(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116199790 A
(43)申请公布日 2023.06.02

(21)申请号 202211743245.4
(22)申请日 2016.02.10
(30)优先权数据
62/114,526 2015.02.10 US
(62)分案原申请数据
201680021263.8 2016.02.10
(71)申请人 米纳瓦生物技术公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 辛西娅·巴姆达德
贝努瓦·斯马格
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 贺淑东 武晶晶
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

权利要求书3页 说明书146页
序列表（电子公布） 附图62页

(54)发明名称

人源化抗MUC1*抗体

(57)摘要

本申请公开了人源化抗体和抗体样蛋白以及它们的片段。

CN 116199790 A

1.嵌合抗原受体,其包含:

(a)抗MUC1*抗体片段,其中所述抗MUC1*抗体片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区中具有如下互补决定区(CDR):

CDR1重链SEQ ID NO:123,

CDR1轻链SEQ ID NO:173,

CDR2重链SEQ ID NO:127,

CDR2轻链SEQ ID NO:177,

CDR3重链SEQ ID NO:131,

CDR3轻链SEQ ID NO:181;以及

(b)T细胞受体共刺激域。

2.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:145具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:195具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:145具有至少95%序列同一性的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:195具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

4.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NO:145具有至少98%序列同一性的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:195具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

5.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:195的氨基酸序列。

6.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区和轻链可变区通过接头连接。

7.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述接头包含SEQ ID NO:402的氨基酸序列。

8.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗MUC1*抗体片段包含单链可变片段(scFv)。

9.根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述scFv包含与SEQ IDNO:239、241、243或398中的任一个具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

10.根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述scFv包含与SEQ IDNO:239、241、243或398中的任一个具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

11.根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述scFv包含与SEQ IDNO:239、241、243或398中的任一个具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

12.根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述scFv包含SEQ IDNO:239、241、243或398中任一个的氨基酸序列。

13.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述T细胞受体共刺激域包含CD3-zeta、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7或Fc受体γ域。

14.根据权利要求13所述的嵌合抗原受体,其中所述T细胞受体共刺激域包含CD3-zeta

的细胞质结构域。

15.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体，其中所述T细胞受体共刺激域包含CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7或Fc受体γ域。

16.根据权利要求1所述的嵌合抗原受体，其中所述T细胞受体共刺激域包含CD3-zeta和4-1BB的细胞质结构域。

17.根据权利要求16所述的嵌合抗原受体，其中所述CD3-zeta的细胞质结构域包含与SEQ ID NO:374具有至少95％序列同一性的氨基酸序列。

18.权利要求16的嵌合抗原受体，其中41-BB的细胞质结构域包含与SEQ ID NO:380具有至少95％序列同一性的氨基酸序列。

19.根据权利要求16所述的嵌合抗原受体，其中所述T细胞受体共刺激域包含SEQ ID NO:374和SEQ ID NO:380的氨基酸序列。

20.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中所述CAR包含与SEQ ID NO:611具有至少90％序列同一性的氨基酸序列。

21.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中所述CAR包含与SEQ ID NO:611具有至少95％序列同一性的氨基酸序列。

22.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中所述CAR包含与SEQ ID NO:611具有至少98％序列同一性的氨基酸序列。

23.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中用于CAR的scFv根据其结合MUC1*肽的能力来选择，其中所述MUC1*肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:620、或SEQ ID NO:621的氨基酸序列。

24.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中根据其结合MUC1*阳性癌症细胞或MUC1*转染细胞的能力来选择用于CAR的scFv。

25.根据权利要求24所述的嵌合抗原受体，其中所述MUC1*阳性癌细胞包括MUC1*阳性乳腺癌细胞。

26.根据权利要求24所述的嵌合抗原受体，其中所述MUC1*阳性癌细胞包括MUC1*阳性前列腺癌细胞。

27.根据权利要求10所述的嵌合抗原受体，其中用于CAR的scFv根据其抑制癌细胞生长的能力来选择。

28.根据权利要求27所述的嵌合抗原受体，其中所述癌细胞包括MUC1*阳性乳腺癌细胞。

29.包含权利要求1-27之一所述的嵌合抗原受体的细胞。

30.根据权利要求29所述的细胞，其中所述细胞包括T细胞、树突细胞或肥大细胞。

31.一种人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，结合至没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域上的区。

32.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化κ轻链或人源化λ轻链配对的人源化IgG2重链或人源化IgG1重链表示的人源化MN-E6的序列组成。

33.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化λ轻链、以及人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链、人源化IgG2重链表示的人源化MN-C2的序列组成。

34.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1

重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-C3的序列组成。

35.一种抗MUC1*胞外结构域抗体,由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-C8的序列组成。

36.一种包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区的单链可变片段(scFv),进一步包含结合至MUC1*胞外结构域的抗体的CDR。

37.一种嵌合抗原受体(CAR),包含结合至没有串联重复序列的MUC1的胞外结构域的人源化可变区或scFv、接头分子、跨膜结构域和细胞质结构域。

38.一种包含CAR的细胞,所述CAR具有结合至MUC1*转染或转导的细胞的胞外结构域。

39.一种CAR分子,其中,胞外结构域单元识别肽。

40.一种包含至少两种CAR的组合物,所述CAR具有转染至相同细胞中的不同胞外结构域单元。

人源化抗MUC1*抗体

[0001] 本申请是申请日为2016年02月10日、申请号为201680021263.8、发明名称为“人源化抗MUC1*抗体”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2016年02月10日、申请号为PCT/US2016/017422)的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请涉及人源化抗MUC1*抗体以及制备和使用它们的方法。

背景技术

[0003] 我们以前发现,MUC1(SEQ ID NO:1)跨膜蛋白的切割形式是生长因子受体,其驱动超过75%的所有人癌症的生长。MUC1的切割形式,我们称其为MUC1*(发音为muk 1星),是强大的生长因子受体。MUC1的胞外结构域的大部分的切割和释放会暴露用于激活配体二聚体NME1、NME6或NME7的结合位点。它是癌症药物的理想的靶,因为它异常表达于超过75%的所有癌症并且可能过度表达于甚至更高百分比的转移性癌症(Fessler SP,Wotkowicz MT,Mahanta SK and Bamdad C.(2009)。在乳腺癌细胞中,MUC1*是曲妥单抗(赫赛汀)抗性的决定子。胸腺癌研究和治疗(Breast Cancer Res Treat.)118(1):113-124)。在MUC1切割以后,大部分的其胞外结构域从细胞表面脱落。剩余部分具有截短的胞外结构域,其至少包含主要生长因子受体序列PSMGFR(SEQ ID NO:2)。

[0004] 抗体越来越多地用来治疗人疾病。在非人物种中产生的抗体历来被用作在人类中的治疗剂,如马抗体。最近,设计或选择抗体以致它们主要包含人序列以避免外来抗体的全身性排斥。将非人抗体的识别片段工程化为人抗体的过程一般叫做‘人源化’。用来代替人抗体序列的非人序列的量决定了它们称为嵌合、人源化或全人。

[0005] 存在替代技术,其使得能够生成人源化或全人抗体。这些策略涉及筛选人抗体或抗体片段的库以及识别结合于靶抗原的那些,而不是用抗原来免疫动物。另一种方法是将抗体的可变区工程化为抗体样分子。本发明意在还包括这些方法,其用于本发明人已经确定的结合于MUC1*的胞外结构域的抗体的识别片段。

[0006] 除用抗体来治疗患者之外,最近已经显示,癌症免疫疗法可有效地治疗癌症。基于T细胞的癌症免疫治疗是用来克服癌细胞从免疫系统逃避的有吸引力的方式。第一免疫治疗,称为CAR T(嵌合抗原受体T细胞)疗法依赖于在患者T细胞的表面上CAR的表达,用于过继T细胞疗法(Dai H,Wang Y,Lu X,Han W.(2016)Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy.J Natl Cancer Inst.108(7):djv439)。这种受体由连接于T细胞跨膜和信令结构域(signaling domain)的抗癌scFv组成。在受体与癌症相关抗原的结合以后,信号被发送,导致T细胞激活、增殖以及癌细胞的靶向杀伤。在实践中,患者的T细胞被分离并利用CAR转导、扩增、然后被注射回患者。当患者的CAR T细胞结合于在癌细胞上的抗原时,CAR T细胞扩增和攻击癌细胞。这种方法的缺点是以下风险:当大多数癌症抗原表达在一些健康组织上但过度表达在癌组织上时,会激活患者的免疫系统来破坏携带靶抗原的细胞。为了最小化摆脱肿瘤(off-tumor)/靶向效应的风险,癌症抗原应最低表达在健

康组织上。

[0007] 第二癌症免疫治疗涉及BiTE(双特异性T细胞衔接物)。BiTE方法试图消除摆脱肿瘤/靶向效应的CAR T相关风险。不同于CAR T,BiTE是双特异性抗体,其应该不会造成任何比基于常规抗体的治疗更大的风险。然而,不像典型的抗癌抗体,其结合于并阻止癌症抗原,BiTE被设计为结合于在肿瘤细胞上的抗原并同时结合于在免疫细胞如T细胞上的抗原。以这种方式,BiTE募集T细胞到肿瘤。BiTE是工程化蛋白,其同时结合于癌症相关抗原和T细胞表面蛋白如CD3-ε。BiTE是通过基因连接结合于T细胞抗原如抗CD3-ε抗体的scFv至结合于癌症抗原的治疗性单克隆抗体的scFv制备的抗体(Patrick A.Baeuerle,and Carsten Reinhardt(2009)Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy.Cancer Res.69(12):4941-4944)。

发明内容

[0008] 在一方面,本发明涉及人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白(antibody-like protein),其结合于在没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物(cleavage product)的胞外结构域上的区。人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白可以特异性地结合于

[0009] (i)MUC1的PSMGFR区;

[0010] (ii)PSMGFR肽;

[0011] (iii)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQ YKTEAASRY(SEQ ID NO:620)的氨基酸序列的肽;

[0012] (iv)具有SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)的氨基酸序列的肽;

[0013] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[0014] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)的氨基酸序列的肽。

[0015] 人或人源化抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。人或人源化抗体片段或抗体样蛋白可以是scFv或scFv-Fc。

[0016] 如上所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白可以包含重链可变区和轻链可变区,其源自小鼠单克隆MN-E6抗体,并且与小鼠单克隆MN-E6抗体具有至少80%、90%或95%或98%的序列同一性。重链可变区与SEQ ID NO:13可以具有至少90%或95%或98%的序列同一性并且轻链可变区与SEQ ID NO:66可以具有至少90%或95%或98%的序列同一性。

[0017] 根据上述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白可以包括在重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR),其与具有如下序列的CDR1、CDR2或CDR3区具有至少90%或95%或98%的序列同一性:

[0018] CDR1重链SEQ ID NO:17

[0019] CDR1轻链SEQ ID NO:70,

[0020] CDR2重链SEQ ID NO:21

[0021] CDR2轻链SEQ ID NO:74,

[0022] CDR3重链SEQ ID NO:25

[0023] CDR3轻链SEQ ID NO:78。

[0024] 上文描述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白可以包括重链可变区和轻链可变区，其源自小鼠单克隆MN-C2抗体，并且与小鼠单克隆MN-C2抗体具有至少80％、90％或95％或98％的序列同一性。重链可变区与SEQ ID NO:119可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性并且轻链可变区与SEQ ID NO:169具有至少90％或95％或98％的序列同一性。在重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR)与具有如下序列的CDR1、CDR2或CDR3区可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性：

[0025] CDR1重链SEQ ID NO:123

[0026] CDR1轻链SEQ ID NO:173，

[0027] CDR2重链SEQ ID NO:127

[0028] CDR2轻链SEQ ID NO:177，

[0029] CDR3重链SEQ ID NO:131

[0030] CDR3轻链SEQ ID NO:181。

[0031] 如上所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白可以包括重链可变区和轻链可变区，其源自小鼠单克隆MN-C3抗体，并且与小鼠单克隆MN-C3抗体可以具有至少80％、90％或95％或98％的序列同一性。重链可变区与SEQ ID NO:414可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性并且轻链可变区与SEQ ID NO:459可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性。在重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR)与具有如下序列的CDR1、CDR2或CDR3区可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性：

[0032] CDR1重链SEQ ID NO:418

[0033] CDR1轻链SEQ ID NO:463，

[0034] CDR2重链SEQ ID NO:422

[0035] CDR2轻链SEQ ID NO:467，

[0036] CDR3重链SEQ ID NO:426，

[0037] CDR3轻链SEQ ID NO:471。

[0038] 上文描述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白可以包括重链可变区和轻链可变区，其源自小鼠单克隆MN-C8抗体，并且与小鼠单克隆MN-C8抗体具有至少80％、90％或95％或98％的序列同一性。重链可变区与SEQ ID NO:506可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性并且轻链可变区与SEQ ID NO:544可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性。在重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR)与具有如下序列的CDR1、CDR2或CDR3区可以具有至少90％或95％或98％的序列同一性：

[0039] CDR1重链SEQ ID NO:508

[0040] CDR1轻链SEQ ID NO:546，

[0041] CDR2重链SEQ ID NO:510

[0042] CDR2轻链SEQ ID NO:548，

[0043] CDR3重链SEQ ID NO:512，

[0044] CDR3轻链SEQ ID NO:550。

[0045] 在另一方面，本发明涉及抗MUC1*胞外结构域抗体，其由与人源化κ轻链或人源化λ轻链配对的人源化IgG2重链或人源化IgG1重链表示的人源化MN-E6的序列组成。人源化

IgG2重链可以是SEQ ID NOS:53,人源化IgG1重链可以是SEQ ID NO:57,人源化κ轻链可以是SEQ ID NO:108,以及人源化λ轻链可以是SEQ ID NO:112,或与其具有90％、95％或98％序列同一性的序列。

[0046] 在另一方面,本发明涉及抗MUC1*胞外结构域抗体,其由与人源化λ轻链和人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链、人源化IgG2重链表示的人源化MN-C2的序列组成。人源化IgG1重链MN-C2可以是SEQ ID NOS:159或IgG2重链可以是SEQ ID NOS:164,其配对与λ轻链(SEQ ID NO:219)或κ轻链(SEQ ID NO:213),或与其具有90％、95％或98％序列同一性的序列。

[0047] 在另一方面,本发明涉及抗MUC1*胞外结构域抗体,其由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-C3的序列组成。人源化MN-C3 IgG1重链可以是SEQ ID NOS:454,IgG2重链可以是SEQ ID NOS:456,λ轻链可以是SEQ ID NO:501,以及κ轻链可以是SEQ ID NO:503,或与其具有90％、95％或98％序列同一性的序列。

[0048] 在另一方面,本发明涉及抗MUC1*胞外结构域抗体,其由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-C8的序列组成。人源化MN-C8 IgG1重链可以是SEQ ID NOS:540,IgG2重链可以是SEQ ID NOS:542,λ轻链可以是SEQ ID NO:580以及κ轻链可以是SEQ ID NO:582,或具有其90％、95％或98％序列同一性的序列。

[0049] 在另一方面,本发明涉及根据上述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其抑制NME蛋白与MUC1*的结合。NME可以是NME1、NME6、NME7AB、NME7或NME8。

[0050] 在又一方面,本发明涉及单链可变片段(scFv),其包含通过接头连接的重和轻链可变区,进一步包含结合于MUC1*胞外结构域的抗体的CDR。CDR可以源自MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8抗体或其人源化抗体。scFv可以是具有SEQ ID NOS:233、235和237(E6);SEQ ID NOS:239、241、和243(C2);SEQ ID NOS:245、247、和249(C3);或SEQ ID NOS:251、253、和255(C8)中的一种。

[0051] 在再一方面,本发明涉及嵌合抗原受体(CAR),其包含结合于没有串联重复序列的MUC1的胞外结构域的人源化可变区或scFv、接头分子、跨膜结构域和细胞质结构域。单链抗体片段可以结合于

[0052] (i)MUC1的PSMGFR区,

[0053] (ii)PSMGFR肽,

[0054] (iii)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQ YKTEAASRY(SEQ ID NO:620)的氨基酸序列的肽;

[0055] (iv)具有SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)的氨基酸序列的肽;

[0056] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[0057] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)的氨基酸序列的肽。

[0058] 在如上所述的CAR中,上文阐述和描述的任何可变区的部分、或它们的组合可以用于胞外结构域、跨膜区和胞质尾区,其包含信号免疫系统激活的序列基序。胞外结构域可以由MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv或MN-C8 scFv的人源化单链抗体片段组成。

[0059] 在如上文描述的CAR中,胞外结构域包括阐述为SEQ ID NOS:233、235、或237)的

MN-E6 scFv、MN-C2 scFv(SEQ ID NOS:239、241、或243)、MN-C3 scFv(SEQ ID NOS:245、247、或249)或MN-C8 scFv(SEQ ID NOS:251、253、或255)的人源化单链抗体片段。

[0060] 在上文描述的任何CAR中,胞质尾区可以由信令序列基序(signaling sequence motif)CD3-ζ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、或CD7中的一种或多种组成。

[0061] 在上文描述的任何CAR中,序列可以是CARMN-E6 CD3z(SEQ ID NOS:295);CARMN-E6 CD28/CD3z(SEQ ID NOS:298);CARMN-E6 4-1BB/CD3z(SEQ ID NOS:301);CARMN-E6 OX40/CD3z(SEQ ID NOS:617);CARMN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NOS:304);CARMN-E6 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NOS:619);CAR MN-C2 CD3z(SEQ ID NOS:607);CAR MN-C2 CD28/CD3z(SEQ ID NOS:609);CAR MN-C24-1BB/CD3z(SEQ ID NOS:611);CAR MN-C2 OX40/CD3z(SEQ ID NOS:613);CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NOS:307);或CAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NOS:615)。

[0062] 在另一方面,CAR可以具有识别肽的胞外结构域单元。肽可以是PSMGFR(SEQ ID NO:2)。肽可以是源自NME7的肽。肽可以是

[0063] NME7A肽1(A结构域):MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID NO:7);

[0064] NME7A肽2(A结构域):SGVARTDASES(SEQ ID NO:8);

[0065] NME7B肽1(B结构域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(SEQ ID NO:9);

[0066] NME7B肽2(B结构域):EVYKGVVTEYHDMVTE(SEQ ID NO:10);或

[0067] NME7B肽3(B结构域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(SEQ ID NO:11)。

[0068] 在另一方面,本发明涉及组合物,该组合物包括至少两种CAR,其具有转染至相同细胞中的不同胞外结构域单元。

[0069] 至少两种CAR可以具有一种CAR,其不具有靶向识别单元,以及另一种CAR,其确实具有靶向识别单元。或,胞外结构域识别单元之一可以结合于MUC1*胞外结构域。或,胞外结构域识别单元之一可以结合PD-1。或,胞外结构域识别单元之一是抗体片段以及另一种是肽。或,一种是抗MUC1*scFv,其选自由MN-E6抗体的scFv、MN-C2抗体的scFv、MN-C3抗体的scFv或MN-C8抗体的scFv组成的组,以及另一种是源自NME7或选自由下述组成的组的肽

[0070] NME7A肽1(A结构域):MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID NO:7);

[0071] NME7A肽2(A结构域):SGVARTDASES(SEQ ID NO:8);

[0072] NME7B肽1(B结构域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(SEQ ID NO:9);

[0073] NME7B肽2(B结构域):EVYKGVVTEYHDMVTE(SEQ ID NO:10);以及

[0074] NME7B肽3(B结构域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(SEQ ID NO:11)。

[0075] 在另一方面,本发明涉及细胞,该细胞包含具有结合于MUC1*转染或转导的细胞的胞外结构域的CAR。包括CAR的细胞可以是免疫系统细胞,优选T细胞或树突状细胞或肥大细胞。

[0076] 在另一方面,本发明涉及工程化抗体样蛋白。

[0077] 在另一方面,本发明涉及针对结合于下述的那些来筛选为人的抗体或抗体片段的库的方法

[0078] (i)PSMGFR肽;

[0079] (ii)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQ YKTEAASRY(SEQ ID NO:620)的

氨基酸序列的肽；

[0080] (iii)具有SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)的氨基酸序列的肽；

[0081] (iv)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID NO:622)的氨基酸序列的肽；

[0082] (v)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)的氨基酸序列的肽；

[0083] (vi)NME7蛋白；或

[0084] (vii)NME7蛋白的肽片段。

[0085] 在另一方面，本发明涉及用于治疗受试者中的疾病的方法，包括将根据上述任何权利要求的抗体给予患有疾病的人，其中受试者异常地表达MUC1。疾病可以是癌症，如乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌。

[0086] 在另一方面，本发明涉及用于治疗受试者中的疾病的方法，包括将NME肽给予患有疾病的人，其中受试者异常地表达MUC1。

[0087] 在另一方面，本发明涉及增殖或扩增干细胞群体的方法，包括使细胞接触上文描述的根据任何方法或组合物的抗体。

[0088] 在另一方面，本发明涉及促进干细胞附着至表面的方法，包括用人源化MN-C3或MN-C8抗体、其抗体片段或单链抗体来涂覆表面以及使干细胞接触表面。

[0089] 在另一方面，本发明涉及体外或体内递送干细胞的方法，包括以下步骤：用人源化MN-C3或MN-C8抗体、其抗体片段或单链抗体来涂覆表面，使干细胞接触表面以及将干细胞递送到特定位置。

[0090] 在另一方面，本发明涉及分离干细胞的方法，包括以下步骤：用人源化MN-C3或MN-C8抗体、其抗体片段或单链抗体来涂覆表面，使混合细胞群体接触表面以及分离干细胞。

[0091] 在另一方面，本发明涉及包含可变结构域片段的scFv，所述可变结构域片段源自结合于没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域的抗体。可变结构域片段可以源自小鼠单克隆抗体MN-E6(SEQ ID NO:13和66)或源自人源化MN-E6(SEQ ID NO:39和94)，或源自MN-E6 scFv(SEQ ID NO:233、235和237)。或，可变结构域片段可以源自小鼠单克隆抗体MN-C2(SEQ ID NO:119和169)或源自人源化MN-C2(SEQ ID NO:145和195)，或源自MN-C2 scFv(SEQ ID NO:239、241和243)。或，可变结构域片段可以源自小鼠单克隆抗体MN-C3(SEQ ID NO:414和459)或源自人源化MN-C3(SEQ ID NO:440和487)，或源自MN-C3 scFv(SEQ ID NO:245、247和249)。或，可变结构域片段可以源自小鼠单克隆抗体MN-C8(SEQ ID NO:505和544)或源自人源化MN-C8(SEQ ID NO:526和566)，或源自MN-C8scFv(SEQ ID NO:251、253、255)。

[0092] 在另一方面，本发明涉及用于治疗诊断有、怀疑有或有发展MUC1或MUC1*阳性癌症的风险的人的方法，涉及将有效量的上文描述的scFv给予人。

[0093] 在另一方面，本发明涉及包含如上文描述的scFv的scFv-Fc构建体。scFv-Fc可以是二聚化的。或，可以突变Fc组分以致scFv-Fc是单体的。突变可以包括突变或删除在Fc上的铰链区，在由SEQ ID NO:281、279、285和287表示的Fc上制备F405Q、Y407R、T366W/L368W、和T364R/L368R突变或它们的组合。

[0094] 在另一方面，本发明涉及包含至少两种不同scFv序列的多肽，其中scFv序列之一是结合于没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域的序列。多肽可以结

合至

[0095] (i)MUC1的PSMGFR区;

[0096] (ii)PSMGFR肽;

[0097] (iii)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFN QYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)的氨基酸序列的肽;

[0098] (iv)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)的氨基酸序列的肽;

[0099] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[0100] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)的氨基酸序列的肽。

[0101] 多肽可以结合于在免疫细胞如T细胞上的受体,以及尤其是,在T细胞上的CD3。

[0102] 在另一方面,本发明涉及检测异常地表达MUC1*的细胞的存在的方法,包括用上文描述的scFv-Fc来接触细胞样品以及检测scFv-Fc与细胞的结合的存在。细胞可以是癌细胞。

[0103] 在另一方面,本发明涉及用于测试受试者的癌症对于利用包含MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的可变区的部分的组合物来治疗的适应性的方法,包括以下步骤:将来自患者的身体试样(bodily specimen)与相应的MN-E6 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc或MN-C8 scFv-Fc接触。

[0104] 在另一方面,本发明涉及治疗患有疾病的受试者的方法,包括将来自受试者的T细胞暴露于MUC1*肽,其中经过不同轮次的成熟(various rounds of maturation),T细胞发展MUC1*特异性受体,产生适应的T细胞,以及将适应的T细胞扩增并给予诊断有、怀疑有、或有发展MUC1*阳性癌症的风险的供体患者。

[0105] 依据本发明的以下描述、所附附图和所附权利要求,将会更充分地了解本发明的这些和其它目的。

附图说明

[0106] 依据下面给出的详细描述、和附图,本发明将得到更充分的理解,其仅作为说明而给出,因此不限制本发明,以及其中;

[0107] 图1A-D示出用二价'bv'抗MUC1*抗体、单价'mv'或Fab、NM23-H1二聚体或NME7-AB处理的MUC1*阳性细胞的细胞生长测定图。二价抗MUC1*抗体刺激癌细胞的生长,而单价Fab抑制生长(A,B)。经典钟形曲线表明配体诱导二聚化刺激生长。二聚体NM23-H1,又叫做(aka)NME1,刺激MUC1*阳性癌细胞的生长,但siRNA抑制MUC1表达,从而消除其影响(C)。NME7-AB还刺激MUC1*阳性细胞的生长(D)。

[0108] 图2A-F示出ELISA测定的结果。将MUC1*肽PSMGFR,从N端减去10个氨基酸的PSMGFR,又叫做N-10,或从C端减去10个氨基酸的PSMGFR,又叫做C-10,固定在板上以及测定下述的结合:NME7-AB(A)、MN-C2单克隆抗体(B)、MN-E6单克隆抗体(C)、或二聚体NME1(D)。这些测定表明NME1、NME7-AB以及单克隆抗体MN-C2和MN-E6都需要MUC1*胞外结构域的第一膜近端10个氨基酸来结合。将MUC1*肽,从N端减去10个氨基酸的PSMGFR,又叫做N-10,或从C端减去10个氨基酸的PSMGFR,又叫做C-10,固定在板上并测定下述的结合:MN-C3(E)和MN-C8(F)。

[0109] 图3A-C示出竞争性ELISA测定的结果。将PSMGFR MUC1*肽固定在板上，然后单独或在已添加MN-E6抗体以后添加二聚体NM23-H1，又叫做NME1(A)。进行相同的实验，其中单独或在已添加MN-E6以后添加NM23-H7、NME7-AB(B)。结果显示MN-E6竞争性地抑制MUC1*激活配体NME1和NME7的结合。在类似的实验中(C)，将PSMGFR或从N端减去10个氨基酸的PSMGFR，又叫做N-10，固定在板上。然后添加二聚体NM23-H1。然后测试抗MUC1*抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8竞争掉NM23-H1的能力。结果显示虽然全部三种抗体结合于PSMGFR肽，但MN-E6和MN-C2竞争性地抑制MUC1*激活配体的结合。

[0110] 图4A-F示出抗MUC1*抗体的FACS扫描，其中上述抗MUC1*抗体特异性地结合于MUC1*阳性癌细胞和MUC1*转染细胞，但不特异性地结合于MUC1*或MUC1阴性细胞。用1:2或1:10稀释度的1.5ug/ml人源化MN-C2来染色ZR-75-1，又叫做1500，MUC1*阳性乳腺癌细胞。在洗涤两次以后，在共轭于1:200(A)、1:50(B)、或1:10(C)的Alexa488(Qiagen)稀释度下，用次级抗体，抗Penta-His抗体来染色细胞以检测在huMN-C2 scFv上的6x His标记。流式细胞仪分析揭示了细胞子集的浓度依赖性转变，其指示特异性结合，在缺乏MN-C2 scFv时，其是未看到的(A-C)。在另一种情况下，MN-E6用来染色用空载体、单细胞克隆#8转染的MUC1阴性HCT-116结肠癌细胞(D)，用MUC1*单细胞克隆#10转染的HCT-116结肠癌细胞(E)，或ZR-75-1，又叫做1500，MUC1*阳性乳腺癌细胞。如FACS扫描所示，MN-C2和MN-E6均仅染色MUC1*阳性细胞，而不染色MUC1或MUC1*阴性细胞。

[0111] 图5示出ELISA的曲线图，其中表面涂覆有MUC1*PSMGFR肽或对照肽。然后按照标准方法，连同表面一起来温育人源化MN-C2 scFv，洗涤和检测。ELISA显示huMN-C2 scFv结合于MUC1*肽，其中EC-50为约333nM。

[0112] 图6A-B示出MUC1*抗体可变区片段人源化MN-C2 scFv的癌细胞生长抑制的曲线图。hMN-C2 scFv有效地抑制ZR-75-1，又叫做1500，MUC1*阳性乳腺癌细胞(A)和T47D MUC1*阳性乳腺癌细胞(B)的生长，其具有和体外ELISA大致相同的EC-50。

[0113] 图7A-B示出在免疫受损小鼠中肿瘤生长的曲线图，其中上述小鼠已被植入有人肿瘤，然后借助于抗MUC1*抗体MN-E6 Fab或模拟治疗来治疗。植入有90天雌激素丸的雌性nu/nu小鼠被植入有6百万T47D人乳腺癌细胞，其已经50/50混合与基质胶。选择带有肿瘤(其是至少150mm^{3}并具有肿瘤体积的连续三次增加)的小鼠，用于治疗。用80mg/kg MN-E6 Fab皮下注射动物，每周两次，以及用单独的载体注射相等数目的符合相同的选择标准的小鼠(A)。对雄性NOD/SCID小鼠植入6百万个DU-145人前列腺癌细胞，其已50/50混合与基质胶。选择带有肿瘤的小鼠，其中上述肿瘤是至少150mm^{3}并具有连续三次肿瘤体积的增加，用于治疗。每48小时，用160mg/kg MN-E6 Fab皮下注射动物并用单独的载体注射相等数目的符合相同的选择标准的小鼠(B)。每周两次，由两位研究者独立测量肿瘤并记录。由独立统计员盲目地计算统计数字，从而给出各自0.0001的P值。抗MUC1*Fab抑制乳腺癌生长和前列腺癌生长。治疗对重量、骨髓细胞类型或数量没有影响。

[0114] 图8是ELISA测定的图，其示出人源化MN-E6抗MUC1*抗体的表达的不同水平，其取决于轻链是κ或λ以及可变部分是否融合于人IgG1或IgG2。

[0115] 图9是ELISA测定的曲线图，其比较亲本小鼠MN-E6抗体和MN-E6抗体的人源化版本与呈递源自MUC1*胞外结构域的PSMGFR肽的表面的结合。

[0116] 图10是ELISA测定的图，其示出人源化MN-C2抗MUC1*抗体的表达的不同水平，其取

决于轻链是κ或λ以及可变部分是否融合于人IgG1或IgG2。

[0117] 图11是ELISA测定的曲线图，其比较亲本小鼠MN-C2抗体和MN-C2抗体的人源化版本与呈递源自MUC1*胞外结构域的PSMGFR肽的表面的结合。

[0118] 图12是ELISA测定的曲线图，其示出人源化单链(scFv)MN-C2和MN-E6抗体的结合，其中MN-E6抗体结合于呈递源自MUC1*胞外结构域的PSMGFR肽的表面。

[0119] 图13A-C示出经过蛋白A亲和柱，MN-E6 scFv-Fc融合蛋白(其生长在低IgG FBS中)的纯化的FPLC痕迹。A)是通过流的痕迹。B)是洗脱的痕迹。C)显示在还原或非还原凝胶上的纯化蛋白。

[0120] 图14A-B显示在非还原凝胶上纯化MN-E6 scFv-Fc融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片，其中融合于MN-E6的Fc部分是野生型(wt)或突变的，如下：A)F405Q、Y407R、T394D；B)T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W或T364R/L368R。Fc突变体F405Q、Y407R、T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W和T364R/L368R，相对于二聚体形成，均有利于单体形成。用于指定突变的参比构建体氨基酸序列是SEQ ID NO:273。

[0121] 图15A-D显示经蛋白A亲和柱，MN-E6 scFv-Fc Y407Q融合蛋白(其生长在低IgG FBS中)的纯化的FPLC痕迹。A)是通过流的痕迹。B)是洗脱的痕迹。经S200柱，通过尺寸排阻来进一步纯化蛋白质(C)。(D)是SDS-PAGE凝胶的照片，其显示哪些部分具有单体的优势。用于指定突变的参比构建体氨基酸序列是SEQ ID NO:273。

[0122] 图16示出在非还原凝胶上纯化MN-E6 scFv-Fc-突变融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片，其中融合于MN-E6 scFv的Fc部分是野生型(wt)或突变的：通过消除Fc的铰链区，‘脱铰链(DHinge)’，或通过消除Fc的铰链区并且还携带Y407R突变。所有Fc突变体均，相对于二聚体形成，有利于单体形成。用于指定突变的参比构建体氨基酸序列是SEQ ID NO:273。

[0123] 图17A-C。A和B示出MN-E6 scFv-Fc无铰链突变体的大规模表达和纯化的非还原SDS-PAGE特征的照片，其表明它是单体。MN-E6 scFv-Fc无铰链突变体的FPLC特征和纯化示于(C)。

[0124] 图18A-C示出在非还原凝胶(A)或还原凝胶(B)上，纯化MN-C3 scFv-Fc融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片。通过尺寸排阻来纯化蛋白质。FPLC痕迹示于(C)。

[0125] 图19A-B示出MN-C3或MN-E6 Fab、scFv、scFv-Fc的天然凝胶的照片，其中Fc部分是野生型或突变体，其更优选或唯一地是单体。天然凝胶显示Y407R Fc突变(A)以及双突变体Y407R和的铰链(B)，相对于二聚体，最有利于单体。需要注意的是，以比典型的使用浓度高得多的浓度，将蛋白质加载到凝胶上。其它Fc突变体的二聚体形成可以仅反映以下事实：装载浓度非常高。

[0126] 图20示出ELISA的图，其中表面固定有PSMGFR肽、从N端减去10个氨基酸的PSMGFR、或从C端减去10个氨基酸的PSMGFR。hu MN-E6 scFv-Fc结合于PSMGFR肽和结合于PSMGFR N-10肽，但不结合于PSMGFR C-10肽。亲代MN-E6抗体和人源化MN-E6需要用于结合的PSMGFR的C端的10个氨基酸。

[0127] 图21A-B示出若干抗MUC1*scFv-Fc融合蛋白的ELISA图，其中已消除或突变Fc区。示出的是hu MN-E6 scFv-Fc-wt、hu MN-E6 scFv-Fc-Y407R、hu MN-E6 scFv-Fc-无铰链、和hu MN-E6 scFv-Fc-Y407R-无铰链。所有突变体结合于MUC1*胞外结构域的PSMGFR肽(A)。若干抗MUC1*scFv-Fc融合蛋白的ELISA图，其中Fc区是野生型或突变的。示出的是hu MN-E6

scFv-Fc-wt、hu MN-E6 scFv-Fc-无铰链，以及hu MN-C3 scFv-Fc示于(B)。它们都结合于MUC1*胞外结构域的PSMGFR肽。

[0128] 图22A-C示出ELISA的图，其中测定板表面固定有PSMGFR肽、从N端减去10个氨基酸的PSMGFR、或从C端减去10个氨基酸的PSMGFR。然后测定MN-C3抗体变体与各种MUC1*肽的结合。A)纯化小鼠单克隆MN-C3抗体；B)不纯的人源化MN-C3抗体；以及C)人源化MN-C3 scFv-Fc。ELISA显示结合于PSMGFR肽以及结合于某些肽。

[0129] 图23示出ELISA测定的曲线图，其量化人源化MN-E6 scFv-Fc-δ铰链，又叫做脱铰链或无铰链，以及人源化MN-E6 scFv，与MUC1*肽PSMGFR的结合。

[0130] 图24显示免疫荧光实验的照片，其中，以相同的浓度依赖性方式，人源化MN-C2 scFv或MN-E6 scFv特异性地结合于MUC1*阳性乳腺癌细胞。A-G:在指示浓度下，hu MN-C2 scFv结合于T47D乳腺癌细胞。H-N显示荧光标记的scFv和DAPI。O-U:在指示浓度下，hu MN-E6 scFv结合于T47D乳腺癌细胞。V-B'示出荧光标记的scFv和DAPI。C'是次级抗体对照。

[0131] 图25A-L显示已在普通培养基中或在人源化MN-E6 scFv的存在下培养的1500MUC1*阳性乳腺癌细胞的照片。A-D是在4X放大率下拍摄的明场图像。E-H是在4X放大率下拍摄的钙黄绿素荧光图像。I-L是在10X放大率下拍摄的钙黄绿素荧光图像。A、E、I显示在普通RPMI培养基中培养的对照细胞。B、F、J显示在普通RPMI培养基加上一定体积的PBS(其等于加入实验孔的在PBS中的MN-E6 scFv的体积)中培养的对照细胞。C、G、K显示在普通RPMI培养基加上500ug/mL MN-E6 scFv中培养的细胞。D、H、L显示在普通RPMI培养基加上5ug/mL MN-E6 scFv中培养的细胞。照片显示在5ug/mL下MN-E6 scFv对MUC1*阳性细胞的杀伤和/或生长抑制以及在500ug/mL下甚至更大的效果。在添加测试分子以后96小时获得图像。

[0132] 图26A-L显示已在普通培养基中或在人源化MN-E6 scFv-Fc脱铰链(其是无铰链或δ铰链突变体)的存在下培养的1500MUC1*阳性乳腺癌细胞的照片。A-F是在20X放大率下拍摄的明场图像。G-L是在4X放大率下拍摄的钙黄绿素荧光图像。A、G显示在普通RPMI培养基中培养的对照细胞。B、H显示在普通RPMI培养基加上100ug/mL hMN-E6 scFv-Fc脱铰链中培养的细胞。C、I显示在普通RPMI培养基加上50ug/mL hMN-E6 scFv-Fc脱铰链中培养的细胞。D、J显示在普通RPMI培养基加上5ug/mL hMN-E6 scFv-Fc脱铰链中培养的细胞。E、K显示在普通RPMI培养基加上0.5ug/mL hMN-E6 scFv-Fc脱铰链中培养的细胞。F、L显示在普通RPMI培养基加上500ug/mL的MN-E6 Fab中培养的细胞。照片显示5ug/mL的hMN-E6 scFv-Fc脱铰链对MUC1*阳性细胞的杀伤和/或生长抑制，在50ug/mL下甚至更大的效果，以及在100ug/mL下甚至还要更大的效果。相对于对照细胞，比较细胞形态，在MN-E6 Fab中或在有效量的hMN-E6 scFv-Fc脱铰链中生长的癌细胞显示在细胞死亡前发生形态变化的细胞的集合(rounding up)。在添加测试分子以后的96小时获得图像。

[0133] 图27示出图25和26的荧光图像的图像分析的图。图像J用来量化在用人源化MN-E6scFv或MN-E6 scFv-Fc-δ铰链，又叫做脱铰链，96小时治疗以后，剩余的细胞数目。分析软件使用像素计数和像素荧光强度来量化在每张照片中的细胞数目。对整个图像512X512个像素，8位图像，进行分析。为了比较，还分析了小鼠单克隆MN-E6 Fab的抑制。

[0134] 图28示出CAR序列成分的示意图。

[0135] 图29是当CAR T细胞暴露于已由MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时通过用小

组的CAR转导的Jurkat T细胞来测量IL-2细胞因子分泌的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-CD28-3z和MN-E6-CD4-CD28-41BB-3z。

[0136] 图30是当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时通过用小组的CAR转导的Jurkat T细胞来测量IL-2细胞因子分泌的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-CD28-3z和MN-E6-CD4-41BB-3z。

[0137] 图31是当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时通过分离自血液样品的用小组的CAR转导的原代人T细胞来测量IL-2细胞因子分泌的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD4-41BB-3z。

[0138] 图32是当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时通过分离自血液样品的用小组的CAR转导的原代人T细胞来测量干扰素-γ(IFN-g)细胞因子分泌的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-CD28-3z和MN-E6-CD4-41BB-3z。

[0139] 图33是当CAR T细胞暴露于K562-wt细胞、已用MUC1*转染的K562细胞、或前列腺癌、乳腺癌或胰腺癌的MUC1*阳性癌细胞时通过分离自血液样品的用小组的CAR转导的原代人T细胞来测量干扰素-γ(IFN-g)细胞因子分泌的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。

[0140] 图34是当CAR T细胞暴露于K562-wt细胞或已用MUC1*转染的K562细胞时通过分离自血液样品的用小组的CAR转导的原代人T细胞来测量靶细胞死亡的实验的图，所述CAR包括MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD4-41BB-3z。T细胞与靶细胞的比率是1:1以及共培养细胞24小时。

[0141] 图35是FACS测量从第1天至第3天的靶细胞存活的时间进程的图。用小组的CAR来转导分离自血液样品的原代人T细胞，所述CAR包括人源化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于自然表达低水平的MUC1*的K562-wt细胞，或已用高MUC1*转染的K562细胞。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是1:1、10:1、或20:1。在第1天(A)或第3天(B)，检测和测量存活细胞。

[0142] 图36是在共培养实验的第3天时靶细胞存活的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞或MUC1*阳性1500，又叫做ZR-75-1乳腺癌细胞。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是1:1或10:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞，对于MUC1*癌细胞，具有比未转导对照T细胞大得多的杀伤效果。此外，当增加T细胞:靶细胞的比率时，杀伤效果要大得多。

[0143] 图37是在共培养实验的第1天时靶细胞存活的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于以下MUC1*阳性癌细胞：T47D乳腺癌；capan2胰腺癌；或DU-145前列腺癌。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是5:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞，对于MUC1*癌细胞，具有比未转导对照T细胞大得多的杀伤效果。需要注意的是，仅在5:1的T细胞与靶细胞的比率下，在24小时以后，获得测量结果。还需要注意的是，具有CD4胞外结构域-跨膜-胞质尾区的MUC1*靶向CAR和CD8构建

体效果同样好。

[0144] 图38是在共培养实验的第3天时靶细胞存活的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于以下MUC1*阳性癌细胞：用MUC1*转染的K562白血病细胞；T47D乳腺癌；1500，又叫做ZR-75-1乳腺癌细胞；或CAPAN-2胰腺癌细胞。除未转导T细胞对照之外，还对PC3MUC1*阴性前列腺癌细胞进行测定。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是1:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞，对于MUC1*癌细胞，具有比未转导对照T细胞大得多的杀伤效果。此外，杀伤效果对于MUC1*阳性细胞是特异性的。需要注意的是，具有CD4胞外结构域-跨膜-胞质尾区的MUC1*靶向CAR和CD8构建体效果同样好。

[0145] 图39是在与靶细胞的共培养中，其中CAR T细胞与靶细胞的比率为5:1，CAR T细胞扩增经过(over，超过)24小时的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。连同MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞、MUC1*阳性Capan胰腺癌细胞、以及MUC1阴性细胞HCT-116结肠癌细胞和HEK-293人胚胎肾细胞一起来共培养CAR T细胞。如从图中可以看出，在MUC1*阳性细胞的存在下会增加CAR T群体。

[0146] 图40显示MUC1*靶向CAR的蛋白质印迹的照片。从1至9是：

[0147] 1.E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(人Fc，作为具有CD8 TM的铰链区)；

[0148] 2:E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(无铰链的人Fc，作为具有CD8 TM的铰链区)

[0149] 3:E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(人Fc，作为具有CD4 TM的铰链区)

[0150] 4:E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(人Fc，作为具有CD4 TM的无铰链铰链区)

[0151] 5:E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(铰链区，来自具有CD8 TM的人IgD)

[0152] 6:E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(铰链区，来自具有CD4 TM的人IgD)

[0153] 7:E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(长柔性接头，作为具有CD8 TM的铰链区)

[0154] 8:E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(长柔性接头，作为具有CD4 TM的铰链区)

[0155] 9:E6scFv-8-4-41BB-CD3z(铰链区，来自CD8和CD4 a，并具有CD4 TM)。

[0156] 图41示出与人T细胞一起共培养的T47D乳腺癌细胞的FACS扫描的图，其中上述人T细胞用MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z和MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z转导。在1:1的比率下，共培养T细胞和癌细胞48小时。将T细胞计数归一化到所有未转导T细胞的平均值以及将靶细胞归一化到各自特定的细胞类型(当和未转导T细胞一起共培养时)。该图显示，当和MUC1*阳性癌细胞一起共培养CAR T细胞时，T细胞群体扩大以及靶向癌细胞群体减小。

[0157] 图42示出与人T细胞一起共培养的T47D乳腺癌细胞、Capan-2胰腺癌细胞、K562-MUC1*转染细胞、和K562-wt细胞的FACS扫描的图，其中上述人T细胞用MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z和MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z转导。在1:1比率下，共培养T细胞和癌细胞48小时。将T细胞计数归一化到所有未转导T细胞的平均值以及将靶细胞归一化到各自特定的细胞类型(当和未转导T细胞一起共培养时)。该图显示，当和

MUC1*阳性癌细胞一起共培养CAR T细胞时,T细胞群体扩大以及靶向癌细胞群体减小。

[0158] 图43A、B是乳腺癌组织阵列的照片。A)用VU4H5染色,其识别MUC1-FL(全长);B)用小鼠单克隆抗体MN-C2染色,其识别癌性MUC1*。在自动染色(克莱恩诊断学(Clarient Diagnostics))以后,利用Allred评分方法,其结合强度评分和分布评分,来评分组织染色。C、D、E、F是颜色编码图,其显示对于每个患者的组织针对MUC1全长染色所计算的得分。G、H、I、J是颜色编码图,其显示对于每个患者的组织针对MUC1*染色所计算的得分。

[0159] 图44A、B是乳腺癌组织阵列的照片。A)用VU4H5染色,其识别MUC1-FL(全长);B)用小鼠单克隆抗体MN-C2染色,其识别癌性MUC1*。在自动染色(克莱恩诊断学)以后,利用Allred评分方法,其结合强度评分和分布评分,来评分组织染色。C、D、E、F是颜色编码图,其显示对于每个患者的组织针对MUC1全长染色所计算的得分。G、H、I、J是颜色编码图,其显示对于每个患者的组织针对MUC1*染色所计算的得分。

[0160] 图45显示用2.5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常乳腺和乳腺癌组织的照片。A)是正常乳腺组织。B-D是来自患者的乳腺癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体(secondary antibody)染色的相应的连续切片(serial section)的照片。

[0161] 图46显示用2.5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常乳腺和乳腺癌组织的照片。A)是正常乳腺组织。B-C是来自患者的乳腺癌组织,如图所示。D-F是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0162] 图47显示用10ug/mL的MN-E6抗MUC1*抗体染色,然后用兔抗小鼠次级HRP抗体染色的乳腺癌组织的照片。A-D是来自患者#300的乳腺癌组织。E-H是来自转移性患者#291的乳腺癌组织。

[0163] 图48显示用2.5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常肺和肺癌组织的照片。A)是正常肺组织。B、C是来自患者的肺癌组织,如图所示。D-F是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0164] 图49显示用2.5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常肺和肺癌组织的照片。A)是正常肺组织。B、C是来自患者的肺癌组织,如图所示。D-F是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0165] 图50显示用25ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常肺和肺癌组织的照片。A)是正常肺组织。B、C是来自患者的肺癌组织,如图所示。D-F是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0166] 图51显示用25ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常肺和肺癌组织的照片。A)是正常肺组织。B、C是来自患者的肺癌组织,如图所示。D-F是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0167] 图52显示用5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常小肠和癌性小肠组织的照片。A)是正常小肠组织。B)是来自患者的小肠癌,如图所示。C、D是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0168] 图53显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的正常小肠组织的照片。A-D是正常小肠组织。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0169] 图54显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的癌性小肠组织的照片。A-D是来自患者的癌性小肠组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0170] 图55显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的癌性小肠组织的照片。A-D是来自患者的癌性小肠组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0171] 图56显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的正常结肠组织的照片。A-D是正常结肠。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0172] 图57显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自转移性患者的结肠癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0173] 图58显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自等级2的患者的结肠癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0174] 图59显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自转移性患者的结肠癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0175] 图60显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0176] 图61显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0177] 图62显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色，然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织，如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

具体实施方式

[0178] 在本申请中，“一个”和“一种”用来指单个和多个对象。

[0179] 如在本文中所使用的，放在抗体构建体之前的“h”或“hu”是用于人源化的速记。

[0180] 如在本文中所使用的，术语“抗体样”是指这样的分子，其可以加以设计以致它含有抗体的部分但不是将天然存在于自然界中的抗体。实例包括但不限于CAR(嵌合抗原受体)T细胞技术和Ylanthia®技术。CAR技术使用融合于T细胞的一部分的抗体表位以致身体的免疫系统被引导攻击特定靶蛋白或细胞。Ylanthia®技术组成自“抗体样”库，其是合成的人Fab的集合，然后，针对与来自靶蛋白的肽表位的结合来筛选上述Fab。然后可以将所选的Fab区设计进入脚手架或架构以致它们类似于抗体。

[0181] 如在本文中所使用的，抗体MN-C2、MN-E6、MN-C3和MN-C8还可以分别称为C2、E6、C3和C8。

[0182] 如在本文中所使用的，“PSMGFR”是MUC1生长因子受体的初级序列的缩写，其由SEQ ID NO:2所确定，因而不要与六氨基酸序列混淆。“PSMGFR肽”或“PSMGFR区”是指这样的肽或区，其合并MUC1生长因子受体的初级序列(SEQ ID NO:2)。

[0183] 如在本文中所使用的，“MUC1*”胞外结构域主要由PSMGFR序列(GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:2))来定义。由于MUC1切割的确切位点取决于剪修它的酶，以及切割酶是变化的，其取决于细胞类型、组织类型或在细胞进化中的时间，所以在N端处MUC1*胞外结构域的确切序列可以变化。

[0184] 其它修剪的氨基酸序列可以包括SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)；或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。

[0185] 如在本文中所使用的，术语“PSMGFR”是MUC1生长因子受体的初级序列的缩写，如阐述为GTINVHDVETQFNQYKTEAASRY NLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:2)。在这方面，“N-数字”，如在“N-10PSMGFR”、“N-15PSMGFR”、或“N-20PSMGFR”中，是指在PSMGFR的N末端处已被删除的氨基酸残基的数目。同样，“C-数字”，如在“C-10PSMGFR”、“C-15PSMGFR”、或“C-20PSMGFR”中，是指在PSMGFR的C末端处已被删除的氨基酸残基的数目。

[0186] 如在本文中所使用的，“MUC1*的胞外结构域”是指没有串联重复结构域的MUC1蛋白的胞外部分。在大多数情况下，MUC1*是切割产物，其中MUC1*部分组成自没有串联重复序列的短胞外结构域、跨膜结构域和胞质尾区。MUC1的切割的精确位置是未知的，也许是因为似乎它可以由多于一种酶加以切割。MUC1*的胞外结构域将包括大部分的PSMGFR序列，但可以具有另外的10-20个N末端氨基酸。

[0187] 如在本文中所使用的，“序列同一性”是指在特定多肽或核酸的序列中相对于核酸或氨基酸的参比序列的同源性，以致同源肽的功能与参比肽或核酸相同。上述同源性可以如此靠近参比肽，以致有时两种序列可以是90％、95％或98％相同的但具有在结合或其它生物活性方面相同的功能。

[0188] MUC1＊抗体(抗PSMGFR)，用于癌症的治疗或预防

[0189] 我们发现，MUC1(SEQ ID NO:1)跨膜蛋白的切割形式是生长因子受体，其驱动超过75％的所有人癌症的生长。MUC1的切割形式，我们称其为MUC1*(发音为muk 1星)，是强大的生长因子受体。酶切割释放大部分(bulk)的MUC1胞外结构域。正是包含截短的胞外结构域、跨膜和胞质尾区的剩余部分被称为MUC1*。MUC1的胞外结构域的大部分的切割和释放会暴露用于激活配体二聚体NME1、NME6、NME8、NME7-AB或NME7的结合位点。细胞生长测定显示，正是MUC1*胞外结构域的配体诱导的二聚化促进了生长(图1A-D)。用二价‘bv’抗MUC1*抗体、单价‘mv’或Fab、NM23-H1二聚体或NME7-AB来处理MUC1*阳性细胞。二价抗MUC1*抗体刺激癌细胞的生长，而单价Fab则抑制生长。经典钟形曲线表明，配体诱导二聚化会刺激生长。二聚体NM23-H1，又叫做NME1，会刺激MUC1*阳性癌细胞的生长，但抑制MUC1表达的siRNA则消除其影响(C)。NME7-AB也刺激MUC1*阳性细胞的生长(D)。

[0190] MUC1*是癌症药物的理想的靶，因为它异常表达在超过75％的所有癌症上并且可能过度表达在甚至更高百分比的转移性癌症上(Fessler SP,Wotkowicz MT,Mahanta SK and Bamdad C.(2009)。在乳腺癌细胞中，MUC1*是曲妥单抗(赫赛汀)抗性的决定子。胸腺癌研究和治疗(Breast Cancer Res Treat.)118(1):113-124)。在MUC1切割以后，大部分的其

胞外结构域脱落自细胞表面。剩余部分具有截短的胞外结构域,其至少包含主要生长因子受体序列,PSMGFR(SEQ ID NO:2)。结合于PSMGFR序列的抗体以及尤其是那些竞争性地抑制激活配体如NME蛋白(包括NME1、NME6、NME8和NME7)的结合的抗体是理想的治疗剂并且可以用来治疗或预防MUC1阳性或MUC1*阳性癌症,作为独立的抗体、并入双特异性抗体中的其抗体片段或可变区片段、或嵌合抗原受体,其还称为CAR。治疗剂抗MUC1*抗体可以是单克隆、多克隆的抗体模拟物、工程化抗体样分子、全抗体或抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、scFv、和scFv-Fc。人或人源化抗体优选用于癌症的治疗或预防。在任何这些抗体样分子中,可以引入突变以防止或最小化二聚体形成。为单价或双特异性的抗MUC1*抗体是优选的,因为MUC1*功能是通过配体诱导二聚化来激活。典型的结合测定显示,NME1和NME7结合于MUC1*的PSMGFR肽部分(图2A,D)。此外,它们显示这些激活生长因子结合于MUC1*的近膜部分,因为它们并不结合于PSMGFR肽(如果10个C端氨基酸缺失)。类似地,抗MUC1*抗体MN-C2和MN-E6结合于PSMGFR肽(当且仅当存在10个C端氨基酸)(图2B,C)。抗体MN-C3和MN-C8结合于不同于MN-C2和MN-E6的表位,因为它们并不取决于PSMGFR肽的10个C端氨基酸的存在(图2E,F)。由免疫细胞表达的抗体MN-C2、MN-E6、MN-C3或MN-C8、或源自它们的片段,作为独立抗体或并入双特异性抗体、BiTE或嵌合抗原受体(其还称为CAR),均是有效的抗癌治疗剂。

[0191] 可以基于具体标准来选择用作独立抗体治疗剂或用于并入BiTE或CAR的治疗性抗MUC1*抗体。可以利用用于在动物中产生单克隆抗体的典型方法来产生亲本抗体。可替换地,可以针对它们结合于MUC1*肽的能力,通过筛选抗体和抗体片段库来选择它们,其中上述MUC1*肽可以是PSMGFR肽(SEQ ID NO:2)、SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620);或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。

[0192] 然后可以通过另外的筛选来进一步选择以这种方式所产生或选择的抗体或抗体片段。例如,基于它们结合于MUC1*阳性癌细胞或组织但不结合至MUC1阴性癌细胞或组织的能力,抗体或抗体片段成为更优选的。进一步地,如果它们结合于干细胞或祖细胞,则可以去选择抗MUC1*抗体或抗体片段作为抗癌治疗剂。如果它们能够竞争性地抑制激活配体与MUC1*的结合,则抗MUC1*抗体或抗体片段成为更优选的。图3A-C显示,MN-E6和MN-C2竞争性地抑制激活配体NME1和NME7与MUC1*的结合。用于选择用于治疗诊断有MUC1阳性癌症、有发展MUC1阳性癌症的风险或怀疑有MUC1阳性癌症的患者的抗MUC1*抗体的方法包括以下一个或多个步骤:选择抗体或抗体片段,其1)结合于PSMGFR肽;2)结合于N-10PSMGFR肽;3)结合于癌细胞;4)不结合于干细胞或祖细胞;以及5)竞争性地抑制二聚体NME1或NME7-AB与PSMGFR肽的结合。例如,图3A-C显示,单克隆MN-E6和MN-C2满足所有五个标准,而单克隆MN-C3和MN-C8则并不竞争性地抑制激活配体NME1和NME7的结合(图M3 C)。然而,当并入BiTE或CAR中时,如在这些方法中,源自MN-C3和MN-C8的抗体或抗体片段同样有效地作为抗癌剂,免疫细胞的杀伤效果是比抑制激活配体的结合的能力更重要的。此外,结合至MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的毒性剂是有效的抗癌治疗剂。回想一下,通过它的胞外结构域的配体诱导的二聚化来激活MUC1*生长因子受体。因此,理想的抗体治疗剂应不二聚化MUC1*胞外结构域。优选地,在这方面,适宜的抗体包括单价抗体如在美洲驼和骆驼中产生的那些单价抗体、Fab、scFv、单结构域抗体(sdAb)、scFv-Fc,只要构建Fc部分以致它并不同源二聚化。

[0193] FACS扫描显示,抗MUC1*抗体MN-C2、MN-E6、MN-C3和MN-C8特异性地结合于MUC1*阳性癌细胞和MUC1*转染细胞,但并不特异性地结合于MUC1*或MUC1阴性细胞。在一个实例中,人源化MN-C2scFv被显示为结合于ZR-75-1,又叫做1500,MUC1*阳性乳腺癌细胞(图4A-C)。当且仅当它们由MUC1*转染时,MN-E6被显示为结合于MUC1阴性HCT-116结肠癌细胞。MN-E6还结合至MUC1*阳性癌细胞如ZR-75-1,又叫做1500,MUC1*阳性乳腺癌细胞(图4D-F)。结合测定如ELISA、免疫荧光等都确认了MN-C2和MN-E6结合于PSMGFR肽并结合至活MUC1阳性癌细胞。基于它们还结合于PSMGFR肽或结合至MUC1阳性癌细胞的能力来选择人源化抗MUC1*抗体。图5显示人源化MN-C2 scFv高亲和力地结合于MUC1*肽PSMGFR,其中EC-50为约333nM。人源化MN-C2 scFv,像Fab,有效地抑制MUC1*阳性癌细胞的生长,如在图6A、B中的一个实例中所示。

[0194] MN-E6和MN-C2的Fab或源自它们的可比单链可变区体外和体内有效地抑制MUC1*阳性癌症的生长。在一些实例中,抗MUC1*抗体的Fab体内抑制人MUC1*阳性癌症的生长。在一种情况下,免疫受损小鼠被植入人乳腺肿瘤,然后在肿瘤植入以后用MN-E6 Fab治疗。图7A显示MN-E6 Fab有效地抑制MUC1*阳性乳腺癌的生长。植入有90天雌激素丸的雌性nu/nu小鼠被植入6百万个T47D人乳腺癌细胞,其已50/50与基质胶混合。选择带有肿瘤的小鼠用于治疗,其中上述肿瘤是至少150mm^3并具有肿瘤体积的连续三次增加。用80mg/kg MN-E6 Fab来皮下注射动物,每周两次,以及用单独的载体来注射符合相同的选择标准的相等数目的小鼠(A)。在另一方面,MN_E6被显示会停止前列腺癌的生长。图7B显示,MN-E6 Fab有效地抑制MUC1*阳性前列腺癌的生长。雄性NOD/SCID小鼠被植入6百万个DU-145人前列腺癌细胞,其已50/50与基质胶混合。选择带有肿瘤的小鼠用于治疗,其中上述肿瘤是至少150mm^3并具有肿瘤体积的连续三次增加。每48小时,用160mg/kg MN-E6 Fab来皮下注射动物,并用单独的载体来注射符合相同的选择标准的相等数目的小鼠(B)。每周两次,由两位研究者来独立测量肿瘤并记录。由独立统计员来盲目地计算统计数字,从而各自给出0.0001的P值。抗MUC1*Fab抑制乳腺癌生长和前列腺癌生长。治疗对重量、骨髓细胞类型或数量没有影响。MN-E6 Fab有效地抑制肿瘤的生长,而对照组的肿瘤则继续生长直至处死。没有观察或检测到治疗的不良反应。

[0195] 构建重组MN-E6,像Fab是单体的。在这种情况下,人源化MN-E6。存在本领域技术人员已知的用于人源化抗体的许多方法。除人源化之外,可以筛选人抗体的库以确定结合于PSMGFR的其它完全人抗体。基因工程化人源化MN-E6可变区的单链,称为scFv,以致它连接于抗体的Fc部分(SEQ ID NO:256和257)。Fc区对用作治疗剂的抗体片段赋予某些好处。抗体的Fc部分募集补体,其一般意味着它可以募集免疫系统的其他方面并因而放大抗肿瘤反应而超过只是抑制目标。Fc部分的添加还增加抗体片段的半衰期(Czajkowsky DM,Hu J,Shao Z and Pleass RJ.(2012)Fc-fusion proteins:new developments and future perspectives.EMBO Mol Med.4(10):1015-1028)。然而,抗体的Fc部分同源二聚化,其在基于抗MUC1*抗体的治疗剂的情况下不是最佳的,因为MUC1*受体的配体诱导的二聚化会刺激生长。如从图13B中可以看出,人源化MN-E6 scFv-Fc是二聚体,部分是由于二硫键。因此,在Fc区中抵制二聚体形成的突变对于抗MUC1*抗癌治疗剂是优选的。引起铰链区的缺失(无铰链,在一些图和实例SEQ ID NO:288和289中,还被称为δ铰链或脱铰链)和在Fc区中的其它突变,其使得Fc-突变体耐二聚化。在CH3结构域中制备以下突变以产生单体的scFv-Fc融合

蛋白:Y407R(SEQ ID NO:278和279)、F405Q(SEQ ID NO:280和281)、T394D(SEQ ID NO:282和283)、T366W/L368W(SEQ ID NO:284和285)、T364R/L368R(SE ID NO:286和287)。图14显示在非还原凝胶上纯化MN-E6 scFv-Fc融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片,其中融合于MN-E6的Fc部分是野生型(wt)或突变的,具体如下:A)F405Q、Y407R、T394D;B)T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W或T364R/L368R。Fc突变体F405Q、Y407R、T366W/L368W、T364R/L368R、T366W/L368W和T364R/L368R,就相对于二聚体形成而言,均有利于单体形成。图15显示经蛋白A亲和柱生长在低IgG FBS中的MN-E6 scFv-Fc Y407Q融合蛋白的纯化的FPLC痕迹。A)是通过流的痕迹。B)是洗脱的痕迹。经S200柱,通过尺寸排阻来进一步纯化蛋白质(C)。(D)是SDS-PAGE凝胶的照片,其显示哪些部分具有优势的单体。图16显示在非还原凝胶上纯化MN-E6 scFv-Fc-突变融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片,其中融合于MN-E6 scFv的Fc部分是野生型(wt)或突变的,其中通过消除Fc的铰链区,'脱铰链',或通过消除Fc的铰链区以及还携带Y407R突变。所有Fc突变体,相对于二聚体形成,有利于单体形成。用于指定突变的参比构建体氨基酸序列是SEQ ID NO:273。其他相关序列是SEQ ID NOS:289和279。图17A-C。A和B显示MN-E6 scFv-Fc无铰链突变体的大规模表达和纯化的非还原SDS-PAGE特征的照片,其表明它是单体。示出MN-E6 scFv-Fc无铰链突变体的FPLC特征和纯化(C)。图18A-C显示在非还原凝胶上(A)或还原凝胶(B)上纯化MN-C3 scFv-Fc融合蛋白的SDS-PAGE特征的照片。通过尺寸排阻来纯化蛋白质。示出FPLC痕迹(C)。图19A-B显示MN-C3或MN-E6 Fab、scFv、scFv-Fc的天然凝胶的照片,其中Fc部分是野生型或突变体,其更优选或唯一地是单体。天然凝胶显示,Y407R Fc突变(A)以及双突变体Y407R和缺失的铰链(B),相对于二聚体,最有利于单体。需要注意的是,以比典型的使用浓度高得多的浓度,将蛋白质加载到凝胶上。其它Fc突变体的二聚体形成可以仅反映以下事实:装载浓度非常高。

[0196] 一些突变或缺失是如此有效,以致即使在高浓度下加载到凝胶上,它们也抵制二聚体形成(图14A、B)。Y407R突变导致二聚体scFv-Fc的几乎纯群体(图10)。类似地,Fc的铰链区的缺失导致为单体而不是二聚体的融合蛋白。突变的组合可以导致二聚体形成的甚至更有效的抗性(图16和17)。将这些和其他突变以及它们的组合引入CH2-CH3(SEQ ID NO:274和275)和CH3(SEQ ID NO:276和277)融合蛋白如scFv或在无铰链Fc-融合蛋白中如scFv并且显示出会消除或最小化二聚化。

[0197] 像亲代小鼠单克隆抗体,人或人源化抗体以及单链构建体、scFv、scFv-Fc融合体或scFv-Fc-突变体特异性地结合于合成MUC1*肽(图20-22)。图E23示出ELISA测定的曲线图,其中上述ELISA测定量化人源化MN-E6 scFv-Fc-δ铰链,又叫做脱铰链或无铰链,和人源化MN-E6scFv与MUC1*肽PSMGFR的结合。

[0198] 这里描述的人或人源化抗MUC1*抗体片段特异性地结合于MUC1和MUC1*阳性癌细胞。图24显示免疫荧光实验的照片,其中人源化MN-C2 scFv或MN-E6 scFv以相同的浓度依赖性方式,特异性地结合于MUC1*阳性乳腺癌细胞。A-G:在指示浓度下,hu MN-C2 scFv结合于T47D乳腺癌细胞。H-N显示荧光标记的scFv和DAPI。O-U:在指示浓度下,hu MN-E6 scFv结合于T47D乳腺癌细胞。V-B'显示荧光标记的scFv以及DAPI。C'是次级抗体对照。

[0199] 除结合于MUC1*阳性癌细胞之外,抗MUC1*抗体可变区片段、scFv、scFv-Fc和scFv-Fc-突变体还抑制MUC1阳性癌细胞的生长。图25A-L显示MUC1*阳性乳腺癌细胞的照片,其已在普通培养基中或在人源化MN-E6 scFv的存在下加以。照片显示,在5ug/mL下,MN-E6 scFv

对MUC1*阳性细胞的杀伤和/或生长抑制，以及在500ug/mL下甚至更大的效果。图26A-L显示MUC1*阳性乳腺癌细胞的照片，其已在普通培养基中或在人源化MN-E6 scFv-Fc脱铰链(其是无铰链或δ铰链突变体)的存在下培养。照片显示5ug/mL的hMN-E6 scFv-Fc脱铰链对MUC1*阳性细胞的杀伤和/或生长抑制，在50ug/mL下的甚至更大的效果，以及在100ug/mL下甚至还要更大的效果。图27示出图25和26的荧光图像的图像分析的图。图像J用来量化在人源化MN-E6scFv或MN-E6scFv-Fc-δ铰链又叫做脱铰链中96小时治疗以后剩余的细胞数目。分析软件使用像素计数和像素荧光强度来量化在每个照片中的细胞数目。对整个图像512X512像素，8位图像，进行分析。为了比较，还分析了小鼠单克隆MN-E6 Fab的抑制。

[0200] 这些数据表明，人或人源化MN-E6抗体或抗体片段、Fab、MN-E6scFv或hu MN-E6 scFv-Fc_{mut}是有效的抗癌剂，其可以被给予诊断有MUC1或MUC1*阳性癌症、怀疑有MUC1或MUC1*阳性癌症、或有发展MUC1或MUC1*阳性癌症的风险的人。

[0201] 在这些具体的实施例中，融合到抗体片段或scFv的耐二聚体的Fc是hu MN-E7 scFv。然而，消除或最小化二聚化的任何这些Fc区突变或它们的组合可以被融合到可变区片段或MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的单链构建体，或确定的选择性地结合于MUC1*(当它存在于癌细胞或组织上时)的其它抗体。此外，这些抗体的Fab可以用作抗癌治疗剂。在本发明的一方面，用有效量的人或人源化MN-E6 scFv、MN-C2scFv、MN-C3 scFv、或MN-C8 scFv来治疗诊断有、怀疑有或有发展MUC1*或MUC1阳性癌症的风险的人。在本发明的另一方面，用有效量的人或人源化MN-E6 scF_V-Fc_{Y407R}、MN-C2 scFv-Fc_{Y407R}、MN-C3 scFv-Fc_{Y407R}、或MN-C8 scFv-Fc_{Y407R}来治疗诊断有、怀疑有或有发展MUC1*或MUC1阳性癌症的风险的人。在本发明的另一方面，用有效量的人或人源化MN-E6 scFv-Fc突变体$_{脱铰链}$、MN-C2 scFv-Fc突变体$_{脱铰链}$、MN-C3scFv-Fc突变体$_{脱铰链}$、或MN-C8 scFv-Fc突变体$_{脱铰链}$来治疗诊断有、怀疑有或有发展MUC1*或MUC1阳性癌症的风险的人。在本发明的又一方面，用有效量的人或人源化MN-E6 scFv-Fc突变体$_{Y407R-脱铰链}$、MN-C2 scFv-Fc突变体$_{Y407R-脱铰链}$、MN-C3 scFv-Fc突变体$_{Y407R-脱铰链}$、或MN-C8 scFv-Fc突变体$_{Y407R-脱铰链}$来治疗诊断有、怀疑有或有发展MUC1*或MUC1阳性癌症的风险的人。本发明的一个方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中患者被给予有效量的单体的MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、MN-C8 scFv、或MN-E6 scFv-Fc、MN-C2 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C8 scFv-Fc，其中抗体样蛋白的Fc部分已被突变，以致它抵抗二聚体形成。

[0202] 人源化

[0203] 结合于-MUC1*的胞外结构域的人源化抗体或抗体片段或完全人抗体优选用于治疗用途。这里描述的用于人源化抗体的技术只是本领域技术人员已知的多种方法的几种。本发明不意味着受限于用来人源化抗体的技术。

[0204] 人源化是这样的过程，其用人抗体的区替换治疗性抗体(通常为小鼠单克隆抗体)的非人区而没有改变其结合特异性和亲和力。人源化的主要目标是当给予人时减弱治疗性单克隆抗体的免疫原性。三种不同类型的人源化是可能的。首先，通过用人恒定区替换抗体的非人恒定区来制备嵌合抗体。这样的抗体将包含小鼠Fab区以及将包含约80-90％的人序列。第二，通过将小鼠CDR区(负责特异性)移植到人抗体可变区，替换人CDR(CDR-移植方法)来制备人源化抗体。这样的抗体将包含约90-95％的人序列。第三和最后，可以通过噬菌体展示来产生全人抗体(100％人序列)，其中筛选人抗体的库以选择抗原特异性人抗体，或通

过表达人抗体的免疫转基因小鼠。

[0205] 大约如下实践用于人源化抗体的一般技术。在宿主动物中，通常在小鼠中，产生单克隆抗体。然后筛选单克隆抗体结合于目标的亲和力和特异性。在确定了具有所期望的效果和所需特征的单克隆抗体以后，测定其序列。然后对准动物产生的抗体的序列与许多人抗体的序列，以找到与动物抗体具有最同源的序列的人抗体。生化技术用来将人抗体序列和动物抗体序列粘贴在一起。通常，将非人CDR嫁接到与非人抗体具有最高同源性的人抗体。这个过程可以产生许多候选人源化抗体，其需要加以测试以确定哪个抗体或哪些抗体具有所期望的亲和力和特异性。

[0206] 在已产生人抗体或人源化抗体以后，可以进一步修饰它以用作Fab片段、全抗体、或抗体样实体如含有可变区的单链分子，如scFv或scFv-Fc。在一些情况下，期望具有抗体的Fc区或抗体样分子突变，以致它并不二聚化。

[0207] 除在在非人物种中产生的抗体中引入人序列的方法之外，还可以通过筛选具有抗原的肽片段的人抗体库来获得完全人抗体。通过筛选具有PSMGFR N-10肽的序列的肽的人抗体库来产生功能像MN-E6或MN-C2的完全人抗体。通过筛选具有肽的人抗体库来产生功能像MN-C3或MN-C8的完全人抗体，其中上述肽具有PSMGFR C-10肽的序列。

[0208] 基于小鼠单克隆抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3和MN-C8的序列来产生人源化抗MUC1*抗体。在本发明的一方面，用有效量的人源化MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8来治疗诊断有MUC1*阳性癌症的患者。在优选实施方式中，用有效量的人源化MN-E6或MN-C2来治疗诊断有MUC1*阳性癌症的患者。在本发明的另一方面，用有效量的人源化单价MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8来治疗诊断有MUC1*阳性癌症的患者，其中单价是指相应的Fab片段、相应的scFv或相应的scFv-Fc融合体。在优选实施方式中，用有效量的MN-E6或MN-C2的人源化scFv或单体的人源化scFv-Fc来治疗诊断有MUC1*阳性癌症的患者。因为通过其胞外结构域的配体诱导二聚化来激活MUC1*生长因子受体，以及由于抗体的Fc部分同源二聚化，所以优选的是，包括Fc部分的构建体使用防止或最小化二聚化的突变Fc区。

[0209] 结合于MUC1*受体的胞外结构域的PSMGFR(SEQ ID NO:2)肽的抗体是有效的抗癌治疗剂，其有效地用于治疗或预防MUC1*阳性癌症。它们已被证明会抑制激活配体二聚体NME1(SEQ ID NOS:3和4)和NME7(SEQ ID NOS:5和6)与MUC1*的胞外结构域的结合。结合于PSMGFR序列的抗MUC1*抗体抑制MUC1*阳性癌细胞的生长，尤其是如果它们抑制配体诱导受体二聚化。抗MUC1*抗体的Fab已被证明在动物中会阻止肿瘤生长。因而，结合于MUC1*的胞外结构域的抗体或抗体片段将有益于癌症治疗，其中癌组织表达MUC1*。

[0210] 结合于MUC1*的PSMGFR区或结合于合成PSMGFR肽的抗体是优选的。我们已经确定了结合于MUC1*的胞外结构域的若干单克隆抗体。在这组中有小鼠单克隆抗体MN-E6、MN-C2、MN-C3和MN-C8，它们的可变区被测序并被给予MN-E6 SEQ ID NO:12-13和65-66、MN-C2SEQ ID NO:118-119和168-169、MN-C3 SEQ ID NO:413-414和458-459以及MN-C8 SEQ ID NO:505-506和543-554。这些抗体的CDR构成抗体的识别单元并且是当移植进入人抗体时应保留的小鼠抗体的最重要的部分。对于每种小鼠单克隆的CDR的序列如下，重链序列，随后轻链：MN-E6 CDR1(SEQ ID NO:16-17和69-70)CDR2(SEQ ID NO:20-21和73-74)CDR3(SEQ ID NO:24-25和77-78)、MN-C2 CDR1(SEQ ID NO:122-123和172-173)CDR2(SEQ ID NO:126-127和176-177)CDR3(SEQ ID NO:130-131和180-181)、MN-C3 CDR1(SEQ ID NO:417-418和

462-463)CDR2(SEQ ID NO:421-422和466-467)CDR3(SEQ ID NO:425-426和470-471)、MN-C8 CDR1(SEQ ID NO:507-508和545-546)CDR2(SEQ ID NO:509-510和547-548)CDR3(SEQ ID NO:511-512和549-550)。在一些情况下,通过建模,被认为对于CDR的三维结构是重要的架构区的部分还导入自小鼠序列。

[0211] 单克隆抗体MN-E6和MN-C2对于MUC1*具有更大的亲和力,这是因为它出现在癌细胞上。单克隆抗体MN-C3和MN-C8对于MUC1*具有更大的亲和力,这是因为它出现在干细胞上。通过序列对齐,以下人抗体被选为足够同源于小鼠抗体,以致小鼠CDR的替代将导致抗体保留识别目标的能力。小鼠MN-E6重链可变区是同源于人IGHV3-21*03重链可变区(SEQ ID NO:26-27)以及轻链可变区是同源于人IGKV3-11*02轻链可变区(SEQ ID NO:79-80)。小鼠MN-C2重链可变区是同源于人IGHV3-21*04重链可变区(SEQ ID NO:132-133)以及轻链可变区是同源于人IGKV7-3*01轻链可变区(SEQ ID NO:182-183)。小鼠MN-C3重链可变区是同源于人IGHV1-18*04重链可变区(SEQ ID NO:427-428)以及轻链可变区是同源于人IGKV2-29*03轻链可变区(SEQ ID NO:472-473)。小鼠MN-C8重链可变区是同源于人IGHV3-21*04重链可变区(SEQ ID NO:513-514)以及轻链可变区是同源于人Z00023轻链可变区(SEQ ID NO:551-552)。

[0212] 所有四种抗体已被人源化,其过程已导致每种抗体的若干人源化形式。源自小鼠抗体的可变区的CDR被生化嫁接到同源人抗体可变区序列。通过将小鼠CDR移植进入同源人抗体的可变区来产生MN-E6(SEQ ID NO:38-39和93-94)、MN-C2(SEQ ID NO:144-145和194-195)、MN-C3(SEQ ID NO:439-440和486-487)以及MN-C8(SEQ ID NO:525-526和543-544)的人源化可变区。然后将人源化重链可变构建体融合入恒定区:人IgG1重链恒定区(SEQ ID NO:58-59)或人IgG2重链恒定区(SEQ ID NO:54-55),其然后与人源化轻链可变构建体配对,所述构建体融合于人κ链(SEQ ID NO:109-110),或人λ链(SEQ ID NO:113-114)恒定区。其它IgG同型可以用作恒定区,包括IgG3或IgG4。

[0213] 产生了以下实例:进入IgG2重链(SEQ ID NO:52-53)和进入IgG1重链(SEQ ID NO:56-57)的人源化MN-E6可变区,人源化MN-C2可变区,其进入IgG1重链(SEQ ID NO:158-159)或进入IgG2重链(SEQ ID NO:163-164),其与λ轻链(SEQ ID NO:111-112和216-219)或κ链(SEQ ID NO:107-108和210-213)配对,以及人源化MN-C3(SEQ ID NO:455-456、453-454和500-501、502-503)和MN-C8(SEQ ID NO:541-542、539-540和579-580、581-582)抗体。将何种IgG恒定区融合于人源化可变区取决于所期望的效果,因为每种同型具有其自己的特征活性。人恒定区的同型的选择是基于因素如是否期望抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC),但还可以取决于在基于细胞的蛋白质表达系统中产生的抗体的产率。在优选实施方式中,将人源化抗MUC1*抗体或抗体片段给予诊断有或有发展MUC1阳性癌症的风险的人。

[0214] 用于测试和选择将最可用于治疗患有癌症或有发展癌症的风险的人的人源化抗MUC1*抗体的一种方法是测试它们的抑制激活配体与MUC1*胞外结构域的结合的能力。二聚体NME1可以结合于和二聚化MUC1*胞外结构域以及进而刺激癌细胞生长。为结合于MUC1*胞外结构域而与NME1竞争的抗体和抗体片段因此是抗癌剂。NME7是MUC1*的另一种激活配体。在一些情况下,优选的是,确定这样的抗体,其阻止NME7、或NME7截短或切割产物与MUC1*胞外结构域的结合。对于结合于MUC1*胞外结构域而与NME7和NME7变体竞争的抗体和抗体片

段是有效作为抗癌治疗剂。这些抗体包括但不限于MN-E6、MN-C2、MN-C3、MN-C8以及这些抗体的单链版本如scFv,以及它们的人源化版本。其它NME蛋白也结合于MUC1或MUC1*,包括NME6和NME8。针对结合于MUC1*,与这些蛋白质竞争的抗体也可以用作治疗剂。在优选实施方式中,将人源化抗MUC1*抗体或抗体片段给予诊断有或有发展MUC1-阳性癌症的风险的人。在更优选的实施方式中,将源自MN-E6和MN-C2的人源化序列的单链抗体片段、或单体的scFv-Fc融合体给予诊断有或有发展MUC1阳性癌症的风险的人。

[0215] 导致单价抗体或抗体样蛋白的单链可变片段,scFv,或其他形式也是有用的。在一些情况下,希望防止MUC1*胞外结构域的二聚化。单链可变片段、Fab和其它单价抗体样蛋白已被证明可有效结合于MUC1*的胞外结构域并阻止MUC1*二聚化。这些单链可变片段、Fab和其它单价抗体样分子在体外和在异种移植有人MUC1阳性癌细胞的动物中有效地阻止癌症生长。因而,人源化单链可变片段或单价抗MUC1*抗体或抗体样分子将非常有效地作为抗癌治疗剂。因此,这样的人源化单链抗体、Fab和其它单价抗体样分子,其结合于MUC1*胞外结构域或结合至PSMGFR肽,可用作抗癌治疗剂。通过移植抗体的非人CDR,其结合于MUC1*的胞外结构域或结合至PSMGFR肽,进入同源可变区人抗体的架构,来产生抗MUC1*单链可变片段。然后,通过合适的接头,彼此连接所得人源化重和轻链可变区,其中接头应是柔性的并具有一定长度,以致它允许重链结合于轻链,但阻碍一种分子的重链结合于另一种分子的轻链。例如约10-15个残基的接头。优选地,接头包括$[(甘氨酸)_4(丝氨酸)_1]_3$(SEQ ID NO:401-402),但不限于这种序列,因为其它序列是可能的。

[0216] 在一方面,将MN-E6(SEQ ID NO:38-39和93-94)、MN-C2(SEQ ID NO:144-145和194-195)、MN-C3(SEQ ID NO:439-440和486-487)和MN-C8(SEQ ID NO:525-526和565-566)的人源化可变区生化嫁接到构建体,其通过接头来连接重链和轻链。产生人源化单链抗MUC1*抗体的实例,其包含来自MN-E6、MN-C2、MN-C3和MN-C8的可变区的人源化序列。产生了若干人源化MN-E6单链蛋白(SEQ ID NO:232-237)。产生了若干人源化MN-C2单链蛋白(SEQ ID NO:238-243)。产生了若干人源化MN-C3单链蛋白(SEQ ID NO:244-249)。产生了若干人源化MN-C8单链蛋白(SEQ ID NO:250-255)。在优选实施方式中,将人源化抗MUC1*抗体片段,包括可变片段、scFv抗体片段MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、或MN-C8 scFv,给予诊断有或有发展MUC1阳性癌症的风险的人。在更优选的实施方式中,将单链抗体片段,如源自MN-E6和MN-C2的人源化序列的可变片段,给予诊断有或有发展MUC1阳性癌症的风险的人。

[0217] 在另一方面,将MN-E6(SEQ ID NO:38-39和93-94)、MN-C2(SEQ ID NO:144-145和194-195)、MN-C3(SEQ ID NO:439-440和486-487)和MN-C8(SEQ ID NO:525-526和565-566)的人源化可变区生化嫁接到单链可变片段,scFv,其还含有抗体的Fc部分。产生了融合于抗体的Fc区的MN-E6、MN-C2、MN-C3和MN-C8的人源化单链可变片段的实例(SEQ ID NO:256-257、260-261、264-265和268-269)。Fc区的包括有几个目的。它增加抗体片段的分子量,其会减慢退化并增加半衰期。Fc区还募集免疫系统互补到肿瘤部位。另外,抗体Fc区的添加使scFv成为方便的诊断工具,因为次级抗体检测和标记Fc部分。然而,Fc部分同源二聚化。因而,scFv-Fc将是二价的并可以二聚化以及激活MUC1*生长因子受体。为了获得具有连接于抗MUC1*scFv的Fc的好处,而没有诱导MUC1*二聚化的缺点,突变Fc区以最小化或消除Fc同源二聚体形成。在CH3域中形成以下突变以产生单体的scFv-Fc融合蛋白:Y407R(SEQ ID

NO:278和279)、F405Q(SEQ ID NO:280和281)、T394D(SEQ ID NO:282和283)、T366W/L368W(SEQ ID NOD:284和285)、T364R/L368R(SEQ ID NO:286和285)。那些突变的任何组合可以加以测试并可以引入Fc(SEQ ID NO:272-273)、CH2-CH3(SEQ ID NO:274-275)或CH3(SEQ ID NO:276-277)融合蛋白或无铰链Fc融合蛋白(SEQ ID NO:288-289)。

[0218] 本发明的一个方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法,其中将有效量的单体的MN-E6 scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv、MN-C8 scFv、或MN-E6 scFv-Fc、MN-C2 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc、MN-C8 scFv-Fc给予患者,其中抗体可变片段部分是人的或已被人源化以及其中已突变抗体样蛋白的Fc部分以致它抵抗二聚体形成。

[0219] CAR T和癌症免疫治疗技术

[0220] 在本发明的另一方面,利用几种不同的嵌合抗原受体,'CAR'策略,将抗MUC1*抗体片段的一些或全部的单链部分生化融合到免疫系统分子。这个想法是将抗体的识别部分,通常作为单链可变片段,融合到具有跨膜结构域的免疫系统分子和能够发送激活免疫系统的信号的胞质尾区。识别单元可以是抗体片段、单链可变片段、scFv、或肽。在一方面,CAR的胞外结构域的识别部分组成自来自MN-E6(SEQ ID NO:38-39和93-94)、MN-C2(SEQ ID NO:144-145和194-195)、MN-C3(SEQ ID NO:439-440和486-487)和MN-C8(SEQ ID NO:525-526和565-566)的人源化可变区的序列。在另一方面,它组成自来自单链可变片段的序列。给出单链构建体的实例。产生了若干人源化MN-E6单链蛋白,scFv(SEQ ID NO:232-237)。产生了若干人源化MN-C2单链蛋白,scFv(SEQ ID NO:238-243)。产生了若干人源化MN-C3单链蛋白,scFv(SEQ ID NO:244-249)。产生了若干人源化MN-C8单链蛋白,scFv(SEQ ID NO:250-255)。CAR的跨膜区可以源自CD8、CD4、抗体结构域或其它跨膜区,包括近侧胞质共刺激域的跨膜区。CAR的胞质尾区可以组成自信号免疫系统激活的一种或多种基序。此组胞质信号基序,有时称为共刺激细胞质结构域,包括但不限于CD3-ζ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7和Fc受体γ域。最小CAR可以具有CD3-ζ或Fc受体γ域,其中上述域的一个或两个串联在胞质尾区上。在一方面,胞质尾区包含CD3-ζ、CD28、4-IBB和/或OX40。产生了人源化MN-E6 CAR的若干实例:CAR MN-E6 CD3z(SEQ ID NO:294-295);CAR MN-E6 CD28/CD3z(SEQ ID NO:297-298);CAR MN-E6 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:300-301);CAR MN-E6 OX40/CD3z(SEQ ID NO:616-617);CAR MN-E6 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NO:618-619);CAR MN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:303-304)。产生了人源化MN-C2 CAR的若干实例:CAR MN-C2 CD3z(SEQ ID NO:606-607);CAR MN-C2 CD28/CD3z(SEQ ID NO:608-609);CAR MN-C2 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:610-611);CAR MN-C2OX40/CD3z(SEQ ID NO:612-613);CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:306-307);CAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NO:614-615)。产生了人源化MN-C3 CAR:CAR MN-C3 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:600-601)。

[0221] 产生了具有不同铰链区的人源化MN-E6 CAR(SEQ ID NO:345-360)的若干实例:CAR MN-E6-Fc/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:310-311);CAR MN-E6 FcH/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:315-316);CAR MN-E6Fc/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:318-319);CAR MN-E6 FcH/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:321-322);CAR MN-E6 IgD/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:323-324);CAR MN-E6 IgD/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:327-328);CAR MN-E6 X4/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:330-

331);CAR MN-E6X4/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:333-334);CAR MN-E6 8+4/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:336-337)。此外,还产生了若干人源化MN-C3单链可变片段和人源化MN-C8单链可变片段。

[0222] MUC1*靶向CAR的胞外结构域识别单元可以包含人源化MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的可变区,或其他抗体,其结合于MUC1*或PSMGFR肽的PSMGFR部分。在一方面,CAR的胞外结构域识别单元基本上组成自人源化MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8单链可变片段scFv。CAR的跨膜区可以源自CD8(SEQ ID NO:363-364),或可以是CD3-ζ、CD28、41bb、OX40的跨膜结构域或其它跨膜区(SEQ ID NO:361-372),以及具有靶向MUC1*胞外结构域的抗体片段的CAR的细胞质结构域可以组成自一种或多种,其选自由免疫系统共刺激细胞质结构域组成的组。上述组的免疫系统共刺激域包括但不限于CD3-ζ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7和Fc受体γ域(SEQ ID NO:373-382)。可替换地,CAR的识别单元部分可以包含肽,其中肽结合于目标。NME7结合于以及激活MUC1*。在本发明的一方面,CAR的识别单元是源自NME7(SEQ ID NO:5-6)的肽或源自NME7的肽,包括但不限于NME7肽A1(SEQ ID NO:7)、NME7肽A2(SEQ ID NO:8)、NME7肽B1(SEQ ID NO:9)、NME7肽B2(SEQ ID NO:10)和NME7肽B3(SEQ ID NO:11)。

[0223] 用于生成CAR的一些策略包括与自身二聚化的分子的一部分。在一些情况下,目标的二聚化是不可取的。因此,可以构建CAR以致它们异源二聚化。在一种情况下,第一CAR的识别单元结合于第一目标,而第二CAR的识别单元则结合于第二目标。两种识别单元可以是抗体片段,均可以是肽,或一种可以是抗体片段以及另一种是肽。CAR的第一目标可以是MUC1*的胞外结构域。CAR的识别单元将组成自抗体片段,其结合于MUC1*胞外结构域或结合至PSMGFR肽。可替换地,CAR的识别单元将组成自肽,其结合于MUC1*胞外结构域,这样的肽包括源自NME蛋白的肽如NME1或NME7,更具体地列为SEQ ID NO:7-11的NME7衍生肽。杂二聚体CAR的第二目标可以是结合于NME7的肽或抗体片段。可替换地,杂二聚体CAR的第二目标可以是肽或抗体片段,其结合于MUC1*呈递细胞上的PD1或其他目标。第二目标可以是结合于NME1的肽或抗体片段。因为需要防止由CAR诱导的MUC1的二聚化,所以可以构建杂二聚体CAR以致仅一种分子的胞外结构域具有胞外识别单元,其结合于目标(SEQ ID NO:584-587)。另一种分子可以具有截短的胞外结构域,其没有目标识别单元或抗体片段(SEQ ID NO:588-599)。可以将描述的CAR转染或转导进入免疫系统的细胞。在优选实施方式中,将MUC1*靶向CAR转染或转导进入T细胞。在一方面,T细胞是CD3+/CD28+T细胞。在另一种情况下,它是树突状细胞。在另一种情况下,它是B细胞。在另一种情况下,它是肥大细胞。受体细胞可以来自患者或来自供体。如果来自供体,它可以工程化以去除将触发排斥的分子。可以离体或体外扩增用本发明的CAR转染或转导的细胞,然后将其给予患者。选择的给予途径包括但不限于骨髓移植、静脉注射、原位注射或移植。在优选实施方式中,将MUC1*靶向CAR给予诊断有或有发展MUC1阳性癌症的风险的人。

[0224] 有许多可能的抗MUC1*CAR构建体,其可以被转导进入T细胞或其它免疫细胞,用于治疗或预防MUC1*阳性癌症。CAR由组件组成以及一些组件的特性是相对不重要的,而其它组件的特性是非常重要的。

[0225] 我们的实验证明,在CAR的最外部分处的抗体识别片段是非常重要的,这是由于它将携带CAR的免疫细胞靶向肿瘤部位。细胞内信号基序也是非常重要的但可以互换。图28显

示CAR的组分的示意图以及可以包括在CAR中的各种序列。参照图28，

[0226] R1是:没有;或

[0227] 癌症相关抗原的配体或配体的片段;或

[0228] MUC1或MUC1*的配体或配体的片段;或

[0229] 抗体或抗体片段，其中抗体或抗体片段结合于MUC1或MUC1*;或抗体或抗体片段，其中抗体或抗体片段结合于PSMGFR*，其中抗体可以是人的或人源化的;或MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8或人源化MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的抗体或抗体片段;或抗体的单链可变片段，scFv，其结合于切割MUC1或MUC1*;或MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8的scFv，其可以被人源化;或肽，其结合于MUC1*或PSMGFR肽;或是抗体片段、scFv、或肽，其结合MUC1*的PSMGFR部分;或组成自序列，其来自MN-E6(SEQ ID NO:38-39和93-94)、MN-C2(SEQ ID NO:144-145和194-195)、MN-C3(SEQ ID NO:439-440和486-487)和MN-C8(SEQ ID NO:525-526和565-566)的人源化可变区。在一方面，R1是scFv，其结合MUC1*的PSMGFR部分，其组成自序列，上述序列来自人源化MN-E6 scFv(SEQ ID NO:232-237)、人源化MN-C2 scFv(SEQ ID NO:238-243)、人源化MN-C3 scFv(SEQ ID NO:244-249)或人源化MN-C8 scFv(SEQ ID NO:250-255)。在另一方面，R1是scFv，其结合MUC1*的PSMGFR部分，其组成自序列，上述序列来自人源化MN-E6 scFv(SEQ ID NO:232-237)或人源化MN-C2scFv(SEQ ID NO:238-243)。在一个实例中，R1是scFv，其结合MUC1*的PSMGFR部分，其组成自序列，上述序列来自人源化MN-E6 scFv(SEQ ID NO:232-237)。

[0230] R2是多肽柔性接头，其连接识别部分至CAR的跨膜结构域。在一方面，R2可以是5至250个氨基酸的不同长度的多肽接头。在另一方面，R2是人起源的多肽接头。在一方面，R2可以构成自人免疫球蛋白的Fc区(IgG、IgA、IgE、IgM或IgD)或是其的修饰。在另一方面，R2可以是人免疫球蛋白(IgG、IgA、IgE、IgM或IgD)的铰链区或上述铰链区的修饰。在一方面，R2可以是T细胞受体(CD8a、CD28或CD4)的铰链区或上述铰链区的修饰。在一个实例中，R2是CD8a的铰链区、人IgD的铰链区或人IgG1的Fc域。

[0231] R3是跨膜结构域。在一方面，R3可以是跨膜结构域或任何跨膜人蛋白的跨膜结构域的修饰。在另一方面，R3可以是跨膜结构域或来自人细胞受体的跨膜结构域的修饰。在一方面，R3可以是T细胞受体(CD8a、CD4。CD28、CD3z、OX40或41-BB)的跨膜结构域或上述跨膜结构域的修饰。在另一方面，R3是来自CAR的第一胞质共刺激域的跨膜结构域。在一方面，R3可以是跨膜结构域或T细胞受体的跨膜结构域的修饰，其延伸有与跨膜结构域相关的细胞质结构域的1、2、3、4或5个氨基酸。在另一方面，R3可以是跨膜结构域或T细胞受体的跨膜结构域的修饰，其延伸有与跨膜结构域相关的细胞质结构域的1、2、3、4或5个氨基酸，接着用于二硫键形成的半胱氨酸。在一个实例中，R3是CD8a或CD4的跨膜结构域。

[0232] R4是来自T细胞受体的信号域。在一方面，R4可以是CD3-ζ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7和Fc受体γ域的胞质信号域。在一个实例中，R4是CD3-ζ的细胞质结构域。再生了具有单信号域的人源化CAR(CAR I)的若干实例:CAR MN-E6 CD3z(SEQ ID NOS:294-295);CAR MN-C2 CD3z(SEQ ID NO:606-607)。

[0233] R5是来自T细胞受体的共刺激域。在一方面，R5可以是CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7和Fc受体γ域的胞质信号域。R5将不同于R4和R6。在一个实例中，R5是CD28、4-1BB或OX40的细胞质结构域。再生了具有两个信号域

的人源化CAR(CAR II)的若干实例:CAR MN-E6CD28/CD3z(SEQ ID NO:297-298);CAR MN-E6 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:300-301);CAR MN-E6 OX40/CD3z(SEQ ID NO:616-617);CAR MN-C2 CD28/CD3z(SEQ ID NO:608-609);CAR MN-C2 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:610-611);CAR MN-C2 OX40/CD3z(SEQ ID NO:612-613);MN-C3 4-1BB/CD3z(SEQ ID NOS:600-601);CAR MN-E6-Fc/8/41BB/CD3z(SEQ ID NOS:310-311);CAR MN-E6 FcH/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:315-316);CAR MN-E6 Fc/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:318-319);CAR MN-E6 FcH/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:321-322);CAR MN-E6 IgD/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:323-324);CAR MN-E6IgD/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:327-328);CAR MN-E6 X4/8/41BB/CD3z(SEQ ID NO:330-331);CAR MN-E6 X4/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:333-334);CAR MN-E6 8+4/4/41BB/CD3z(SEQ ID NO:336-337)。

[0234] R6是来自T细胞受体的共刺激域。在一方面,R6可以是CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、CD7和Fc受体γ域的胞质信号域。R6将不同于R4和R5。在一个实例中,R5是CD28的细胞质结构域。再生了具有两个信号域的人源化CAR(CAR III)的若干实例:CAR MN-E6 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NO:618-619);CAR MN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:303-304);CAR MN-C2 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:306-307);CAR MN-C2CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NO:614-615)。

[0235] 我们和其他人(PulèMA,Straathof KC,Dotti G,Heslop HE,Rooney CM and Brenner MK.(2005)A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primay human T cells.Mol Ther.12(5):933-941;Hombach AA,Heiders J,Foppe M,Chmielewski M and Abken H.(2012)OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2induced IL-10sevretion by redirected CD4(+)Tcells.Oncoimmunology.1(4):458-466;Kowolik CM,Topp MS,Gonzalez S,Pfeiffer T,Olivares S,Gonzalez N,Smith DD,Forman SJ,Jensen MC and Cooper LJ.(2006)CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells.Cancer Res.66(22):10995-11004;Loskog A,Giandomenico V,Rossig C,Pule M,Dotti G and Brenner MK.(2006)Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells.Leukemia.20(10):1819-1828;Milone MC,Fish JD,Carpenito C,Carroll RG,Binder GK,Teachey D,Samanta M,Lakhal M,Gloss B,Danet-Desnoyers G,Campana D,Riley JL,Grupp SA and June CH.(2009)Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo.Mol Ther.17(8):1453-1464;Song DG,Ye Q,Carpenito C,Poussin M,Wang LP,Ji C,Figini M,June CH,Coukos G,Powell DJ Jr.(2011)In vivo persistence,tumor localization,and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137(4-1BB).Cancer Res.71(13):4617-4627)已经表明细胞内信号组件,如CD3-ζ(SEQ ID NO:373-376)、CD28(SEQ ID NO:377-378)和41BB(SEQ ID NO:379-380),单独或组合地刺激免疫细胞扩增、细胞因子分泌和靶向肿瘤细胞的免疫细胞介导杀

伤。呈现在细胞内信号基序之前出现的抗体片段、跨膜结构域、和短胞质尾区的短胞外碎片的特性是不太重要的。

[0236] 使CAR靶向肿瘤的识别抗体片段的特性是非常重要的。对于MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的治疗，抗体识别片段必须结合于MUC1的部分的胞外结构域，在胞外结构域的大部分的切割和脱落以后，其留下，其含有串联重复结构域。在本发明的一方面，留下的部分包含PSMGFR序列。在本发明的另一方面，在切割和脱落以后留下的MUC1的部分含有PSMGFR序列加上九(9)个更多的在N端处延伸的氨基酸。在本发明的另一方面，在切割和脱落以后留下的MUC1的部分含有PSMGFR序列加上二十一(21)个更多的在N端处延伸的氨基酸。在一方面，抗体识别片段结合于PSMGFR肽。在本发明的另一方面，抗体识别片段结合于这样的肽，其包含序列SNIKFRPGSVVVQLTLAFR EGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)；或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。作为示范，将包括单克隆抗MUC1*抗体的可变域的单链抗体片段，称为MN-E6或MN-C2，工程化为小组的CAR。然后将MUC1*靶向CAR单独或组合地转导进入免疫细胞。当受到呈递MUC1*肽、用MUC1*转染的抗原呈递细胞、或MUC1*阳性癌细胞的表面攻击时，用MUC1*靶向CAR转导的免疫细胞引起免疫反应，包括细胞因子释放、靶细胞的杀伤和免疫细胞的扩增。在一种情况下，用MUC1*靶向CAR来转导人jurkat细胞以及在暴露于呈递PSMGFR肽、已用MUC1*或MUC1*阳性癌细胞转染的K562抗原呈递细胞的表面以后，jurkhat细胞分泌IL-2。在另一种情况下，用MUC1*靶向CAR来转导纯化人T细胞以及在暴露于呈递PSMGFR肽、已用MUC1*或MUC1*阳性癌细胞转染的K562抗原呈递细胞的表面以后，T细胞分泌IL-2、干扰素γ，以及杀伤靶向抗原呈递细胞和癌细胞，同时T细胞扩增。如证实的，当所述CAR被转导进入免疫细胞(其包括T细胞)时，包含抗体片段，其中抗体片段能够结合于PSMGFR肽，跨膜结构域和携带共刺激域的胞质尾区的CAR引发免疫系统抗肿瘤细胞反应。因此，其他抗体、抗体片段或抗体模拟物，其能够结合于PSMGFR肽，将类似地起作用并可以用来治疗或预防癌症。本领域技术人员将认识到，存在许多技术可用于用CAR来转染或转导细胞，以及本发明不受限于用于制作表达MUC1*靶向CAR的免疫细胞的方法。例如，可以使用逆转录病毒、腺病毒、慢病毒等。类似地，构成CAR的非靶向部分如胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域的近膜部分的分子的特性，对于MUC1*靶向CAR的功能不是必要的。例如，细胞质结构域的胞外结构域、跨膜结构域和近膜部分可以组成自部分的CD8、CD4、CD28、或通用激活抗体域如Fc、CH2CH3、或CH3。进一步地，CAR的非靶向部分可以是一种或多种的这些分子或其他家族成员的部分的复合体。

[0237] 本发明的一个方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中将有效量的已用MUC1*靶向CAR转导的免疫细胞给予患者。在本发明的另一方面，免疫细胞是分离自患者的T细胞，其然后用CAR转导，其中CAR的靶向头(targeting head)结合于MUC1*，以及在转导T细胞的扩增以后，将CAR T细胞以有效量给予患者。在本发明的又一方面，免疫细胞是分离自患者的T细胞，其然后用CAR加以转导，其中CAR的靶向头包含部分的huMN-E6、huMN-C2、huMN-C3或huMN-C8，以及在转导T细胞的可选扩增以后，将CAR T细胞以有效量给予患者。

[0238] 制备和测试的CAR的细节

[0239] 产生了许多MUC1*靶向CAR，其中在CAR的远端处的靶向抗体片段是MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8。测序每个CAR的DNA以确认克隆正确完成。然后将每种构建体混杂进入表达

质粒,转染进入细胞,然后通过蛋白质印迹来确认已成功插入构建体。通过FACS来证实表面表达。然后将MUC1*靶向CAR病毒转导进入免疫细胞。在一方面,它们被转导进入Jurkat细胞。在另一方面,它们被转导进入纯化自血液的原代人T细胞。进行一系列功能测定,并且证实了,CAR是功能性的。功能测定表明,当受到呈递MUC1*的细胞的攻击时,用MUC1*靶向CAR转导的Jurkat细胞和原代T细胞均分泌细胞因子IL-2。图29是实验图,其中上述实验测量由用小组的CAR转导的Jurkat细胞分泌的IL-2细胞因子,其中上述CAR包括MN-E6 CD8/CD3z、MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z、MN-E6 CD4/CD28/CD3z和MN-E6CD4/CD28/41BB/CD3z。仅当CAR Jurkat细胞暴露于已由MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时才分泌IL-2。应该指出的是,亲代K562-wt细胞表达非常低水平的MUC1*。类似地测试转染进入Jurkat细胞的另一组的CAR的细胞因子分泌。图30示出,当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时,Jurkat T细胞的IL-2分泌,其中上述Jurkat T细胞用MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6CD8/41BB/CD3z、MN-E6 CD4/CD28/CD3z或MN-E6 CD4/41BB/CD3z转导。类似地,图31示出原代人T细胞的IL-2细胞因子分泌,其中上述原代人T细胞用MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z或MN-E6 CD4/41BB/CD3z转导。仅当MUC1*靶向CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时才发生细胞因子分泌。当它们看到靶细胞时由激活的T细胞分泌的另一种细胞因子是干扰素-γ(IFN-g)。图32示出,当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时,由用小组的CAR转导的原代人T细胞来分泌干扰素-γ,其中上述CAR包括MN-E6 CD8/CD28/CD3z和MN-E6CD4/41BB/CD3z。当MUC1*靶向CAR T细胞暴露于K562-wt细胞、已用MUC1*、或前列腺癌(DU145)、乳腺癌(1500)或胰腺癌(Capan)的MUC1*阳性癌细胞转染的K562细胞时,用小组的CAR转导的原代人T细胞类似地分泌干扰素-γ,其中上述CAR包括MN-E6CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z和MN-E6CD8/CD28/41BB/CD3z(图33)。

[0240] CAR T细胞的功能的另一种度量是它们是否诱导靶细胞的杀伤。在共培养测定中,用各种CAR转染的T细胞杀伤MUC1*表达细胞,其中上述CAR包含抗体片段,其结合于MUC1*的PSMGFR序列。在一种测定中,和钙黄绿素一起来温育表达目标MUC1*的细胞。当它们与CAR T细胞混合时,其中CAR包含抗体片段如MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8,CAR T细胞杀伤MUC1*呈递细胞,其引起靶细胞裂解和释放钙黄绿素进入上清液。图34是实验图,当CAR T细胞暴露于已用MUC1*转染的K562-wt细胞或K562细胞时,以及当原代人T细胞分离自血液样品,其用小组的CAR转导时,其测量靶细胞死亡,其中上述CAR包括MN-E6 CD8/CD28/CD3z、MN-E6 CD8/41BB/CD3z和MN-E6CD4/41BB/CD3z。T细胞与靶细胞的比率是1:1以及共培养细胞24小时。图35A-B是FACS图,其测量靶细胞存活从第1天至第3天的时间进程。用小组的CAR来转导分离自血液样品的原代人T细胞,其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于自然表达低水平的MUC1*的K562-wt细胞、或已用高MUC1*转染的K562细胞。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是1:1、10:1、或20:1。在第1天(A)或第3天(B)时检测和测量存活细胞。

[0241] 图36是在共培养实验的第3天时靶细胞存活的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞,其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-3z、MN-E6-CD8-CD28-3z、MN-E6-CD8-41BB-3z和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞或MUC1*阳性1500,又叫做ZR-75-1乳腺癌细胞。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率

是1:1或10:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞具有比未转导的对照T细胞大得多的对MUC1*癌细胞的杀伤效果。此外，当增加T细胞:靶细胞的比率时，杀伤效果要大得多。图37是FACS测量结果的图，其示出在共培养实验的第1天时的靶细胞存活。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于以下MUC1*阳性癌细胞:T47D乳腺癌;capan2胰腺癌;或DU-145前列腺癌。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是5:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞具有比未转导的对照T细胞大得多的对MUC1*癌细胞的杀伤效果。需要注意的是，在24小时以后，仅在5:1的T细胞与靶细胞的比率下进行测量。此外，需要注意的是，具有CD4胞外结构域-跨膜-胞质尾区的MUC1*靶向CAR和CD8构建体效果同样好。图38是在共培养实验的第3天时靶细胞存活的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。然后将CAR T细胞暴露于以下MUC1*阳性癌细胞:用MUC1*转染的K562白血病细胞;T47D乳腺癌;1500又叫做ZR-75-1乳腺癌细胞;或CAPAN-2胰腺癌细胞。除未转导的T细胞对照之外，还测定了PC3 MUC1*阴性前列腺癌细胞。MUC1*靶向CAR T细胞与靶细胞的比率是1:1。如从图中可以看出，用MUC1*靶向CAR转导的T细胞具有比未转导的对照T细胞大得多的对MUC1*癌细胞的杀伤效果。此外，杀伤效果对于MUC1*阳性细胞是特定的。需要注意的是，具有CD4胞外结构域-跨膜-胞质尾区的MUC1*靶向CAR和CD8构建体效果同样好。图39是在和靶细胞一起的共培养中，在5:1的CAR T细胞与靶细胞的比率下，经24小时的CAR T细胞扩增的FACS测量结果的图。用小组的CAR来转导原代人T细胞，其中上述CAR包括人源化MN-E6-CD8-41BB-3z、MN-E6-CD4-41BB-3z、和MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z。与MUC1*阳性T47D乳腺癌细胞、MUC1*阳性Capan胰腺癌细胞、和MUC1阴性细胞HCT-116结肠癌细胞以及HEK-293人胚胎肾细胞一起来共培养CAR T细胞。如从图中可以看出，在MUC1*阳性细胞的存在下，会增加CAR T群体。图40显示MUC1*靶向CAR的蛋白质印迹的照片。从1至9是:1.MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(人Fc，作为铰链区，具有CD8 TM);2:MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(人Fc无铰链，作为铰链区，具有CD8 TM);3:MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(人Fc，作为铰链区，具有CD4 TM);4:MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(人Fc，作为无铰链铰链区，具有CD4 TM);5:MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(铰链区，来自人IgD，具有CD8 TM);6:MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(铰链区，来自人IgD，具有CD4 TM);7:MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(长柔性接头，作为铰链区，具有CD8 TM);8:MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(长柔性接头，作为铰链区，具有CD4TM);9:MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z(铰链区，来自CD8和CD4 a，具有CD4 TM)。

[0242] 图41示出和人T细胞一起共培养的T47D乳腺癌细胞的FACS扫描的图，其中上述人T细胞用MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(无铰链)、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z和MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z转导。以1:1比率，共培养T细胞和癌细胞48小时。当和未转导T细胞一起共培养时，将T细胞计数归一化到所有未转导T细胞的平均值以及将靶细胞归一化到各自特定的细胞类型。该图显示，当和MUC1*阳性癌细胞一起来共培养CAR T细胞时，T细胞群体扩大以及靶向癌细胞群体减小。

[0243] 图42示出和人T细胞一起共培养的T47D乳腺癌细胞、Capan-2胰腺癌细胞、K562-MUC1*转染细胞、和K562-wt细胞的FACS扫描的图，其中上述人T细胞用MN-E6scFv-Fc-8-

41BB-CD3z、MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z、MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z、MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z和MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z转导。以1:1的比率，共培养T细胞和癌细胞48小时。当和未转导T细胞一起共培养时，将T细胞计数归一化到所有未转导T细胞的平均值以及将靶细胞归一化到各自特定的细胞类型。该图显示，当和MUC1*阳性癌细胞一起共培养CAR T细胞时，T细胞群体扩大以及靶向癌细胞群体减小。

[0244] 如这些实验所示，CAR的关键部分是引导免疫细胞到肿瘤细胞的抗体片段。如在下面的部分中我们将说明的，MN-E6和MN-C2，对于表达在肿瘤细胞上的MUC1*的形式是特异性的。CAR的下一个最重要的部分是携带免疫系统共刺激域的胞质尾区。这些域的特性会调节免疫反应程度，但决不会影响特异性。如所示，CAR的跨膜部分的特性是最不重要的。似乎，只要跨膜部分具有一些柔性以及足够长以允许抗体片段达到在肿瘤细胞上的其关联受体，就够了。这在图40-42中示出。包括MN-E6靶向抗体片段、以及细胞内共刺激域41BB和CD3-ζ，但具有各种不同的胞外、跨膜和短胞质尾区的CAR均起作用，因为它们特异性地杀伤靶细胞，同时刺激宿主T细胞的扩增。具有可变中央部分的这些CAR是：MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z(人Fc，作为铰链区，具有CD8 TM)；2:MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z(人Fc无铰链，作为铰链区，具有CD8TM)；3:MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z(人Fc，作为铰链区，具有CD4TM)；4:MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z(人Fc，作为无铰链铰链区，具有CD4 TM)；5:MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z(铰链区，来自人IgD，具有CD8 TM)；6:MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z(铰链区，来自人IgD，具有CD4 TM)；7:MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z(长柔性接头，作为铰链区，具有CD8 TM)；8:MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z(长柔性接头，作为铰链区，具有CD4 TM)；9:MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z(铰链区，来自CD8和CD4 a，具有CD4 TM)。

[0245] 本发明的一个方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中将有效量的已用MUC1*靶向CAR转导的免疫细胞给予患者，其中CAR选自由下述组成的组：MN-E6-CD8-3z；MN-E6-CD4-3z；MN-E6-CD8-CD28-3z；MN-E6-CD4-CD28-3z；MN-E6-CD8-41BB-3z；MN-E6-CD4-41BB-3z；MN-E6-CD8-CD28-41BB-3z；MN-E6-CD4-CD28-41BB-3z；MN-E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z；MN-E6scFv-FcH-8-41BB-CD3z；MN-E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z；MN-E6scFv-FcH-4-41BB-CD3z；MN-E6scFv-IgD-8-41BB-CD3z；MN-E6scFv-IgD-4-41BB-CD3z；MN-E6scFv-X4-8-41BB-CD3z；MN-E6scFv-X4-4-41BB-CD3z；MN-E6scFv-8-4-41BB-CD3z，或任何上述CAR，其中MN-E6由MN-C2、MN-C3或MN-C8替换。本发明的另一方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展癌症的风险的患者的方法，其中将有效量的免疫细胞给予患者，其中上述免疫细胞已用上述CAR之一加以转导，其中MN-E6由包含抗体可变域片段的肽替换，其中上述肽对于癌症抗原是特异性的。在任何上述方法中，免疫细胞可以是T细胞并且可以进一步分离自待治疗的患者。

[0246] 抗MUC1＊靶向抗体的特异性

[0247] 说明抗体特异性的最准确的方式是，与癌组织样品相比，对正常人组织样品来测试抗体。MN-C2和MN-E6显示出，特异性地结合于MUC1或MUC1*阳性癌细胞。利用若干抗MUC1或MUC1*抗体来测定若干乳腺肿瘤阵列。基本上，涉及来自超过1,200位不同乳腺癌患者的连续切片或乳腺癌组织样品的研究表明，在乳腺癌组织上留下很少全长MUC1。绝大多数的表达的MUC1是MUC1*并通过MN-C2染色。由克莱恩诊断学进行分析以及利用Allred方法来评分组织染色。例如，图43示出乳腺癌组织阵列的连续切片，其染色有VU4H5，市售抗MUC1抗

体,其结合于串联重复序列,或MN-C2,其结合于MUC1*。图43和44是乳腺癌组织阵列的照片,其染色有VU4H5,其识别MUC1-FL(全长),或MN-C2,其识别癌性MUC1*。利用Allred评分方法,其结合强度评分和分布评分,来评分组织染色。在组织阵列的照片下方是显示结果的颜色编码图。如可以看出,用VU4H5染色的阵列是很亮的并且许多组织根本没有染色,尽管已发表报告,MUC1异常表达在超过96%的所有乳腺癌上,如通过基于核酸的诊断所证实的。相比之下,用MN-C2染色的阵列是非常暗的(在图中的红色与黄色或白色)。另外,借助于抗全长MUC1,许多组织根本没有染色,但借助于MN-C2的染色则非常暗(见图中的绿色盒子)。类似地,我们用人源化MN-E6 scFv-Fc来染色正常或癌性乳腺组织。生物素化抗体片段以致它可以通过基于次级链霉亲和素的二抗加以可视化。如从图45中可以看出,hMN-E6 scFv-Fc不染色正常乳腺组织但染色癌性乳腺组织。进一步地,染色的强度和均匀性随着患者的肿瘤等级和/或转移性等级的增加而增加(图45和46)。类似地,hMN-E6 scFv-Fc不染色正常肺组织,但确实染色肺癌组织(图47-51)以及染色的强度和分布随着肿瘤等级或转移性等级的增加而增加。图52显示用5ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc生物素化抗MUC1*抗体染色,然后用次级链霉亲和素HRP抗体染色的正常小肠和癌性小肠组织的照片。A)是正常小肠组织。B)是来自患者的小肠癌,如图所示。C、D是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图53显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的正常小肠组织的照片。A-D是正常小肠组织。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图54显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的癌性小肠组织的照片。A-D是来自患者的癌性小肠组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图55显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的癌性小肠组织的照片。A-D是来自患者的癌性小肠组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图56显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的正常结肠组织的照片。A-D是正常结肠。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图57显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自转移性患者的结肠癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图58显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自第2等级患者的结肠癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图59显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的结肠癌组织的照片。A-D是来自转移性患者的结肠癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图60显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图61显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。图62显示用50ug/mL的人源化MN-E6-scFv-Fc抗MUC1*抗体染色,然后用次级山羊抗人HRP抗体染色的前列腺癌组织的照片。A-D是来自患者的前列腺癌组织,如图所示。E-H是单独用次级抗体染色的相应的连续切片的照片。

[0248] 本发明的一个方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中样品获自患者的癌症并测试与抗体的反应性，其中上述抗体结合于PSMGFR SEQ ID NO:2，SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。然后用scFv、scFv-Fc或CAR T，其包含来自抗体的抗体可变片段，其与他们的癌症样品反应，来治疗患者。本发明的另一方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中样品获自患者的癌症并测试与MN-E6-scFv、MN-C2-scFv、MN-C3-scFv或MN-C8-scFv的反应性；然后用scFv、scFv-Fc-突变体或CAR T，其包含部分的抗体，其与他们的癌症样品反应，来治疗患者。

[0249] BiTE

[0250] 可以通过连接两个scFv来工程化二价(或双价)单链可变片段(di-scFv、bi-scFv)。这可以通过产生具有两个V_H和两个V_L区的单肽链来做到，从而产生串联scFv。另一种可能性是产生具有接头肽的scFv，其中上述接头肽太短以致两个可变区不可能折叠在一起(约5个氨基酸)，从而迫使scFv二聚化。这种类型被称为双特异抗体。双特异抗体已被证明具有高达40倍低于相应的scFv的解离常数，这意味着它们对于它们的靶具有高得多的亲和力。因此，双抗体药物的剂量可以远低于其它治疗性抗体并且能够体内高度特异性地靶向肿瘤。仍然较短的接头(一个或两个氨基酸)导致形成三聚体，所谓的三体或三抗体。还已产生了四抗体。它们呈现出比双特异抗体甚至更高的对于它们的靶的亲和力。

[0251] 所有这些格式可以组成自对于两种不同的抗原具有特异性的可变片段，在这种情况下，它们是双特异性抗体的类型。它们的进一步发展是双特异性的串联di-scFv，被称为双特异性T细胞衔接物(BiTE抗体构建体)。BiTE是融合蛋白，其组成自在约55千道尔顿的单肽链上的不同抗体的两种scFv。scFv之一可以结合于T细胞如通过CD3受体，以及另一种，通过肿瘤特异性分子，结合于肿瘤细胞，如异常表达的MUC1*。

[0252] 本发明的另一方面是用于治疗诊断有、怀疑有、或有发展MUC1阳性或MUC1*阳性癌症的风险的患者的方法，其中将有效量的BiTE给予患者，其中BiTE的一种抗体可变片段结合于T细胞表面抗原以及BiTE的另一种抗体可变片段则结合于PSMGFR SEQ ID NO:2，SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。在一种情况下，结合于MUC1*的BiTE的抗体可变片段包含部分的huMN-E6、huMN-C2、huMN-C3、或huMN-C8。

[0253] 在本发明的另一方面，以过继T细胞方式来使用MUC1*肽，其包括PSMGFR SEQ ID NO:2，大部分或全部的SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。在这种情况下，将患者的T细胞暴露于MUC1*肽以及经过不同轮次的成熟，T细胞发展MUC1*特异性受体。然后扩增适应的T细胞并将其给予诊断有、怀疑有、或有发展MUC1*阳性癌症的风险的供体患者。

[0254] 其它MUC1切割位点

[0255] 然而，在除癌细胞之外的一些健康细胞上，MUC1被切割成生长因子受体形式，MUC1*。例如，在健康的干细胞和祖细胞上，MUC1被切割成MUC1*。较大比例的骨髓细胞是MUC1*阳性。肠的部分是MUC1*阳性。

[0256] 本发明人已经发现，可以在相对彼此靠近的不同位置处切割MUC1，但切割位置会

改变胞外结构域的剩余部分的折叠。因此，可以确定这样的单克隆抗体，其结合于在第一位置处切割的MUC1*，但并不结合于已在第二位置处被切割的MUC1*。此发现公开于2013年8月14日提交的WO2014/028668，其全部内容以引用方式结合于本文。我们确定了一组抗MUC1*单克隆抗体，其结合于MUC1*，因为它出现在癌细胞上但并不结合于MUC1*，因为它出现在干细胞和祖细胞上。反过来，我们确定了第二组单克隆抗体，其结合于干细胞和祖细胞，但并不结合于癌细胞。用来确定干细胞特异性抗体的一种方法如下：将来自单克隆杂交瘤的上清液分别吸附到2个多孔板上。将干细胞，其是非贴壁细胞，放入一个板，以及将癌细胞，其是贴壁细胞，放入相同的板。在温育期以后，冲洗和倒置上述板。如果非贴壁干细胞粘附于板，那未在那个特别孔中的单克隆识别干细胞并且将无法识别癌细胞。没有捕获干细胞的抗体或捕获癌细胞的抗体被确定为癌特异性干细胞。FACS分析已经确认，此方法有效。抗体MN-E6和MN-C2是癌症特异性抗体的实例。MN-C3和MN-C8是干细胞特异性抗体的实例。虽然两组的抗体均能够结合于具有PSMGFR序列的肽，但FACS分析表明，抗MUC1*多克隆抗体和MN-C3结合于MUC1*阳性骨髓细胞但MN-E6并不。通过用PSMGFR肽来免疫兔以产生MUC1*多克隆抗体。类似地，MN-C3结合于肠隐窝的干细胞，但MN-E6则不。反过来，MN-E6抗体结合于癌组织，而干细胞特异性MN-C3则不。竞争ELISA实验表明，对于MN-E6和MN-C2结合，需要PSMGFR肽的C端10个氨基酸，但对于MN-C3和MN-C8则不需要。因此，用于识别癌症特异性抗体的另一种方法是用肽来免疫，其中上述肽具有PSMGFR肽减去10个N末端氨基酸的序列，或使用上述肽来筛选将是癌症特异性的抗体或抗体片段。结合于具有PSMGFR肽减去N末端10个氨基酸的序列的肽但并不结合于具有PSMGFR肽减去C端10个氨基酸的序列的肽的抗体是癌症特异性抗体，其用于治疗或预防癌症。

[0257] 在干细胞和一些祖细胞上，还切割MUC1的胞外结构域，其中通过配体NME1(以二聚体形式)或NME7的切割的MUC1的激活会促进生长和多能性并抑制分化。在切割以后留下的MUC1的跨膜部分被称为MUC1*以及胞外结构域基本上组成自MUC1生长因子受体(PSMGFR)序列的初级序列。然而，切割的确切位点可以有所不同，其取决于细胞类型、组织类型、或特定的人表达或过表达哪种切割酶。除我们以前确定的切割位点，其留下MUC1*的跨膜部分，其包含大部分或全部的PSMGFR SEQ ID NO:2，之外，其它切割位点导致延伸的MUC1*，其组成自大部分或全部的SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)；或SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)。MUC1切割的位点会影响剩余的胞外结构域如何折叠。我们已经确定了这样的单克隆抗体，其结合于在癌细胞上的切割的MUC1*，但当它存在于健康的干细胞和祖细胞上时并不结合于切割的MUC1*。

[0258] 尽管如果它竞争性地抑制NME1、NME6、NME8或NME7或NME7-AB与MUC1*的结合，则抗MUC1*抗体或抗体样分子可能是最有效的，例如结合于PSMGFR序列的抗体，尤其是如果所述抗体不能结合于PSMGFR肽，如果10个C端氨基酸是缺失的，携带有效载荷的抗体或抗体样分子不需要竞争性地抑制MUC1*配体的结合，以有效作为抗癌剂。例如结合至毒素的抗体或抗体样分子可以有效地杀伤靶癌细胞而没有必要抑制激活配体的结合。例如，抗体或抗体样分子如CAR或BiTE，其募集患者的免疫系统到肿瘤，可以有效作为抗癌剂，即使抗体片段靶向一部分的MUC1*，以致抗体片段结合并不竞争性地抑制NME1、NME6、NME8、NME7-AB或NME7的结合。在优选实施方式中，并入CAR、适应性T细胞受体或BiTE的抗体片段确实竞争性地抑制NME1、NME6、NME8、NME7-AB或NME7与MUC1*的结合。

[0259] 能够结合于剩余的跨膜部分的胞外结构域的抗体会阻止在MUC1*胞外结构域和激活配体之间的相互作用,以及以这种方式可以用作治疗剂,例如用于癌症治疗。抗MUC1*抗体还可体外和体内用于干细胞的生长、递送、鉴定或分离。

[0260] 使用靶向MUC1＊的胞外结构域的抗体、抗体片段和CAR的一般策略

[0261] 单克隆抗体MN-C3和MN-C8,对于干细胞,比对于癌细胞,具有更大的结合亲和力。包含源自MN-C3和MN-C8的可变区的序列的人源化抗体和抗体片段可以用作用于人干细胞的粘附表面涂覆。

[0262] 可替换地,含有源自MN-C3和MN-C8的可变区的序列的人源化抗体和抗体片段可以用来将干细胞递送到特定位置如用于原位人治疗剂。在一种情况下,用干细胞来加载涂覆有人源化MN-C3或MN-C8衍生的抗体或抗体片段的基板,然后将其插入患者。在另一种情况下,将涂覆有人源化MN-C3或MN-C8衍生的抗体或抗体片段的基板插入患者以将患者自身的干细胞募集到特定区域,用于治疗。人疗法,其中结合于人干细胞的抗体将具有治疗用途,包括脊髓修复。涂覆有人源化MN-C3或MN-C8衍生的抗体或抗体片段的基板还用来确定或分离人抗体。人源化MN-C3或MN-C8衍生的抗体还可以用来刺激干细胞的生长。

[0263] 序列自由文本

[0264] 关于不同于a、g、c、t的核苷酸符号的使用,它们遵循在WIPO标准ST.25、附录2、表1中阐述的惯例,其中k表示t或g;n表示a、c、t或g;m表示a或c;r表示a或g;s表示c或g;w表示a或t以及y表示c或t。

[0265] MUC1受体

[0266] (粘蛋白1前体,基因库登录号P15941)

[0267]
MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTT
QGQDVTLAPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVT
SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA
PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR
PAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT
RPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHG
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD
TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH
GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALG
STAPPVHNVTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSV
PPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFR
PGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLVC
VLVALAIVYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSL
SYTNPAVAAASANL (SEQ ID NO:1)

[0268] PSMGFR

[0269] GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO:2)

[0270] 人NME1

[0271] (DNA)

[0272]
atggccaactgtgagcgtaccttcattgcgatcaaaccagatggggtccagcggggtcttgtgggagagatta
tcaagcgttttgagcagaaaggattccgccttgttggtctgaaattcatgcaagcttccgaagatcttctcaa
ggaacactacgttgacctgaaggaccgtccattctttgccggcctggtgaaatacatgcactcagggccggta
gttgccatggtctgggaggggctgaatgtggtgaagacgggccgagtcatgctcggggagaccaaccctgcag
actccaagcctgggaccatccgtggagacttctgcatacaagttggcaggaacattatacatggcagtgattc
tgtggagagtgcagagaaggagatcggcttgtggtttcaccctgaggaactggtagattacacgagctgtgct
cagaactggatctatgaatga (SEQ ID NO:3)

[0273] (氨基酸)

[0274] MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDLKDRPFFAGLVKYMHSGPV VAMVWEGLNVVKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNIIHGSDSVESAEKEIGLWFHPEELVDYTSCA QNWIYE- (SEQ ID NO:4)

[0275] 人NME7

[0276] (DNA)

[0277] atgaatcatagtgaaagattcgttttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatg agcttttatttacccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcacctttttaaagcg gaccaaatatgataacctgcacttggaagatttatttataggcaacaaagtgaatgtcttttctcgacaactg gtattaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaa ttaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaaagctggatttactataaccaa actcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagacccttttttc aatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgtg aatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccct ctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggag ttgtttttttccttcaagtggaggttgtgggccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcattg ttaaaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaat ctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtg accgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatg ctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactct cagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctatta gaggttcaatacttcttcaagatcttggataattag (SEQ ID NO:5)

[0278] (氨基酸)

[0279] MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVFSRQL VLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFF NELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREME LFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVV TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLL EVQYFFKILDN- (SEQ ID NO:6)

[0280] NME7肽

[0281] NME7A肽1(A域):MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID NO:7)

[0282] NME7A肽2(A域):SGVARTDASES(SEQ ID NO:8)

[0283] NME7B肽1(B域):DAGFEI SAMQMFNMDRVNVE(SEQ ID NO:9)

[0284] NME7B肽2(B域):EVYKGVVTEYHDMVTE(SEQ ID NO:10)

[0285] NME7B肽3(B域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF(SEQ ID NO:11)

[0286] 小鼠E6重链可变区序列:

[0287] (DNA)

[0288] gaggtgaaggtggtggagtctgggggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgtagtct ctggattcactttcagtagatatggcatgtcttgggttcgccagactccaggcaagaggctggagtgggtcgc aaccattagtggtggcggtacttacatctactatccagacagtgtgaaggggcgattcaccatctccagagac aatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacagccatgtatcactgtacaa gggataactacggtaggaactacgactacggtatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctc a (SEQ ID NO:12)

[0289] (氨基酸)

[0290] EVKVVESGGDLVKPGGSLKLSCVVSGFTFSRYGMSWVRQTPGKRLEWVATISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRD NAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYHCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:13)

[0291] 小鼠E6重链可变构架区1(FWR1)序列:

[0292] (DNA)

[0293] gaggtgaaggtggtggagtctgggggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgtagtct ct (SEQ ID NO:14)

[0294] (氨基酸)

[0295] EVKVVESGGDLVKPGGSLKLSCWSGFTFS(SEQ ID NO:15)

[0296] 小鼠E6重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0297] (DNA)

[0298] ggattcactttcagtagatatggcatgtct(SEQ ID NO:16)

[0299] (氨基酸)

[0300] RYGMS(SEQ ID NO:17)

[0301] 小鼠E6重链可变构架区2(FWR2)序列：

[0302] (DNA)

[0303] tgggttcgccagactccaggcaagaggctggagtgggtcgca(SEQ ID NO:18)

[0304] (氨基酸)

[0305] WVRQTPGKRLEWVA(SEQ ID NO:19)

[0306] 小鼠E6重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0307] (DNA)

[0308] accattagtggtggcggtacttacatctactatccagacagtgtgaagggg(SEQ ID NO:20)

[0309] (氨基酸)

[0310] TISGGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:21)

[0311] 小鼠E6重链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[0312] (DNA)

[0313] cgattcaccatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacagccatgtatcactgtacaagg(SEQ ID NO:22)

[0314] (氨基酸)

[0315] RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYHCTR(SEQ ID NO:23)

[0316] 小鼠E6重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0317] (DNA)

[0318] gataactacggtaggaactacgactacggtatggactac(SEQ ID NO:24)

[0319] (氨基酸)

[0320] DNYGRNYDYGMDY(SEQ ID NO:25)

[0321] IGHV3-21＊03重链可变区序列：

[0322] (DNA)

[0323] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcatccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcga ga(SEQ ID NO:26)

[0324] (氨基酸)

[0325] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR(SEQ ID NO:27)

[0326] IGHV3-21＊01重链可变构架区1(FWR1)序列：

[0327] (DNA)

[0328] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:28)

[0329] (氨基酸)

[0330] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:29)

[0331] IGHV3-21＊01重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0332] (DNA)

[0333] agctatagcatgaac(SEQ ID NO:30)

[0334] (氨基酸)

[0335] SYSMN(SEQ ID NO:31)

[0336] IGHV3-21＊01重链可变构架区2(FWR2)序列：

[0337] (DNA)

[0338] tgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctca(SEQ ID NO:32)

[0339] (氨基酸)

[0340] WVRQAPGKGLEWVS(SEQ ID NO:33)

[0341] IGHV3-21＊01重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0342] (DNA)

[0343] tccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggc(SEQ ID NO:34)

[0344] (氨基酸)

[0345] SISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:35)

[0346] IGHV3-21＊01重链可变构架区3(FWR3)序列：

[0347] (DNA)

[0348] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:36)

[0349] (氨基酸)

[0350] RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:37)

[0351] 人源化E6重链可变区序列：

[0352] (DNA)

[0353] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtctcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc(SEQ ID NO:38)

[0354] (氨基酸)

[0355] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGK RLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:39)

[0356] 人源化E6重链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[0357] (DNA)

[0358] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt

gcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:40)

[0359] (氨基酸)

[0360] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:41)

[0361] 人源化E6重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0362] (DNA)

[0363] aggtatggcatgagc(SEQ ID NO:42)

[0364] (氨基酸)

[0365] RYGMS(SEQ ID NO:43)

[0366] 人源化E6重链可变构架区2(FWR2)酸序列：

[0367] (DNA)

[0368] tgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtctca(SEQ ID NO:44)

[0369] (氨基酸)

[0370] WVRQAPGKRLEWVS(SEQ ID NO:45)

[0371] 人源化E6重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0372] (DNA)

[0373] accattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggc(SEQ ID NO:46)

[0374] (氨基酸)

[0375] TISGGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:47)

[0376] 人源化E6重链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[0377] (DNA)

[0378] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccg
aggacacggctgtgtattactgtaccaga(SEQ ID NO:48)

[0379] (氨基酸)

[0380] RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:49)

[0381] 人源化E6重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0382] (DNA)

[0383] gataactatggccgcaactatgattatggcatggattat(SEQ ID NO:50)

[0384] (氨基酸)

[0385] DNYGRNYDYGMDY(SEQ ID NO:51)

[0386] 由Genescript合成的人源化E6 IgG2重链：

[0387] (DNA)

[0388] gaattctaagcttgggccaccatggaactggggctccgctgggttttccttgttgctattttagaagg
tgtccagtgtgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt
gcagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtggg
tctcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagaga
caacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccaga
gataactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgcct
ccaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctg
cctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacacc

ttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggca
cccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttg
tgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggac
accctcatgatctcccggaccccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagt
tcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgtt
ccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac
aaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccc
tgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcga
catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgac
ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg
tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaagtttaaac
tctaga(SEQ ID NO:52)

[0389] (氨基酸)

[0390] EF*AWATMELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAP
GKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**V*TLX(SEQ ID NO:53)

[0391] 人IgG2重链恒定区序列:

[0392] (DNA)

[0393] gcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagc
cgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagc
ggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcca
gcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttga
gcgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccca
aaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagcacgaagacc
ccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagtt
caacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccac
aggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggctt
ctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatg
ctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag
(SEQ IDNO:54)

[0394] (氨基酸)

[0395] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDV

SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:55)

[0396] 人源化E6 IgG1重链序列：

[0397] (DNA)

[0398] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtc
tcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaacccactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtcccagaga
taactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgctagc
accaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcc
tggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctt
cccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctccagcagcttgggcacc
cagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtg
acaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaa
acccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccct
gaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaca
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaa
ggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
gtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttct
atcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgct
ggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgat
aa(SEQ ID NO:56)

[0399] (氨基酸)

[0400] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNPLYLQMNSLRAEDTAVYYCPRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK**(SEQ ID NO:57)人IgG1重链恒定区序列：

[0401] (DNA)

[0402] gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagc
ggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagc
ggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctcca
gcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttga
gcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttc
ctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga

gccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcg
ggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
gagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagc
aggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtc
tccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:58)

[0403] (氨基酸)

[0404] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:59)

[0405] 人IgG1重链恒定区gBLOCK#1序列：

[0406] (DNA)

[0407] atggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgctagcaccaagggcccatcg
gtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactact
tccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctaca
gtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgc
aacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacat
gcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccct
catgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaac
tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag(SEQ ID NO:60)

[0408] 人IgG1重链恒定区gBLOCK#2序列：

[0409] (DNA)

[0410] tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgta
ccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccc
tgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcga
catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgac
ggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttcteatgetccg
tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataagtttaaac
ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ IDNO:61)

[0411] E6重链可变区重叠序列：

[0412] (DNA)

[0413] atggcatggattattggggccagggcaccct(SEQ ID NO:62)

[0414] IgG1重链恒定区重叠区序列：

[0415] (DNA)

[0416] tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag(SEQ ID NO:63)

[0417] pCDNA3.1 V5和pSEC标签2(Tag2)重叠序列：

[0418] (DNA)

[0419] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:64)

[0420] 小鼠E6轻链可变区序列：

[0421] (DNA)

[0422] caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaggaggtcaccctaacctgcagtgccacctcaagtgtaagttacatacactggttccagcagaggccaggcacttctcccaaactctggatttatagcacatccaacctggcttctggagtccctgttcgcttcagtggcagtggatatgggacctcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaaggagtagttccccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaa(SEQ ID NO:65)

[0423] (氨基酸)

[0424] QIVLTQSPAIMSASPGEEVTLTCSATSSVSYIHWFQQRPGTSPKLW IYSTSNLASGVPVRFSGSGYGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSSPF TFGSGTKLEIK(SEQ ID NO:66)

[0425] 小鼠E6轻链可变构架区1(FWR1)序列：

[0426] (DNA)

[0427] caaattgttctcacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaggaggtcaccctaacctgc(SEQ ID NO:67)

[0428] (氨基酸)

[0429] QIVLTQSPAIMSASPGEEVTLTC(SEQ ID NO:68)

[0430] 小鼠E6轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0431] (DNA)

[0432] AGTGCCACCTCAAGTGTAAGTTACATACAC(SEQ ID NO:69)

[0433] (氨基酸)

[0434] SATSSVSYIH(SEQ ID NO:70)

[0435] 小鼠E6轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[0436] (DNA)

[0437] tggttccagcagaggccaggcacttctcccaaactctggatttat(SEQ ID NO:71)

[0438] (氨基酸)

[0439] WFQQRPGTSPKLWIY(SEQ ID NO:72)

[0440] 小鼠E6轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0441] (DNA)

[0442] agcacatccaacctggcttct(SEQ ID NO:73)

[0443] (氨基酸)

[0444] STSNLAS(SEQ ID NO:74)

[0445] 小鼠E6轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[0446] (DNA)

[0447] ggagtccctgttcgcttcagtggcagtggatatgggacctcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgc(SEQ ID NO:75)

[0448] (氨基酸)

[0449] GVPVRFSGSGYGTSYSLTISRMEAEDAATYYC(SEQ ID NO:76)

[0450] 小鼠E6轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0451] (DNA)

[0452] cagcaaaggagtagttccccattcacg(SEQ ID NO:77)

[0453] (氨基酸)

[0454] QQRSSSPFT(SEQ ID NO:78)

[0455] IGKV3-11＊02轻链可变区序列：

[0456] (DNA)

[0457] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagctacttagctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctcc(SEQ ID NO:79)

[0458] (氨基酸)

[0459] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGRDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PP(SEQ ID NO:80)

[0460] IGKV3-11＊02轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[0461] (DNA)

[0462] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgc(SEQ ID NO:81)

[0463] (氨基酸)

[0464] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC(SEQ ID NO:82)

[0465] IGKV3-11＊02轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0466] (DNA)

[0467] agggccagtcagagtgttagcagctacttagcc(SEQ ID NO:83)

[0468] (氨基酸)

[0469] RASQSVSSYLA(SEQ ID NO:84)

[0470] IGKV3-11＊02轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[0471] (DNA)

[0472] tggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctat(SEQ ID NO:85)

[0473] (氨基酸)

[0474] WYQQKPGQAPRLLIY(SEQ ID NO86)

[0475] IGKV3-11＊02轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0476] (DNA)

[0477] gatgcatccaacagggccact(SEQ ID NO:87)

[0478] (氨基酸)

[0479] DASNRAT(SEQ ID NO:88)

[0480] IGKV3-11＊02轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[0481] (DNA)

[0482] ggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgt(SEQ ID NO:89)

[0483] (氨基酸)

[0484] GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:90)

[0485] IGKV3-11＊02轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0486] (DNA)

[0487] cagcagcgtagcaactggcctcc(SEQ ID NO:91)

[0488] (氨基酸)

[0489] QQRSNWPP(SEQ ID NO:92)

[0490] 人源化E6轻链可变区序列：

[0491] (DNA)

[0492] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaa(SEQ ID NO:93)

[0493] (氨基酸)

[0494] EIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLI YSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTF GSGTKVEIK(SEQ ID NO:94)

[0495] 人源化E6轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[0496] (DNA)

[0497] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgc(SEQ ID NO:95)

[0498] (氨基酸)

[0499] EIVLTQSPATLSLSPGERATLTC(SEQ ID NO:96)

[0500] 人源化E6轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0501] (DNA)

[0502] agcgccaccagcagtgttagctacatccac(SEQ ID NO:97)

[0503] (氨基酸)

[0504] SATSSVSYIH(SEQ ID NO:98)

[0505] 人源化E6重轻可变构架区2(FWR2)酸序列：

[0506] (DNA)

[0507] tggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctat(SEQ ID NO:99)

[0508] (氨基酸)

[0509] WYQQRPGQSPRLLIY(SEQ ID NO:100)

[0510] 人源化E6轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0511] (DNA)

[0512] agcacctccaacctggccagc(SEQ ID NO:101)

[0513] (氨基酸)

[0514] STSNLAS(SEQ ID NO:102)

[0515] 人源化E6轻链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[0516] (DNA)

[0517] ggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgt(SEQ ID NO:103)

[0518] (氨基酸)

[0519] GIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:104)

[0520] 人源化E6轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0521] (DNA)

[0522] cagcagcgtagcagctccccttcacc(SEQ ID NO:105)

[0523] (氨基酸)

[0524] QQRSSSPFT(SEQ ID NO:106)

[0525] 由Genescript合成的人源化E6κ轻链：

[0526] (DNA)

[0527] gaattctaagcttgggccaccatggaagccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagataccactggagaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcaccttggcagcggcaccaaagtggaaattaaaaggacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttagtaagtttaaactctaga(SEQ ID NO:107)

[0528] (氨基酸)

[0529] EF*AWATMEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERA TLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**V*TLX(SEQ ID NO:108)

[0530] 人κ轻链恒定区序列：

[0531] (DNA)

[0532] aggacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccg tcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag(SEQ ID NO:109)

[0533] (氨基酸)

[0534] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:110)

[0535] 人源化E6λ轻链序列：

[0536] (DNA)

[0537] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctg cagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctat agcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcacca tcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcag cggcaccaaagtggaaattaaaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggag cttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaagg cagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccag cagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagc accgtggagaagacagtggcccctacagaatgttcatagtaa(SEQ ID NO:111)

[0538] (氨基酸)

[0539] EIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGS DYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS**(SEQ ID NO:112)

[0540] 人源化λ轻链恒定区序列：

[0541] (DNA)

[0542] ggtcagcccaaggctgcccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaa ggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagcccc gtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcc tgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagac agtggcccctacagaatgttcatagtaa(SEQ ID NO:113)

[0543] (氨基酸)

[0544] GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS**(SEQ ID NO:114)

[0545] 人λ轻链恒定区gBLOCK#3序列：

[0546] (DNA)

[0547] agcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcct catctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacact ctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacct ttggcagcggcaccaaagtggaaattaaaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctc tgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcc tggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacg cggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatga agggagcaccgtggagaagacagtggcccctacagaatgttcatagtaagtttaaacccg ctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:115)

[0548] E6轻链可变区重叠序列：

[0549] (DNA)

[0550] agcgccaccagcagtgttagctacatccact(SEQ ID NO:116)

[0551] pCDNA3.1 V5和pSEC标签2重叠序列：

[0552] (DNA)

[0553] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:117)

[0554] 小鼠C2重链可变区序列：

[0555] (DNA)

[0556] gaggtccagctggaggagtcaggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtggctatgccatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtagtggtggtacttatatctactatccagacagtgtgaaggggcgattcaccatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacggccatgtattactgtgcaagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcctccgccaaaacgacacccccatctgtctat(SEQ ID NO:118)

[0557] (氨基酸)

[0558] EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYAMSWVRQTPEK RLEWVATISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDT AMYYCARLGGDNYYEYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVY(SEQ IDNO:119)

[0559] 小鼠C2重链可变构架区1(FWR1)序列：

[0560] (DNA)

[0561] gaggtccagctggaggagtcaggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagt(SEQ ID NO:120)

[0562] (氨基酸)

[0563] EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:121)

[0564] 小鼠C2重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0565] (DNA)

[0566] ggctatgccatgtct(SEQ ID NO:122)

[0567] (氨基酸)

[0568] GYAMS(SEQ ID NO:123)

[0569] 小鼠C2重链可变构架区2(FWR2)序列：

[0570] (DNA)

[0571] tgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgca(SEQ ID NO:124)

[0572] (氨基酸)

[0573] WVRQTPEKRLEWVA(SEQ ID NO:125)

[0574] 小鼠C2重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0575] (DNA)

[0576] accattagtagtggtggtacttatatctactatccagacagtgtgaagggg(SEQ ID NO:126)

[0577] (氨基酸)

[0578] TISSGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:127)

[0579] 小鼠C2重链可变构架区3(FWR3)序列：

[0580] (DNA)

[0581] cgattcaccatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacggccatgtattactgtgcaaga(SEQ ID NO:128)

[0582] (氨基酸)

[0583] RFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCAR(SEQ ID NO:129)

[0584] 小鼠C2重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0585] (DNA)

[0586] cttgggggggataattactacgaatacttcgatgtc(SEQ ID NO:130)

[0587] (氨基酸)

[0588] LGGDNYYEYFDV(SEQ ID NO:131)

[0589] IGHV3-21＊04重链可变区序列：

[0590] (DNA)

[0591] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcatccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcga ga(SEQ ID NO:132)

[0592] (氨基酸)

[0593] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR(SEQ ID NO:133)

[0594] IGHV3-21＊04重链可变构架区1(FWR1)序列：

[0595] (DNA)

[0596] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:134)

[0597] (氨基酸)

[0598] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:135)

[0599] IGHV3-21＊04重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0600] (DNA)

[0601] agctatagcatgaac(SEQ ID NO:136)

[0602] (氨基酸)

[0603] SYSMN(SEQ ID NO:137)

[0604] IGHV3-21＊04重链可变构架区2(FWR2)序列：

[0605] (DNA)

[0606] gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctca(SEQ ID NO:138)

[0607] (氨基酸)

[0608] WVRQAPGKGLEWVS(SEQ ID NO:139)

[0609] IGHV3-21＊04重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0610] (DNA)

[0611] tccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggc(SEQ ID NO:140)

[0612] (氨基酸)

[0613] SISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:141)

[0614] IGHV3-21＊04重链可变构架区3(FWR3)序列：

[0615] (DNA)

[0616] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:142)

[0617] (氨基酸)

[0618] RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:143)

[0619] 人源化C2重链可变区序列：

[0620] (DNA)

[0621] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctcc(SEQ ID NO:144)

[0622] (氨基酸)

[0623] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGK GLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:145)

[0624] 人源化C2重链可变构架区1(FWR1)序列：

[0625] (DNA)

[0626] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:146)

[0627] (氨基酸)

[0628] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:147)

[0629] 人源化C2重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0630] (DNA)

[0631] ggctatgccatgagc(SEQ ID NO:148)

[0632] (氨基酸)

[0633] GYAMS(SEQ ID NO:149)

[0634] 人源化C2重链可变构架区2(FWR2)序列：

[0635] (DNA)

[0636] tgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaa(SEQ ID NO:150)

[0637] (氨基酸)

[0638] WVRQAPGKGLEWVS(SEQ ID NO:151)

[0639] 人源化C2重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0640] (DNA)

[0641] accattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggc(SEQ ID NO:152)

[0642] (氨基酸)

[0643] TISSGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:153)

[0644] 人源化C2重链可变构架区3(FWR3)序列：

[0645] (DNA)

[0646] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccg
aggacacggccgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:154)

[0647] (氨基酸)

[0648] RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:155)

[0649] 人源化C2重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0650] (DNA)

[0651] cttgggggggataattactacgaatacttcgatgtc(SEQ ID NO:156)

[0652] (氨基酸)

[0653] LGGDNYYEYFDV(SEQ ID NO:157)

[0654] 人源化C2 IgG1重链序列

[0655] (DNA)

[0656] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc
tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact
tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgctagcacc
aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgg
tcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccc
ggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctccagcagcttgggcacccag
acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgaca
aaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaaacc
caaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag
gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatc
ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgga
ctccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca
tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa
(SEQ ID NO:157)

[0657] (氨基酸)

[0658] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK**(SEQ ID NO:158)

[0659] 人源化C2 gBLOCK#4序列：

[0660] (DNA)

[0661] actcactatagggagacccaagctggctagttaagcttgggccaccatggagacagacacactcctgc
tatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggt
caagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtc
cgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgact
cagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagc
cgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaa
gggaccacggtcaccgtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc
aggcgccctgaccagc(SEQ ID NO:160)

[0662] pCDNA3.1 V5重叠序列：

[0663] (DNA)

[0664] actcactatagggagacccaagctggctagtt(SEQ ID NO:161)

[0665] 人IgG1恒定区重叠序列：

[0666] (DNA)

[0667] gacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagc(SEQ ID NO:162)

[0668] 人源化C2 IgG2重链序列

[0669] (DNA)

[0670] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc
tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact
tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgcctccacc
aagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctgg
tcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttccc
agctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccag
acctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgtgtcg
agtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccct
catgatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaac
tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtg
tggtcagcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagg
cctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccc
ccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcg
ccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctc
cttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg

catgaggctctgcacaaccactacacgcag aagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa(SEQ ID NO:163)

[0671] (氨基酸)

[0672] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:164)

[0673] 人源化C2 gBLOCK#5序列：

[0674] (DNA)

[0675] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgacca(SEQ ID NO:165)

[0676] pSEC标签2重叠序列：

[0677] (DNA)

[0678] tgctctgggttccaggttccactggtgacgc(SEQ ID NO:166)

[0679] 人IgG2恒定区重叠序列：

[0680] (DNA)

[0681] gacggtgtcgtggaactcaggcgctctgacca(SEQ ID NO:167)

[0682] 小鼠C2轻链可变区序列：

[0683] (DNA)

[0684] gacattgtgatcacacagtctacagcttccttaggtgtatctctggggcagagggccaccatctcatgcagggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagttatatgcactggtaccaacagagaccaggacagccacccaaactcctcatctatcttgcatccaacctagaatctggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggatgctgcaacctattactgtcagcacagtagggagcttccgttcacgttcggaggggggaccaagctggagataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatcc(SEQ ID NO:168)

[0685] (氨基酸)

[0686] DIVITQSTASLGVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQRPG QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ HSRELPFTFGGGTKLEIKRADAAPTVS(SEQ ID NO:169)

[0687] 小鼠C2轻链可变构架区1(FWR1)序列：

[0688] (DNA)

[0689] gacattgtgatcacacagtctacagcttccttaggtgtatctctggggcagagggccaccatctcatgc (SEQ ID NO:170)

[0690] (氨基酸)

[0691] DIVITQSTASLGVSLGQRATISC(SEQ ID NO:171)

[0692] 小鼠C2轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0693] (DNA)

[0694] agggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagttatatgcac(SEQ ID NO:172)

[0695] (氨基酸)

[0696] RASKSVSTSGYSYMH(SEQ ID NO:173)

[0697] 小鼠C2轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[0698] (DNA)

[0699] tggtaccaacagagaccaggacagccacccaaactcctcatctat(SEQ ID NO:174)

[0700] (氨基酸)

[0701] WYQQRPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:175)

[0702] 小鼠C2轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0703] (DNA)

[0704] cttgcatccaacctagaatc(SEQ ID NO:176)

[0705] (氨基酸)

[0706] LASNLES(SEQ ID NO:177)

[0707] 小鼠C2轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[0708] (DNA)

[0709] tggggtccctgccaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtgg aggag gaggatgctgcaacctattactgt(SEQ ID NO:178)

[0710] (氨基酸)

[0711] GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC(SEQ ID NO:179)

[0712] 小鼠C2轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0713] (DNA)

[0714] cagcacagtagggagcttccgttcacg(SEQ ID NO:180)

[0715] (氨基酸)

[0716] QHSRELPFT(SEQ ID NO:181)

[0717] IGKV7-3＊01轻链可变区序列：

[0718] (DNA)

[0719] gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctg cagagccagtgagagtgtcagtttcttgggaataaacttaattcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcct aaactcctgatttaccaagcatccaataaagacactggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccg atttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtctgcagagtaagaattttcc tcccaca(SEQ ID NO:182)

[0720] (氨基酸)

[0721] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGILIHWYQQKPGQP PKLLIYQASNKDTGVPARFSG

SGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCLQS KNFPPT(SEQ ID NO:183)

[0722] IGKV7-3＊01轻链可变构架区1(FWR1)序列：

[0723] (DNA)

[0724] gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgc(SEQ ID NO:184)

[0725] (氨基酸)

[0726] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC(SEQ ID NO:185)

[0727] IGKV7-3＊01轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0728] (DNA)

[0729] agagccagtgagagtgtcagtttcttgggaataaacttaattcac(SEQ ID NO:186)

[0730] (氨基酸)

[0731] RASESVSFLGINLIH(SEQ ID NO:187)

[0732] IGKV7-3＊01轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[0733] (DNA)

[0734] tggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttac(SEQ ID NO:188)

[0735] (氨基酸)

[0736] WYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:189)

[0737] IGKV7-3＊01轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0738] (DNA)

[0739] caagcatccaataaagacact(SEQ ID NO:190)

[0740] (氨基酸)

[0741] QASNKDT(SEQ ID NO:191)

[0742] IGKV7-3＊01轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[0743] (DNA)

[0744] ggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgt(SEQ ID NO:192)

[0745] (氨基酸)

[0746] GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC(SEQ ID NO:193)

[0747] 人源化C2轻链可变区序列：

[0748] (DNA)

[0749] gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO:194)

[0750] (氨基酸)

[0751] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC QHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:195)

[0752] 人源化C2轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[0753] (DNA)

[0754] gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgc(SEQ ID NO:196)

[0755] (氨基酸)

[0756] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC(SEQ ID NO:197)

[0757] 人源化C2轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[0758] (DNA)

[0759] agagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcac(SEQ ID NO:198)

[0760] (氨基酸)

[0761] RASKSVSTSGYSYMH(SEQ ID NO:199)

[0762] 人源化C2重轻可变构架区2(FWR2)酸序列：

[0763] (DNA)

[0764] tggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttac(SEQ ID NO:200)

[0765] (氨基酸)

[0766] WYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:201)

[0767] 人源化C2轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[0768] (DNA)

[0769] ctggcatccaatctggagagc(SEQ ID NO:202)

[0770] (氨基酸)

[0771] LASNLES(SEQ ID NO:203)

[0772] 人源化C2轻链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[0773] (DNA)

[0774] ggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgt(SEQ ID NO:204)

[0775] (氨基酸)

[0776] GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYC(SEQ ID NO:205)

[0777] 人源化C2轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0778] (DNA)

[0779] cagcacagtagggagctgcctttcaca(SEQ ID NO:206)

[0780] (氨基酸)

[0781] QHSRELPFT(SEQ ID NO:207)

[0782] 人源化C2轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[0783] (DNA)

[0784] ctgcagagtaagaattttcctcccaca(SEQ ID NO:208)

[0785] (氨基酸)

[0786] LQSKNFPPT(SEQ ID NO:209)

[0787] 人源化C2 gBLOCK#6序列(κ轻链,在pCDNA3.1 V5中)：

[0788] (DNA)

[0789] actcactatagggagacccaagctggctagttaagcttgggccaccatggagacagacacactcctgc

tatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggc
cgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatg
cactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcc
cagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgc
aaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact
acggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt
gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactc
ccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagca
gactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagetcgcccgtcacaaagagcttca
acaggggagagtgttagtaagtttaaacccgctgatcagctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:210)

[0790] pCDNA3.1 V5 5'重叠序列：

[0791] (DNA)

[0792] actcactatagggagacccaagctggctagtt(SEQ ID NO:211)

[0793] pCDNA3.1 V5 3'重叠序列：

[0794] (DNA)

[0795] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:212)

[0796] 人源化C2 gBLOCK#7序列(κ轻链,在pSEC标签2中)：

[0797] (DNA)

[0798] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgacattgtgctgacccagtctcca
gcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggat
actcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctgga
gagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagct
aatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggaga
tcaaacgaactacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgc
ctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgc
tgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagetcgcccgtcac
aaagagcttcaacaggggagagtgttagtaagtttaaacccgctgatcageetcgactgtgccttctagttg(SEQ
ID NO:213)

[0799] pSEC标签2 5'重叠序列：

[0800] (DNA)

[0801] tgctctgggttccaggttccactggtgacgc(SEQ ID NO:214)

[0802] pSEC标签2 3'重叠序列：

[0803] (DNA)

[0804] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:215)

[0805] 人源化C2 gBLOCK#8序列(λ轻链,在pCDNA3.1 V5中)：

[0806] (DNA)

[0807] actcactatagggagacccaagctggctagttaagcttgggccaccatggagacagacacactcctgc
tatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggc

cgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatg
cactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcc
cagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgc
aaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact
ggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacac
tggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggc
gggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcct
gagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggccc
ctacagaatgttcatagtaagtttaaacccgctgatcagctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:216)

[0808] pCDNA3.1 V5 5'重叠序列：

[0809] (DNA)

[0810] actcactatagggagacccaagctggctagtt(SEQ ID NO:217)

[0811] pCDNA3.1 V5 3'重叠序列：

[0812] (DNA)

[0813] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:218)

[0814] 人源化C2 gBLOCK#9序列(λ轻链,在pSEC标签2中)：

[0815] (DNA)

[0816] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgacattgtgctgacccagtctcca
gcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggat
actcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctgga
gagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagct
aatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggaga
tcaaacgaactggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaa
caaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagc
cccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctga
gcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaa
gacagtggcccctacagaatgttcatagtaagtttaaacccgctgatcageetcgactgtgccttctagttg(SEQ
ID NO:219)

[0817] pSEC标签2 5'重叠序列：

[0818] (DNA)

[0819] tgctctgggttccaggttccactggtgacgc(SEQ ID NO:220)

[0820] pSEC标签2 3'重叠序列：

[0821] (DNA)

[0822] ccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttg(SEQ ID NO:221)

[0823] 鼠Igκ链前导序列

[0824] (DNA)

[0825] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgac(SEQ
ID NO:222)

[0826] (氨基酸)

[0827] METDTLLLWVLLLWVPGSTGD(SEQ ID NO:223)

[0828] 白细胞介素-2(IL-2)前导序列

[0829] (DNA)

[0830] atgtacaggatgcaactcctgtcttgcattgcactaagtcttgcacttgtcacaaacagt(SEQ IDNO:224)

[0831] (氨基酸)

[0832] MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:225)

[0833] CD33前导序列

[0834] (DNA)

[0835] atgcctcttctgcttctgcttcctctgctttgggctggagctcttgct(SEQ ID NO:226)

[0836] (氨基酸)

[0837] MPLLLLLPLLWAGALA(SEQ ID NO:227)

[0838] IGHV3-21＊03前导序列

[0839] (DNA)

[0840] atggaactggggctccgctgggttttccttgttgctattttagaaggtgtccagtgt(SEQ ID NO:228)

[0841] (氨基酸)

[0842] MELGLRWVFLVAILEGVQC(SEQ ID NO:229)

[0843] IGHV3-11＊02前导序列

[0844] (DNA)

[0845] atggaagccccagcgcagcttctcttcctcctgctactctggctcccagataccactgga(SEQ IDNO:230)

[0846] (氨基酸)

[0847] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG(SEQ ID NO:231)

[0848] 人源化E6单链GS3

[0849] (DNA)

[0850] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt

[0851] g

[0852] cagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagt

[0853] gggtctcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctc

[0854] cagagacaacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtatt

[0855] actgtaccagagataactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggaccctggtgacc

[0856] gtgagcagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgaaattgtgttgacac

[0857] agtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagt

gtta

[0858] gctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaac ctgg

[0859] ccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagc cta

[0860] gagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcagcgg caccaaagtggaaattaaa(SEQ ID NO:232)

[0861] (氨基酸)

[0862] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(SEQ ID NO:233)

[0863] 人源化E6单链IgGlnoC

[0864] (DNA)

[0865] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtc tcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagaga taactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgataaa acccatactaaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtgaaattgtgttgacacagt ctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacat ccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatc ccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttg cagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaa(SEQ ID NO:234)

[0866] (氨基酸)

[0867] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGE IVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSL EPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(SEQ ID NO:235)

[0868] 人源化E6单链X4(接头是IgG1和IgG2修饰铰链区)

[0869] (DNA)

[0870] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtc tcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagaga taactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcgataaa acccatactaaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtactggtggtccgactatta aacctccgaaacctccgaaacctgctccgaacctgctgggtggtccggaaattgtgttgacacagtctccagccac

cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtac caacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggt tcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttatta ctgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaa(SEQ ID NO:236)

[0871] (氨基酸)

[0872] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGT GGPTIKPPKPPKPAPNLLGGPEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLAS GIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(SEQ ID NO:237)

[0873] 人源化C2单链GS3

[0874] (DNA)

[0875] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggc ggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgt ctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactg gtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagcc aggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaatt attactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO:238)

[0876] (氨基酸)

[0877] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA NDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:239)

[0878] 人源化C2单链IgG(没有半胱氨酸)

[0879] (DNA)

[0880] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgataaaacc catactaaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtgacattgtgctgacccagtctc cagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcgg atactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctg gagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaag ctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtgga

gatcaaacgaact(SEQ ID NO:240)

[0881] (氨基酸)

[0882] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGDI VLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLT INPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:241)

[0883] 人源化C2单链X4(接头是IgG1和IgG2修饰铰链区)

[0884] (DNA)

[0885] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgataaaacc catactaaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtactggtggtccgactattaaac ctccgaaacctccgaaacctgctccgaacctgctgggtggtccggacattgtgctgacccagtctccagcctcctt ggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctac atgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcgggg tcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatac tgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacga act(SEQ ID NO:242)

[0886] (氨基酸)

[0887] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTG GPTIKPPKPPKPAPNLLGGPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:243)

[0888] 人源化C3单链GS3

[0889] (DNA)

[0890] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcggcggtggcggatcc ggcggtggcggatccggcggtggcggatccgatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctg gacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggta cctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggt ttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttatt actgcttccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO:244)

[0891] (氨基酸)

[0892] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLS LSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:245)

[0893] 人源化C3单链IgG1(没有半胱氨酸)

[0894] (DNA)

[0895] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcgataaaacccatact aaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtgatattgtgatgacccagactccactct ctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaa cacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttc tctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctg aggatgttggggtttattactgcttccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagat caaacgaact(SEQ ID NO:246)

[0896] (氨基酸)

[0897] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGDIVM TQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:247)

[0898] 人源化C3单链X4(接头是IgG1和IgG2修饰铰链区)

[0899] (DNA)

[0900] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcgataaaacccatact aaaccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtactggtggtccgactattaaacctccga aacctccgaaacctgctccgaacctgctgggtggtccggatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgt cacccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttg gagtggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgc cagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttgg ggtttattactgettccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact (SEQ ID NO:248)

[0901] (氨基酸)

[0902] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGP

TIKPPKPPKPAPNLLGGPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:249)

[0903] 人源化C8单链GS3(接头是[Gly_4Ser_1]$_3$)

[0904] (DNA)

[0905] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact gggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccggc ggtggcggatccggcggtggcggatccgacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcg agagggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccagca gaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattcagt ggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtc aacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO: 250)

[0906] (氨基酸)

[0907] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL AVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:251)

[0908] 人源化C8单链IgG1(没有半胱氨酸)

[0909] (DNA)

[0910] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact gggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgataaaacccatactaaa ccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtgacatcgtgatgacccagtctccagactccc tggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagcta catgcactggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggg gtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatg tggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaa acgaact(SEQ ID NO:252)

[0911] (氨基酸)

[0912] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGDIVMT QSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:253)

[0913] 人源化C8单链X4(接头是IgG1和IgG2修饰铰链区)

[0914] (DNA)

[0915] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc
tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact
gggcggcgacaattactatgagtattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgataaaacccatactaaa
ccgccaaaaccggcgccggaactgctgggtggtcctggtaccggtactggtggtccgactattaaacctccgaaac
ctccgaaacctgctccgaacctgctgggtggtccggacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtc
tctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactgg
taccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgacc
gattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagttta
ttactgtcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ
ID NO:254)

[0916] (氨基酸)

[0917] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSSDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPT
IKPPKPPKPAPNLLGGPDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRT(SEQ IDNO:255)

[0918] pSEC标签2E6 scFV-FC

[0919] (DNA)

[0920] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggc
ccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt
gcagcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtggg
tctcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagaga
caacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccaga
gataactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcggcg
gtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtc
tttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacag
aggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtg
gcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtca
gcagcgtagcagctccccttcaccttggcagcggcaccaaagtggaaattaaagagcccaaatcttgtgacaaa
actcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccca
aggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggt
caagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc
acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgta
caccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggact
ccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatg

ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:256)

[0921] (氨基酸)

[0922] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPG KRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGI PARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:257)

[0923] E6 scFC-FC 1gBLOCK序列：

[0924] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctggg ggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaggtatggca tgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtctcaaccattagtggcggaggcacctacatata ctacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgattatggcatgg attattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtgg cggatccgaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtc(SEQ ID NO:258)

[0925] E6 scFC-FC 2gBLOCK序列：

[0926] aattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgca gcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatag cacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatc agcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccctttcacctttggcagcg gcaccaaagtggaaattaaagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaact cctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtc acatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc(SEQ ID NO:259)

[0927] pSEC标签2C2 scFV-FC

[0928] (DNA)

[0929] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcc ccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt gcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg tctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagaga caacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgaga cttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtg gcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgt gtctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcac tggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccag ccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaa

ttattactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgag
cccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcc
tcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgag
ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg
gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg
agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcc
ccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg
gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca
cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca
ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
ccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:260)

[0930] (氨基酸)

[0931] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPG
KGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:261)

[0932] C2 scFV-FC 1gBLOCK序列：

[0933] (DNA)

[0934] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctggg
ggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgcca
tgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatata
ctaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaac
agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacttgggggggataattactacgaatacttcgatg
tctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcgg
atccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggc(SEQ IDNO:262)

[0935] C2 scFV-FC 2gBLOCK序列：

[0936] (DNA)

[0937] cattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctgca
gagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcctaa
actcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggttcagcggcagtgggtctgggaccgat
ttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcctt
tcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc
accgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg
atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggt
acgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggt
cagc(SEQ ID NO:263)

[0938] pSEC标签2C3 scFV-FC

[0939] (DNA)

[0940] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggc
ccagccggcccaggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgc
aaggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtgga
tgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaecatgaccacaga
cacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgaga
agcgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcggcggtggcggat
ccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccc
tggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtgg
tacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagata
ggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggttta
ttactgettccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagccc
aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctct
tccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagcca
cgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag
gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
agaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtc
aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg
ggtaaatgataa(SEQ ID NO:264)

[0941] (氨基酸)

[0942] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPG
QGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ IDNO:265)

[0943] C3 GS scFV FC 1gBLOCK序列:

[0944] (DNA)

[0945] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggcccaggttcagctggtgcagtctgga
gctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttaccgactacgcca
tgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaa
cttcaaccagaagttcaagggcagagtcaecatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgagg
agcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggcccatacttcgactactggg
gccagggcaccaccctgaccgtgtccagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccga

tattgtgatgacccagactccactctctctgt(SEQ ID NO:266)

[0946] C3 scFV FC2 gBLOCK序列：

[0947] (DNA)

[0948] tattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgca
ggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtctcc
acagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggaca
gatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgettccaaggtagccacgtgc
ctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatg
cccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctc
atgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaact
ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagc(SEQ ID NO:267)

[0949] pSEC标签2C8 scFV-FC

[0950] (DNA)

[0951] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggc
ccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgt
gcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagaga
caacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgaga
ctgggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccg
gcggtggcggatccggcggtggcggatccgacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctggg
cgagagggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccag
cagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattca
gtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactg
tcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaa
tcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcc
ccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga
agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag
cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca
agtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgaga
accacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa
ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctc
ccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa
cgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt
aaatgataa(SEQ ID NO:268)

[0952] (氨基酸)

[0953] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPAEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPG
KGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESG

VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRTEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ IDNO:269)

[0954] C8 scFV FC 1gBLOCK序列：

[0955] (DNA)

[0956] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctggg
ggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgcca
tgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatata
ctaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaac
agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcggcgataactattatgaatattggggca
aagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacat
cgtgatgacccagtctccagactccctgg(SEQ ID NO:270)

[0957] C8 scFV FC2 gBLOCK序列：

[0958] (DNA)

[0959] catcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgca
gggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaa
gctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagat
ttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgacca
ggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatg
cccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctc
atgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaact
ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagc(SEQ ID NO:271)

[0960] 人IgG1 Fc序列：

[0961] (DNA)

[0962] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggacc
gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc
tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:272)

[0963] (氨基酸)

[0964] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:273)

[0965] 人IgG1 CH2-CH3域序列：

[0966] (DNA)

[0967] ccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac cctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtacc gtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaa agccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg cccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg ctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO: 274)

[0968] (氨基酸)

[0969] PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** (SEQ ID NO:275)人IgG1 CH3域序列：

[0970] (DNA)

[0971] gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggt cagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag aacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggaca agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaa gagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:276)

[0972] (氨基酸)

[0973] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:277)

[0974] 人IgG1 Fc Y407R序列：

[0975] (DNA)

[0976] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacc gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctcaggagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc

tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:278)

[0977] (氨基酸)

[0978] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLRSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:279)

[0979] 人IgG1 Fc F405Q序列：

[0980] (DNA)

[0981] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggacc gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttccagctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:280)

[0982] (氨基酸)

[0983] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFQLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:281)

[0984] 人IgG1 Fc T394D序列：

[0985] (DNA)

[0986] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggacc gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacaagaccgaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:282)

[0987] (氨基酸)

[0988] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTDPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

YTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:283)

[0989] 人IgG1 Fc T366W/L368W序列：

[0990] (DNA)

[0991] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga ccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc tgtggtgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:284)

[0992] (氨基酸)

[0993] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLWCWVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:285)

[0994] 人IgG1 Fc T364R/L368R序列：

[0995] (DNA)

[0996] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga ccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcaggc tgacctgcagggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc tctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:286)

[0997] (氨基酸)

[0998] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVRLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:287)

[0999] 人IgG1 Fc无铰链序列：

[1000] (DNA)

[1001] gcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtac

gtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtca
gcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccc
agcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc
cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
agtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctt
cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:288)

[1002] (氨基酸)

[1003] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
(SEQ ID NO:289)

[1004] 人IgG1 G237A FC序列：

[1005] (DNA)

[1006] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggcccc
gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc
tctccctgtctccgggtaaa(SEQ IDNO:290)

[1007] (氨基酸)

[1008] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:291)

[1009] 人IgG1 L234A/L235AFC序列：

[1010] (DNA)

[1011] gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgccgggggacc
gtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc

aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc
tctccctgtctccgggtaaa(SEQ IDNO:292)

[1012] (氨基酸)

[1013] EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:293)

[1014] CAR-T E6 CD3z序列：

[1015] (DNA)

[1016] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
ccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccct
ggtgattaccctgtactgccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaa
ctgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaa
tgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagc
ttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccaca
gcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:294)

[1017] (氨基酸)

[1018] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR****
(SEQ ID NO:295)

[1019] CAR-T E6 CD3z gBLOCK序列：

[1020] (DNA)

[1021] tggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggca
catgtggagtgetcctcctctccctggtgattaccctgtactgccgcgttaagttctcccgatcagecgacgcgcc

tgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggac
aaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagt
tgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacga
cggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacgg
tgataagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgc(SEQ IDNO:296)

[1022] CAR-T E6 CD28/CD3z序列：

[1023] (DNA)

[1024] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtgggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgetcctcctctccct
ggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaaga
ccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcccgcgttaagt
tctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacg
ggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccc
caggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaa
ggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctcca
tatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:297)

[1025] (氨基酸)

[1026] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:298)

[1027] CAR-T E6 CD28/CD3z g BLOCK序列：

[1028] (DNA)

[1029] tggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggca
catgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctga

ttacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttc
gctgcctaccggtcccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgt
acaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatggg
cggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttat
agcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaa
caaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcagcctc
gactgtgc(SEQ ID NO:299)

[1030] CAR-T E6 4-1BB/CD3z序列：

[1031] (DNA)

[1032] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgetcctcctctccct
ggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagta
cagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgtta
agttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtag
acgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaac
ccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggg
aaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccct
ccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:300)

[1033] (氨基酸)

[1034] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:301)

[1035] CAR-T E6 4-1BB/CD3z gBLOCK序列：

[1036] (DNA)

[1037] tggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggca catgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttt taagcagcctttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggag gaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaac tgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaat gggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagct tatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacag caacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcagc ctcgactgtgc(SEQ ID NO:302)

[1038] CAR-T E6 CD28/4-1BB/CD3z序列：

[1039] (DNA)

[1040] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag gaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc cccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccct ggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaaga ccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtccaaaaggggcc gcaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctc atgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgct tacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaac ggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgca gaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggc ctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgat aa(SEQ ID NO:303)

[1041] (氨基酸)

[1042] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY

RSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR**(SEQ ID NO:304)

[1043] CAR-T E6 CD28/4-1BB/CD3z gBLOCK序列：

[1044] (DNA)

[1045] atagggagacccaagctggctagttaagcttggtaccgagggccaccatggccctgcccgtgaccgct
ttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggtccagctggttgagagtggcggtgggctgg
ttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggatttactttcagccgatatgggatgagttgggt
gcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccgggggggcacttacatctattaccccgac
tcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaataccctgtatttgcagatgaattctctgagag
cagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactattgggg
acaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggaggaggaggcagcggtgggggggcagcgag
atagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacct
cctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcccctagattgctcatttatagtacctctaa
tctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacaccctcactatctctagcctg
gagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacctttgggagtgggaccaagg
ttgaaattaaaacgacaaccccggccccccagaccaccaacgccagccccccaccatcgccagccaaccccctgtctct
gagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctac
atttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagc
ggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagcc
ctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtccaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcag
ccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggag
ggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaa
cgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggc
aagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcg
agatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaa
agatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcagcctcgact
gtgc(SEQ ID NO:305)

[1046] CAR-T C2 CD28/4-1BB/CD3z序列：

[1047] (DNA)

[1048] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagt
gcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttc
actttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagct
caggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactc
cctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaac
tactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggag
gcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacg
cgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaa
ccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcaggga

gtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaaca
ttcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccc
agaccaccaacgccageccccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccg
gtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtgg
agtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatg
aacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcct
accggtccaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactca
agaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccga
tcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagt
acgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggaggg
actgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggggaaaggagacga
gggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcagg
cacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:306)

[1049] (氨基酸)

[1050] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP
ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA
NDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY
IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID
NO:307)

[1051] CAR-T C2-1 gBLOCK序列：

[1052] (DNA)

[1053] atagggagacccaagctggctagttaagcttggtaccgagggccaccatggccttgccagtgacggcc
ctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagtgcagctcgtagagagtggcgggggactgg
tgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttcacttttcaggttacgccatgtcctgggt
aagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagctcaggaggcacttatatatattatcctgac
tctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactccctctacctccaaatgaacagtcttaggg
cagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaactactacgagtactttgacgtgtgggggaa
agggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggaggcgggtcaggggggggaggaagtgatatt
gtgctcacacaatccccagcctccctggc(SEQ ID NO:308)

[1054] CAR-T C2-2 gBLOCK序列：

[1055] (DNA)

[1056] aagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacgcgctacaatta
catgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaaccaggacaacc
ccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcagggagtgggagcggc
acagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaacattcccgggaac
tccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggcccccagaccaccaac

gccagcccccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtg
cacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgc(SEQ ID
NO:309)

[1057] CAR E6 Fc/8/4-1BB/CD3z序列：

[1058] (DNA)

[1059] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccca
ccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatga
tctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttct
tcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaatctacatttgggccccgctcgca
ggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttaca
tttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgagga
ggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaac
caactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccag
aaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcaga
agcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtcc
acagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:310)

[1060] (氨基酸)

[1061] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**
(SEQ ID NO:311)

[1062] E6 CAR pCDH gBLOCK序列：

[1063] (DNA)

[1064] acgctgttttgacctccatagaagattctagagctagctgtagagcttggtaccgagggccaccatgg
ccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggtccagetggttga
gagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagetgcgccgcgagtggatttactttcagccga
tatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccgggggggcactt
acatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaataccctgtatttgca
gatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcaggaactacgactac
ggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggaggaggaggcagcg
gtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctggggaacgagctaccct
gacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcccctagattgctc
atttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgc(SEQ ID NO:312)

[1065] E6 CAR Fc pCDH gBLOCK序列：

[1066] (DNA)

[1067] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccag
cacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
gtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctca
ccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccat
cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggag
atgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggaga
gcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctg(SEQ ID NO:313)

[1068] E6 CAR 8BB3 pCDH gBLOCK序列：

[1069] (DNA)

[1070] agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact
acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgct
cctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttt
atgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcg
aactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagct
gaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcct
cgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcg
gaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatac

gtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcaggcggccgcgaaggatctgcgatcgctccggtgcccgtcag(SEQ ID NO:314)

[1071] CAR E6 FcH/8/4-1BB/CD3z序列：

[1072] (DNA)

[1073] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggtccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggatttactttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccgggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatacccctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcaggaactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggaggaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggggacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtccccctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctcccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:315)

[1074] (氨基酸)

[1075] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV

QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:316)

[1076] E6 CAR FcH pCDH gBLOCK序列：

[1077] (DNA)

[1078] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaa
aacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccc
tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgca
aggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaca
ggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc
tg(SEQ ID NO:317)

[1079] CAR E6 Fc/4/4-1BB/CD3z序列：

[1080] (DNA)

[1081] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctcccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgatttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccca
ccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatga
tctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc
ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
gagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttct
tcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaatggccctgattgtgctgggggc
gtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttta
agcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggagga
aggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactg

tacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgg
gcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagctta
tagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagca
acaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:318)

[1082] (氨基酸)

[1083] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**
(SEQ ID NO:319)

[1084] E6 CAR 44BB3 pCDH gBLOCK序列：

[1085] (DNA)

[1086] agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact
acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaaatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgct
tttcattgggctaggcatcttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgagg
ccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgc
gcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatct
cggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcagg
aaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatga
aggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatga
cgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagtttaaacccgctgatcaggcggccgcgaaggatctgcg
atcgctccggtgcccgtcag(SEQ IDNO:320)

[1087] CAR E6 FcH/4/4-1BB/CD3z序列：

[1088] (DNA)

[1089] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctcccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt

ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctc
ttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagcc
acgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggga
ggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
tacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc
gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt
caaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagg
ggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc
gggtaaaatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttcaaa
aggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacg
ggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgc
gcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttg
gacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatg
agttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggaca
cgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccacca
cggtgataa(SEQ ID NO:321)

[1090] (氨基酸)

[1091] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:322)

[1092] CAR E6 IgD/8/4-1BB/CD3z序列：

[1093] (DNA)

[1094] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt

ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagtctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccact
gcacaaccccaagcagagggcagcctcgccaaggcaaccacagccccagccaccacccgtaacacaggaagaggcg
gcgaagagaagaaaaaggagaaggagaaagaggaacaagaagagagagagacaaagacaccaatctacatttgggc
cccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaa
ctcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgct
ttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagca
gggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggc
cgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagata
agatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatca
gggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID
NO:323)

[1095] (氨基酸)

[1096] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTR
NTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:324)

[1097] E6 CAR IgD8 pcDH gBLOCK序列：

[1098] (DNA)

[1099] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagtctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccactgcacaacccc
aagcagagggcagcctcgccaaggcaaccacagccccagccaccacccgtaacacaggaagaggcggcgaagagaa
gaaaaaggagaaggagaaagaggaacaagaagagagagagacaaagacaccaatctacatttgggccccgctcgca
ggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttaca
tttttaagcagccttttatgaggccag(SEQ ID NO:325)

[1100] E6 CAR BB 3pCDH gBLOCK序列：

[1101] (DNA)

[1102] acatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgc
tttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagc
agggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagagg
ccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagat
aagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatc
agggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataagttta
aacccgctgatcaggcggccgcgaaggatctgcgatcgctccggtgcccgtcag(SEQ ID NO:326)

[1103] CAR E6 IgD/4/4-1BB/CD3z序列：

[1104] (DNA)

[1105] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctcccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagtctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccact
gcacaaccccaagcagagggcagcctcgccaaggcaaccacagccccagccaccacccgtaacacaggaagaggcg
gcgaagagaagaaaaaggagaaggagaaagaggaacaagaagagagagagacaaagacaccaatggccctgattgt
gctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctt
tacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctg
aggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggcca
gaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgac
ccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatgg
cagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcct
gtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:
327)

[1106] (氨基酸)

[1107] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTR
NTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:328)

[1108] E6 CAR IgD4 pcDH gBLOCK序列：

[1109] (DNA)

[1110] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagagtctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccactgcacaacccc
aagcagagggcagcctcgccaaggcaaccacagccccagccaccacccgtaacacaggaagaggcggcgaagagaa
gaaaaaggagaaggagaaagaggaacaagaagagagagagacaaagacaccaatggccctgattgtgctgggggc
gtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttta
agcagccttttatgaggccag(SEQ ID NO:329)

[1111] CAR E6 X4/8/4-1BB/CD3z序列：

[1112] (DNA)

[1113] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctcca
gaactgctcggaggtcctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccacctaagccacctaagcctgctccta
acctgctcggaggacctatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgat
taccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttatgaggccagtacagacg
actcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttct
cccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacggga
agagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccag
gagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggggaaagga
gacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatat
gcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:330)

[1114] (氨基酸)

[1115] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKP
PKPAPNLLGGPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:331)

[1116] E6 CAR X48 pCDH gBLOCK序列：

[1117] (DNA)

[1118] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcg
gaggtcctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccacctaagccacctaagcctgctcctaacctgctcgg
aggacctatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtac
tgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacattttaagcagcctttatgaggccag(SEQ IDNO:332)

[1119] CAR E6 X4/4/4-1BB/CD3z序列：

[1120] (DNA)

[1121] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
cccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctcca
gaactgctcggaggtcctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccacctaagccacctaagcctgctccta
acctgctcggaggacctatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcat
cttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacattttaagcagcctttatgaggccagtacagacgactcaa
gaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgat
cagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagta
cgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccaggaggga
ctgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgag
ggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggc
acttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:333)

[1122] (氨基酸)

[1123] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKDKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKP
PKPAPNLLGGPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR
VKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:334)

[1124] E6 CAR X44 pCDH gBLOCK序列：

[1125] (DNA)

[1126] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaagacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcg
gaggtcctggcaccggaaccggaggacctaccatcaaaccacctaagccacctaagcctgctcctaacctgctcgg
aggacctatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttcaaa
aggggccgcaaaaaactcctttacattttaagcagcctttatgaggccag(SEQ IDNO:335)

[1127] CAR E6 8+4/4/4-1BB/CD3z序列：

[1128] (DNA)

[1129] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtggcggaggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
ccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggct
aggcatcttcttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacg
actcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttct
cccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacggga
agagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccag
gagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaagga
gacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatat
gcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:336)

[1130] (氨基酸)

[1131] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:337)

[1132] E6 CAR CD844 pCDH gBLOCK序列：

[1133] (DNA)

[1134] agtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggttctgattacac
cctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctccccattcacc
tttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcg
ccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactgga
tttcgcctgtgatatggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttc
ttcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacattttaagcagccttttatgaggccag(SEQ IDNO:338)

[1135] 在CAR中的人源化C2 scFV序列：

[1136] (DNA)

[1137] gagggccaccatggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgcca

ggcctgaagtgcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgc
ctcaggtttcacttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtct
actatcagctcaggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatg
caaagaactccctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcgg
cggcgacaactactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggc
tcaggtggaggcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctc
ccggccaacgcgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggta
tcaacagaaaccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgc
ttttcagggagtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattatt
attgtcaacattcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaacc(SEQ ID
NO:339)

[1138] (氨基酸)

[1139] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP
ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA
NDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:340)

[1140] 在CAR中的人源化E6 scFV序列：

[1141] (DNA)

[1142] gaggtccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgc
cgcgagtggatttactttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtc
tcaacaatctccgggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagaca
acgctaagaataccctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcga
caactatggcaggaactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggc
gggggcagcggaggaggaggcagcggtgggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtc
tctcacctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacg
gcccgggcagtcccctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctgga
tctggttcaggttctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagc
agaggtctagctccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaa(SEQ ID NO:341)

[1143] (氨基酸)

[1144] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFA
VYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(SEQ ID NO:342)

[1145] CD8前导序列：

[1146] (DNA)

[1147] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggcca(SEQ
ID NO:343)

[1148] (氨基酸)

[1149] MALPVTALLLPLALLLHAARP(SEQ ID NO:344)

[1150] CD8铰链域序列：

[1151] (DNA)

[1152] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctct gagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgat(SEQ ID NO:345)

[1153] (氨基酸)

[1154] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:346)

[1155] CD4铰链域序列：

[1156] (DNA)

[1157] tcgggacaggtcctgctggaatccaacatcaaggttctgcccacatggtccaccccggtgcagcca(SEQ ID NO:347)

[1158] (氨基酸)

[1159] SGQVLLESNIKVLPTWSTPVQP(SEQ ID NO:348)

[1160] CD28铰链域序列：

[1161] (DNA)

[1162] aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc(SEQ ID NO:349)

[1163] (氨基酸)

[1164] KHLCPSPLFPGPSKP(SEQ ID NO:350)

[1165] CD8+CD4铰链域序列：

[1166] (DNA)

[1167] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctct gagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgattc gggacaggtcctgctggaatccaacatcaaggttctgcccacatggtccaccccggtgcagcca(SEQ ID NO:351)

[1168] (氨基酸)

[1169] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDS GQVLLESNIKVLPTWSTPVQP(SEQ ID NO:352)

[1170] CD8+CD28铰链域序列：

[1171] (DNA)

[1172] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctct gagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgata aacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc(SEQ ID NO:353)

[1173] (氨基酸)

[1174] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDK HLCPSPLFPGPSKP(SEQ ID NO:354)

[1175] CD28+CD4铰链域序列：

[1176] (DNA)

[1177] aaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctcgggacaggtcctgctggaatcca acatcaaggttctgcccacatggtccaccccggtgcagcca(SEQ ID NO:355)

[1178] (氨基酸)

[1179] KHLCPSPLFPGPSKPSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQP(SEQ ID NO:356)

[1180] 人IgD铰链域序列：

[1181] (DNA)

[1182] gagtctccaaaggcacaggcctcctcagtgcccactgcacaaccccaagcagagggcagcctcgc caaggcaaccacagccccagccaccacccgtaacacaggaagaggcggcgaagagaagaaaaaggag aaggagaaag aggaacaagaagagagagagacaaagacacca(SEQ ID NO:357)

[1183] (氨基酸)

[1184] ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKE KEKEEQEERETKTP(SEQ ID NO:358)

[1185] X4接头(IgG1和IgG2修饰铰链区)序列：

[1186] (DNA)

[1187] gacaagacgcacaccaagccacctaaaccagctccagaactgctcggaggtcctggcaccggaac cg gaggacctaccatcaaaccacctaagccacctaagcctgctcctaacctgctcggaggacct(SEQ ID NO:359)

[1188] (氨基酸)

[1189] DKTHTKPPKPAPELLGGPGTGTGGPTIKPPKPPKPAPNLLGGP(SEQ ID NO:360)

[1190] CD3ζ跨膜结构域序列：

[1191] (DNA)

[1192] ctctgctacctgctggatggaatcctcttcatctatggtgtcattctcactgccttgttcctg(SEQ IDNO:361)

[1193] (氨基酸)

[1194] LCYLLDGILFIYGVILTALFL(SEQ ID NO:362)

[1195] CD8跨膜结构域序列：

[1196] (DNA)

[1197] atctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtact gc(SEQ ID NO:363)

[1198] (氨基酸)

[1199] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(SEQ ID NO:364)

[1200] CD4跨膜结构域序列：

[1201] (DNA)

[1202] atggccctgattgtgctgggggcgtcgccggcctcctgcttttcattgggctaggcatcttcttc(SEQ ID NO:365)

[1203] (氨基酸)

[1204] MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF(SEQ ID NO:366)

[1205] CD28跨膜结构域序列：

[1206] (DNA)

[1207] ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattt tctgggtg(SEQ ID NO:367)

[1208] (氨基酸)

[1209] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:368)

[1210] 4-1BB跨膜结构域序列：

[1211] (DNA)

[1212] atcatctccttctttcttgcgctgacgtcgactgcgttgctcttcctgctgttcttcctcacgctccg tttctct gttgtt(SEQ ID NO:369)

[1213] (氨基酸)

[1214] IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV(SEQ ID NO:370)

[1215] OX40跨膜结构域序列：

[1216] (DNA)

[1217] gttgccgccatcctgggcctgggcctggtgctggggctgctgggccccctggccatcctgctggccc tgtacctgctc(SEQ ID NO:371)

[1218] (氨基酸)

[1219] VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL(SEQ ID NO:372)

[1220] CD3ζ域序列：

[1221] (DNA)

[1222] cgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacga gctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaag cctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgaga tcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaaga tacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacgg(SEQ IDNO:373)

[1223] (氨基酸)

[1224] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:374)

[1225] CD3ζ域变体序列：

[1226] (DNA)

[1227] agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacga gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaag ccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgaga ttgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga cacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc(SEQ IDNO:375)

[1228] (氨基酸)

[1229] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:376)

[1230] CD28域序列：

[1231] (DNA)

[1232] agaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccca ccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcc(SEQ ID NO:377)

[1233] (氨基酸)

[1234] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(SEQ ID NO:378)

[1235] 4-1BB域序列：

[1236] (DNA)

[1237] aaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcctttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactg(SEQ IDNO:379)

[1238] (氨基酸)

[1239] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:380)

[1240] OX40域序列：

[1241] (DNA)

[1242] cggagggaccagaggctgccccccgatgcccacaagccccctgggggaggcagtttccggaccc ccatccaagaggagcaggccgacgcccactccaccctggccaagatc(SEQ ID NO:381)

[1243] (氨基酸)

[1244] RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI(SEQ ID NO:382)

[1245] 人源化抗CD3 scFV克隆12F6(VH-VL)序列：

[1246] (DNA)

[1247] caggtgcagctggtgcagagcggaggtggagtggtccaacctggaagatctctgagactgagctgtaaggctagcgggtacacgttcacatcttacacgatgcactgggtgaggcaagcccccggtaagggcctggaatggatcggatatataaaccccagctcagggtataccaaatataatcagaagttcaaagatcggttcacgatttctgctgataaaagtaagtccaccgctttcctgcagatggactcactcaggccagaagatactggtgtttatttctgtgcaaggtggcaggactacgacgtgtactttgactattgggggcaggggacgcctgtaacagtatcaagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccatgacctgccgcgcgagcagcagcgtgagctatatgcattggtatcagcagaccccgggcaaagcgccgaaaccgtggatttatgcgaccagcaacctggcgagcggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattataccctgaccattagcagcctgcagccggaagatattgcgacctattattgccagcagtggagcagcaacccgccgacctttggccagggcaccaaactgcagattacccgcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatcccaggtgcagctggtgcagagcggaggtggagtggtccaacctggaagatctctgagactgagctgtaaggctagcgggtacacgttcacatcttacacgatgcactgggtgaggcaagcccccggtaagggcctggaatggatcggatatataaacccagctcagggtataccaaatataatcagaagttcaaagatcggttcacgatttctgctgataaaagtaagtccaccgctttcctgcagatggactcactcaggccagaagatactggtgtttatttctgtgcaaggtggcaggactacgacg

tgtactttgactattgggggcaggggacgcctgtaacagtatcaagc(SEQ ID NO:385)

[1253] (氨基酸)

[1254] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSYMHWYQQTPGKAPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLQITRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC KASGYTFTSYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCAR WQDYDVYFDYWGQGTPVTVSS(SEQ ID NO:386)

[1255] 人源化抗CD3 scFV克隆OKT3(VH-VL)序列：

[1256] (DNA)

[1257] caggtgcagctggtgcagagcggaggcggagtggtgcagcctggaagaagcctgcgcctgagctgcaa agcgagcggctatacctttacccgctataccatgcattgggtgcgccaggcgccgggcaaaggcctggaatggatt ggctatattaacccgagccgcggctataccaactataaccagaaagtgaaagatcgctttaccattagcaccgata aaagcaaaagcaccgcgtttctgcagatggatagcctgcgcccggaagataccgcggtgtattattgcgcgcgcta ttatgatgatcattattgcctggattattggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagcggcggtggcggatcc ggcggtggcggatccggcggtggcggatccgatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgg gcgatcgcgtgaccattacctgcagcgcgagcagcagcgtgagctatatgaactggtatcagcagaccccgggcaa agcgccgaaacgctggatttatgataccagcaaactggcgagcggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagc ggcaccgattatacctttaccattagcagcctgcagccggaagatattgcgacctattattgccagcagtggagca gcaacccgtttacctttggccagggcaccaaactgcagattacccgc(SEQ ID NO:387)

[1258] (氨基酸)

[1259] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRF TISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYY CQQWSSNPFTFGQGTKLQITR(SEQ ID NO:388)

[1260] 人源化抗CD3 scFV克隆OKT3(VH-VL)序列：

[1261] (DNA)

[1262] gatattcagatgacccagagcccgagcagcctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgaccattacctg cagcgcgagcagcagcgtgagctatatgaactggtatcagcagaccccgggcaaagcgccgaaacgctggatttat gataccagcaaactggcgagcggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatacctttacca ttagcagcctgcagccggaagatattgcgacctattattgccagcagtggagcagcaacccgtttacctttggcca gggcaccaaactgcagattacccgcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatcccaggtg cagctggtgcagagcggaggcggagtggtgcagcctggaagaagcctgcgcctgagctgcaaagcgagcggctata cctttacccgctataccatgcattgggtgcgccaggcgccgggcaaaggcctggaatggattggctatattaaccc gagccgcggctataccaactataaccagaaagtgaaagatcgctttaccattagcaccgataaaagcaaaagcacc gcgtttctgcagatggatagcctgcgcccggaagataccgcggtgtattattgcgcgcgctattatgatgatcatt attgcctggattattggggccagggcaccaccctgaccgtgagcagc(SEQ ID NO:389)

[1263] (氨基酸)

[1264] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGT DYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC KASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLRPEDTAVYYCAR

YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:390)

[1265] 人源化E6 scFV(VH-VL)序列：

[1266] (DNA)

[1267] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtc
tcaaccattagtggcggaggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagaga
taactatggccgcaactatgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcggcggt
ggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctt
tgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagag
gcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggc
agtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc
agcgtagcagctccccttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaa(SEQ ID NO:391)

[1268] (氨基酸)

[1269] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFA
VYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIK(SEQ ID NO:392)

[1270] 人源化E6 scFV(VL-VH)序列：

[1271] (DNA)

[1272] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctg
cagcgccaccagcagtgttagctacatccactggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctat
agcacctccaacctggccagcggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcacca
tcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcag
cggcaccaaagtggaaattaaaggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgaggtgcag
ctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacct
tcagtaggtatggcatgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtctcaaccattagtggcgg
aggcacctacatatactacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctg
tatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaact
atgattatggcatggattattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc(SEQ ID NO:393)

[1273] (氨基酸)

[1274] EIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGS
DYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA
ASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRD
NYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:394)

[1275] 人源化C2 scFV(VH-VL)序列：

[1276] (DNA)

[1277] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc

tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact tgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccggcggtggc ggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgt ctccaggacagagggccaccatcacctgcagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactg gtatcagcagaaaccaggacaacctcctaaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagcc aggttcagcggcagtgggtctgggaccgatttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaatt attactgtcagcacagtagggagctgcctttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO:395)

[1278] (氨基酸)

[1279] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA NDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:396)

[1280] 人源化E6 scFV(VL-VH)序列：

[1281] (DNA)

[1282] gacattgtgctgacccagtctccagcctccttggccgtgtctccaggacagagggccaccatcacctg cagagccagtaagagtgtcagtaccagcggatactcctacatgcactggtatcagcagaaaccaggacaacctcct aaactcctgatttacctggcatccaatctggagagcggggtcccagccaggttcageggcagtgggtctgggaccg atttcaccctcacaattaatcctgtggaagctaatgatactgcaaattattactgtcagcacagtagggagctgcc tttcacattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactggcggtggcggatccggcggtggcggatccggc ggtggcggatccgaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcct gtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtg ggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccccgactcagtgaagggccgattcaccatctccaga gacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcga gacttgggggggataattactacgaatacttcgatgtctggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctcc(SEQ ID NO:397)

[1283] (氨基酸)

[1284] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSG SGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:398)

[1285] G_4S_1接头序列：

[1286] (DNA)

[1287] ggcggtggcggatcc(SEQ ID NO:399)

[1288] (氨基酸)

[1289] GGGGS(SEQ ID NO:400)

[1290] $[G_4S_1]$x3接头序列：

[1291] (DNA)

[1292] ggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatcc(SEQ ID NO:401)

[1293] (氨基酸)

[1294] GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:402)

[1295] 8aa GS接头序列：

[1296] (DNA)

[1297] ggcggttccggcggtggatccgga(SEQ ID NO:403)

[1298] (氨基酸)

[1299] GGSGGGSG(SEQ ID NO:404)

[1300] 12aa GS接头序列：

[1301] (DNA)

[1302] ggcggttccggcggtggatccggcggtggcggatccgga(SEQ ID NO:405)

[1303] (氨基酸)

[1304] GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:406)

[1305] 13aa GS接头序列：

[1306] (DNA)

[1307] ggcggtggatccggcggtggcggatccggcggtggatcc(SEQ ID NO:407)

[1308] (氨基酸)

[1309] GGGSGGGGSGGGS(SEQ ID NO:408)

[1310] 22aa GS接头序列：

[1311] (DNA)

[1312] ggcggtggaagcggcggtggcggatccggcagcggcggaagcggcggtggcggatccggcggt gga (SEQ ID NO:409)

[1313] (氨基酸)

[1314] GGGSGGGGSGSGGSGGGGSGGG(SEQ ID NO:4110)

[1315] 24aa GS接头序列：

[1316] (DNA)

[1317] ggcggttccggcggtggatccggcggtggcggatccggaggcggttccggcggtggatccggcg gtggcggatccgga(SEQ ID NO:411)

[1318] (氨基酸)

[1319] GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:412)

[1320] 小鼠C3重链可变区序列：

[1321] (DNA)

[1322] caggtccagctgcagcagtctgggcctgagctggtgaggcctggggtctcagtgaagatttcctgcaa gggttccggctacagattcactgattatgctatgaactgggtgaagcagagtcatgcaaagagtctagagtggatt ggagttattagtactttctctggtaatacaaacttcaaccagaagtttaagggcaaggccacaatgactgtagaca aatcctccagcacagcctatatggaacttgccagattgacatctgaggattctgccatgtattactgtgcaagatc ggattactacggcccatactttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctca(SEQ ID NO:413)

[1323] (氨基酸)

[1324] QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYRFTDYAMNWVKQSHAK SLEWIGVISTFSGNTNFNQKFKGK

ATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDS AMYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:414)

[1325] 小鼠C3重链可变构架区1(FWR1)序列：

[1326] (DNA)

[1327] caggtccagctgcagcagtctgggcctgagctggtgaggcctggggtctcagtgaagatttcctgcaagggttccggctacagattcact(SEQ ID NO:415)

[1328] (氨基酸)

[1329] QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYRFT(SEQ ID NO:416)

[1330] 小鼠C3重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1331] (DNA)

[1332] gattatgctatgaac(SEQ ID NO:417)

[1333] (氨基酸)

[1334] DYAMN(SEQ ID NO:418)

[1335] 小鼠C3重链可变构架区2(FWR2)序列：

[1336] (DNA)

[1337] tgggtgaagcagagtcatgcaaagagtctagagtggattgga(SEQ ID NO:419)

[1338] (氨基酸)

[1339] WVKQSHAKSLEWIG(SEQ ID NO:420)

[1340] 小鼠C3重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1341] (DNA)

[1342] gttattagtactttctctggtaatacaaacttcaaccagaagtttaagggc(SEQ ID NO:421)

[1343] (氨基酸)

[1344] VISTFSGNTNFNQKFKG(SEQ ID NO:422)

[1345] 小鼠C3重链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[1346] (DNA)

[1347] aaggccacaatgactgtagacaaatcctccagcacagcctatatggaacttgccagattgacatctgaggattctgccatgtattactgtgcaaga(SEQ ID NO:423)

[1348] (氨基酸)

[1349] KATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAMYYCAR(SEQ ID NO:424)

[1350] 小鼠C3重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1351] (DNA)

[1352] tcggattactacggcccatactttgactac(SEQ ID NO:425)

[1353] (氨基酸)

[1354] SDYYGPYFDY(SEQ ID NO:426)

[1355] IGHV1-18＊04重链可变区序列：

[1356] (DNA)

[1357] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttaccagctacggtatcagctgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatggatggatcagcgcttacaatggtaacacaaactatgcacagaagctccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaga

(SEQ ID NO:427)

[1358] (氨基酸)

[1359] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQ GLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCAR(SEQ ID NO:428)

[1360] IGHV1-18＊04重链可变构架区1(FWR1)序列：

[1361] (DNA)

[1362] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgca aggcttctggttacacctttacc(SEQ ID NO:429)

[1363] (氨基酸)

[1364] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT(SEQ ID NO:430)

[1365] IGHV1-18＊04重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1366] (DNA)

[1367] agctacggtatcagc(SEQ ID NO:431)

[1368] (氨基酸)

[1369] SYGIS(SEQ ID NO:432)

[1370] IGHV1-18＊04重链可变构架区2(FWR2)序列：

[1371] (DNA)

[1372] tgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatggga(SEQ ID NO:433)

[1373] (氨基酸)

[1374] WVRQAPGQGLEWMG(SEQ ID NO:434)

[1375] IGHV1-18＊04重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1376] (DNA)

[1377] tggatcagcgcttacaatggtaacacaaactatgcacagaagctccagggc(SEQ ID NO:435)

[1378] (氨基酸)

[1379] WISAYNGNTNYAQKLQG(SEQ ID NO:436)

[1380] IGHV1-18＊04重链可变构架区3(FWR3)序列：

[1381] (DNA)

[1382] agagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatct gacgacacggccgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:437)

[1383] (氨基酸)

[1384] RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR(SEQ ID NO:438)

[1385] 人源化C3重链可变区序列：

[1386] (DNA)

[1387] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagc(SEQ ID NO:439)

[1388] (氨基酸)

[1389] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPG QGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGR VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:440)

[1390] 人源化C3重链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[1391] (DNA)

[1392] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgca aggcttctggttacacctttacc(SEQ ID NO:441)

[1393] (氨基酸)

[1394] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT(SEQ ID NO:442)

[1395] 人源化C3重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1396] (DNA)

[1397] gactacgccatgaac(SEQ ID NO:443)

[1398] (氨基酸)

[1399] DYAMN(SEQ ID NO:444)

[1400] 人源化C3重链可变构架区2(FWR2)酸序列：

[1401] (DNA)

[1402] tgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatggga(SEQ ID NO:445)

[1403] (氨基酸)

[1404] WVRQAPGQGLEWMG(SEQ ID NO:446)

[1405] 人源化C3重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1406] (DNA)

[1407] gtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggc(SEQ ID NO:447)

[1408] (氨基酸)

[1409] VISTFSGNTNFNQKFKG(SEQ ID NO:448)

[1410] 人源化C3重链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[1411] (DNA)

[1412] agagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatct gacgacacggccgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:449)

[1413] (氨基酸)

[1414] RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR(SEQ ID NO:450)

[1415] 人源化C3重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1416] (DNA)

[1417] agcgactactacggcccatacttcgactac(SEQ ID NO:451)

[1418] (氨基酸)

[1419] SDYYGPYFDY(SEQ ID NO:452)

[1420] 人源化C3 IgG1重链序列

[1421] (DNA)

[1422] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca

catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag
cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcgctagcaccaagggc
ccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaagg
actacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgt
cctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctccagcagcttgggcacccagacctac
atctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactc
acacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggga
caccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag
ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgt
accgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa
caaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcg
acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccga
cggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID
NO:453)

[1423] (氨基酸)

[1424] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
(SEQ ID NO:454)

[1425] 人源化C3 IgG2重链序列

[1426] (DNA)

[1427] caggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaa
ggcttctggttacacctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatg
ggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagaca
catccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaag
cgactactacggcccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcgcctccaccaagggc
ccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaagg
actacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgt
cctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctac
acctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcc
caccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat
ctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtac
gtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtca
gcgtcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctccc

agcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtgg agtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttctt cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa(SEQ IDNO:455)

[1428] (氨基酸)

[1429] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:456)

[1430] 人源化C3重链IgG1 gBLOCK序列：

[1431] (DNA)

[1432] tgetctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggcccaggttcagetggtgcagtctgga gctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttaccgactacgcca tgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttcagcggtaacacaaa cttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgagg agcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggcccatacttcgactactggg gccagggcaccaccctgaccgtgtccagcgctagcaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaa gagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgg aactcaggcgccctgaccagc(SEQ ID NO:457)

[1433] 小鼠C3轻链可变区序列：

[1434] (DNA)

[1435] gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttg cagatctagtcagaccattgtacatagtaatggaaacacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccagtct ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagtggcagtggatcaggga cagatttcacactcaagatcaacagagtggaggctgaggatctgggagtttattactgctttcaaggttcacatgt tccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaa(SEQ ID NO:458)

[1436] (氨基酸)

[1437] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQK PGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYY CFQGSHVPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID NO:459)

[1438] 小鼠C3轻链可变构架区1(FWR1)序列：

[1439] (DNA)

[1440] gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgc (SEQ ID NO:460)

[1441] (氨基酸)

[1442] DVLMTQTPLSLPVSLGDQAS ISC(SEQ ID NO:461)

[1443] 小鼠C3轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1444] (DNA)

[1445] agatctagtcagaccattgtacatagtaatggaaacacctatttagaa(SEQ ID NO:462)

[1446] (氨基酸)

[1447] RSSQTIVHSNGNTYLE(SEQ ID NO:463)

[1448] 小鼠C3轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[1449] (DNA)

[1450] tggtacctgcagaaaccaggccagtctccaaagctcctgatctac(SEQ ID NO:464)

[1451] (氨基酸)

[1452] WYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO:465)

[1453] 小鼠C3轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1454] (DNA)

[1455] aaagtttccaaccgattttct(SEQ ID NO:466)

[1456] (氨基酸)

[1457] KVSNRFS(SEQ ID NO:467)

[1458] 小鼠C3轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[1459] (DNA)

[1460] ggggtcccagacaggttcagtggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcaacagagtggaggctgaggatctgggagtttattactgc(SEQ ID NO:468)

[1461] (氨基酸)

[1462] GVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYC(SEQ ID NO:469)

[1463] 小鼠C3轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1464] (DNA)

[1465] tttcaaggttcacatgttccattcacg(SEQ ID NO:470)

[1466] (氨基酸)

[1467] FQGSHVPFT(SEQ ID NO:471)

[1468] IGKV2-29＊03轻链可变区序列：

[1469] (DNA)

[1470] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgcaagtctagtcagagcctcctgcatagtgatggaaagacctatttgtattggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctatgaagtttccagccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagecgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgcatgcaaggtatacacctcct(SEQ ID NO:472)

[1471] (氨基酸)

[1472] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKP GQSPQLLIYEVSSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGIHLP(SEQ ID NO:473)

[1473] IGKV2-29＊03轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[1474] (DNA)

[1475] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgc

(SEQ ID NO:474)

[1476] (氨基酸)

[1477] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC(SEQ ID NO:475)

[1478] IGKV2-29＊03轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1479] (DNA)

[1480] aagtctagtcagagcctcctgcatagtgatggaaagacctatttgtat(SEQ ID NO:476)

[1481] (氨基酸)

[1482] KSSQSLLHSDGKTYLY(SEQ ID NO:477)

[1483] IGKV2-29＊03轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[1484] (DNA)

[1485] tggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctat(SEQ ID NO:478)

[1486] (氨基酸)

[1487] WYLQKPGQSPQLLIY(SEQ ID NO:479)

[1488] IGKV2-29＊03轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1489] (DNA)

[1490] gaagtttccagccggttc(SEQ ID NO:480)

[1491] (氨基酸)

[1492] EVSSRFS(SEQ ID NO:481)

[1493] IGKV2-29＊03轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[1494] (DNA)

[1495] ggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagecgggtg gaggctgaggatgttggggtttattactgc(SEQ ID NO:482)

[1496] (氨基酸)

[1497] GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC(SEQ ID NO:483)

[1498] IGKV2-29＊03轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1499] (DNA)

[1500] atgcaaggtatacaccttcct(SEQ ID NO:484)

[1501] (氨基酸)

[1502] MQGIHLP(SEQ ID NO:485)

[1503] 人源化C3轻链可变区序列：

[1504] (DNA)

[1505] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctg caggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtct ccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcaggga cagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgcttccaaggtagccacgt gcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ ID NO:486)

[1506] (氨基酸)

[1507] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQGSHVPFTFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:487)

[1508] 人源化C3轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[1509] (DNA)

[1510] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgc (SEQ ID NO:488)

[1511] (氨基酸)

[1512] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC(SEQ ID NO:489)

[1513] 人源化C3轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1514] (DNA)

[1515] ggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggag(SEQ ID NO:490)

[1516] (氨基酸)

[1517] RSSQTIVHSNGNTYLE(SEQ ID NO:491)

[1518] 人源化C3轻链可变构架区2(FWR2)酸序列：

[1519] (DNA)

[1520] tggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctat(SEQ ID NO:492)

[1521] (氨基酸)

[1522] WYLQKPGQSPQLLIY(SEQ ID NO:493)

[1523] 人源化C3轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1524] (DNA)

[1525] aaggtttccaaccggttctct(SEQ ID NO:494)

[1526] (氨基酸)

[1527] KVSNRFS(SEQ ID NO:495)

[1528] 人源化C3轻链可变构架区3(FWR3)酸序列：

[1529] (DNA)

[1530] ggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtg gaggctgaggatgttggggtttattactgc(SEQ ID NO:496)

[1531] (氨基酸)

[1532] GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC(SEQ ID NO:497)

[1533] 人源化C3轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1534] (DNA)

[1535] ttccaaggtagccacgtgcctttcacc(SEQ ID NO:498)

[1536] (氨基酸)

[1537] FQGSHVPFT(SEQ ID NO:499)

[1538] 人源化C3λ轻链序列

[1539] (DNA)

[1540] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctg caggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtct ccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcaggga cagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgcttccaaggtagccacgt gcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactggtcagcccaaggctgccccctcggtcact

ctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgg gagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaecacaccctccaaaca aagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagc tgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggcccctacagaatgttcatagtaa(SEQ ID NO: 500)

[1541] (氨基酸)

[1542] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRTGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS**(SEQ ID NO:501)

[1543] 人源化C3κ轻链

[1544] (DNA)

[1545] gatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctg caggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtct ccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcaggga cagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgcttccaaggtagccacgt gcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactacggtggctgcaccatctgtcttcatcttc ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagg ccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaa ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc gaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttagtaa(SEQ ID NO: 502)

[1546] (氨基酸)

[1547] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRTTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (SEQ ID NO:503)

[1548] 人源化C3κ轻gBLOCK序列：

[1549] (DNA)

[1550] agctggctaggtaagcttggtaccgagctcggatccacgccaccatggagacagacacactcctgcta tgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgatattgtgatgacccagactccactctctctgtccg tcacccctggacagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctattt ggagtggtacctgcagaagccaggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtg ccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttg gggtttattactgettccaaggtagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaac tacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg tgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc

aacaggggagagtgttagtaagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgc(SEQ ID NO:504)

[1551] 小鼠C8重链可变区序列

[1552] (DNA)

[1553] gaagtgatggtcgtggaaagcggcggtggtctggtaaagccgggggggatcccttaagctttcttgcgccgcatccgggttcacgttctccggctatgccatgtcctgggtccgacagactcccgaaaagcgcttggaatgggtggccactatctcctccgggggggacgtacatctactaccccgacagtgtgaaaggaagatttacaatatctcgcgacaacgcaaaaaataccttgtatcttcaaatgagctccctgcggtcagaggacactgccatgtactattgcgcccgcctgggcggcgacaattactatgagtat(SEQ ID NO:505)

[1554] (氨基酸)

[1555] EVMVVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYAMSWVRQTPEK RLEWVATISSGGTYIYYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDT AMYYCARLGGDNYYEY(SEQ ID NO:506)

[1556] 小鼠C8重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1557] (DNA)

[1558] ggctatgccatgtcc(SEQ ID NO:507)

[1559] (氨基酸)

[1560] GYAMS(SEQ ID NO:508)

[1561] 小鼠C8重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1562] (DNA)

[1563] actatctcctccgggggggacgtacatctactaccccgacagtgtgaaagga(SEQ ID NO:509)

[1564] (氨基酸)

[1565] TISSGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:510)

[1566] 小鼠C8重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1567] (DNA)

[1568] ctgggcggcgacaattactatgagtat(SEQ ID NO:511)

[1569] (氨基酸)

[1570] LGGDNYYEY(SEQ ID NO:512)

[1571] IGHV3-21＊04重链可变区序列：

[1572] (DNA)

[1573] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatagcatgaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcatccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcga(SEQ ID NO:513)

[1574] (氨基酸)

[1575] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR(SEQ ID NO:514)

[1576] IGHV3-21＊04重链可变构架区1(FWR1)序列：

[1577] (DNA)

[1578] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:515)

[1579] (氨基酸)

[1580] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:516)

[1581] IGHV3-21＊04重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1582] (DNA)

[1583] agctatagcatgaac(SEQ ID NO:517)

[1584] (氨基酸)

[1585] SYSMN(SEQ ID NO:518)

[1586] IGHV3-21＊04重链可变构架区2(FWR2)序列：

[1587] (DNA)

[1588] tgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc(SEQ ID NO:519)

[1589] (氨基酸)

[1590] WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO:520)

[1591] IGHV3-21＊04重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1592] (DNA)

[1593] tcatccattagtagtagtagttacatatactacgcagactcagtgaagggc(SEQ ID NO:521)

[1594] (氨基酸)

[1595] SSISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:522)

[1596] IGHV3-21＊04重链可变构架区3(FWR3)序列：

[1597] (DNA)

[1598] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcga(SEQ ID NO:523)

[1599] (氨基酸)

[1600] RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:524)

[1601] 人源化C8重链可变区序列：

[1602] (DNA)

[1603] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctcc(SEQ ID NO:525)

[1604] (氨基酸)

[1605] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGK GLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:526)

[1606] 人源化C8重链可变构架区1(FWR1)序列：

[1607] (DNA)

[1608] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagt(SEQ ID NO:527)

[1609] (氨基酸)

[1610] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:528)

[1611] 人源化C8重链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1612] (DNA)

[1613] ggctatgccatgagc(SEQ ID NO:529)

[1614] (氨基酸)

[1615] GYAMS(SEQ ID NO:530)

[1616] 人源化C8重链可变构架区2(FWR2)序列：

[1617] (DNA)

[1618] tgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctca(SEQ ID NO:531)

[1619] (氨基酸)

[1620] WVRQAPGKGLEWVS(SEQ ID NO:532)

[1621] 人源化C8重链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1622] (DNA)

[1623] accattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggc(SEQ ID NO:533)

[1624] (氨基酸)

[1625] TISSGGTYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:534)

[1626] 人源化C8重链可变构架区3(FWR3)序列：

[1627] (DNA)

[1628] cgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgaga(SEQ ID NO:535)

[1629] (氨基酸)

[1630] RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:536)

[1631] 人源化C8重链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1632] (DNA)

[1633] ctgggcggcgataactattatgaatat(SEQ ID NO:537)

[1634] (氨基酸)

[1635] LGGDNYYEY(SEQ ID NO:538)

[1636] 人源化C8 IgG1重链序列

[1637] (DNA)

[1638] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagactgggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgctagcaccaagggcccatcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacagtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcaca

catgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacac
cctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtacc
gtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaa
agccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg
cccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagectgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca
tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg
ctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgataa(SEQ ID NO:
539)

[1639] (氨基酸)

[1640] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**
(SEQ ID NO:540)

[1641] 人源化C8 IgG2重链序列

[1642] (DNA)

[1643] gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgc
agcctctggattcaccttcagtggctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtc
tcaaccattagtagtggcggaacctacatatactaccctgactcagtgaagggccgattcaccatctccagagaca
acgccaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagact
gggcggcgataactattatgaatattggggcaaagggaccacggtcaccgtctcctccgcctccaccaagggccca
tcggtcttcccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggact
acttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcct
acagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacc
tgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcccac
cgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
ccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtg
gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcg
tcctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagc
ccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagt
gggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttcct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatagtaa(SEQ ID NO:541)

[1644] (氨基酸)

[1645] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**(SEQ ID NO:542)

[1646] 小鼠C8轻链可变区序列

[1647] (DNA)

[1648] gacatcgtcattacgcagacccctgccagtcttgccgtttctctgggccagagggccactatcagtta cagggcgagtaagtctgtgagtaccagcggctatagttacatgcattggaaccagcagaaaccgggacagccacca cgcctgcttatttatctggtgtctaatcttgagtccggggtgcccgccaggttcagcggcagcggctctgggaccg acttcacactcaacattcatccagtggaagaagaggacgctgctacatactactgtcaacacattcgggaactgac caggagtgaa(SEQ ID NO:543)

[1649] (氨基酸)

[1650] DIVITQTPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPG QPPRLLIYLVSNLESGVPARFS GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQH IRELTRSE(SEQ ID NO:544)

[1651] 小鼠C8轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1652] (DNA)

[1653] agggcgagtaagtctgtgagtaccagcggctatagttacatgcat(SEQ ID NO:545)

[1654] (氨基酸)

[1655] RASKSVSTSGYSYMH(SEQ ID NO:546)

[1656] 小鼠C8轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1657] (DNA)

[1658] ctggtgtctaatcttgagtcc(SEQ ID NO:547)

[1659] (氨基酸)

[1660] LVSNLES(SEQ ID NO:548)

[1661] 小鼠C8轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1662] (DNA)

[1663] caacacattcgggaactgaccaggagtgaa(SEQ ID NO:549)

[1664] (氨基酸)

[1665] QHIRELTRSE(SEQ ID NO:550)

[1666] NCBI生殖系z00023轻链可变区序列：

[1667] (DNA)

[1668] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactg caagtccagccagagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtaccagcagaaaccaggacag cctcctaagctgctcatttactgggcatctacccgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctg gacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatag tactcct(SEQ ID NO:551)

[1669] (氨基酸)

[1670] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTP(SEQ ID NO:552)

[1671] NCBI生殖系z00023轻链可变构架区1(FWR1)酸序列：

[1672] (DNA)

[1673] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactg c(SEQ ID NO:553)

[1674] (氨基酸)

[1675] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:554)

[1676] NCBI生殖系z00023轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1677] (DNA)

[1678] aagtccagccagagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagct(SEQ ID NO:555)

[1679] (氨基酸)

[1680] KSSQSVLYSSNNKNYLA(SEQ ID NO:556)

[1681] NCBI生殖系z00023轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[1682] (DNA)

[1683] tggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttac(SEQ ID NO:557)

[1684] (氨基酸)

[1685] WYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:558)

[1686] NCBI生殖系z00023轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1687] (DNA)

[1688] tgggcatctacccgggaatcc(SEQ ID NO:559)

[1689] (氨基酸)

[1690] WASTRES(SEQ ID NO:560)

[1691] NCBI生殖系z00023轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[1692] (DNA)

[1693] ggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca ggctgaagatgtggcagtttattactgt(SEQ ID NO:561)

[1694] (氨基酸)

[1695] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC(SEQ ID NO:562)

[1696] NCBI生殖系z00023轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1697] (DNA)

[1698] cagcaatattatagtactcct(SEQ ID NO:563)

[1699] (氨基酸)

[1700] QQYYSTP(SEQ ID NO:564)

[1701] 人源化C8轻链可变区序列

[1702] (DNA)

[1703] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactg cagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccagcagaaaccaggacagcctcct

aagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact(SEQ IDNO:565)

[1704] (氨基酸)

[1705] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ HIRELTRSEFGGGTKVEIKRT(SEQ ID NO:566)

[1706] 人源化C8轻链可变构架区1(FWR1)序列：

[1707] (DNA)

[1708] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgc(SEQ ID NO:567)

[1709] (氨基酸)

[1710] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:568)

[1711] 人源化C8轻链可变互补决定区1(CDR1)序列：

[1712] (DNA)

[1713] agggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatg(SEQ ID NO:569)

[1714] (氨基酸)

[1715] RASKSVSTSGYSYM(SEQ ID NO:570)

[1716] 人源化C8轻链可变构架区2(FWR2)序列：

[1717] (DNA)

[1718] cactggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttac(SEQ ID NO:571)

[1719] (氨基酸)

[1720] HWYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:572)

[1721] 人源化C8轻链可变互补决定区2(CDR2)序列：

[1722] (DNA)

[1723] ctggtgtctaacctggaatcc(SEQ ID NO:573)

[1724] (氨基酸)

[1725] LVSNLES(SEQ ID NO:574)

[1726] 人源化C8轻链可变构架区3(FWR3)序列：

[1727] (DNA)

[1728] ggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgt(SEQ ID NO:575)

[1729] (氨基酸)

[1730] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC(SEQ ID NO:576)

[1731] 人源化C8轻链可变互补决定区3(CDR3)序列：

[1732] (DNA)

[1733] caacacattcgggaactgaccaggagtgaa(SEQ ID NO:577)

[1734] (氨基酸)

[1735] QHIRELTRSE(SEQ ID NO:578)

[1736] 人源化C8λ轻链序列

[1737] (DNA)

[1738] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactg cagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccagcagaaaccaggacagcctcct aagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacag atttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgac caggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactggtcagcccaaggctgccccctcggtcact ctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccgg gagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaecacaccctccaaaca aagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagc tgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggcccctacagaatgttcatagtaa(SEQ ID NO: 579)

[1739] (氨基酸)

[1740] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRTGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS**(SEQ ID NO:580)

[1741] 人源化C8κ轻链序列

[1742] (DNA)

[1743] gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactg cagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgcactggtaccagcagaaaccaggacagcctcct aagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacag atttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcaacacattcgggaactgac caggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactacggtggctgcaccatctgtcttcatcttc ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagg ccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaa ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc gaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttagtaa(SEQ ID NO: 581)

[1744] (氨基酸)

[1745] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHIRELTRSEFGGGTKVEIKRTTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (SEQ ID NO:582)

[1746] 人源化C8κ轻链gBLOCK序列：

[1747] (DNA)

[1748] agctggctaggtaagcttggtaccgagctcggatccacgccaccatggagacagacacactcctgcta tgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctg tgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcagggccagcaagagtgttagcaccagcggctacagctacatgca ctggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttacctggtgtctaacctggaatccggggtccct

gaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcag
tttattactgtcaacacattcgggaactgaccaggagtgaattcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaac
tacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact
cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgttagtaagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgc(SEQ ID NO:
583)

[1749] CAR-T E6 CD8序列：

[1750] (DNA)

[1751] gaggtccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgc
cgcgagtggatttactttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtc
tcaacaatctccgggggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagaca
acgctaagaataccctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcga
caactatggcaggaactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggc
gggggcagcggaggaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtc
tctcacctggggaacgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacg
gcccgggcagtcccctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctgga
tctggttcaggttctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagc
agaggtctagctccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagacc
accaacgccagcccccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtgga
gctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgc
tcctcctctccctggtgattaccctgtactgctgataa(SEQ ID NO:584)

[1752] (氨基酸)

[1753] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEWVSTISGGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGSDYTLTISSLEPEDFA
VYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYC**(SEQ ID NO:585)

[1754] CAR-T C2 CD8序列：

[1755] (DNA)

[1756] gaagtgcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgc
cgcctcaggtttcacttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtg
tctactatcagctcaggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgaca
atgcaaagaactccctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcct
cggcggcgacaactactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggt
ggctcaggtggaggcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgt
ctcccggccaacgcgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactg
gtatcaacagaaaccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcg

cgcttttcagggagtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaatt
attattgtcaacattcccgggaactccccttttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgac
aaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgt
aggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcg
caggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgctgataa(SEQ ID NO:586)

[1757] (氨基酸)

[1758] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSP
ASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA
NDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY
IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC**(SEQ ID NO:587)

[1759] CD8/4-1BB序列

[1760] (DNA)

[1761] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag
accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt
tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgca
aaaaactccttacatttttaagcagcctttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatg
ccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgtgataa(SEQ ID NO:588)

[1762] (氨基酸)

[1763] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCEL**(SEQ ID NO:589)

[1764] CD8/CD28序列

[1765] (DNA)

[1766] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag
accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt
tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggt
ctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccccta
cgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcctgataa(SEQ ID NO:590)

[1767] (氨基酸)

[1768] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS**(SEQ ID NO:591)

[1769] CD8/CD3z序列：

[1770] (DNA)

[1771] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag
accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt
tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgccgcgttaagttct
cccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacggga
agagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaacccccag
gagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaagga

gacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatat
gcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ IDNO:592)

[1772] (氨基酸)

[1773] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**

[1774] (SEQ ID NO:593)

[1775] CD8/CD28/CD3z序列：

[1776] (DNA)

[1777] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag
accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt
tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggt
ctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccccta
cgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaag
cagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagag
gccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaaga
taagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttat
cagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ
ID NO:594)

[1778] (氨基酸)

[1779] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR**(SEQ IDNO:595)

[1780] CD8/4-1BB/CD3z序列：

[1781] (DNA)

[1782] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag
accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt
tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgca
aaaaactcctttacatttttaagcagccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatg
ccgctttcctgaggaggaggaaggagggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttac
aagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacgga
gaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaa
agataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctt
tatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa
(SEQ ID NO:596)

[1783] (氨基酸)

[1784] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD

VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR**(SEQ IDNO:597)

[1785] CD8/CD28/4-1BB/CD3z序列：

[1786] (DNA)

[1787] acgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgag accagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatt tgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggt ctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagcccta cgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtccaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcct tttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggt gcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacga gctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaag cctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgaga tcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaaga tacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:598)

[1788] (氨基酸)

[1789] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:599)

[1790] CAR-T C3 4-1BB/CD3z序列：

[1791] (DNA)

[1792] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccacaggt tcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggttac acctttaccgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagca ccttcagcggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcac agcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggc ccatacttcgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcggcggtggcggatccggcggtggcggat ccggcggtggcggatccgatattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctc catctcctgcaggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagcca ggccagtctccacagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcg ggtcagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgettccaagg tagccacgtgcctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactacgacaaccccggcccccaga ccaccaacgccagcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtg gagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagt gctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcagcct tttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggagggt gcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacga gctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaag

cctcgcaggaaaaacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgaga
tcggaatgaagggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaaga
tacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:600)

[1793] (氨基酸)

[1794] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMNWVRQAPGQGLEWMGVISTFSGNTNFNQKFKGRV
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSDYYGPYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLS
LSVTPGQPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
DVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALP PR**(SEQ ID NO:601)

[1795] C3 CAR gBLOCK 1序列：

[1796] (DNA)

[1797] atccacgctgttttgacctccatagaagattctagagctagctgtagagcttggtaccgagggccacc
atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccacaggttcagctgg
tgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctggttacacctttac
cgactacgccatgaactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggagtgatcagcaccttcagc
ggtaacacaaacttcaaccagaagttcaagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctaca
tggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaagcgactactacggcccatactt
cgactactggggccagggcaccaccctgaccgtgtccagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggt
ggcggatccgatattgtgatgacccagactccactctctctgt(SEQ ID NO:602)

[1798] C3 CAR gBLOCK 2序列：

[1799] (DNA)

[1800] tattgtgatgacccagactccactctctctgtccgtcacccctggacagccggcctccatctcctgca
ggtctagtcagaccattgtccatagtaatggaaacacctatttggagtggtacctgcagaagccaggccagtctcc
acagctcctgatctataaggtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggaca
gatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggggtttattactgettccaaggtagccacgtgc
ctttcaccttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactacgacaaccccggcccccagaccaccaacgcc
agcccccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcac
acaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtg(SEQ ID NO:603)

[1801] E6 scFV gBLOCK 1序列：

[1802] (DNA)

[1803] tgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctggg
ggaggcctggtcaagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaggtatggca
tgagctgggtccgccaggctccagggaagaggctggagtgggtctcaaccattagtggcggaggcacctacatata
ctacccagactcagtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacaccctgtatctgcaaatgaac
agcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtaccagagataactatggccgcaactatgattatggcatgg
attattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagcggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtgg
cggatcc(SEQ ID NO:604)

[1804] E6 scFV gBLOCK 2序列：

[1805] (DNA)

[1806] ggcggtggcggatccggcggtggcggatccggcggtggcggatccgaaattgtgttgacacagtctcc
agccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctcacctgcagcgccaccagcagtgttagctacatccac
tggtaccaacagaggcctggccagagccccaggctcctcatctatagcacctccaacctggccagcggcatcccag
ccaggttcagtggcagtgggtctgggagcgactacactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagt
ttattactgtcagcagcgtagcagctccccttcacctttggcagcggcaccaaagtggaaattaaaaccggtcat
catcaecatcaccactgataagtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagt(SEQ ID NO:605)

[1807] CAR-T C2 CD3z序列：

[1808] (DNA)

[1809] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagt
gcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttc
acttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagct
caggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactc
cctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaac
tactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggag
gcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacg
cgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaa
ccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcaggga
gtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaaca
ttcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccc
agaccaccaacgccagecccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccg
gtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtgg
agtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgccgcgttaagttctcccgatcagecgacgcgcctgcttac
aagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatetcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacgga
gaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaa
agataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctt
tatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa
(SEQ ID NO:606)

[1810] (氨基酸)

[1811] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW
VSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP
ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR**(SEQ ID NO:607)

[1812] CAR-T C2 CD28/CD3z序列：

[1813] (DNA)

[1814] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagt
gcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttc
acttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagct
caggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactc
cctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaac
tactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggag
gcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacg
cgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaa
ccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcaggga
gtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaaca
ttcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccc
agaccaccaacgccageccccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccg
gtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtgg
agtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatg
aacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcct
accggtcccgcgttaagttctcccgatcagecgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacga
gctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaag
cctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgaga
tcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaaga
tacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:608)

[1815] (氨基酸)

[1816] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW
VSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP
ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:609)

[1817] CAR-T C2 4-1BB/CD3z序列：

[1818] (DNA)

[1819] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagt
gcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttc
acttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagct
caggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactc
cctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaac
tactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggag
gcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacg
cgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaa
ccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcaggga

gtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaaca
ttcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccc
agaccaccaacgccagecccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccg
gtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtgg
agtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcaaaaggggccgcaaaaaactcctttacatttttaagcag
ccttttatgaggccagtacagacgactcaagaggaagacgggtgctcatgccgctttcctgaggaggaggaaggag
ggtgcgaactgcgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaa
cgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggc
aagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcg
agatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaa
agatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:610)

[1820] (氨基酸)

[1821] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW
VSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP
ARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP
EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:611)

[1822] CAR-T C2 OX40/CD3z序列：

[1823] (DNA)

[1824] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagt
gcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttc
acttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagct
caggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactc
cctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaac
tactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggag
gcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacg
cgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaa
ccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcaggga
gtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaaca
ttcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccc
agaccaccaacgccagecccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccg
gtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtgg
agtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgccggagggaccagaggctgccccccgatgcccacaagccc
cctgggggaggcagtttccggacccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccaccctggccaagatccgcg
ttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcgg
tagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaa
aacccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaagg

gggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgcctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:612)

[1825] (氨基酸)

[1826] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:613)

[1827] CAR-T C2 CD28/OX40/CD3z序列：

[1828] (DNA)

[1829] atggccttgccagtgacggccctgctgctgccattggctcttctgttgcacgctgccaggcctgaagtgcagctcgtagagagtggcgggggactggtgaagcccggtggaagcctcagactcagttgcgccgcctcaggtttcacttttcaggttacgccatgtcctgggtaagacaggcaccggggaaaggactcgagtgggtgtctactatcagctcaggaggcacttatatatattatcctgactctgtaaaaggccgatttacgatttctcgcgacaatgcaaagaactccctctacctccaaatgaacagtcttagggcagaagacactgctgtatactattgtgcacgcctcggcggcgacaactactacgagtactttgacgtgtgggggaaagggactaccgtgacagtttcaagcggaggaggtggctcaggtggaggcgggtcaggggggggaggaagtgatattgtgctcacacaatccccagcctccctggctgtgtctcccggccaacgcgctacaattacatgtcgggcctccaaaagcgtgagcaccagcggctacagctacatgcactggtatcaacagaaaccaggacaaccccccaaactgttgatttatctcgcttcaaacttggagtccggcgtgcctgcgcgcttttcagggagtgggagcggcacagattttacgctgactatcaaccccgtagaagcaaacgatacagcgaattattattgtcaacattcccgggaactccccttacgttcggcgggggcacaaaggtcgaaattaagagaaccacgacaaccccggccccccagaccaccaacgccagecccaccatcgccagecaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaagaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccctggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaagaccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcccggagggaccagaggctgcccccgatgcccacaagccccctgggggaggcagtttccggacccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccaccctggccaagatccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:614)

[1830] (氨基酸)

[1831] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGGDNYYEYFDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRELPFTFGGGTKVEIKRTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA

CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
RDFAAYRSRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR**(SEQ ID NO:615)

[1832] CAR-T E6 OX40/CD3z序列：

[1833] (DNA)

[1834] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg
gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
ccccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaaccccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgetcctcctctccct
ggtgattaccctgtactgccggagggaccagaggctgccccccgatgcccacaagccccctgggggaggcagtttc
cggacccccatccaagaggagcaggccgacgcccactccaccctggccaagatccgcgttaagttctcccgatcag
ccgacgcgcctgcttacaagcagggccagaaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacga
cgtgttggacaaacggagaggccgcgacccagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactg
tacaatgagttgcagaaagataagatggcagaagcttatagcgagatcggaatgaaggggggaaaggagacgaggga
aaggacacgacggcctttatcagggcctgtccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcact
tccaccacggtgataa(SEQ ID NO:616)

[1835] (氨基酸)

[1836] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV
KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**(SEQ ID NO:617)

[1837] CAR-T E6 CD28/OX40/CD3z序列：

[1838] (DNA)

[1839] atggccctgcccgtgaccgctttgctgctccccctggcgctgctgctgcacgccgccaggccagaggt
ccagctggttgagagtggcggtgggctggttaagcctggcggctccctgcggctgagctgcgccgcgagtggattt
actttcagccgatatgggatgagttgggtgcggcaagctcccgggaagaggctggaatgggtctcaacaatctccg

gggggggcacttacatctattaccccgactcagtcaaggggagatttaccatttcacgagacaacgctaagaatac
cctgtatttgcagatgaattctctgagagcagaggacacagctgtttactattgtacccgcgacaactatggcagg
aactacgactacggtatggactattggggacaagggacattggttacagtgagcagtggcggcgggggcagcggag
gaggaggcagcggtgggggggggcagcgagatagtgctcacgcagtcacccgcgactctcagtctctcacctgggga
acgagctaccctgacgtgctctgctacctcctcagtgtcatatattcactggtatcagcaacggcccgggcagtcc
cctagattgctcatttatagtacctctaatctggcctcaggtatccctgcacgattttctggatctggttcaggtt
ctgattacaccctcactatctctagcctggagcctgaagactttgccgtttattactgccagcagaggtctagctc
ccattcacctttgggagtgggaccaaggttgaaattaaaacgacaaccccggcccccagaccaccaacgccagcc
cccaccatcgccagccaacccctgtctctgagaccagaagcctgtaggcctgccgccggtggagctgtgcacacaa
gaggactggatttcgcctgtgatatctacatttgggccccgctcgcaggcacatgtggagtgctcctcctctccct
ggtgattaccctgtactgcagaagcaagcggtctcggctcctgcattctgattacatgaacatgaccccaagaaga
ccaggccccaccaggaaacattaccagccctacgctccgccacgcgacttcgctgcctaccggtcccggagggacc
agaggctgccccccgatgcccacaagccccctgggggaggcagtttccggacccccatccaagaggagcaggccga
cgcccactccaccctggccaagatccgcgttaagttctcccgatcagccgacgcgcctgcttacaagcagggccag
aaccaactgtacaacgagctgaatctcggtagacgggaagagtacgacgtgttggacaaacggagaggccgcgacc
cagaaatgggcggcaagcctcgcaggaaaaaccccccaggagggactgtacaatgagttgcagaaagataagatggc
agaagcttatagcgagatcggaatgaaggggaaaggagacgagggaaaggacacgacggcctttatcagggcctg
tccacagcaacaaaagatacgtatgacgccctccatatgcaggcacttccaccacggtgataa(SEQ ID NO:
618)

[1840] (氨基酸)

[1841] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKRLEW
VSTISGGGTYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNYGRNYDYGMDYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLTCSATSSVSYIHWYQQRPGQSPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSSPFTFGSGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**
(SEQ ID NO:619)

[1842] MUC1截短的细胞质序列

[1843] (氨基酸)

[1844] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:620)

[1845] MUC1截短的细胞质序列

[1846] (氨基酸)

[1847] SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID NO:621)

[1848] MUC1截短的细胞质序列

[1849] (氨基酸)

[1850] VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID NO:622)

[1851] MUC1截短的细胞质序列

[1852] (氨基酸)

[1853] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)

[1854] 引物

[1855] attctaagcttgggccaccatggaactg(SEQ ID NO:624)

[1856] tctagagtttaaacttactatttacccggagacagggagag(SEQ ID NO:625)

[1857] agtatggcccagccggccgaggtgcagctggtggagtctgg(SEQ ID NO:626)

[1858] tagaaggcacagtcgaggctgatcag(SEQ ID NO:627)

[1859] attctaagcttgggccaccatggaagc(SEQ ID NO:628)

[1860] tctagagtttaaacttactaacactctcccctgttgaagc(SEQ ID NO:629)

[1861] agtatggcccagccggccgaaattgtgttgacacagtctccag(SEQ ID NO:630)

[1862] tagaaggcacagtcgaggctgatcag(SEQ ID NO:631)

[1863] actgtcatatggaggtgcagctggtggagtctg(SEQ ID NO:632)

[1864] actgtctcgagtttaatttccactttggtgccgctgc(SEQ ID NO:633)

[1865] actgtcatatggaggtgcagctggtggagtctg(SEQ ID NO:634)

[1866] actgtaccggttttaatttccactttggtgccgctgc(SEQ ID NO:635)

[1867] cttcttcctcaggagcaagctcaccgtgg(SEQ ID NO:636)

[1868] gagccgtcggagtccagc(SEQ ID NO:637)

[1869] gcacctgaactcctgggg(SEQ ID NO:638)

[1870] tttaatttccactttggtgccg(SEQ ID NO:639)

[1871] cgcggctagcttaagcttggtaccgagggcca(SEQ ID NO:640)

[1872] cgcggcggccgcctgatcagcgggtttaaacttatc(SEQ ID NO:641)

[1873] 本发明的范围不限于这里描述的具体实施方式。确实,除这里描述的那些改进之外,依据前面的描述和附图,本发明的各种改进对于本领域技术人员而言将变得显而易见的。这样的改进旨在属于所附权利要求的范围。通过说明本发明而非限制的方式来提供以下实施例。

[1874] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[1875] 1.一种人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,结合至没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域上的区。

[1876] 2.根据实施方式1所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,所述人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白特异性地结合至

[1877] (i)MUC1的PSMGFR区;

[1878] (ii)PSMGFR肽;

[1879] (iii)具有以下氨基酸序列的肽

[1880] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASR

[1881] Y(SEQ ID NO:620);

[1882] (iv)具有以下氨基酸序列的肽

[1883] SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ

[1884] ID NO:621);

[1885] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID

[1886] NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[1887] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)

[1888] 的氨基酸序列的肽。

[1889] 3.根据实施方式1所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1890] 4.根据实施方式1所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1891] Fc。

[1892] 5.根据实施方式1所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白,包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区源自小鼠单克隆MN-E6抗体,并且与所述小鼠单克隆MN-E6抗体具有至少80%、90%或95%或98%的序列同一性。

[1893] 6.根据实施方式5所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白,其中,所述重链可变区与SEQ ID NO:13具有至少90%或95%或

[1894] 98%的序列同一性并且所述轻链可变区与SEQ ID NO:66具有至少

[1895] 90%或95%或98%的序列同一性。

[1896] 7.根据实施方式5所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白,包含所述重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR),所述互补决定区与具有以下序列的CDR1、CDR2或CDR3区具有至少

[1897] 90%或95%或98%的序列同一性:

[1898] CDR1重链SEQ ID NO:17

[1899] CDR1轻链SEQ ID NO:70,

[1900] CDR2重链SEQ ID NO:21

[1901] CDR2轻链SEQ ID NO:74,

[1902] CDR3重链SEQ ID NO:25

[1903] CDR3轻链SEQ ID NO:78。

[1904] 8.根据实施方式5所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1905] 9.根据实施方式5所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1906] Fc。

[1907] 10.根据实施方式1所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白,包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区源自小鼠单克隆MN-C2抗体,并且与所述小鼠单克隆MN-C2抗体具有至少80%、90%或95%或98%的序列同一性。

[1908] 11.根据实施方式10所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白,其中,所述重链可变区与SEQ ID NO:119具有至少90%或95%或

[1909] 98%的序列同一性并且所述轻链可变区与SEQ ID NO:169具有至少90%或95%或98%的序列同一性。

[1910] 12.根据实施方式10所述的抗体,包含所述重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR),所述互补决定区与具有以下序列的CDR1、

[1911] CDR2或CDR3区具有至少90%或95%或98%的序列同一性:

[1912] CDR1重链SEQ ID NO:123

[1913] CDR1轻链SEQ ID NO:173，

[1914] CDR2重链SEQ ID NO:127

[1915] CDR2轻链SEQ ID NO:177，

[1916] CDR3重链SEQ ID NO:131

[1917] CDR3轻链SEQ ID NO:181。

[1918] 13.根据实施方式10所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1919] 14.根据实施方式10所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1920] Fc。

[1921] 15.根据实施方式1所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白，包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区源自小鼠单克隆MN-C3抗体，并且与所述小鼠单克隆MN-C3抗体具有至少80％、90％或95％或98％的序列同一性。

[1922] 16.根据实施方式15所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白，其中，所述重链可变区与SEQ ID NO:414具有至少90％或95％或98％的序列同一性并且所述轻链可变区与SEQ ID NO:459具有至少90％或95％或98％的序列同一性。

[1923] 17.根据实施方式15所述的抗体，包含所述重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR)，所述互补决定区与具有以下序列的CDR1、

[1924] CDR2或CDR3区具有至少90％或95％或98％的序列同一性：

[1925] CDR1重链SEQ ID NO:418

[1926] CDR1轻链SEQ ID NO:463，

[1927] CDR2重链SEQ ID NO:422

[1928] CDR2轻链SEQ ID NO:467，

[1929] CDR3重链SEQ ID NO:426，

[1930] CDR3轻链SEQ ID NO:471。

[1931] 18.根据实施方式15所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1932] 19.根据实施方式15所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1933] Fc。

[1934] 20.根据实施方式1所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白，包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区源自小鼠单克隆MN-C8抗体，并且与所述小鼠单克隆MN-C8抗体具有至少80％、90％或95％或98％的序列同一性。

[1935] 21.根据实施方式20所述的人或人源化抗体、抗体片段或抗体样蛋白，其中，所述重链可变区与SEQ ID NO:506具有至少90％或95％或98％的序列同一性并且所述轻链可变区与SEQ ID NO:544具有至少90％或95％或98％的序列同一性。

[1936] 22.根据实施方式20所述的抗体，包含所述重链可变区和轻链可变区中的互补决定区(CDR)，所述互补决定区与具有以下序列的CDR1、

[1937] CDR2或CDR3区具有至少90％或95％或98％的序列同一性：

[1938] CDR1重链SEQ ID NO:508

[1939] CDR1轻链SEQ ID NO:546，

[1940] CDR2重链SEQ ID NO:510

[1941] CDR2轻链SEQ ID NO:548，

[1942] CDR3重链SEQ ID NO:512，

[1943] CDR3轻链SEQ ID NO:550。

[1944] 23.根据实施方式20所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1945] 24.根据实施方式20所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白，其中，人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1946] Fc。

[1947] 25.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化κ轻链或人源化λ轻链配对的人源化IgG2重链或人源化IgG1重链表示的人源化MN-

[1948] E6的序列组成。

[1949] 26.根据实施方式25所述的抗体，其中，所述人源化IgG2重链是SEQ

[1950] ID NO:53，所述人源化IgG1重链是SEQ ID NO:57，所述人源化κ

[1951] 轻链是SEQ ID NO:108，并且所述人源化λ轻链是SEQ ID NO:112，或与它们具有90％、95％或98％序列同一性的序列。

[1952] 27.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化λ轻链、以及人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链、人源化IgG2重链表示的人源化MN-C2的序列组成。

[1953] 28.根据实施方式27所述的抗体，其中，人源化IgG1重链MN-C2

[1954] (SEQ ID NO:159)或IgG2重链(SEQ ID NO:164)与下述配对：

[1955] λ轻链(SEQ ID NO:219)或κ轻链(SEQ ID NO:213)、或与它们具有90％、95％或98％序列同一性的序列。

[1956] 29.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-

[1957] C3的序列组成。

[1958] 30.根据实施方式29所述的抗体，其中，人源化MN-C3 IgG1重链是SEQ ID NO:454，IgG2重链是SEQ ID NO:456，λ轻链是SEQ ID

[1959] NO:501，并且κ轻链是SEQ ID NO:503，或与它们具有90％、95％

[1960] 或98％序列同一性的序列。

[1961] 31.一种抗MUC1*胞外结构域抗体，由与人源化λ轻链或人源化κ轻链配对的人源化IgG1重链或人源化IgG2重链表示的人源化MN-

[1962] C8的序列组成。

[1963] 32.根据实施方式31所述的抗体，其中，人源化MN-C8 IgG1重链是SEQ ID NO:540，IgG2重链是SEQ ID NO:542，λ轻链是SEQ ID NO:580，并且κ轻链是SEQ ID NO:582，或与它们具有90％、95％

[1964] 或98％序列同一性的序列。

[1965] 33.根据实施方式1所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,抑制NME蛋白结合至MUC1*。

[1966] 34.根据实施方式33所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,所述NME是NME7或NME1。

[1967] 35.根据实施方式33所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,所述NME是NME6或NME8。

[1968] 36.根据实施方式33所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM。

[1969] 37.根据实施方式33所述的人或人源化抗MUC1*抗体或抗体片段或抗体样蛋白,其中,人或人源化抗体片段或抗体样蛋白是scFv或scFv-

[1970] Fc。

[1971] 38.一种包含通过接头连接的重链可变区和轻链可变区的单链可变片

[1972] 段(scFv),进一步包含结合至MUC1*胞外结构域的抗体的CDR。

[1973] 39.根据实施方式38所述的scFv,其中,抗MUC1*抗体的CDR源自MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8抗体。

[1974] 40.根据实施方式39所述的scFv,其中,所述抗MUC1*抗体的CDR

[1975] 源自人源化MN-E6、MN-C2、MN-C3或MN-C8抗体。

[1976] 41.根据实施方式38所述的scFv,选自SEQ ID NO:233、235和237

[1977] (E6)的组。

[1978] 42.根据实施方式38所述的scFv,选自SEQ ID NO:239、241、和243

[1979] (C2)的组。

[1980] 43.根据实施方式38所述的scFv,选自SEQ ID NO:245、247、和249

[1981] (C3)的组。

[1982] 44.根据实施方式38所述的scFv,选自SEQ ID NO:251、253、和255

[1983] (C8)的组。

[1984] 45.一种嵌合抗原受体(CAR),包含结合至没有串联重复序列的MUC1的胞外结构域的人源化可变区或scFv、接头分子、跨膜结构域和细胞质结构域。

[1985] 46.根据实施方式45所述的CAR,其中,单链抗体片段结合至

[1986] (i)MUC1的PSMGFR区,

[1987] (ii)PSMGFR肽,

[1988] (iii)具有以下氨基酸序列的肽

[1989] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASR

[1990] Y(SEQ ID NO:620);

[1991] (iv)具有以下氨基酸序列的肽

[1992] SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ

[1993] ID NO:621);

[1994] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID

[1995] NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[1996] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)

[1997] 的氨基酸序列的肽。

[1998] 47.根据实施方式46所述的CAR,包含在所述胞外结构域中的实施方式25至32中阐述的任何可变区的部分或它们的组合、跨膜区和胞质尾区,所述胞质尾区包含信号免疫系统激活的序列基序。

[1999] 48.根据实施方式45所述的CAR,其中,所述胞外结构域由MN-E6

[2000] scFv、MN-C2 scFv、MN-C3 scFv或MN-C8 scFv的人源化单链抗体片段组成。

[2001] 49.根据实施方式48所述的CAR,其中,所述胞外结构域由阐述为SEQ ID NO:233、235、或237)的MN-E6 scFv、MN-C2 scFv(SEQ

[2002] ID NO:239、241、或243)、MN-C3 scFv(SEQ ID NO:245、247、或249)或MN-C8 scFv(SEQ ID NO:251、253、或255)的人源化单链抗体片段组成。

[2003] 50.根据实施方式45所述的CAR,其中,所述胞质尾区由信令序列基序CD3-ζ、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICAm-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD5、或CD7中的一种或多种组成。

[2004] 51.根据实施方式45所述的CAR,其中,它的序列是CARMN-E6 CD3z

[2005] (SEQ ID NO:295)、CARMN-E6 CD28/CD3z(SEQ ID NO:298)、CARMN-E6 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:301)、CARMN-E6

[2006] OX40/CD3z(SEQ ID NO:617)、CARMN-E6 CD28/4-1BB/CD3z(SEQ

[2007] ID NO:304)、CARMN-E6 CD28/OX40/CD3z(SEQ ID NO:619)、

[2008] CAR MN-C2 CD3z(SEQ ID NO:607)、CAR MN-C2 CD28/CD3z

[2009] (SEQ ID NO:609)、CAR MN-C2 4-1BB/CD3z(SEQ ID NO:611)、CAR MN-C2 OX40/CD3z(SEQ ID NO:613)、CAR MN-C2 CD28/4-

[2010] 1BB/CD3z(SEQ ID NO:307)、或CAR MN-C2 CD28/OX40/CD3z

[2011] (SEQ ID NO:615)。

[2012] 52.一种包含CAR的细胞,所述CAR具有结合至MUC1*转染或转导的细胞的胞外结构域。

[2013] 53.根据实施方式52所述的细胞,其中,所述包含CAR的细胞是免疫系统细胞。

[2014] 54.根据实施方式53所述的细胞,其中,包含所述CAR的所述免疫系统细胞是T细胞。

[2015] 55.根据实施方式53所述的细胞,其中,包含所述CAR的所述免疫系统细胞是树突状细胞。

[2016] 56.根据实施方式53所述的细胞,其中,包含所述CAR的所述免疫系统细胞是肥大细胞。

[2017] 57.一种CAR分子,其中,胞外结构域单元识别肽。

[2018] 58.根据实施方式57所述的CAR分子,其中,所述肽是PSMGFR(SEQ ID NO:2)。

[2019] 59.根据实施方式57所述的CAR分子,其中,所述肽是源自NME7的肽。

[2020] 60.根据实施方式59所述的CAR分子,其中,所述肽是

[2021] NME7A肽1(A结构域):MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID NO:7);

[2022] NME7A肽2(A结构域):SGVARTDASES(SEQ ID NO:8);

[2023] NME7B肽1(B结构域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(SEQ ID NO:9);

[2024] NME7B肽2(B结构域):EVYKGVVTEYHDMVTE(SEQ ID NO:10);或

[2025] NME7B肽3(B结构域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLE VQYFF(SEQ ID NO:11)。

[2026] 61.一种包含至少两种CAR的组合物,所述CAR具有转染至相同细胞中的不同胞外结构域单元。

[2027] 62.一种包含至少两种CAR的组合物,所述CAR具有转染至相同细胞中的不同胞外结构域单元,其中一种CAR不具有靶向识别单元而另一种CAR具有靶向识别单元。

[2028] 63.根据实施方式61所述的包含至少两种CAR的组合物,其中,胞外结构域识别单元之一结合至MUC1*胞外结构域。

[2029] 64.根据实施方式61所述的包含至少两种CAR的组合物,其中,胞外结构域识别单元之一结合PD-1。

[2030] 65.根据实施方式61所述的包含至少两种CAR的组合物,其中,胞外结构域识别单元之一是抗体片段并且另一种是肽。

[2031] 66.根据实施方式61所述的包含至少两种CAR的组合物,其中,一种是选自由MN-E6抗体的scFv、MN-C2抗体的scFv、MN-C3抗体的scFv或MN-C8抗体的scFv组成的组的抗MUC1* scFv,并且另一种是肽,所述肽源自NME7或选自由下述组成的组

[2032] NME7A肽1(A结构域):MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID

[2033] NO:7);

[2034] NME7A肽2(A结构域):SGVARTDASES(SEQ ID NO:8);

[2035] NME7B肽1(B结构域):DAGFEISAMQMFNMDRVNVE(SEQ

[2036] ID NO:9);

[2037] NME7B肽2(B结构域):EVYKGVVTEYHDMVTE(SEQ ID

[2038] NO:10);以及

[2039] NME7B肽3(B结构域):AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDG

[2040] LLEVQYFF(SEQ ID NO:11)。

[2041] 67.根据实施方式1所述的抗体,所述抗体是工程化抗体样蛋白。

[2042] 68.一种针对结合至以下的那些来筛选人的抗体或抗体片段的库的方法,

[2043] (i)PSMGFR肽;

[2044] (ii)具有以下氨基酸序列的肽

[2045] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASR

[2046] Y(SEQ ID NO:620);

[2047] (iii)具有下述氨基酸序列的肽

[2048] SVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ

[2049] ID NO:621);

[2050] (iv)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID

[2051] NO:622)的氨基酸序列的肽;

[2052] (v)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)的氨基酸序列的肽;

[2053] (vi)NME7蛋白;或

[2054] (vii)NME7蛋白的肽片段。

[2055] 69.一种用于治疗受试者中的疾病的方法,包括将根据以上任一项实施方式所述

的抗体给予患有所述疾病的人，其中所述受试者异常地表达MUC1。

[2056] 70.根据实施方式69所述的方法，其中，所述疾病是癌症。

[2057] 71.一种用于治疗受试者中的疾病的方法，包括将NME肽给予患有所述疾病的人，其中所述受试者异常地表达MUC1。

[2058] 72.一种增殖或扩增干细胞群体的方法，包括使所述细胞与根据以上任一项实施方式所述的抗体接触。

[2059] 73.一种促进干细胞附着至表面的方法，包括用人源化MN-C3或MN-

[2060] C8抗体、它们的抗体片段或单链抗体涂覆所述表面以及使干细胞接触所述表面。

[2061] 74.一种体外或体内递送干细胞的方法，包括以下步骤：用人源化MN-

[2062] C3或MN-C8抗体、它们的抗体片段或单链抗体涂覆表面，使所述干细胞接触所述表面以及将所述干细胞递送到特定位置。

[2063] 75.一种分离干细胞的方法，包括以下步骤：用人源化MN-C3或MN-

[2064] C8抗体、它们的抗体片段或单链抗体涂覆表面，使混合细胞群体接触所述表面以及分离干细胞。

[2065] 76.一种包含可变结构域片段的scFv，所述可变结构域片段源自结合至没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域的抗体。

[2066] 77.根据实施方式75所述的scFv，其中，所述可变结构域片段源自小鼠单克隆抗体MN-E6(SEQ ID NO:13和66)或源自人源化MN-

[2067] E6(SEQ ID NO:39和94)、或源自MN-E6 scFv(SEQ ID NO:233、

[2068] 235和237)。

[2069] 78.根据实施方式75所述的scFv，其中，所述可变结构域片段源自小鼠单克隆抗体MN-C2(SEQ ID NO:119和169)或源自人源化MN-

[2070] C2(SEQ ID NO:145和195)、或源自MN-C2 scFv(SEQ ID NO:

[2071] 239、241和243)。

[2072] 79.根据实施方式75所述的scFv，其中，所述可变结构域片段源自小鼠单克隆抗体MN-C3(SEQ ID NO:414和459)或源自所述人源化MN-C3(SEQ ID NO:440和487)、或源自MN-C3 scFv(SEQ ID NO:245、247和249)。

[2073] 80.根据实施方式75所述的scFv，其中，所述可变结构域片段源自小鼠单克隆抗体MN-C8(SEQ ID NO:505和544)或源自所述人源化MN-C8(SEQ ID NO:526和566)、或源自MN-C8 scFv(SEQ ID NO:251、253、255)。

[2074] 81.一种用于治疗诊断有、怀疑有或处于发展MUC1或MUC1*阳性癌症的风险的人的方法，包括向所述人给予有效量的在实施方式76至80任一项中描述的scFv。

[2075] 82.一种scFv-Fc构建体，包含根据实施方式76至80所述的scFv。

[2076] 83.根据实施方式82所述的scFv-Fc构建体，所述构建体是二聚化的。

[2077] 84.根据实施方式82所述的scFv-Fc构建体，其中，使Fc组分突变以使scFv-Fc是单体的。

[2078] 85.根据实施方式84所述的scFv-Fc构建体，其中，所述突变包括将Fc上的铰链区突变或删除，在由SEQ ID NO:281、279、285和287

[2079] 表示的Fc上制备F405Q、Y407R、T366W/L368W、和T364R/L368R

[2080] 突变或它们的组合。

[2081] 86.一种包含至少两种不同scFv序列的多肽,其中,所述scFv序列之一是结合至没有串联重复结构域的MUC1同种型或切割产物的胞外结构域的序列。

[2082] 87.根据实施方式86所述的多肽,其中,所述多肽结合至

[2083] (i)MUC1的PSMGFR区;

[2084] (ii)PSMGFR肽;

[2085] (iii)具有以下氨基酸序列的肽

[2086] SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASR

[2087] Y(SEQ ID NO:620);

[2088] (iv)具有以下氨基酸序列的肽

[2089] VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRY(SEQ ID

[2090] NO:621);

[2091] (v)具有VQLTLAFREGTINVHDVETQFNQY(SEQ ID

[2092] NO:622)的氨基酸序列的肽;或

[2093] (vi)具有SNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTIN(SEQ ID NO:623)

[2094] 的氨基酸序列的肽。

[2095] 88.根据实施方式86所述的多肽,其中,所述多肽结合至免疫细胞上的受体。

[2096] 89.根据实施方式88所述的多肽,其中,所述多肽结合至T细胞上的受体。

[2097] 90.根据实施方式89所述的多肽,其中,所述多肽结合至T细胞上的CD3。

[2098] 91.一种检测异常地表达MUC1*的细胞的存在的方法,包括使细胞的样品与根据实施方式82所述的scFv-Fc接触以及检测scFv-Fc与所述细胞的结合的存在。

[2099] 92.根据实施方式91所述的方法,其中,所述细胞是癌细胞。

[2100] 93.一种用于测试受试者的癌症对于利用包含MN-E6、MN-C2、MN-

[2101] C3或MN-C8的可变区的部分的组合物治疗的适应性的方法,包括以下步骤:使来自患者的身体试样与相应的MN-E6 scFv-Fc、MN-

[2102] C3 scFv-Fc、MN-C3 scFv-Fc或MN-C8 scFv-Fc接触。

[2103] 94.一种治疗患有疾病的受试者的方法,包括,

[2104] 将来自所述受试者的T细胞暴露于MUC1*肽,其中,经过不同轮次的成熟,T细胞发展MUC1*特异性受体,产生适应的T细胞,

[2105] 将所述适应的T细胞扩增并给予诊断有、怀疑有、或处于发展MUC1*阳性癌症的风险的供体患者。

[2106] 95.一种用于治疗诊断有、怀疑有、或处于发展MUC1阳性或MUC1*

[2107] 阳性癌症的风险的患者的方法,包括给予有效量的用MUC1*靶向CAR转导的免疫细胞。

[2108] 96.根据实施方式95所述的方法,其中,所述免疫细胞是从患者分离、然后用CAR转导的T细胞,其中所述CAR的靶向头结合至MUC1*,并且在转导的T细胞的扩增之后,将CAR T细胞以有效量给予所述患者。

[2109] 97.根据实施方式95所述的方法,其中,所述免疫细胞是从患者分离、然后用CAR转导的T细胞,其中所述CAR的靶向头包含huMN-

[2110] E6、huMN-C2、huMN-C3或huMN-C8的部分，并且在转导的T细胞的可选扩增之后，将CAR T细胞以有效量给予所述患者。

[2111] 实施例

[2112] 实施例1-与NME1和NME7的ELISA竞争

[2113] 利用Imject Maleimide激活BSA试剂盒(Thermo Fisher)，将PSMGFR肽共价偶联于BSA。在0.1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液pH 9.6中，将PSMGFR肽偶联BSA稀释至7.5ug/mL并将50uL加入96孔板的每个孔。在4℃下过夜温育以后，用PBS-T来洗涤板两次并添加3％ BSA溶液以阻止在孔上的剩余的结合位点。在室温下1小时以后，用PBS-T来洗涤板两次，然后在饱和浓度下添加稀释在PBS-T+1％ BSA中的NME1或NME7。在室温下1小时以后，用PBS-T来洗涤3x板，然后添加稀释在PBS-T+1％ BSA中的抗MUC1*抗体(或抗体片段)(5x摩尔过量，与NME1/NME7相比)。在室温下1小时以后，用PBS-T来洗涤3x板，然后以1/10000稀度，添加稀释在PBS-T+1％ BSA中的山羊抗His标签-HRP(HisTag-HRP)。在室温下1小时以后，用PBS-T来洗涤3x板，然后，利用ABTS溶液(Thermo Fisher)，在415nm处，测量结合于PSMGFR肽的剩余的NME1或NME7。

[2114] 实施例2-抗MUC1＊胞外结构域单克隆抗体的人源化

[2115] 我们产生了人源化抗体，通过称为互补决定区，‘CDR’，移植的过程，其结合于MUC1*的胞外结构域。首先，进行同源性搜索以相对于人抗体序列的所有组成成分(IMGT，国际ImMunoGeneTics信息系统)，独立对齐小鼠单克隆抗MUC1*抗体的重链可变区和轻链可变区核苷酸序列(E6 HC SEQ ID NO:12-13;LC SEQ ID NO:65-66以及MN-C2 HC SEQ ID NO:118-119;LC SEQ ID NO:168-169)。选择具有最高同源性的序列。IGHV3-21*01是人IgG重链可变区序列，相对于小鼠MN-E6重链可变区，其具有82.9％(DNA)和4.5％(氨基酸)同一性。IGKV3-11*02是人IgG轻链可变区序列，相对于小鼠MN-E6轻链可变区，其具有68.8％(DNA)和61.1％(氨基酸)同一性。IGHV3-21*04是人IgG重链可变区序列，相对于小鼠MN-C2重链可变区，其具有85％(DNA)和81.6％(氨基酸)同一性。IGKV7-3*01是人IgG轻链可变区序列，相对于小鼠MN-C2轻链可变区，其具有76.9％(DNA)和71.3％(氨基酸)同一性。其次，产生小鼠scFv的模型以选择并保持对于CDR和架构的稳定性重要的小鼠残基。最后，由相应的小鼠CDR替换来自人类种系的CDR。

[2116] 人源化MN-E6 IgG2重链克隆

[2117] Kozak共有序列接着IGHV3-21*03前导序列，人IgG2的人源化MN-E6重链可变区和恒定区根据我们的要求由GenScript,NJ合成(SEQ ID NO:52-53。通过聚合酶链反应(PCR)并使用以下引物来扩增cDNA:5’-ATTCTAAGCTTGGGCCACCATGGAACTG-3’(SEQ ID NO:624)和5’-TCTAGAGTTTAAACTTACTATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3’(SEQ ID NO:625)。在借助于HindIII和PmeI限制酶(New England Biolabs)的消化以后，将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的pCDNA3.1V5载体(Life Technologies)。

[2118] 通过聚合酶链反应(PCR)并使用以下引物:5’-AGTATGGCCCAGCCGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3’

[2119] (SEQ ID NO:626)和5’-TAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAG-3’(SEQ ID NO:627)来扩增人源化MN-E6重链cDNA。在借助于SfiI和PmeI限制酶(New England Biolabs)的消化以后，将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的pSEC标签2载体(Life Technologies)。

[2120] 人源化MN-E6κ轻链克隆

[2121] Kozak共有序列接着IGHV3-11*02前导序列,人源化MN-E6轻链可变区和人κ轻链的恒定区根据我们的要求由GenScript,NJ合成(SEQ ID NO:107-108)。通过聚合酶链反应(PCR)并使用以下引物:5'-ATTCTAAGCTTGGGCCACCATGGAAGC-3'(SEQ ID NO:628)和5'-TCTAGAGTTTAAACTTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3'(SEQ ID NO:629)来扩增cDNA。在借助于HindIII和PmeI限制酶(New England Biolabs)的消化以后,将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的pCDNA3.1V5载体(Life Technologies)。

[2122] 通过聚合酶链反应(PCR)并使用以下引物:5'-AGTATGGCCCAGCCGGCCGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG-3'(SEQ ID NO:630)和5'-TAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAG-3'(SEQ ID NO:631)来扩增人源化MN-E6轻链cDNA。在借助于SfiI和PmeI限制酶(New England Biolabs)的消化以后,将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的pSEC标签2载体(Life Technologies)。

[2123] 人源化MN-E6 IgG1重链克隆

[2124] 用BstEII和PmeI(New England Biolabs)来消化人源化MN-E6 IgG2构建体(pCDNA 3.1V5和pSEC标签2)以除去IgG2重链恒定区。纯化具有人源化MN-E6重链可变区的载体。根据我们的要求,人IgG1重链恒定区由IDT,IA合成(SEq ID NO:60-61)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCKS和具有人源化MN-E6可变区的纯化载体。

[2125] 人源化MN-E6λ轻链克隆

[2126] 用KpnI和PmeI(New England Biolabs)来消化人源化MN-E6κ轻链构建体(pCDNA 3.1V5载体和pSEC标签2载体)以除去κ轻链恒定区。纯化具有人源化MN-E6轻链可变区的载体。根据我们的要求,人λ轻链恒定区由IDT,IA合成(SEQ ID NO:115)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和具有人源化MN-E6轻链可变区的纯化载体。

[2127] 人源化MN-C2 IgG1和IgG2重链克隆

[2128] 用SfiI和AgeI来消化在pSEC标签2(pSECTag2)中的人源化MN-E6 IgG1和IgG2重链,以除去MN-E6可变区。用HindIII和AgeI来消化在pCDNA 3.1V5中的人源化MN-E6 IgG1和IgG2重链,以除去MN-E6可变区。纯化具有人IgG1或IgG2恒定区的载体。根据我们的要求,人源化MN-C2重链由IDT,IA合成(SEQ ID NO:160和165)。待克隆到pCDNA 3.1V5的序列含有在5'中的鼠Igκ链前导序列(SEQ ID NO160)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和具有人IgG1或IgG2恒定区的纯化载体。

[2129] 人源化MN-C2κ/λ轻链克隆

[2130] 根据我们的要求,由IDT,IA合成融合于κ轻链恒定区的两个人源化MN-C2可变区和融合于λ轻链恒定区的两个人源化MN-C2可变区(分别为SEQ ID NO:210和213以及SEQ ID NO:216和219)。用HindIII和PmeI限制酶(New England Biolabs)来消化pCDNA 3.1V5以及用SfiI和PmeI限制酶(New England Biolabs)来消化pSEC标签2。然后纯化两种质粒。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs),将SEQ ID NO:210和216连接到消化的pCDNA3.1V5以及将SEQ ID NO:213和219连接到消化的pSEC标签2。

[2131] 人源化C3 IgG1重链克隆

[2132] 用SfiI和AgeI(New England Biolabs)来消化人源化E6 IgG1构建体(pSEC标签2)以除去E6重链可变区。纯化没有人源化E6重链可变区的载体。根据我们的要求,人源化C3重链可变区由IDT,IA合成(SEQ ID NO:457)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England

Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2133] 人源化C3κ轻链克隆

[2134] 用BamHI和PmeI(New England Biolabs)来消化pEF V5-His并纯化。根据我们的要求,人源化C3κ轻链由IDT,IA合成(SEq ID NO:504)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2135] 人源化C8κ轻链克隆

[2136] 用BamHi和PmeI(New England Biolabs)来消化pEF V5-His并纯化。根据我们的要求,人源化C8κ轻链由IDT,IA合成(SEq ID NO:583)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2137] 实施例3-抗MUC1＊胞外结构域抗体的人源化scFV的克隆

[2138] 人源化E6 scFV克隆

[2139] 用SfiI和PmeI(New England Biolabs)来消化pSEC标签2并纯化。根据我们的要求,人源化E6 scFV gBLOCKS由IDT,IA合成(SEQ ID NO:604-605)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2140] 通过聚合酶链反应(PCR)并利用以下引物:5-ACTGTCATATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3'(SEQ ID NO:632)和5'-ACTGTCTCGAGTTTAATTTCCACTTTGGTGCCGCTGC-3'(SEQ ID NO:633)来扩增人源化E6 scFV cDNA。在借助于NdeI和XhoI限制酶(New England Biolabs)的消化以后,将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的pET21b载体(Novagen)。克隆人源化E6 scFV cDNA,组氨酸标记的5',用于蛋白纯化。

[2141] 通过聚合酶链反应(PCR)并利用以下引物:5-ACTGTCATATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3'(SEQ ID NO:634)和5'-ACTGTACCGGTTTTAATTTCCACTTTGGTGCCGCTGC-3'(SEQ ID NO:635)来扩增人源化E6 scFV cDNA。在借助于NdeI和AgeI限制酶(New England Biolabs)的消化以后,将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的修饰pET21b载体(Novagen)。修饰载体以包括Strep标签2序列接着2个终止密码子,组氨酸标记的5'。克隆人源化E6 scFV cDNA,Strep标签2的5',用于蛋白纯化。

[2142] 人源化E6、C2、C3和C8 scFV-Fc克隆

[2143] 用SfiI和SacII(New England Biolabs)来消化人源化E6 IgG1构建体(pSEC标签2),以除去E6重链可变区和部分的IgG1重链恒定区。纯化没有人源化E6重链可变区的载体。根据我们的要求,人源化E6、C2、C3和C8 scFV gBLOCKS由IDT,IA合成(SEQ ID NO:258-259、262-263、266-267和270-271)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接E6、C2、C3和C8 gBLOCK以及纯化载体,以在人IgG1 Fc区的框中组装相应的scFV。

[2144] 人源化E6 scFV-Fc Y407R克隆

[2145] 通过定位诱变,将人源化E6 scFV-Fc酪氨酸407突变到精氨酸(Y407R)。使用Q5定位诱变试剂盒(NEB)并使用以下引物:5'-CTTCTTCCTCAGGAGCAAGCTCACCGTGG-3'(SEQ ID NO:636)和5'-GAGCCGTCGGAGTCCAGC-3'(SEQ ID NO:637)

[2146] 人源化E6 scFV-Fc无铰链克隆

[2147] 通过定位诱变来除去人源化E6 scFV-Fc的铰链区。使用Q5定位诱变试剂盒(NEB)并使用以下引物:5'-GCACCTGAACTCCTGGGG-3'(SEQ ID NO:638)和5'-TTTAATTTCCACTTTGGTGCCG-3'(SEQ ID NO:639)

[2148] 实施例4-抗MUC1＊胞外结构域抗体的CAR-T的克隆

[2149] CAR E6 CD28/4-1BB/CD3z克隆:

[2150] 用KpnI和PmeI(New England Biolabs)来消化pCDNA 3.1V5并加以纯化。根据我们的要求,全CAR-T E6(CD8/CD28/4-1BB/CD3z)gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:305)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2151] CAR E6 CD3z克隆:

[2152] 用EcoRV和PmeI(New England Biolabs)来消化pCDNA 3.1V5CAR-T E6 CD8/CD28/4-1BB/CD3z以除去细胞质结构域。纯化没有细胞质结构域的载体。根据我们的要求,CAR-T E6 CD8/CD3z gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:296)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2153] CAR E6 CD28/CD3z克隆:

[2154] 用EcoRV和PmeI(New England Biolabs)来消化pCDNA 3.1V5CAR-T E6 CD8/CD28/4-1BB/CD3z以除去细胞质结构域。纯化没有细胞质结构域的载体。根据我们的要求,CAR-T E6 CD8/CD28/CD3z gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:299)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2155] CAR E6 4-1BB/CD3z克隆:

[2156] 用EcoRV和PmeI(New England Biolabs)来消化pCDNA 3.1V5CAR-T E6 CD8/CD28/4-1BB/CD3z以除去细胞质结构域。纯化没有细胞质结构域的载体。根据我们的要求,CAR-T E6 CD8/4-1BB/CD3z gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:302)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2157] CAR C2 CD28/4-1BB/CD3z克隆:

[2158] 用KpnI和EcoRV(New England Biolabs)E6 scFV来消化pCDNA3.1V5 CAR-T E6 CD8/CD28/4-1BB/CD3z。纯化没有E6 scFV的载体。根据我们的要求,CAR-T C2 gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:308-309)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2159] CAR亚克隆进入慢病毒载体:

[2160] 通过聚合酶链反应(PCR)并利用以下引物:5-CGCGGCTAGCTTAAGCTTGGTACCGAGGGCCA-3'(SEQ ID NO:640)和5'-CGCGGCGGCCGCCTGATCAGCGGGTTTAAACTTATC-3'(SEQ ID NO:641)来扩增所有pcDNA3.1V5 CAR cDNA。在借助于NheI和NotI限制酶(New England Biolabs)的消化以后,将纯化片段克隆到用相同限制酶消化的慢病毒载体(pCDH-EF1-MCS-IRES GFP和pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro,SBI)。

[2161] CAR-E6-Fc/8/41BB/CD3z克隆:

[2162] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、313和314)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2163] CAR-E6-FcH/8/41BB/CD3z克隆:

[2164] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、317和314)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2165] CAR-E6-Fc-4-41BB-CD3z克隆：

[2166] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、313和320)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2167] CAR-E6 FcH/4/41BB/CD3z克隆：

[2168] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、317和320)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2169] CAR-E6 IgD/8/41BB/CD3z克隆：

[2170] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、325和326)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2171] CAR-E6 IgD/4/41BB/CD3z克隆：

[2172] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、329和326)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2173] CAR-E6 X4/8/41BB/CD3z克隆：

[2174] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、332和326)、利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2175] CAR-E6 X4/4/41BB/CD3z克隆：

[2176] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、335和326)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2177] CAR E6-8+4-4-41BB-CD3Z克隆：

[2178] 用NheI和NotI(New England Biolabs)来消化pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP+puro(SBI)并纯化载体。根据我们的要求,gBLOCK由IDT,IA合成(SEq ID NO:312、338和326)。利用Gibson装配克隆试剂盒(New England Biolabs)来连接gBLOCK和纯化载体。

[2179] 实施例5-慢病毒生产

[2180] HEK 293T细胞(ATCC)用来产生慢病毒。前一天,转染板(6孔板)被涂覆有聚-D-赖氨酸并接种细胞以致在转染时细胞密度达到90-95％,然后在5％ CO2气氛中培养。第二天,根据制造商的说明(使用0.75ug的慢病毒表达载体和2.25ug的pPACKH1包装混合物),用Lipofectamine 3000(life technologies)和Opti-MEM®I降低的血清培养

[2181] 基(Opti-MEM®I Reduced Serum Medium)来转染细胞。在6小时温育以后,变化培养基以及在24和48小时以后收获含有慢病毒的培养基。用Lenti-X浓缩器(Clontech)来浓缩慢病毒并利用Lenti-X p@4滴度快速试剂盒(Clontech)来计算滴度。以一次性使用等分试样,将慢病毒储存在-80C下。

[2182] 实施例6-Lipofectamine瞬时表达

[2183] HEK 293T细胞(ATCC)用来测试人源化IgG的表达。转染前一天晚上,在1/3稀度下,

使细胞通过(6孔板)并在5% CO2气氛中培养。第二天,转染前1小时,将培养基改变为没有抗生素的完全培养基(DMEM高葡萄糖,来自ATCC,含有10%胎牛血清)。为了转染,根据制造商的说明,我们使用Lipofectamine 3000(life technologies)和Opti-MEM®I降低的血清培养基。使用了1.25ug的重链构建体和1.25ug的轻链构建体或2,5ug的Fc-融合构建体。在48小时温育以后,收集培养基,通过离心加以清除以及用于ELISA测定,来量化人源化IgG表达和结合于PSMGFR肽的水平。

[2184] 实施例7-聚乙烯亚胺(PEI)大规模瞬时表达

[2185] HEK 293T细胞(ATCC)用于Fc-融合蛋白的大规模表达。转染前一天晚上,使细胞通过($6.5x10^6$个细胞,在150mm平皿中)并在5% CO2气氛中培养。第二天,转染前1小时,用PBS pH 7.4来洗涤细胞一次,然后将培养基改变为没有抗生素的完全培养基(DMEM高葡萄糖,来自ATCC,含有10%超低IgG胎牛血清)。为了转染,我们使用了聚乙烯亚胺"Max"(PEI"Max",Polysciences)和Opti-MEM®I降低的血清培养基(25ug的Fc-融合构建体+250ug的PEI)。在72小时温育以后,收集培养基并储存在-20℃下或通过离心/过滤加以清除,用于纯化。

[2186] 实施例8-Jurkat细胞慢病毒转导:

[2187] 协议#1:在新鲜培养基中制备慢病毒的50/50溶液(2mL),其补充有8ug/mL的多聚季铵盐并加入6孔板的孔中。在室温下并在1200rpm下沉淀Jurkat E6-1细胞(ATCC,TIB-152)5分钟并再悬浮在新鲜培养基(RPMI,含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素/两性霉素b)中。计数细胞并将$2x10^5$个细胞加入含有病毒+多聚季铵盐溶液的孔。温育24-48小时并添加新鲜培养基和/或割裂细胞。在72小时以后,借助于抗生素选择(嘌呤霉素),开始生长细胞。

[2188] 协议#2:在室温下并在1200rpm下沉淀Jurkat E6-1细胞(ATCC,TIB-152)5分钟,然后以$2.5x10^5$个细胞/mL,再悬浮在新鲜培养基(RPMI,含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素/两性霉素b)中。将2mL的细胞加入15mL无菌锥形管,添加IX的Transdux感染试剂(IX,SBI)和慢病毒。在室温下温和地混合和温育20分钟。在32℃下并在1900rpm下离心细胞30分钟,除去上清液,将细胞再悬浮于2mL新鲜培养基中,然后将细胞转移到6孔板的孔。检查在48小时以后细胞的GFP表达。

[2189] 实施例9-T细胞慢病毒转导:

[2190] 在室温下并在200xg下,沉淀高度纯化T细胞(所有细胞)5分钟,然后,以$1x10^6$个细胞/mL,再悬浮于新鲜培养基(RPMI1640,含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素)中。添加CD3/CD28激活因子Dynabeads(Thermo Fisher,25uL,$1x10^6$个细胞)并用1 mL细胞来接种24孔板,然后添加IL2(Thermo Fisher)。每日监测细胞以及割裂细胞(如果需要的话)。转导前一天,用Retronectin(Takara)来涂覆板并在4℃下储存它过夜。接下来,除去Retronectin溶液,然后添加阻断溶液(2% BSA,在PBS中)并在室温下温育30分钟。除去BSA溶液并添加PBS直到细胞准备好了。收集激活T细胞并在$0.5x10^6$个细胞/mL下将它们再悬浮在新鲜培养基中。添加1mL细胞到retronectin治疗板、1mL的慢病毒溶液和IL2。在室温下并在1000xg下,通过板的离心来旋转接种(spinoculated)细胞90分钟。使板回到培养箱过夜。接着,除去1mL培养基,添加1mL病毒并重复旋转培养。监测细胞并以0.5-$1x10^6$个细胞/mL的密度割裂它们(如果必要的话)。T细胞可以用于转导后48小时的细胞因子释放测定或细胞毒性测

定。

[2191] 实施例10-IL2检测

[2192] 利用人IL-2ELISA试剂盒(Thermo Fisher)来测量在培养基中的IL-2分泌。用抗IL-2抗体(涂覆抗体,1/100,在PBS中)来涂覆板。在4℃下过夜温育以后,用PBS-T来洗涤板3次并添加4％ BSA溶液,以阻止在孔上的剩余的结合位点。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板一次,然后添加条件培养基(CM)和稀释在PBS+4％ BSA中的IL-2标准物。在室温下2小时以后,用PBS-T洗涤板3x,然后添加稀释在PBS+4％ BSA(1/100)中的抗人IL-2(检测抗体)。在室温下2小时以后,用PBS-T来洗涤板5次,然后添加链霉亲和素-HRP(1/400)。在室温下30分钟以后,用PBS-T来洗涤板7次(每次洗涤浸泡1分钟),然后添加底物溶液。在20分钟以后,通过添加停止溶液来停止反应,然后在停止的30分钟内在450nm处读取吸光度(减去在550nm处的吸光度)。

[2193] 实施例11-IFN-γ检测

[2194] 利用人IFN-γELISA试剂盒(Biolegend)来测量在培养基中的IFN-γ分泌。用抗IFN-γ抗体(捕获抗体,1X,在涂覆缓冲液中)来涂覆板。在4℃下过夜温育以后,用PBS-T来洗涤板4次,然后添加阻断溶液以阻止在孔上的剩余的结合位点。在室温下1小时(在500rpm下振摇)以后,用PBS-T来洗涤板4次并添加条件培养基(CM)和IFN-γ标准物。在室温下在振摇的情况下2小时以后,用PBS-T来洗涤板4次,然后添加检测抗体(1x)。在室温下在振摇的情况下1小时以后,用PBS-T来洗涤板4次,然后添加抗生物素蛋白-HRP(1x)。在室温下并在振摇的情况下30分钟以后,用PBS-T来洗涤板5次(每次洗涤浸泡1分钟),然后添加TMB底物溶液。在20分钟以后通过添加停止溶液来停止反应,并在停止的15分钟内在450nm处读取吸光度(减去在570nm处的吸光度)。

[2195] 实施例12-CAR T细胞毒性测定

[2196] 按照标准协议,从全血分离人T细胞。然后用慢病毒携带CAR构建体分别转导T细胞两次,其中CAR构建体携带GFP标记。在RPMI10％ FBS和IL-2中培养2-3天以后,用F(ab')2来染色细胞以标记MN-E6、MN-C2、MN-C3和MN-C8的表面表达。然后通过流式细胞术针对Fab阳性、GFP阳性细胞来分选细胞。这意味着,双阳性群体具有插入的CAR,以及CAR暴露正确的抗体片段。然后CAR T细胞准备好与MUC1*阴性对照细胞或目标MUC1*阳性癌细胞混合。

[2197] 靶细胞的制备如下:收获靶细胞,然后,以1-1.5x10^6个细胞/mL,在无血清培养基中再悬浮细胞,其中上述无血清培养基含有15uM的CMTMr染料(细胞示踪橙色,5-和-6-4-氯甲基苯甲酰氨基四甲基罗丹明,Thermo Fisher)。在适合于特定细胞类型的生长条件下温育30分钟。在培养基中洗涤并转移染色细胞到新管,然后在培养基中温育细胞60分钟。在培养基中洗涤2次以上以除去所有多余的染料。在24孔板中设置测定,其中培养基总体积为0.5ml。再悬浮靶细胞(和对照靶细胞),以致总是有20,000个细胞/孔(20,000个细胞/250ul)。在每个孔中平板接种250ul。添加250ul的T细胞以致T细胞:靶细胞的比率＝20:1、10:1、5:1或1:1。在24小时和72小时以后分析细胞。对于悬浮靶细胞,从孔取出0.5ml培养基并放入管中,用0.5ml培养基或PBS来洗涤孔。对于贴壁靶细胞,从孔取出0.5ml培养基并放入管中,用0.5ml PBS来洗涤孔。将PBS加入相同管并将120ul胰蛋白酶加入孔。温育4分钟,然后添加0.5ml培养基以中和胰蛋白酶以及将其放入管中。离心细胞并将沉淀物再悬浮于100ul FACS缓冲液中。再次离心细胞。在冰上在100ul缓冲液+5ul抗CD3抗体中再悬浮细胞

30分钟(以染色T细胞)。在30分钟以后,用FACS缓冲液来洗涤染色细胞2次并再悬浮在250ul缓冲液中。运行细胞通过FACS管的过滤器帽。在分析之前10分钟,将10ul7AAD染料加入每个管并借助于Fortessa在细胞毒性模板下进行分析。

[2198] 实施例13-人源化IgG的ELISA表达水平

[2199] 在0.1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液pH 9.6中,将山羊抗人Fc特异性抗体稀释至5ug/mL,然后将50uL加入96孔板的每个孔。在4℃下过夜温育以后,用PBS-T来洗涤板两次并添加3% BSA溶液以阻止在孔上的剩余的结合位点。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板两次,然后,在不同浓度下,添加稀释在PBS-T+1% BSA中的条件培养基(CM)。此外,在不同浓度下,添加稀释在PBS-T+1% BSA中的纯化人IgG(life technologies),以制备用于确定人源化IgG或Fc融合蛋白的表达水平的标准曲线。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板3次,然后,以1/2500,添加稀释在PBS-T+1% BSA中的抗人(H+L)HRP(life technologies)。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板3次,然后在415nm处,利用ABTS溶液(ThermoFisher)来测量人IgG和人源化IgG的结合(图9(MN-E6)和图11(MN-C2))。

[2200] 实施例14-与MUC1＊胞外结构域的PSMGFR肽的ELISA人源化IgG结合

[2201] 利用Imject Maleimide激活BSA试剂盒(Thermo Fisher),将序列PSMGFR的合成肽共价偶联于BSA。在0.1M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液pH 9.6中,将PSMGFR耦合BSA稀释至7.5ug/mL,然后将50uL加入96孔板的每个孔。在4℃下过夜温育以后,用PBS-T来洗涤板两次,然后添加3% BSA溶液,以阻止在孔上的剩余的结合位点。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板两次,然后,在不同浓度下,添加稀释在PBS-T+1% BSA中的条件培养基(CM)。同时,在PBS-T+1% BSA中稀释相应的小鼠IgG,然后在不同浓度下添加为结合对照。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板3次,然后,在1/5000下,添加稀释在PBS-T+1%BSA中的抗人(H+L)HRP(life technologies),以检测人源化IgG的结合。在1/2500下,添加稀释在PBS-T+1%BSA中的抗小鼠HRP(life technologies),以检测小鼠IgG的结合。在室温下1小时以后,用PBS-T来洗涤板3次,并在415nm处,利用ABTS溶液(ThermoFisher)来测量结合(图8(MN-E6)和图10(MN-C2))。

[2202] 实施例15-稳定的细胞系生成

[2203] CHO-K1细胞(ATCC)用来产生表达高水平的人源化IgG的稳定细胞系。HEK293细胞(ATCC)用来产生表达高水平的Fc融合蛋白的稳定细胞系。转染前一天晚上,在1/3稀度下,使细胞通过(6孔板)并在5%CO2气氛中培养。第二天,转染前1小时,将培养基改变为没有抗生素的完全培养基(F12K或DMEM,包含10%胎牛血清)。为了转染,根据制造商的说明,我们使用了Lipofectamine 3000(life technologies)和Opti-MEM®I降低的血清培养基。使用了1.25ug的重链构建体和1.25ug的轻链构建体或2.5ug的Fc融合构建体。在24小时以后,胰蛋白酶消化细胞并平板接种到T75烧瓶(在F12K或DMEM中,其含有10%胎牛血清)。在24小时以后,胰蛋白酶消化细胞,在F12K或DMEM中,其含有10% FCS和选择剂(Zeocin,用于pSEC标签2,或G418,用于pCDNA3.1V5),稀释至100个细胞/mL和1000个细胞/mL,平板接种在96孔板(100uL/孔)中并在5% CO2气氛中培养。在2-3周以后,收集来自单克隆的培养基,通过离心加以清除并用于ELISA测定以量化人源化IgG表达和结合于PSMGFR肽的水平。扩增具有最高表达和PSMGFR结合的克隆,用于大规模表达。

[2204] 实施例16-scFV表达:

[2205] 将pET21b E6 scFV质粒(具有His标签或Strep标签II)转化进入Shuffle T7表达感受态细胞(NEB)。使TB肉汤(Terrific肉汤)接种有1/100的过夜培养(LB肉汤-30℃-200rpm)并在30℃/200rpm下加以培养。当OD600达到～1时,温度被降低到20℃并且持续生长。在2小时以后,用0.2mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG,Gold Biotechnology)来诱导重组蛋白表达并在22小时以后停止培养。在通过离心(6000rpm,在4℃下10分钟)来收获细胞以后,借助于运行缓冲液,来重悬浮细胞沉淀物。对于His标签,蛋白缓冲液是:50mM Tris pH8.0、300mM NaCl和5mM咪唑。对于Strep标签II,蛋白缓冲液是100mM Tris pH 8.0和150mM NaCl。

[2206] 实施例17-His标签EscFV纯化:

[2207] 添加MgCl2(0.5mM)、DNA酶(0.5ug/mL,Sigma)、PMSF(ImM,Gold Bitotechnology)和BugBuster(1X,Novagen)。在室温下,在旋转平台上温育细胞悬液20分钟。通过离心(20000rpm,30分钟,在4°c下)来除去不溶性细胞碎片。然后将清除的裂解液施加于用运行缓冲液加以平衡的Ni-NTA柱(Qiagen)。在用补充有495mM咪唑的运行缓冲液从柱洗脱掉蛋白质以前,洗涤上述柱。通过尺寸排阻色谱(Superdex200)来进一步纯化蛋白质。汇集含有蛋白质的组分,等分并储存在-80℃下。

[2208] 实施例18-Strep标签II EscFV纯化:

[2209] 添加MgCl2(0.5mM)、DNA酶(0.5ug/mL,Sigma)、PMSF(ImM,Gold Bitotechnology)和BugBuster(1X,Novagen)。在室温下在旋转平台上温育细胞悬液20分钟。通过离心(20000rpm,30分钟,在4°c下)来除去不溶性细胞碎片。然后将清除的裂解液施加于用运行缓冲液加以平衡的Strep-Tactin柱(IBA)。在借助于补充有5mM d-脱硫生物素的运行缓冲液来从柱洗脱掉蛋白质以前,洗涤上述柱。通过尺寸排阻色谱(Superdex 200)来进一步纯化蛋白质。汇集含有蛋白质的组分,等分并储存在-80℃下。

[2210] 实施例19-人源化IgG/Fc融合纯化:

[2211] 收集条件培养基(来自瞬时转染或稳定细胞系),通过离心加以清除并过滤(0.2um)。然后将培养基加载到蛋白A(Genscript)或CaptureSelect FcXL(Thermo Fisher)上,并按照制造商的说明,利用用于洗脱的酸性条件,来纯化蛋白质。然后相对于PBS pH 7.4来透析洗脱蛋白并通过尺寸排阻色谱(Superdex 200)加以进一步纯化。汇集含有蛋白质的组分,等分并储存在-80℃下。

[2212] 实施例20-免疫组化分析

[2213] 人组织样品购买自Biomax。组织是正常或癌性的,如由董事会认证的病理学家确定的。组织被匿名化,但标记有数目、组织类型、癌症阶段以及(如果可用)TNM肿瘤分级指定。TNM分级如下:T是原发性肿瘤。Tx是不能评估的原发性肿瘤。T0是没有肿瘤的证据。此是原位癌、上皮内瘤或固有层的侵入。T1是侵入粘膜下层的肿瘤。T2是侵入固有肌层的肿瘤。T3是通过固有肌层侵入浆膜下层或侵入非腹膜覆盖的结肠周或直肠周组织的肿瘤。T4是直接侵入其他器官或结构和/或穿孔内脏腹膜的肿瘤。N是局部淋巴结。N0是没有局部淋巴结转移。N1是在1至3个局部淋巴结中的转移灶。N2是在4个或更多局部淋巴结中转移的。M是用于远处转移灶。M0是指没有远处转移灶。M1是远处转移灶。

[2214] 用初级抗MUC1*抗体小鼠单克隆MN-C2、MN-E6、人源化MN-E6scFv-Fc、或人源化MN-E6 scFv-Fc-生物素来染色组织。如果初级是小鼠单克隆抗体,那么使用的次级抗体是兔抗

小鼠HRP-共轭抗体。如果初级是人源化抗体，那么次级抗体是山羊抗人HRP共轭抗体。如果初级是生物素化抗体，那么次级抗体是链霉亲和素HRP共轭抗体。

[2215] 按照标准协议，利用二甲苯和乙醇来去石蜡化组织样品。抗原检索程序用于一些组织，其涉及10mM柠檬酸钠-0.05％吐温pH 6缓冲液(预煮缓冲液，保持温暖)，沸腾10’，冷却20’，在电饭煲中，然后冷自来水冲洗5分钟，然后在TBS中两个5分钟洗涤。在室温下，在10％NGS加上在TBS中的5％ BSA中，阻止组织1小时。如果使用的初级抗体是人源化MN-E6scFv，其结合至生物素，以致它可以通过次级抗体被可视化，则用抗生物素蛋白溶液，然后用生物素溶液来预阻止组织。在4摄氏度下，在1％ BSA-TBS中，借助于温和的轨道旋转，连同组织一起来温育初级抗体过夜。借助于温和摇摆，用TBS-T来冲洗组织5分钟。仅对于HRP共轭检测，在室温下，在TBS中的3％ H_2O_2中，温育封固组织15分钟。对于用生物素化初级抗体加以温育的组织，然后在链霉亲和素中浸透它们10分钟，其中使用链霉亲和素-HRP标记(Biocare Cat#:HP604G、H、L)，然后在室温下，在TBS-T中，借助于温和摇摆，洗涤3次，时间为5分钟。然后在室温下用色素原(DAB-1mL稀释剂;1滴DAB底物)来显影它们5分钟，然后用运行自来水加以冲洗5分钟。然后用苏木素来复染它们1秒，然后短暂浸泡在0.08％NH4OH‘蓝色试剂’中，接着在自来水中5分钟。然后脱水组织以及用Cytoseal XYL(1滴/切片)封固并盖玻片。

[2216] 本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文。

[2217] *****

[2218] 本领域技术人员将认识到，或使用不超过常规的实验，能够确定这里具体描述的本发明的具体实施方式的许多等同物。

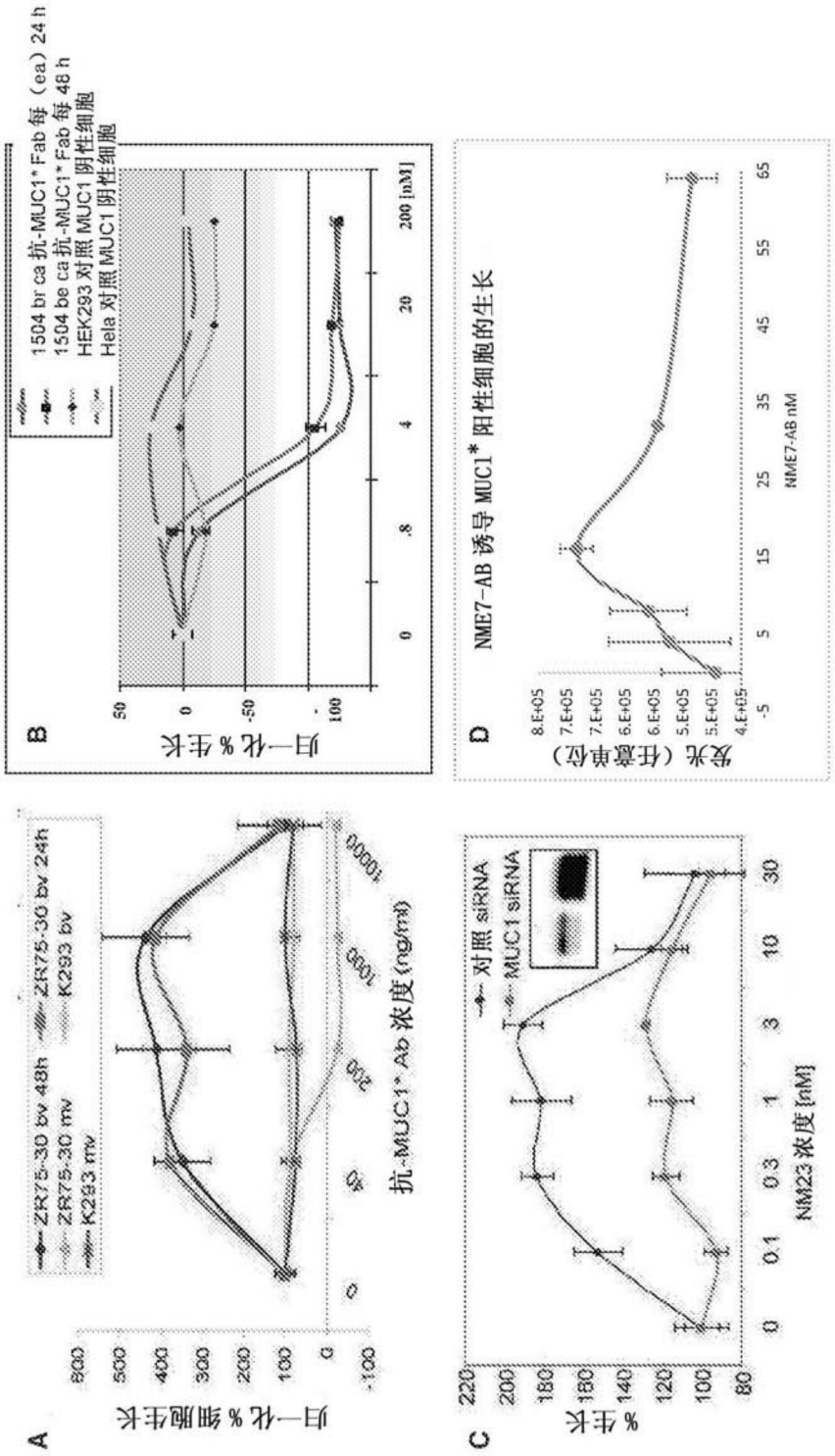

A
ZR75-30 bv 48h
ZR75-30 bv 24h
ZR75-30 mv
K293 bv
K293 mv
归一化 % 细胞生长
抗-MUC1* Ab 浓度(ng/ml)
B
1504 br ca 抗-MUC1* Fab 每（ea）24 h
1504 be ca 抗-MUC1* Fab 每 48 h
HEK293 对照 MUC1 阴性细胞
Hela 对照 MUC1 阴性细胞
归一化 % 生长
C
对照 siRNA
MUC1 siRNA
% 生长
NM23 浓度 [nM]
D
NME7-AB 诱导 MUC1* 阳性细胞的生长
发光（任意单位）
NME7-AB nM

图1

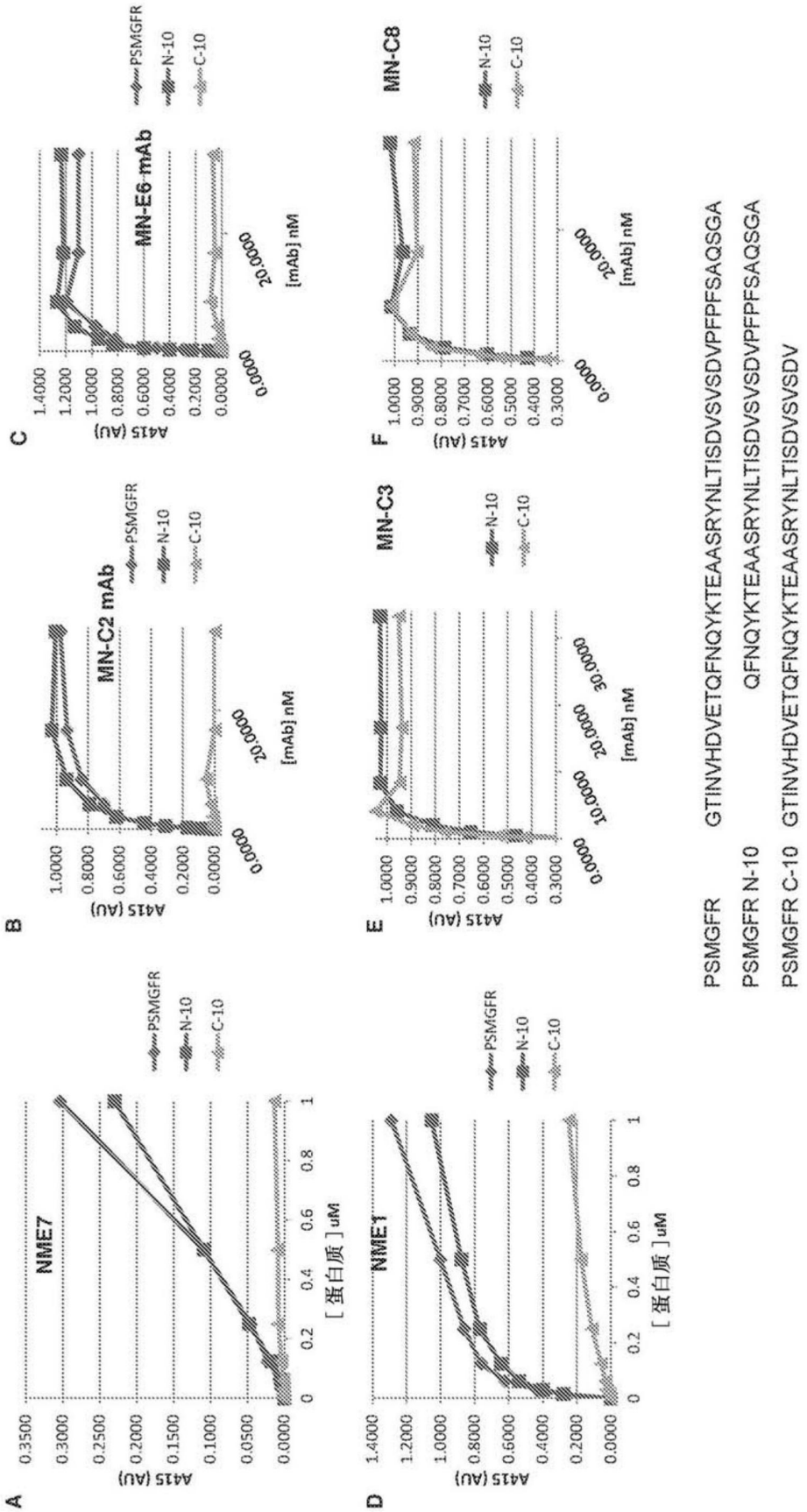

A
NME7
A415 (AU)
[蛋白质] uM
PSMGFR
N-10
C-10
B
MN-C2 mAb
[mAb] nM
C
MN-E6 mAb
D
NME1
E
MN-C3
F
MN-C8
PSMGFR GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA
PSMGFR N-10 QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA
PSMGFR C-10 GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV

图2

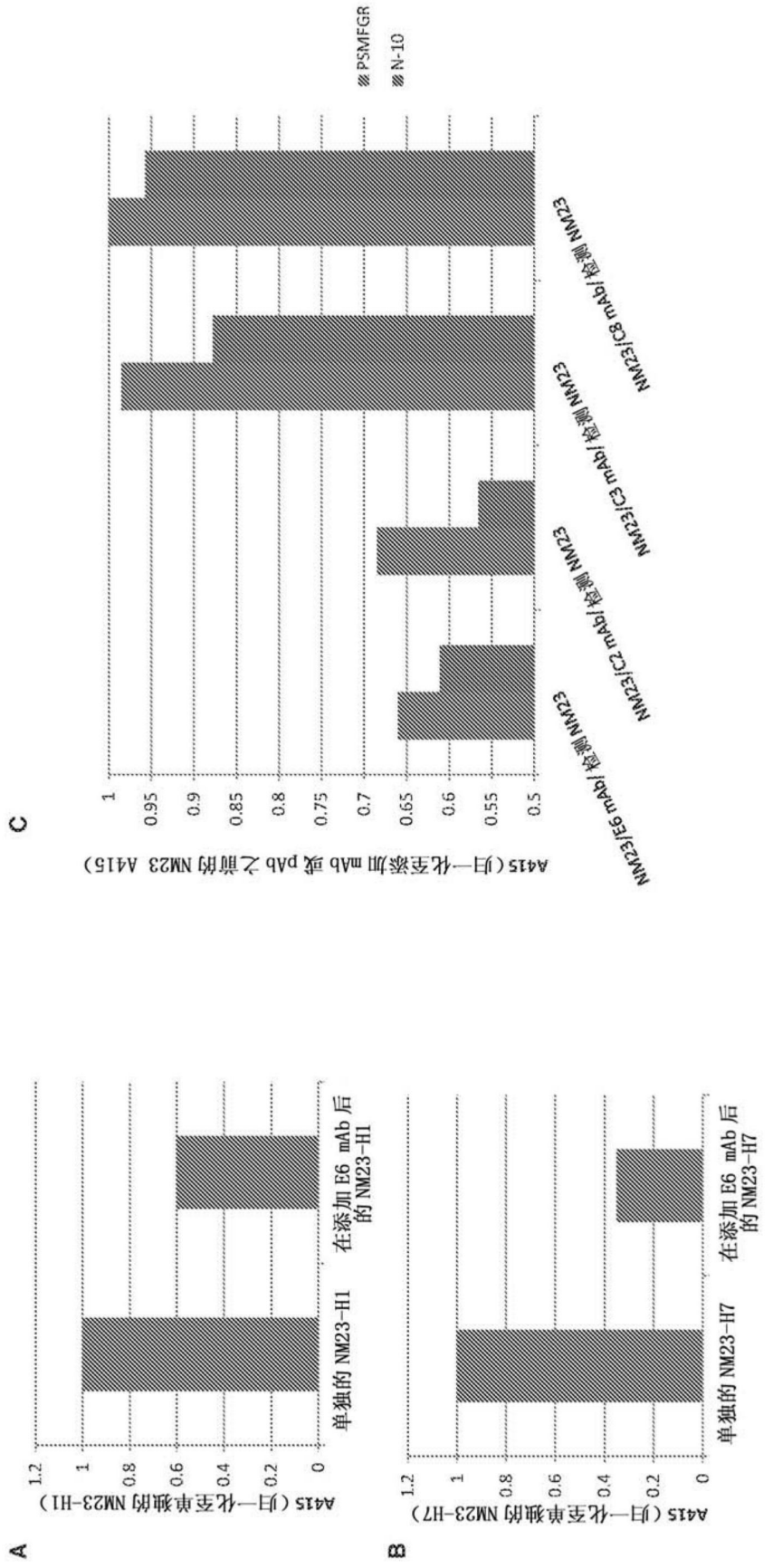

A
A415（归一化至单独的 NM23-H1）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
单独的 NM23-H1
在添加 E6 mAb 后的 NM23-H1
B
A415（归一化至单独的 NM23-H7）
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
单独的 NM23-H7
在添加 E6 mAb 后的 NM23-H7
C
A415（归一化至添加 mAb 或 pAb 之前的 NM23 A415）
1
0.95
0.9
0.85
0.8
0.75
0.7
0.65
0.6
0.55
0.5
PSMFGR
N-10
NM23/E6 pAb/检测 NM23
NM23/C2 mAb/检测 NM23
NM23/C5 mAb/检测 NM23
NM23/C8 mAb/检测 NM23

图3

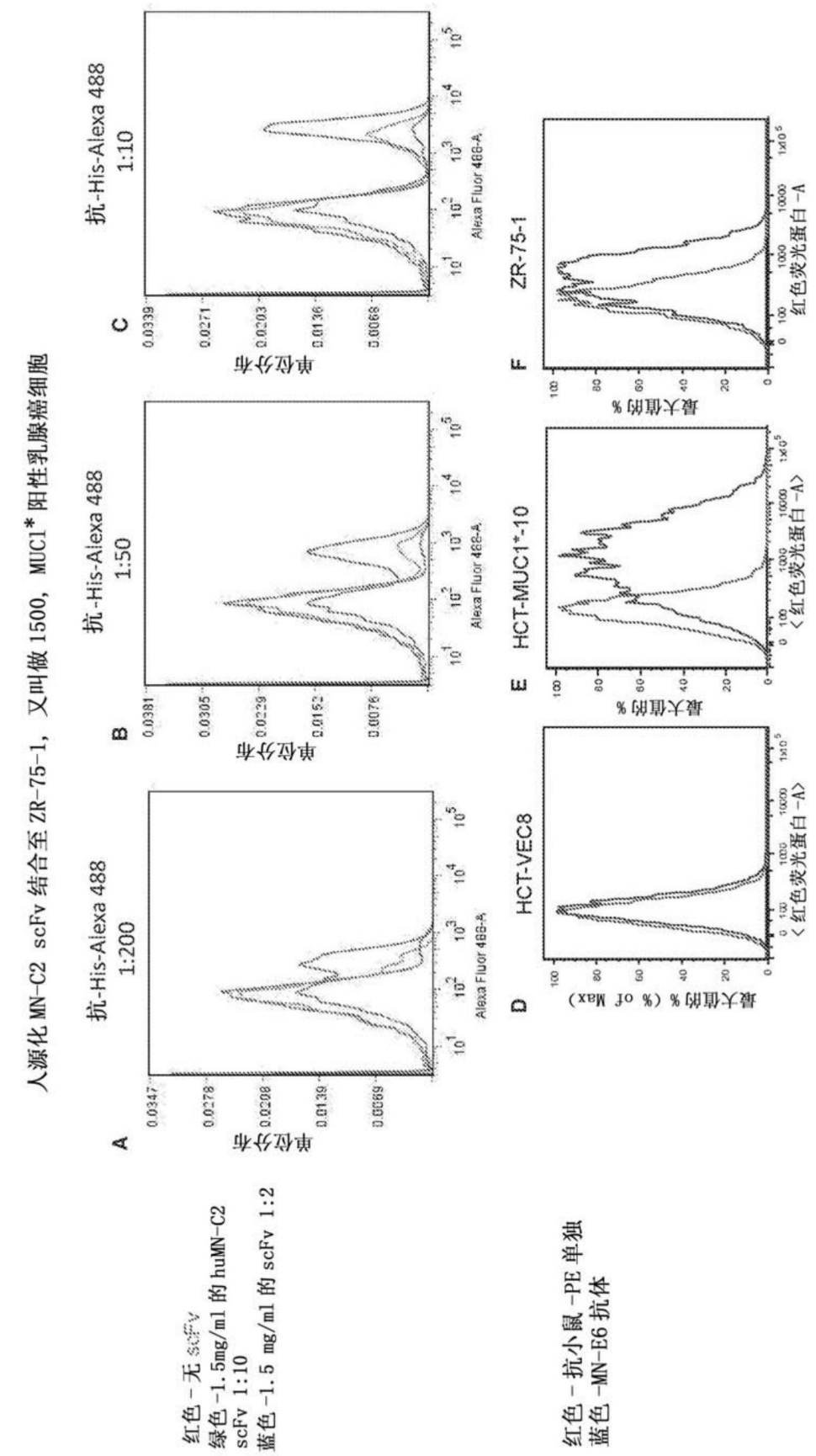

人源化 MN-C2 scFv 结合至 ZR-75-1，又叫做 1500，MUC1* 阳性乳腺癌细胞
A
抗-His-Alexa 488
1:200
B
抗-His-Alexa 488
1:50
C
抗-His-Alexa 488
1:10
单位分布
Alexa Fluor 488-A
D
HCT-VEC8
E
HCT-MUC1*-10
F
ZR-75-1
最大值的 %
最大值的 % (% of Max)
<红色荧光蛋白-A>
红色 - 无 scFv
绿色 -1.5mg/ml 的 huMN-C2
scFv 1:10
蓝色 -1.5 mg/ml 的 scFv 1:2
红色 - 抗小鼠 -PE 单独
蓝色 -MN-E6 抗体

图4

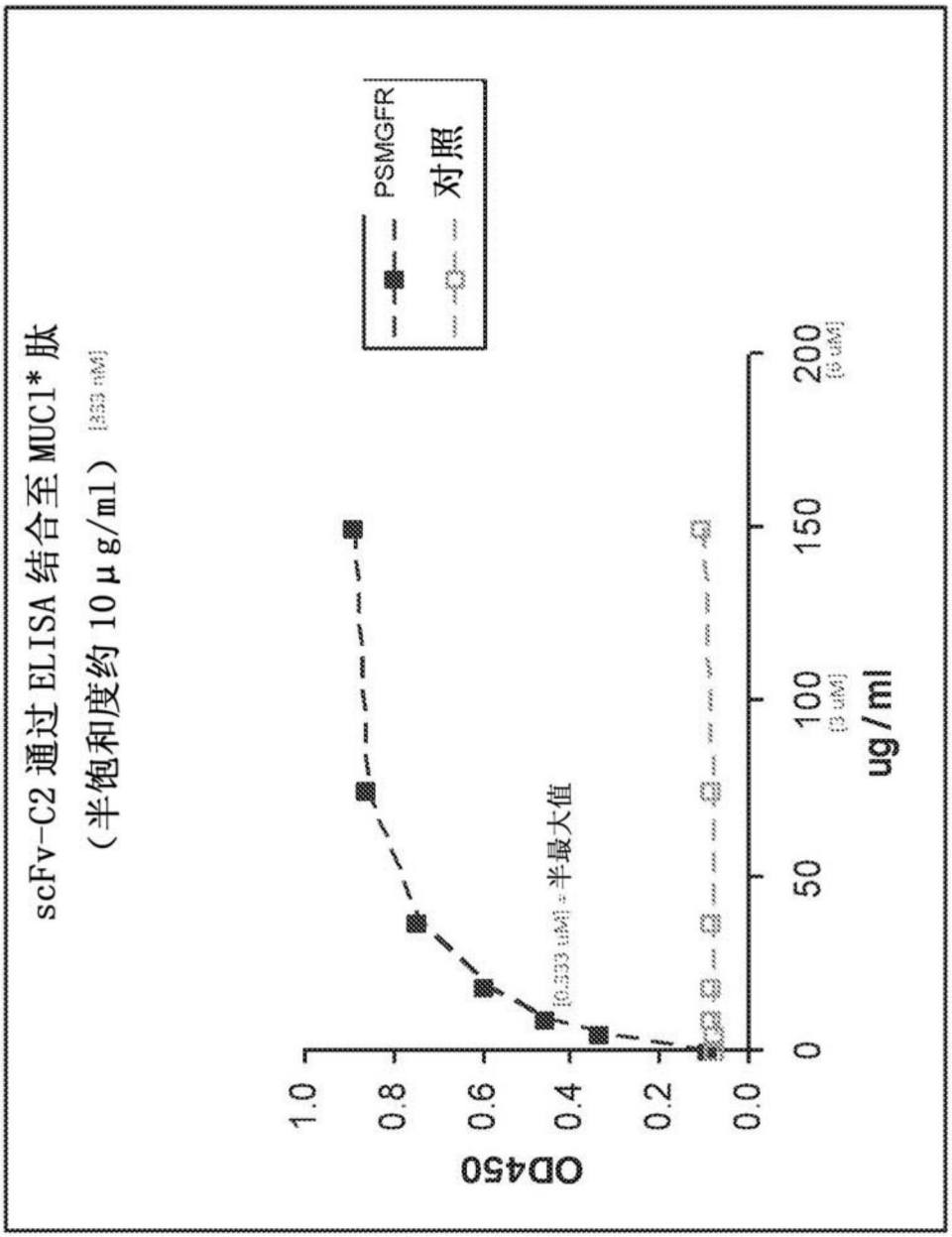

scFv-C2 通过 ELISA 结合至 MUC1* 肽
（半饱和度约 10 μg/ml）
PSMGFR
对照
半最大值
OD450
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
200
ug/ml

图5

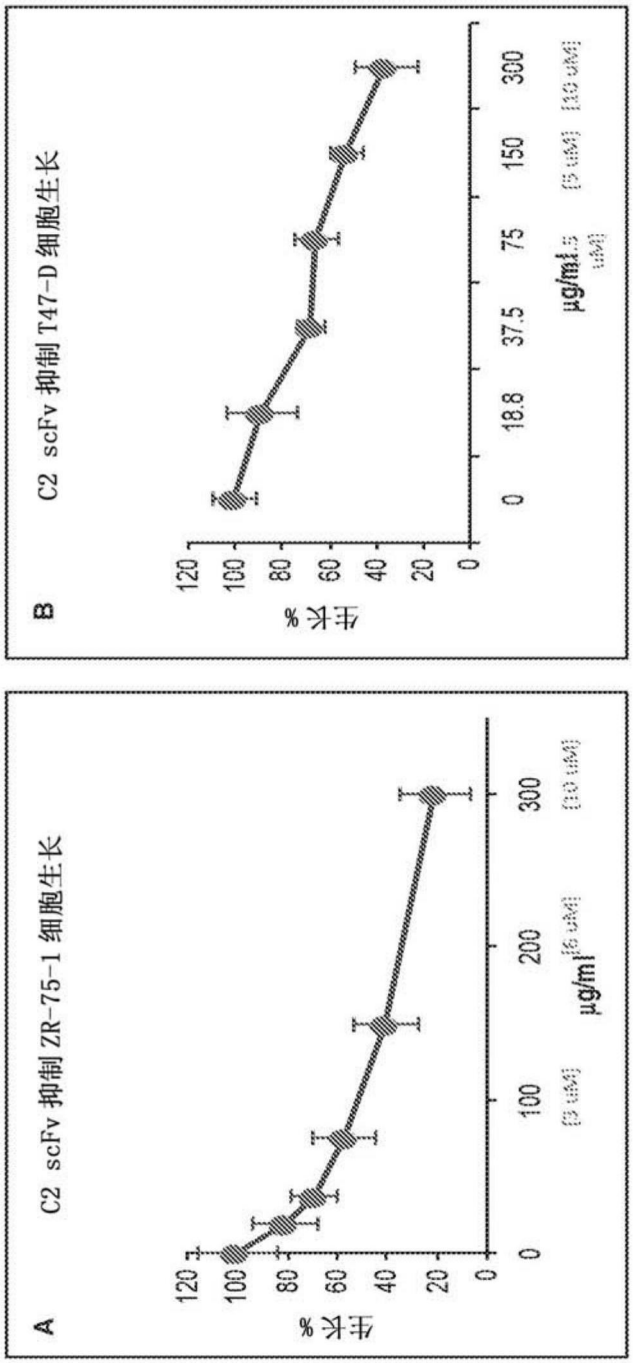

A
C2 scFv 抑制 ZR-75-1 细胞生长
生长%
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
μg/ml
B
C2 scFv 抑制 T47-D 细胞生长
生长%
120
100
80
60
40
20
0
0
18.8
37.5
75
150
300
μg/ml

图6

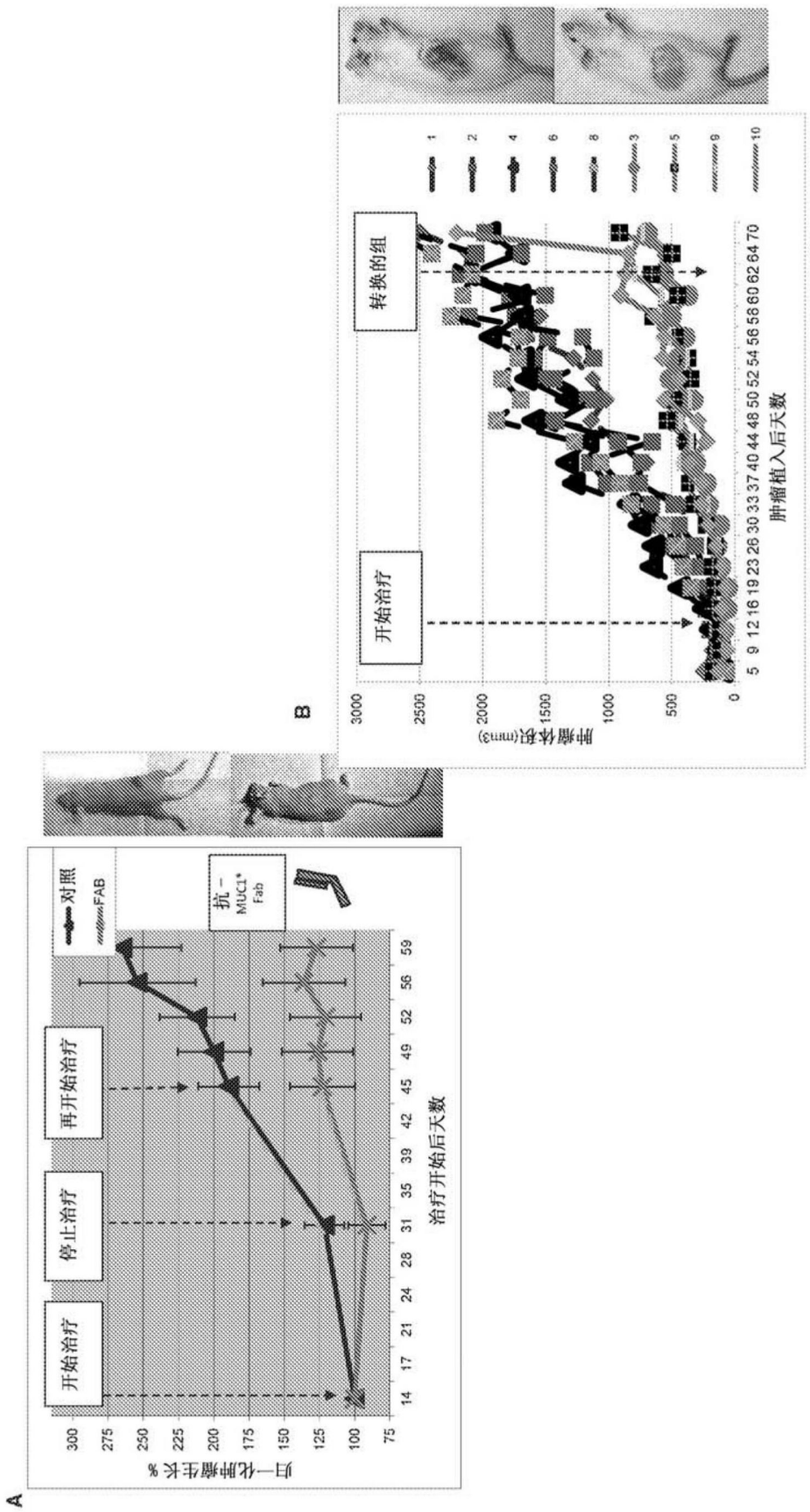

A
归一化肿瘤生长%
治疗开始后天数
开始治疗
停止治疗
再开始治疗
对照
FAB
抗-MUC1* Fab
B
肿瘤体积(mm3)
肿瘤植入后天数
开始治疗
转换的组

图7

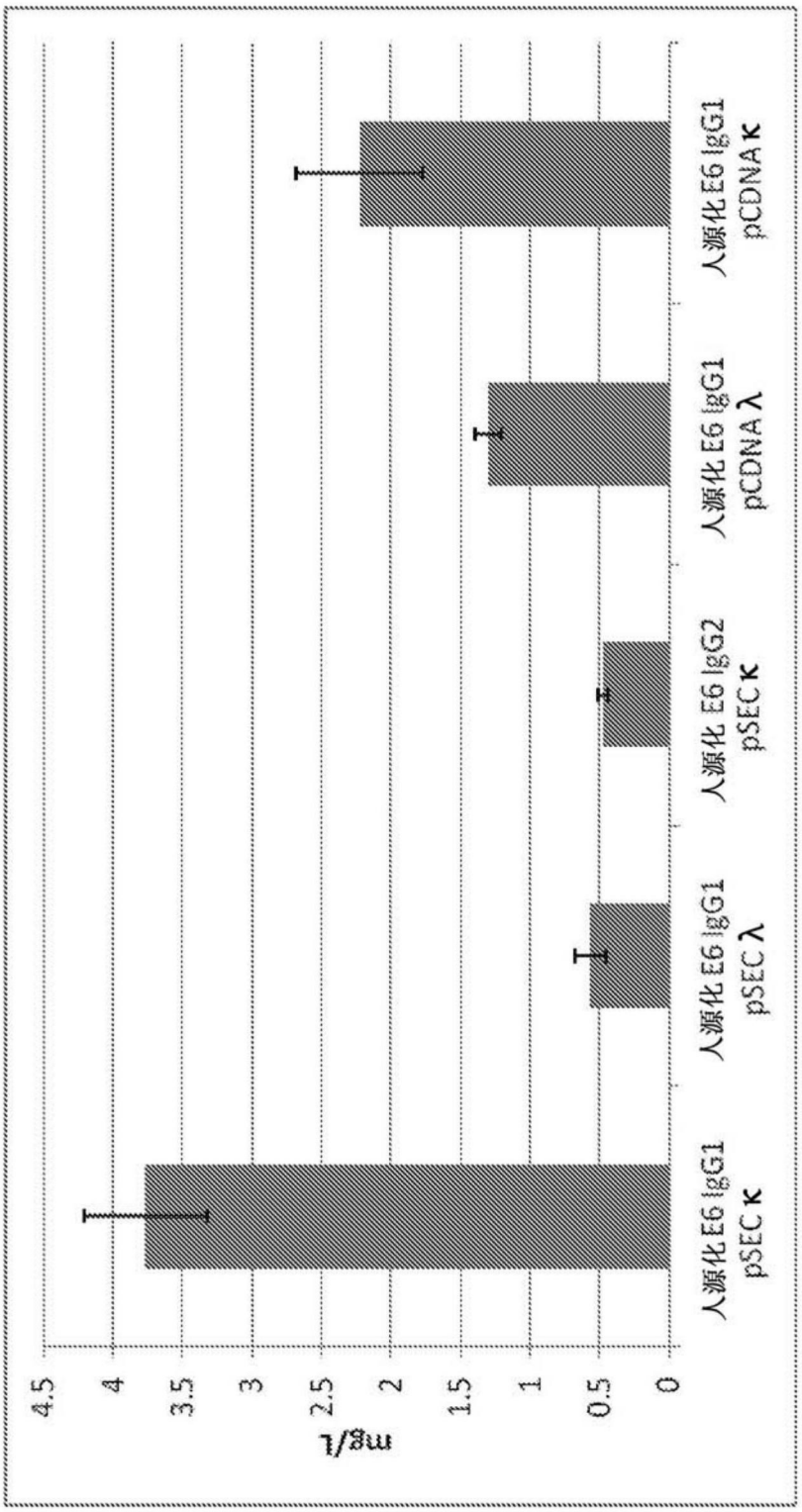

mg/L
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
人源化E6 IgG1 pSEC κ
人源化E6 IgG1 pSEC λ
人源化E6 IgG2 pSEC κ
人源化E6 IgG1 pCDNA λ
人源化E6 IgG1 pCDNA κ

图8

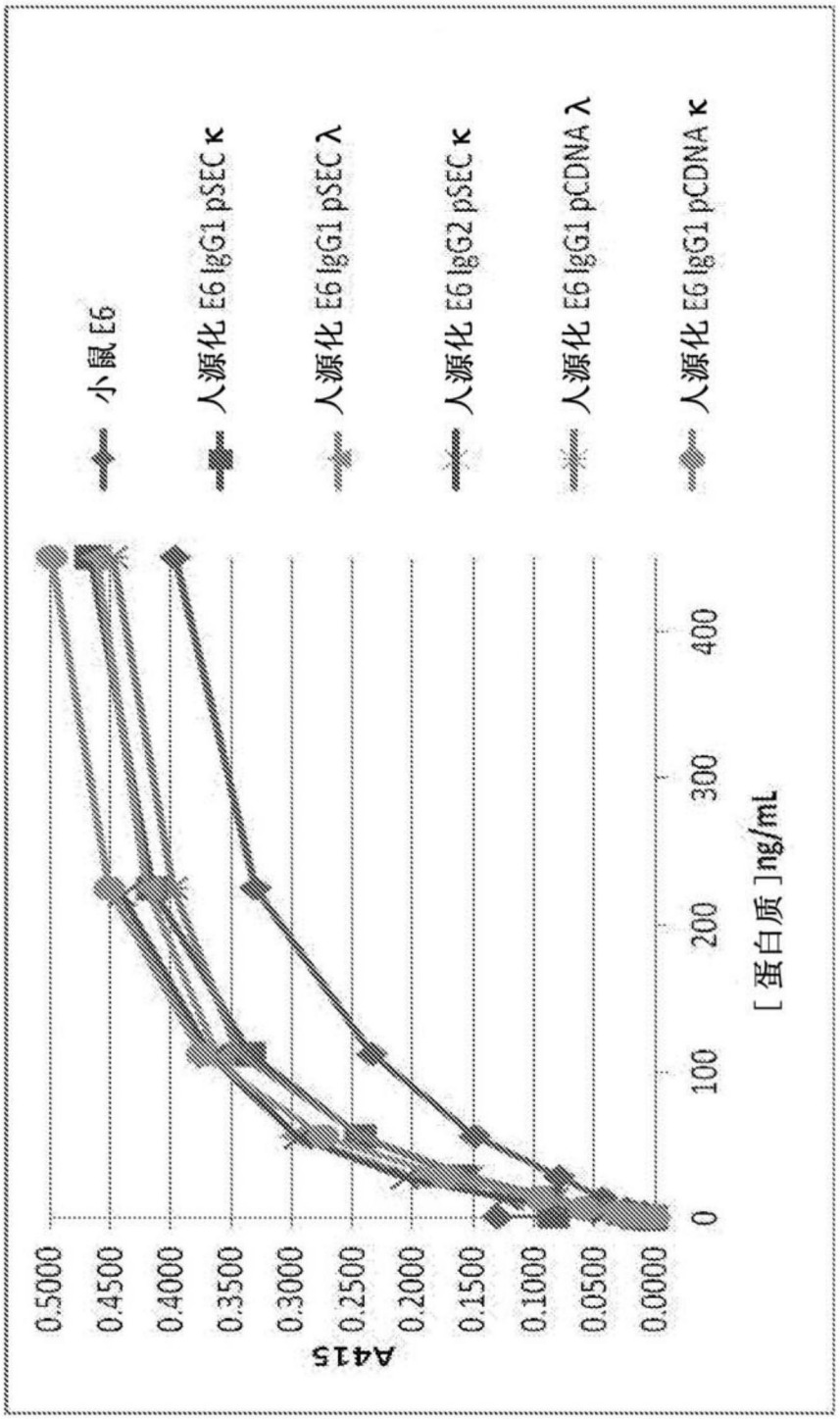

小鼠 E6
人源化 E6 IgG1 pSEC κ
人源化 E6 IgG1 pSEC λ
人源化 E6 IgG2 pSEC κ
人源化 E6 IgG1 pCDNA λ
人源化 E6 IgG1 pCDNA κ
A415
0.5000
0.4500
0.4000
0.3500
0.3000
0.2500
0.2000
0.1500
0.1000
0.0500
0.0000
0
100
200
300
400
[蛋白质]ng/mL

图9

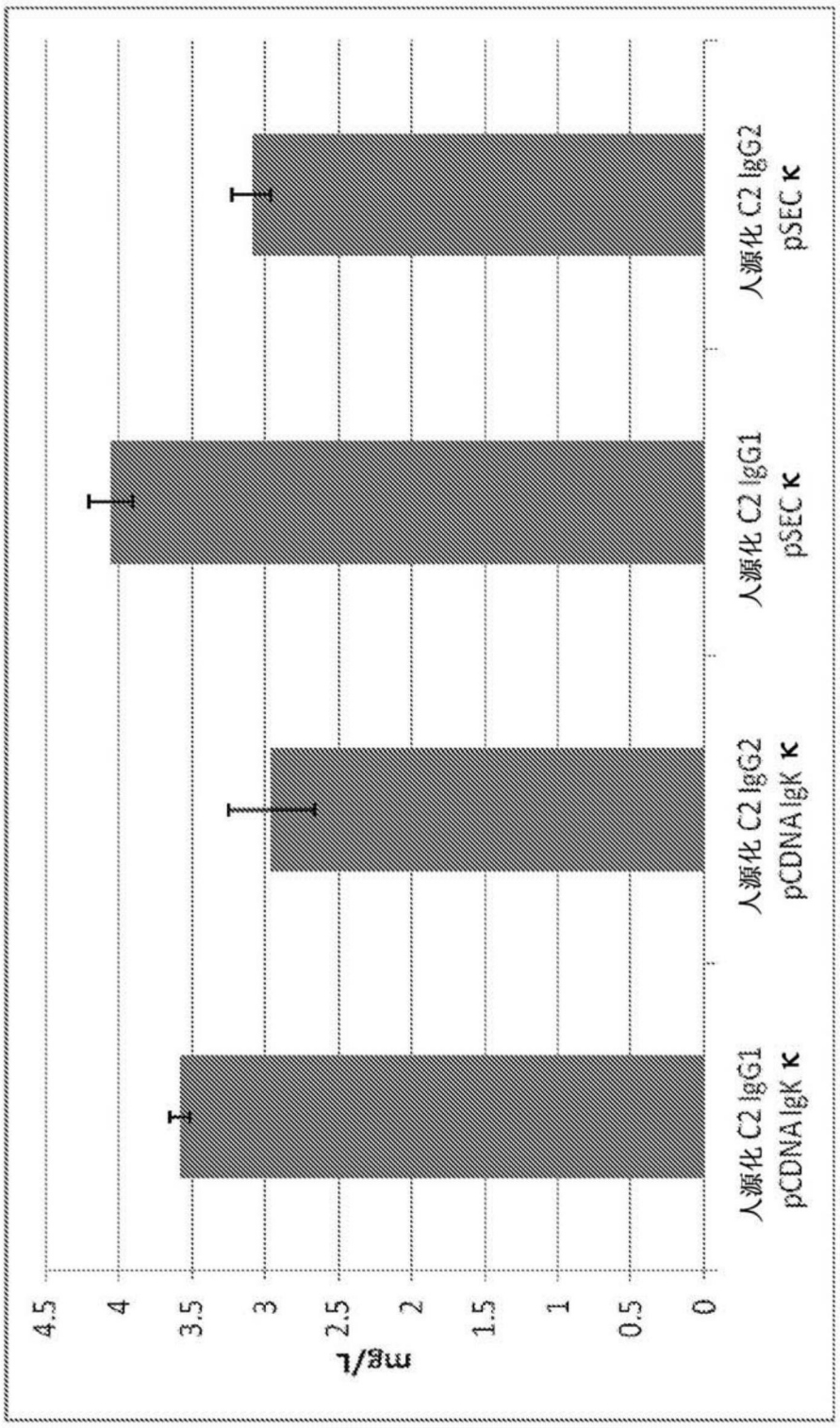

mg/L
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
人源化 C2 IgG1 pCDNA IgK κ
人源化 C2 IgG2 pCDNA IgK κ
人源化 C2 IgG1 pSEC κ
人源化 C2 IgG2 pSEC κ

图10

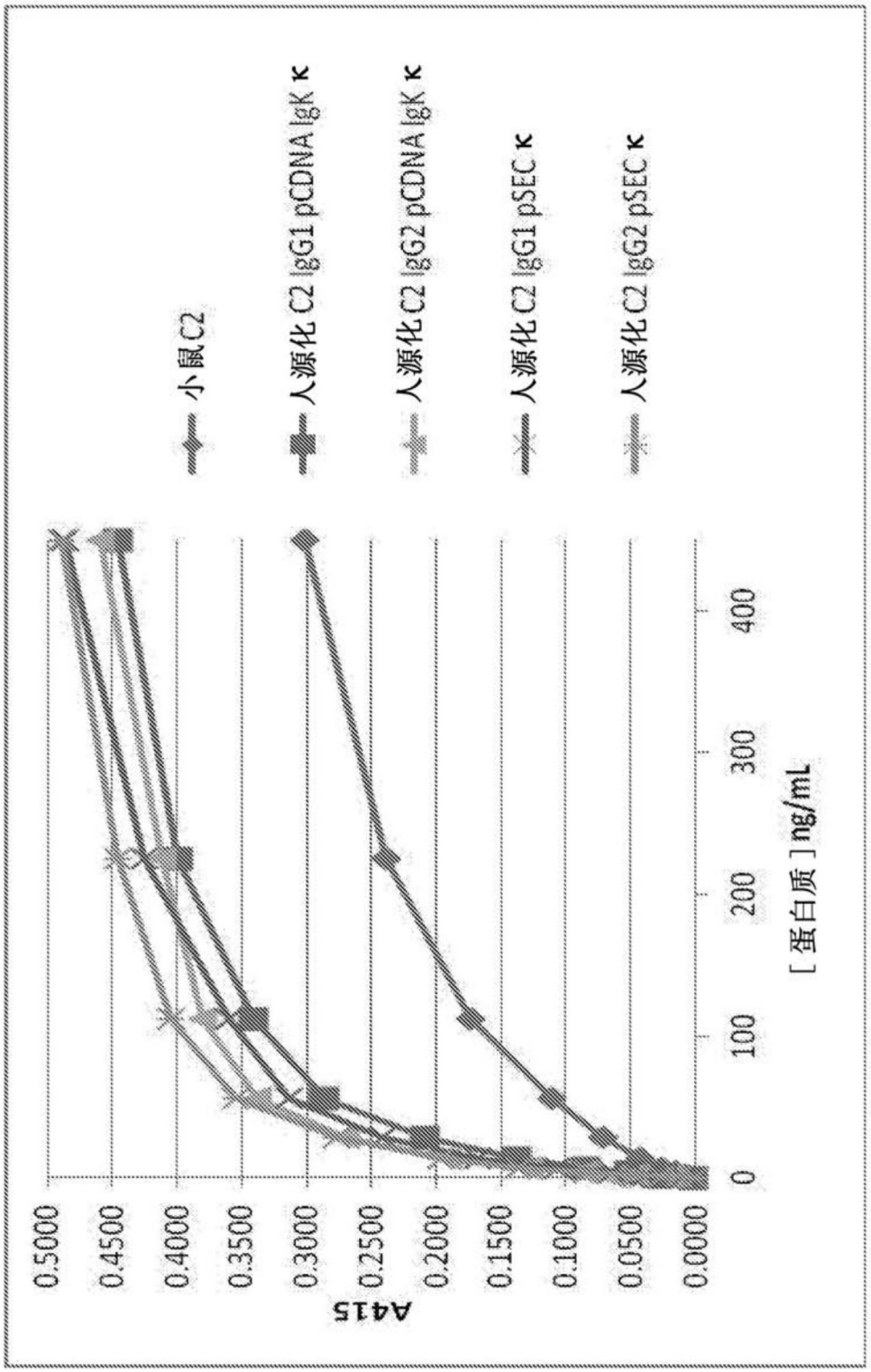

小鼠C2
人源化 C2 IgG1 pCDNA IgK κ
人源化 C2 IgG2 pCDNA IgK κ
人源化 C2 IgG1 pSEC κ
人源化 C2 IgG2 pSEC κ
A415
0.5000
0.4500
0.4000
0.3500
0.3000
0.2500
0.2000
0.1500
0.1000
0.0500
0.0000
0
100
200
300
400
[蛋白质] ng/mL

图11

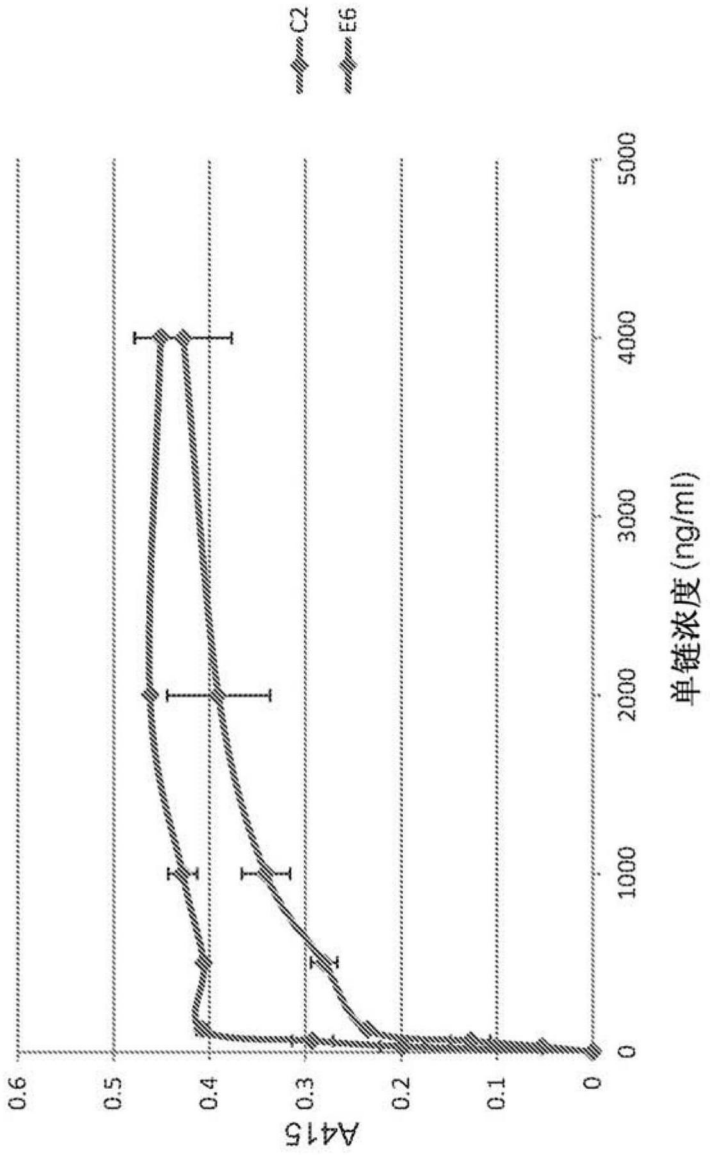

C2
E6
A415
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
单链浓度(ng/ml)

图12

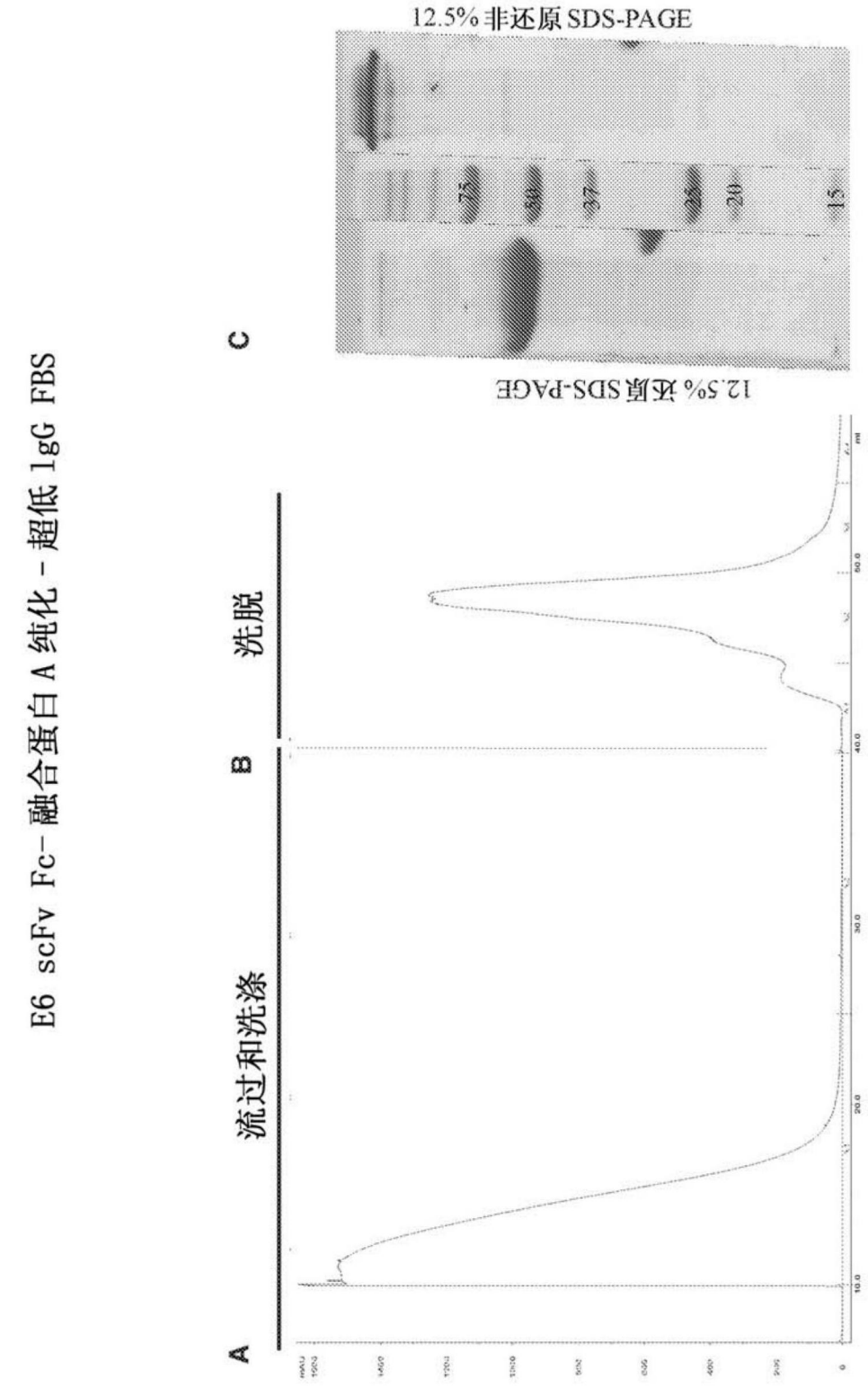

E6 scFv Fc- 融合蛋白 A 纯化 - 超低 IgG FBS
A
流过和洗涤
B
洗脱
C
12.5% 还原 SDS-PAGE
12.5% 非还原 SDS-PAGE
75
50
37
25
20
15

图13

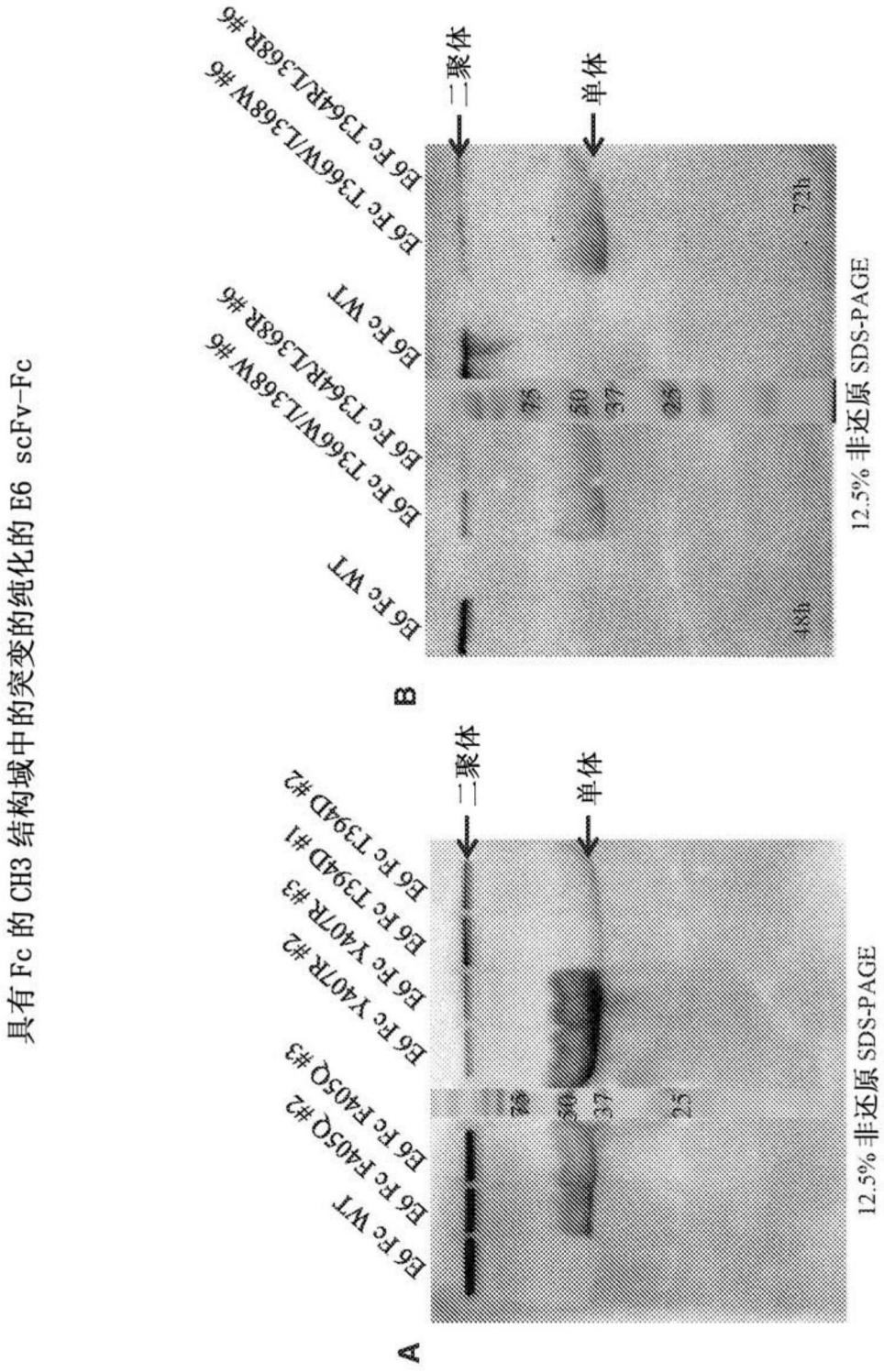

具有 Fc 的 CH3 结构域中的突变的纯化的 E6 scFv-Fc
A
E6 Fc WT
E6 Fc F405Q #2
E6 Fc F405Q #3
E6 Fc Y407R #2
E6 Fc Y407R #3
E6 Fc T394D #1
E6 Fc T394D #2
二聚体
单体
180
60
37
25
12.5% 非还原 SDS-PAGE
B
E6 Fc WT
E6 Fc T366W/L368W #6
E6 Fc T364R/L368R #6
E6 Fc WT
E6 Fc T366W/L368W #6
E6 Fc T364R/L368R #6
二聚体
单体
180
75
60
37
25
72h
12.5% 非还原 SDS-PAGE

图14

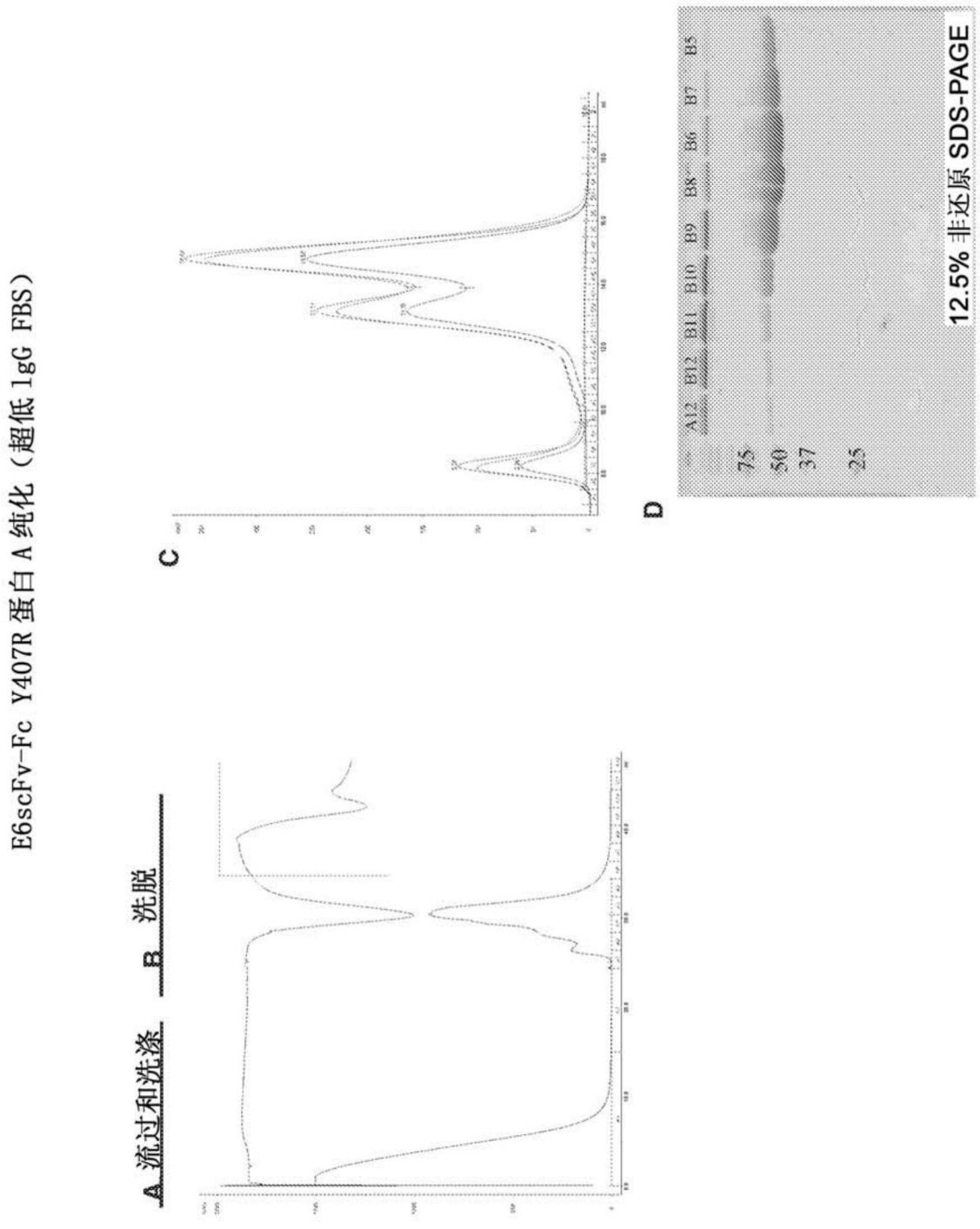

E6scFv-Fc Y407R 蛋白 A 纯化（超低 IgG FBS）
A 流过和洗涤
B 洗脱
C
D
A12 B12 B11 B10 B9 B8 B6 B7 B5
75
50
37
25
12.5% 非还原 SDS-PAGE

图15

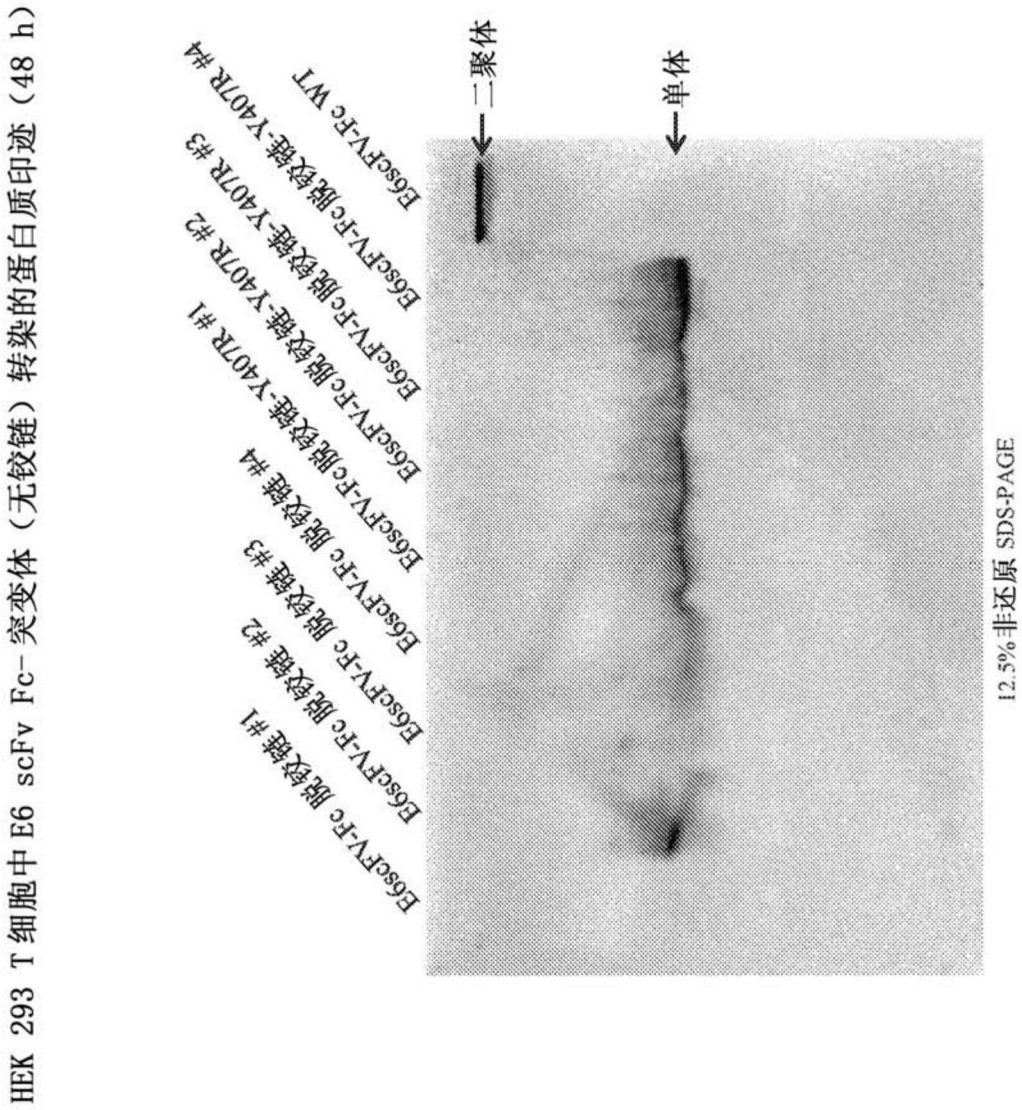

HEK 293 T 细胞中 E6 scFv Fc- 突变体（无铰链）转染的蛋白质印迹（48 h）
二聚体
单体
E6scFv-Fc 无铰链 #1
E6scFv-Fc 无铰链 #2
E6scFv-Fc 无铰链 #3
E6scFv-Fc 无铰链 #4
E6scFv-Fc 无铰链-Y407R #1
E6scFv-Fc 无铰链-Y407R #2
E6scFv-Fc 无铰链-Y407R #3
E6scFv-Fc 无铰链-Y407R #4
E6scFv-Fc WT
12.5% 非还原 SDS-PAGE

图16

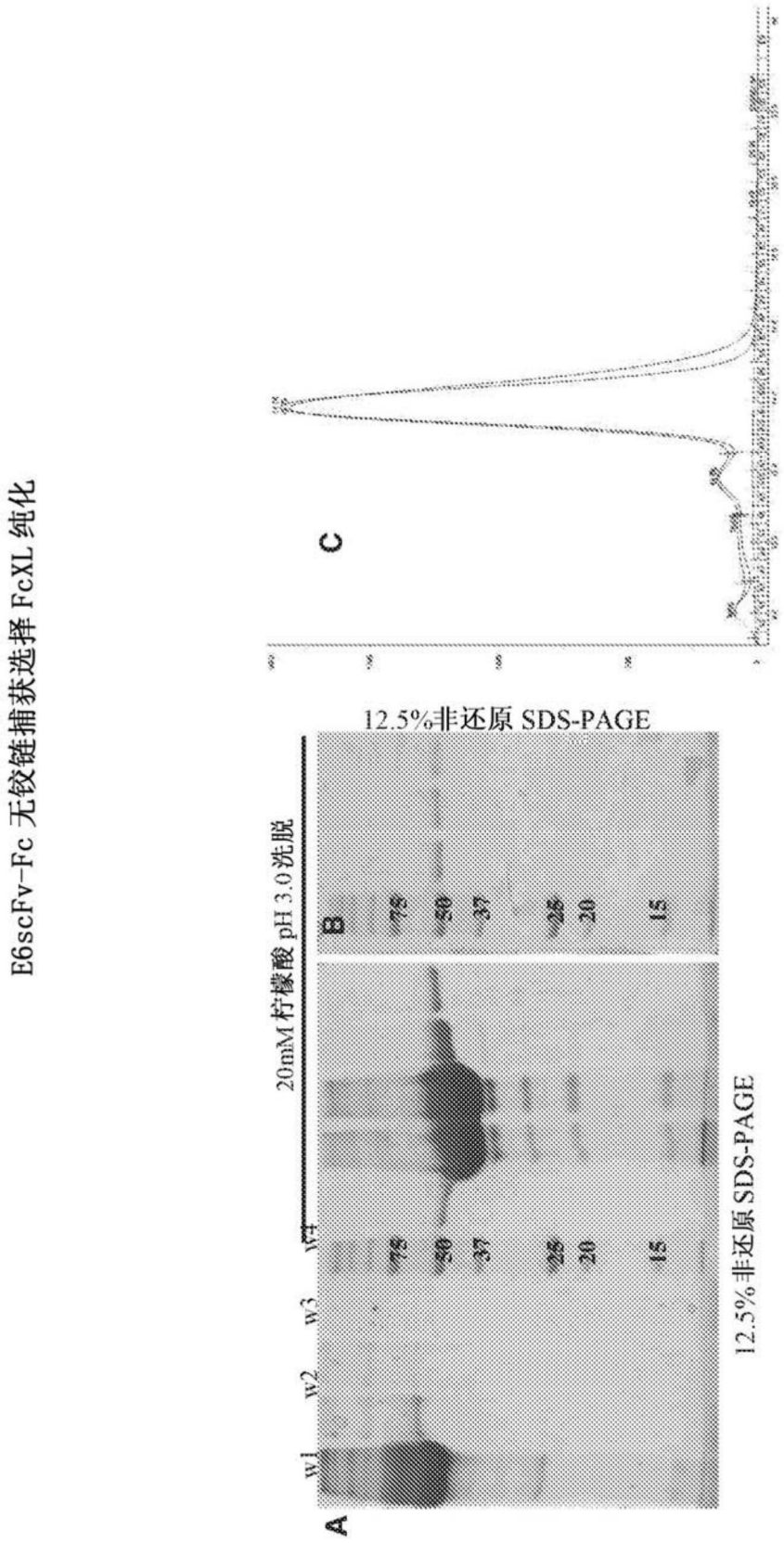

E6scFv-Fc 无铰链捕获选择 FcXL 纯化
C
12.5%非还原 SDS-PAGE
B
A
20mM柠檬酸 pH 3.0洗脱
w1
w2
w3
w4
75
50
37
25
20
15
12.5%非还原SDS-PAGE

图17

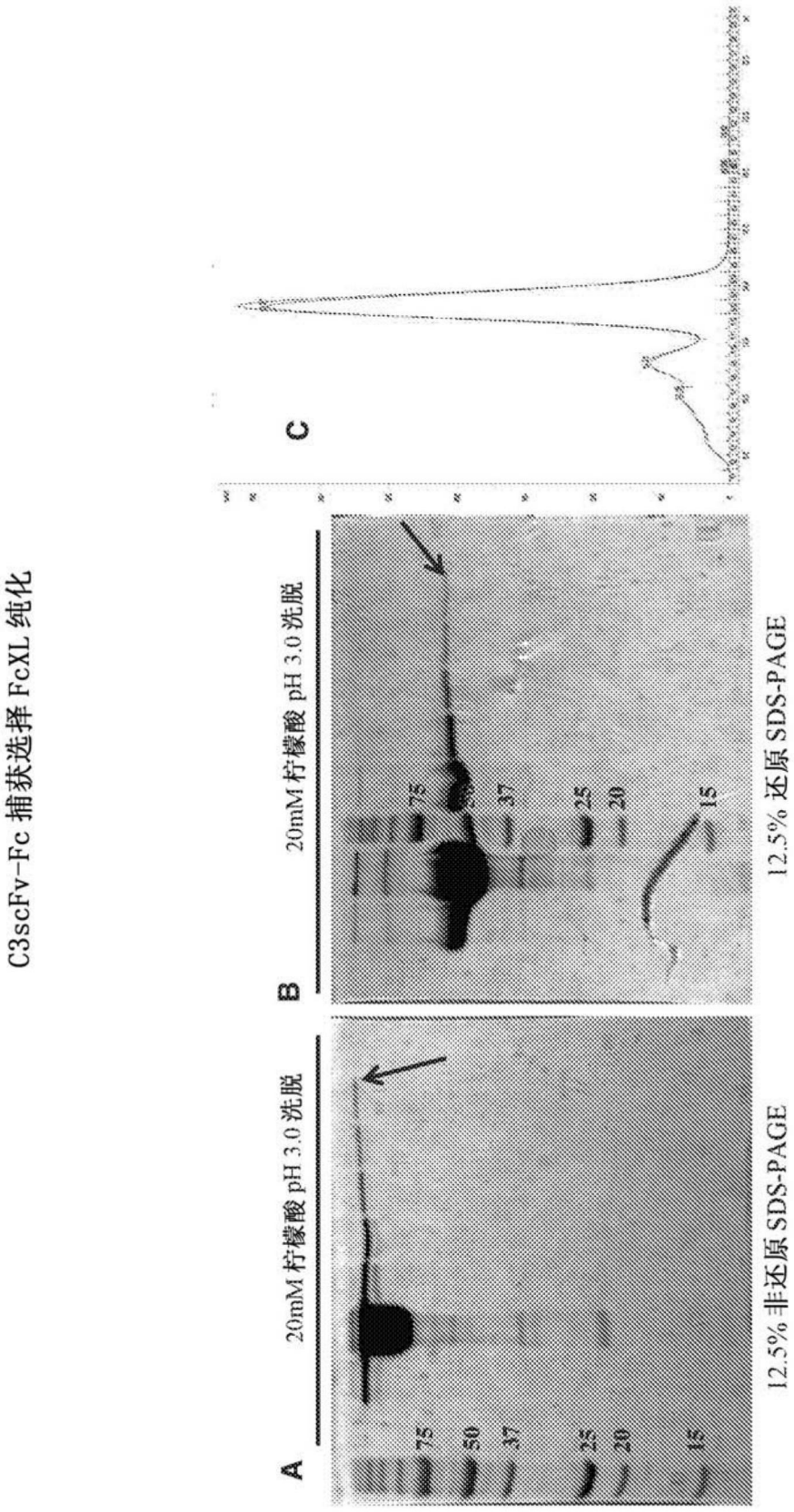

C3scFv-Fc 捕获选择 FcXL 纯化
A
20mM 柠檬酸 pH 3.0 洗脱
75
50
37
25
20
15
12.5% 非还原 SDS-PAGE
B
20mM 柠檬酸 pH 3.0 洗脱
75
50
37
25
20
15
12.5% 还原 SDS-PAGE
C

图18

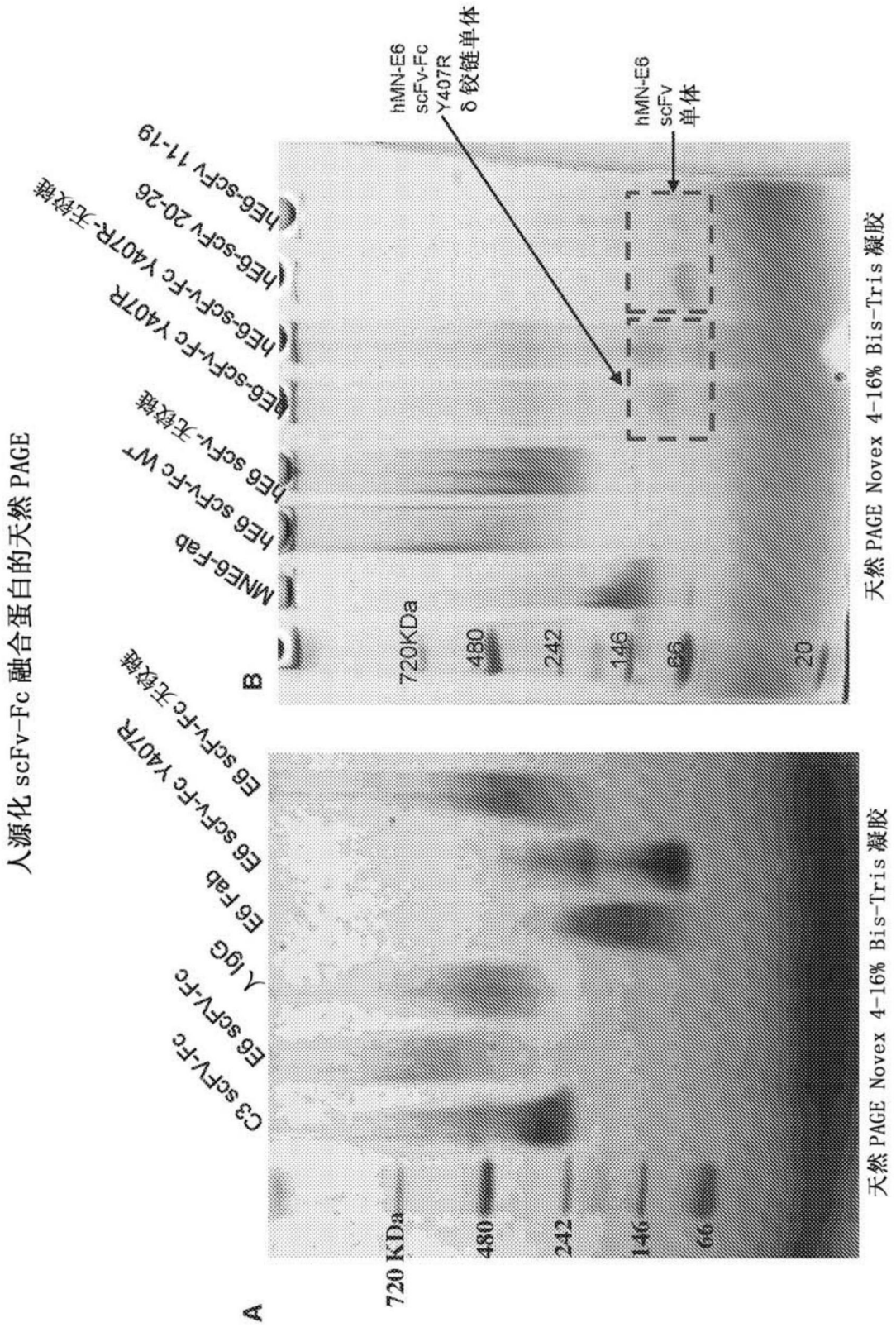

人源化 scFv-Fc 融合蛋白的天然 PAGE
A
720 KDa
480
242
146
66
C3 scFv-Fc
E6 scFv-Fc
λ IgG
E6 Fab
E6 scFv-Fc Y407R
E6 scFv-Fc 无铰链
天然 PAGE Novex 4-16% Bis-Tris 凝胶
B
720KDa
480
242
146
66
20
MNE6-Fab
hE6 scFv-Fc WT
hE6 scFv-无铰链
hE6-scFv-Fc Y407R
hE6-scFv-Fc Y407R-无铰链
hE6-scFv 20-26
hE6-scFv 11-19
hMN-E6 scFv-Fc Y407R δ 铰链单体
hMN-E6 scFv 单体
天然 PAGE Novex 4-16% Bis-Tris 凝胶

图19

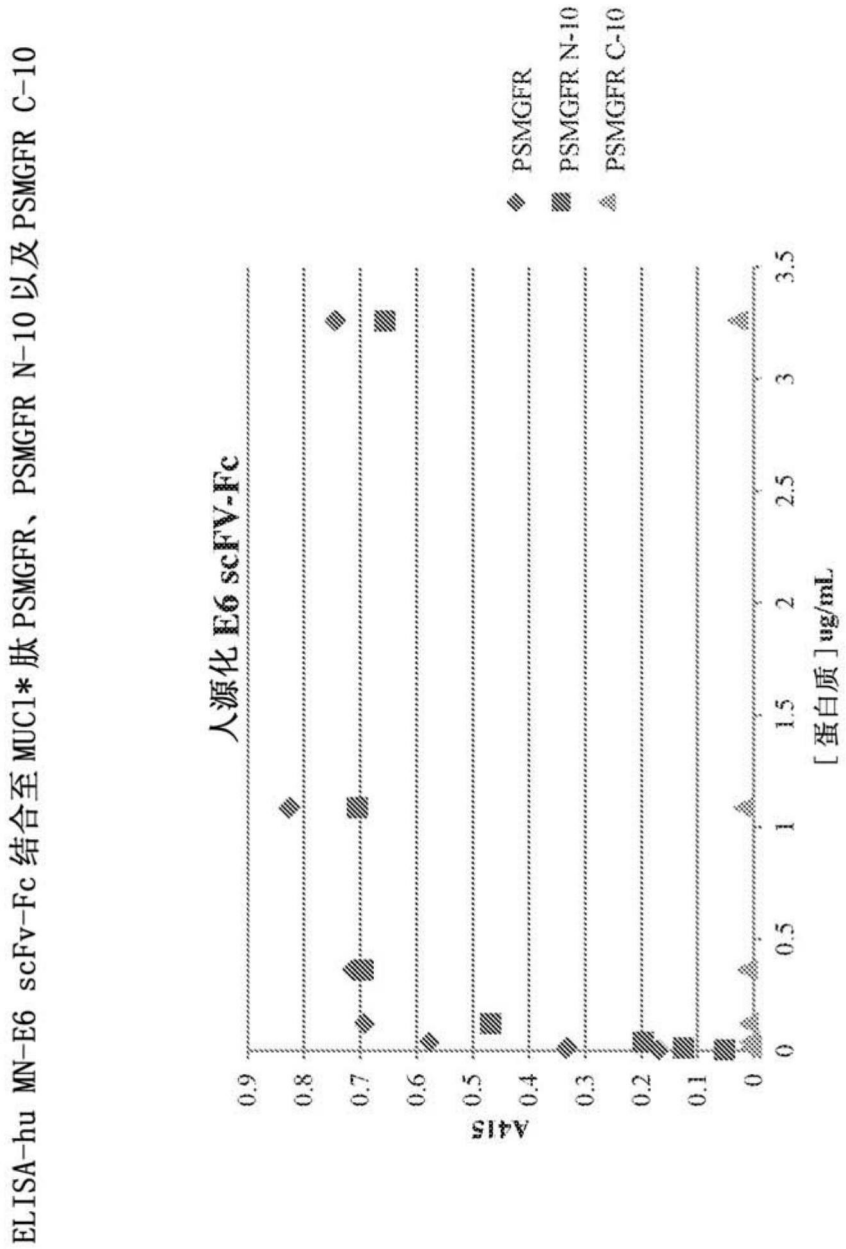

ELISA-hu MN-E6 scFv-Fc 结合至 MUC1* 肽 PSMGFR、PSMGFR N-10 以及 PSMGFR C-10
人源化 E6 scFV-Fc
A415
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5
[蛋白质] ug/mL
PSMGFR
PSMGFR N-10
PSMGFR C-10

图20

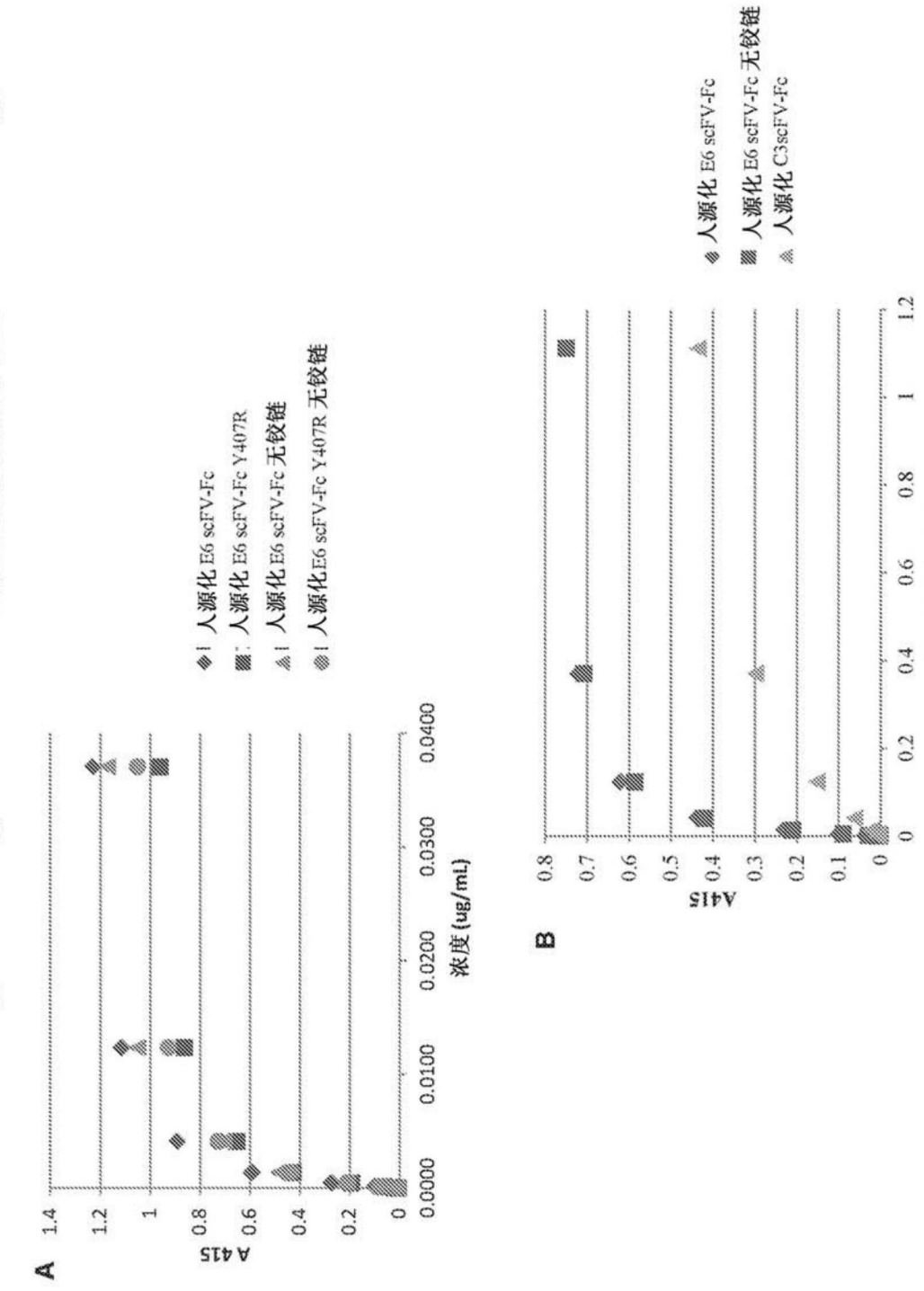

ELISA- 将 hu MN-E6 或 MN-C3 scFv-Fc 野生型或突变体结合至 MUC1* PSMGFR 肽
A
A415
浓度(ug/mL)
人源化 E6 scFV-Fc
人源化 E6 scFV-Fc Y407R
人源化 E6 scFV-Fc 无铰链
人源化E6 scFV-Fc Y407R 无铰链
B
A415
[蛋白质] ug/mL
人源化 E6 scFV-Fc
人源化 E6 scFV-Fc 无铰链
人源化 C3scFV-Fc

图21

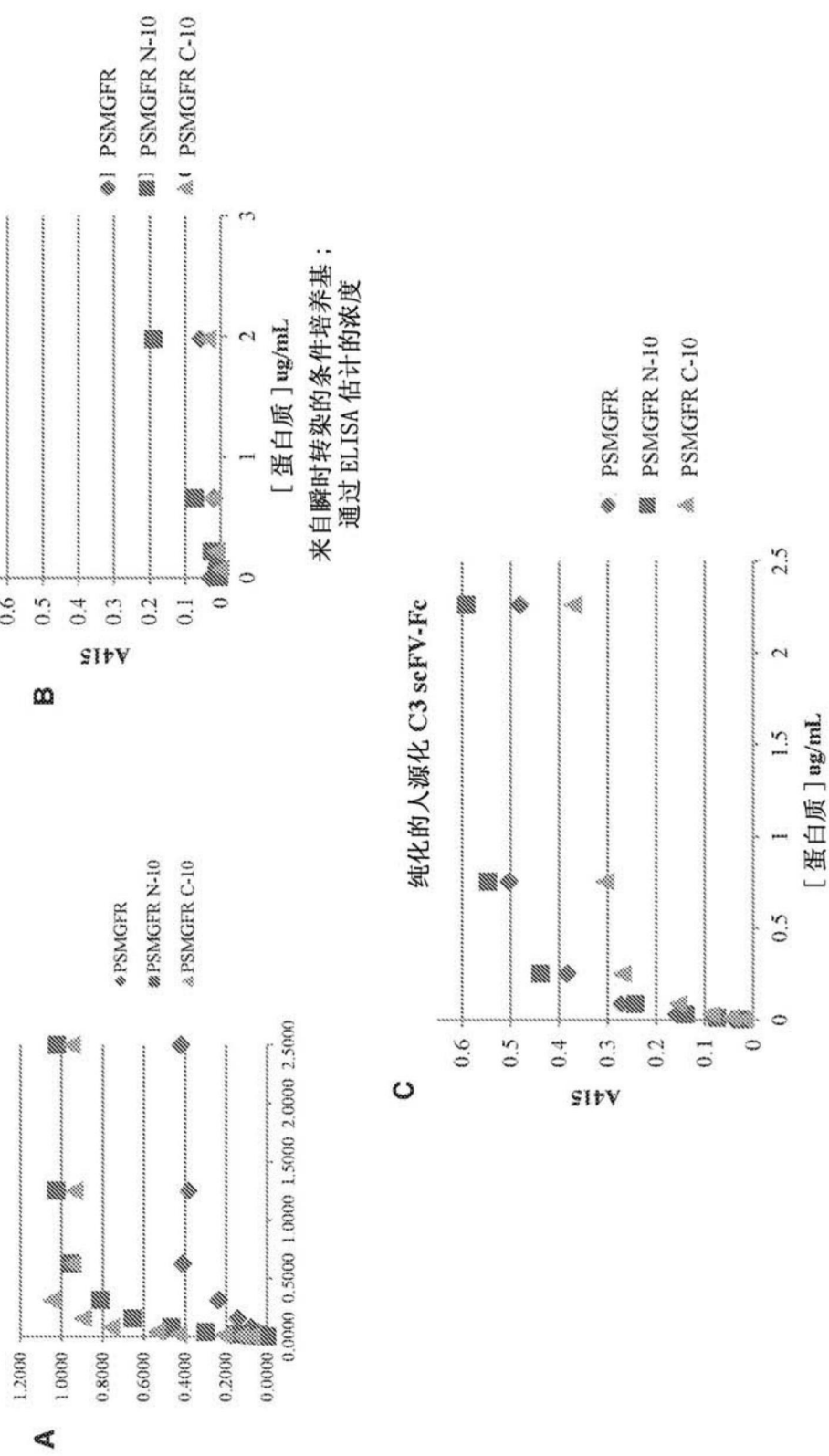

ELISA- 小鼠单克隆 MN-C3、人源化 MN-C3 和人源化 MN-C3
scFv-Fc 结合至 MUC1* 肽 PSMGFR、PSMGFR N-10 以及 PSMGFR C-10
小鼠 C3 IgG
A
A415
PSMGFR
PSMGFR N-10
PSMGFR C-10
[蛋白质] ug/mL
上清液的不纯的人源化 C3 1gG
B
来自瞬时转染的条件培养基；
通过 ELISA 估计的浓度
纯化的人源化 C3 scFV-Fc
C

图22

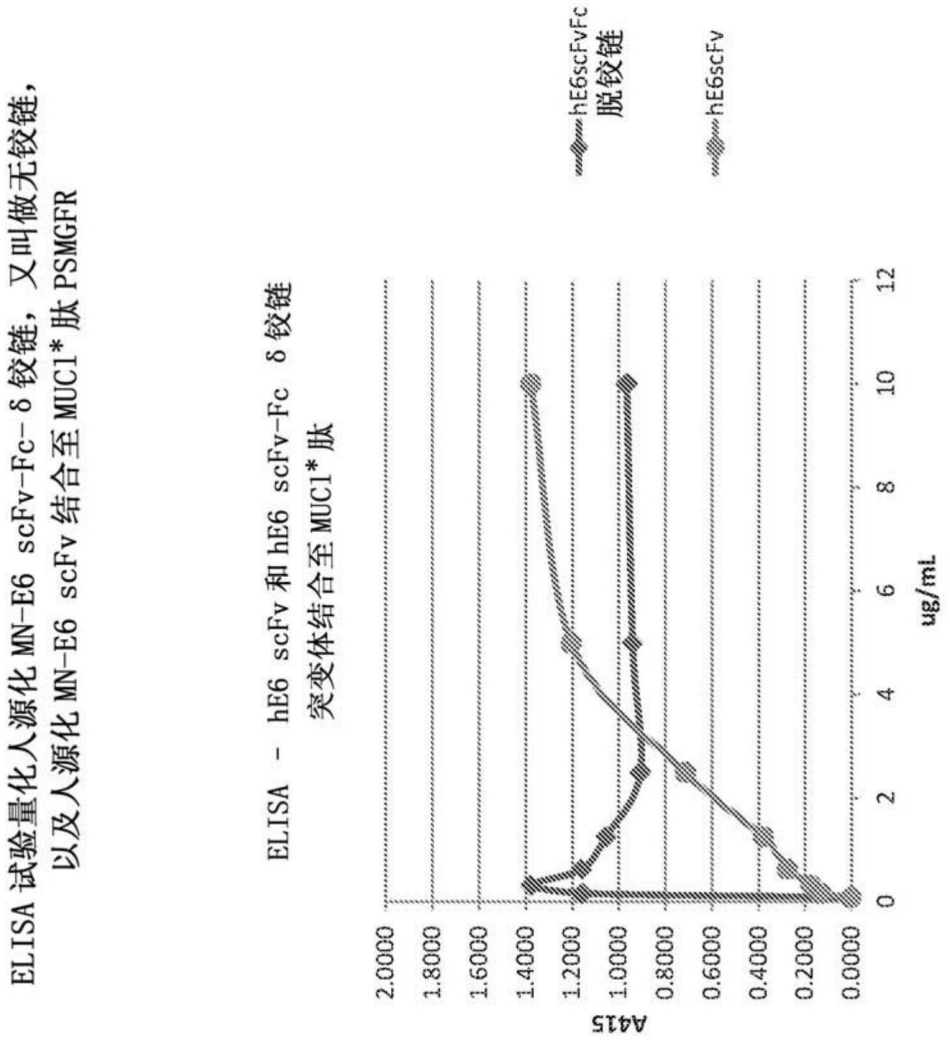

ELISA 试验量化人源化 MN-E6 scFv-Fc- δ 铰链，又叫做无铰链，
以及人源化 MN-E6 scFv 结合至 MUC1* 肽 PSMGFR
ELISA - hE6 scFv 和 hE6 scFv-Fc δ 铰链
突变体结合至 MUC1* 肽
hE6scFvFc
脱铰链
hE6scFv
A415
2.0000
1.8000
1.6000
1.4000
1.2000
1.0000
0.8000
0.6000
0.4000
0.2000
0.0000
0
2
4
6
8
10
12
ug/mL

图23

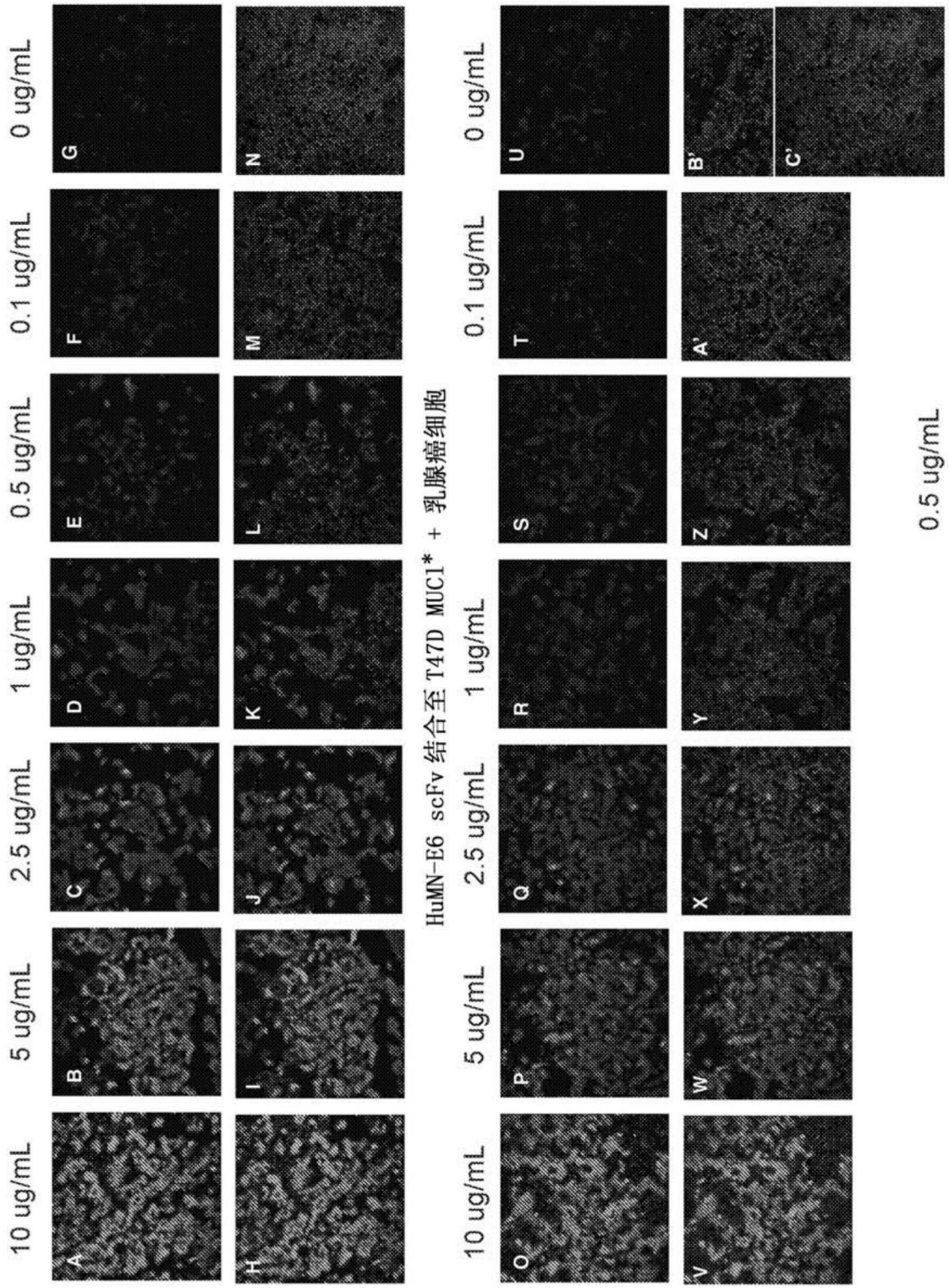

10 ug/mL
5 ug/mL
2.5 ug/mL
1 ug/mL
0.5 ug/mL
0.1 ug/mL
0 ug/mL
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X
Y
Z
A'
B'
C'
HuMN-E6 scFv 结合至 T47D MUC1* + 乳腺癌细胞
0.5 ug/mL

图24

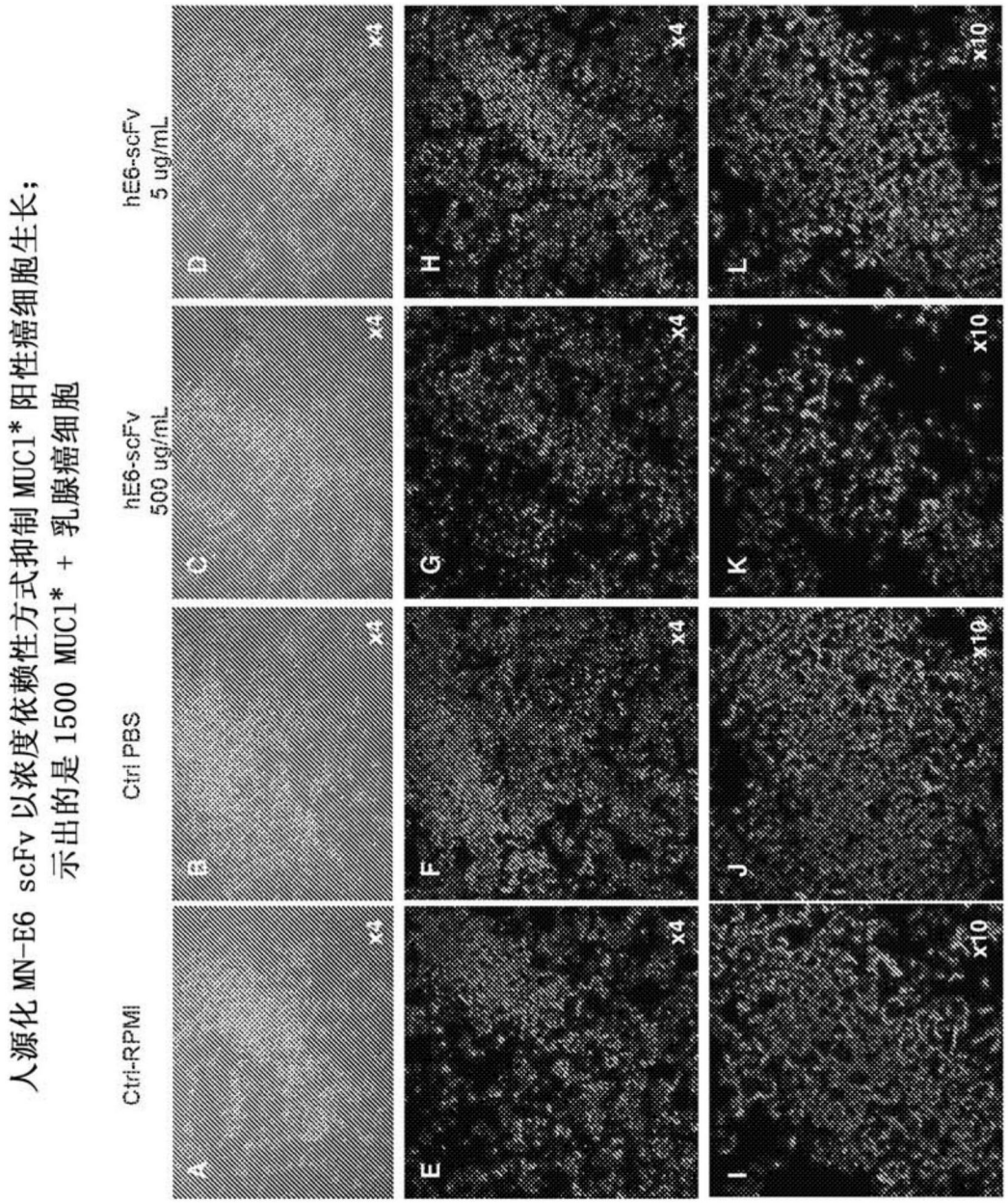

人源化 MN-E6 scFv 以浓度依赖性方式抑制 MUC1* 阳性癌细胞生长；
示出的是 1500 MUC1* + 乳腺癌细胞
Ctrl-RPMI
Ctrl PBS
hE6-scFv
500 ug/mL
hE6-scFv
5 ug/mL
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
x4
x10

图25

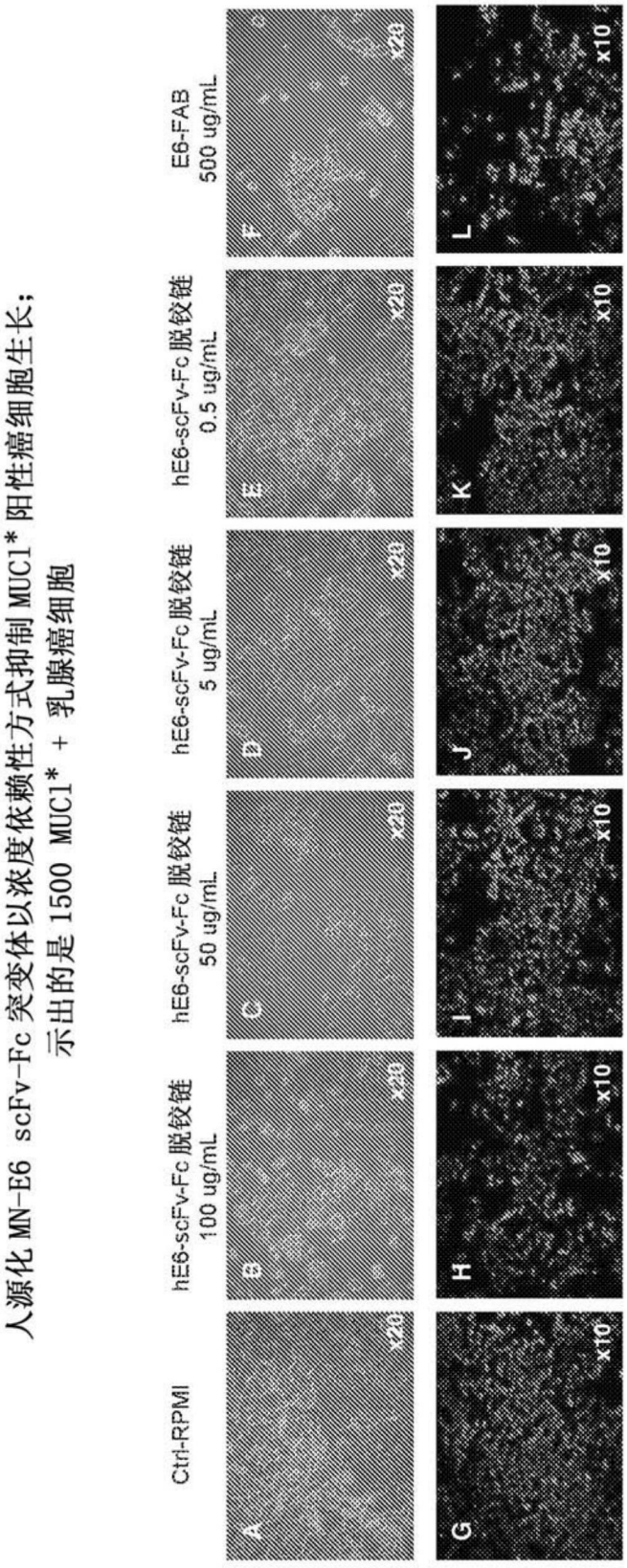

人源化 MN-E6 scFv-Fc 突变体以浓度依赖性方式抑制 MUC1* 阳性癌细胞生长；
示出的是 1500 MUC1* + 乳腺癌细胞
Ctrl-RPMI
hE6-scFv-Fc 脱铰链 100 ug/mL
hE6-scFv-Fc 脱铰链 50 ug/mL
hE6-scFv-Fc 脱铰链 5 ug/mL
hE6-scFv-Fc 脱铰链 0.5 ug/mL
E6-FAB 500 ug/mL
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
x20
x10

图26

使用像素计数 / 像素荧光强度的图像分析量化通过 MN-E6、人源化 MN-E6 scFv-Fc- δ 铰链又叫做无铰链、以及人源化 MN-E6 scFv 的 MUC1* 阳性癌症的生长抑制

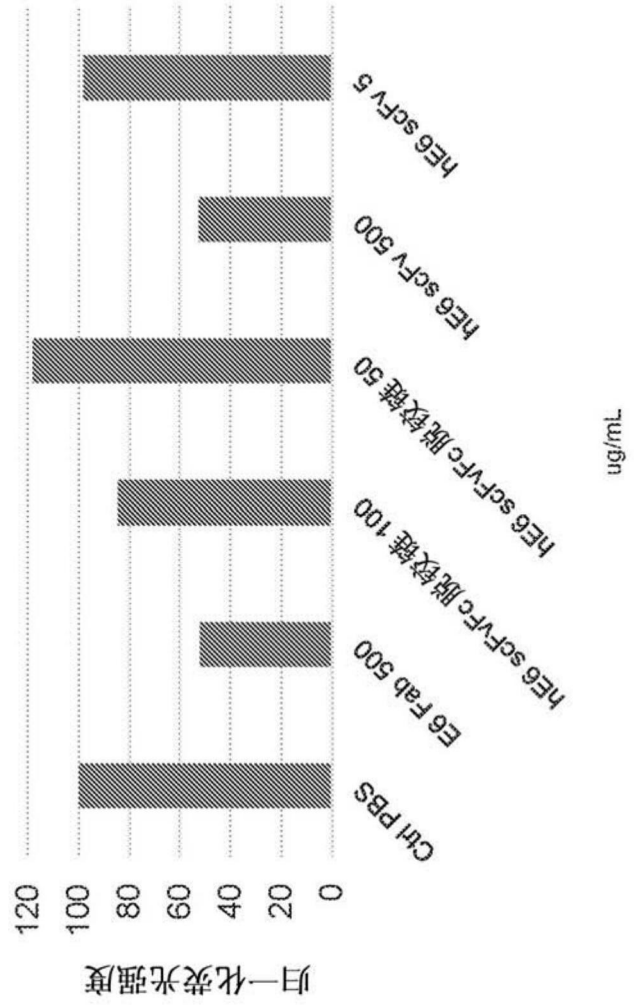


图27

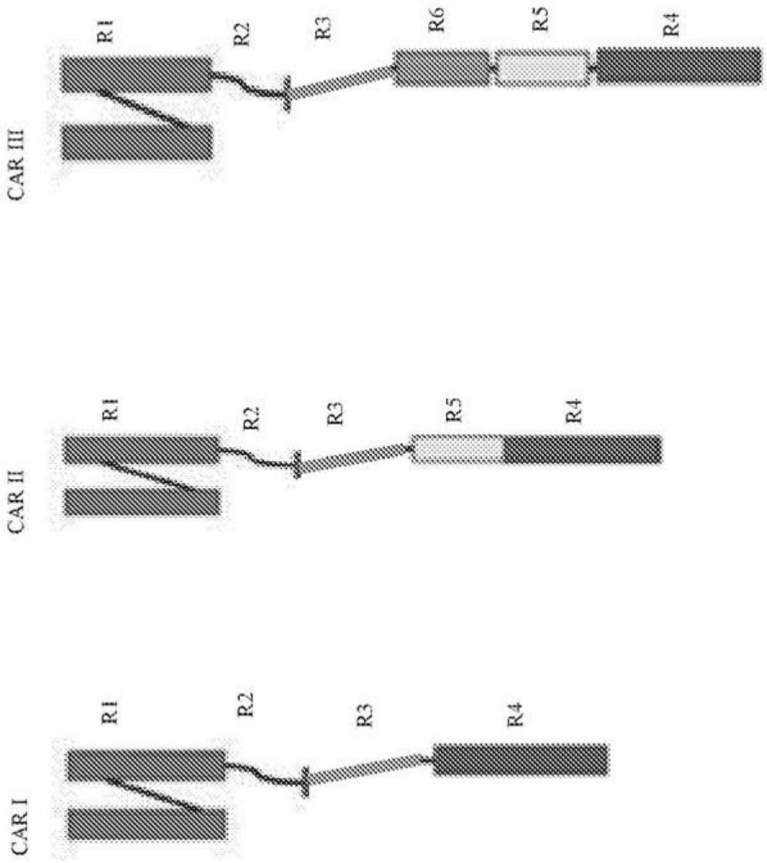


图28

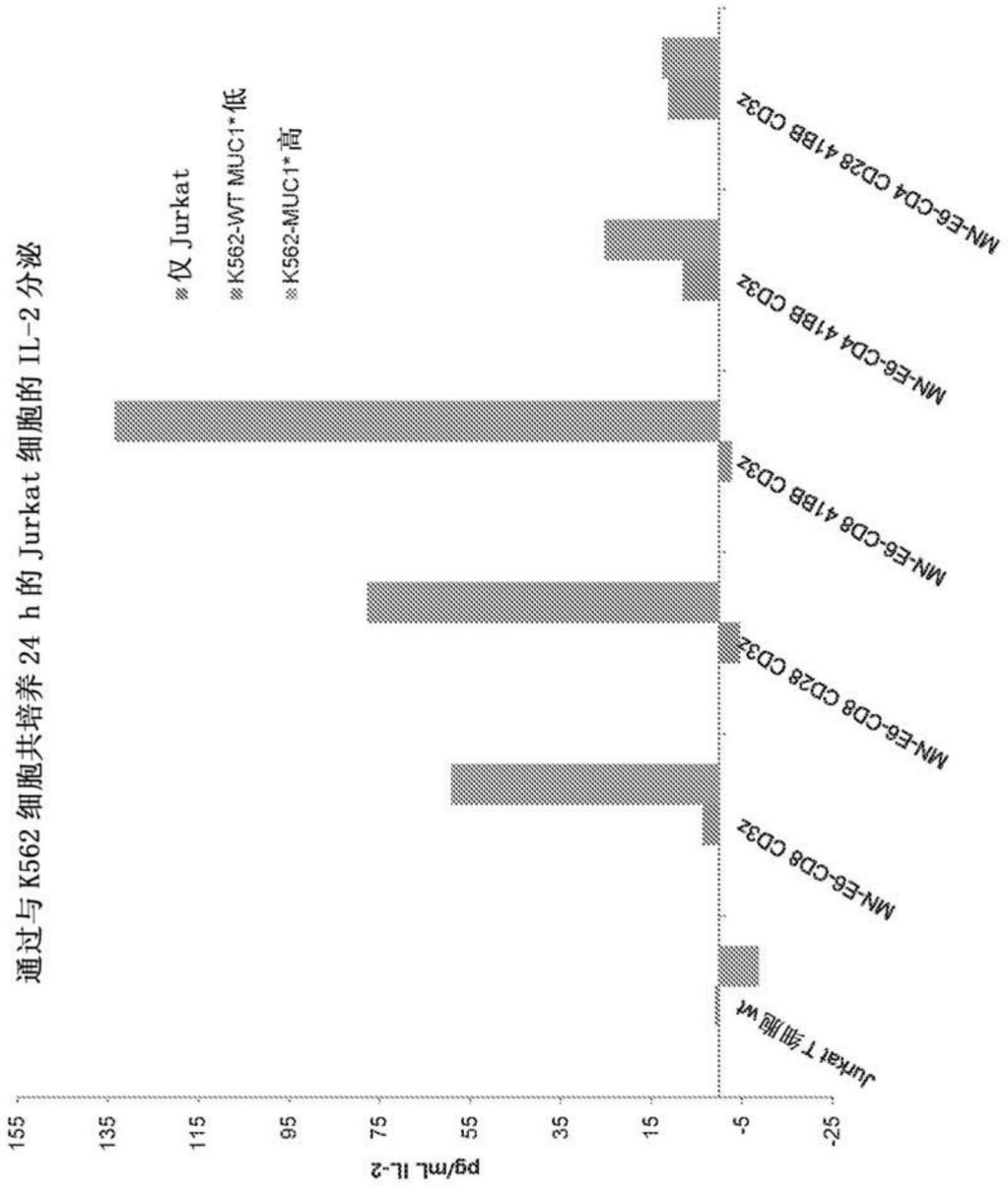

通过与 K562 细胞共培养 24 h 的 Jurkat 细胞的 IL-2 分泌
※仅 Jurkat
※K562-WT MUC1*低
※K562-MUC1* 高
pg/mL IL-2
155
135
115
95
75
55
35
15
-5
-25
Jurkat T 细胞 wt
MN-E6-CD8 CD3ζ
MN-E6-CD8 CD28 CD3ζ
MN-E6-CD8 4IBB CD3ζ
MN-E6-CD4 4IBB CD3ζ
MN-E6-CD4 CD28 4IBB CD3ζ

图29

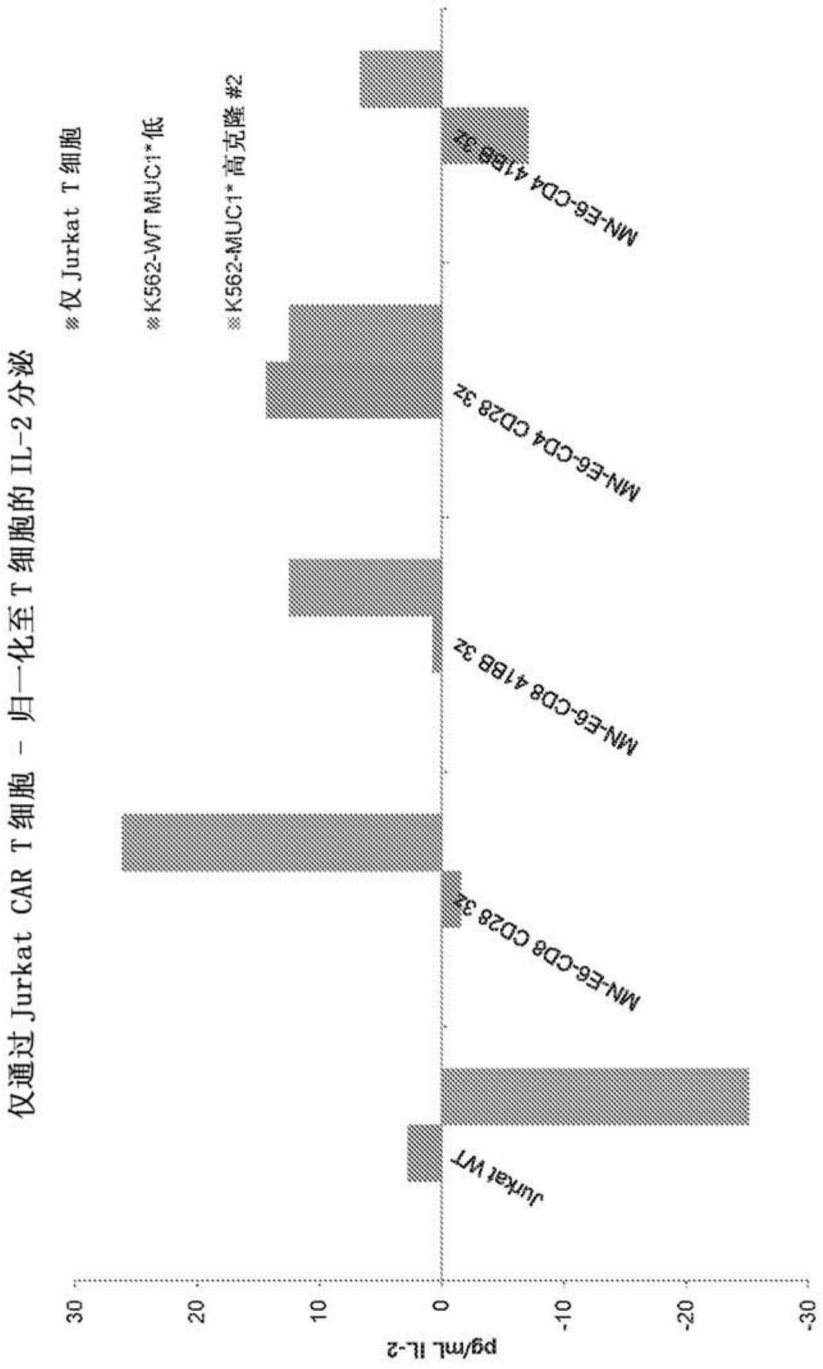

仅通过 Jurkat CAR T 细胞 - 归一化至 T 细胞的 IL-2 分泌
※仅 Jurkat T 细胞
※K562-WT MUC1*低
※K562-MUC1* 高克隆 #2
MN-E6-CD4 41BB 3z
MN-E6-CD4 CD28 3z
MN-E6-CD8 41BB 3z
MN-E6-CD8 CD28 3z
Jurkat WT
pg/mL IL-2
30
20
10
0
-10
-20
-30

图30

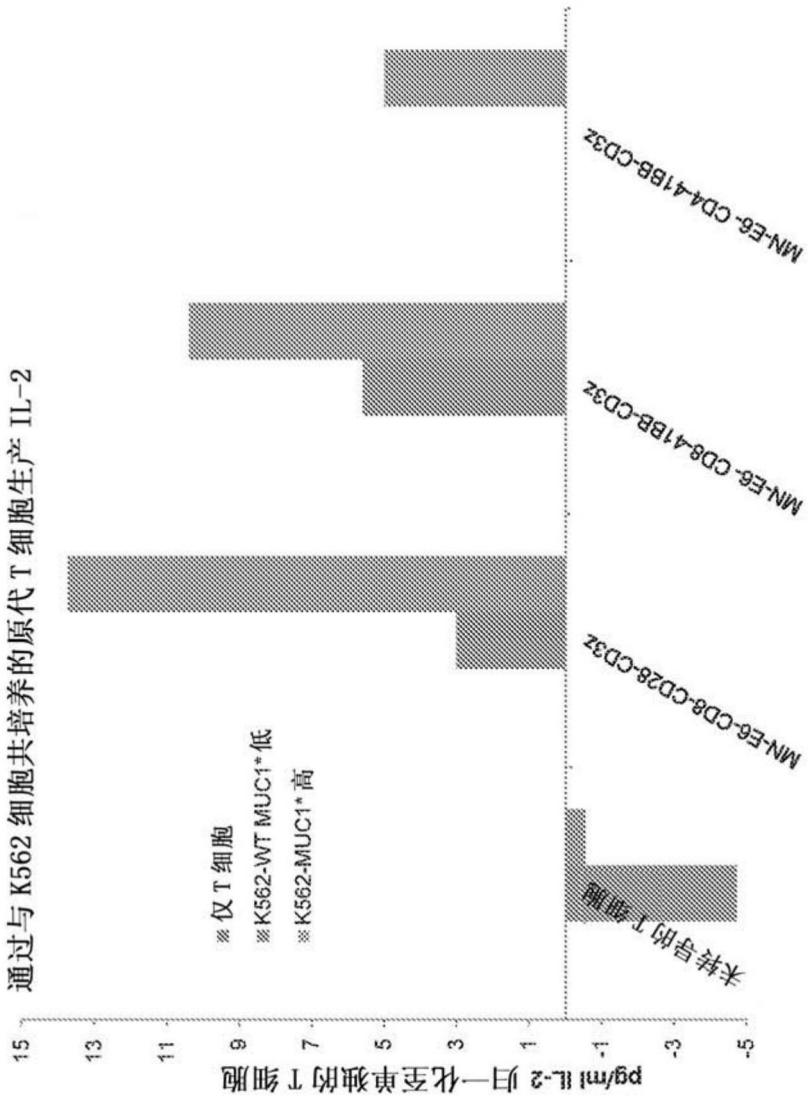

通过与 K562 细胞共培养的原代 T 细胞生产 IL-2
pg/ml IL-2 归一化至单独的 T 细胞
15
13
11
9
7
5
3
1
-1
-3
-5
※仅 T 细胞
※K562-WT MUC1*低
※K562-MUC1*高
未转导的 T 细胞
MN-E6-CD8-CD28-CD3z
MN-E6-CD8-4-1BB-CD3z
MN-E6-CD4-4-1BB-CD3z

图31

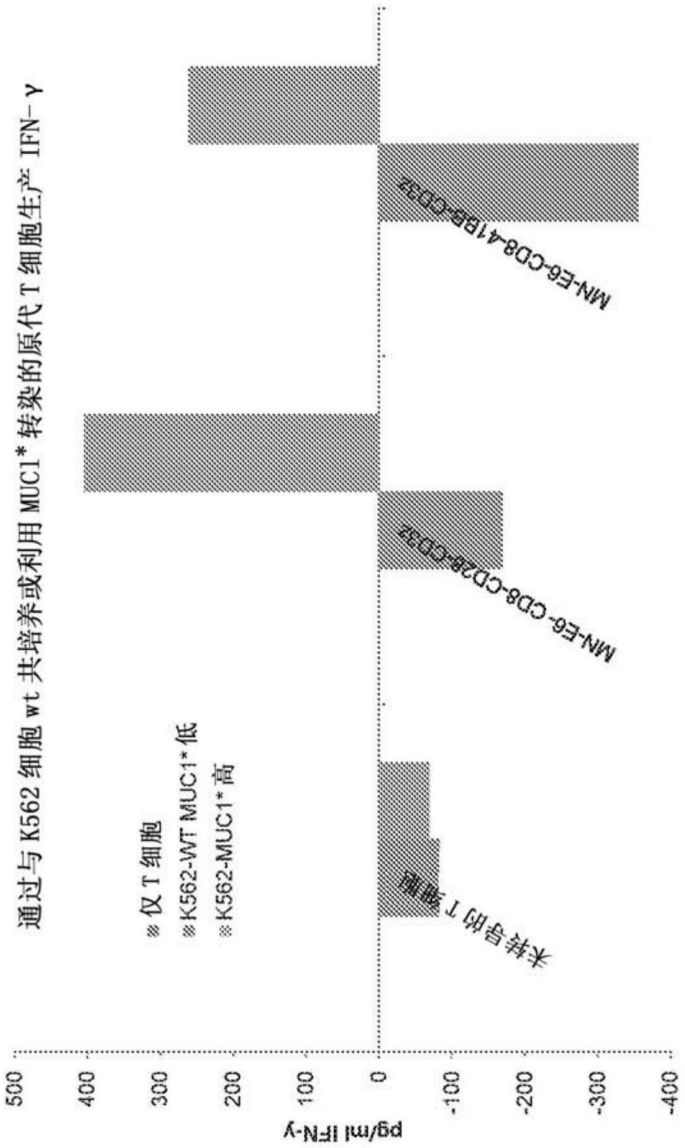

通过与 K562 细胞 wt 共培养或利用 MUC1* 转染的原代 T 细胞生产 IFN-γ
※仅 T 细胞
※K562-WT MUC1* 低
※K562-MUC1* 高
未转导的 T 细胞
MN-E6-CD8-CD28-CD3ζ
MN-E6-CD8-4-1BB-CD3ζ
pg/ml IFN-γ
500
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400

图32

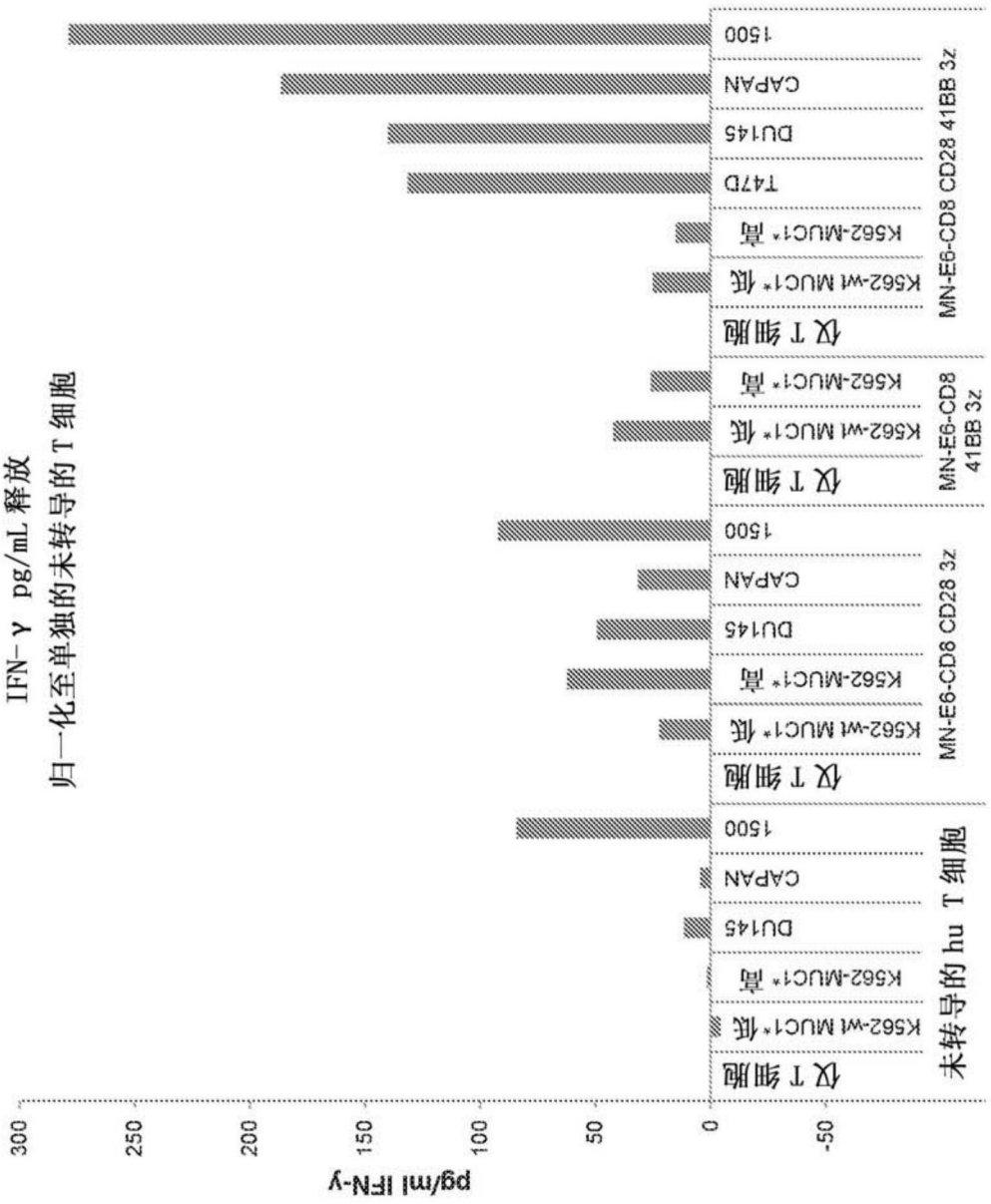

IFN-γ pg/mL 释放
归一化至单独的未转导的 T 细胞
pg/ml IFN-γ
300
250
200
150
100
50
0
-50
未转导的 hu T 细胞
仅 T 细胞
K562-wt MUC1* 低
K562-MUC1* 高
DU145
CAPAN
1500
MN-E6-CD8 CD28 3z
MN-E6-CD8 41BB 3z
MN-E6-CD8 CD28 41BB 3z
T47D

图33

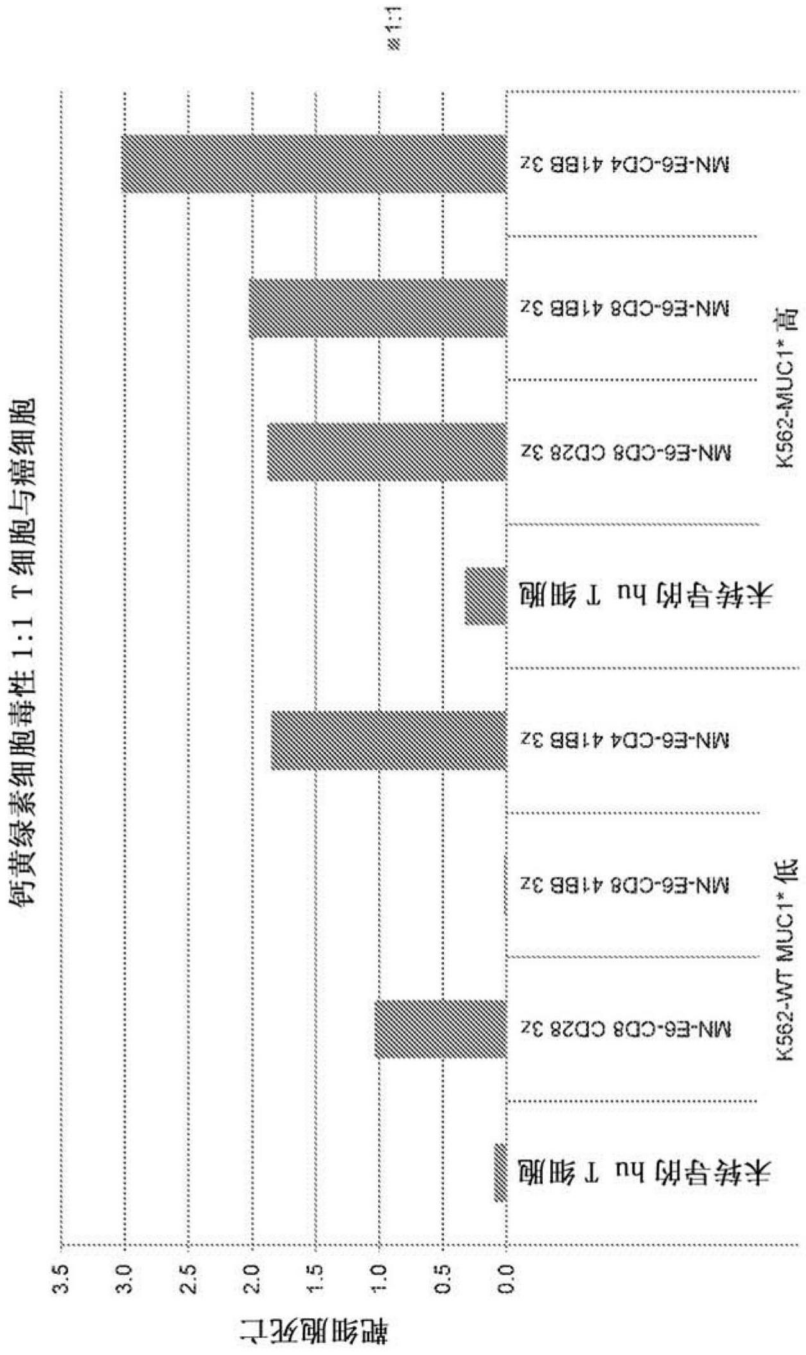

※1:1
钙黄绿素细胞毒性 1:1 T 细胞与癌细胞
靶细胞死亡
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未转导的 hu T 细胞
MN-E6-CD28 3z
MN-E6-CD8 41BB 3z
MN-E6-CD4 41BB 3z
K562-WT MUC1* 低
未转导的 hu T 细胞
MN-E6-CD28 3z
MN-E6-CD8 41BB 3z
MN-E6-CD4 41BB 3z
K562-MUC1* 高

图34

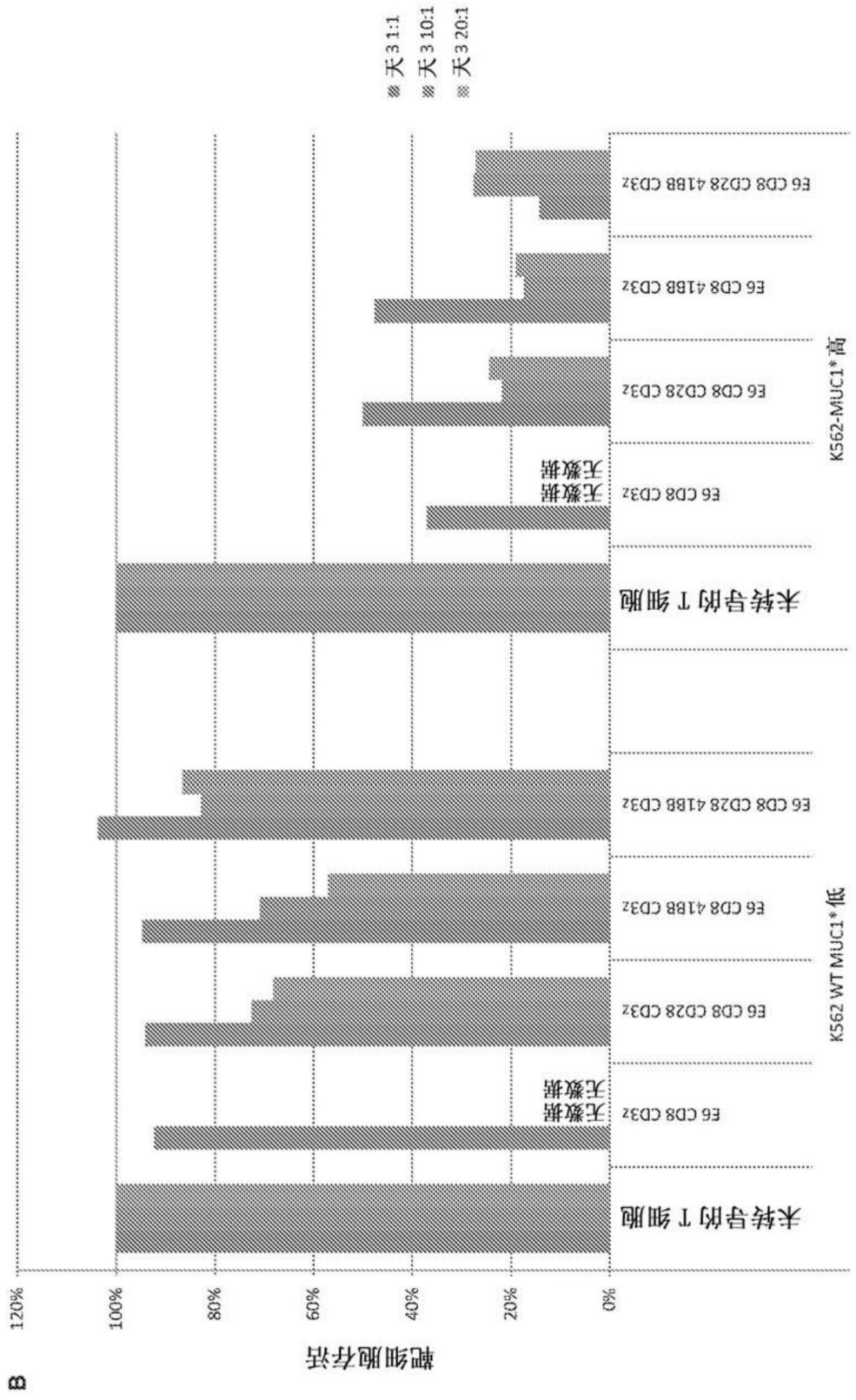

B
靶细胞存活
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
天 3 1:1
天 3 10:1
天 3 20:1
未转导的 T 细胞
E6 CD8 CD3z
无数据
E6 CD8 CD28 CD3z
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z
K562 WT MUC1* 低
未转导的 T 细胞
E6 CD8 CD3z
无数据
E6 CD8 CD28 CD3z
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z
K562-MUC1* 高

图35

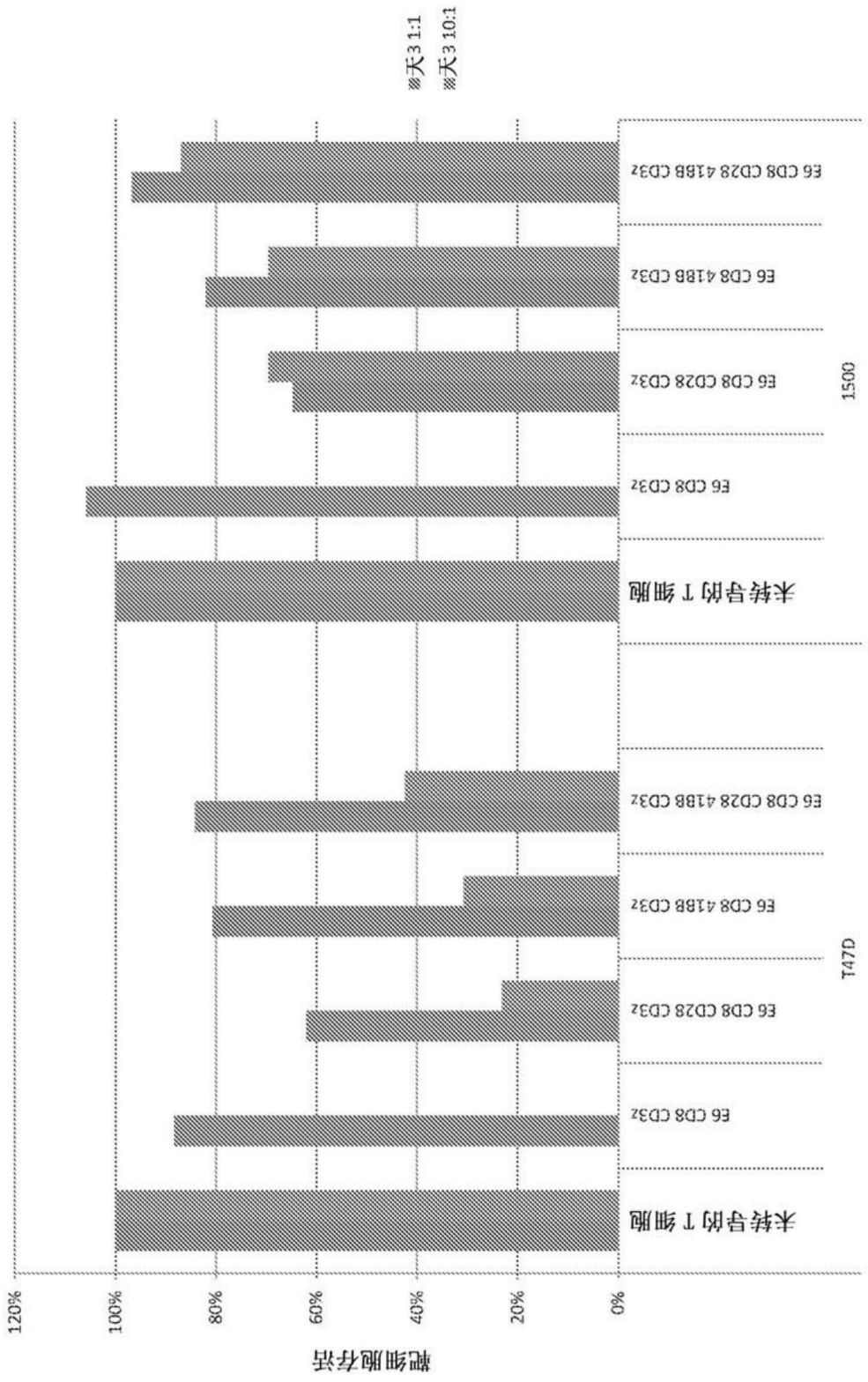

靶细胞存活
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
未转导的 T 细胞
E6 CD8 CD32
E6 CD8 CD28 CD32
E6 CD8 41BB CD32
E6 CD8 CD28 41BB CD32
T47D
未转导的 T 细胞
E6 CD8 CD32
E6 CD8 CD28 CD32
E6 CD8 41BB CD32
E6 CD8 CD28 41BB CD32
1500
效天3 10:1
效天3 1:1

图36

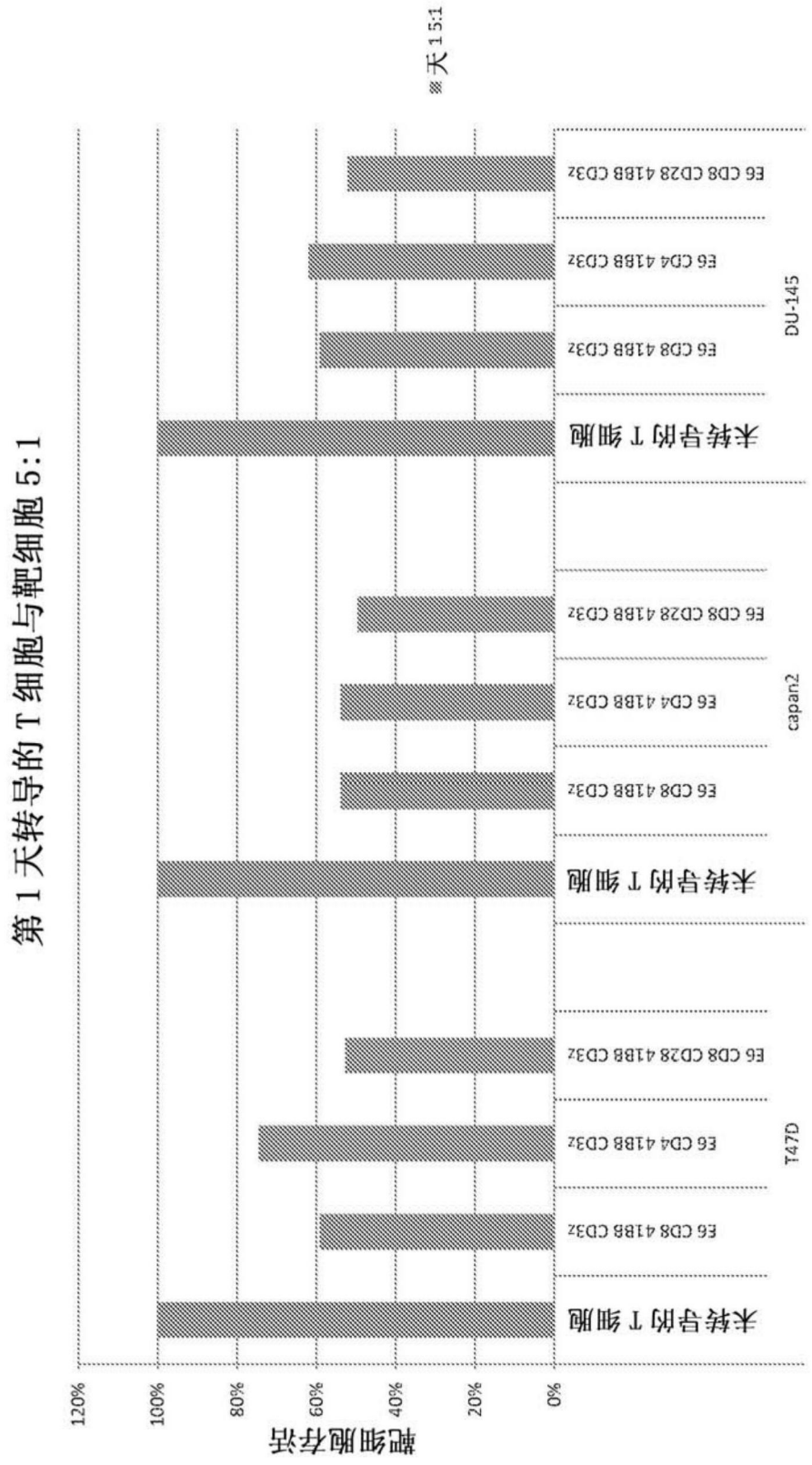

第1天转导的T细胞与靶细胞5:1
※天1 5:1
靶细胞存活
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
未转导的T细胞
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD4 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z
T47D
未转导的T细胞
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD4 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z
capan2
未转导的T细胞
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD4 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z
DU-145

图37

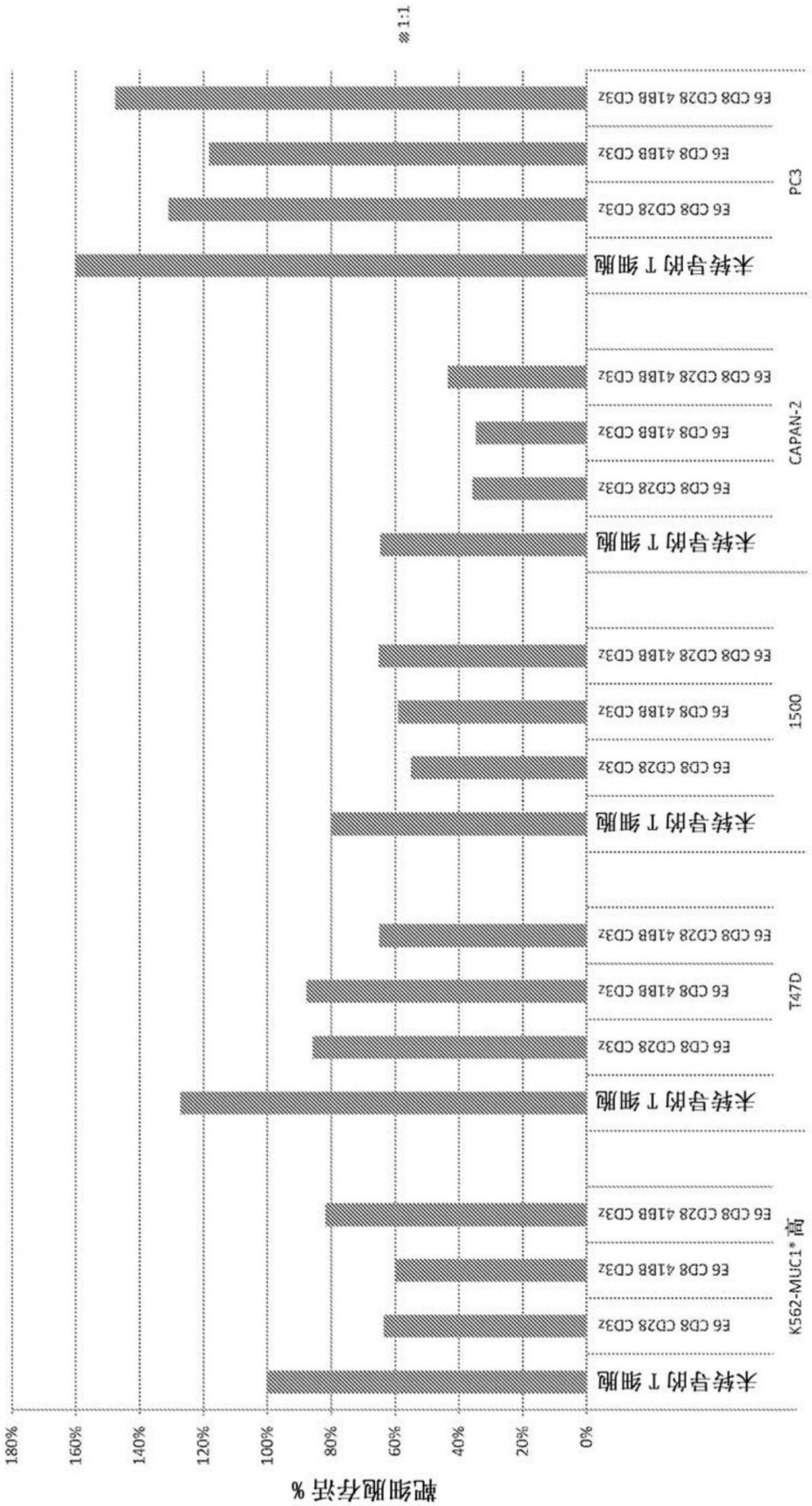

靶细胞存活 %
180%
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
K562-MUC1* 高
T47D
1500
CAPAN-2
PC3
未转导的 T 细胞
E6 CD8 CD28 CD3z
E6 CD8 4 1BB CD3z
E6 CD8 CD28 4 1BB CD3z
≈1:1

图38

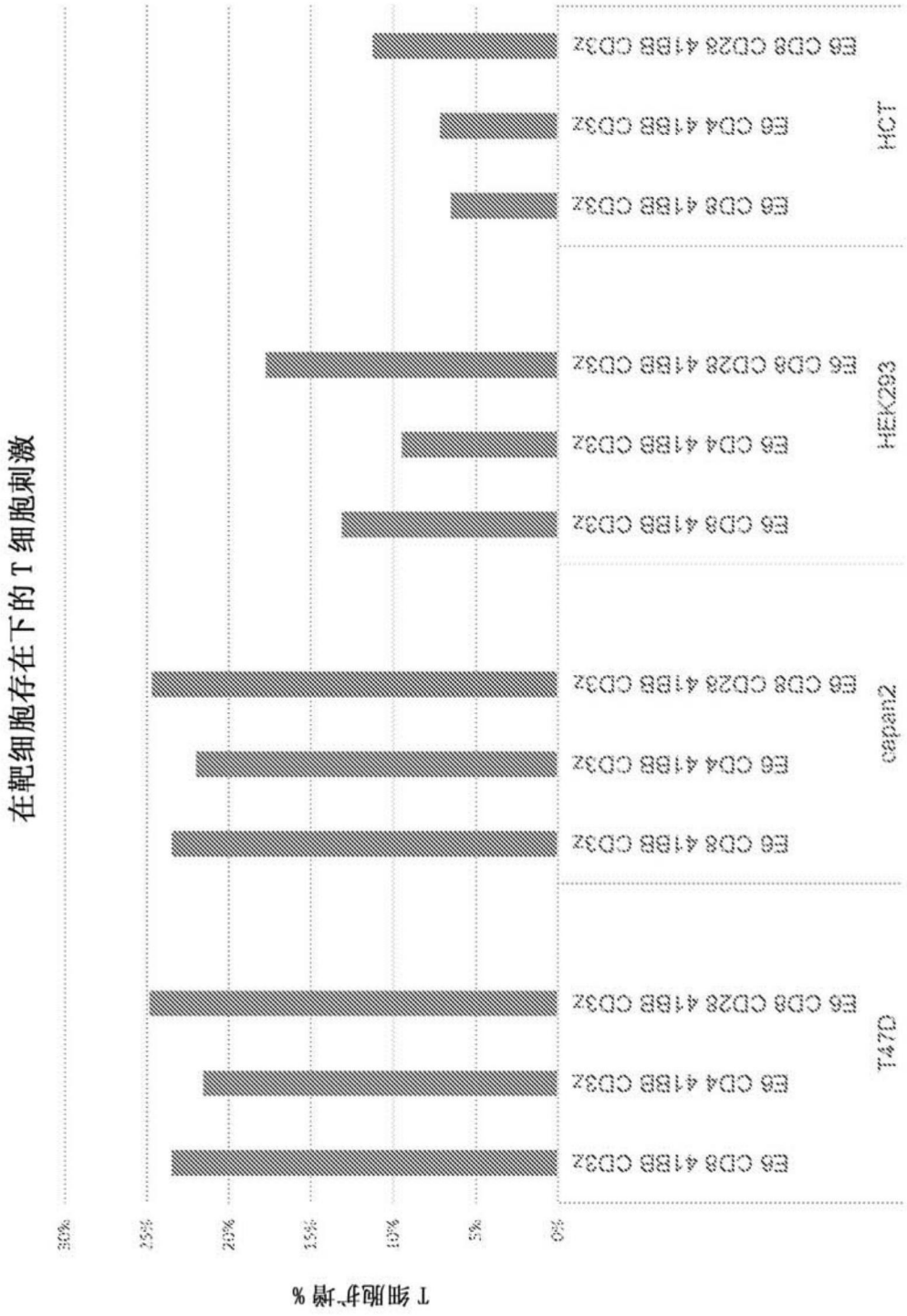

在靶细胞存在下的 T 细胞刺激
T 细胞扩增 %
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
T47D
capan2
HEK293
HCT
E6 CD8 41BB CD3z
E6 CD4 41BB CD3z
E6 CD8 CD28 41BB CD3z

图39

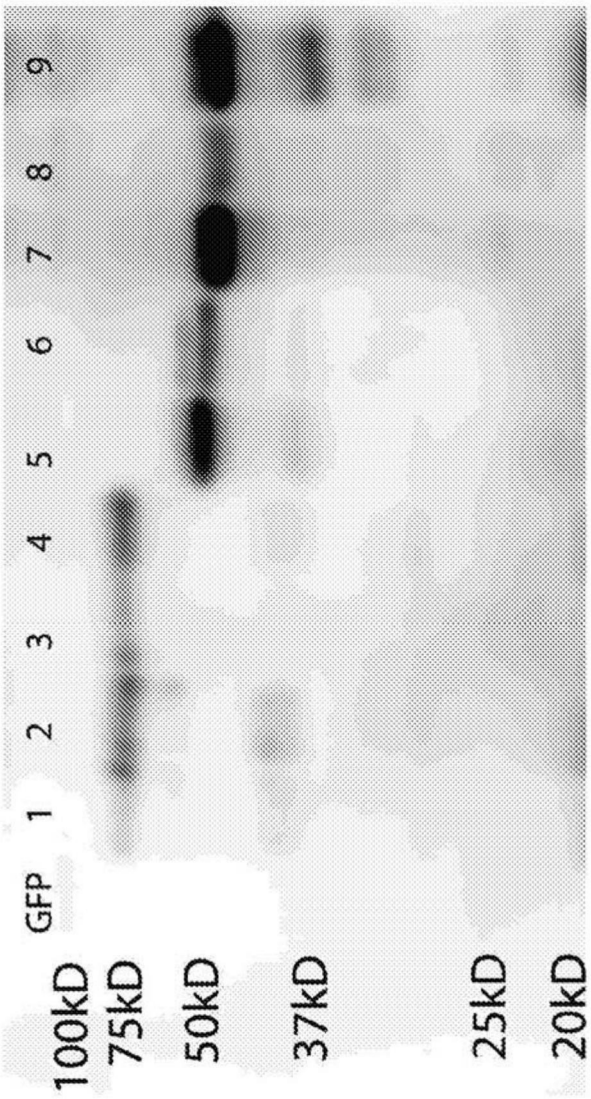


图40

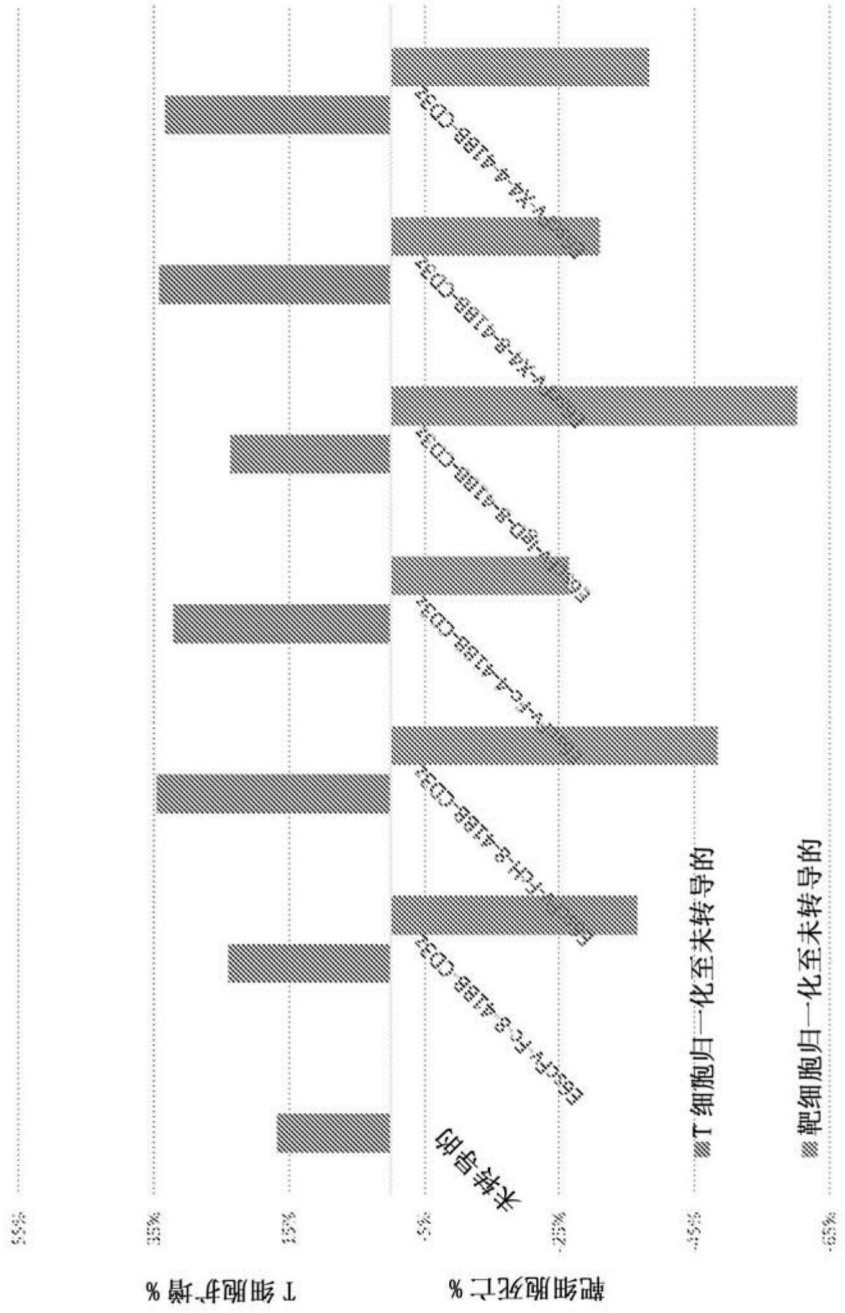


图41

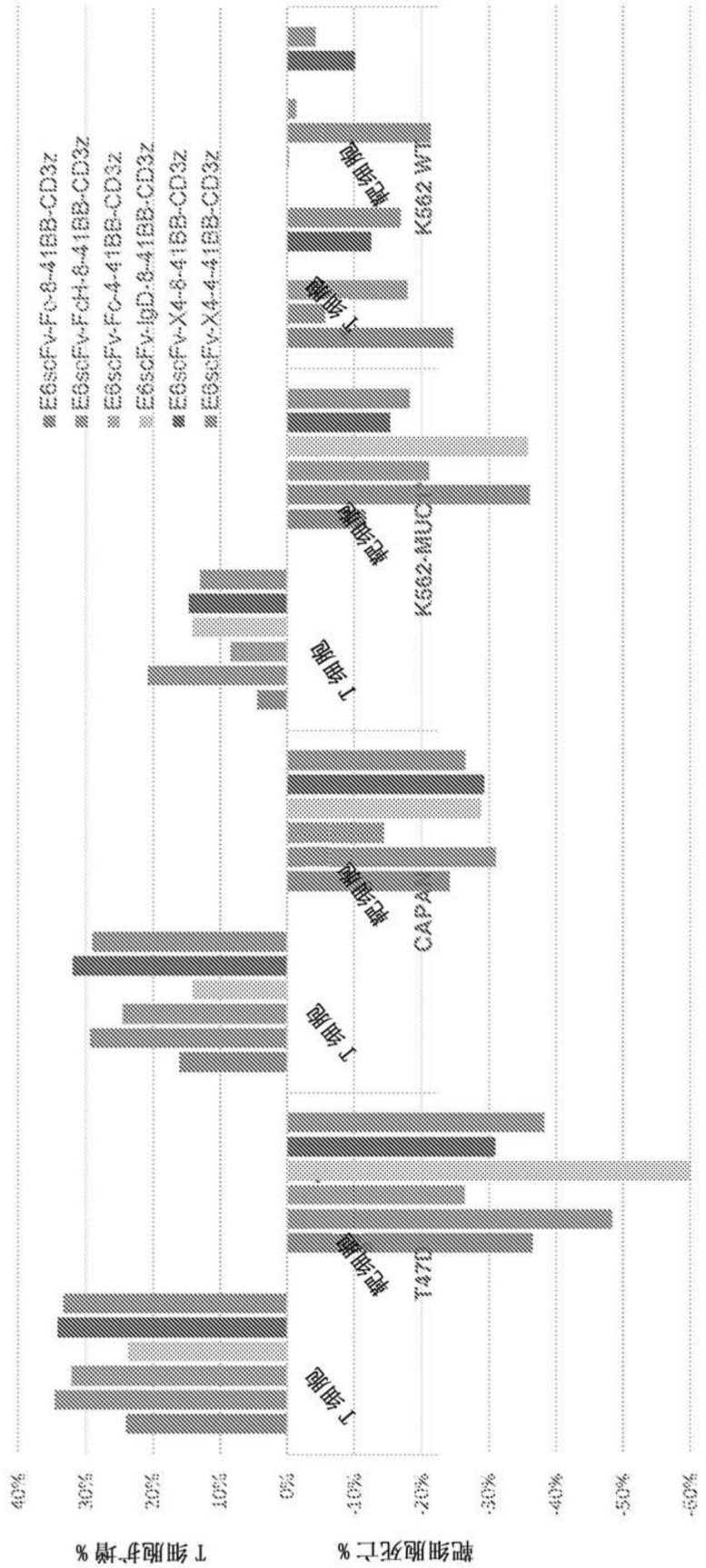

E6scFv-Fc-8-41BB-CD3z
E6scFv-Fch-8-41BB-CD3z
E6scFv-Fc-4-41BB-CD3z
E6scFv-IgD.8-41BB-CD3z
E6scFv-X4-8-41BB-CD3z
E6scFv-X4-4-41BB-CD3z
K562 WT
K562-MUC
CAPA
T471
靶细胞
T 细胞
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
-20%
-30%
-40%
-50%
-60%
T 细胞扩增 %
靶细胞死亡 %

图42

包含来自 240 个乳腺癌患者的试样的组织阵列利用识别全长 MUC1（左）的抗体（VU4H5）染色或利用识别 MUC1*(MN-C2)的抗体染色。数据表明癌组织上的 MUC1 的大多数或全部（绿色盒子）是 MUC1* 而不是 MUC1 全长（MUC1-FL）。数据进一步表明 MN-C2 单克隆抗体结合至癌组织而不是健康对照组织。

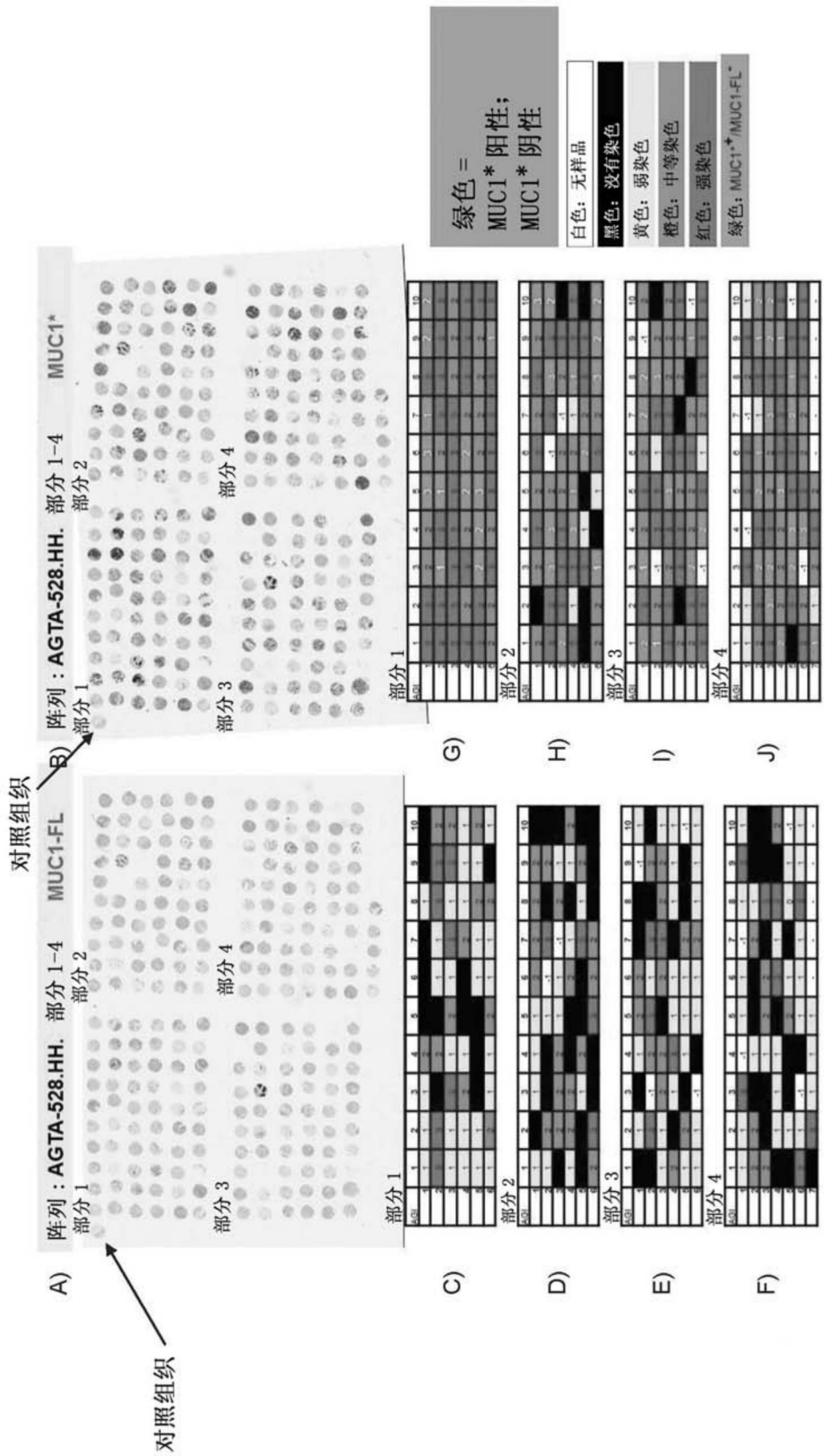


图43

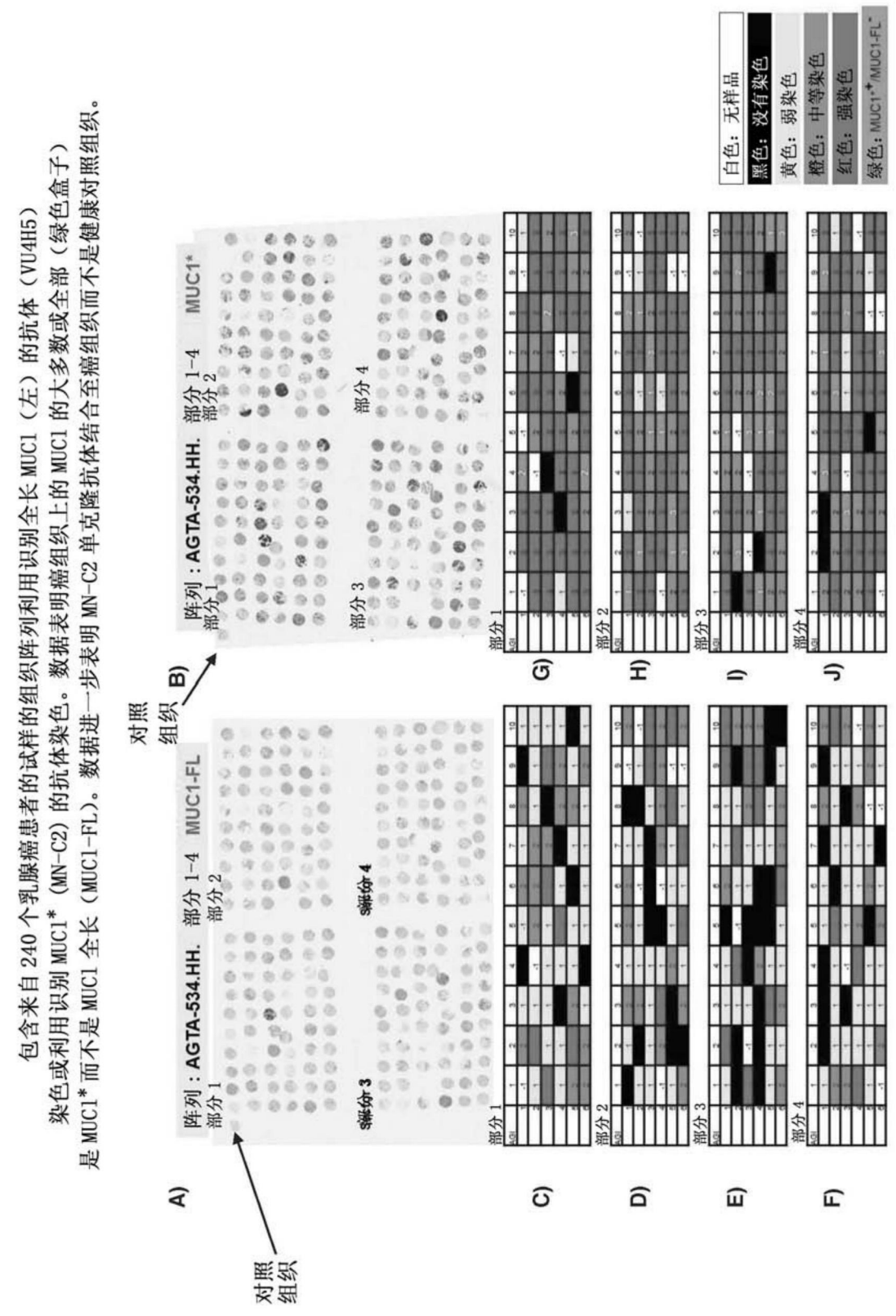

包含来自240个乳腺癌患者的试样的组织阵列利用识别全长MUC1（左）的抗体（VU4H5）
染色或利用识别MUC1*（MN-C2）的抗体染色。数据表明癌组织上的MUC1的大多数或全部（绿色盒子）
是MUC1*而不是MUC1全长（MUC1-FL）。数据进一步表明MN-C2单克隆抗体结合至癌组织而不是健康对照组织。
对照组织
对照组织
A)
B)
阵列：AGTA-534.HH.
部分1
部分2
部分3
部分4
MUC1-FL
MUC1*
C)
D)
E)
F)
G)
H)
I)
J)
白色：无样品
黑色：没有染色
黄色：弱染色
橙色：中等染色
红色：强染色
绿色：MUC1+/MUC1-FL-

图44

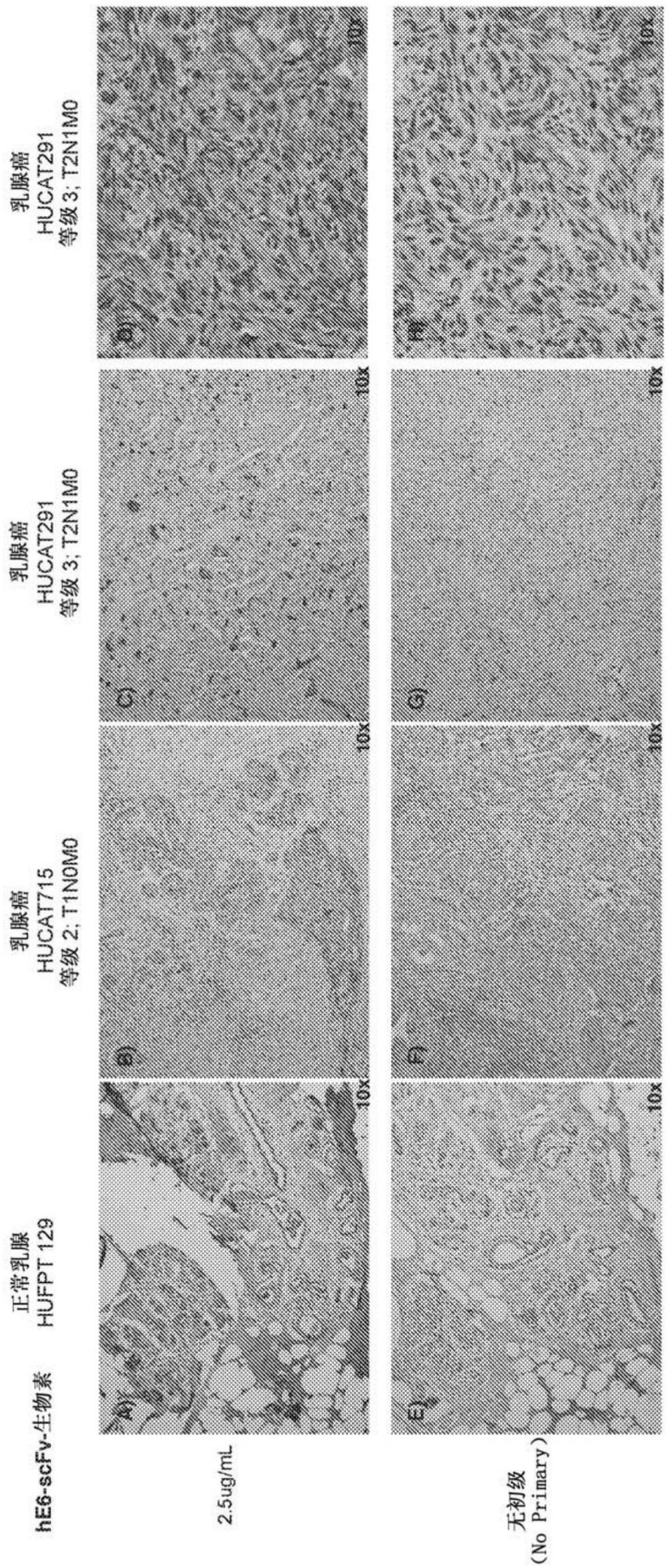

hE6-scFv-生物素
正常乳腺
HUFPT 129
乳腺癌
HUCAT715
等级 2; T1N0M0
乳腺癌
HUCAT291
等级 3; T2N1M0
乳腺癌
HUCAT291
等级 3; T2N1M0
2.5ug/mL
无初级
(No Primary)
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
10x

图45

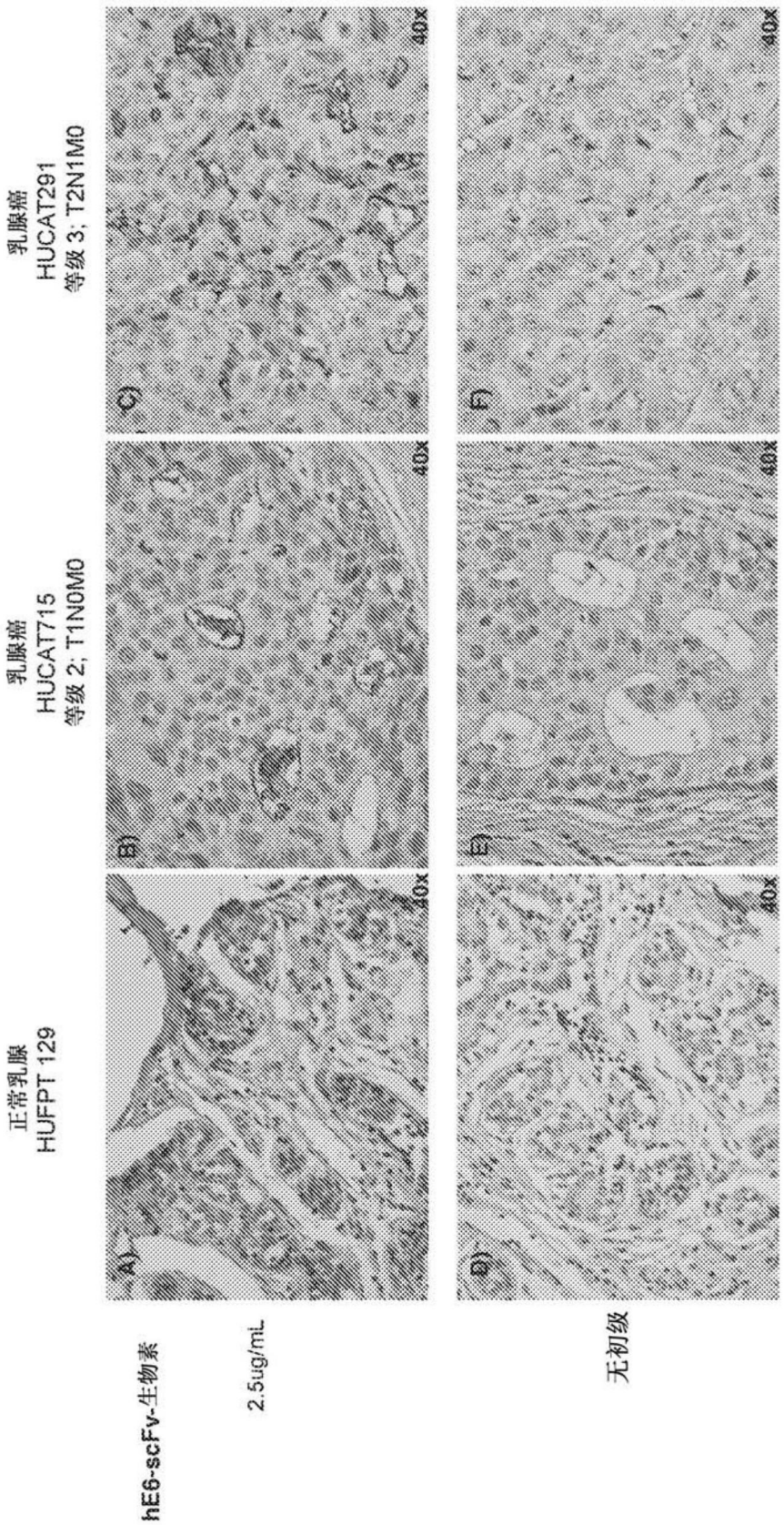

正常乳腺
HUFPT 129
乳腺癌
HUCAT715
等级 2; T1N0M0
乳腺癌
HUCAT291
等级 3; T2N1M0
A)
B)
C)
D)
E)
F)
40x
hE6-scFv-生物素
2.5ug/mL
无初级

图46

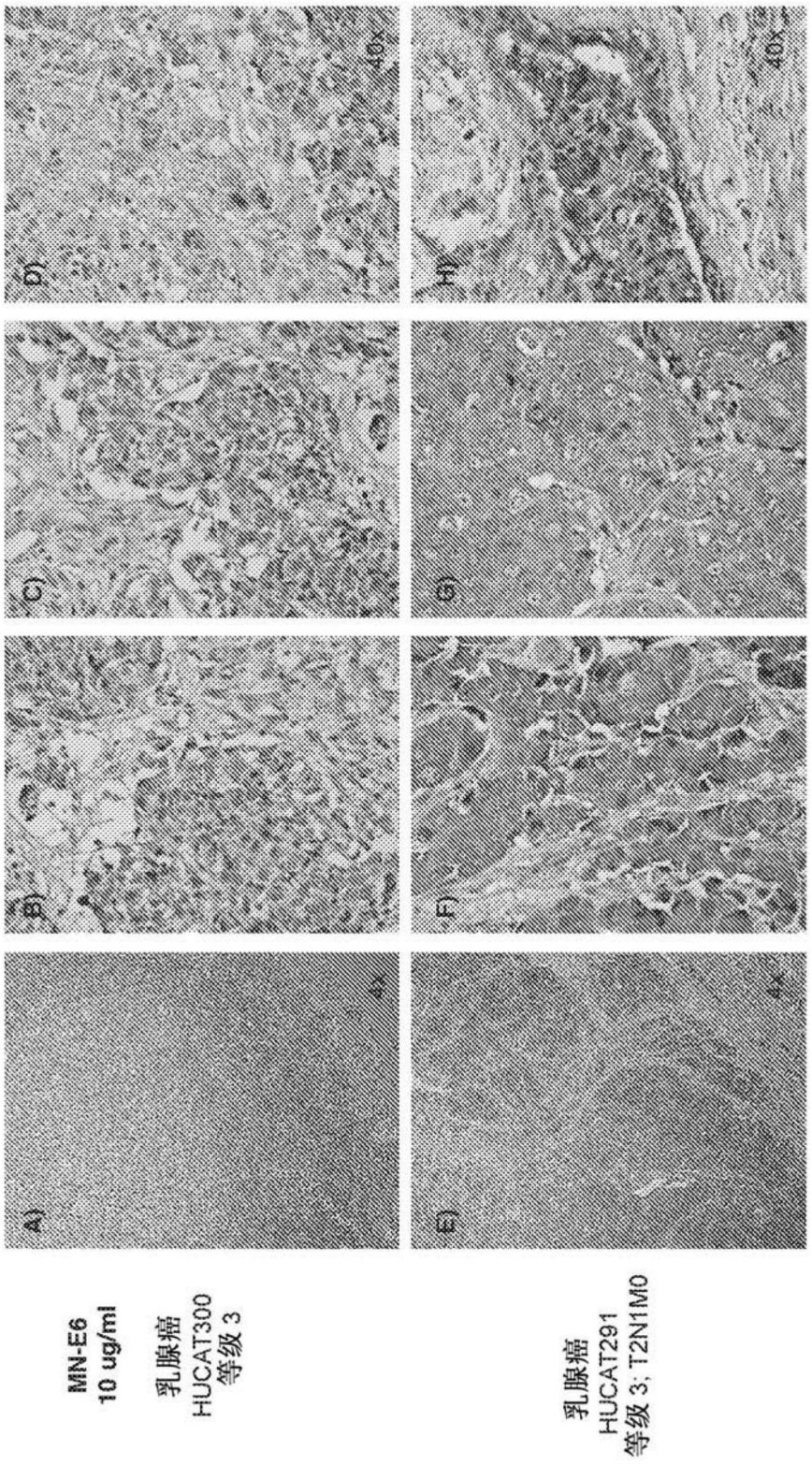

A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
MN-E6
10 ug/ml
乳腺癌
HUCAT300
等级 3
乳腺癌
HUCAT291
等级 3; T2N1M0

图47

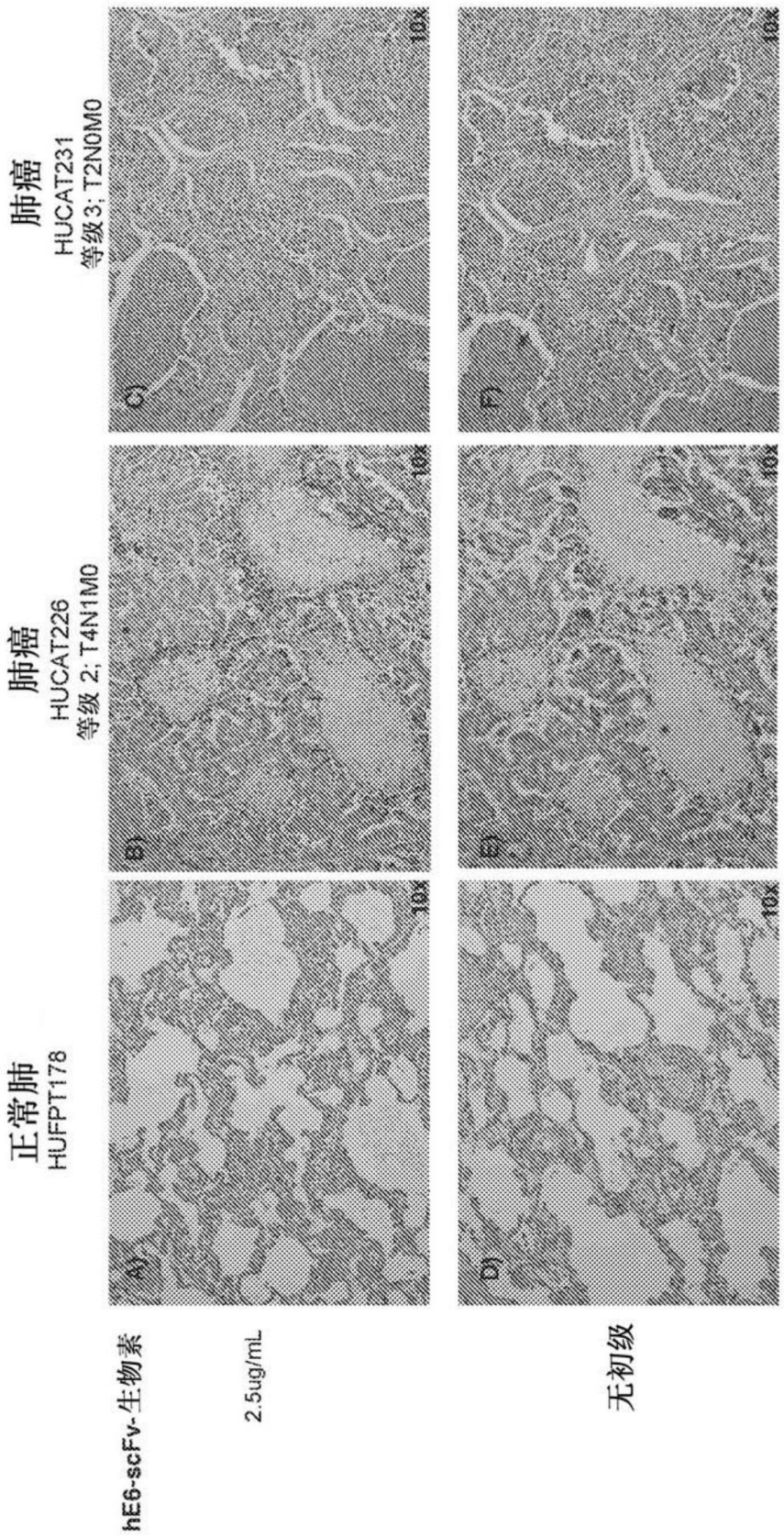

正常肺
HUFPT178
肺癌
HUCAT226
等级 2; T4N1M0
肺癌
HUCAT231
等级 3; T2N0M0
hE6-scFv-生物素
2.5ug/mL
无初级
A)
B)
C)
D)
E)
F)
10x

图48

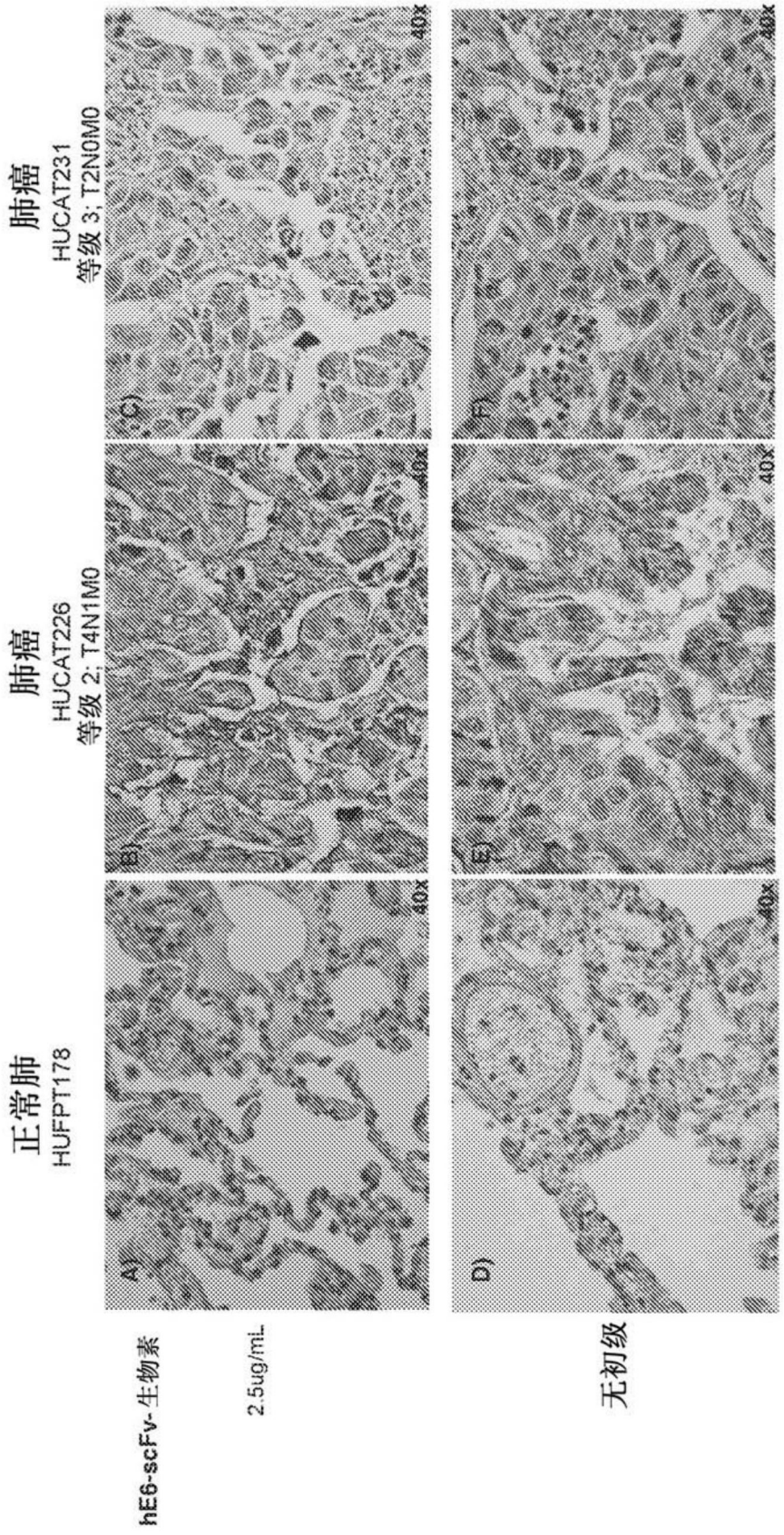

正常肺
HUFPT178
肺癌
HUCAT226
等级 2; T4N1M0
肺癌
HUCAT231
等级 3; T2N0M0
hE6-scFv-生物素
2.5ug/mL
无初级
A)
B)
C)
D)
E)
F)
40x

图49

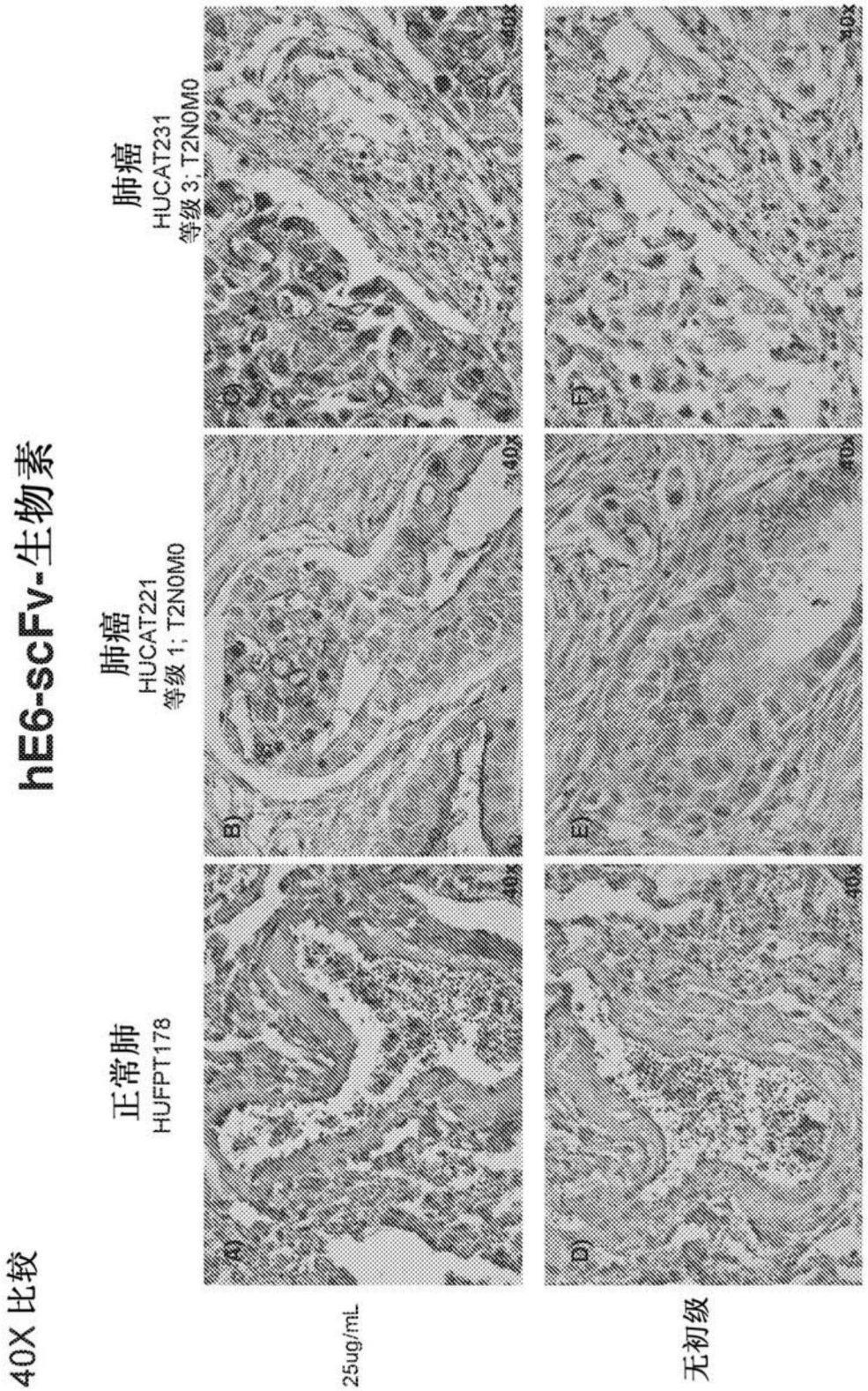

40X 比较
hE6-scFv-生物素
正常肺
HUFPT178
肺癌
HUCAT221
等级 1; T2N0M0
肺癌
HUCAT231
等级 3; T2N0M0
25ug/mL
无初级
A)
B)
C)
D)
E)
F)
40x

图50

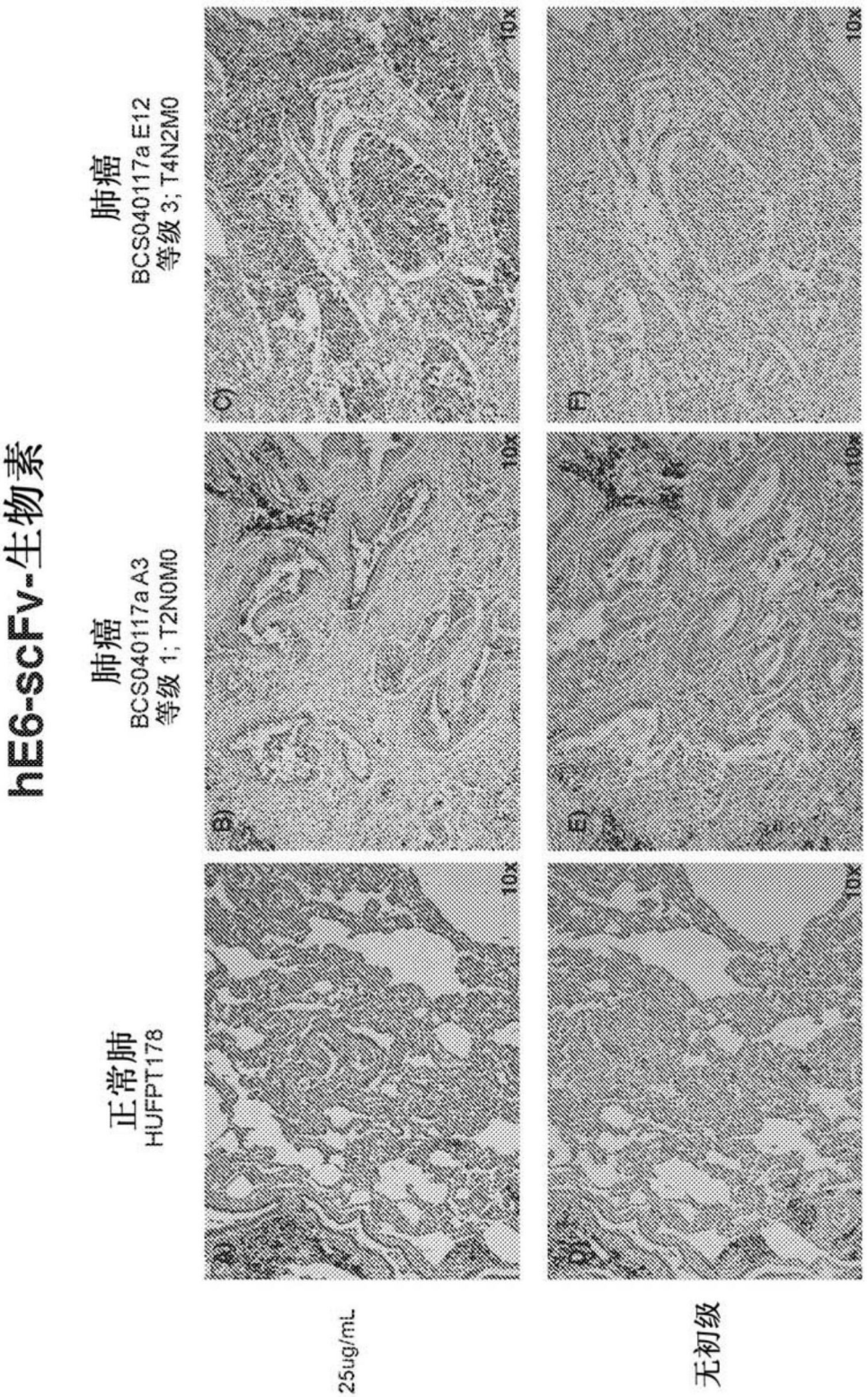

hE6-scFv-生物素
正常肺
HUFPT178
肺癌
BCS040117a A3
等级 1; T2N0M0
肺癌
BCS040117a E12
等级 3; T4N2M0
25ug/mL
无初级
A)
B)
C)
D)
E)
F)
10x

图51

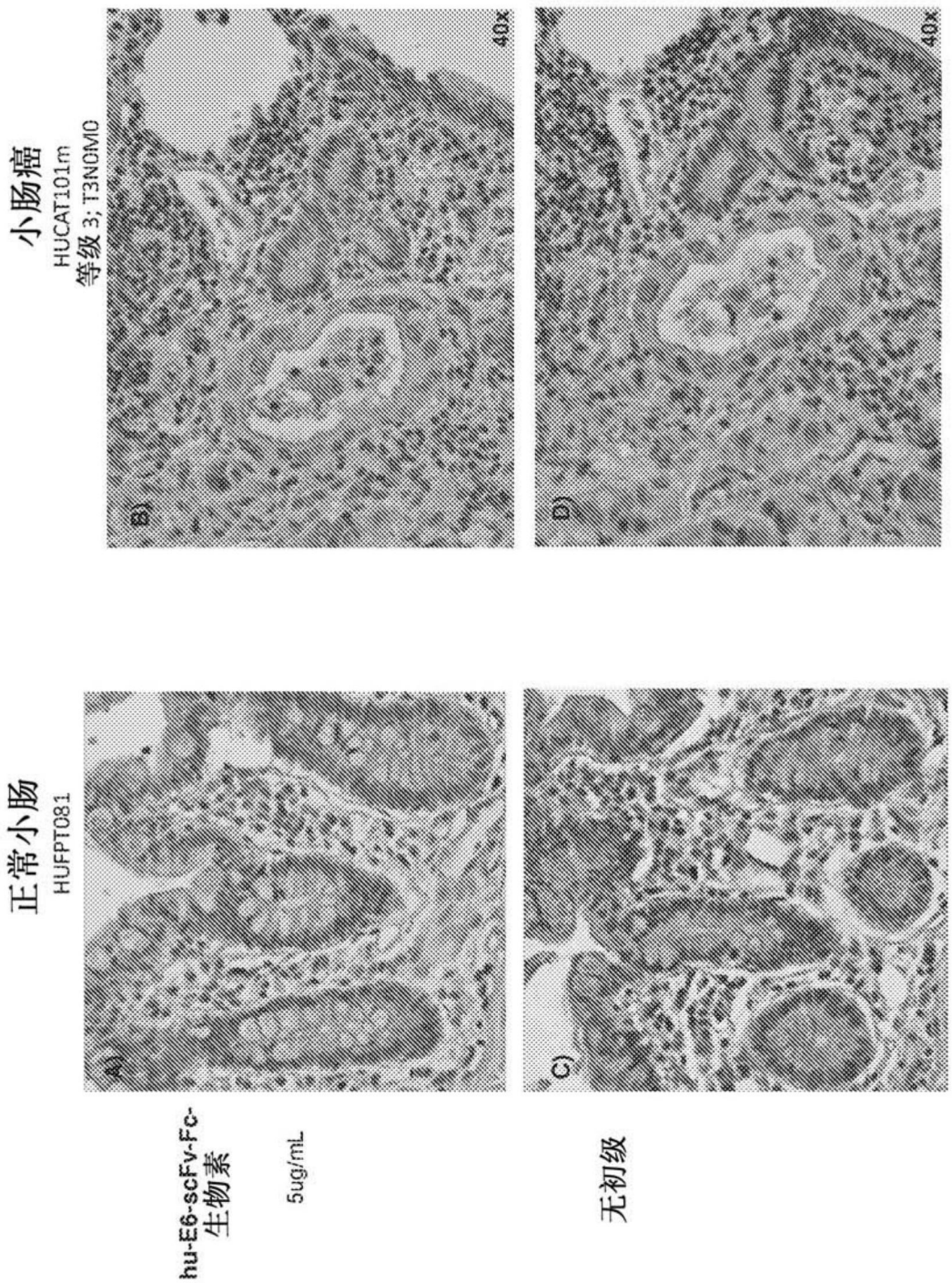

正常小肠
HUFPT081
小肠癌
HUCAT101m
等级 3; T3N0M0
A)
B)
C)
D)
40x
40x
hu-E6-scFv-Fc-
生物素
5ug/mL
无初级

图52

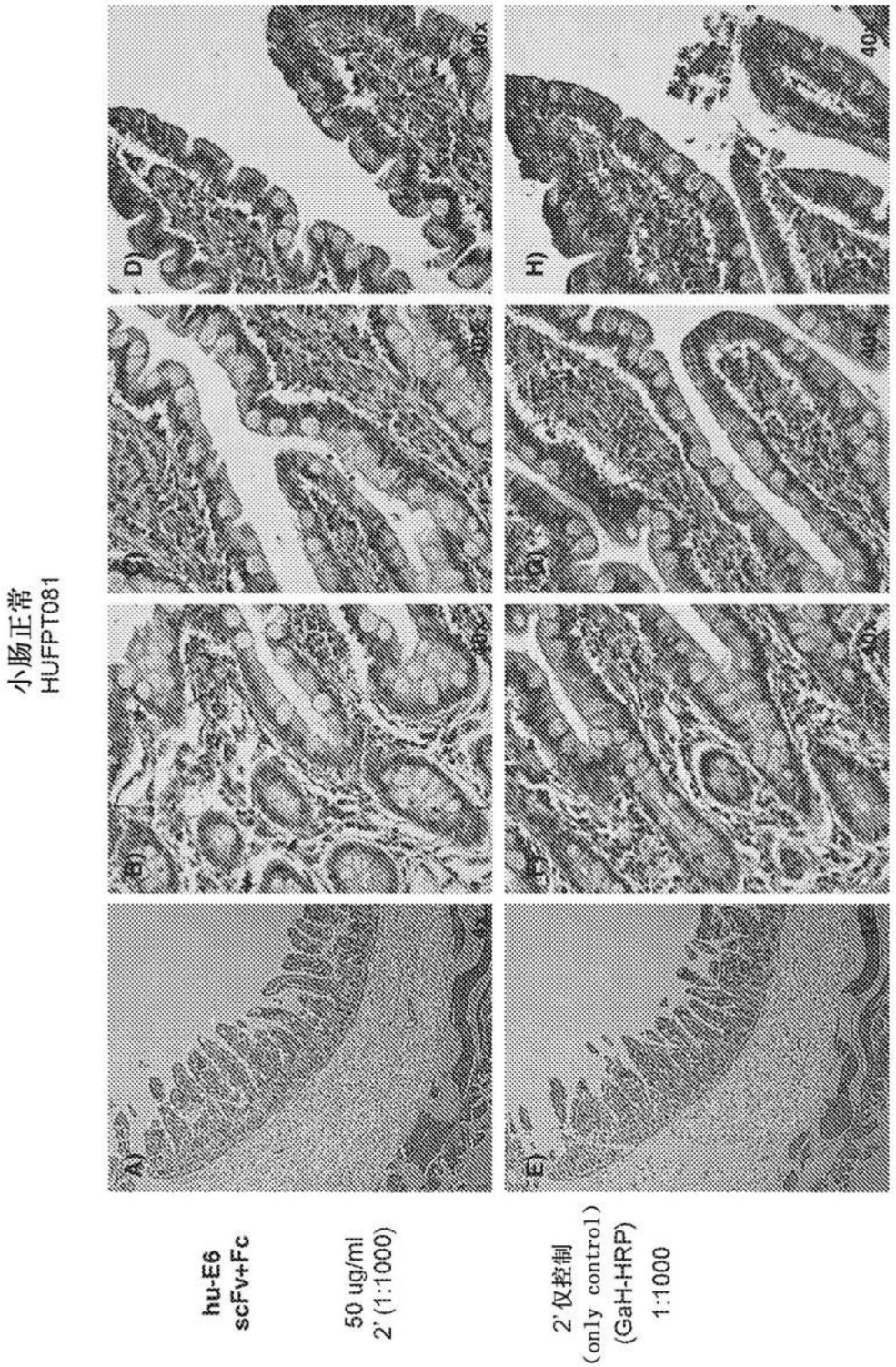

小肠正常
HUFPT081
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2'仅控制
(only control)
(GaH-HRP)
1:1000
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
40x
40x
40x
40x
40x
40x
40x
40x

图53

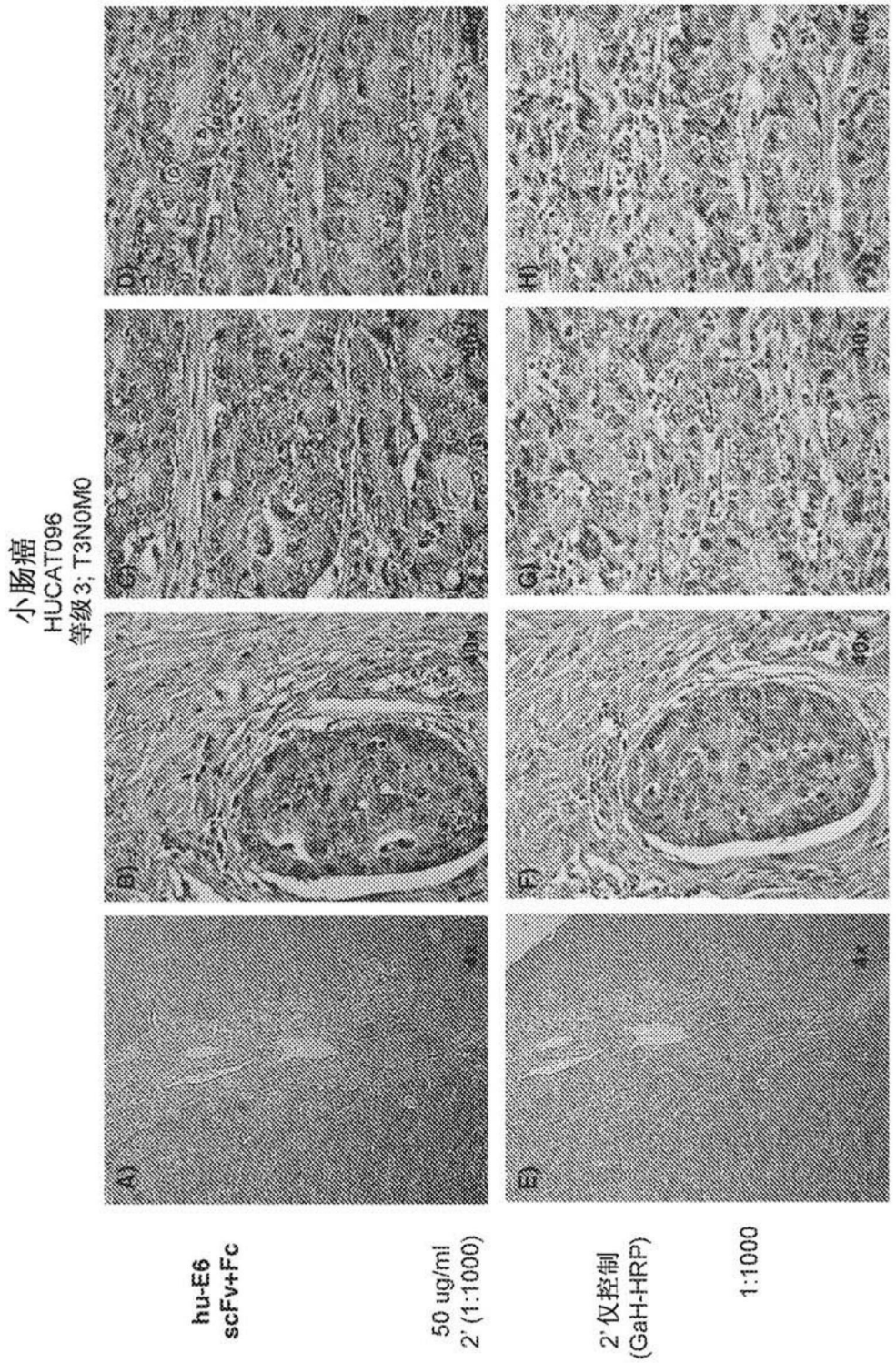

小肠癌
HUCAT096
等级3; T3N0M0
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2'仅控制
(GaH-HRP)
1:1000

图54

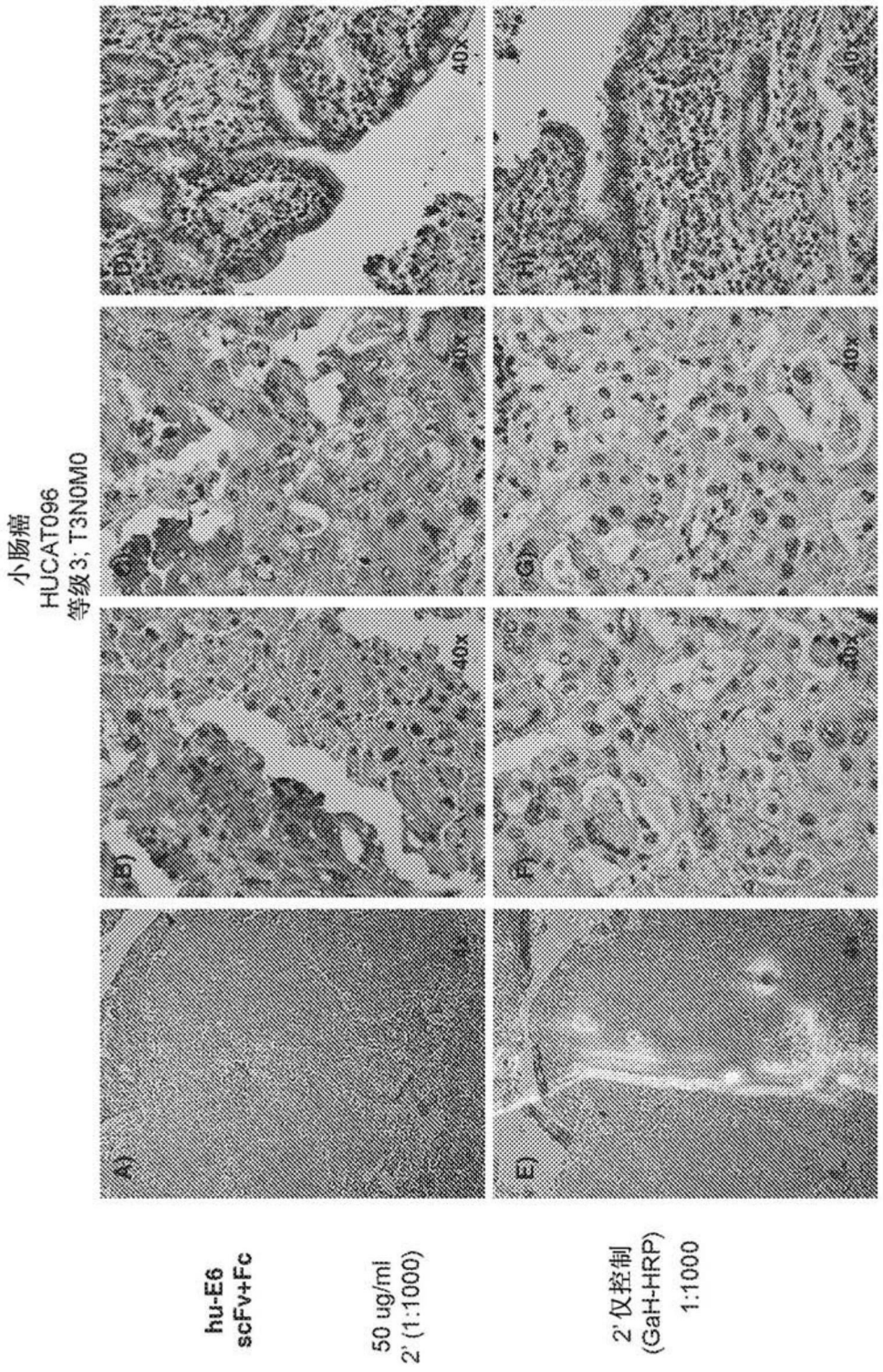

小肠癌
HUCAT096
等级3; T3N0M0
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2'仅控制
(GaH-HRP)
1:1000

图55

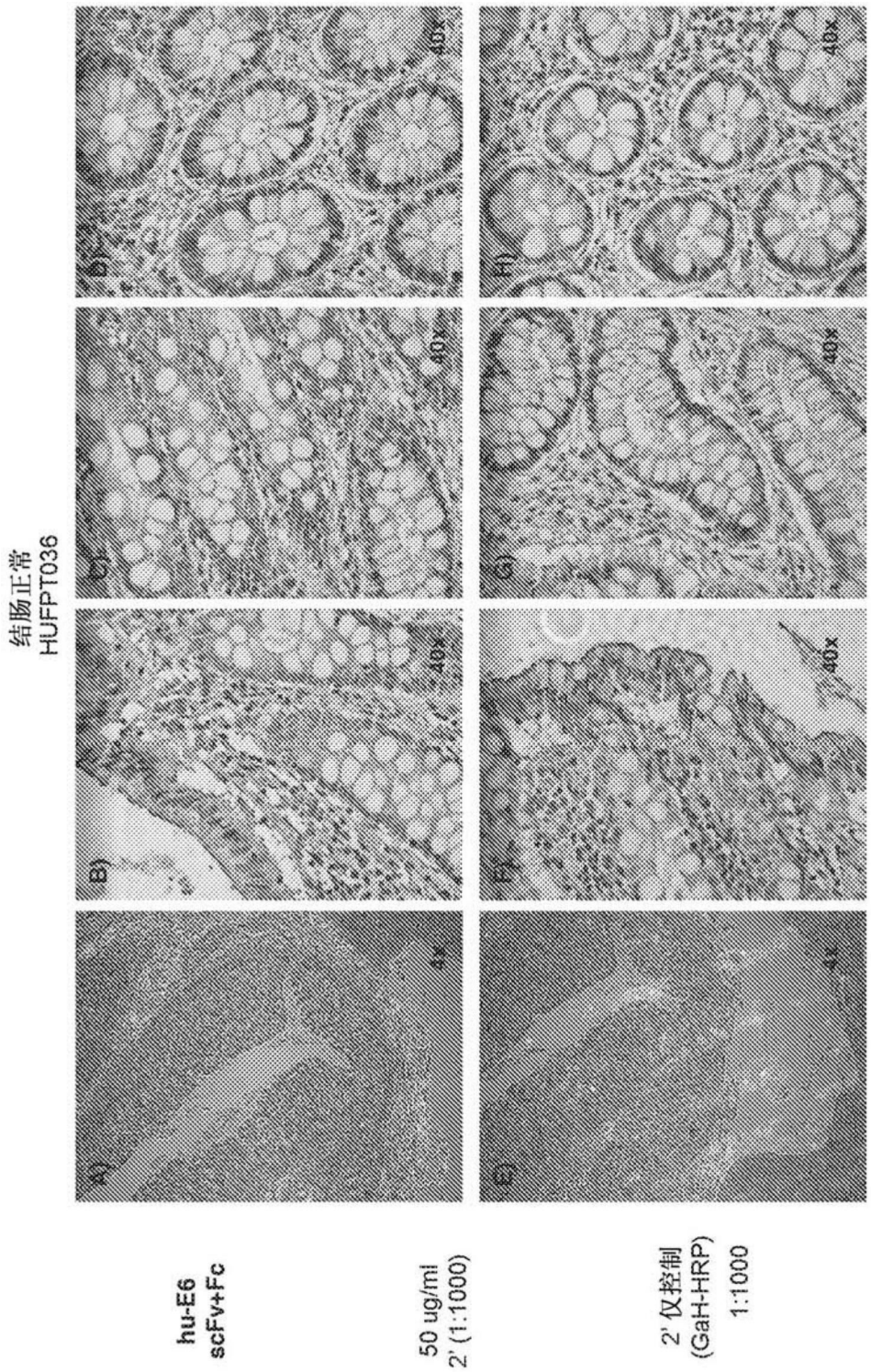

结肠正常
HUFPT036
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2' 仅控制
(GaH-HRP)
1:1000

图56

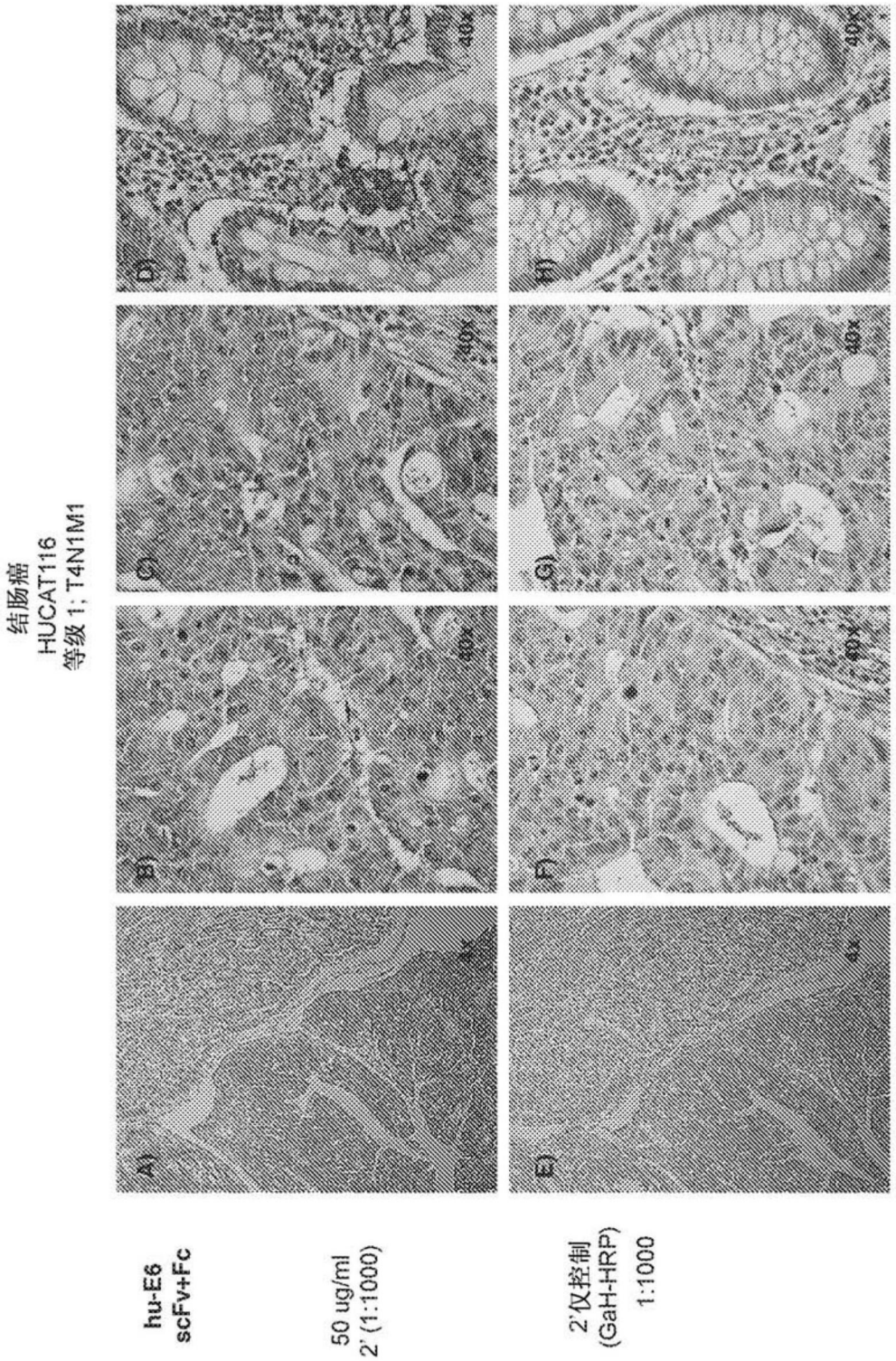

结肠癌
HUCAT116
等级 1; T4N1M1
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2'仅控制
(GaH-HRP)
1:1000
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x

图57

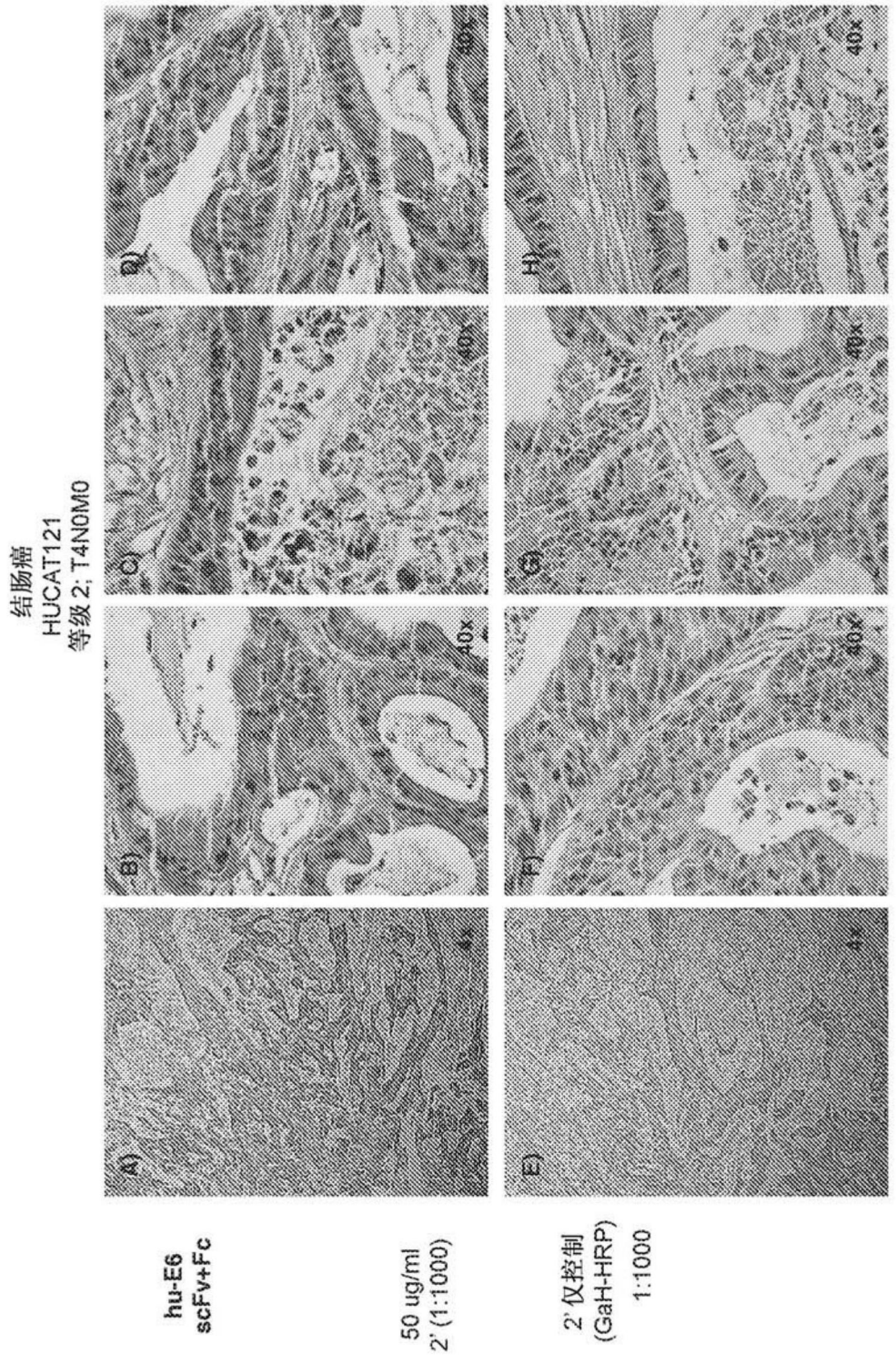

结肠癌
HUCAT121
等级 2; T4N0M0
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2' 仅控制
(GaH-HRP)
1:1000

图58

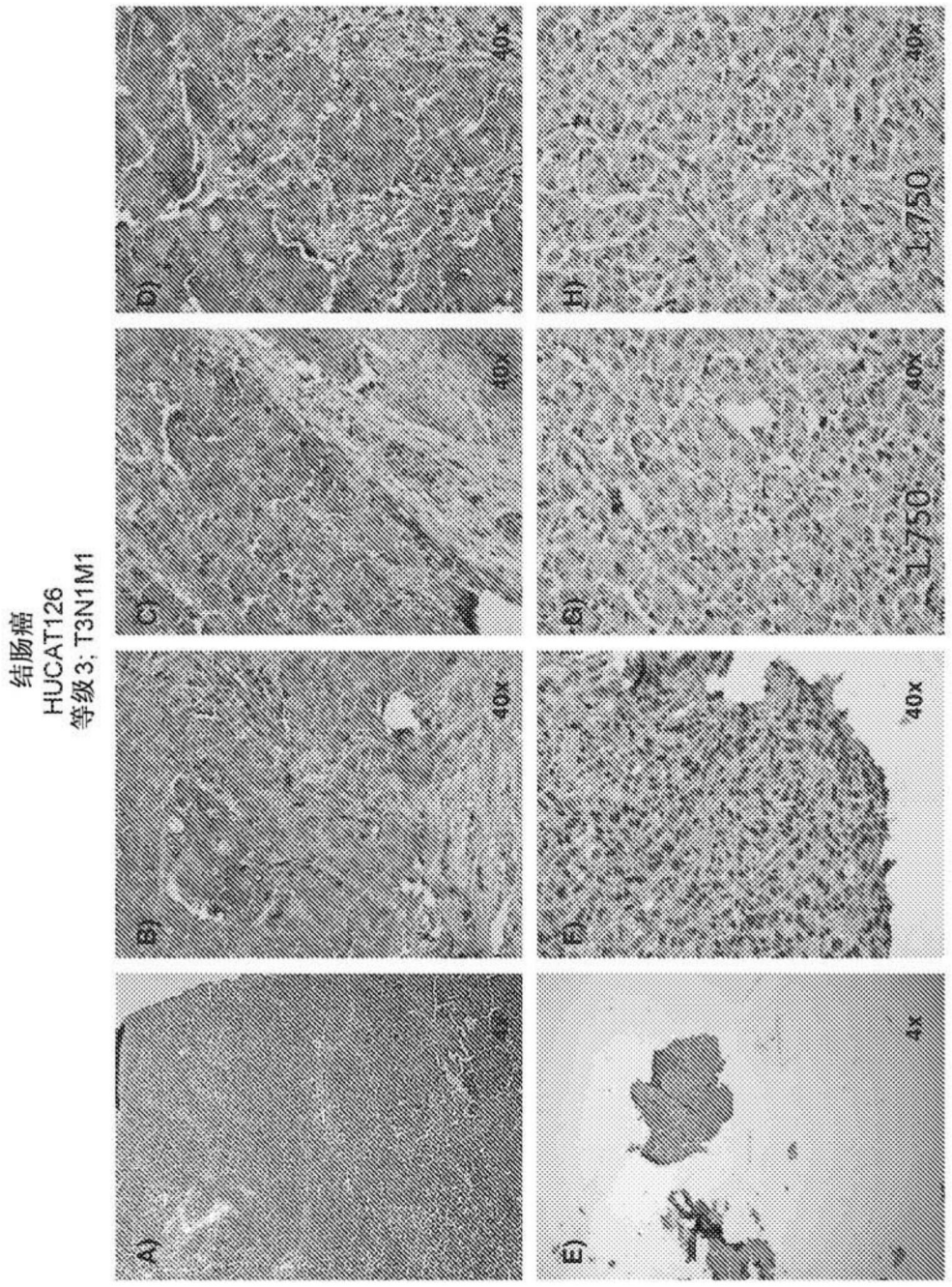

结肠癌
HUCAT126
等级3; T3N1M1
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
40x
40x
4x
40x
40x
40x
1:750
1:750
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:1000)
2' 仅控制
(GaH-HRP)
1:1000

图59

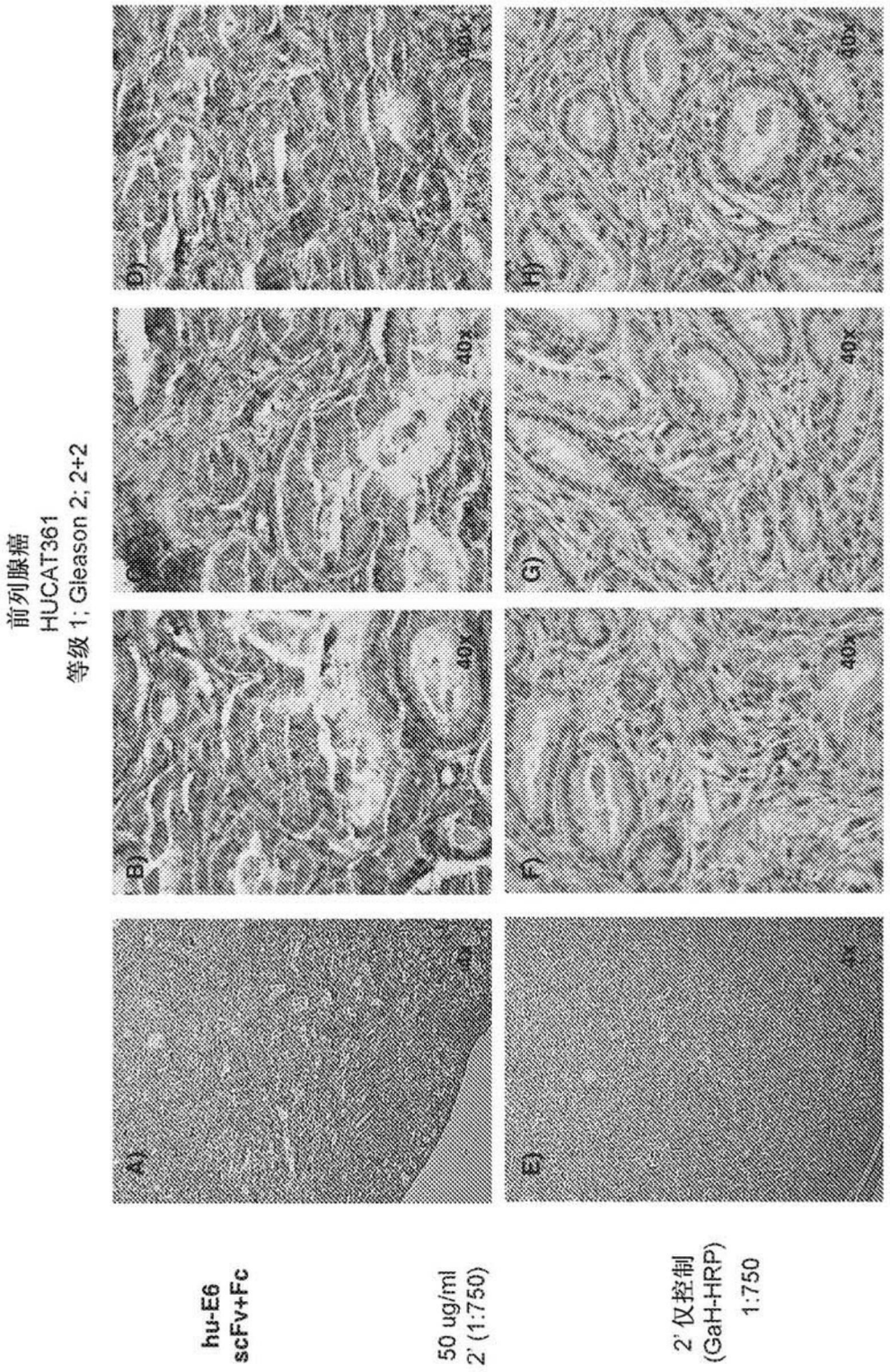

前列腺癌
HUCAT361
等级 1; Gleason 2; 2+2
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:750)
2' 仅控制
(GaH-HRP)
1:750

图60

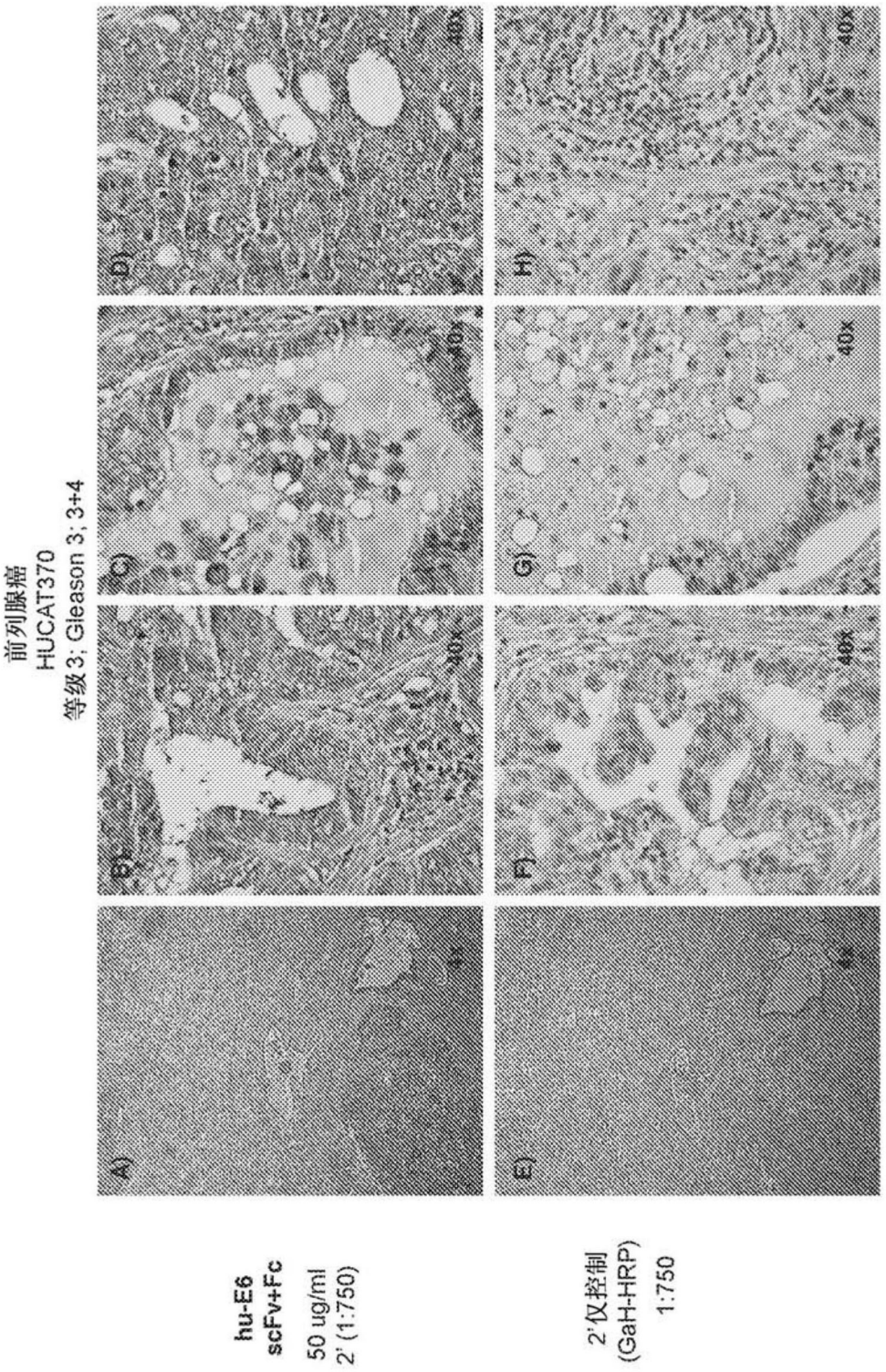

前列腺癌
HUCAT370
等级3; Gleason 3; 3+4
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:750)
2'仅控制
(GaH-HRP)
1:750

图61

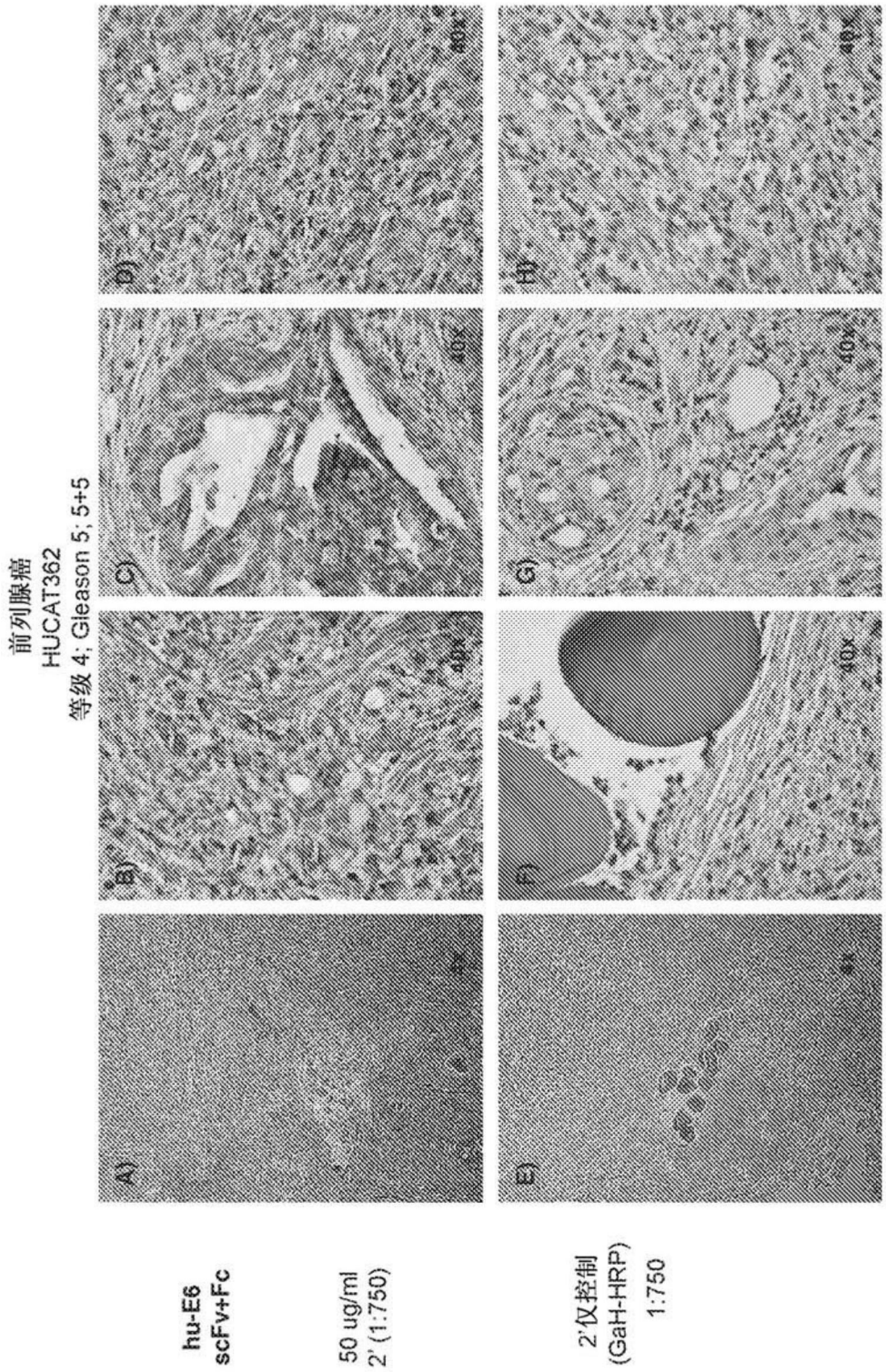

前列腺癌
HUCAT362
等级 4; Gleason 5; 5+5
A)
B)
C)
D)
E)
F)
G)
H)
4x
40x
hu-E6
scFv+Fc
50 ug/ml
2' (1:750)
2'仅控制
(GaH-HRP)
1:750

图62