿科患者化疗期间T细胞扩增的潜能和记忆表型。

[1083] 方法

[1084] 患者选择和临床协议

[1085] 在化疗开始前和化疗的每个周期之后分析从患有血液恶性肿瘤的儿科患者收获的T细胞的扩增能力和表型。患者由Children's Hospital of Philadelphia Division of Hematology and Oncology in Philadelphia,PA的临床实践确定。患者被纳入费城儿童医院机构审查委员会批准的临床试验CHP-12-009915。纳入标准定义如下:6月至21岁的男性或女性;CD19阳性B细胞恶性肿瘤的诊断;之前没有基因治疗(如果接受了骨髓性干细胞移植,患者可能已经接受了CD19 CAR T细胞疗法);父母/监护人知情同意;并在适当情况下允许儿童同意。排除标准定义如下:活性乙肝或丙肝感染;HIV感染;将妨碍参与的任何不受控制的医疗条件;以及调查员认为可能不符合研究程序的父母或监护人。

[1086] David M.Barrett执行同意书和招募,除了用于研究的常规实验室外,还收集了四毫升的外周血样品。这是单独的试验干预,所有患者都继续进行基于疾病的标准护理疗法,在每个化疗周期后都有类似的收集。采用IRB批准的临床试验方案(CHP-12-009915),在诊断为急性淋巴细胞性白血病(ALL)或非霍奇金淋巴瘤(NHL)的患者中,在以下时间点收集外周血样品:化疗前、诱导后、巩固后、临时维持后、延迟增强后和维持。入选时排除复发疾病

患者。患者特征如表7所示。入组时患者的年龄在8个月至19岁之间,并且患者为58%男性,42%女性。疾病组包括ALL,(按国家癌症研究所(NCI)分层)SR(SR-ALL,n=17)或HR/VHR(HR/VHR-ALL,n=21)和NHL(n=12)。淋巴瘤亚型包括伯基特淋巴瘤(Burkitt)(n=6),弥漫性大B细胞(DLBCL,n=3),原发性纵隔(n=1),骨原发性淋巴瘤(n=1)和滤泡性淋巴瘤(n=1)。所有NHL亚型分组分析。表8示出了标准和高风险ALL的化疗方案。

[1087] 表7:患者特征

特征	总计(n=50)
年龄(岁)	
中位数	5
范围	0.7-19
性别 -no. (%)	
男性	29 (58)
女性	21 (42)
疾病-no. (%)	
ALL	38 (76)
标准风险	17 (34)
高和非常高风险	21 (42)
NHL	12 (24)
伯基特	6 (12)
DLBCL	3 (6)
原发性纵隔	1 (2)
骨原发性淋巴瘤	1 (2)
滤泡性淋巴瘤	1 (2)

[1088]

[1089] 表8:给予标准风险ALL和高风险ALL患者的治疗方案

	标准风险 ALL	高风险
[1090] 诱导	长春新碱 6mg/m <sup>2</sup> 地塞米松 6mg/m <sup>2</sup> PEG-L-天冬酰胺酶 2500U/m <sup>2</sup>	长春新碱 6mg/m <sup>2</sup> 地塞米松 6mg/m <sup>2</sup> PEG-L-天冬酰胺酶 2500U/m <sup>2</sup> <u>柔红霉素 100 mg/m<sup>2</sup></u>
[1090] 巩固	长春新碱 1.5mg/m <sup>2</sup> 6-巯基嘌呤 75mg/m <sup>2</sup>	长春新碱 1.5mg/m <sup>2</sup> 6-巯基嘌呤 60mg/m <sup>2</sup> <u>环磷酰胺 1g/m<sup>2</sup></u> <u>阿糖胞苷 75mg/m<sup>2</sup></u> <u>PEG-L-天冬酰胺酶 2500mg/m<sup>2</sup></u>
[1090] 临时维持	长春新碱 7.5mg/m <sup>2</sup> 甲氨蝶呤 500mg/m <sup>2</sup>	长春新碱 7.5mg/m <sup>2</sup> 甲氨蝶呤 20mg/m <sup>2</sup>
		<u>6-巯基嘌呤 25mg/m<sup>2</sup></u>
[1091] 延迟增强	长春新碱 4.5mg/m <sup>2</sup> 地塞米松 10mg/m <sup>2</sup> 多柔比星 75mg/m <sup>2</sup> PEG-L-天冬酰胺酶 2500U/m <sup>2</sup> 环磷酰胺 1 g/m <sup>2</sup> 阿糖胞苷 60mg/m <sup>2</sup> 6-硫鸟嘌呤 60mg/m <sup>2</sup>	长春新碱 7.5mg/m <sup>2</sup> 地塞米松 10mg/m <sup>2</sup> 多柔比星 75mg/m <sup>2</sup> PEG-L-天冬酰胺酶 5000U/m <sup>2</sup> 环磷酰胺 1g/m <sup>2</sup> 阿糖胞苷 60mg/m <sup>2</sup> 6-硫鸟嘌呤 60mg/m <sup>2</sup>
[1091] 临时维持 II*	长春新碱 7.5mg/m <sup>2</sup> 甲氨蝶呤 500mg/m <sup>2</sup>	
[1091] 维持	长春新碱 1.5mg/m <sup>2</sup> 地塞米松 6mg/m <sup>2</sup> 6-巯基嘌呤 75mg/m <sup>2</sup> 甲氨蝶呤 20mg/m <sup>2</sup>	长春新碱 1.5mg/m <sup>2</sup> 泼尼松 40 mg/m <sup>2</sup> 6-巯基嘌呤 75mg/m <sup>2</sup> 甲氨蝶呤 20mg/m <sup>2</sup>
加下划线的文字表示不给予标准风险患者的治疗。*由于高风险(HR)或非常高风险(VHR)疾病没有相应周期,所以未对标准风险 ALL 的临时维持 II 期后收集的 T 细胞进行分析。		

[1092] 离体T细胞扩增和培养

[1093] 按照标准方案使用Ficoll-Paque (GE Life Sciences) 密度离心培养基从外周血收集淋巴细胞。将收获的血沉棕黄层重新悬浮于T细胞培养基中,将细胞以5至10×10<sup>6</sup>个细胞/ml的浓度铺在适当大小的培养容器上,并在37℃孵育过夜。在18-24小时的孵育之后,收集来自这些培养物的上清液并洗涤,留下在培养容器中的贴壁细胞并仅分离悬浮细胞。为CD3、CD4和CD8表达将该上清液的样品染色(参见下文)以计算ATC。然后将全部培养物与以

每个T细胞三个珠的比率组合包被有CD3和CD28激动剂抗体的刺激性微珠(Life Technologies;目录#111.32D),并以 $10^6$ 个T细胞/ml的浓度重悬用于T细胞扩增,与在我们的临床试验扩增中使用相同的刺激和培养条件。计数细胞,每隔一天测量细胞大小,并在第7天除去珠。当细胞生长动力学和体积指示细胞从活化停止时,培养期结束。对于细胞因子研究,如上所述收集样品,并与珠组合,然后分成两种培养物。如上处理一种培养物(无细胞因子),并用IL-7(25ng/ml)和IL-15(10ng/ml)(R&D Systems,#207-IL-025和#247-IL-205)处理另一种培养物(+IL-7和IL-15)。

[1094] 评估诊断和化疗对CD3/CD28刺激细胞成功反应的可能性的影响。对培养的细胞施加超过10天的 $>5$ 倍细胞扩增的标准。该标准与工程化细胞疗法试验在临床上相关,因为它已经被用于CD19 CAR T细胞临床试验所必需的最小扩增的阈值。在GraphPad Prism软件上进行统计分析,并使用方差分析来比较组。

[1095] 流式细胞仪

[1096] 对T细胞染色细胞表面标志物以区分T细胞谱系。使用下面的表达类型:幼稚( $T_N$ )-CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95-;干中央记忆( $T_{SCM}$ )-CCR7+、CD62L+、CD45RO-、CD95+;中央记忆( $T_{CM}$ )-CCR7+、CD62L+、CD45RO+、CD95+;效应记忆( $T_{EM}$ )-CCR7-、CD62L-、CD45RO+、CD95+;末端效应细胞( $T_{Eff}$ )-CCR7-、CD62L-、CD45RO-、CD95+,可以将CCR7、CD62L、CD45RO和CD95用于区分各种T细胞表型。参见例如,Gattinoni等人,Nat.Med.17(2011):1290-7。用于该分析以及如上所述的T细胞群体的定量的抗体是CD8-FITC(BD Biosciences,Franklin Lakes;#347313),CD3-PE(BD Biosciences,#555340),CD4-APC(BD Biosciences,#555349),CCR7-FITC(BD Biosciences,#561271),CD95-PE(BD Biosciences,#556641),CD45RO(BD Biosciences,#559865)和CD62L-PE/Cy7(BioLegend,San Diego,CA;304822)。将细胞重悬于FACS缓冲液(PBS+1%胎牛血清)中,然后与抗体混合物在4℃孵育25分钟。然后将样品洗涤两次,并在BD FACS Verse Flow Cytometer(BD Biosciences,#653118)上进行流式细胞术采集。使用FlowJo软件(Treestar,Inc,Ashland,OR)进行分析。

[1097] 统计分析

[1098] 使用Prism 4(Graphpad Software,La Jolla,CA),使用方差检验分析进行所有统计分析。Fisher的精确检验用于比较百分比。所有报告为显著的比较都达到 $p$ 值 $<0.05$ ,或者为按多重比较的Bonferroni校正的计算。

[1099] 结果

[1100] 在扩增试验期间超过5倍的体外扩增高度预测临床规模扩增的成功,阳性预测值为70%,阴性预测值为95%。

[1101] T细胞扩增因疾病组和既往治疗而异

[1102] 从每位招募患者诊断时和每个化疗周期之后收集外周血。在这些周期中向SR-和HR-ALL患者施用的化学治疗方案在表8中示出。分离T细胞并使用包被有CD3和CD28激动剂抗体的珠刺激,随时间测量细胞扩增。在试验扩增期间(这与临床扩增成功的高度可能性相关),应用大于5倍扩增的阈值,将分析分为“通过”扩增和扩增“未通过”的样品。这些类别代表了那些分别被纳入临床试验的合格或不合格的患者样品。

[1103] ALL对NHL

[1104] ALL患者中有近80%在诊断时满足这个阈值,通过率在治疗过程中缓慢下降,在维

持阶段达到 ~ 40% (图22A)。与之形成鲜明对比的是从NHL患者中收集的细胞(表明扩增不良),诊断时通过率仅为25%,少量样品(全部剩余时间点的12.5%)表明治疗开始后有任何扩增(图22A)。白血病和淋巴瘤样品的通过率差异在所有时间点都是显著的(表12示出了统计分析的结果)。

[1105] 表12-来自图22A-22F的数据的统计分析,显著性数值加下划线。

	<u>% 通过 试验扩增</u>	<u>绝对 T 细胞 计数</u>	
[1106] 白血病 v. 淋巴瘤	<u>0.005</u>	0.140	化疗前
	<u>0.013</u>	0.480	诱导后
	<u>0.025</u>	0.320	巩固后
	<u>0.012</u>	0.260	DI后
	<u>0.025</u>	0.060	IM后
	<u>0.003</u>	0.360	维持
SR-ALL v. HR/VHR-ALL	0.210	0.314	化疗前
	0.120	0.470	诱导后
	<u>0.003</u>	<u>0.009</u>	巩固后
	<u>0.007</u>	<u>0.008</u>	DI后
	<u>0.012</u>	0.275	IM后
	<u>0.023</u>	<u>0.004</u>	维持

[1107] 标准风险与高/非常高风险

[1108] 将ALL样品分层到NCI SR和HR/VHR组中揭示了来自SR-ALL患者的T细胞表现出稳健的且保持的扩增能力,在治疗早期初始下降,在维持阶段中适度下降(图22B)。虽然HR/VHR-ALL样品在治疗早期扩增良好,但巩固阶段后通过率迅速下降(图22B),导致与SR-ALL相比,通过试验扩增的比率有统计学显著差异(表12)。

[1109] T细胞计数

[1110] 在收集时来自外周血的绝对淋巴细胞计数(ALC)在治疗早期较高,并在巩固后下降(图22C和22E)。白血病和淋巴瘤患者的绝对淋巴细胞计数没有差异,也不是T细胞功能的预测指标。研究ATC与扩增潜能之间的关系,以评估这种观察到的功能差异是否仅仅是T细胞数量变化的反映。来自所有通过或未通过5倍体外扩增阈值的患者的收集时间的外周血中的绝对T细胞计数通常在治疗早期较高(图22D和22F)。诱导后通过维持治疗,白血病样品的ATC降低(图22F),表明与扩增率相似的趋势。在某些时间点的淋巴瘤样品具有适度的外周T细胞计数(300-400个细胞/ml);然而,即使在这些周期中,T细胞表现出不良的扩增。而在整个治疗过程中,与淋巴瘤相比,白血病样品表现出显著更大的扩增(图22A),但是在这两种疾病之间在ATC中没有观察到这样的统计学差异。对风险组分层的ALL样品的检查显示SR-ALL ATC的逐渐下降,且在延迟增强后显著下降(图24)。ATC的这种逐渐下降与扩增的逐渐下降相关(图22B)。HR/VHR-ALL ATC在巩固治疗后出现急剧下降,与巩固后的扩增急剧下降相关(图22B)。HR/VHR-ALL ATC在治疗的其余部分保持低水平,扩增潜力显示出逐渐下降。这些发现表明,在ALL中,ATC可能对扩增潜力有一定的容忍;然而,这种关联在每个周期

并不直接相关。对于NHL,ATC似乎对扩增潜力没有任何影响。

[1111] 与增强的表达相关的早期谱系T细胞

[1112] 鉴于T细胞数量与NHL扩增无关,而ALL仅有一般相关性,这些样品中存在的记忆表型被评估为对观察到的功能差异的潜在贡献者。如本文所述,细胞谱系由各种细胞表面标志物模式定义。将分析分成三个比较组,显示在图23中每列的顶部(通过与未通过,图23A-23E;白血病与淋巴瘤,图23F-23J;SR-ALL与HR/VHR-ALL,图23K-23O)。

[1113] 通过试验扩增的样品与未通过试验扩增的样品的比较(图23A-23E)显示,除延迟增强之外,成功扩增都是与所有时间点的TN细胞的显著富集相关的,并且在除了诊断和延迟增强后的所有时间点富集TSCM细胞(图23A-23B)。TN计数在通过和未通过的样品中均逐渐下降,而TSCM计数保持相对稳定。通过的样品在治疗早期富集TCM(图23C)和在单个时间点也富集TEM细胞(图23D);TEff计数在两组中相对相当(图23E)。这种总体模式表明,与几乎每个化疗周期后未通过试验扩增的样品相比,通过试验扩增的样品显著富集早期谱系表型。

[1114] 图23F-23J)反映了构成图22F中表示的ATC的T细胞表型。ALL样品在诊断时、延迟增强和维持期间都有显著的TN细胞富集,并且除诱导和临时维持以外,所有周期后TSCM细胞均显著富集。相反,淋巴瘤样品在整个治疗过程中TN和TSCM计数较低,记忆和效应表型相对保留(图23H-23J),表明淋巴瘤患者中的循环T细胞群体主要由分化的T细胞组成,具有有限的扩增潜能,甚至在诊断时也缺乏早期谱系亚型。ALL样品均富含早期谱系细胞,与整个治疗期间增强的扩增相关。

[1115] 将来自ALL患者的样品分析分为SR-ALL和HR/VHR-ALL。这些表型研究,现分别反映图22B和图24中所示的扩增和ATC数据,显示在两种群体中,TN细胞初始时升高但在治疗期间显示急剧下降;对于SR-ALL,这种下降发生在延迟增强之后,并且对于HR/VHR-ALL,这发生在巩固后(图23K)。TN下降时间的这种变化导致巩固后和临时维持后绝对TN计数的显著差异;当延迟增强之后,SR-ALL TN计数下降时,这种显著性丧失了。与在ATC下降的时机直接相关的TN细胞计数的消耗时机在图24中示出。在另一方面,TSCM细胞保持在SR-ALL样品中相对稳定,但是它们在HR/VHR-ALL样品中逐渐下降(图23L)。这种下降再次导致巩固和临时维持之后的显著差异,这在延迟维持后丧失。图22B显示了在巩固后也出现(并保持)的扩增的显著差异,与在TN和TSCM细胞计数中观察到的差异一致,表明这些早期谱系细胞的消耗取消了成功扩增。对后来的谱系细胞趋势的检查揭示了另外的一些观察结果。SR-ALL样品中TCM计数保持相对稳定,并且在HR/VHR-ALL样品中延迟增强后表现出下降,但这种下降没有保持(图23M)。在整个治疗过程中,两种疾病组的TEM细胞计数都低,具有高度变异(图23N)。最后,TEff细胞计数显示SR-ALL样品逐渐下降,但在HR/VHR-ALL样品中保持相对稳定(图23O;对于统计分析结果,参见表13)。所有三个比较组的结果总结在表9中。

[1116] 在诊断时SR和HR/VHR-ALL都以等价的早期谱系细胞计数开始,并且消耗的模式导致对给予的化学治疗方案的检查。两种药剂,环磷酰胺和阿糖胞苷,在观察到的TN细胞下降时给予每个风险组;即SR-ALL患者在延迟增强期间接受它们,并且HR/VHR-ALL患者在巩固时接受它们。这些药剂在任何其他时间都没有给予任何治疗方案,也没有其他药剂与这种一致且特定的消耗相关联。

[1117] 表13-图23A-23O中呈现的数据的统计分析(所有显著性数值加下划线)

		化疗前	诱导后	巩固后	IM后	DI后	维持	
通过 v. 未通过	2A	0.032	0.047	0.029	0.003	0.143	0.004	幼稚
	2B	0.278	0.040	0.003	0.046	0.730	0.003	SCM
	2C	0.045	0.009	0.022	0.074	0.639	0.054	CM
	2D	0.071	0.016	0.371	0.404	0.635	0.336	EM
	2E	0.060	0.260	0.169	0.131	0.395	0.136	TE
[1118] 白血病 v. 淋巴瘤	2F	0.010	0.215	0.124	0.173	0.044	0.0004	幼稚
	2G	0.020	0.124	0.021	0.079	0.006	0.0009	SCM
	2H	0.108	0.755	0.178	0.035	0.061	0.117	CM
	2I	0.093	0.303	0.770	0.222	0.074	0.916	EM
	2J	0.0002	0.032	0.884	0.074	0.057	0.680	TE
SR-ALL v. HR/HR-ALL	2K	0.456	0.600	0.005	0.001	0.066	0.5	幼稚
	2L	0.355	0.527	0.004	0.025	0.386	0.423	SCM
	2M	0.791	0.800	0.0002	0.076	0.415	0.512	CM
	2N	0.200	0.041	0.014	0.000	0.174	0.5	EM
	2O	0.438	0.002	0.288	0.035	0.285	0.30	TE

[1119] TSCM细胞挽救扩增的富集

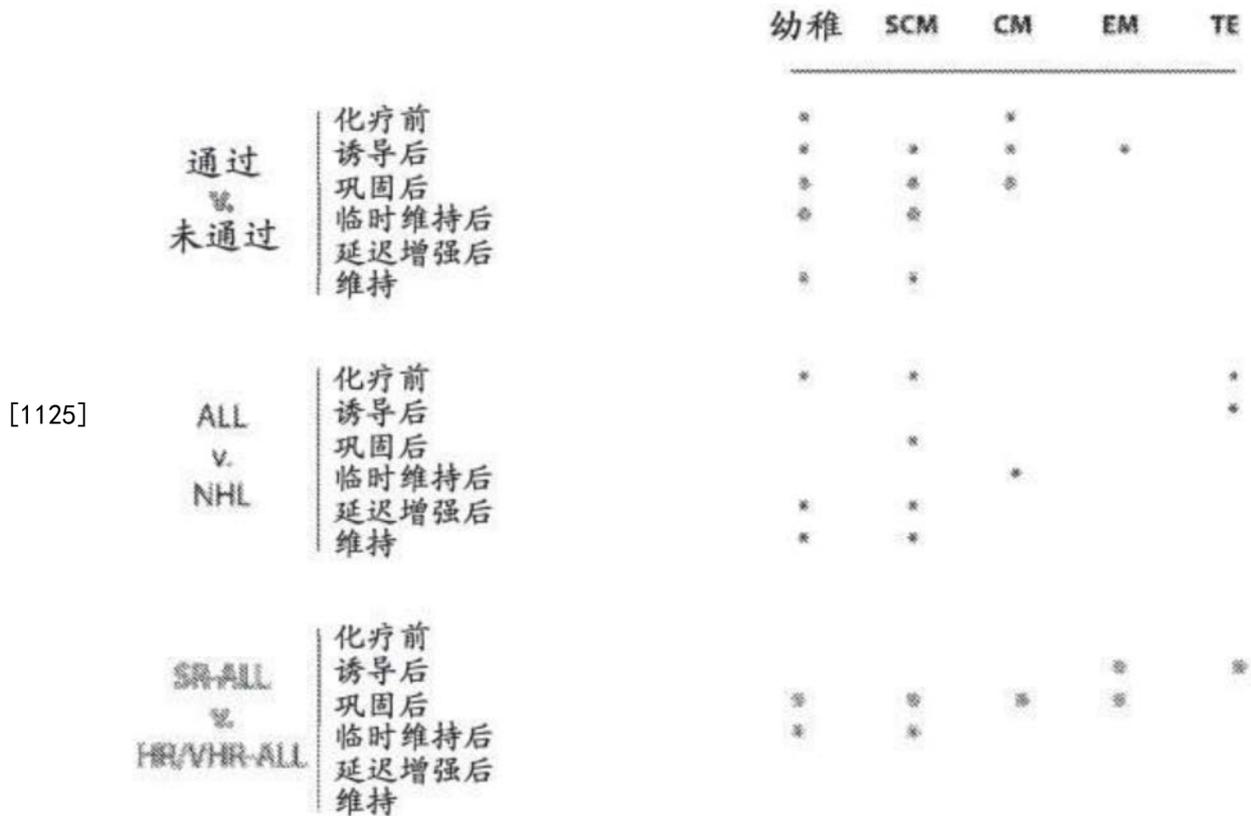
[1120] 通过添加IL-7和IL-15细胞因子来富集TSCM群体已被认为支持不太成熟的T细胞表型。鉴于早期谱系细胞和扩增之间的关联,评估这些细胞因子对细胞表型和扩增能力的影响。收集样品并分成两种培养物,一种有细胞因子,一种没有细胞因子。这种分析只根据疾病类型进行分层,而不是按风险类别或治疗周期进行分层。作为参照,分析包括每个疾病组通过试验扩增的所有样品的百分比,其包括先前收集的分裂培养实验的一部分的所有样品(即,在图22A-22B、22F、24和23A-23O中分析的样品)。

[1121] 从白血病和淋巴瘤患者收集的样品显示在用IL-7和IL-15培养后TSCM群体显著富集(图25A;关于统计分析结果,参见表14)。TSCM的这种扩增是以几乎每种其他细胞类型为代价的,例外是白血病样品中的TEff群体的增加。TSCM细胞的这种增加与白血病和淋巴瘤样品中增加的扩增有关(图25B)。在淋巴瘤患者样品中增强扩增最为明显,显示出了统计学显著改善(P=0.003),反映TSCM细胞富集时总通过率为57.7%,无细胞因子培养时通过率为15.3%。这个通过率接近白血病样品所显示的通过率(60.3%)。

[1122] 表14:图25A-25B中呈现的数据的统计分析-所有显著性数值加下划线

	所有样品	白血病	淋巴瘤
幼稚	0.12	0.012	0.455
[1123] SCM	0.009	0.023	0.001
CM	0.041	0.112	0.097
EM	0.275	0.179	0.172
TE	0.345	0.006	0.386

[1124] 表9-图23A-23O中显著性差异的总结(星号表示左侧显示的比较组之间的统计学显著差异。SCM,干中央记忆T细胞;CM,中央记忆T细胞;EM,效应记忆T细胞;Teff,末端效应T细胞)。



[1126] 结论

[1127] ALL的分析分为标准风险 (SR-ALL) 和高/非常高风险 (HR/VHR-ALL) 疾病。SR-ALL样品直到治疗后期都保持稳定扩增, 而HR/VHR样品显示成功的初始扩增, 其与环磷酰胺和阿糖胞苷施用相关联地急剧下降。环磷酰胺和阿糖胞苷似乎选择性地消耗ALL风险组中的TN细胞, 对应于HR/VHR-ALL T细胞扩增的下降。在扩增期间用外源性白细胞介素-7 (IL-7) 和IL-15培养显著增强了TSCM细胞计数, 并且该富集显著提高了淋巴瘤T细胞的扩增能力。

[1128] 与高风险或非常高风险ALL相比, 标准风险ALL患者的T细胞扩增改善。淋巴瘤患者在整个治疗过程中具有较差的T细胞扩增。具有富含早期谱系细胞的T细胞群体的患者在体外扩增得更好, 并且相对于来自NHL患者的细胞, 具有ALL的患者具有相应的扩增增强的这些细胞的数目更高。T细胞表型的检查显示, ALL的患者具有富集的TN和TSCM细胞亚群 (早期谱系细胞), 而淋巴瘤患者具有非常低的早期谱系细胞计数。此外, 幼稚细胞和干中央记忆细胞的较大群体与增强的扩增能力相关。在标准风险ALL中延迟增强之后, 幼稚细胞和干中央记忆细胞被消耗, 并且在高风险ALL和非常高风险ALL中较早 (在巩固后) 消耗。通过扩增的样品产生大约50% TCM的群体, 而那些未通过扩增的样品产生大约55% TEM和TEff的细胞产物, 其中TEff池是通过的样品的两倍 (19.6%对10.5%)。参见图26。在T细胞扩增结束时存在的TCM群体主要来源于TN和TSCM细胞。早期谱系细胞被环磷酰胺和阿糖胞苷化疗选择性地消耗, 并且用白细胞介素-7 (IL-7) 和IL-15培养富集选择早期谱系细胞并挽救T细胞扩增能力。根据该结果, 环磷酰胺和阿糖胞苷可能主要负责消耗具有高增殖能力的T细胞。早期谱系细胞极大地帮助T细胞适应性扩增, 并且通过T细胞收集时机或者培养方法富集该群体可以增加有资格接受高活性工程化细胞疗法的患者数量。在包括这些药剂的循环之前收集T细胞增加了这些患者有资格进行细胞治疗的可能性。本文描述的结果提供了优化离体

治疗细胞扩增和增强细胞持续性(例如通过T细胞选择和支持)的方法。

[1129] 等同物

[1130] 本文引用的每篇专利,专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。虽然已经参考具体方面公开了本发明,但是显而易见的是,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,本领域技术人员可以设计出本发明的其它方面和变型。所附权利要求旨在被解释为包括所有这些方面和等同变型。

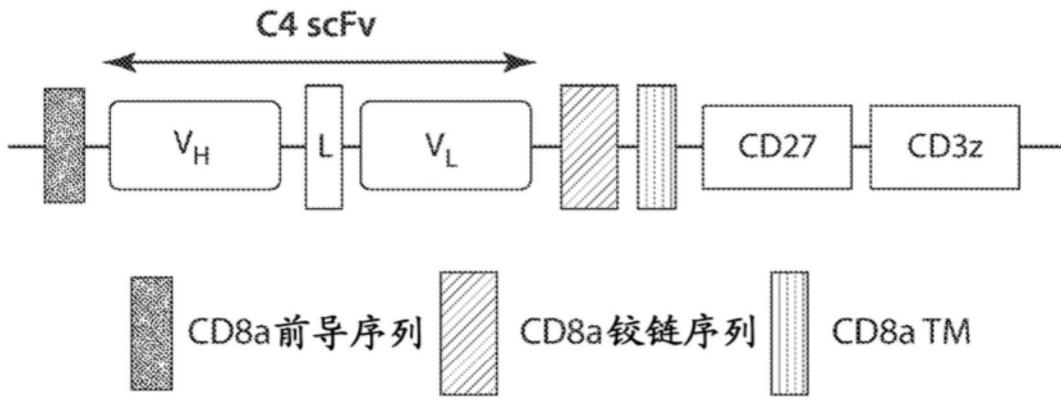


图1A

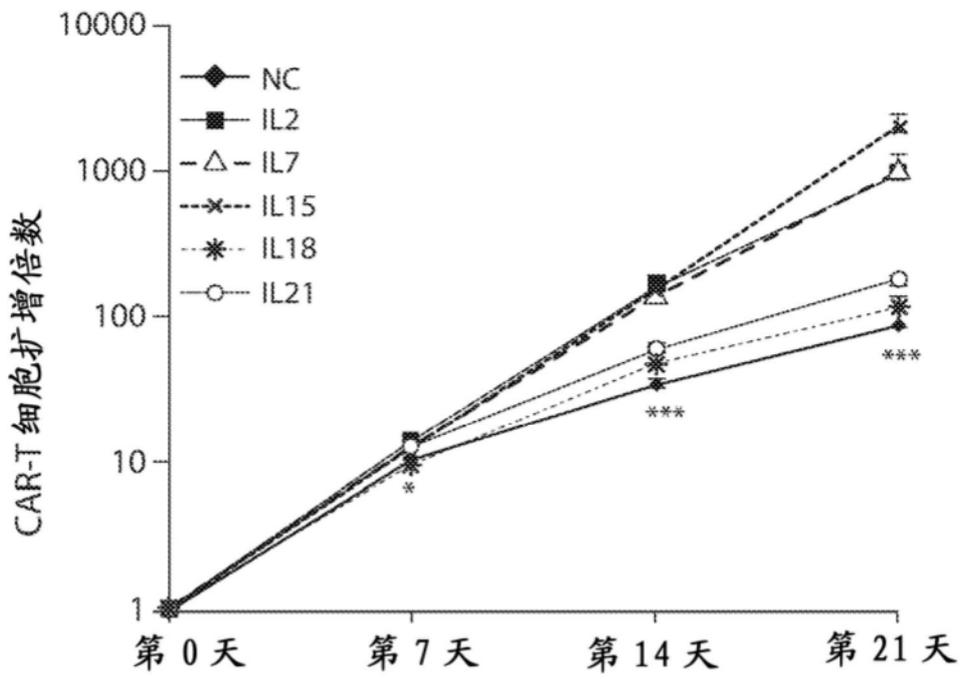


图1B

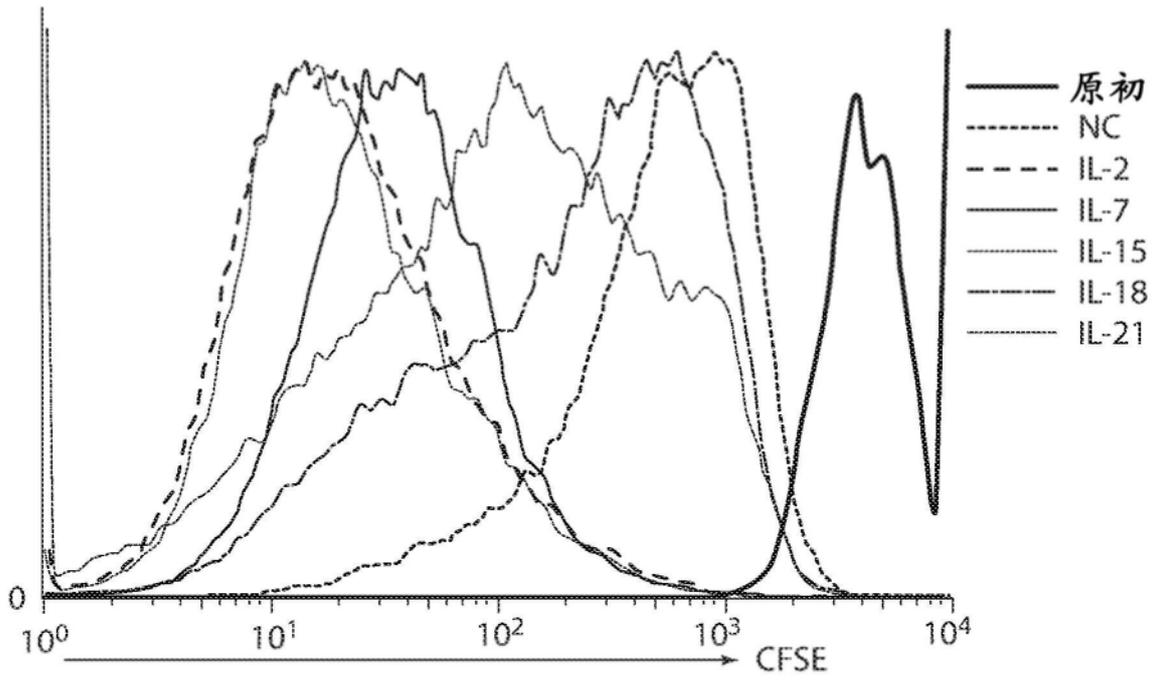


图1C

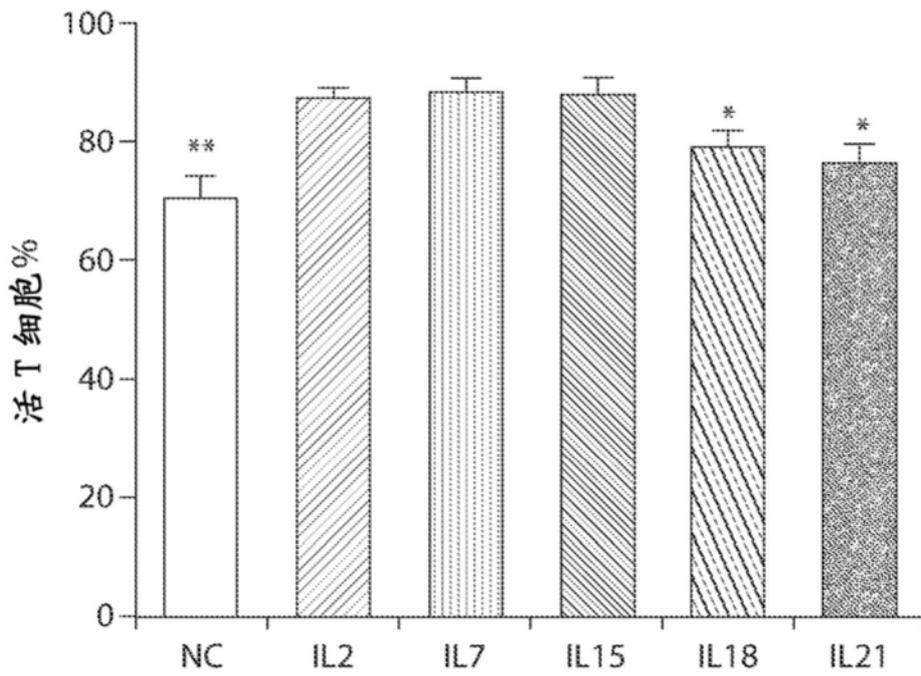


图1D

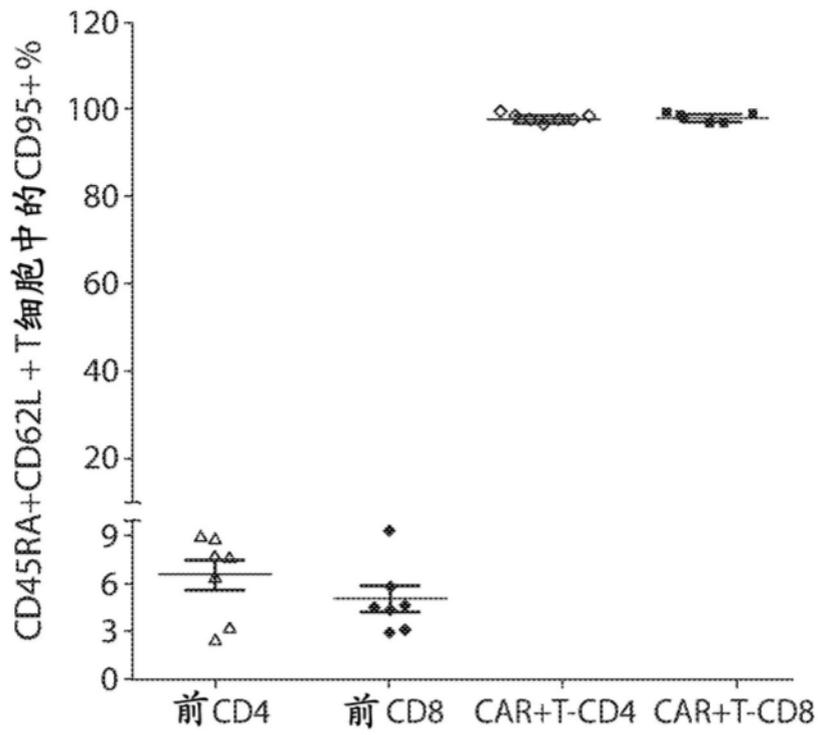


图2A

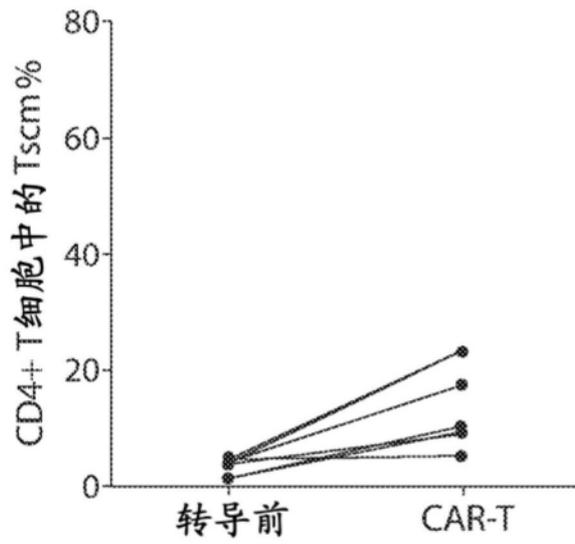


图2B

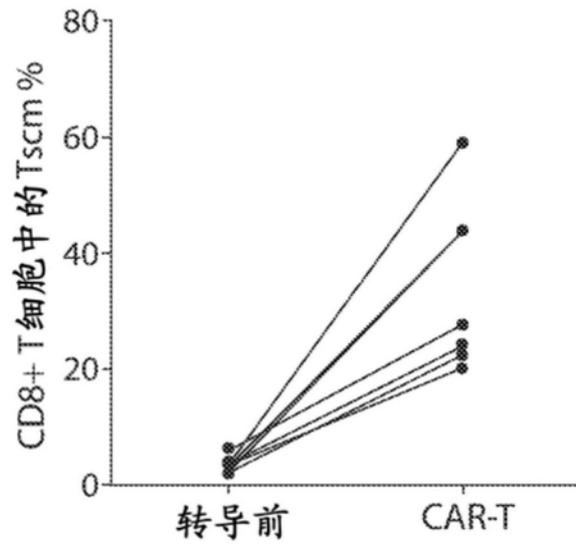


图2C

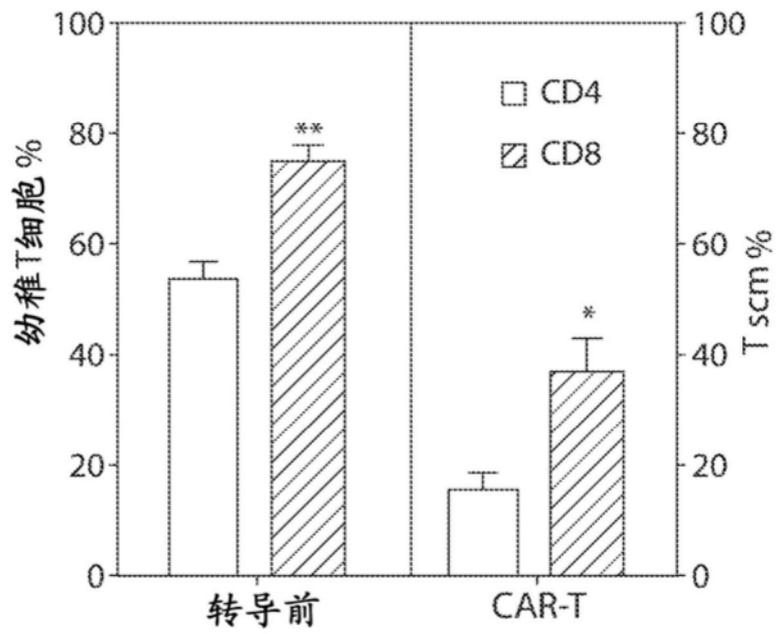


图2D

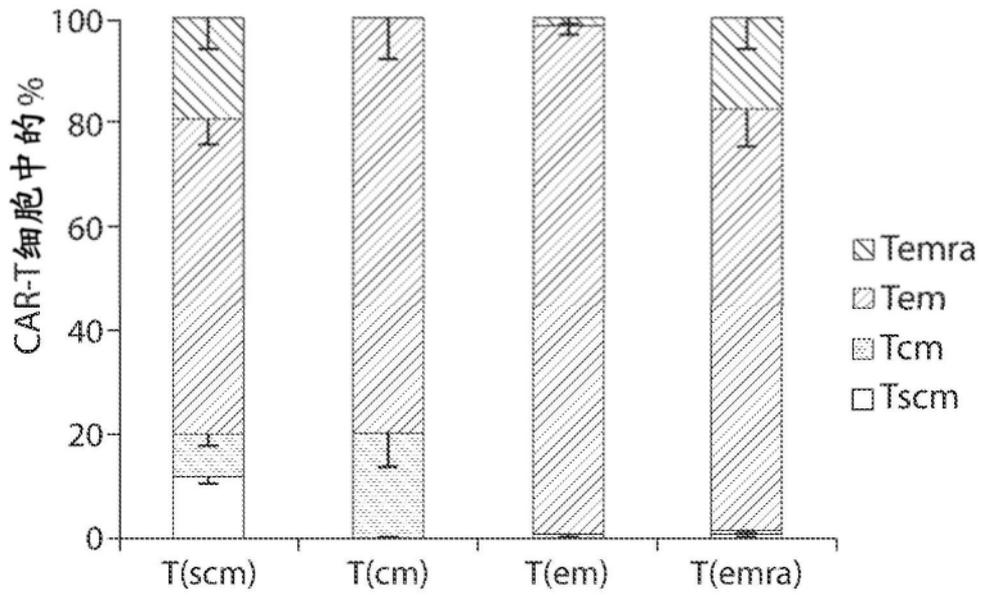


图2E

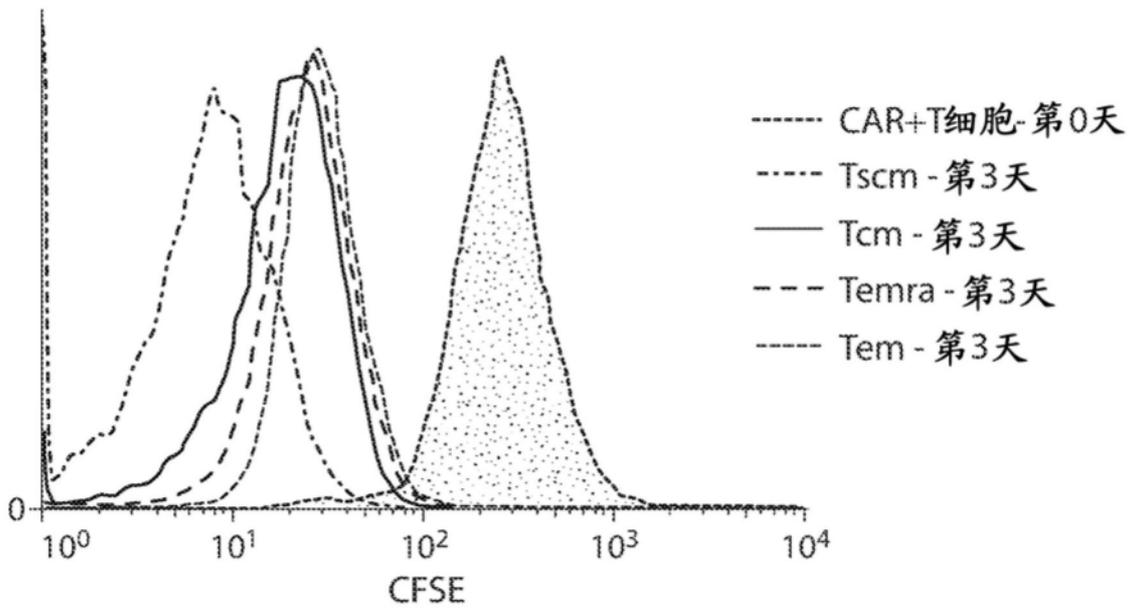


图2F

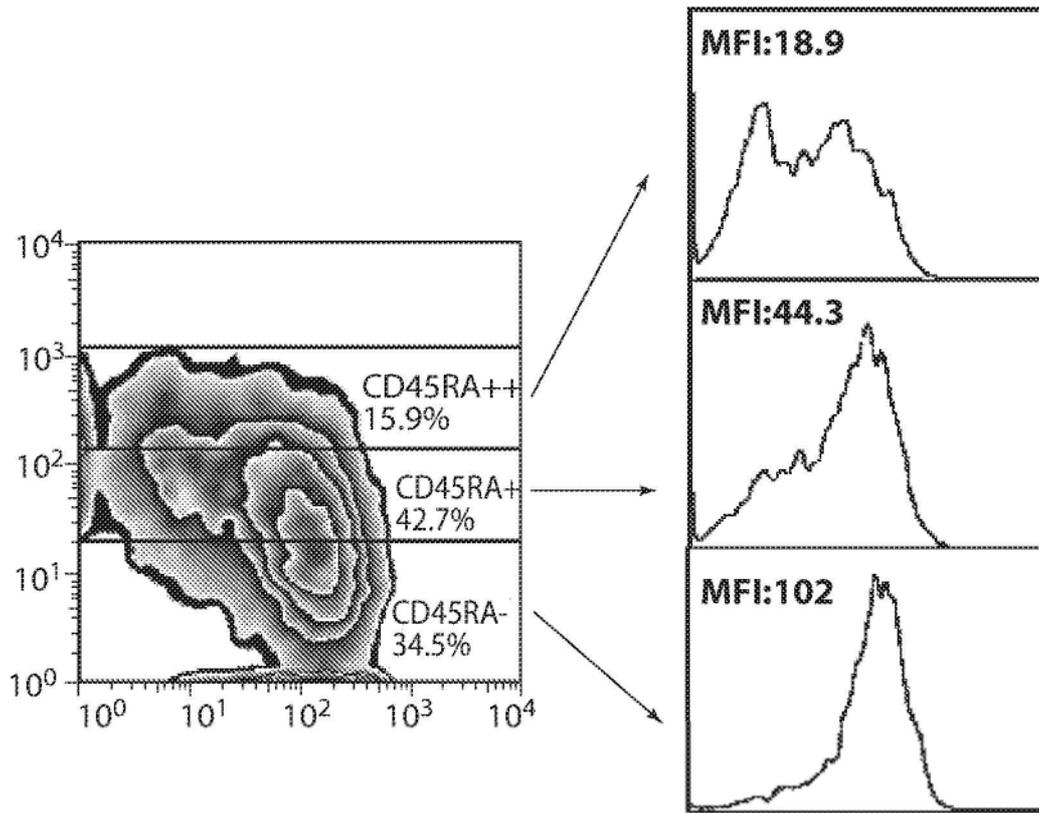


图3A

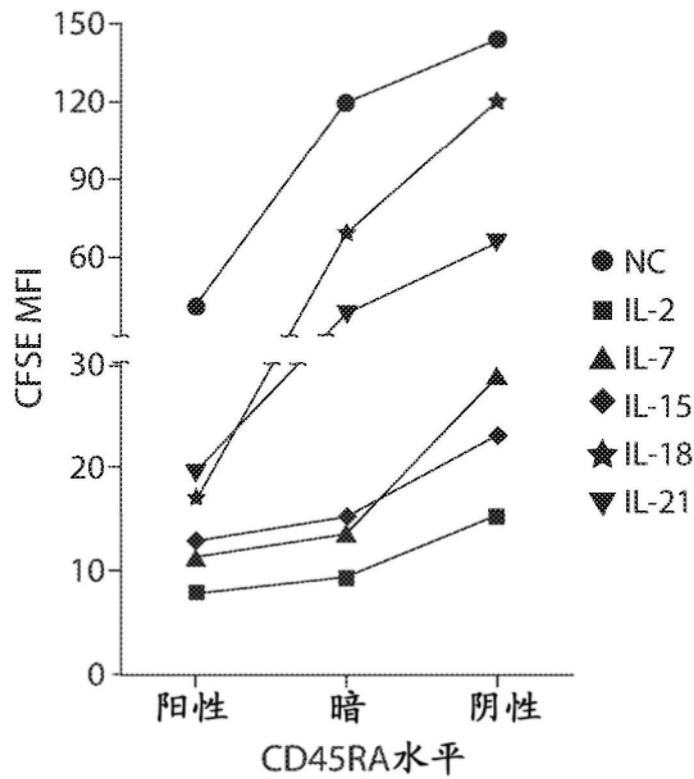


图3B

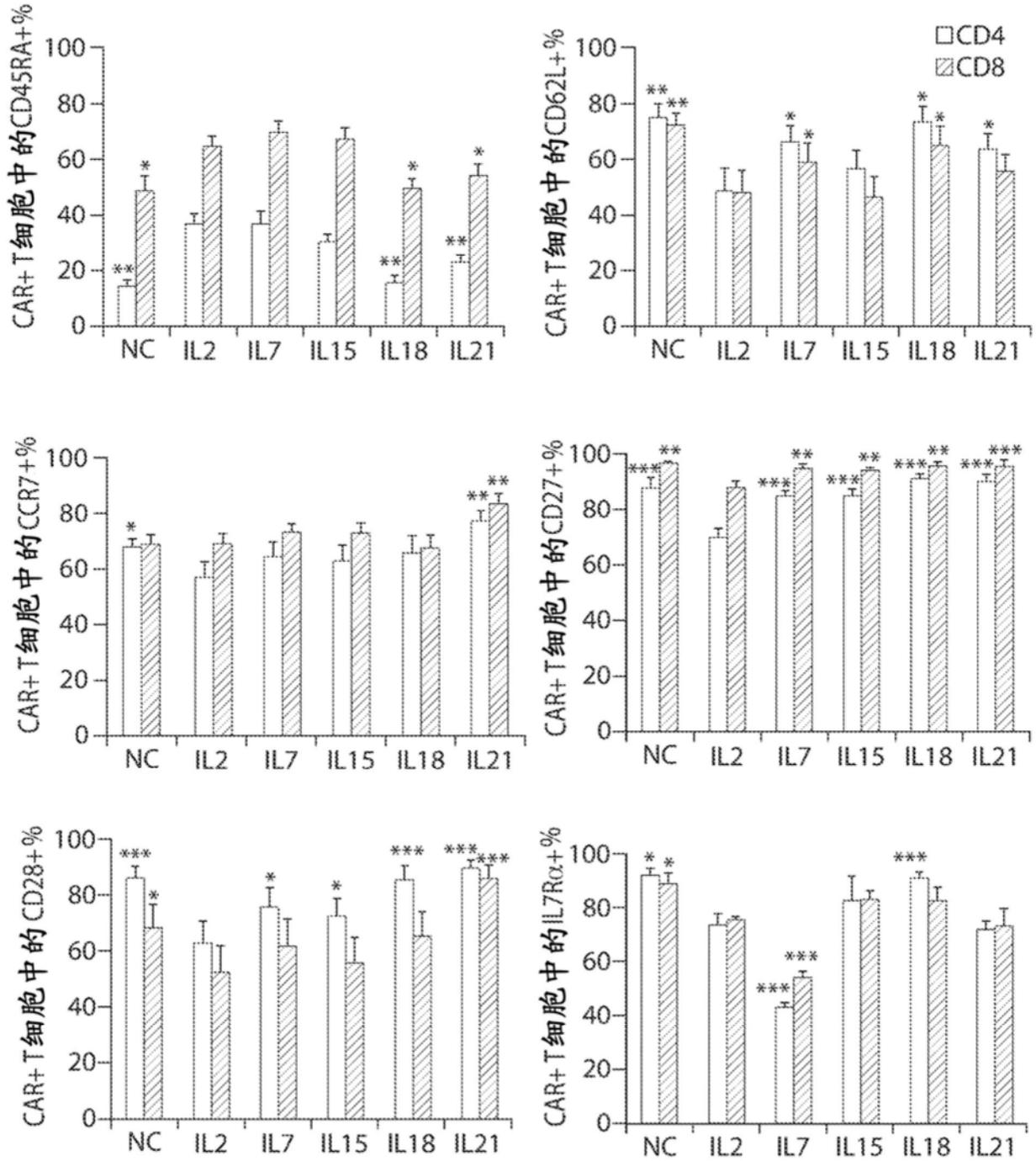


图4

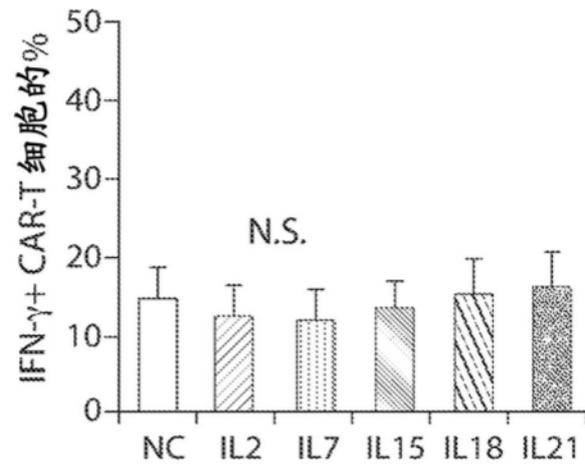


图5A

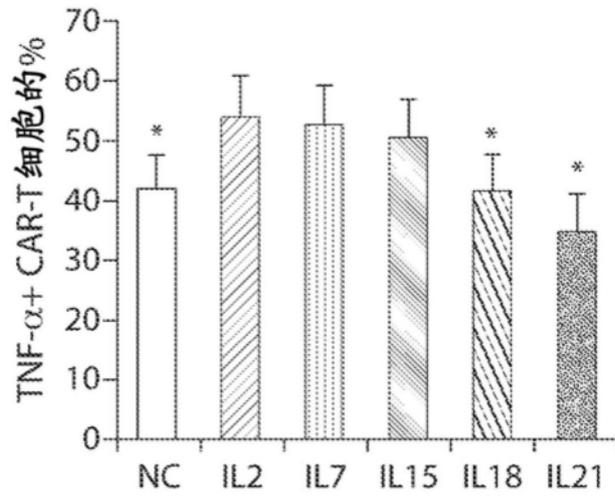


图5B

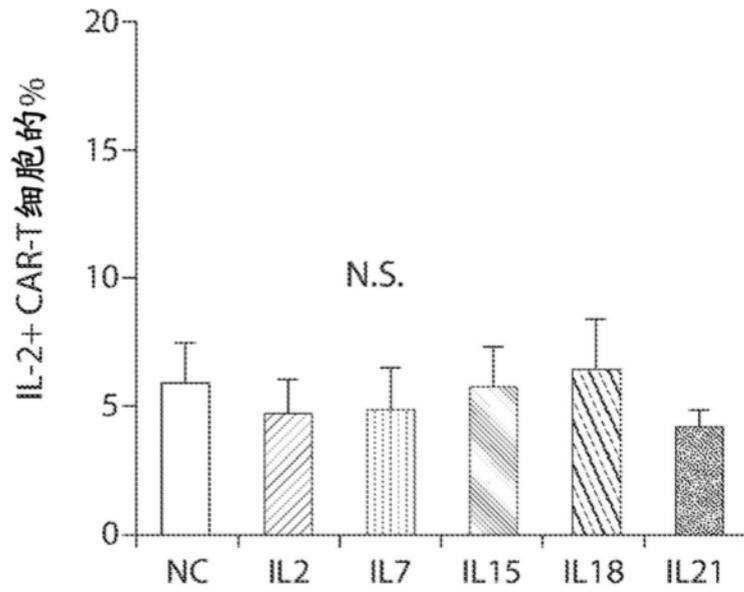


图5C

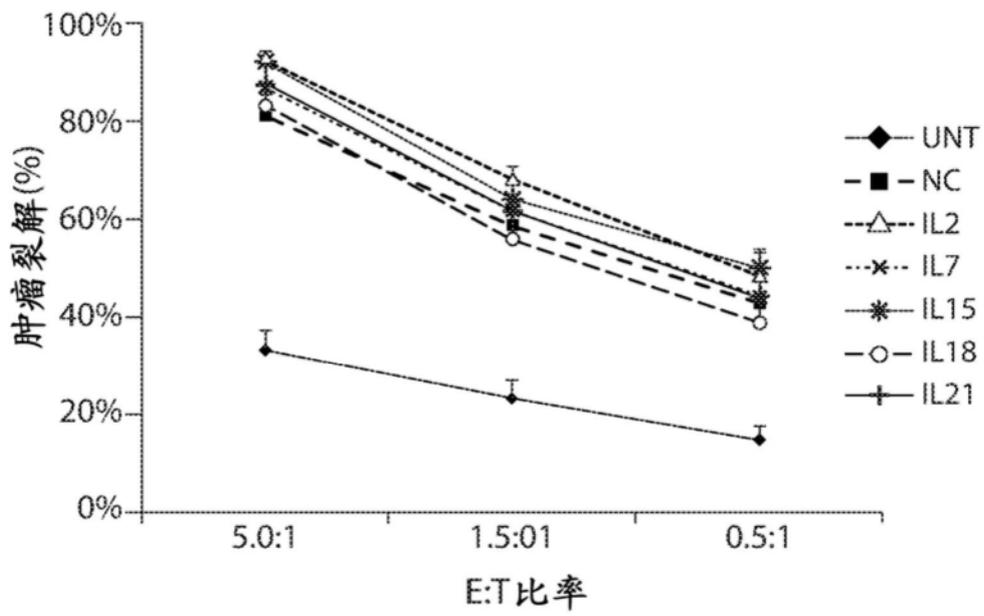


图5D

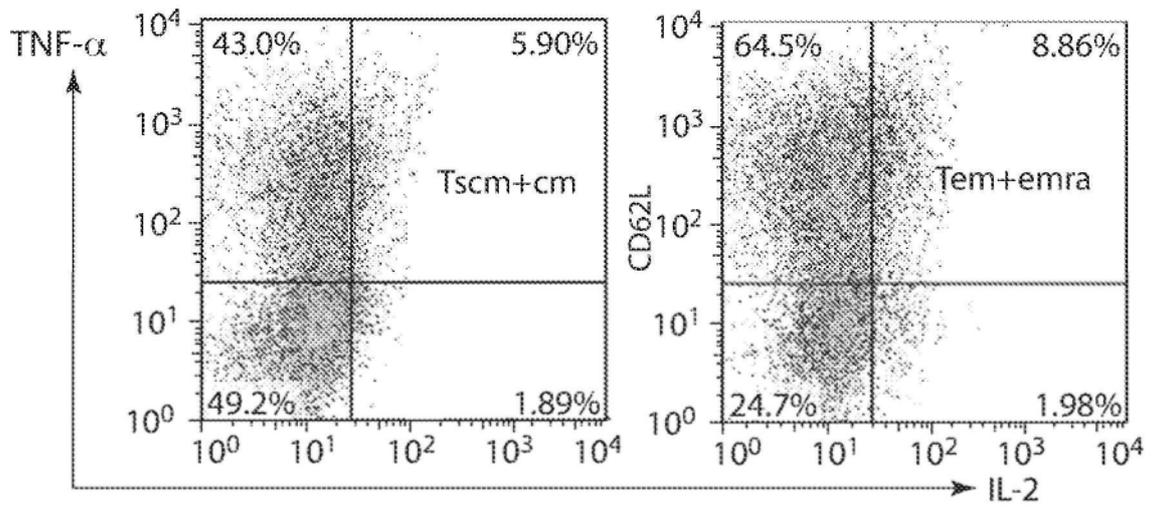


图6A

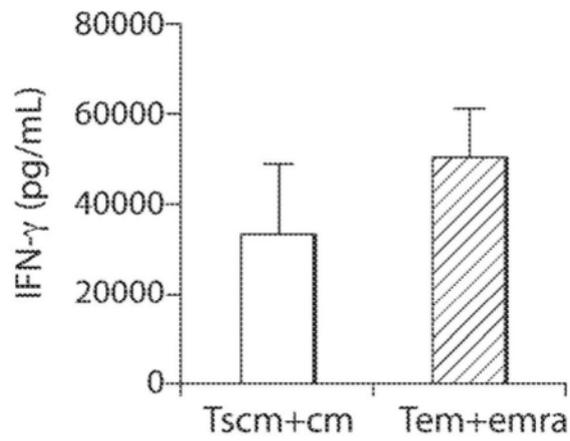


图6B

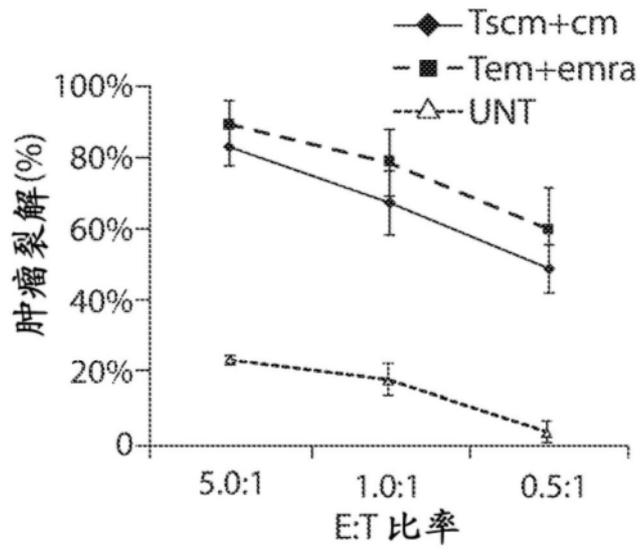


图6C

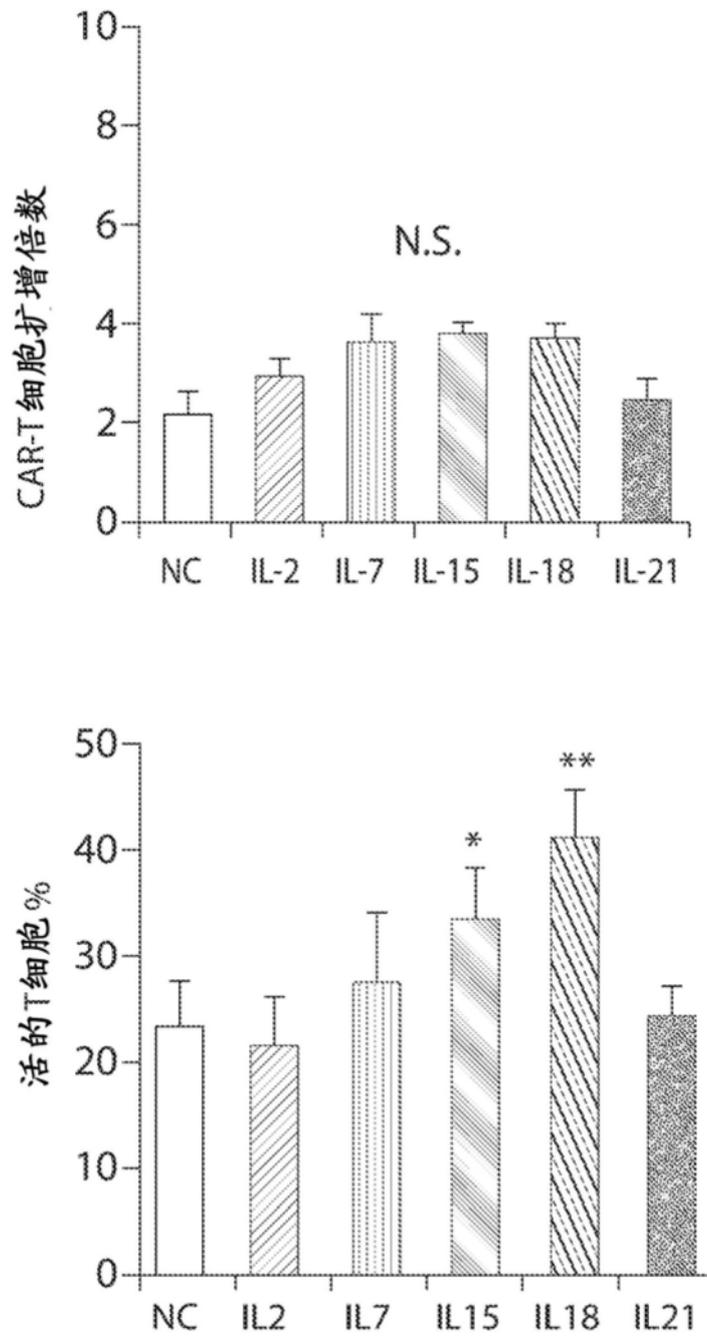


图7A

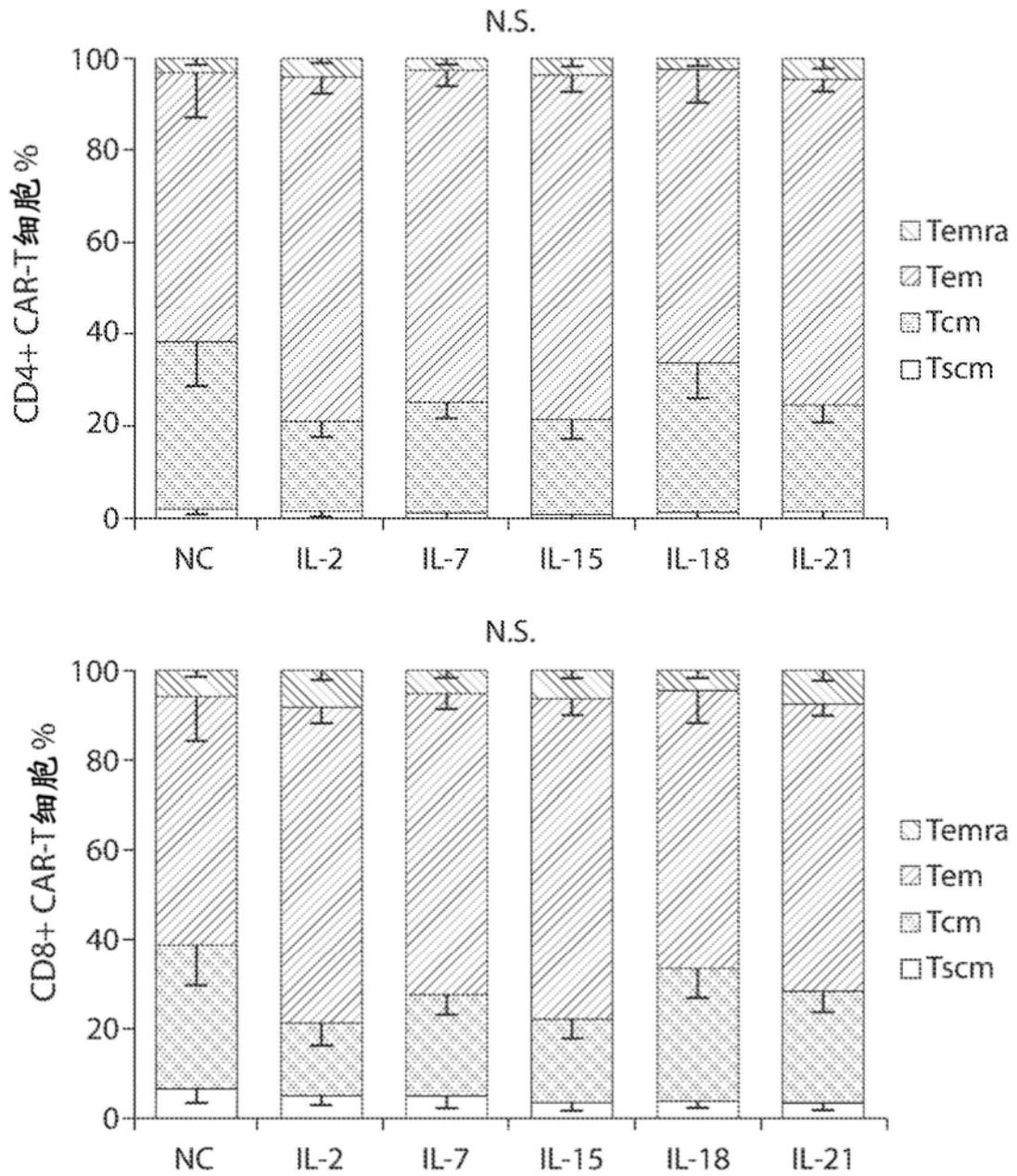


图7B

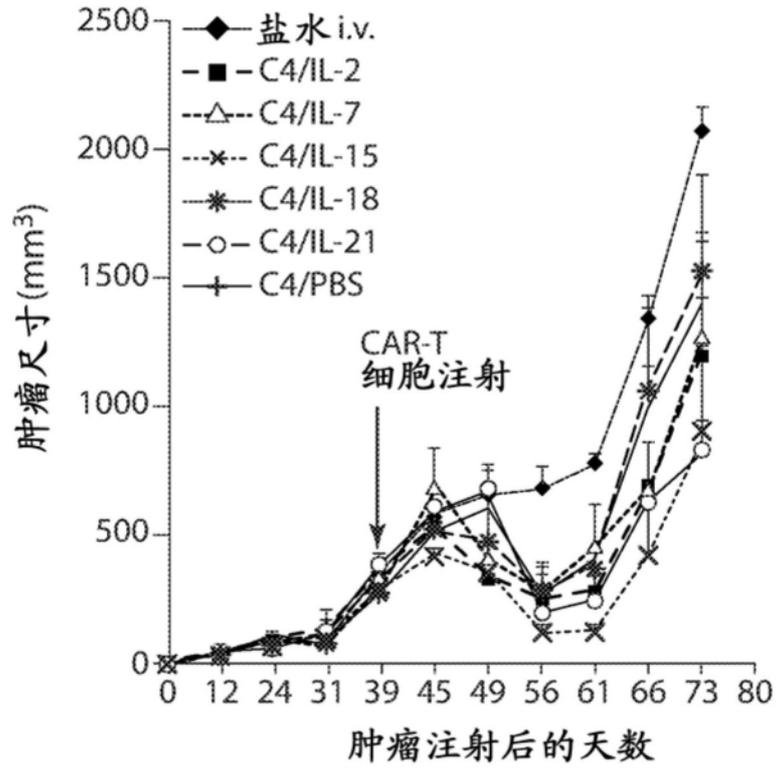


图8A

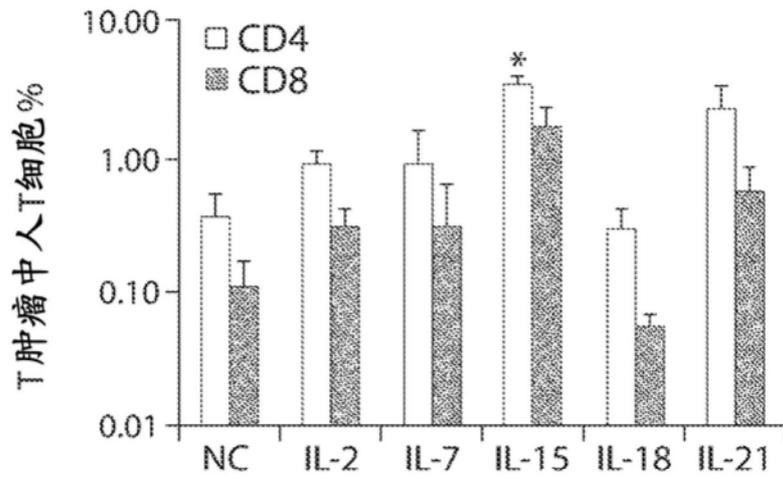


图8B

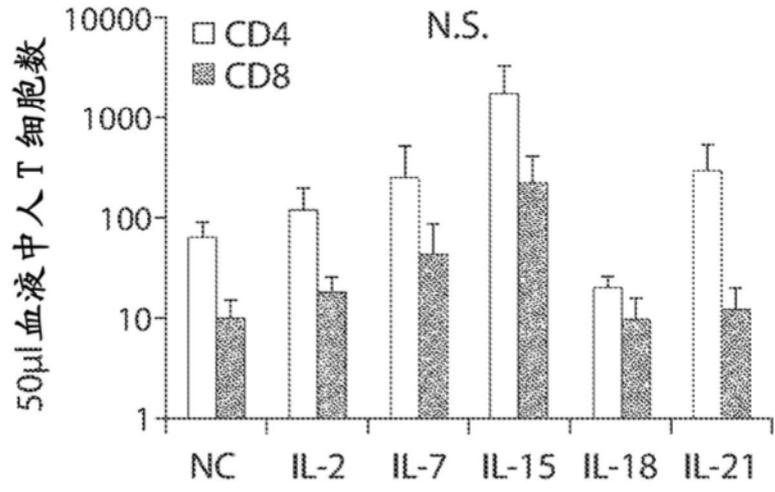


图8C

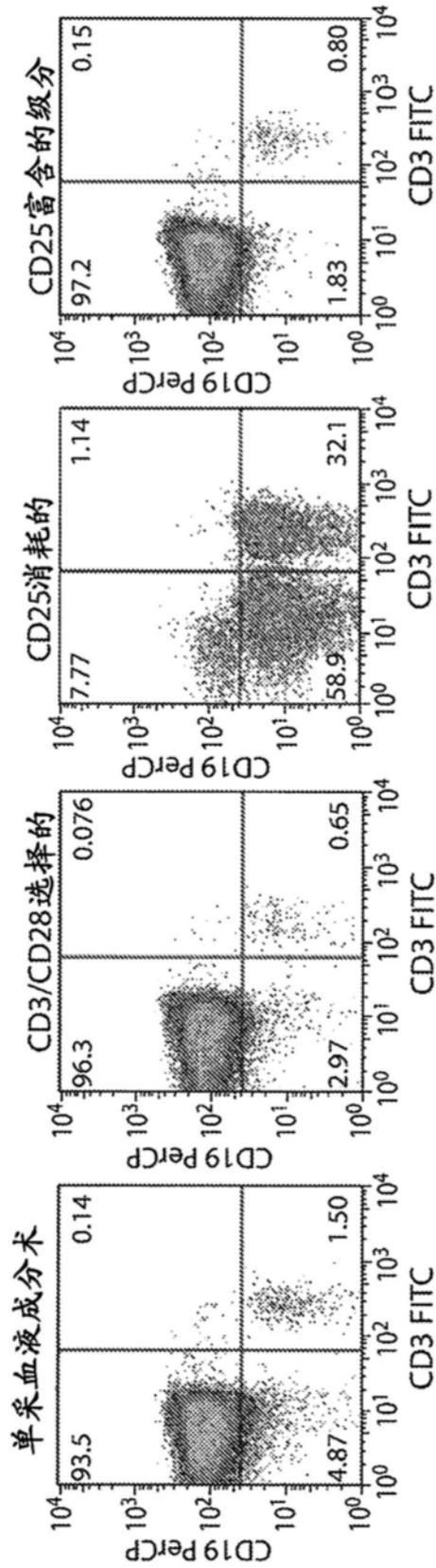


图9

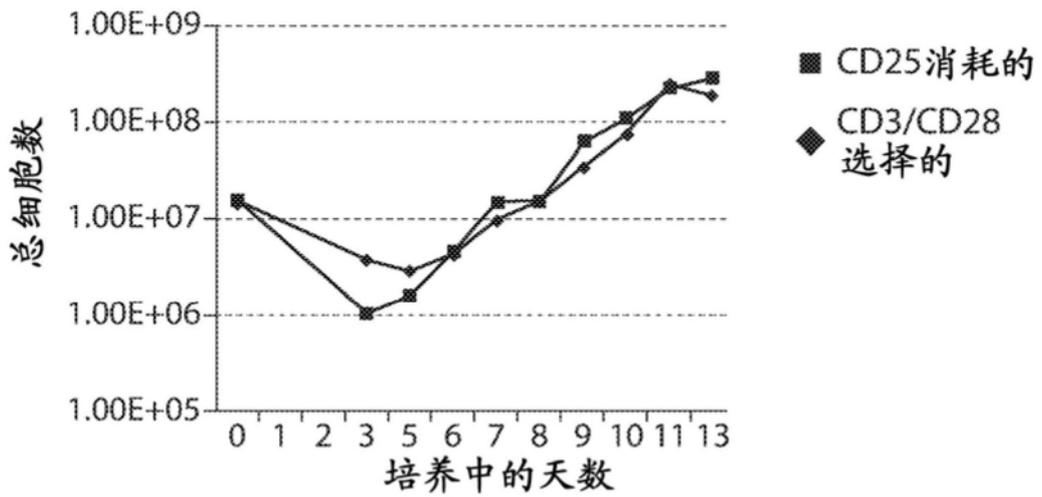


图10A

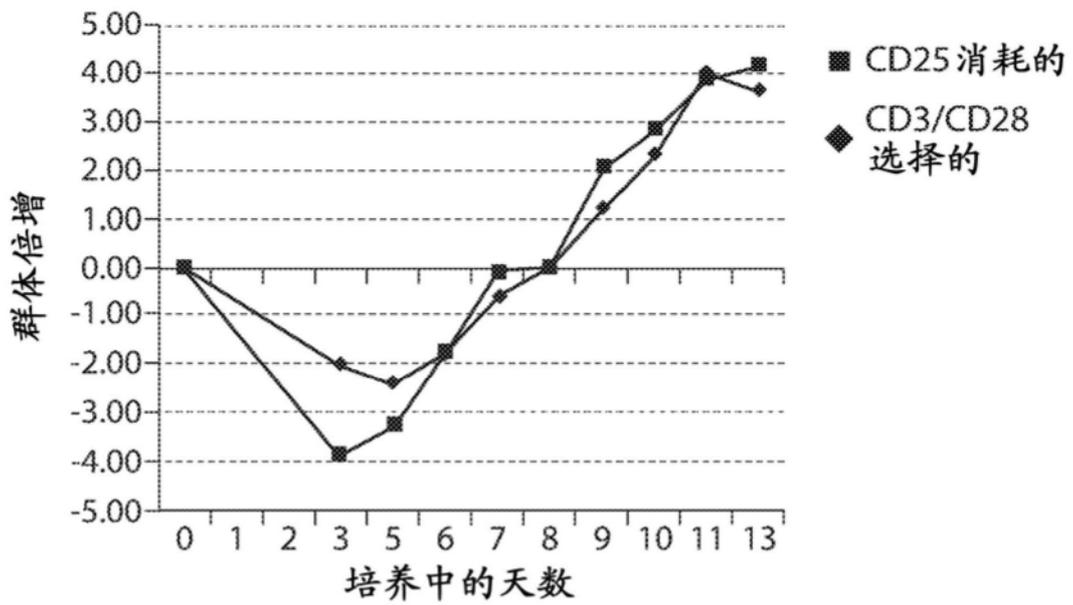


图10B

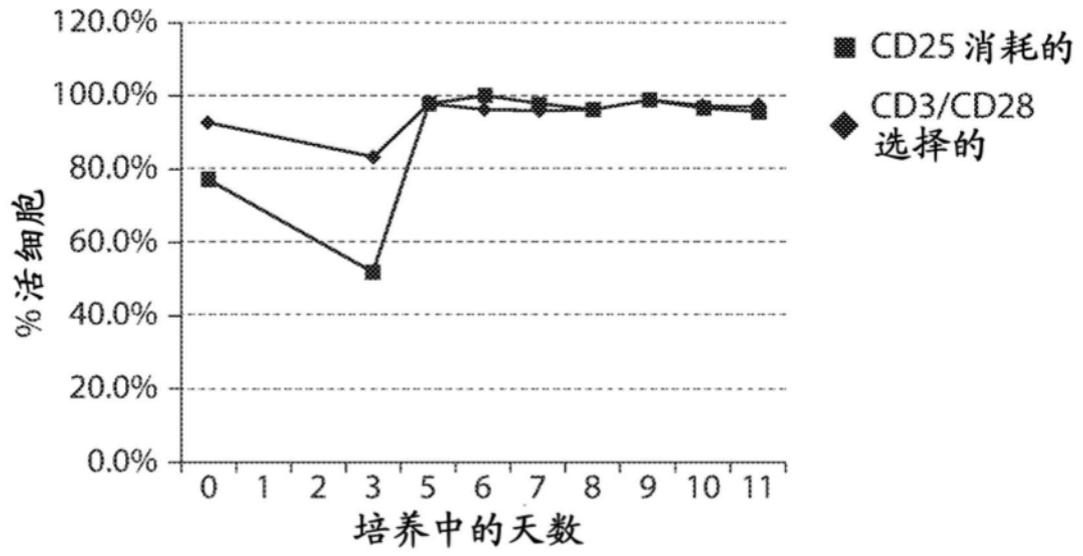


图10C

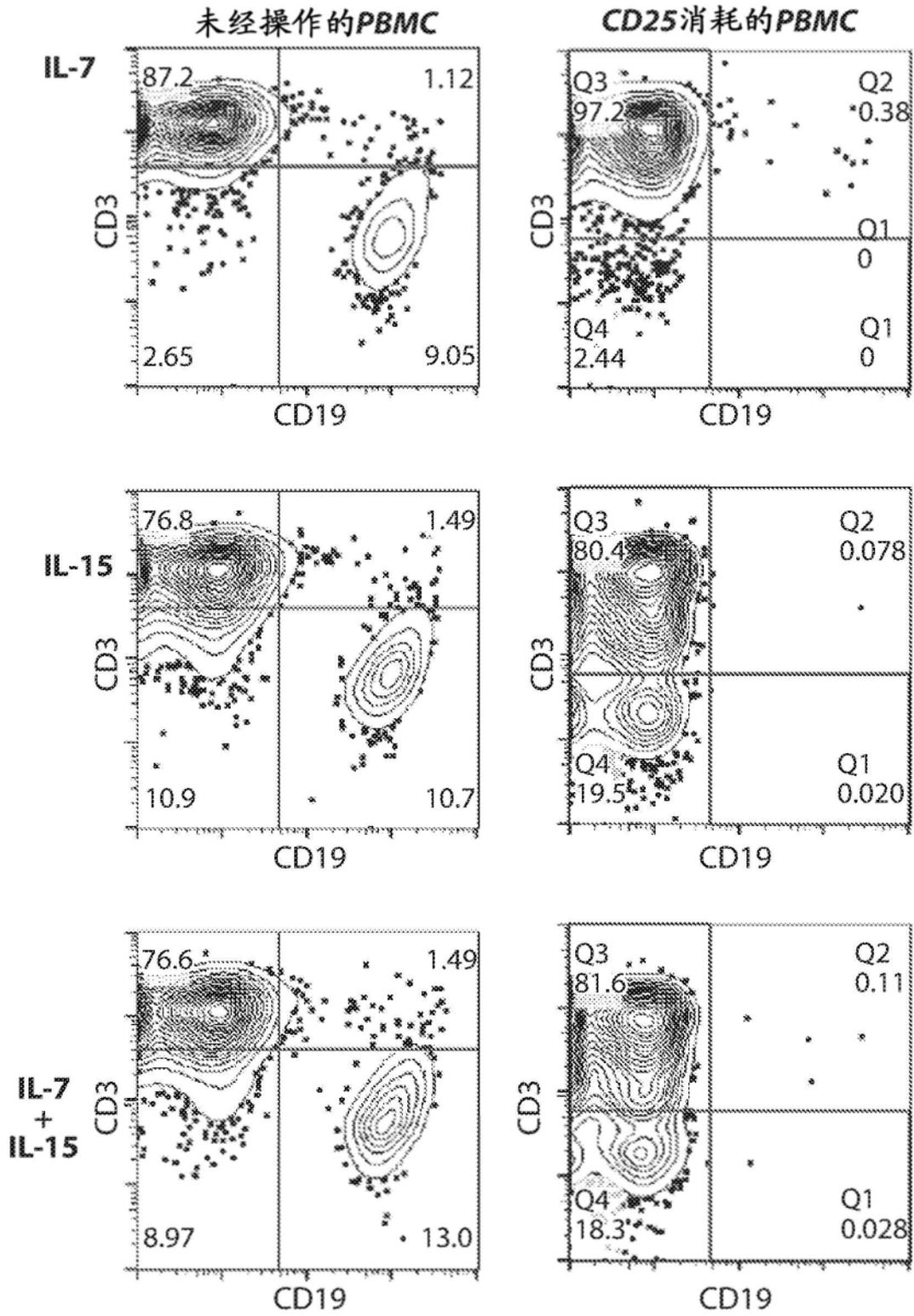


图11

ND447 PBMCs活化, 转导, 脱珠, 以及在  
第5天和第9天收获来比较体外和体内特性

用3x28珠的起初扩增谱  
用箭头指示的收获时间点

正常供体细胞

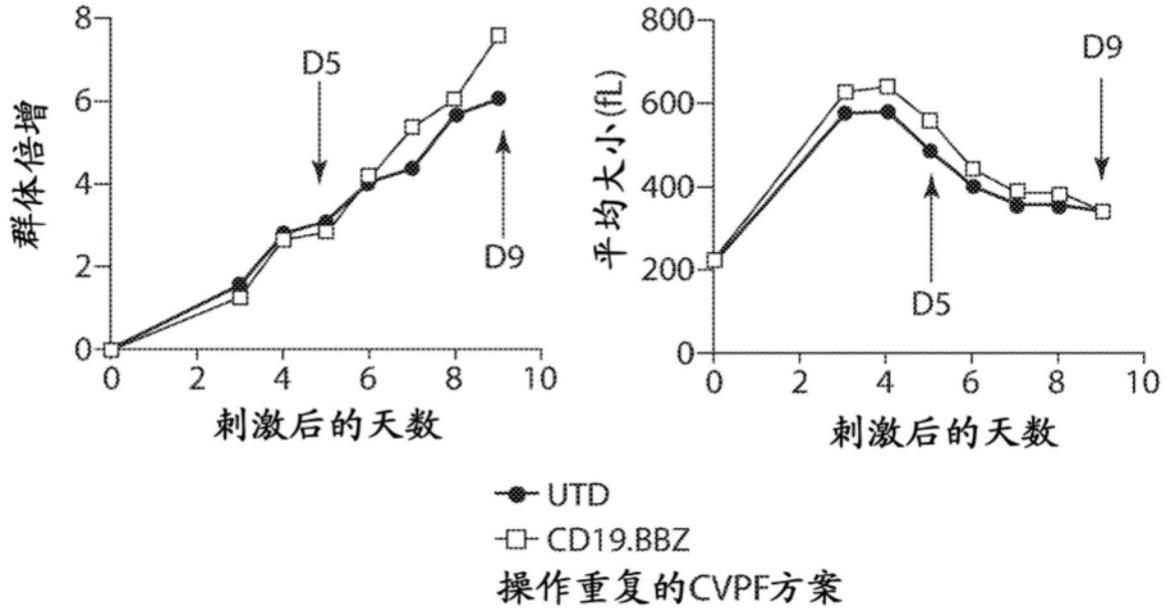


图12

来自扩增的在第 5 天和第 9 天分离的  
细胞对 CART19 细胞杀伤无差异

细胞毒性测定法(18hr)

靶: K562-CD19

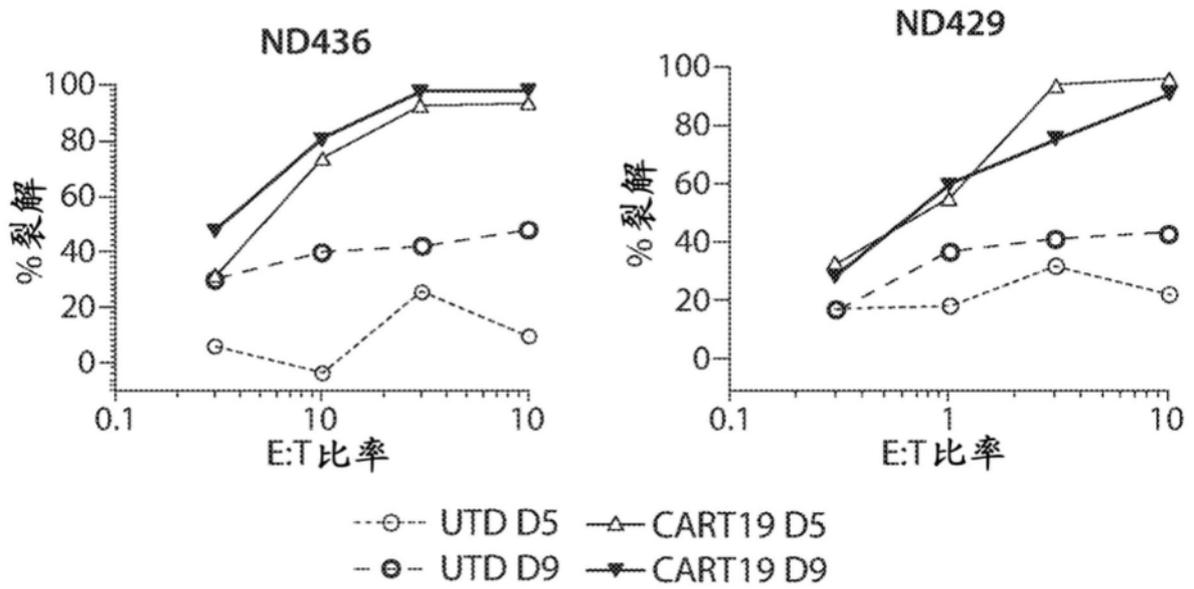


图13

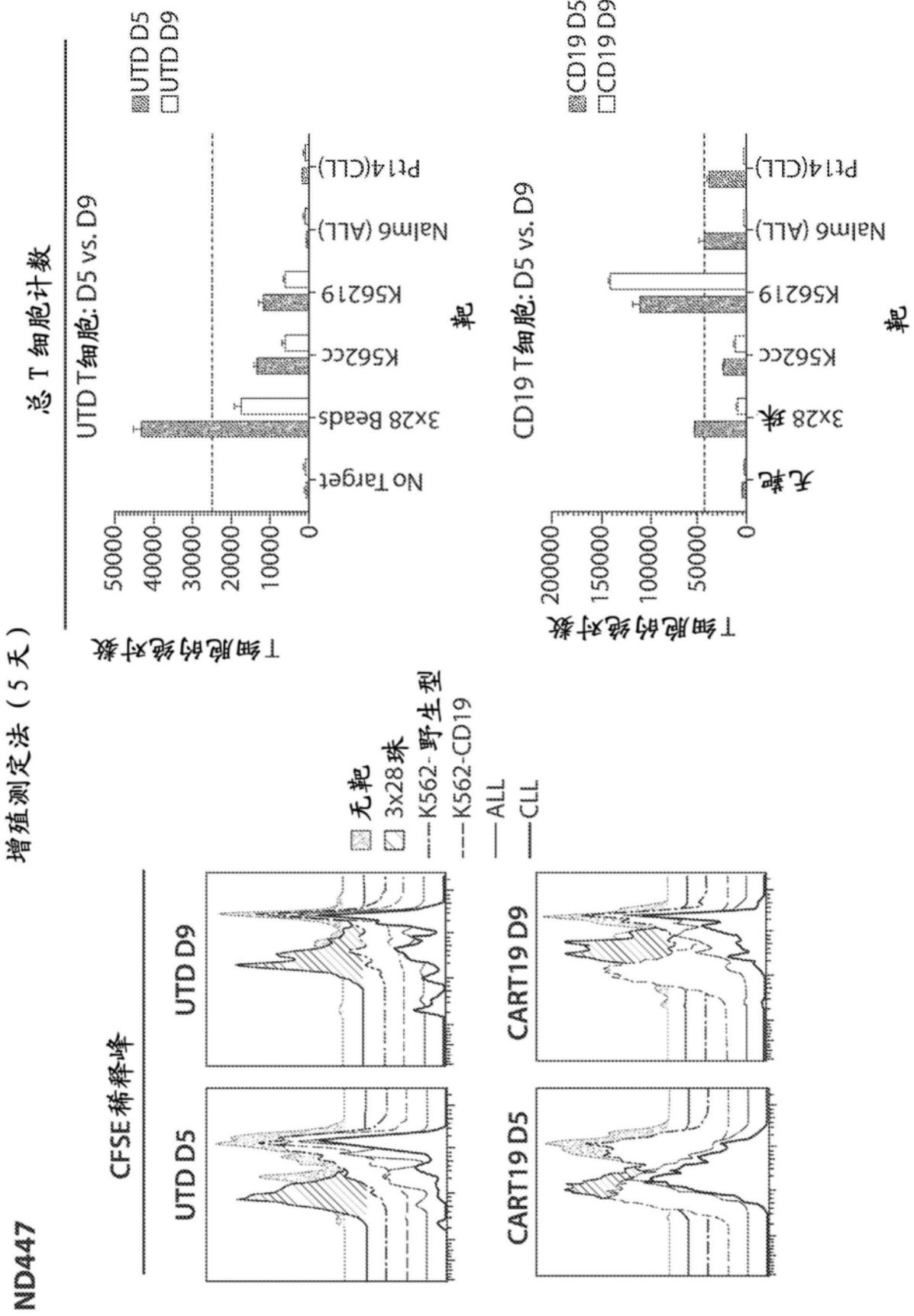


图14

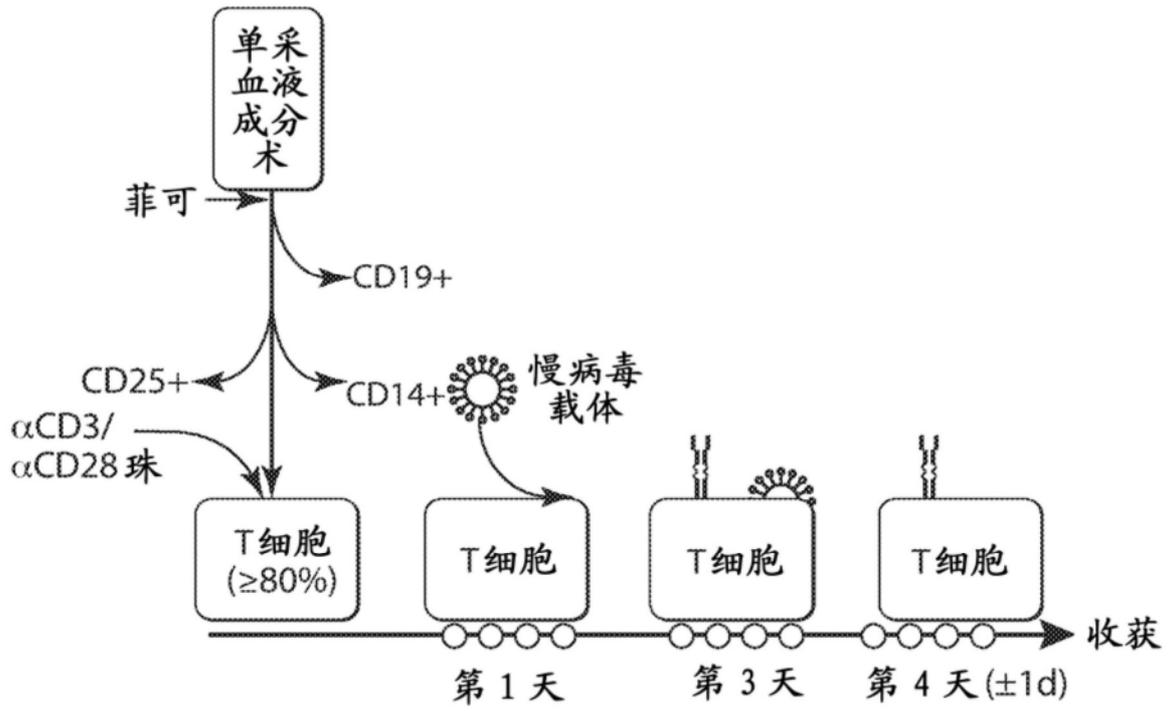


图15

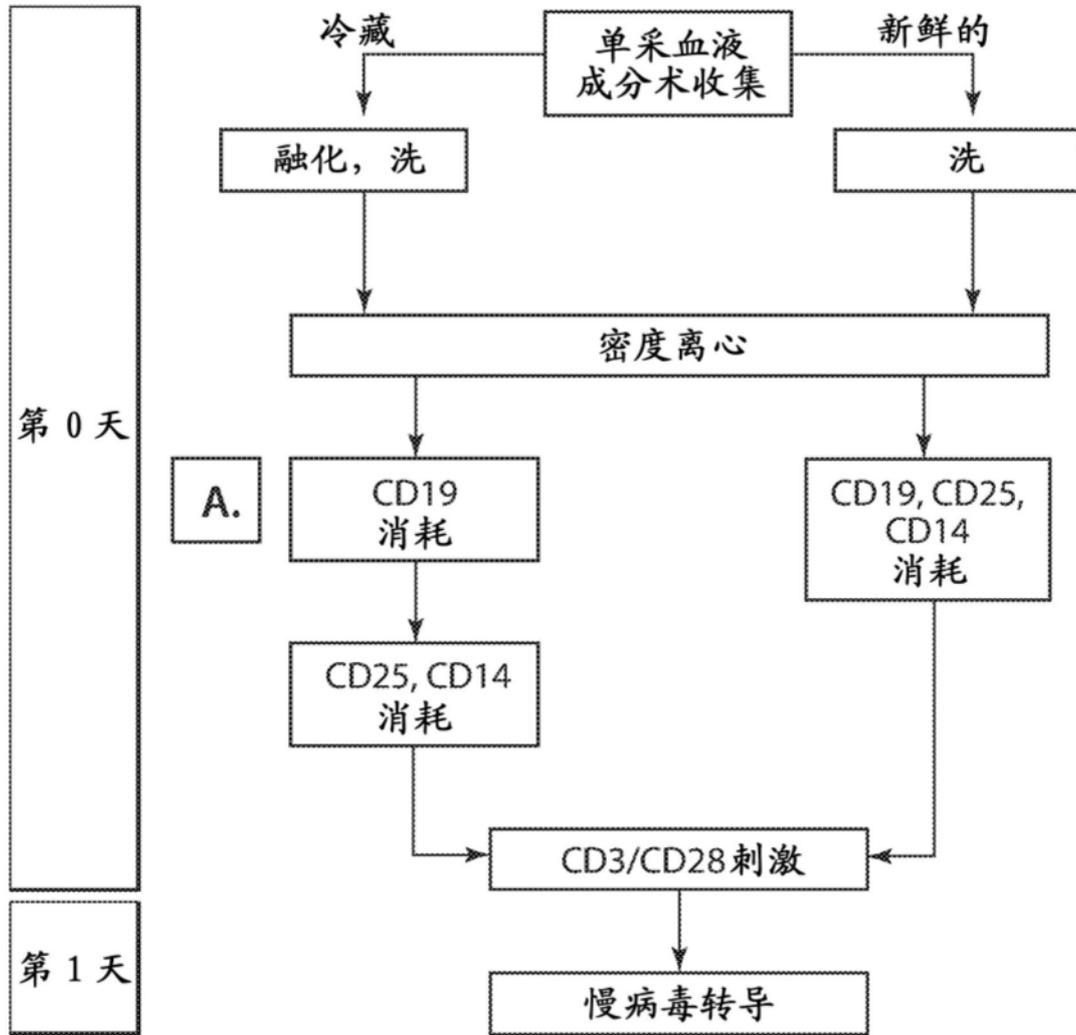


图16

用表达 CD19 的 K562s 刺激 7 天，在第 5 天收获的细胞的增殖好于在第 9 天收获的细胞

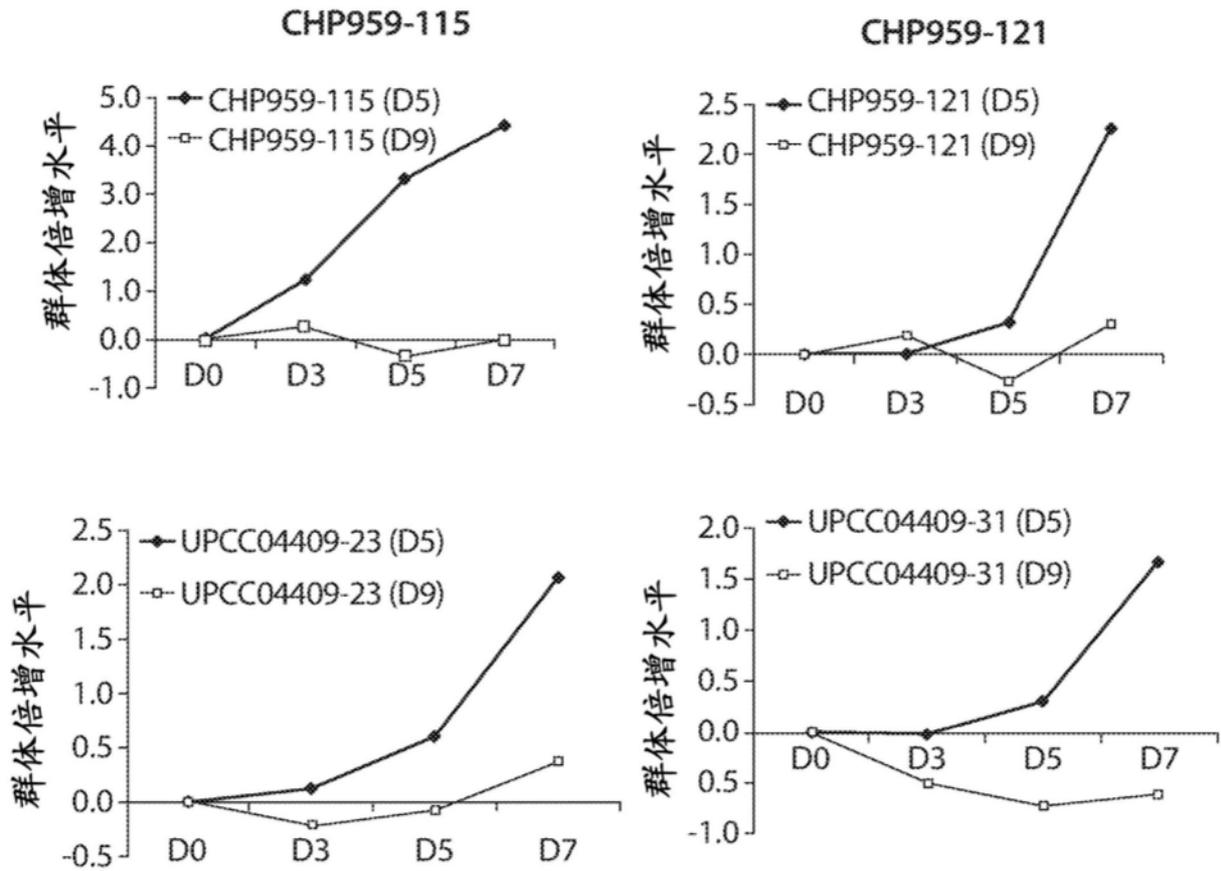


图17

识别靶后第 5 天收获的 CART19 细胞  
更高或可比较的细胞因子产生

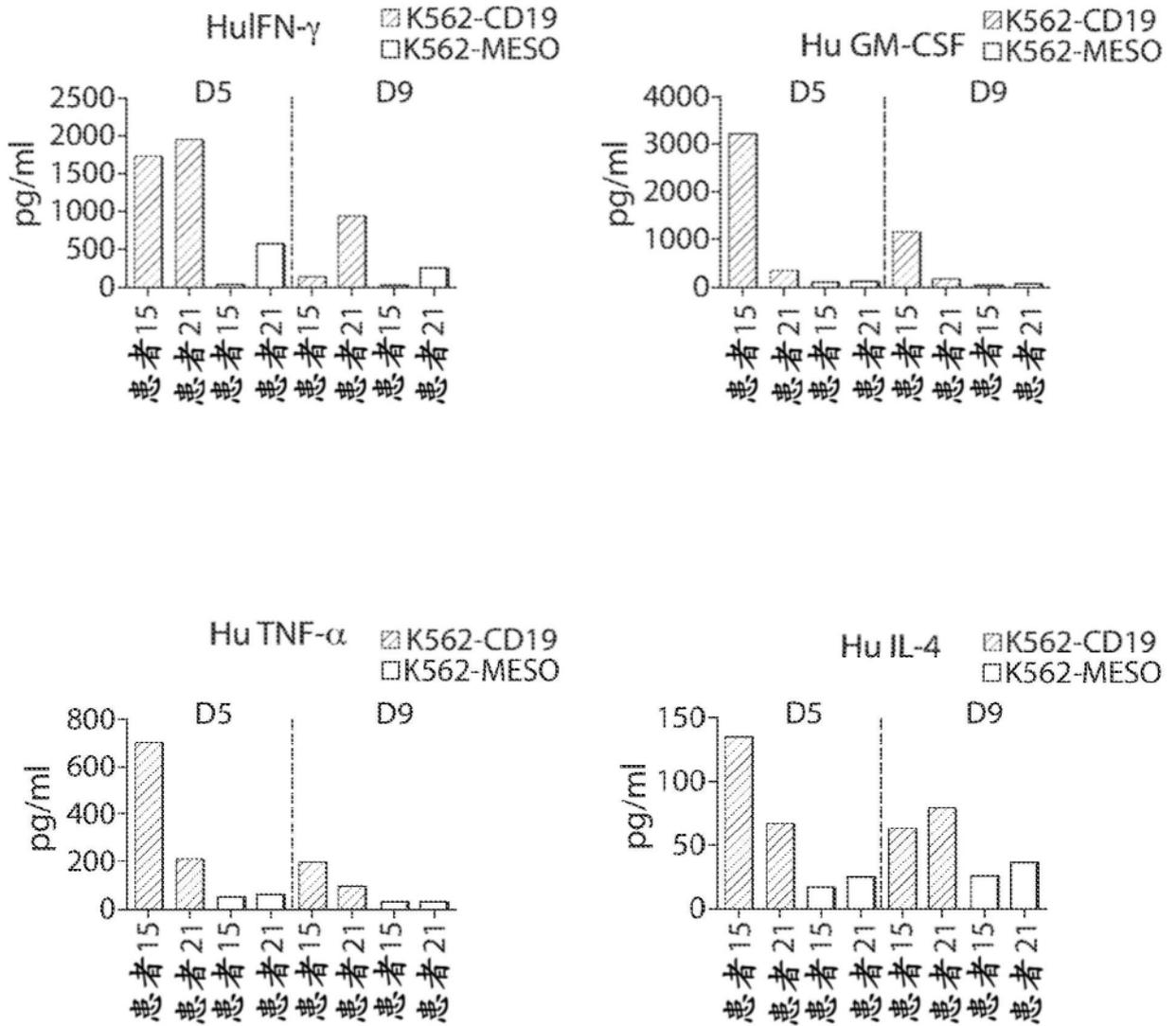
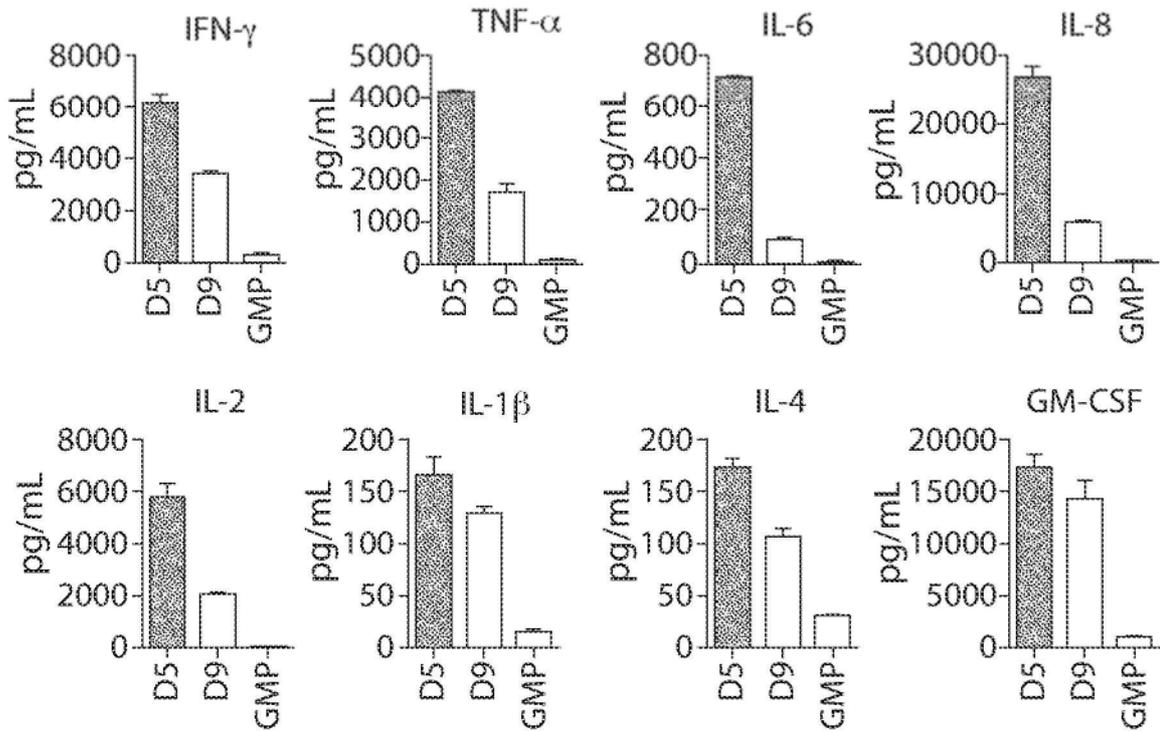


图18

识别靶后第 5 天收获的 CART19 细胞中  
产生增加水平的多种细胞因子

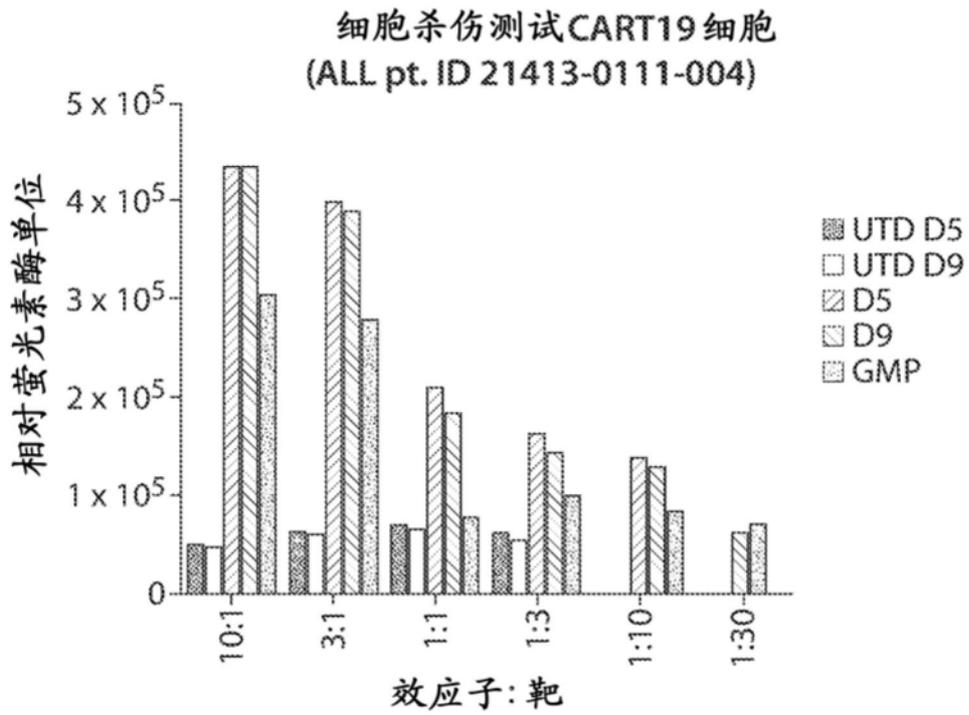
ALL pt. ID 21413\_0111\_004



- CART19细胞用抗CAR19-独特型-Ab-包被珠或对照珠刺激 24h
- 用对照珠没有检测到细胞因子或检测到低水平(<200 pg/ml)细胞因子

图19

在第 5 天收获的 CART19 细胞具有更好的细胞杀伤能力

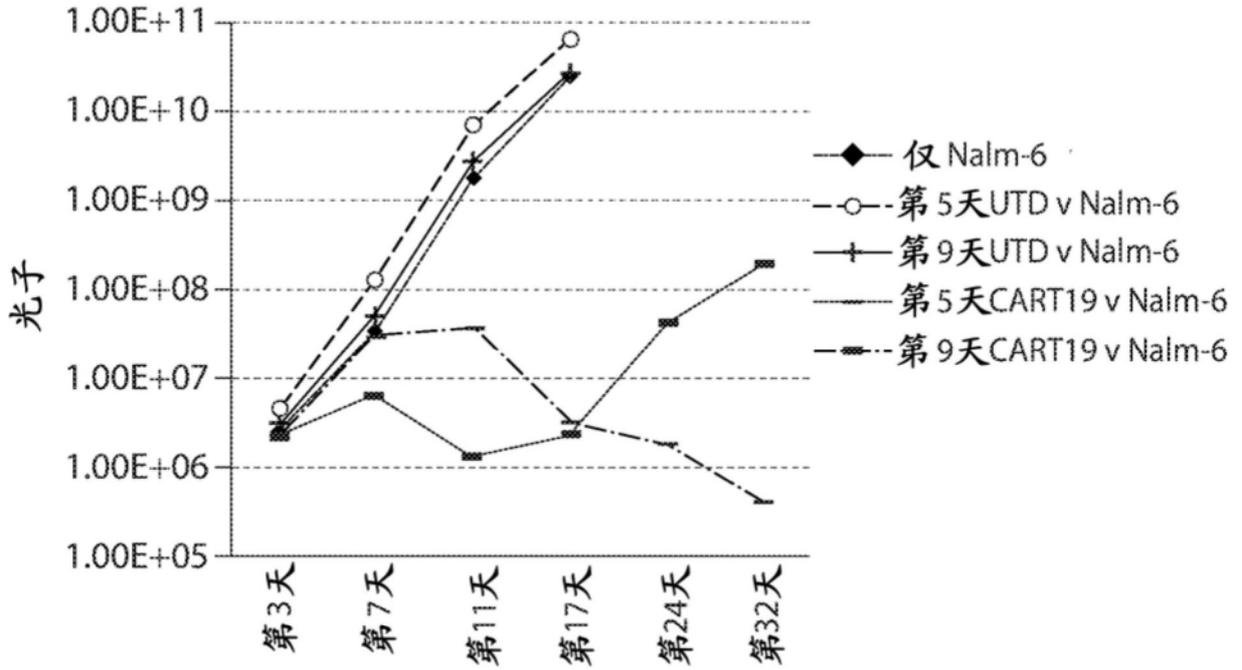


- CART19 细胞与NALM6-Luc 细胞以增加的E:T比率共培养 16 小时
- 通过萤光素酶测定法检测总细胞裂解物

图20

在第5天收获的CART19细胞  
具有更好的体内长期细胞杀伤能力

Nalm 6 第5天 vs. 第9天 10/08/2014



- 10<sup>6</sup> NALM6 (CBG/GFP+)/小鼠
- 10<sup>6</sup> CART19 或 UTD/小鼠

图21

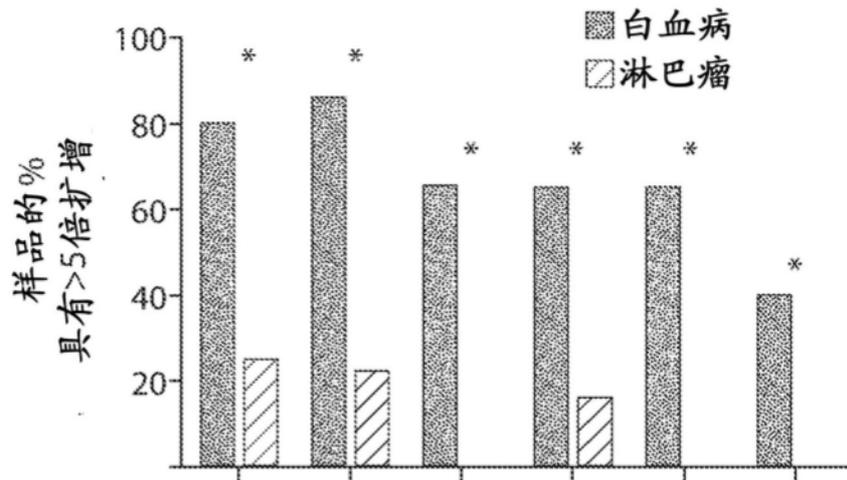


图22A

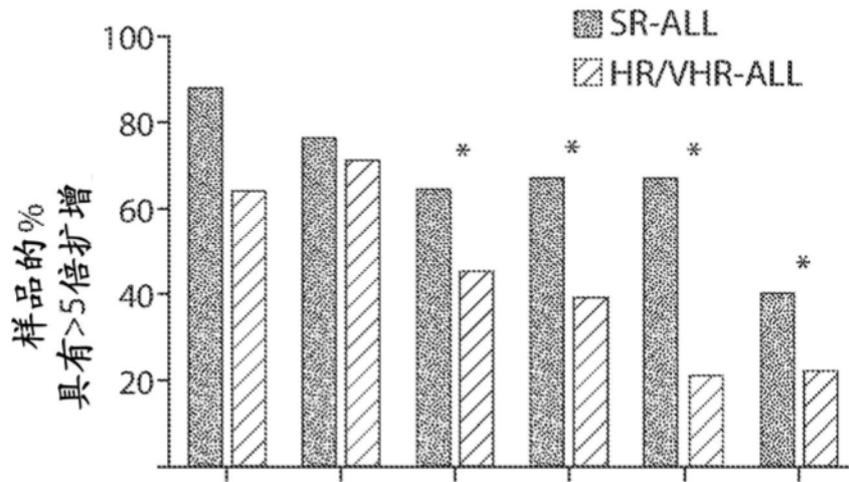


图22B

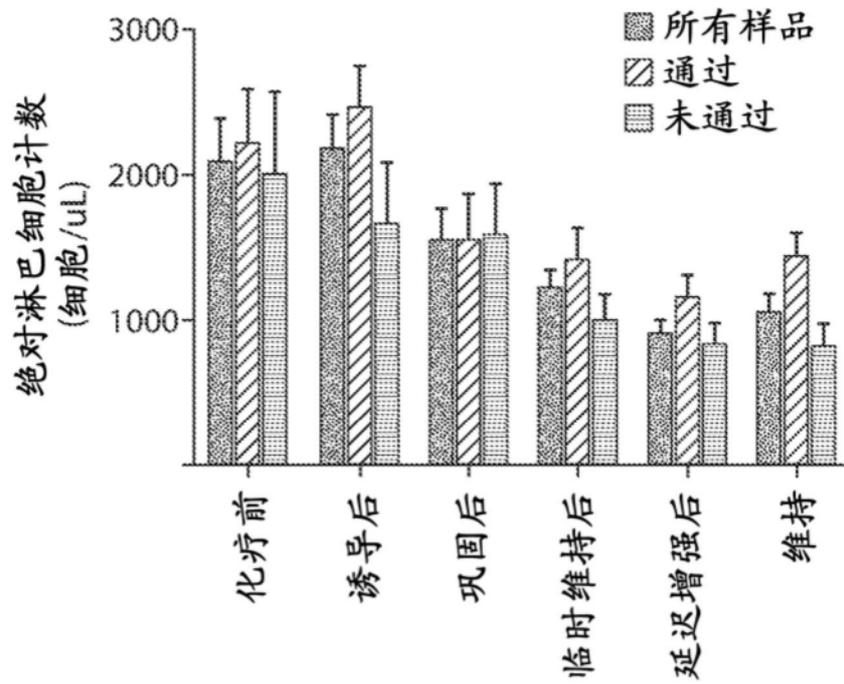


图22C

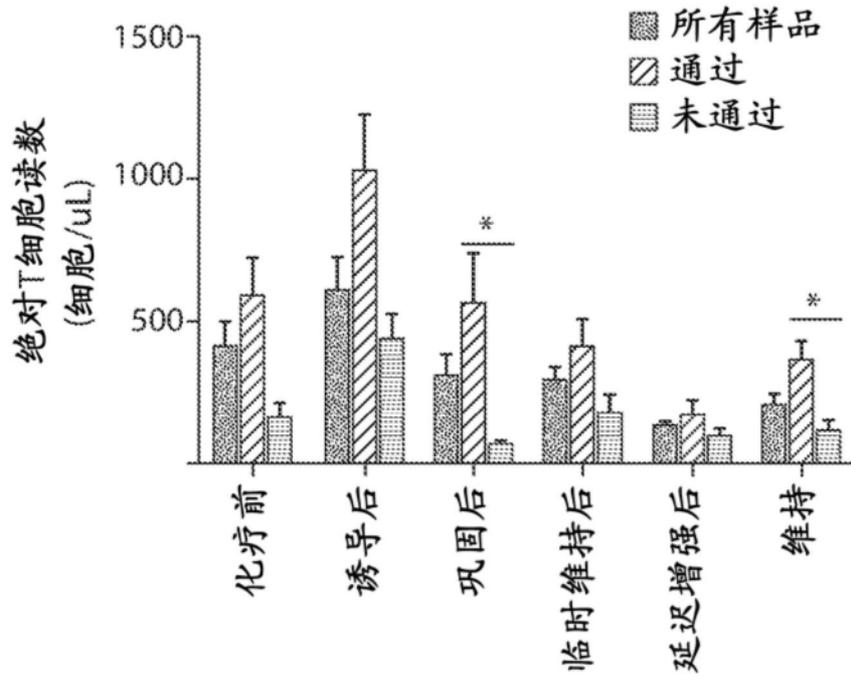


图22D

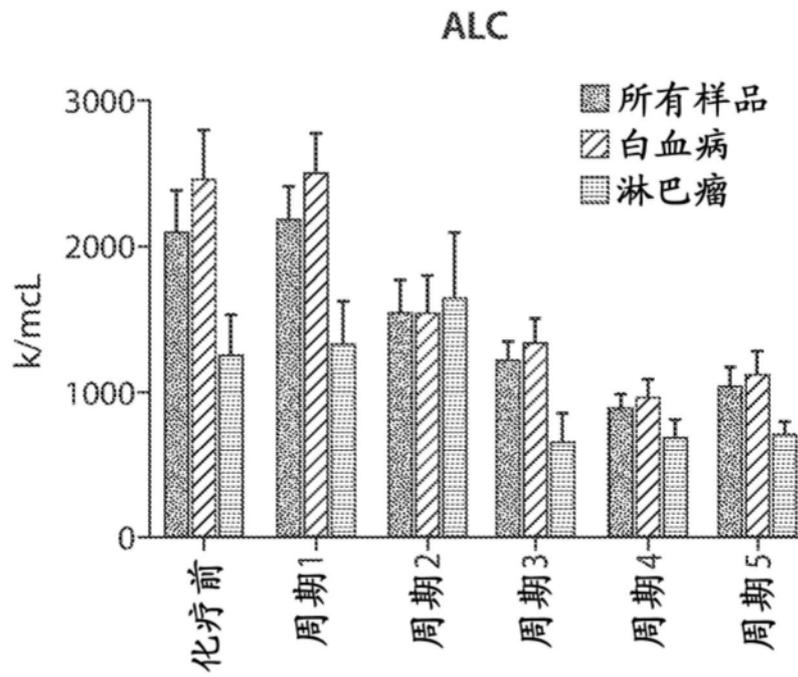


图22E

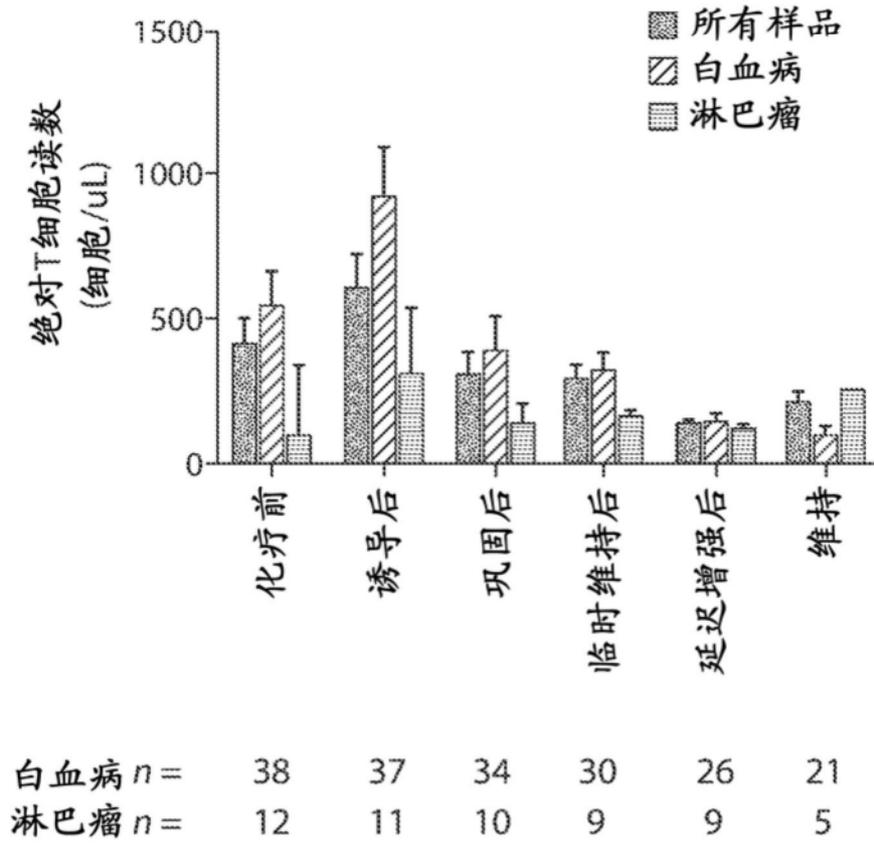


图22F

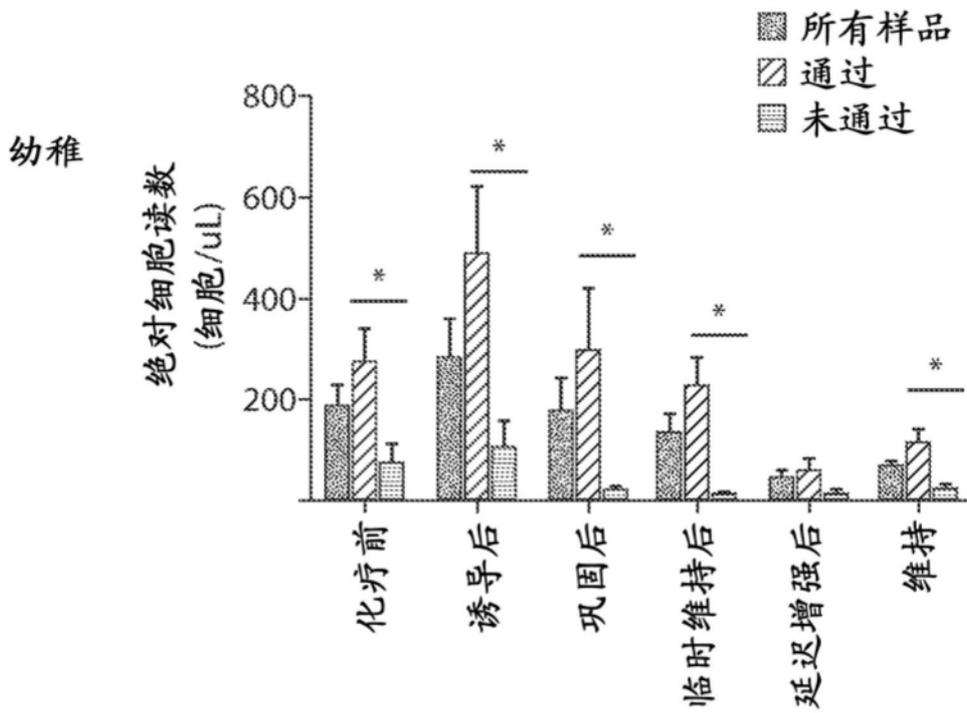


图23A

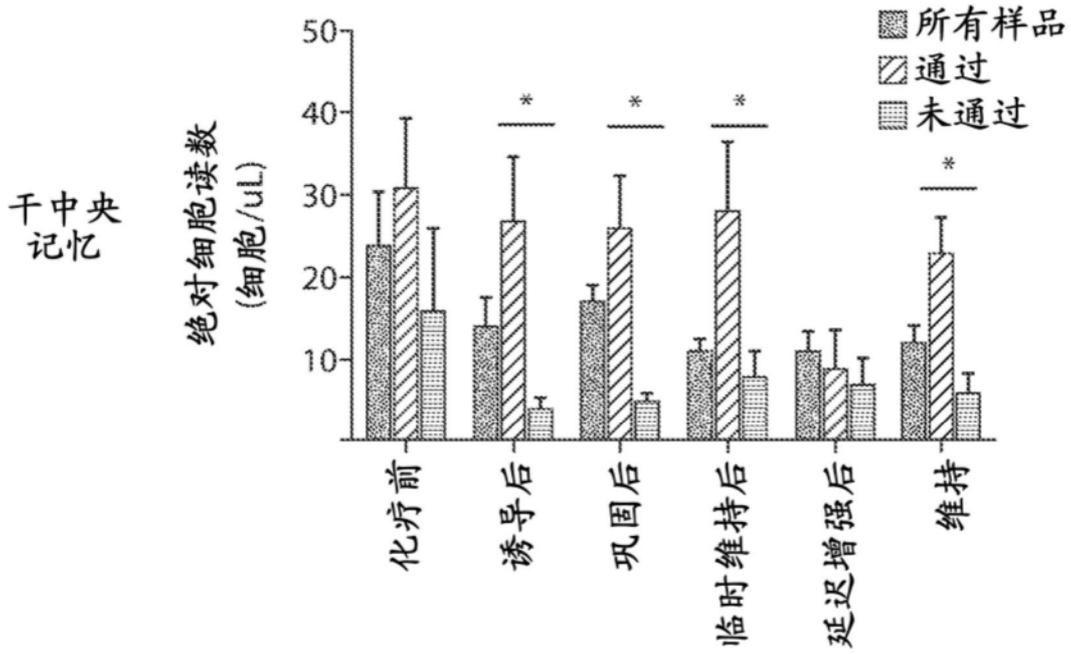


图23B

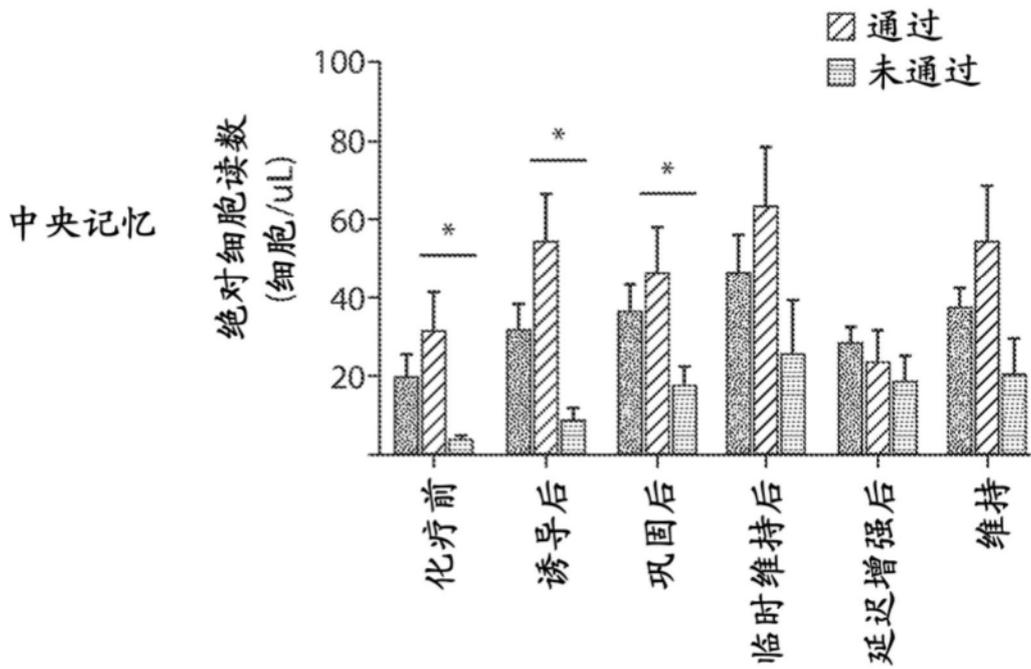


图23C

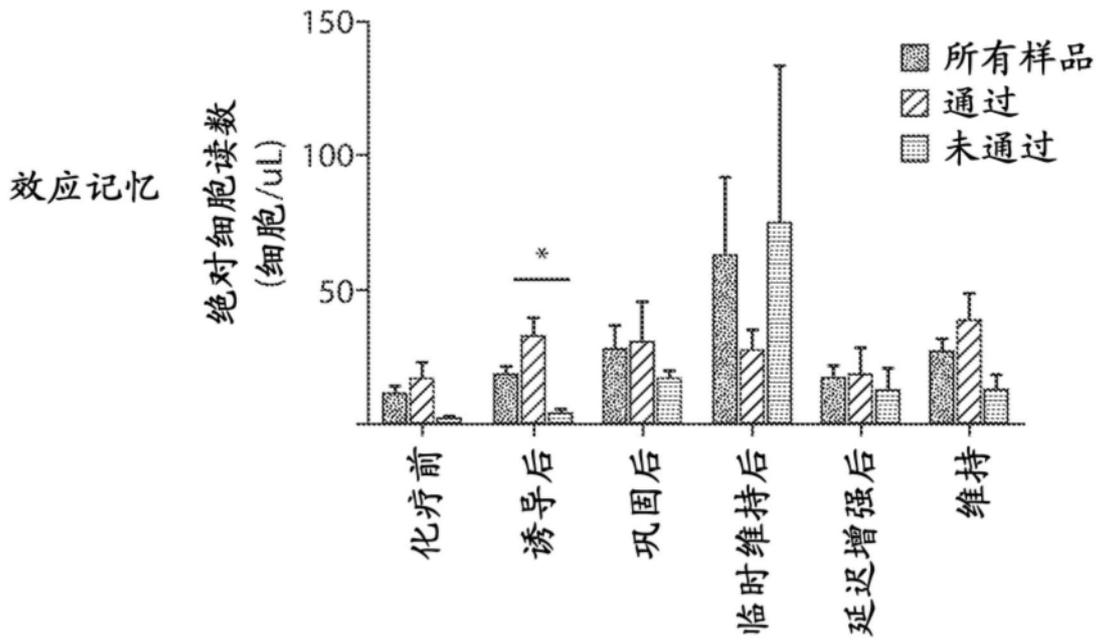


图23D

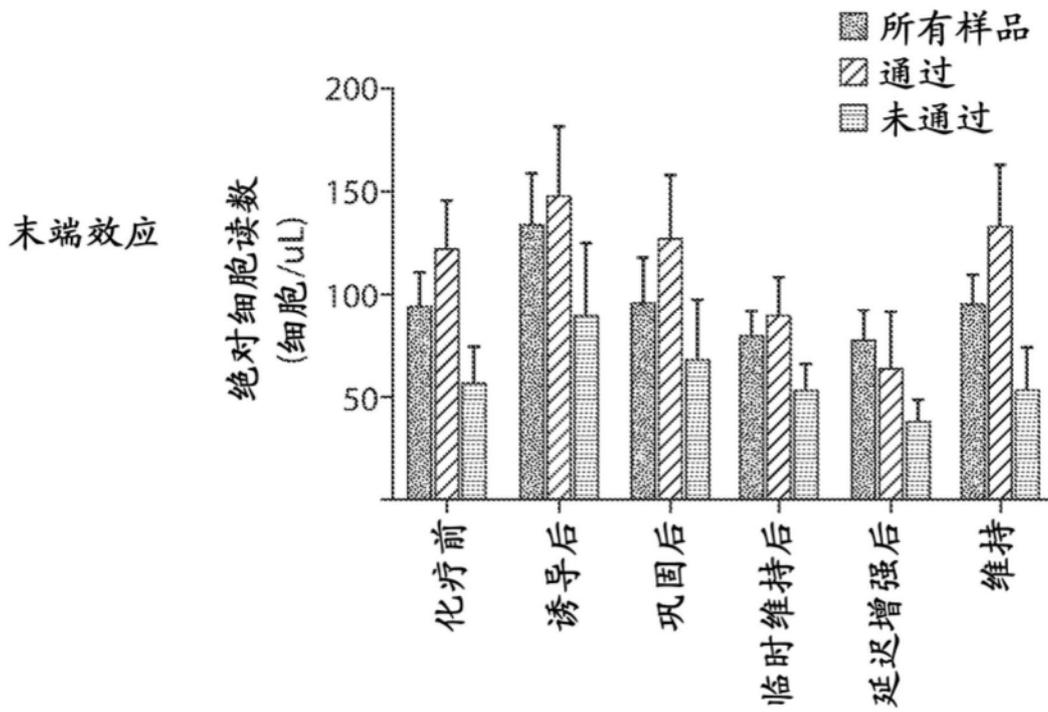


图23E

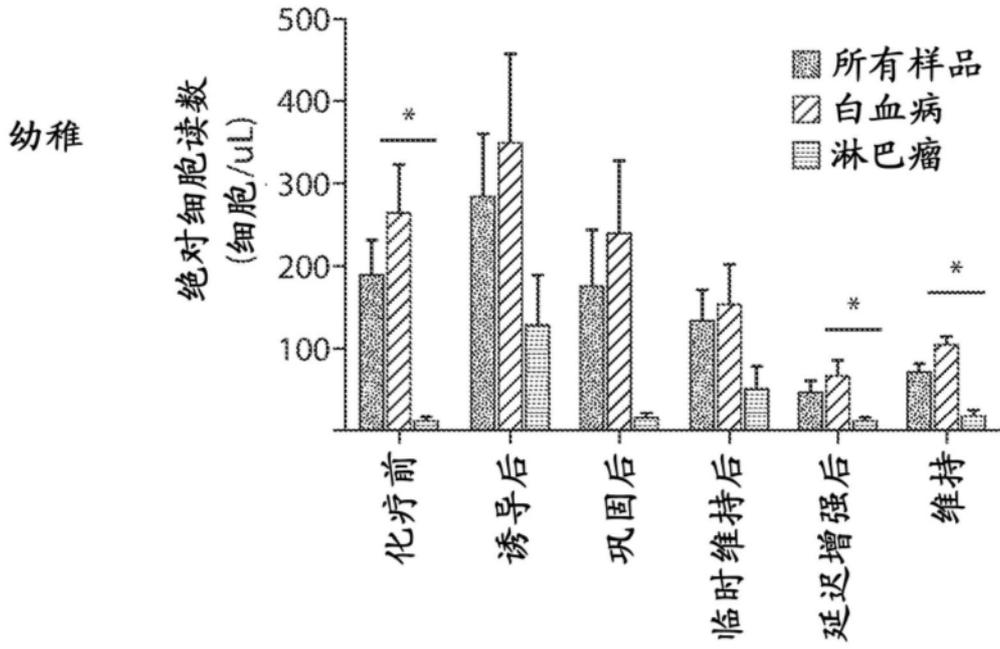


图23F

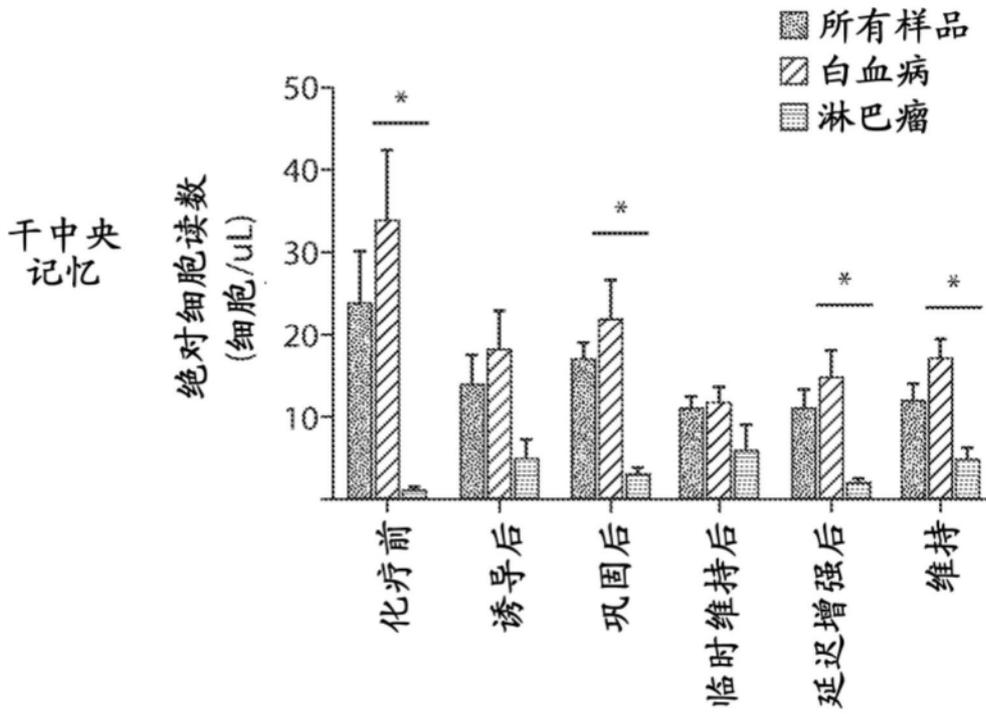


图23G

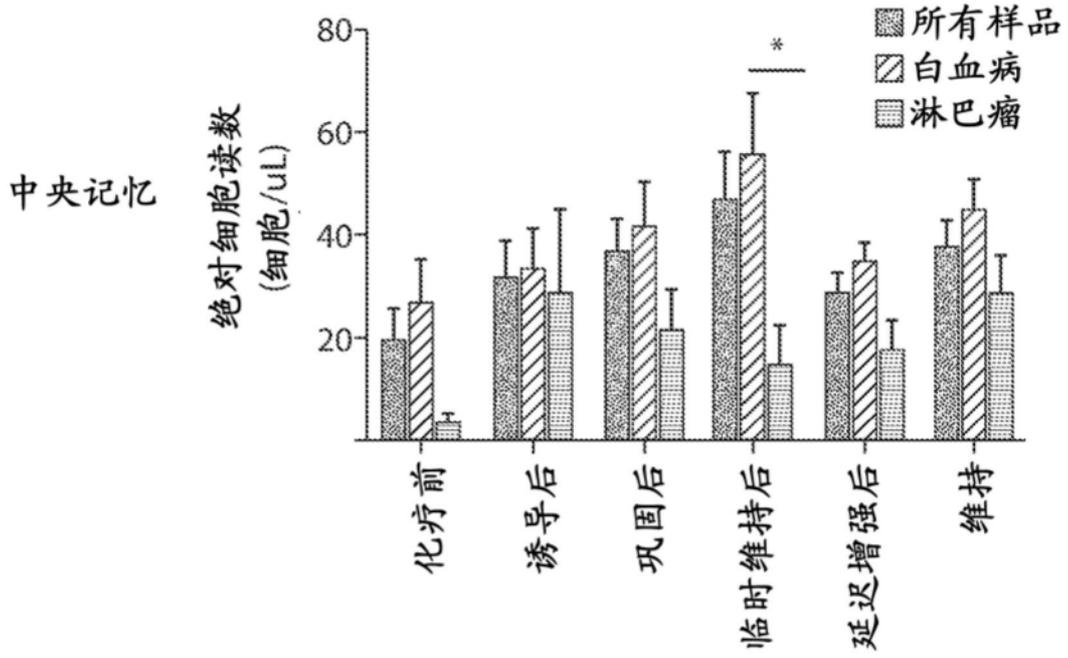


图23H

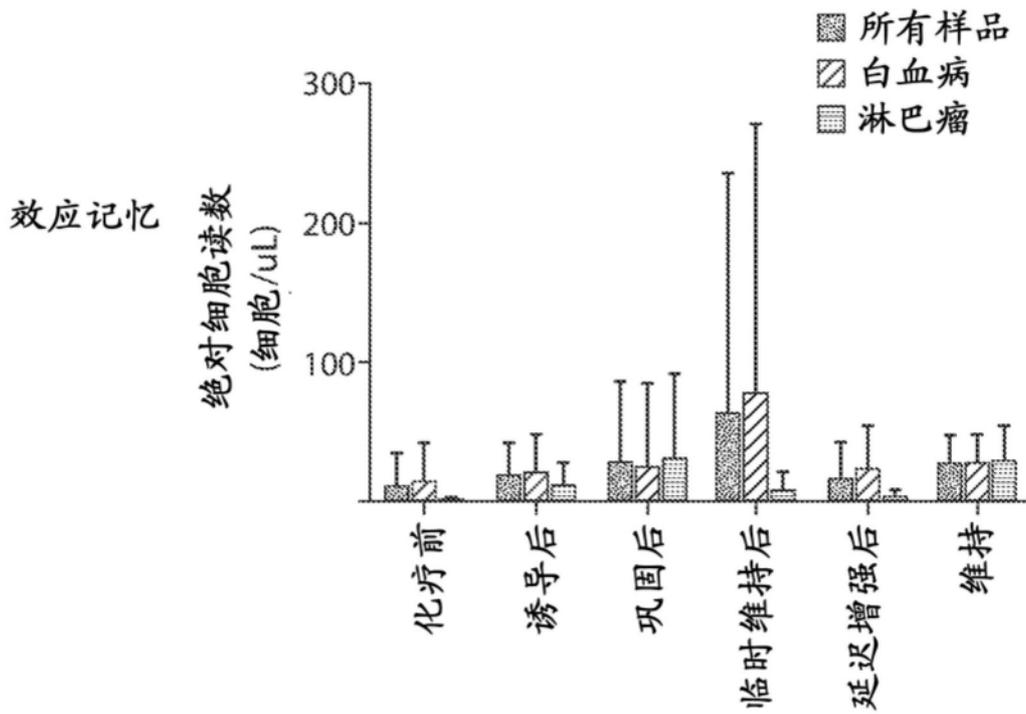


图23I

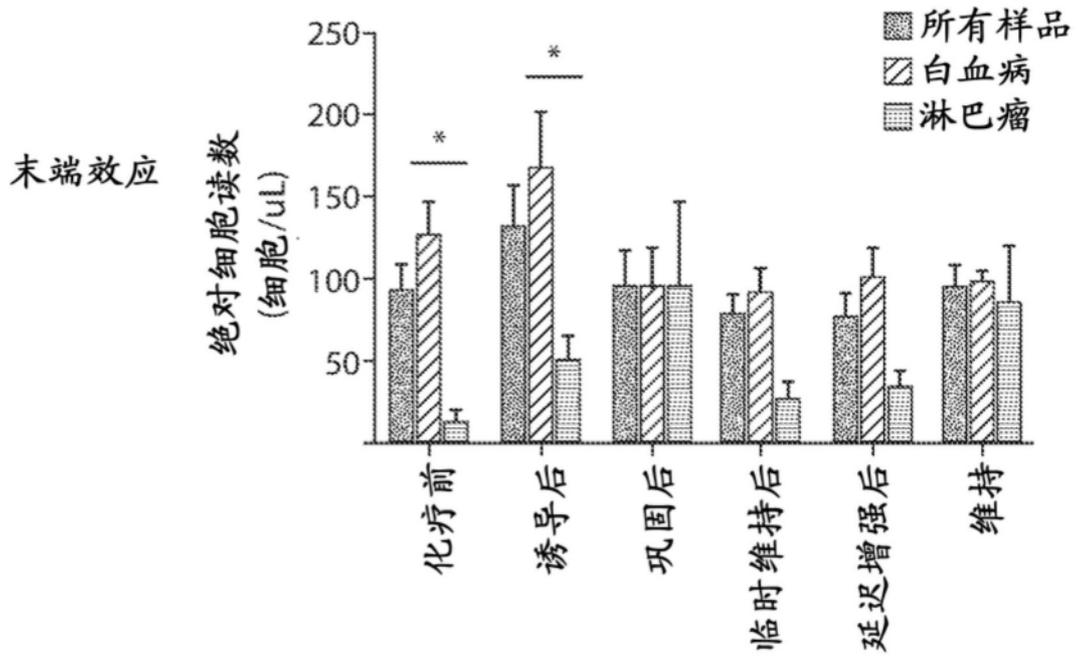


图23J

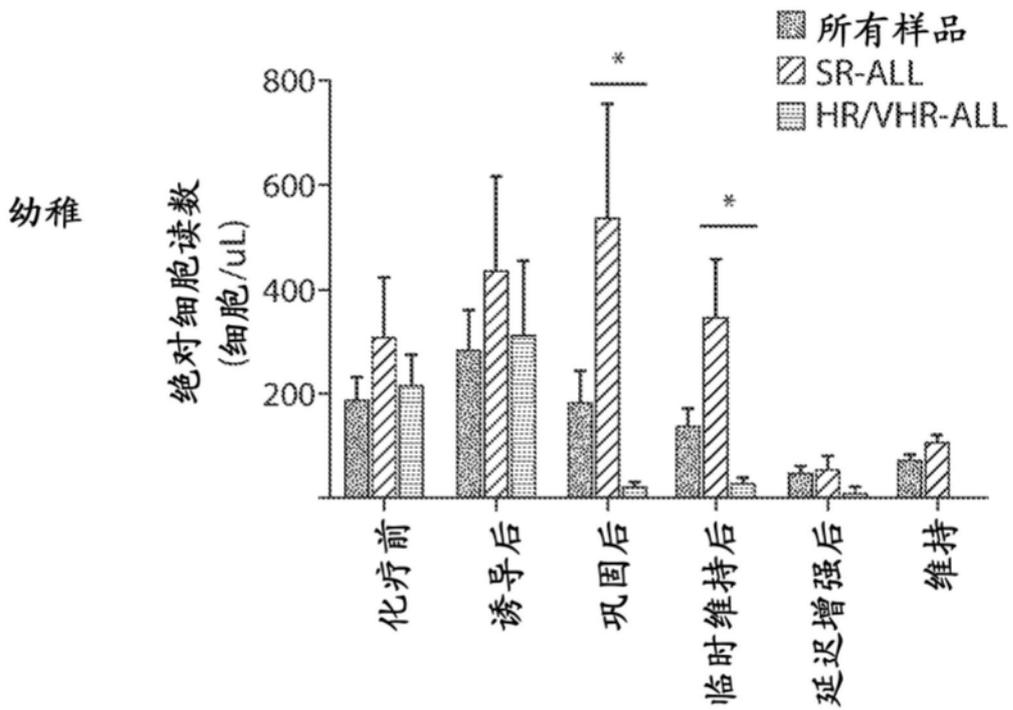


图23K

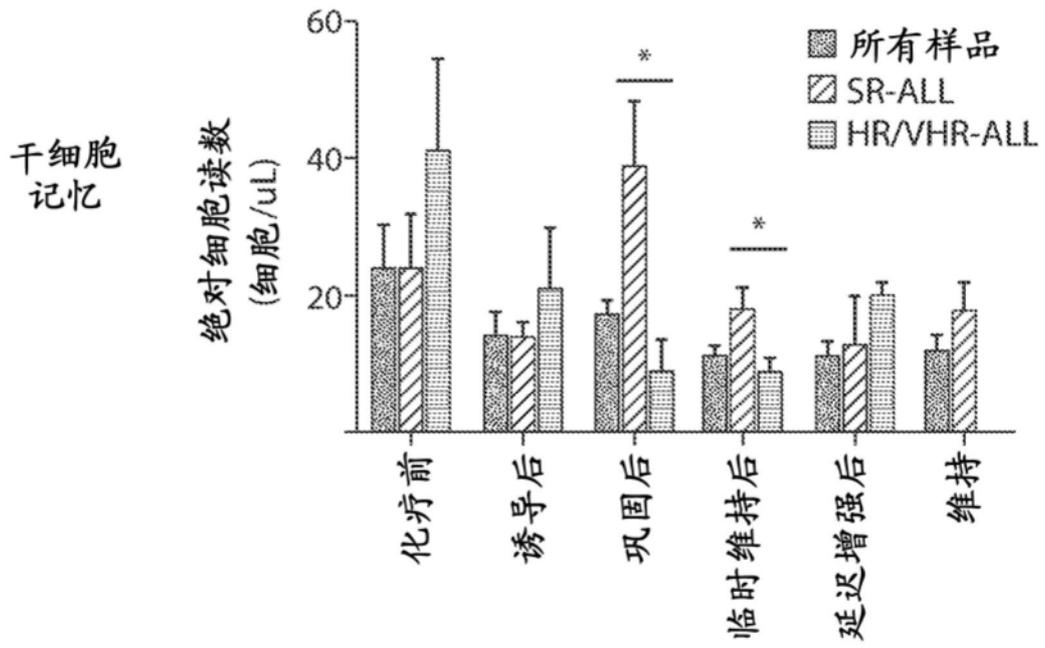


图23L

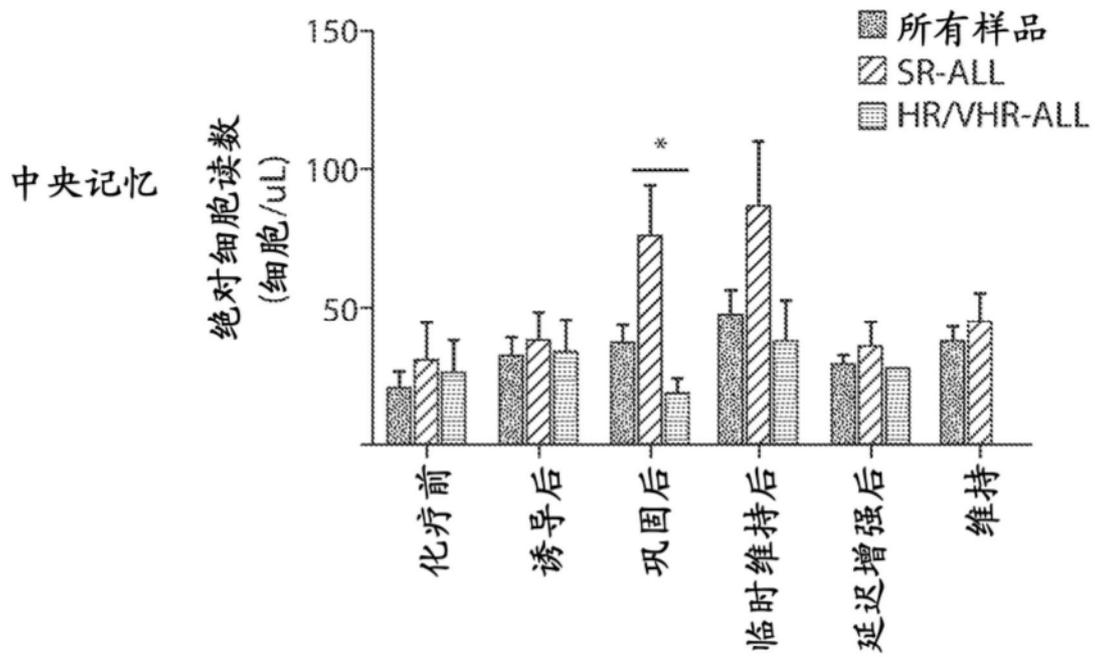


图23M

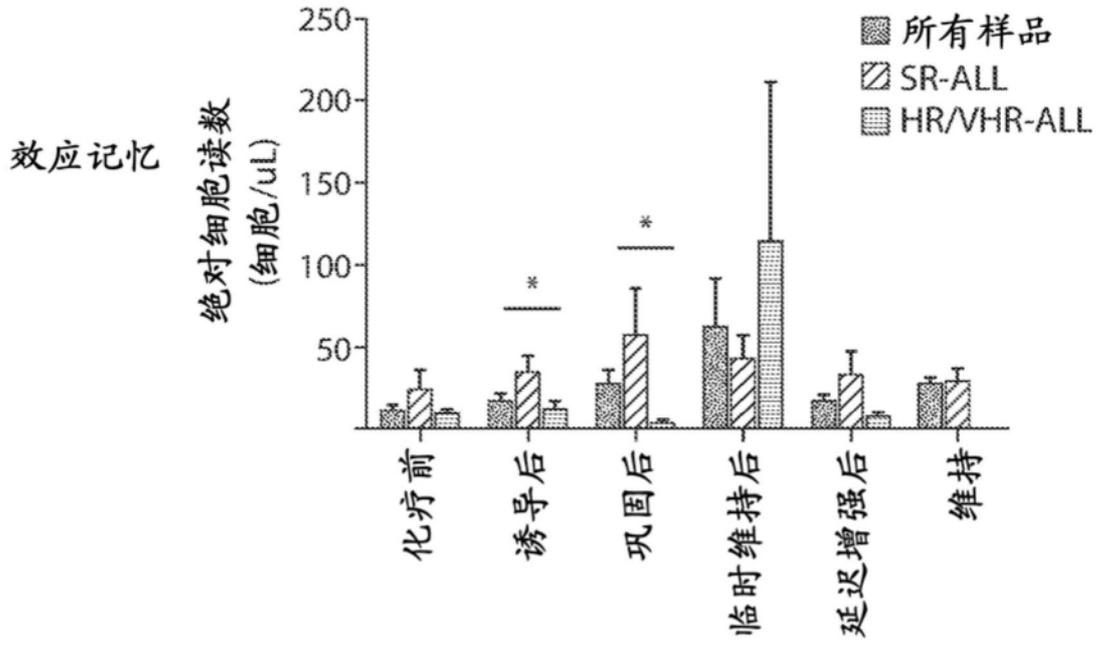


图23N

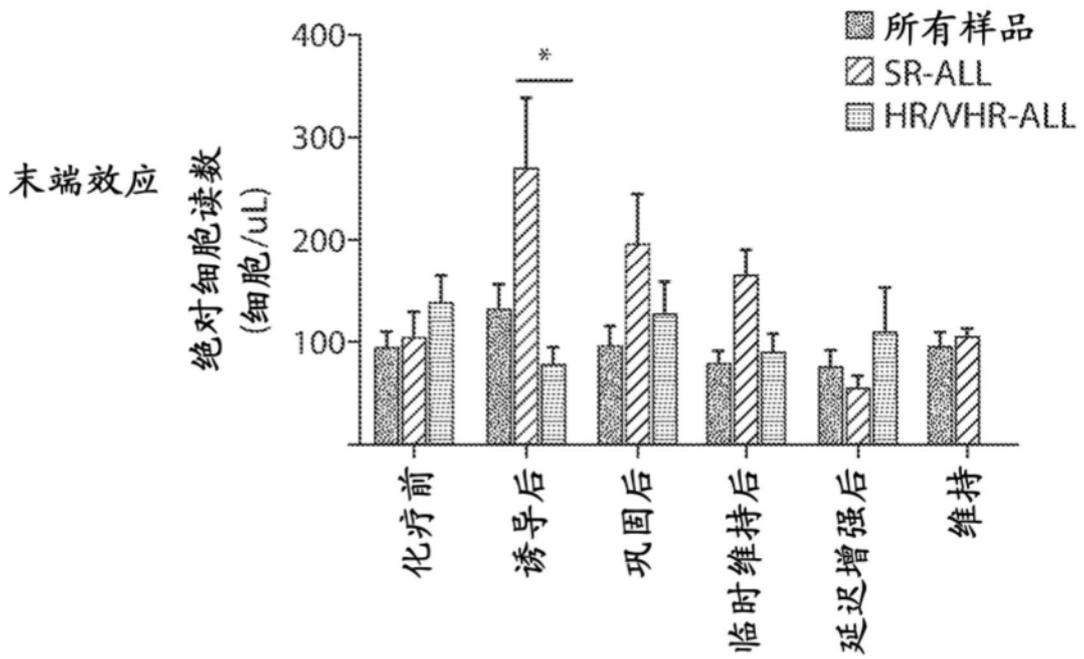


图230

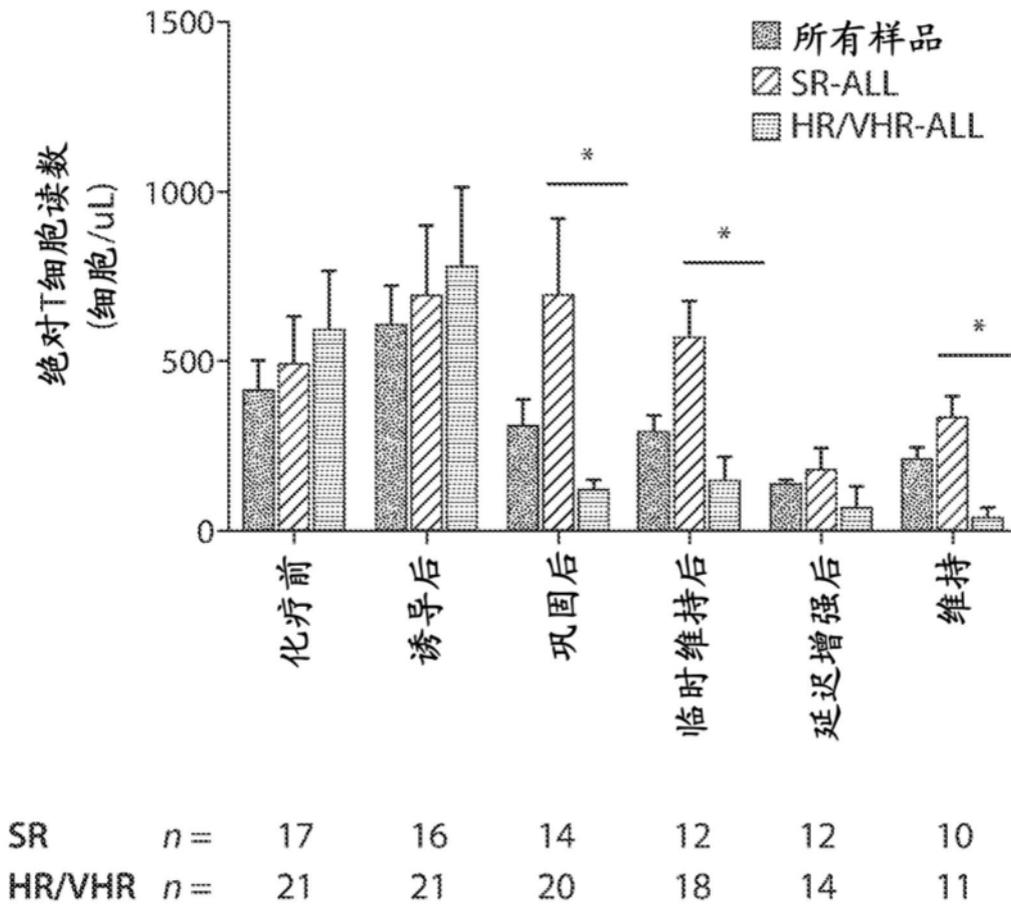


图24

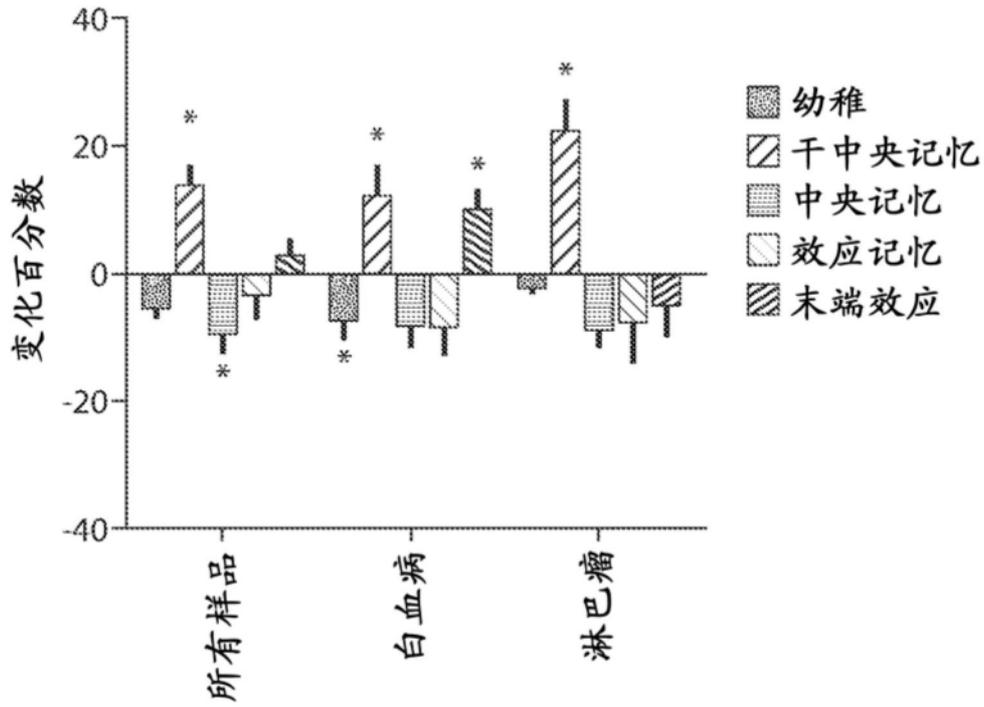


图25A

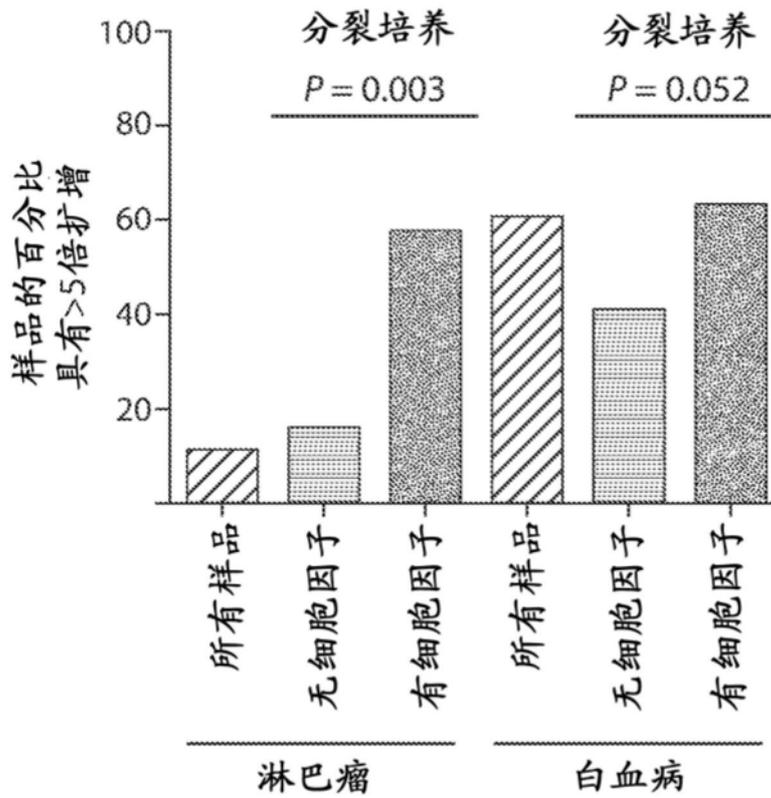


图25B

- 幼稚
- ▨ 干中央记忆
- ▩ 中央记忆
- ▧ 效应记忆
- ▦ 末端效应

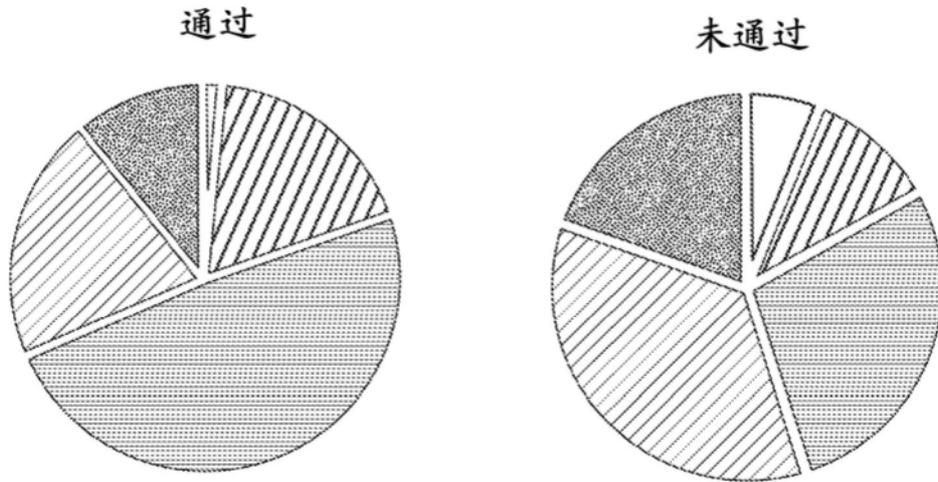


图26