



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201706300 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：105115930

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 20 日

(51) Int. Cl. : C07K14/735 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2015/05/20 丹麥

PA201570296

(71) 申請人：瑟勒提斯公司 (法國) CELLECTIS (FR)

法國

(72) 發明人：史基弗 瑪尼爾 思思爾 (FR)；史密斯 傑萊恩 SMITH, JULIANNE (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：20 共 136 頁

(54) 名稱

用於癌症免疫療法之抗-GD3 專一性嵌合抗原受體

ANTI-GD3 SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

(57) 摘要

本發明係關於嵌合抗原受體(CAR)，其為能夠重定向免疫細胞專一性及反應性朝向所選膜抗原之重組嵌合蛋白質，且更特別地，其中細胞外配位體結合係來源於 GD3 單株抗體之 scFV，賦予針對 GD3 陽性細胞之專一性免疫。具有此類 CARs 的經工程改造之免疫細胞特別適合於治療實體腫瘤，諸如黑素瘤、癌瘤；或液體腫瘤，諸如 T 細胞淋巴母細胞白血病。

The present invention relates to Chimeric Antigen Receptors (CAR) that are recombinant chimeric proteins able to redirect immune cell specificity and reactivity toward selected membrane antigens, and more particularly in which extracellular ligand binding is a scFV derived from a GD3 monoclonal antibody, conferring specific immunity against GD3 positive cells. The engineered immune cells endowed with such CARs are particularly suited for treating solid tumors such as melanomas, carcinomas or liquid tumor such as T-cell lymphoblastic leukemia.

指定代表圖：

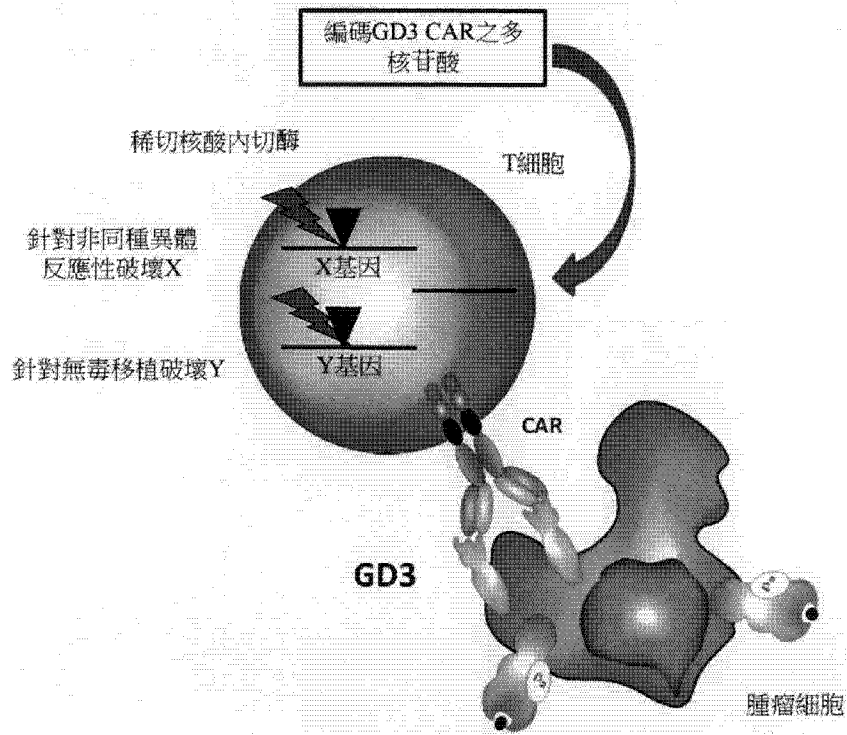


圖3

發明摘要

※ 申請案號：105115930

※ 申請日：105.5.20

C07K 14/335, 16/58 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 3/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

【發明名稱】

用於癌症免疫療法之抗-GD3專一性嵌合抗原受體

ANTI-GD3 SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR
CANCER IMMUNOTHERAPY

●【中文】

本發明係關於嵌合抗原受體(CAR)，其為能夠重定向免疫細胞專一性及反應性朝向所選膜抗原之重組嵌合蛋白質，且更特別地，其中細胞外配位體結合係來源於GD3單株抗體之scFV，賦予針對GD3陽性細胞之專一性免疫。具有此類CARs的經工程改造之免疫細胞特別適合於治療實體腫瘤，諸如黑素瘤、癌瘤；或液體腫瘤，諸如T細胞淋巴瘤母細胞白血病。

●【英文】

The present invention relates to Chimeric Antigen Receptors (CAR) that are recombinant chimeric proteins able to redirect immune cell specificity and reactivity toward selected membrane antigens, and more particularly in which extracellular ligand binding is a scFV derived from a GD3 monoclonal antibody, conferring specific immunity against GD3 positive cells. The engineered immune cells endowed with such CARs are particularly suited for treating solid tumors such as melanomas, carcinomas or liquid tumor such as T-cell lymphoblastic leukemia.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（3）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於癌症免疫療法之抗-GD3專一性嵌合抗原受體

ANTI-GD3 SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR
CANCER IMMUNOTHERAPY

【技術領域】

本發明係關於嵌合抗原受體(CAR)，其為能夠重定向免疫細胞專一性及反應性朝向GD3之重組嵌合蛋白質，GD3係在中樞神經系統組織中發現且用於診斷患者之實體腫瘤(諸如黑素瘤、神經外胚層腫瘤及癌瘤)以及液體腫瘤(諸如急性淋巴母細胞白血病(ALL))的神經節苷脂。根據本發明之CAR當在諸如T細胞或NK細胞之免疫細胞中表現時，特別適用於治療帶有GD3抗原之惡性細胞。所得經工程改造之免疫細胞展示針對惡性GD3陽性細胞之高水準專一性，由此賦予免疫療法安全性及效率。

【先前技術】

過繼免疫療法涉及離體產生之自體抗原專一性T細胞的轉移，其為治療病毒感染及癌症的一種頗具前景之策略。用於過繼免疫療法之T細胞可藉由抗原專一性T細胞之擴增或經基因工程改造實現之T細胞重定向而產生(Park, Rosenberg等人, 2011)。病毒抗原專一性T細胞之轉移係用於治療移植相關病毒感染及罕見病毒相關惡性病之公認程序。類似地，經顯示，腫瘤專一性T細胞之分離及轉移可成功治療黑素瘤。

已經藉由轉殖基因T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)之基因轉移成功地產生T細胞之新穎專一性(Jena, Dotti等人, 2010)。CAR係由在

單一融合分子中與一或多個信號傳導域相連之靶向部分組成的合成受體。一般而言，CAR之結合部分由單鏈抗體(scFv)之抗原結合域組成，該單鏈抗體包含藉由可撓性連接子接合的單株抗體之輕鏈及可變片段。基於受體或配位體域之結合部分亦得到成功地使用。第一代CAR之信號傳導域係來源於CD3 ζ 或Fc受體 γ 鏈之細胞質區。經顯示，第一代CAR可成功地重定向T細胞之細胞毒性。然而，其無法在活體內提供長期擴增及抗腫瘤活性。已經添加來自共刺激分子之信號傳導域，以及跨膜域及鉸鏈域形成第二代及第三代CAR，由此在人類中引起一些成功治療試驗，其中T細胞可重定向針對表現CD19之惡性細胞(June等人, 2011)。然而，針對CD19 ScFv使用的信號傳導域、跨膜域及共刺激域之特定組合具有相當大抗原專一性且無法經擴增以針對任何抗原標記物。

雙唾液酸神經節苷脂GD3為圖1中描繪之酸鞘酯脂，經顯示，其在黑素瘤細胞株、成體及胚胎腦中大量表現且在成體及胚胎肺中有較低程度表現(Haraguchi等人, 1994; Nakayama等人, 1996)。神經節苷脂係由常見疏水性神經醯胺部分及含有一各或若干個唾液酸之親水性寡糖鏈構成的家族。因此，作為GD3之來源的神經醯胺藉由不同糖基轉移酶，且特定言之藉由GD3合成酶(α 2,8-唾液酸基轉移酶或ST8Sia I或SATII)轉化成GD3。GD3神經節苷脂，又名 α -N-乙醯神經胺酸苷 α -2,8-唾液酸基轉移酶(參考：Uniprot:Q92185; SIA8A人類)，係在人體中由ST8SIA1基因(RefSeq:NP_003025.1.NM_003034.3)編碼之酶。

當神經細胞積極地增殖時，GD3在中樞神經系統早期發育階段高度表現。在後期發育階段，GD3含量下降且其他神經節苷脂變為主要物質(Daniotti等人, 1997; Gravotta等人, 1989)。此外，一般而言神經節苷脂且特定言之GD3之表現量在成體外神經組織中極低且受限制。儘管如此，GD3在腫瘤細胞中高度表現，佔黑素瘤超過80%。其亦在

神經外胚層腫瘤(神經母細胞瘤及神經膠質瘤)及癌瘤，包括肺癌瘤、乳房癌瘤、結腸癌瘤、前列腺癌瘤及卵巢癌瘤中過表現(Lo等人, 2010)。此外，亦在T細胞急性淋巴母細胞白血病中觀察到GD3表現(Reaman等人, 1990)。

GD3在所選腫瘤類型上高度受限之表現以及所顯示的GD3藉由介導細胞遷移、黏附、增殖及分化來促進腫瘤發生之事實(Birklé等人, 2003)使其成為免疫治療靶向的引人注目之抗原。先前Junghans等人對含有MB3.6 scFv之抗-GD3scCAR進行工程改造及驗證(Lo等人, 2010；Yun等人, 2000)。然而，在建立之裸鼠腫瘤模型中，此CAR需要全身輸注最大劑量之介白素2(IL2)以在根除皮下GD3陽性腫瘤方面達到50%功效。因此，仍需要具有改善之功效且可以用於治療實體腫瘤或液體腫瘤之新型抗-GD3嵌合抗原受體。

本發明人因此認為，GD3可藉由使用表現CAR之T細胞而成為可貴的標靶抗原以用於治療液體腫瘤，諸如T細胞急性淋巴母細胞白血病；及實體腫瘤，諸如黑素瘤、神經外胚層腫瘤(神經母細胞瘤及神經膠質瘤)及癌瘤，包括肺癌瘤、乳房癌瘤、結腸癌瘤、前列腺癌瘤及卵巢癌瘤。

作為先前策略之替代方案，本發明提供新型GD3專一性CAR構建體，其可在免疫細胞中表現以靶向GD3惡性細胞，具有顯著的臨床益處。

【發明內容】

本發明人產生具有不同結構且包含來源於不同GD3專一性抗體之不同scFV的抗-GD3專一性CAR。較佳本發明之CAR多肽包含選自SEQ ID NO. 19至30(具有來自R24、MB3.6、KM641或BW2121之scFv；且具有v1至v3之構形)，較佳SEQ ID NO.30(BW2121-v3)、SEQ ID NO.20(R24-v2)及SEQ ID NO.21(R24-v3)且更佳SEQ ID NO.20(R24-

v2)之胺基酸序列。在活體外非專一性活化(例如，用抗CD3/CD28塗佈之珠粒及重組IL2)之後，使用病毒轉導，以表現此等CAR之多核苷酸對來自供體之T細胞進行轉型。在某些實例中，進一步對T細胞進行工程改造以產生非同種異體反應性T細胞，更特定言之，藉由破壞TCR($\alpha\beta$ -T細胞受體)之組分進行工程改造以防止移植物抗宿主反應。

所得經工程改造之T細胞在活體外針對GD3陽性細胞展示不同程度之反應性，顯示本發明之CAR促成T細胞之抗原依賴性活化以及增殖，由此使其可用於免疫療法。

編碼本發明之CAR的多肽及多核苷酸序列詳述於本說明書中。

本發明之經工程改造之免疫細胞特別適用於治療應用，諸如用於治療實體腫瘤，諸如黑素瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤或乳房腫瘤、結腸腫瘤、肺腫瘤、前列腺腫瘤或卵巢腫瘤；及液體腫瘤，諸如T細胞急性淋巴母細胞白血病。

【圖式簡單說明】

圖1：GD3神經節苷脂之結構，其係由兩個唾液酸連接至許多神經節苷脂常見之乳糖苷基神經醯胺核心構成。

圖2：藉由流式細胞測量術，使用Qifikit(Dako)分析來鑑別表現GD3表面分子之細胞：測試7種不同之人類細胞株且其中4種(CHP-134、G-361、MeWo及SK-MEL-28)先前在文獻中已描述為呈GD3陽性。

圖3：根據本發明之經工程改造之免疫細胞的示意性圖示。此圖中呈現的經工程改造之免疫細胞為經編碼CAR之反轉錄病毒多肽轉導的T細胞。對此T細胞進一步工程改造以使其能更好且更安全地移植至患者體內，此在本發明之框架內為可選的。X基因可例如為表現TCR之組分(TCR α 或TCR β)的基因，Y可為涉及T細胞對免疫抑制藥物(如CD52，針對Campath)或化學療法藥物(如HPRT，針對6-硫代鳥嘌呤)

吟)之敏感性的基因。

圖4：不同CAR架構(V1至V3)之示意性圖示。在此等實驗中，藉由以下構建塊融合而設計出十二種第2代抗-GD3專一性scCAR：-一個來自鼠類(MB3.6或KM641或BW2121或R24)來源之scFv；-一個間隔子(人類Fc γ RIII α 鉸鏈或人類CD8 α 鉸鏈或人類IgG1鉸鏈CH2 CH3)；-人類CD8 α 之跨膜域；-人類41BB之共刺激域；及-人類CD3 ζ 之活化域。

圖5：用於測試在人類原代T細胞中設計之抗-GD3 scCAR的兩步篩選方法。

圖6：在初次篩選期間，藉由西方墨點法，使用抗人類CD3 ζ mAb分析12種scCAR在人類T細胞中之總表現。(A)實驗1。(B)實驗2。

圖7：在初次篩選期間，藉由西方墨點法，使用抗-Fab或蛋白質L分析12種scCAR在人類T細胞中之總表現。(A)第一系列。(B)第二系列。

圖8：在初次篩選期間，分析在與標靶細胞共培養後12種scCAR修飾之T細胞的脫粒情況。(A)第一系列。(B)第二系列。

圖9：在二次篩選期間，分析在與標靶細胞共培養後scCAR修飾之T細胞的脫粒情況。資料呈現為四次獨立實驗之平均值 \pm SD。

圖10：在二次篩選期間，分析在與標靶細胞共培養後scCAR修飾之T細胞的IFN γ 產量。資料呈現為四次獨立實驗之平均值 \pm SD。

圖11：在二次篩選期間，分析與黏附標靶細胞共培養後scCAR修飾之T細胞的細胞毒性活性。資料呈現為三次獨立實驗之平均值 \pm SD。

圖12：編碼處於脾病灶形成病毒(SFFV)啟動子轉錄控制下的藉由2A肽隔開之R24-v2 CAR及自殺基因(RQR8)的雙順反子慢病毒載體。

圖13：用編碼處於脾病灶形成病毒啟動子(SFFV)轉錄控制下的

藉由2A肽隔開之R24-v2 CAR及自殺基因(RQR8)的慢病毒載體轉導CD3/CD28刺激之周邊血液單核細胞(PBMC)。

圖14：慢病毒轉導之GD3 CAR T細胞或未轉導之T細胞在GD3+細胞(G361)、GD-細胞(MCF-7)或非腫瘤細胞存在下的干擾素 γ (IFN- γ)分泌情況。

圖15：CD107 α 在GD3+細胞(G361)、GD-細胞(MCF-7)或非腫瘤細胞存在下在慢病毒轉導之GD3 CAR T細胞或未轉導之T細胞之細胞表面處之表現。

圖16：慢病毒轉導之GD3 CAR T細胞或未轉導之T細胞對GD3+細胞(G361)之溶解活性。

圖17：分別基於最接近之小鼠生殖系IGHV5-17*02及最接近之人類生殖系基因IGHV3-NL1*01，對基於R24 ScFv之抗-GD3 CAR之R24 VH(SEQ ID NO.11)進行人類化的策略。

圖18：針對R24 VH人類化所涉及之SEQ ID NO.11的個別胺基酸殘基取代。

圖19：分別基於最接近之小鼠生殖系IGKV10-96*01及最接近之人類生殖系基因IGKV1-33*01，對基於R24 ScFv之抗-GD3 CAR之R24 VL (SEQ ID NO. 12)進行人類化的策略。

圖20：針對R24 VH人類化所涉及之SEQ ID NO.11的個別胺基酸殘基取代。

【實施方式】

除非本文中具體定義，否則所使用的所有技術及科學術語具有與基因療法、生物化學、遺傳學及分子生物學領域之熟練技術人員通常所理解相同之含義。

可使用與本文所述之方法及材料類似或等效的所有方法及材料進行本發明之實踐或測試，其中在本文中描述適合方法及材料。本文

中提及的所有出版物、專利申請案、專利及其他參考文獻均以全文引用之方式併入本文中。在相矛盾之情況下，將以本說明書(包括定義)為準。另外，除非另外規定，否則材料、方法及實例僅為說明性的且不意欲為限制性的。

除非另外指明，否則本發明之實踐將採用細胞生物學、細胞培養、分子生物學、轉殖基因生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習知技術，此等習知技術在此項技術之技能範圍內。此類技術於文獻中予以完整解釋。參見例如，Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)；Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版, (Sambrook 等人, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編., 1984)；Mullis等人, 美國專利第4,683,195號；Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins編, 1984)；Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins編, 1984)；Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)；Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)；B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)；Methods In ENZYMOLOGY叢書(J. Abelson及M. Simon主編, Academic Press, Inc., New York)，詳言之，第154及155卷 (Wu等人編)及第185卷，「Gene Expression Technology」 (D. Goeddel編)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller及M. P. Calos編, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及Walker編, Academic Press, London, 1987)；Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV卷 (D. M. Weir及C. C. Blackwell編, 1986)；及 Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

N.Y., 1986)。

GD3專一性嵌合抗原受體

本發明係關於抗-GD3嵌合抗原受體(CAR)之新穎設計，其包含細胞外配位體結合域、跨膜域及信號傳導轉導域。

如本文所使用，術語「細胞外配位體結合域」定義為能夠結合配位體之寡肽或多肽。較佳地，該域將能夠與細胞表面分子相互作用。舉例而言，所選細胞外配位體結合域可識別在與特定疾病狀態相關之標靶細胞上充當細胞表面標記物之配位體。

本發明之抗-GD3 CAR之抗原結合域可為結合至脫組織抗原(off-tissue antigen)之任何域，包括(但不限於)單株抗體、重組抗體、人類抗體、人類化抗體及其功能片段。

在一個較佳實施例中，該細胞外配位體結合域包含單鏈抗體片段(scFv)，其包含藉由可撓性連接子接合的標靶抗原專一性單株抗-GD3抗體之輕鏈(V_L)及重鏈(V_H)可變片段。該 V_L 及 V_H 較佳選自如表4中所指示的稱為R24、MB3.6、KM641及BW2121之抗體。其較佳藉由包含例如序列SEQ ID NO:10之可撓性連接子連接在一起。換言之，該等CAR優先包含包括與選自由SEQ ID NO: 11至SEQ ID NO: 18組成之群的胺基酸序列展示至少90%、95%、97%或99%一致性之多肽序列的細胞外配位體結合域。如本文所使用，術語「重組抗體」意謂使用重組DNA技術產生的抗體或抗體片段，諸如由噬菌體、酵母表現系統或哺乳動物細胞表現系統，且更特定言之由用包含編碼抗體CDR區之核酸序列的病毒載體轉導之T細胞表現的抗體或抗體片段。該術語亦應解釋為意謂這樣一種抗體或抗體片段，其係藉由合成編碼該抗體或抗體片段且表現抗體或抗體片段蛋白質之DNA分子或說明該抗體或抗體片段之胺基酸序列而產生，其中該DNA或胺基酸序列係使用此項技術中可用且熟知之重組或合成DNA或胺基酸序列技術獲得。

人類化抗體可使用此項技術中已知之多種技術製造，包括(但不限於)，CDR移植(參見例如，歐洲專利第EP 239,400號；國際公開案第WO 91/09967號；及美國專利第5,225,539號、第5,530,101號及第5,585,089號，其各自以全文引用的方式併入本文中)、鑲飾或表面重塑(參見例如，歐洲專利第EP 592,106號及第EP 519,596號；Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498；Studnicka等人, 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814；及Roguska等人, 1994, *PNAS*, 91:969-973，其各自以全文引用的方式併入本文中)、鏈改組(參見例如，美國專利第5,565,332號，以全文引用的方式併入本文中)及例如美國專利申請公開案第US2005/0042664號、美國專利申請公開案第US2005/0048617號、美國專利第6,407,213號、美國專利第5,766,886號、國際公開案第WO 9317105號，Tan等人, *J. Immunol.*, 169: 1119-25 (2002)；Caldas等人, *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000)；Morea等人, *Methods*, 20(3):267-79 (2000)；Baca等人, *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84 (1997)；Roguska等人, *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996)；Couto等人, *Cancer Res.*, 55 (23增刊):5973s-5977s (1995)；Couto等人, *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22 (1995)；Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994)；及Pedersen等人, *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994)(各自以全文引用的方式併入本文中)中揭示之技術。通常，構架區中之構架殘基將經來自CDR供體抗體之相應殘基取代以改變，例如改善抗原結合。此等構架取代係藉由此項技術中熟知之方法鑑別，例如藉由建立CDR與構架殘基之相互作用模型來鑑別對於抗原結合很重要之構架殘基，且進行序列比較以鑑別特定位置處的異常構架殘基。(參見例如，Queen等人之美國專利第5,585,089號；及Riechmann等人, 1988, *Nature*, 332:323，以全文引用的方式併入本文中。)

在另一個實施例中，該本發明之抗-GD3專一性CAR包含細胞外

配位體結合域，其中該VH多肽包含選自SEQ ID NO.36(CDR1)、SEQ ID NO.37(CDR2)及SEQ ID NO.38(CDR3)之R24抗體CDR序列，且該VL多肽序列包含選自SEQ ID NO.39(CDR1)、SEQ ID NO.40(CDR2)及SEQ ID NO.41(CDR3)之R24抗體CDR序列。

在另一個實施例中，該本發明之抗-GD3專一性CAR包含細胞外配位體結合域，其中該VH包含來自MB3.6抗體之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.42(CDR1)、SEQ ID NO.43(CDR2)及SEQ ID NO.44(CDR3)之CDR序列，且該VL包含MB3.6抗體之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.45(CDR1)、SEQ ID NO.46(CDR2)及SEQ ID NO.47(CDR3)之CDR序列。

在另一個實施例中，該本發明之抗-GD3專一性CAR包含細胞外配位體結合域，其中該VH多肽序列包含來自KM641抗體之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.48(CDR1)、SEQ ID NO.49(CDR2)及SEQ ID NO.50(CDR3)之CDR序列，且該VL多肽序列包含來自KM641抗體之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.51(CDR1)、SEQ ID NO.52(CDR2)及SEQ ID NO.53(CDR3)之CDR序列。

在另一個實施例中，該本發明之抗-GD3專一性CAR包含細胞外配位體結合域，其中該VH多肽序列包含來自BW2121之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.54(CDR1)、SEQ ID NO.55(CDR2)及SEQ ID NO.56(CDR3)之CDR序列，且該VL多肽序列包含來自BW2121抗體之CDR序列，例如選自SEQ ID NO.57(CDR1)、SEQ ID NO.58(CDR2)及SEQ ID NO.59(CDR3)之CDR序列。

根據其較佳實施例之一，本發明提供藉由改變在人類免疫球蛋白中未觀察到的鼠類構架表面殘基來使具有SEQ ID NO.11及SEQ ID NO.12的抗-R24 ScFv之重鏈及輕鏈可變域之外來構架區(FR)人類化。此等殘基通常突變成在最相似之人類對應物中所觀察之殘基。此抗體

表面重塑技術最先由Padlan描述(A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4-5): 489-4981991)。此類方法示於圖17及19中，其中人類對應物為IGHV3-NL1*01及IGKV1-33*01。

因此，考慮到降低人類之免疫原性，可將胺基酸突變，較佳取代引入根據本發明之CAR GD3的SEQ ID NO.11及SEQ ID NO.12中以下位置之任一個處：

- SEQ ID NO.11 (R24 - VH) : L12、R19、K20、N36、F37、E47、A54、Y55、S57、I65、N66、T70、P83、F88、T92、S96、I101、T105、R106、A122、T123、L124及I125。

- SEQ ID NO.12 (R24 - VL) : I7、T8、V13、L15、I20、S22、R24、G36、F38、D47、G48、S49、L50、Y56、T57、R66、Q68、S69、W79、Y87、S88、L89、N93、E95、E96、F102、F103、G107、K108、T109及G120。

因此，本發明涵蓋CAR GD3之人類化功能變體，其中該CAR包含結合GD3抗原之多肽序列，該多肽序列相對於SEQ ID NO.11及SEQ ID NO.12可分別展示至多18%及24%之胺基酸組成變化。

包含呈人類化形式之R24 VH及VL的ScFv之胺基酸序列一般展示高於80%之總體胺基酸一致性，且更一般而言，本發明之抗-GD3專一性CAR包含細胞外配位體結合域，其包含與SEQ ID NO.11及/或SEQ ID NO.12共有至少85%一致性之多肽。

由圖17及19中展示之人類化方法引起的R24 VH及/或VL中之較佳胺基酸取代如下(第一個字母對應於野生型鼠類序列，最後一個字母為建議之取代)：

- SEQ ID NO.11 (R24 - VH) : L12V、R19L、K20R、N36S、

F37Y、E47G、A54S、Y55V、S57Y、I65T、N66Y、T70S、P83S、F88Y、T92N、S96A、I101V、T105A、R106K、A122T、T123L、L124V及I125T。

- SEQ ID NO.12 (R24 - VL)：I7S、T8P、V13A、L15V、I20T、S22T、R24Q、G36S、F38Y、D47G、G48K、S49A、L50P、Y56D、T57A、R66N、Q68E、S69T、W79S、Y87F、S88T、L89F、N93S、E95Q、E96P、F102Y、F103Y、G107Y、K108D、T109N及G120Q。

因此，本發明涵蓋任何GD3 CAR，特別是CAR GD3之此類人類化功能變體，其包含與SEQ ID NO.11及/或SEQ ID NO.12具有一致性且包括以上突變或經取代殘基中之至少一個的胺基酸序列。

然而，由於某些構架殘基對於維持CDR之構形極為重要，故以上使ScFv人類化之程序有時會導致結合親和力降低。此不利方面可藉由將鼠類殘基再引入人類構架中認為對CDR環構形至關重要之位置(稱為「游標區殘基」)處來緩和。在此處呈現之研究中，已確定在人類背景中保留一些小鼠胺基酸對於維持最佳活性可為至關重要的(參見圖18及20)。因此，為了根據本發明之CAR GD3之功能變體的最佳活性，需要在人類化R24-VH及R24-VL胺基酸序列中保留一些殘基。此類「游標區殘基」呈現如下(但不詳盡)：

- SEQ ID NO.11 (R24 - VH)：V2、W52、V53、A54、F76、I78、R80、N82及/或L87，

- SEQ ID NO.12 (R24 - VL)：I2、M4、W41、Y42、L52、L53、I54、Y55、G78、G80、G82、T83及/或Y85。

自該分析可知，SEQ ID NO 11及12中一些殘基對於CDR環構形較為重要。此等殘基以及「游標區殘基」較佳保持在根據本發明之CAR GD3之功能變體中(亦即未突變)。

- SEQ ID NO.11 (R24 - VH)：D1、A54、Y55、N64、P83及/或

F88，

且更重要的是，A54、Y55及/或N64；

- SEQ ID NO.12 (R24 - VL)：7I、8T、24R、66R、68Q、79W、Y85、S86、L87、F101及/或F102，

且更重要的是，66R、Y85及/或F102。

因此，本發明涵蓋任何GD3 CAR，特別是如先前所描述的CAR GD3之人類化功能變體，其包含與SEQ ID NO.11及/或SEQ ID NO.12具有一致性，較佳具有至少80%序列一致性之胺基酸序列，其中以上胺基酸得以保持(亦即，未突變)。

保守胺基酸取代係胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已確定具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電之極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β 分支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，本發明之CAR內的一或多個胺基酸殘基可經來自相同側鏈家族之其他胺基酸殘基置換且可使用本文所描述之功能分析測試改變之CAR結合GD3之能力。

根據本發明之CAR的信號轉導域或胞內信號傳導域負責細胞外配位體結合域結合至標靶之後的細胞內信號傳導，由此引起免疫細胞之活化及免疫反應。換言之，信號轉導域負責表現CAR之免疫細胞之至少一種正常效應功能之活化。舉例而言，T細胞之效應功能可為細胞溶解活性或輔助活性，包括細胞因子之分泌。因此，術語「信號轉導域」係指蛋白質中轉導效應子信號功能信號且引導細胞執行特化功能

之部分。

用於CAR中之信號轉導域之較佳實例可為共同作用以在抗原受體接合之後起始信號轉導之T細胞受體及輔助受體的細胞質序列，以及此等序列之任何衍生物或變體及具有相同功能能力之任何合成序列。信號轉導域包含兩個不同種類之細胞質信號傳導序列，即，起始抗原依賴性初級活化之序列，及以獨立於抗原之方式起作用以提供二級或共刺激信號之序列。初級細胞質信號傳導序列可包含信號傳導基元，稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基元ITAM。ITAM係在多種受體之細胞質內尾中發現的充當syk/zap70類酪胺酸激酶結合位點的明確界定之信號傳導基元。作為非限制性實例，用於本發明中之ITAM的實例可包括來源於TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d之ITAM。在一個較佳實施例中，CAR之信號傳導轉導域可包含CD3 ζ 信號傳導域，其胺基酸序列與選自由(SEQ ID NO: 9)組成之群的胺基酸序列具有至少70%，較佳至少80%，更佳至少90%、95%、97%或99%序列一致性。

在特定實施例中，本發明之CAR之信號轉導域包含共刺激信號分子。共刺激分子為高效免疫反應所需的除抗原受體或其配位體以外之細胞表面分子。「共刺激配位體」係指抗原呈遞細胞上專一性結合T細胞上之同源共刺激分子，由此提供信號之分子，除例如TCR/CD3複合體與裝載有肽之MHC分子結合所提供之初級信號外，該信號亦介導T細胞反應，包括(但不限於)增殖活化、分化及類似反應。共刺激配位體可包括(但不限於)CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激配位體(ICOS-L)、細胞間黏著分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素 β 受體、3/TR6、ILT3、ILT4、結合鐸(Toll)配位體受體之促效劑或抗體，及專一性結合B7-H3之配位體。共刺激

配位體亦尤其涵蓋專一性結合T細胞上存在之共刺激分子的抗體，該共刺激分子諸如(但不限於)CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、專一性結合CD83之配位體。

術語「共刺激分子」係指T細胞上專一性結合共刺激配位體，由此利用T細胞調節共刺激反應(諸如(但不限於)增殖)之同源結合搭配物。共刺激分子包括(但不限於)I類MHC分子、BTLA及鐸(Toll)配位體受體。共刺激分子之實例包括CD27、CD28、CD8、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及專一性結合CD83之配位體，及其類似物。

在一個較佳實施例中，本發明之CAR之信號轉導域包含選自由4-1BB(Genbank：AAA53133)及CD28(NP_006130.1)之片段組成之群的共刺激信號分子之一部分。特定言之，本發明之CAR之信號轉導域包含與選自由SEQ ID NO: 8組成之群的胺基酸序列包含至少70%、較佳至少80%、更佳至少90%、95%、97%或99%序列一致性的胺基酸序列。

根據本發明之CAR係在細胞之表面膜上表現。因此，此類CAR進一步包含跨膜域。適當跨膜域之突出特徵包含能夠在細胞，在本發明中較佳為免疫細胞，特定言之淋巴球細胞或自然殺傷(NK)細胞之表面處表現，及能夠一起相互作用以引導免疫細胞針對預定標靶細胞之細胞反應。跨膜域可來源於天然來源或合成來源。跨膜域可來源於任何膜結合蛋白或跨膜蛋白。作為非限制性實例，跨膜多肽可為T細胞受體之次單元，諸如 α 、 β 、 γ 或 ζ ；構成CD3複合體之多肽；IL2受體p55(α 鏈)；p75(β 鏈)或 γ 鏈；Fc受體之次單元鏈，特定言之，Fc γ 受體III；或CD蛋白質。或者，跨膜域可為合成的且可主要包含疏水性殘

基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一個較佳實施例中，該跨膜域來源於人類CD8 α 鏈(例如，NP_001139345.1)。跨膜域可另外在該細胞外配位體結合域與該跨膜域之間包含鉸鏈區。本文所使用的術語「鉸鏈區」一般意謂用於將跨膜域連接至細胞外配位體結合域的任何寡肽或多肽。特定言之，鉸鏈區用於為細胞外配位體結合域提供更高可撓性及可接近性。鉸鏈區可包含至多300個胺基酸，較佳10至100個胺基酸，且最佳25至50個胺基酸。鉸鏈區可來源於天然存在之分子的全部或一部分，諸如來源於CD8、CD4或CD28之細胞外區域之全部或一部分，或來源於抗體恆定區之全部或一部分。或者，鉸鏈區可為對應於天然存在之鉸鏈序列的合成序列，或可為完全合成之鉸鏈序列。在一個較佳實施例中，該鉸鏈域包含在本說明書中分別稱為SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4及SEQ ID NO.5之人類CD8 α 鏈、Fc γ RIII α 受體或IgG1之一部分，或與此等多肽展示較佳至少80%、更佳至少90%、95%、97%或99%序列一致性之鉸鏈多肽。

根據本發明之CAR一般進一步包含與SEQ ID NO. 6或7且更佳SEQ ID NO. 6(CD8 α TM)之多肽顯示一致性的較佳選自CD8 α 及4-1BB之跨膜域(TM)。

通常在癌細胞中觀察到標靶抗原之下調或突變，由此產生抗原損失之逃逸變體(escape variant)。因此，為了抵消腫瘤逃逸並使免疫細胞對標靶更具專一性，根據本發明之抗-GD3專一性CAR可包含另一細胞外配位體結合域，以同時結合標靶中之不同元件，由此加強免疫細胞活化及功能。在一個實施例中，該等細胞外配位體結合域可串聯置放於同一跨膜多肽上，且可視情況藉由連接子隔開。在另一個實施例中，該等不同細胞外配位體結合域可置放於構成CAR之不同跨膜多肽上。在另一個實施例中，本發明係關於一組CAR，其各自包含不同細胞外配位體結合域。在一個特定實施例中，本發明係關於一種工

程改造免疫細胞之方法，其包含提供免疫細胞及在該細胞之表面表現一組CAR，該組CAR各自包含不同細胞外配位體結合域。在另一特定實施例中，本發明係關於一種工程改造免疫細胞之方法，其包含提供免疫細胞及在該細胞中引入編碼構成一組CAR之多肽的多核苷酸，該組CAR各自包含不同細胞外配位體結合域。CAR組意謂至少兩個、三個、四個、五個、六個或超過六個CAR，其各自包含不同細胞外配位體結合域。根據本發明之不同細胞外配位體結合域較佳可同時結合標靶中之不同元件，由此加強免疫細胞活化及功能。本發明亦係關於一種分離之免疫細胞，其包含一組CAR，該組CAR各自包含不同細胞外配位體結合域。

多核苷酸、載體：

本發明亦係關於編碼上述根據本發明之CAR的多核苷酸、載體。

該多核苷酸可以處於表現卡匣或表現載體(例如，用於引入細菌宿主細胞中之質體，或用於轉染昆蟲宿主細胞之病毒載體，諸如桿狀病毒載體，或用於轉染哺乳動物宿主細胞之質體或病毒載體，諸如慢病毒)中。

在一個特定實施例中，可在一個多核苷酸或載體中包括不同核酸序列，其包含編碼核糖體跳躍序列的核酸序列，諸如編碼2A肽之序列。2A肽係在小核糖核酸病毒之口蹄疫病毒亞群中鑑別，其引起核糖體自一個密碼子「跳躍」至下一密碼子，同時不會在由該等密碼子編碼之兩個胺基酸之間形成肽鍵(參見(Donnelly及Elliott 2001；Atkins, Wills等人 2007；Doronina, Wu等人 2008))。「密碼子」意謂mRNA上(或在DNA分子之有義股上)由核糖體轉譯成一個胺基酸殘基之三個核苷酸。因此，當兩個多肽藉由同框之2A寡肽序列隔開時，可由mRNA內之單一、相鄰開放閱讀框架合成該等多肽。此類核糖體跳躍機制為此項技術中所熟知且已知將由表現由單一信使RNA編碼之

若干蛋白質的若干載體所使用。

為了將跨膜多肽引導至宿主細胞之分泌路徑中，在多核苷酸序列或載體序列中提供分泌信號序列(亦稱為前導序列、前原序列或前序列)。分泌信號序列可操作地連接至跨膜核酸序列，亦即，兩個序列接合於正確閱讀框架中且經安置以將新合成之多肽引導至宿主細胞之分泌路徑中。分泌信號序列通常安置在編碼所關注多肽之核酸序列的5'端，不過某些分泌信號序列可安置在所關注核酸序列中之其他地方(參見例如，Welch等人，美國專利第5,037,743號；Holland等人，美國專利第5,143,830號)。在一個較佳實施例中，信號肽包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1及2。

熟習此項技術者將認識到，考慮到遺傳密碼之簡併性，在該等多核苷酸分子中可能存在相當大的序列變化。較佳對本發明之核酸序列進行密碼子優化以在哺乳動物細胞中表現，較佳在人類細胞中表現。密碼子優化係指在給定物種之高度表現基因中一般罕見的所關注之密碼子序列經此類物種之高度表現基因中一般常見之密碼子替換，此類密碼子編碼與所替換之密碼子相同的胺基酸。

本發明尤其提供一種呈慢病毒載體形式之表現載體，其包含編碼根據本發明之CAR的多核苷酸序列。

因此，該慢病毒載體可包含根據本發明之編碼CAR之多核苷酸序列可操作地連接至啟動子(諸如脾病灶形成病毒啟動子(SFFV))。「可操作地連接」意謂所述之組分處於准許其以其預定方式起作用之關係中的併接。當一個基因(諸如編碼CAR之多核苷酸序列)之轉錄處於啟動子控制下且此轉錄產生由該基因編碼之產物時，該基因「可操作地連接」至該啟動子。

本發明之慢病毒載體通常含有調控元件，諸如5'及3'長末端重複(LTR)序列，而且亦可含有主要來源於慢病毒之其他結構及功能性遺

傳元件。此類結構及功能性遺傳元件為此項技術中所熟知。慢病毒載體可以例如含有基因 *gag*、*pol* 及 *env*。然而，本發明之慢病毒載體較佳不含有基因 *gag*、*pol* 及 *env*。作為另外的調控元件，慢病毒載體可包括包裝信號(諸如包裝信號 ψ)、引子結合位點、轉活化(trans-activation)反應區(TAR)及 *rev* 反應元件(RRE)中之一或多種(諸如兩種或兩種以上)。

通常側接慢病毒基因組之 5' 及 3' 長末端重複(LTR)序列具有啟動子/強化子活性且為正確表現全長慢病毒載體轉錄物必不可少的。LTR 通常包括存在於雙股 DNA 分子之 5' 端及 3' 端處的重複序列 U3RU5，其為單股 RNA 之 5' R-U5 區段與 3' U3-R 區段的組合，其中重複 R 出現在 RNA 之兩個末端，而 U5(單一序列 5)僅出現在 RNA 之 5' 端且 U3(單一序列 3)僅出現在 RNA 之 3' 端。然而，已經藉由移除 U3 序列改善慢病毒載體之安全性，產生完全缺乏最初存在於 LTR 內之病毒啟動子及強化子序列的「自滅活」載體。

因此，術語「自滅活」或「SIN」係指載體中 3' LTR 強化子-啟動子序列(亦即，U3 序列)已經修飾(例如，藉由缺失或取代)以防止在第一輪病毒複製外進行病毒轉錄。因此，該載體僅能夠感染且接著整合至宿主基因組一次，且無法進一步傳代，由此增加使用該載體作為基因遞送載體之安全性。

根據一些實施例，慢病毒載體為自滅活(SIN)慢病毒載體。根據特定實施例，慢病毒載體含有 3' LTR，其中 3' LTR 強化子-啟動子序列(亦即，U3 序列)已經修飾(例如，缺失)。

根據一些實施例，慢病毒載體包含以 5' 至 3' 次序包含以下元件之多核苷酸序列：

(A) 5' 長末端重複序列(5' LTR)；

(B) 啟動子(諸如 SFFV 啟動子)；

- (C) 編碼根據本發明之嵌合抗原受體之多核苷酸序列；及
- (D) 3'長末端重複序列(3' LTR)，較佳為3'自滅活LTR。

根據特定實施例，慢病毒載體包含以5'至3'次序包含以下元件之多核苷酸序列：

- (a) 5'長末端重複序列(5' LTR)；
- (b) 啟動子(諸如SFFV啟動子)；
- (c) 自殺基因(諸如RQR8)
- (d) 編碼2A肽之多核苷酸序列；
- (e) 編碼根據本發明之嵌合抗原受體之多核苷酸序列；及
- (f) 3'長末端重複序列(3' LTR)，較佳為3'自滅活LTR。

第(c)項之自殺基因、第(d)項之編碼2A肽之多核苷酸序列及第(e)項之CAR編碼序列形成可操作地連接至第(b)項之啟動子的單一轉錄單元且全部在該啟動子之控制下進行轉錄。

術語「自殺基因」係指表現的產物使表現自殺基因之細胞致死的基因。自殺基因之活化使細胞經由細胞凋亡殺死其自身。自殺基因產物之實例為RQR8(描述於例如WO 2013/153391 A1中)。RQR8具有通式St-R1-S1-Q-S2-R2，其中St為柄序列(stalk sequence)，R1及R2為利妥昔單抗(rituximab)結合之抗原決定基；及Q為QBEnd10結合之抗原決定基。S1及S2為可選間隔序列，諸如S-(G)*n*-S，其中S為絲胺酸，G為甘胺酸且*n*為在2與8之間之數字。RQR8之代表性多肽序列述於SEQ ID NO:60中。

根據一些實施例，2A肽係選自由以下組成之群：F2A、E2A、T2A及P2A。

用於驅動來自慢病毒載體的根據本發明之CAR在免疫細胞(較佳人類T細胞)中表現的適合啟動子為熟知的，且包括SFFV啟動子、人類泛素c (UbC)啟動子、I類MHC啟動子、II類MHC啟動子及β2微球蛋白

白啟動子。較佳地，該啟動子為SFFV啟動子。

根據一些實施例，慢病毒載體係呈慢病毒載體粒子形式，諸如RNA分子在慢病毒與其他蛋白質之複合體內。通常，慢病毒粒子載體包含由單股RNA之兩個複本構成的基因組。此等RNA序列可自插入宿主細胞基因組中之雙股DNA序列(前病毒載體DNA)轉錄而獲得，或可自質體DNA(質體載體DNA)在經轉導宿主細胞中短暫表現而獲得。較佳慢病毒載體粒子具有整合能力。因此，其含有功能性整合酶蛋白質。非整合性載體粒子具有一或多種除去慢病毒載體粒子之大部分或全部整合能力的突變。舉例而言，非整合性載體粒子可含有突變在慢病毒pol基因編碼之整合酶中，引起整合能力降低。相比之下，整合性載體粒子包含功能性整合酶蛋白質，不含任何除去慢病毒載體粒子之大部分或全部整合能力的突變。

根據其他實施例，慢病毒載體係呈重組DNA分子形式，諸如質體。

較佳地，慢病毒載體係基於人類免疫缺陷病毒(例如HIV-1或HIV-2)，最佳HIV-1。

工程改造具有CAR之免疫細胞的方法：

本發明涵蓋製備用於免疫療法之免疫細胞的方法，其包含將編碼一種如先前所描述之抗-GD3 CAR的多核苷酸或載體離體引入該等免疫細胞中。

在一個較佳實施例中，考慮到在免疫細胞中穩定表現，慢病毒載體中包括該等多核苷酸。

根據某些較佳實施例，該方法包含將如上文所描述之慢病毒載體離體引入該等免疫細胞中。引入該等免疫細胞中之慢病毒載體可以例如包含以5'至3'次序包含以下元件之多核苷酸序列：

(a) 5'長末端重複序列(5' LTR)；

- (b) 啟動子(諸如SFFV啟動子)；
- (c) 自殺基因(諸如RQR8)
- (d) 編碼自裂解2A肽之多核苷酸序列；
- (e) 編碼根據本發明之嵌合抗原受體之多核苷酸序列；及
- (f) 3'長末端重複序列(3' LTR)，較佳為3'自滅活LTR。

根據其他實施例，該方法進一步包含對該細胞進行基因修飾以使其更適於同種異體移植的步驟。

根據第一態樣，可例如WO 2013/176915中所描述，藉由使表現T細胞受體(TCR)一或多種組分之至少一個基因滅活來使免疫細胞成為同種異體的，該至少一個基因之滅活可與編碼或調控HLA或 β 2m蛋白質表現之基因滅活組合。此類具有嵌合抗原受體(CAR)之TCR破壞之免疫細胞的圖示顯示於圖3中。因此，移植物抗宿主症候群及移植物排斥反應之風險明顯降低。

根據另一態樣，免疫細胞可進一步經基因工程改造以改善其對用作治療GD3陽性惡性細胞之標準護理之免疫抑制藥物或化學療法治療的抗性。舉例而言，CD52及糖皮質激素受體(GR)為Campath(阿侖單抗(alemtuzumab))及糖皮質激素治療之藥物標靶，其可經滅活以使細胞對此等治療具有抗性並賦予其優於不具有專一性抗-GD3 CAR之患者自身T細胞之競爭性益處。亦可抑制或減少CD3基因之表現以賦予針對作為另一免疫抑制藥物之替利珠單抗(Teplizumab)的抗性。根據本發明，亦可抑制或減少HPRT之表現以賦予針對6-硫代鳥嘌呤(常用於化學療法中，尤其用於治療急性淋巴母細胞白血病之細胞抑制劑)的抗性。

根據本發明之其他態樣，可藉由使編碼充當「免疫檢查點」且充當T細胞活化之調控因子之蛋白質(諸如PDCD1或CTLA-4)的基因滅活，對免疫細胞進一步操作以使其更具活性或限制耗盡。表現可減少

或抑制之基因的實例於表1中指示。

表1：編碼免疫檢查點蛋白質之基因列表。

路徑	在該路徑中可滅活之基因	
共抑制受體	CTLA4 (CD152)	CTLA4、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22
	PDCD1 (PD-1、CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	IgSF家族	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
SIGLEC9		
CD244(2b4)	CD244	
死亡受體	TRAIL	TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7
	FAS	FADD、FAS
細胞因子信號傳導	TGF-β信號傳導	TGFBRII、TGFBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1
	IL10信號傳導	IL10RA、IL10RB、HMOX2
	IL6信號傳導	IL6R、IL6ST
阻止TCR信號傳導		CSK、PAG1
		SIT1
誘導性Treg	誘導性Treg	FOXP3
控制耗盡之轉錄因子	控制耗盡之轉錄因子	PRDM1 (=blimp1，雜合子小鼠控制慢性病毒感染優於野生型或條件性KO)
		BATF
低氧介導之耐受性	iNOS誘導之鳥苷酸環化酶	GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3

在一個較佳實施例中，該進一步工程改造免疫細胞之方法涉及將編碼專一性稀切核酸內切酶之多核苷酸，特定言之mRNA引入該等T細胞中以藉由DNA裂解使該等基因(如上文所提及之該等基因)選擇性滅活。在一個更佳實施例中，該等稀切核酸內切酶為TALE-核酸酶或Cas9核酸內切酶。到目前為止已證實，相較於其他類型稀切核酸內切酶，TAL-核酸酶具有較高的專一性及裂解效率，使其成為以恆定

轉換大規模產生經工程改造之免疫細胞的精選核酸內切酶。

遞送方法

以上描述的不同方法涉及將CAR引入細胞中。作為非限制性實例，該CAR可以由一個質體載體編碼之轉殖基因形式引入。該質體載體亦可含有用於鑑別及/或選擇接受該載體之細胞的選擇標記物。

多肽可由於在細胞中引入編碼該等多肽之多核苷酸而在該細胞中原位合成。或者，該等多肽可在細胞外部產生且接著引入細胞中。用於將多核苷酸構建體引入細胞中之方法係此項技術中已知的且作為非限制性實例，其包括穩定轉型方法，其中該多核苷酸構建體整合至細胞基因組中；短暫轉型方法，其中該多核苷酸構建體並未整合至細胞基因組中；及病毒介導之方法。該等多核苷酸可藉由例如重組病毒載體(例如，反轉錄病毒、腺病毒)、脂質體及其類似物引入細胞中。舉例而言，短暫轉型方法包括例如顯微注射、電穿孔或粒子轟擊。考慮到在細胞中表現，該等多核苷酸可包括在載體中，更特定言之，質體或病毒中。

經工程改造之免疫細胞

本發明亦係關於易於藉由該工程改造細胞之方法獲得的分離之細胞或細胞株。特定言之，該分離之細胞包含至少一個如上文所描述之CAR。在另一個實施例中，該分離之細胞包含一組CAR，其各自包含不同的細胞外配位體結合域。特定言之，該分離之細胞包含編碼CAR之外源多核苷酸序列。本發明之經基因修飾之免疫細胞係獨立於抗原結合機制經活化及增殖。

在本發明之範圍中，亦涵蓋如先前所描述之方法中之任一種獲得的分離之免疫細胞，較佳T細胞。該免疫細胞係指在功能上涉及固有及/或適應性免疫反應之起始及/或執行的造血來源之細胞。該根據本發明之免疫細胞可來源於幹細胞。該等幹細胞可為成體幹細胞、非

人類胚胎幹細胞，更特定言之，非人類幹細胞、臍帶血幹細胞、祖細胞、骨髓幹細胞、誘導性多能幹細胞、分化全能幹細胞或造血幹細胞。代表性人類細胞為CD34+細胞。該分離之細胞亦可為樹突狀細胞、殺傷樹突狀細胞、肥大細胞、NK細胞、B細胞，或選自由發炎性T-淋巴球、細胞毒性T淋巴球、調節性T淋巴球或輔助性T淋巴球組成之群的T細胞。在另一個實施例中，該細胞可來源於由CD4+ T淋巴球及CD8+ T淋巴球組成之群。在本發明之細胞擴增及基因修飾之前，可經由多種非限制性方法自個體獲得細胞來源。細胞可獲自眾多非限制性來源，包括周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染部位之組織、腹水、肋膜積液、脾組織及腫瘤。在本發明之某些實施例中，可以使用可用且熟習此項技術者已知之多種T細胞株。在另一個實施例中，該細胞可來源於健康供體、診斷患有癌症之患者或診斷具有感染之患者。在另一個實施例中，該細胞為呈現不同表型特徵之一組混合細胞的一部分。在本發明之範圍中，亦涵蓋自根據先前所描述之方法轉型之T細胞獲得的細胞株。本發明之範圍中涵蓋對免疫抑制治療具有抗性且易於藉由先前方法獲得的經修飾細胞。

作為較佳實施例，本發明提供具有如上文所描述之抗-GD3 CAR之T細胞或T細胞群，其不表現功能性TCR且對GD3陽性細胞具有反應性，適於將其同種異體移植至患者體內。舉例而言，作為一個實例，可藉由使用具有SEQ ID NO.44及45之TALEN對使SEQ ID NO. 43之TRAC基因座滅活。

T細胞之活化及擴增

在T細胞基因修飾之前抑或之後，甚至在獨立於抗原結合機制對本發明之經基因修飾之免疫細胞進行活化及增殖時，亦可大體上使用如例如美國專利 6,352,694、6,534,055、6,905,680、6,692,964、

5,858,358 、 6,887,466 、 6,905,681 、 7,144,575 、 7,067,318 、 7,172,869 、 7,232,566 、 7,175,843 、 5,883,223 、 6,905,874 、 6,797,514 、 6,867,041 ；及美國專利申請公開案第20060121005號中所描述之方法對本發明之免疫細胞，特定言之T細胞進一步活化及擴增。T細胞可在活體外或活體內擴增。

一般而言，藉由使T細胞表面上之共刺激分子與刺激CD3 TCR複合體之試劑接觸以產生T細胞活化信號來使本發明之T細胞擴增。舉例而言，可使用化學物質，諸如鈣離子載體A23187、佛波醇12-豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)或促有絲分裂凝集素(如植物血球凝集素(PHA))來產生T細胞之活化信號。

作為非限制性實例，T細胞群可在活體外，諸如藉由接觸抗CD3抗體或其抗原結合片段，或固定在表面上之抗-CD2抗體，或藉由接觸蛋白激酶C活化因子(例如，苔蘚蟲素)與鈣離子載體之組合進行刺激。為了共刺激T細胞表面上之輔助分子，使用結合輔助分子之配位體。舉例而言，T細胞群可與抗-CD3抗體及抗-CD28抗體在適於刺激T細胞增殖之條件下接觸。適合於T細胞培養之條件包括適當培養基(例如，最低必需培養基，或RPMI培養基1640，或X-vivo 5 (Lonza))，其可含有增殖及存活所需之因子，包括血清(例如，胎牛血清或人血清)、介白素-2(IL-2)、胰島素、IFN-g、1L-4、1L-7、GM-CSF、-10、-2、1L-15、TGFp及腫瘤壞死因子，或熟習此項技術者已知用於生長細胞之任何其他添加劑。用於細胞生長之其他添加劑包括(但不限於)界面活性劑、血漿製品，及還原劑，諸如N-乙醯基-半胱胺酸及2-巰基乙醇。培養基可包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1及X-Vivo 20、優化劑(Optimizer)，添加有胺基酸、丙酮酸鈉及維生素，無血清或補充有適量血清(或血漿)或一組確定的激素，及/或足以使T細胞生長及擴增之量的細胞因子。抗生素，

例如青黴素及鏈黴素，僅包括在實驗培養物中，而不包括在待輸注至個體之細胞培養物中。標靶細胞維持在支持生長所需之條件下，例如適當溫度(例如，37°C)及氛圍(例如，空氣加5% CO₂)。暴露於不同刺激時間之T細胞可展現不同特徵。

在另一特定實施例中，該等細胞可與組織或細胞共培養來進行擴增。該等細胞亦可在活體內，例如在將該細胞投與個體中之後於個體之血液中擴增。

治療應用

在另一個實施例中，如先前所描述，藉由不同方法獲得的分離之細胞或來源於該分離之細胞的細胞株可用作藥劑。

在另一個實施例中，該藥劑可以用於治療癌症，特別是用於治療有需要患者之實體腫瘤，諸如黑素瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤或癌瘤，諸如肺腫瘤、乳房腫瘤、結腸腫瘤、前列腺腫瘤或卵巢腫瘤。

在另一個實施例中，該根據本發明之分離之細胞或來源於該分離之細胞的細胞株可用於製造用以治療有需要患者之癌症之藥劑。

在另一態樣中，本發明依賴於用於治療有需要患者之方法，該方法包含以下步驟中之至少一個：

(a) 提供可藉由先前所描述之方法中之任一種獲得的免疫細胞；

(b) 將該轉型之免疫細胞投與該患者，

在一個實施例中，該等本發明之T細胞可經歷穩定的活體內T細胞擴增且可保留一段較長時間量。

該治療可為改善性、治癒性或預防性的。其可為自體免疫療法之一部分或為同種異體免疫療法治療之一部分。自體意謂用於治療患者之細胞、細胞株或細胞群係源自該患者或源自人白血球抗原(HLA)

相容性供體。同種異體意謂用於治療患者之細胞或細胞群並非源自該患者，而是源自供體。

可用於所揭示之方法的細胞描述於前一節中。該治療可用於治療診斷患有以GD3表現細胞，尤其以GD3表現細胞過多為特徵之癌前或惡性癌症病狀的患者。此類病狀見於實體癌症，諸如黑素瘤、神經膠質瘤、神經母細胞瘤或癌瘤中。

在另一個實施例中，該根據本發明之分離之細胞或來源於該分離之細胞的細胞株可以用於治療液體腫瘤且較佳治療T細胞急性淋巴母細胞白血病。

成人腫瘤/癌症及兒科腫瘤/癌症亦包括在內。

用根據本發明之經工程改造免疫細胞進行之治療可與選自以下之群之一或多種針對癌症之療法組合：抗體療法、化學療法、細胞因子療法、樹突狀細胞療法、基因療法、激素療法、雷射光療法及放射療法。

根據本發明之一個較佳實施例，該治療可投與正在進行免疫抑制治療之患者。實際上，本發明較佳依賴於由於編碼此類免疫抑制劑之受體的基因滅活而對至少一種免疫抑制劑產生抗性的細胞或細胞群。在此態樣中，免疫抑制治療應幫助在患者內選擇及擴增根據本發明之T細胞。

根據本發明之細胞或細胞群可以任何便利方式投與，包括藉由氣霧劑吸入、注射、攝取、輸注、植入或移植。可經皮下、皮內、瘤內、結節內、髓內、肌肉內、藉由靜脈內或淋巴管內注射，或經腹膜內向患者投與本文所描述之組合物。在一個實施例中，較佳藉由靜脈內注射投與本發明之細胞組合物。

細胞或細胞群之投與可由投與 10^4 至 10^9 個細胞/kg體重，較佳 10^5 至 10^6 個細胞/kg體重(包括在該等範圍內之所有整數值之細胞數)組

成。可投與一或多次劑量之細胞或細胞群。在另一個實施例中，該等有效量之細胞係以單次劑量投與。在另一個實施例中，該等有效量之細胞係以超過一次劑量經一段時間投與。投藥時序係在主治醫師之判斷內且取決於患者之臨床病狀。細胞或細胞群可自任何來源獲得，諸如血庫或供體。儘管個體需要變化，但針對特定疾病或病狀之給定細胞類型的最佳有效量範圍之確定係在此項技術之技能範圍內。有效量意謂提供治療或預防益處之量。所投與之劑量將取決於接受者之年齡、健康狀況及體重；同時治療(若存在)之種類；治療頻率；及所需作用之性質。

在另一個實施例中，該等有效量之細胞或包含該等細胞之組合物係非經腸投與。該投與可為靜脈內投與。該投與可藉由在腫瘤內注射直接進行。

在本發明之某些實施例中，向患者投與細胞與多種相關治療方式之組合(例如，在投與細胞之前、同時或之後投與)，該等治療方式包括(但不限於)用藥劑治療，諸如抗病毒療法、西多福韋(cidofovir)及介白素-2、阿糖胞苷(亦稱為ARA-C)，或針對MS患者之那他珠單抗(natalizumab)治療，或針對牛皮癬患者之依法珠單抗(efalizumab)治療，或針對PML患者之其他治療。在其他實施例中，本發明之T細胞可與化學療法、放射、免疫抑制劑(諸如環孢素、硫唑嘌呤、甲胺嘌呤、黴酚酸酯及FK506)、抗體或其他免疫燒蝕劑(諸如CAMPATH)、抗CD3抗體或其他抗體療法、細胞毒素、氟達拉濱(fludarabine)、環孢素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸、類固醇、FR901228、細胞因子及照射組合使用。此等藥物抑制鈣依賴性磷酸酶鈣調神經磷酸酶(環孢素及FK506)或抑制對於生長因子誘導之信號傳導極為重要之p70S6激酶(雷帕黴素)(Henderson, Naya等人1991；Liu, Albers等人1992；Bierer, Hollander等人1993)。在另一實施例中，向患者投與本

發明之細胞組合物與骨髓移植；使用化學治療劑(諸如氟達拉濱)、外部射線放射療法(XRT)、環磷醯胺或抗體(諸如OKT3或CAMPATH)進行之T細胞消融療法之組合(例如，在投與細胞組合物之前、同時或之後投與)。在另一個實施例中，本發明之細胞組合物係在B細胞消融療法(諸如與CD20反應之試劑，例如美羅華(Rituxan))之後投與。舉例而言，在一個實施例中，個體可經歷使用高劑量化學療法之標準治療，隨後經歷周邊血液幹細胞移植。在某些實施例中，在移植後，個體接受本發明之經擴增免疫細胞輸注。在另一實施例中，在手術之前或之後投與擴增之細胞。

根據本發明之抗-GD3 CAR之治療應用的較佳適應症為黑素瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤、乳癌、卵巢上皮腫瘤、神經內分泌腫瘤及T細胞急性淋巴母細胞白血病。

其他定義

- 多肽序列中之胺基酸殘基在本文中係根據單字母代碼命名，其中例如，Q意謂Gln或麩醯胺酸殘基，R意謂Arg或精胺酸殘基，且D意謂Asp或天冬胺酸殘基。

- 胺基酸取代意謂一個胺基酸殘基經另一個胺基酸殘基置換，例如，肽序列中之精胺酸殘基經麩醯胺酸殘基置換為一種胺基酸取代。

- 核苷酸如下命名：使用單字母代碼指定核苷鹼基：a為腺嘌呤，t為胸腺嘧啶，c為胞嘧啶，且g為鳥嘌呤。對於簡併之核苷酸，r表示g或a(嘌呤核苷酸)，k表示g或t，s表示g或c，w表示a或t，m表示a或c，y表示t或c(嘧啶核苷酸)，d表示g、a或t，v表示g、a或c，b表示g、t或c，h表示a、t或c，且n表示g、a、t或c。

- 如本文所使用，「核酸」或「多核苷酸」係指核苷酸及/或多核苷酸，諸如脫氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、藉由聚合酶鏈反應(PCR)產生之片段，及藉由連接、斷裂、核酸內切酶作

用及核酸外切酶作用中之任一種產生的片段。核酸分子可由單體構成，該等單體為天然存在之核苷酸(諸如DNA及RNA)，或天然存在之核苷酸之類似物(例如，天然存在之核苷酸之對映異構形式)，或兩者之組合。經修飾之核苷酸可在糖部分中及/或嘧啶或嘌呤鹼基部分中具有改變。糖修飾包括例如用鹵素、烷基、胺及疊氨基置換一或多個羥基，或糖可官能化為醚或酯形式。此外，整個糖部分用在空間上及電子上類似之結構，諸如氮雜-糖及碳環糖類似物置換。鹼基部分中修飾之實例包括烷基化之嘌呤及嘧啶、醯基化之嘌呤或嘧啶，或其他熟知之雜環取代。核酸單體可藉由磷酸二酯鍵或此類鍵聯之類似物連接。核酸可為單股或雙股的。

- 嵌合抗原受體(CAR)意欲為將針對標靶細胞上存在之組分的結合域，例如針對所需抗原(例如，腫瘤抗原)的基於抗體之專一性與T細胞受體活化細胞內域組合以產生展現專一性抗標靶細胞免疫活性之嵌合蛋白質的分子。一般而言，CAR由細胞外單鏈抗體(scFvFc)與T細胞抗原受體複合體 ζ 鏈之細胞內信號傳導域融合(scFvFc: ζ)而組成且當在T細胞中表現時，能夠基於單株抗體之專一性重定向抗原識別。如WO2014039523中所描述，CAR有時可包含多個跨膜多肽(多鏈CAR)。本發明中所使用之CAR的一個實例為針對GD3抗原之CAR且作為非限制性實例，可包含胺基酸序列：SEQ ID NO: 19至30。

- 術語「核酸內切酶」係指能夠催化在DNA或RNA分子，較佳DNA分子內之核酸之間的鍵水解(裂解)的任何野生型或變體酶。核酸內切酶不會裂解DNA或RNA分子，無論其序列如何，但識別及裂解DNA或RNA分子之特定多核苷酸序列，又稱為「標靶序列」或「標靶位點」。核酸內切酶當通常具有超過12個鹼基對(bp)，更佳14至55 bp長度之多核苷酸識別位點時，可歸類為稀切核酸內切酶。稀切核酸內切酶藉由在確定之基因座處誘導DNA雙股斷裂(DSB)使HR明顯增加

(Perrin, Buckle等人1993； Rouet, Smih等人1994； Choulika, Perrin等人1995； Pingoud及Silva 2007)。稀切核酸內切酶可例如為歸巢核酸內切酶(Paques及Duchateau 2007)；由經工程改造之鋅指域與諸如FokI之限制酶之催化區融合而產生的嵌合鋅指核酸酶(ZFN)(Porteus及Carroll 2005)；來自CRISPR系統之Cas9核酸內切酶(Gasiunas, Barrangou等人2012； Jinek, Chylinski等人2012； Cong, Ran等人2013； Mali, Yang等人2013)；或化學核酸內切酶(Eisenschmidt, Lanio等人2005； Arimondo, Thomas等人2006)。在化學核酸內切酶中，化學或肽裂解劑與核酸聚合物或識別特定標靶序列之另一DNA結合，由此使裂解活性靶向特定序列。化學核酸內切酶亦涵蓋已知結合特定DNA序列之合成核酸酶，如鄰二氮雜菲、DNA裂解分子及三鏈形成寡核苷酸(TFO)之結合物(Kalish及Glazer 2005)。此類化學核酸內切酶包含在根據本發明之術語「核酸內切酶」中。

- 「TALE-核酸酶」(TALEN)意欲為由通常來源於類轉錄活化因子效應子(TALE)之核酸結合域及一個核酸酶催化域組成的用以裂解核酸標靶序列的融合蛋白。該催化域較佳為核酸酶域且更佳為具有核酸內切酶活性之域，如例如I-TevI、ColE7、NucA及Fok-I。在一個特定實施例中，TALE域可與大範圍核酸酶，如例如I-CreI及I-OnuI或其功能變體融合。在一個更佳實施例中，該核酸酶為單體TALE-核酸酶。單體TALE-核酸酶為專一性識別及裂解不需要二聚合之TALE-核酸酶，諸如WO2012138927中描述的經工程改造之TAL重複序列與I-TevI之催化域之融合物。類轉錄活化因子效應子(TALE)係來自黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)細菌種類之蛋白質，其包含複數個重複序列，每個重複序列包含在12位及13位之二殘基(RVD)，其對核酸靶向序列之每個核苷酸鹼基具有專一性。具有類似模組化逐鹼基核酸結合特性(MBBBD)之結合域亦可來源於本申請人近來在不同細菌種類中發現

的新模組化蛋白質。該等新模組化蛋白質具有展示比TAL重複序列更高之序列變化的益處。較佳地，與識別不同核苷酸有關之RVD為用於識別C之HD，用於識別T之NG，用於識別A之NI，用於識別G或A之NN，用於識別A、C、G或T之NS，用於識別T之HG，用於識別T之IG，用於識別G之NK，用於識別C之HA，用於識別C之ND，用於識別C之HI，用於識別G之HN，用於識別G之NA，用於識別G或A之SN，及用於識別T之YG，用於識別A之TL，用於識別A或G之VT及用於識別A之SW。在另一個實施例中，關鍵胺基酸12及13可突變成其他胺基酸殘基，以便調節其針對核苷酸A、T、C及G之專一性且特別是增強此專一性。已經描述TALE-核酸酶且其被用於刺激基因靶向及基因修飾(Boch, Scholze等人2009；Moscou及Bogdanove 2009；Christian, Cermak等人2010；Li, Huang等人2011)。定製之TAL-核酸酶為可以商品名TALENTM(Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France)購得。

根據本發明之稀切核酸內切酶亦可為Cas9核酸內切酶。近來，基於RNA導引之Cas9核酸酶(Gasiunas, Barrangou等人2012；Jinek, Chylinski等人2012；Cong, Ran等人2013；Mali, Yang等人2013)，由II型原核CRISPR(成簇規律間隔短回文重複序列)適應性免疫系統開發出新的基因組工程改造工具(相關評述，參見(Sorek, Lawrence等人2013))。CRISPR相關(Cas)系統最先在細菌中發現且充當針對外來DNA(病毒或質體DNA)之防禦。CRISPR介導之基因組工程改造首先藉由選擇通常側接稱為原間隔子相鄰基元(PAM)之短序列基元的標靶序列來進行。在選定標靶序列之後，對與此標靶序列互補之特定crRNA進行工程改造。II型CRISPR系統中所需之轉活化(Trans-activating) crRNA(tracrRNA)與crRNA配對並結合至所提供之Cas9蛋白質。Cas9充當分子錨，促進tracrRNA與crRNA之鹼基配對(Deltcheva,

Chylinski等人2011)。在此三元複合體中，tracrRNA:crRNA二元結構充當導引RNA，將核酸內切酶Cas9引導至同源標靶序列。Cas9-tracrRNA:crRNA複合體之標靶識別係藉由針對標靶序列與crRNA之間之同源性掃描標靶序列來起始。除標靶序列-crRNA互補性外，DNA靶向需要存在鄰近於原間隔子之短基元(原間隔子相鄰基元-PAM)。在雙-RNA與標靶序列之間配對之後，接著引入Cas9使PAM基元上游3個鹼基處平頭雙股斷裂(Garneau, Dupuis等人2010)。

稀切核酸內切酶可為歸巢核酸內切酶，亦稱為大範圍核酸酶。此類歸巢核酸內切酶為此項技術熟知的(Stoddard 2005)。歸巢核酸內切酶識別DNA標靶序列且產生單股或雙股斷裂。歸巢核酸內切酶具有高度專一性，識別長度範圍為12至45個鹼基對(bp)，通常長度範圍為14至40 bp之DNA標靶位點。根據本發明之歸巢核酸內切酶可以例如對應於LAGLIDADG核酸內切酶、HNH核酸內切酶或GIY-YIG核酸內切酶。較佳根據本發明之歸巢核酸內切酶可為I-CreI變體。

- 「遞送載體(delivery vector/delivery vectors)」意欲為可用於本發明中以將本發明中所需之試劑/化學物質及分子(蛋白質或核酸)與細胞接觸(亦即，「接觸」)或遞送至細胞內部或亞細胞區室(亦即，「引入」)的任何遞送載體。其包括(但不限於)脂質體遞送載體、病毒遞送載體、藥物遞送載體、化學載劑、聚合物載劑、脂複合體、聚合複合體、樹枝狀聚合物、微泡(超音造影劑)、奈米粒子、乳液或其他適當之轉移載體。「遞送載體」亦意欲為執行轉染之遞送方法。

- 術語「載體(vector/vectors)」係指能夠輸送其所連接之另一核酸的核酸分子。在本發明中「載體」包括(但不限於)病毒載體、質體RNA載體，或者線性或圓形DNA或RNA分子，其可由染色體、非染色體、半合成核酸或合成核酸組成。較佳載體為能夠自主複製(游離型載體)及/或表現其所連接之核酸的載體(表現載體)。熟習此項技術

者已知大量適合載體且其為可商購的。

病毒載體包括反轉錄病毒；腺病毒；小病毒(例如，腺相關病毒)；冠形病毒；負股RNA病毒，諸如正黏病毒(例如，流感病毒)、棒狀病毒(例如，狂犬病及水泡性口炎病毒)、副黏病毒(例如，麻疹病毒及仙台(Sendai)病毒)；正股RNA病毒，諸如小RNA病毒及 α 病毒；及雙股DNA病毒，包括腺病毒、疱疹病毒(例如，1型及2型單純疱疹病毒、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)、巨細胞病毒)及痘病毒(例如，牛痘病毒、禽痘病毒及金絲雀痘病毒)。其他病毒包括例如諾沃克病毒(Norwalk virus)、披衣病毒、黃病毒、呼腸孤病毒、乳多泡病毒、嗜肝DNA病毒及肝炎病毒。反轉錄病毒之實例包括：鳥類白血病性肉瘤性病毒、哺乳動物C型病毒、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV群、慢病毒、泡沫病毒(Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, Fundamental Virology, 第三版, B.N.Fields等人編, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

- 「慢病毒載體」意謂基於HIV之慢病毒載體，其由於相對較大之包裝能力、降低之免疫原性及其高效穩定轉導大量不同細胞類型之能力而在基因遞送方面極具前景。慢病毒載體通常在將三個(包裝、包膜及轉移)或更多質體短暫轉染至生產細胞中之後產生。與HIV相同，慢病毒載體經由病毒表面糖蛋白與細胞表面上之受體的相互作用而進入標靶細胞。在進入後，病毒RNA進行反轉錄，此係由病毒反轉錄酶複合體所介導。反轉錄之產物為雙股線性病毒DNA，其為感染細胞之DNA中病毒整合之受質。「整合性慢病毒載體(或LV)」意謂(作為非限制性實例)能夠整合標靶細胞基因組之載體。相對地，「非整合性慢病毒載體(或NILV)」意謂不能經由病毒整合酶之作用整合標靶細胞基因組之高效基因遞送載體。

- 遞送載體及載體可與任何細胞滲透技術，諸如聲致穿孔或電穿

孔或此等技術之衍生技術結合或組合。

- 細胞意欲為任何真核活細胞、原代細胞及來源於此等生物體之活體外培養物的細胞株。

- 「原代細胞(primary cell/primary cells)」意欲為直接自活體組織(亦即，活檢材料)取得且確定用於活體外生長之細胞，其經歷極少的群體倍增且因此相較於連續致瘤或人工永生化之細胞株，其更能代表獲得其之組織之主要功能組分及特徵。

作為非限制性實例，細胞株可選自由以下組成之群：CHO-K1細胞；HEK293細胞；Caco2細胞；U2-OS細胞；NIH 3T3細胞；NSO細胞；SP2細胞；CHO-S細胞；DG44細胞；K-562細胞；U-937細胞；MRC5細胞；IMR90細胞；Jurkat細胞；HepG2細胞；HeLa細胞；HT-1080細胞；HCT-116細胞；Hu-h7細胞；Huvec細胞；Molt 4細胞。

所有此等細胞株可藉由本發明之方法修飾以提供細胞株模型，由此製造、表現、定量、偵測、研究所關注的基因或蛋白質；此等模型亦可用於在研究及製造以及諸如(作為非限制性實例)化學、生物燃料、治療劑及農學之各種領域中篩選所關注的生物活性分子。

- 「突變」意欲為多核苷酸(cDNA、基因)或多肽序列中至多一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、二十個、二十五個、三十個、四十個、五十個或更多個核苷酸/胺基酸之取代、缺失、插入。突變可影響基因之編碼序列或其調控序列。其亦可能影響基因組序列之結構或編碼之mRNA之結構/穩定性。

- 「變體」意欲為重複變體、變體、DNA結合變體、TALE-核酸酶變體、由母分子胺基酸序列中至少一個殘基之突變或置換獲得的多肽變體。

- 「功能變體」意欲為蛋白質或蛋白質域之催化活性突變體；此

類突變體相較於其親本蛋白質或蛋白質域或另外的特性可具有相同活性，或者更高或更低活性。

- 「一致性」係指兩個核酸分子或多肽之間的序列一致性。一致性可藉由對出於比較目的而對準之每個序列中的位置進行比較來測定。當比較序列中之位置由相同鹼基佔據時，則該等分子在該位置處為一致的。核酸或胺基酸序列之間之相似性或一致性程度隨在該等核酸序列共有之位置處一致或相配核苷酸之數量而變化。可使用各種比對演算法及/或程式來計算兩個序列之間的一致性，包括FASTA或BLAST，其可作為GCG序列分析包(University of Wisconsin, Madison, Wis.)之一部分獲得，且可以例如預設設置使用。舉例而言，涵蓋與本文所描述之特定多肽具有至少70%、85%、90%、95%、98%或99%一致性且較佳展現實質上相同之功能的多肽以及編碼此類多肽之多核苷酸。除非另外指示，否則相似性分值將基於BLOSUM62之使用。當使用BLASTP時，相似性百分比係基於BLASTP正分值且序列一致性百分比係基於BLASTP一致性分值。BLASTP「一致性」顯示高得分序列中一致之總殘基數目及分數；且BLASTP「正值」顯示比對得分具有正值且彼此相似之殘基之數目及分數。本發明預期且涵蓋與本文所揭示之胺基酸序列具有此等程度之一致性或相似性或任何中間程度之一致性或相似性的胺基酸序列。使用遺傳密碼推導具有相似多肽之多核苷酸序列，且其可藉由習知手段，特定言之，藉由使用遺傳密碼反向轉譯其胺基酸序列獲得。

- 「信號轉導域」或「共刺激配位體」係指抗原呈遞細胞上專一性結合T細胞上之同源共刺激分子而由此提供信號之分子，除例如TCR/CD3複合體與裝載有肽之MHC分子結合所提供之初級信號外，該信號亦介導T細胞反應，包括(但不限於)增殖活化、分化及其類似反應。共刺激配位體可包括(但不限於)CD7、B7-1(CD80)、B7-

2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激配位體(ICOS-L)、細胞間黏著分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素 β 受體、3/TR6、ILT3、ILT4、結合鐸(Toll)配位體受體之促效劑或抗體，及專一性結合B7-H3之配位體。共刺激配位體亦尤其涵蓋專一性結合T細胞上存在之共刺激分子，諸如(但不限於)CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LTGHT、NKG2C、B7-H3的抗體、專一性結合CD83之配位體。

術語「共刺激分子」係指T細胞上專一性結合共刺激配位體，由此藉由該細胞介導共刺激反應(諸如(但不限於)增殖)之同源結合搭配物。共刺激分子包括(但不限於)I類MHC分子、BTLA及鐸(Toll)配位體受體。

如本文所使用，「共刺激信號」係指與初級信號組合(諸如TCR/CD3連接)，導致T細胞增殖及/或關鍵分子上調或下調之信號。

如本文所使用，術語「細胞外配位體結合域」定義為能夠結合配位體之寡肽或多肽。較佳地，該域將能夠與細胞表面分子相互作用。舉例而言，可選擇細胞外配位體結合域以識別與特定疾病狀態相關之標靶細胞上用作細胞表面標記物之配位體。因此，可用作配位體之細胞表面標記物之實例包括與病毒、細菌及寄生蟲感染、自身免疫疾病及癌細胞有關之標記物。

如本文所使用，術語「個體」或「患者」包括動物界所有成員，包括非人類靈長類動物及人類。

本發明之以上書面說明提供製備及使用本發明之方式及方法，以使得熟習此項技術者能夠製備及使用本發明，此實現特別提供於所附申請專利範圍之主題中，構成原始說明之一部分。

當本文中陳述數字界限或範圍時，包括終點在內。另外，在數

字界限或範圍內的所有值及子範圍均特定地包括在內，就如同明確寫出一般。

呈現以上說明以使熟習此項技術者能夠製備並使用本發明，且其提供於特定應用及其要求的上下文中。熟習此項技術者將易於瞭解對較佳實施例的各種修改，且在不背離本發明之精神及範疇的情況下，本文所定義之一般原理可應用於其他實施例及應用。因此，本發明並不意欲侷限於所顯示之實施例，而應符合與本文揭示之原理及特徵一致的最廣泛範疇。

已大體上描述本發明，參照某些具體實例可獲得進一步理解，該等實例僅出於說明的目的提供於本文中，且不意欲為限制性的，除非另外規定。

實例

實例1.GD3陽性及GD3陰性細胞株之選擇

材料及方法

原代細胞

藉由密度梯度離心，由來自健康志願者供體 (Etablissement Français du Sang) 之白血球層分離出周邊血液單核細胞。接著使用 EasySep 人類 T 細胞富集套組 (Stemcell Technologies) 純化 T 淋巴球，且在補充有 20 ng/mL IL-2 (Miltenyi) 及 5% 人類 AB 血清 (Seralab) 之 X-vivo 15 培養基 (Lonza) 中用 Dynabeads 人類 T-活化因子 CD3/CD28 (Life Technologies) 使其活化。

細胞株

SK-MEL-28、A2058、G-361、MeWo 及 MCF-7 細胞株係自美國菌種保藏中心 (American Type Culture Collection) 獲得。MeWo 及 SK-MEL-28 細胞在補充有 10% 熱滅活 FCS、2 mmol/L L-麩醯胺酸及 100 個單位/毫升青黴素及 100 µg/mL 鏈黴素之 EMEM 中培養。A2058 細胞在

補充有10%熱滅活FCS、2 mmol/L L-麩醯胺酸及100個單位/毫升青黴素及100 µg/mL鏈黴素之DMEM中培養。G-361細胞在補充有10%熱滅活FCS、2 mmol/L L-麩醯胺酸及100個單位/毫升青黴素及100 µg/mL鏈黴素之McCoy's 5a中培養。MCF-7細胞在補充有10%熱滅活FCS、2 mmol/L L-麩醯胺酸及100個單位/毫升青黴素及100 µg/mL鏈黴素以及0.01 mg/ml人胰島素之DMEM中培養。

GD3細胞表面表現之定量

根據製造商之說明，使用單株抗-GD3 R24(ab11779-Abcam)及Dako QiFIKIT，藉由飽和結合來測定不同人類細胞上GD3表面分子之數量。

結果

為了鑑別表現不同細胞表面表現量之GD3的細胞株，使用Qifikit(Dako)及抗人類GD3 mAb純系R24(參見材料及方法)，藉由流式細胞測量術分析7種人類細胞株。如下表2中所示，此等細胞株中有四種先前已在文獻中描述為呈GD3陽性。

表2：選擇的用於表現GD3之細胞株

細胞株	說明	細胞類型
CHP-134	黏附	神經母細胞瘤
G-361	黏附	惡性黑素瘤
MeWo	黏附	惡性黑素瘤
SK-MEL-28	黏附	惡性黑素瘤

流式細胞測量術結果指示，SK-MEL-28、G-361及MeWo細胞表現最高的GD3表面表現量。在A2058、CHP-134及MDA-MB-231細胞上偵測到較低含量(圖2)。相較於SK-MEL-28、G361、Mewo及A2058細胞，MCF-7細胞及T細胞僅表現可忽略之量的GD3(圖2)。

自此等實驗選出5個細胞株以篩選抗-GD3 scCAR之活性：視為GD3陽性之SK-MEL-28、G-361、MeWo及A2058細胞，及視為GD3陰性之MCF-7細胞。

實例2：抗-GD3 scCAR之產生

在此等實驗中藉由構建塊融合設計出十二種第2代抗-GD3專一性scCAR，如圖4中所描繪。

-一個來自鼠類(MB3.6或KM641或BW2121或R24)來源之scFv

-一個間隔子(人類FcεRIIIα鉸鏈或人類CD8α鉸鏈或人類IgG1鉸鏈CH2 CH3)

-人類CD8α之跨膜域

-人類41BB之共刺激域

-人類CD3ζ之活化域

在scCAR中使用不同scFv以產生具有不同結合親和力及不同抗原決定基專一性之受體。

在scCAR使用不同長度之三個間隔子(16個aa、45個aa及231個aa)以嘗試優化scCAR與GD3之近端及遠端抗原決定基之接合(Guest等人, 2005；Hudecek等人, 2013)。

材料及方法

編碼scCAR之DNA的合成

編碼scCAR之DNA係由GenScript合成。

scCAR之活體外轉錄mRNA載體之構建

將編碼scCAR之DNA選殖於質體pCLS9632中T7啟動子與BGH多聚A之間。

抗-GD3 scCAR：組分及構造

用於構建抗-GD3 CAR之scFv的所有組分呈現於下表2及表3中。

取決於所用鉸鏈及連接子，下表3至表7分別對應於形式v1至v3之結構。

表3：不同CAR組分之序列

功能域	SEQ ID #	原始胺基酸序列
CD8 α 信號肽	SEQ ID NO.1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
替代性信號肽 (作為實例，未用於實驗)	SEQ ID NO.2	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
Fc ϵ R1II α 鉸鏈	SEQ ID NO.3	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8 α 鉸鏈	SEQ ID NO.4	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACD
IgG1鉸鏈	SEQ ID NO.5	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD8 α 跨膜域	SEQ ID NO.6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
41BB跨膜域 (作為實例，未用於實驗中)	SEQ ID NO.7	IISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVV
41BB細胞內域	SEQ ID NO.8	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL
CD3 ζ 細胞內域	SEQ ID NO.9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQUALPPR
G4Sx3連接子	SEQ ID NO.10	GGGGSGGGGSGGGGS

表4：scFv之VH及VL鏈及其相應CDR之序列

ScFv序列	SEQ ID #	原始胺基酸序列
R24重鏈可變區	SEQ ID NO.11	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSNFGMHWV RQAPEKGLEWVAYISSGGSSINYADTVKGRFTISRDNPK NTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRGGTGTRSLYYFDYWGQ GATLIV
	SEQ ID NO.36	NFGMH (CDR1)
	SEQ ID NO.37	YISSGGSSINYADTV (CDR2)
	SEQ ID NO.38	GGTGRSLYYFDY (CDR3)

R24輕鏈可變區	SEQ ID NO.12	DIQMTQITSSLSVSLGDRVIISCRASQDIGNFLNHWYQQK PDGSLKLLIYYTSRLQSGVPSRFSGWGS GTDYSLTISNLE EEDIATFFCQQGKTLPYTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO.39	RASQDIGNFLN (CDR1)
	SEQ ID NO.40	YTSRLQS (CDR2)
	SEQ ID NO.41	QQGKTLPYT (CDR3)
MB3.6重鏈可變區	SEQ ID NO.13	EVVVVESGGGFVKPGGSLKLSCAAAGFTFSRYAMSWV RQTPEKRLEWVATISSGGSHYYPDSVKGRFTISRDNAL NTLYLQMSSLRSEDTAIYYCARPGYDRGAWFFDVWGA GTTVTVSS
	SEQ ID NO.42	GFTFSRYA (CDR1)
	SEQ ID NO.43	ISSGGSHY (CDR2)
	SEQ ID NO.44	ARPGYDRGAWFFDV (CDR3)
MB3.6輕鏈可變區	SEQ ID NO.14	DIVLTQSPATLSVTPGDVSVLSCRASQIISNNLHWYQQK SHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMYFCQQSNSWPLTFGSGTKLEIKR
	SEQ ID NO.45	QIISNN (CDR1)
	SEQ ID NO.46	YAS (CDR2)
	SEQ ID NO.47	QQSNSWPLT (CDR3)
KM641重鏈可變區	SEQ ID NO.15	EVTLVESGGDFVKPGGSLKLVSCAASGFASHYAMSWVR QTPAKRLEWVAYISSGGSGTYYSDSVKGRFTISRDNAL TLYLQMRSLRSEDSAMYFCTRVKLGTYFDSWGQGTTL TVSS
	SEQ ID NO.48	HYAMS (CDR1)
	SEQ ID NO.48	YISSGGSGTYYSDSVKG (CDR2)
	SEQ ID NO.49	VKLGTYFDS (CDR3)
KM641輕鏈可變區	SEQ ID NO.16	DIQMTQTASSLPASLGDRVTISCSASQDISNYLNHWYQQ KPDGTVKLLIFYSSNLHSGVPSRFSGGGSGTDYSLTISNLE PEDIATYFCHQYSKLPWTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO.50	SASQDISNYLN (CDR1)
	SEQ ID NO.51	YSSNLHS (CDR2)
	SEQ ID NO.52	HQYSKLPWT (CDR3)
BW2121重鏈可變區	SEQ ID NO.17	QVQLQQSGGGLVKPGGSLTLSCAASRFTFSTYAMSWV RQTPAKRLEWVAYISSGGASTYYRDSVKGRFTISRDNAL NTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARGGSRyamDYWGQGT TVTSS
	SEQ ID NO.53	RFTFSTYA (CDR1)
	SEQ ID NO.54	ISSGGAST (CDR2)
	SEQ ID NO.55	ARGGSRyamDY (CDR3)

BW2121輕鏈可變區	SEQ ID NO.18	DIQLTQSPAILSVSPGERVFSFCWASQSIGTSIHWYQQR TNGSPRLLIKYSSESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSLESED IADYYCQQTYSWPFTFGSGTKLEI
	SEQ ID NO.56	QSIGTS (CDR1)
	SEQ ID NO.57	YSS (CDR2)
	SEQ ID NO.58	QQTYSWPFT (CDR3)

表5：結構V-1之CAR

SEQ ID NO.	CAR結構						
	信號肽 (可選)	VH	VL	FcεRIII α鉸鏈	CD8α TM	41BB -IC	CD3ζ IC
(SEQ ID NO.19)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.22)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.25)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.28)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

表6：結構V2之CAR

SEQ ID NO	CAR結構						
	信號肽 (可選)	VH	VL	CD8α鉸 鏈	CD8α TM	41BB -IC	CD3ζ IC
(SEQ ID NO.20)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.23)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.26)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.29)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

表7：結構V-3之CAR

SEQ ID NO.	CAR結構						
	信號肽 (可選)	VH	VL	IgG1 鉸 鏈	CD8α TM	41BB -IC	CD3ζ IC
(SEQ ID NO.21)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.24)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.27)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
(SEQ ID NO.30)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

抗-GD3 scCAR之胺基酸呈現於以下SEQ ID NO.19至30中。

在本發明中測試之抗-GD3 CAR多肽序列

加框序列對應於較佳之VH及VL序列。

R24 v1 (SEQ ID NO.19)

MALPVTALLPLALLHAARP DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG
 GSSINYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRGGTGTRSLYFDYWGGQATLIVGGGGSGGGGS
 GGGGS DIQMTQITSSLSVSLGDRVIISCRASQDIGNFLNWWYQQKPDGSLKLLIYYSRLQSGVPSRFSGWGSGTDYS
 LTISNLEEDIATFFCQQGKTLPYTFGGGKLEIK GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
 DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

R24 v2 (SEQ ID NO.20)

MALPVTALLPLALLHAARP DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG
 GSSINYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRGGTGTRSLYFDYWGGQATLIVGGGGSGGGGS
 GGGGS DIQMTQITSSLSVSLGDRVIISCRASQDIGNFLNWWYQQKPDGSLKLLIYYSRLQSGVPSRFSGWGSGTDYS
 LTISNLEEDIATFFCQQGKTLPYTFGGGKLEIK TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
 DIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

R24 v3 (SEQ ID NO.21)

MALPVTALLPLALLHAARP DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG
 GSSINYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRGGTGTRSLYFDYWGGQATLIVGGGGSGGGGS
 GGGGS DIQMTQITSSLSVSLGDRVIISCRASQDIGNFLNWWYQQKPDGSLKLLIYYSRLQSGVPSRFSGWGSGTDYS
 LTISNLEEDIATFFCQQGKTLPYTFGGGKLEIK EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTC
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
 TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

MB3.6-v1 (SEQ ID NO.22)

MALPVTALLPLALLHAARP EVVVVESGGGFVKPGSLKLSCAAAGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGG
 SHTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSEDTAIYYCARPGYDRGAWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGS
 SGGGGS DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQIISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLS
 INSVETEDFGMYFCQQNSWPLTFGSGTKLEIKR GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
 RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

MB3.6-v2 (SEQ ID NO.23)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVVVVESGGGFVKPGGSLKLSCAAAGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGG]
 SHTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSRSEDTAIYYCARPGYDRGAWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGG
 SGGGS[DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCRASQIISNNLHWYQQKSHESPRLIKYASQSIGIPSRFSGSGSDFTLS
]INSVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGSGTKLEIKR]TTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
 CDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

MB3.6-v3 (SEQ ID NO.24)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVVVVESGGGFVKPGGSLKLSCAAAGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGG]
 SHTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSRSEDTAIYYCARPGYDRGAWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGG
 SGGGS[DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCRASQIISNNLHWYQQKSHESPRLIKYASQSIGIPSRFSGSGSDFTLS
]INSVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGSGTKLEIKR]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
 QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

KM641-v1 (SEQ ID NO.25)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVTLVESGGDFVKPGGSLKVSCAASGFASFHYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG]
 SGTYYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRSEDSAMYFCTRVKLGTYFDSWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS
 GGG[DIQMTQTASSLPASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIFYSSNLHSGVPSRFSGGGSGTDYSL
]TISNLEPEDIATYFCHQYSKLPWTFGGGKLEIK]GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKK
 LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

KM641-v2 (SEQ ID NO.26)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVTLVESGGDFVKPGGSLKVSCAASGFASFHYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG]
 SGTYYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRSEDSAMYFCTRVKLGTYFDSWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS
 GGG[DIQMTQTASSLPASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIFYSSNLHSGVPSRFSGGGSGTDYSL
]TISNLEPEDIATYFCHQYSKLPWTFGGGKLEIK]TTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
 IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
 QQQQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

KM641-v3 (SEQ ID NO.27)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVTLVESGGDFVKPGGSLKVSCAASGFASFHYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG]
 SGTYYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRSEDSAMYFCTRVKLGTYFDSWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGS
 GGG[DIQMTQTASSLPASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIFYSSNLHSGVPSRFSGGGSGTDYSL
]TISNLEPEDIATYFCHQYSKLPWTFGGGKLEIK]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

BW2121-v1 (SEQ ID NO.28)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGGGLVKPGGSLTSCAASRFTFSTYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG
ASTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARGGSRYAMDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGS|DIQLTQSPAILSVPGERVFSFCWASQSIGTSIHWYQQRNTNGSPRLLIKYSSESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
NSLESEDIADYYCQQTYSWPFTFGSGTKLEI|GLAVSTISSFFPPGYQYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

BW2121-v2 (SEQ ID NO.29)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGGGLVKPGGSLTSCAASRFTFSTYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG
ASTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARGGSRYAMDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGS|DIQLTQSPAILSVPGERVFSFCWASQSIGTSIHWYQQRNTNGSPRLLIKYSSESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
NSLESEDIADYYCQQTYSWPFTFGSGTKLEI|ITTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

BW2121-v3 (SEQ ID NO.30)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGGGLVKPGGSLTSCAASRFTFSTYAMSWVRQTPAKRLEWVAYISSGG
ASTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARGGSRYAMDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGS|DIQLTQSPAILSVPGERVFSFCWASQSIGTSIHWYQQRNTNGSPRLLIKYSSESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
NSLESEDIADYYCQQTYSWPFTFGSGTKLEI|EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

實例3：抗-GD3 scCAR之活體外測試

材料及方法

RNA之活體外轉錄

在活體外轉錄編碼scCAR之mRNA並遵循製造商之說明，使用mMessage mMachine T7 Ultra套組(Life technologies)使其聚腺苷酸化。用RNeasy管柱(Qiagen)純化RNA，在cytoporation培養基T(Harvard Apparatus)中溶離並藉由使用Nanodrop ND-1000分光光度計

量測在260 nm下之吸光度來進行定量。在變性甲醛/MOPS瓊脂糖凝膠上驗證RNA之品質。

T細胞之RNA電穿孔

活化後4至5天或11至12天，藉由使用AgilePulse MAX系統(Harvard Apparatus)電轉印信使RNA來轉染T淋巴球。移除活化珠粒之後，使細胞集結成團，以 25×10^6 個細胞/毫升再懸浮於cytoporation培養基T中。將 5×10^6 個細胞與15 μg 編碼scCAR之mRNA混合於0.4 cm比色管中。電穿孔由在1200 V下之兩次0.1 ms脈衝，隨後在130V下之四次0.2 ms脈衝組成。電穿孔之後，將細胞稀釋於培養基中且在37°C /5% CO₂下培育。

scCAR之偵測

流式細胞測量術：首先用生物素標記之多株山羊抗小鼠(Fab)₂抗體(Jackson Immunoresearch)或生物素標記之蛋白質L(GenScript)對T細胞染色，且接著用藻紅素標記之抗生蛋白鏈菌素(BD pharmingen)染色，且最後使用MACSQuant流式細胞儀(Miltenyi)加以分析。

西方墨點法：將 1×10^6 個T細胞溶解於50 μl 含有1 mM原鈣酸鹽、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶抑制劑及2 mM PMSF之RIPA緩衝液中。在Any kD™丙烯醯胺凝膠(BioRad)上藉由SDS-PAGE分離細胞溶解產物。在轉印至硝化纖維素膜上之後，將其與小鼠抗人類CD3z(pharmingen)一起培育，且接著與山羊抗小鼠IgG辣根過氧化酶結合抗體(sigma)一起培育。藉由使用ECL套組(Pierce)顯示抗體結合。

脫粒分析

在96孔盤中將 5×10^4 個T細胞與 5×10^4 個GD3陽性或GD3陰性細胞以0.1毫升/孔共培養。在共培養開始時，添加APC標記之抗-CD107a(BD Biosciences)以及1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗-CD49d(BD Biosciences)、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗-CD28(Miltenyi)及1 \times 莫能菌素溶液(Monensin solution; eBioscience)。

培育6小時之後，用可固定活力染料(eBioscience)及vioblue標記之抗-CD8(Miltenyi)對細胞染色且使用MACSQuant流式細胞儀(Miltenyi)進行分析。應注意：脫粒之細胞毒性T細胞對應於CD8+CD107a+細胞。

細胞因子釋放分析

在96孔盤中將 5×10^4 個T細胞與 5×10^4 個GD3陽性或GD3陰性細胞以0.1毫升/孔共培養。培育24小時之後，收集培養物上清液並使用ELISA(R&D Systems)分析IFN γ 之產生。

細胞毒性分析

在96孔盤中以0.1毫升/孔接種 2×10^4 個GD3陽性或GD3陰性細胞。接種後次日，用CellTrace CFSE標記GD3陽性及GD3陰性細胞且將其與 4×10^5 個T細胞共培養4小時。接著收集細胞，用可固定活力染料(eBioscience)染色並使用MACSQuant流式細胞儀(Miltenyi)加以分析。

使用下式計算比溶胞率百分比：

$$\text{細胞溶解}\% = 100\% - \frac{\frac{\text{與CAR修飾之T細胞共培養後之存活標靶細胞}\%}{\text{與CAR修飾之T細胞共培養後之存活對照細胞}\%}}{\frac{\text{與未修飾T細胞共培養後之存活標靶細胞}\%}{\text{與未修飾T細胞共培養後之存活對照細胞}\%}}$$

結果

在人類原代T細胞中使用兩步篩選方法測試經設計之抗-GD3 scCAR(圖5)。

在篩選方法之第一步驟中，用編碼12種經設計之抗-GD3 scCAR之mRNA電穿孔預先用抗-CD28/CD3珠粒及IL-2活化4至5天的原代人類T細胞。電穿孔後1天，藉由流式細胞測量術及西方墨點法評估scCAR表現，且藉由量測T細胞脫粒情況評估scCAR修飾之T細胞之活性。選擇藉由西方墨點法偵測且在與至少一個GD3陽性細胞株共培養後誘導顯著T細胞專一性脫粒($\geq 20\%$)之scCAR通過篩選方法之第二步驟。

在篩選方法之第二步驟中，用編碼在第一篩選步驟之後選擇之抗-GD3 scCAR之mRNA電穿孔預先用抗-CD28/CD3珠粒及IL-2活化11至12天之原代人類T細胞。電穿孔後1至2天，藉由流式細胞測量術評估scCAR表現，且藉由量測T細胞之效應功能來評估scCAR修飾之T細胞之活性。選擇在與至少一個GD3陽性細胞株共培養後引起顯著T細胞專一性脫粒($\geq 20\%$)、標靶細胞之顯著比溶胞率($\geq 20\%$)及T細胞之顯著IFN γ 產量(≥ 1500 pg/ml)的scCAR作為潛在scCAR候選物。

a) scCAR 之初次篩選：

scCAR表現：

使用抗人類CD3 ζ mAb，藉由西方墨點法評估T細胞中抗-GD3 scCAR之總表現。觀察到除scCAR BW2121-v1外，在T細胞溶解產物中明顯偵測到所有scCAR(圖6A及6B)。

接著使用抗-Fab或蛋白質L，藉由流式細胞測量術評估T細胞上抗-GD3 scCAR之表面表現。據觀察，1°)藉由西方墨點法在T細胞溶解產物中明顯偵測到的scCAR MB3.6-v2、MB3.6-v3及BW2121-v2藉由流式細胞測量術在T細胞表面上亦明顯偵測到；2°)藉由西方墨點法在T細胞溶解產物中幾乎未偵測到的scCAR BW2121-v1藉由流式細胞測量術在T細胞表面上亦未偵測到(圖7A及7B，結果係自執行至少三次不同FACS分析獲得)。

意外地是，藉由西方墨點法在T細胞溶解產物中明顯偵測到的scCAR MB3.6-v1、KM641-v1、KM641-v2、KM641-v3、BW2121-v3、R24-v1、R24-v2及R24-v3藉由流式細胞測量術在T細胞表面上幾乎不可偵測到(圖7A及7B，且結果係自執行至少3次FACS分析獲得)。

scCAR活性：

為了評估scCAR活性，分析在與GD3陽性細胞(SK-MEL-28及MeWo)或GD3陰性細胞(MCF-7)共培養後scCAR修飾之T細胞之脫粒情

況。

據觀察，1°)用scCAR R24-v2及R24-v3修飾之T細胞在與SK-MEL-28及MeWo細胞共培養後單獨地且顯著地脫粒($\geq 20\%$)。2°) 用scCAR BW2121-v3修飾之T細胞在與SK-MEL-28細胞共培養後單獨地且顯著地脫粒($\geq 20\%$)；3°)用scCAR MB3.6-v1、KM641-v1、BW2121-v1及R24-v1修飾之T細胞在與SK-MEL-28或MeWo細胞共培養後完全未脫粒；4°)用scCAR MB3.6-v2、MB3.6-v3、KM641-v2、KM641-v3及BW2121修飾之T細胞在與SK-MEL-28及MeWo細胞共培養後以及在與MCF-7細胞共培養後或在無任何刺激情況下顯著地脫粒($\geq 20\%$)(圖8A及8B，結果係自執行至少三次不同FACS分析獲得)。

總而言之，在本發明中呈現之結果證實，在設計的十二種抗-GD3 scCAR中，有三種(BW2121-v3、R24-v2及R24-v3)被視為最佳的且將經由篩選方法之第二步驟進一步分析。此時，涉及MB3.6 ScFv之構建體由於顯示出過多非專一性脫粒而丟棄，亦即，在無GD3陽性細胞(無活化)存在下T細胞強烈的活化。

a) scCAR 之二次篩選：

scCAR表現：

使用抗-Fab或蛋白質L，藉由流式細胞測量術評估T細胞上抗-GD3 scCAR之表面表現。據觀察，scCAR BW2121-v3及R24-v2在使用抗-Fab之四次實驗中有一次偵測到且在使用蛋白質L之實驗中皆未偵測到。用抗-Fab及用蛋白質L均未偵測到scCAR R24-v3。

scCAR活性：

為了評估scCAR活性，首先分析在與GD3陽性(SK-MEL-28、G-361、MeWo及A2058)細胞或GD3陰性(MCF-7)細胞共培養後scCAR修飾之T細胞的脫粒情況。據觀察，與用scCAR BW2121-v3及R24-v3修飾之T細胞相反，用scCAR R24-v2修飾之T細胞在與SK-MEL-28、G-

361及A2058共培養後之脫粒程度($\geq 20\%$)顯著高於在與MCF-7共培養後或在單獨培養基中之脫粒程度(圖9結果來自執行至少三次不同FACS分析)。未修飾之T細胞在與SK-MEL-28、G-361、MeWo、A2058及MCF-7細胞共培養後完全未脫粒(圖9結果係自執行至少三次不同FACS分析獲得)。

接著分析scCAR修飾之T細胞在與GD3陽性(SK-MEL-28、G-361、MeWo及A2058)細胞或GD3陰性(MCF-7)細胞共培養後的IFN γ 產量。據觀察，與用scCAR BW2121-v3及R24-v3修飾之T細胞相反，用scCAR R24-v2修飾之T細胞在與SK-MEL-28、G-361及MeWo共培養後產生的IFN γ (≥ 1500 pg/ml)顯著高於在與MCF-7共培養後或在單獨培養基中產生之IFN γ (圖10)。未修飾之T細胞在與SK-MEL-28、G-361、MeWo、A2058及MCF-7共培養後未產生任何IFN γ (圖10)。

最後分析scCAR修飾之T細胞在與GD3陽性(SK-MEL-28、G-361、MeWo及A2058)細胞或GD3陰性(MCF-7)細胞共培養後的細胞毒性活性。據觀察，與用scCAR BW2121-v3及R24-v3修飾之T細胞相反，用scCAR R24-v2修飾之T細胞專一性殺死共培養物中超過20%的G-361細胞(圖11，其表示3次獨立實驗之平均值 \pm SD)。有趣的是，儘管SK-MEL-28細胞誘導的T細胞脫粒程度及IFN γ 產量類似於G-361細胞，但此等細胞對溶解之敏感性明顯低於G-361細胞(圖11)。

總而言之，結果證實，scCAR R24-v2代表最佳scCAR之一用於進一步研究。

此等實驗顯示，根據本發明之構建體，尤其是包括R24 scFv之構建體，且更特定言之使用構形V2之構建體在T細胞脫粒方面引起較強反應。

實例4：表現GD3-CAR之TCR α 滅活細胞之增殖

設計並產生靶向T細胞受體 α 恆定鏈區(TRAC)基因內藉由15 bp間

隔子隔開之兩個17 bp長序列(稱為半標靶)的異二聚體TALE-核酸酶。每個半標靶係由表11中所列之一半TALE-核酸酶之重複序列識別。

表11：靶向TCR α 基因之TAL-核酸酶

標靶	標靶序列	重複序列	一半TALE-核酸酶
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 43)	重複TRAC_T01-L (SEQ ID NO: 44)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 46)
		重複TRAC_T01-R (SEQ ID NO: 45)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 47)

在處於T7啟動子控制下之哺乳動物表現載體中，使用限制酶消化次選殖每個TALE-核酸酶構建體。由帶有T7啟動子下游編碼序列之質體合成編碼裂解TRAC基因組序列之TALE-核酸酶的mRNA。

用編碼兩半TRAC_T01 TALE-核酸酶之2個mRNA分別轉染在72小時期間用抗-CD3/CD28塗佈之珠粒預活化的純化之T細胞。轉染48小時後，用編碼先前所描述之GD3 CAR之一(SEQ ID NO:19至30)之慢病毒載體分別轉導來自同一供體之不同T細胞組。轉導後2天，使用抗-CD3磁珠純化CD3_{NEG}細胞且轉導後5天，用可溶性抗-CD28(5/ml)再活化細胞。

再活化之後，藉由每週對細胞計數2次來跟蹤細胞增殖情況，持續30天。觀察到相較於未轉導之細胞，表現GD3 CAR之TCR α 滅活細胞之增殖增加，尤其是當用抗-CD28再活化時。

為了研究表現GD3 CAR之人類T細胞是否展示活化狀態，轉導後7天，藉由FACS分析活化標記物CD25之表現。相較於未轉導之細胞，分析用編碼GD3 CAR之慢病毒載體轉導的純化之細胞在其表面處之CD25表現，以便評估其活化情況。預期在CD28再活化或無再活化情況下CD25表現均增加。

據觀察，表現根據本發明之不同GD3 CAR構建體的原代經活化T細胞係與表現相同GD3 CAR構建體之TCR滅活T細胞相同之方式作用。

實例5：GD3 CART細胞之產生

為了用GD3專一性CAR永久地修飾T細胞，開發出編碼藉由2A肽隔開之R24-v2 CAR及自殺基因(RQR8)的雙順反子慢病毒載體(圖12)。

使用此慢病毒載體轉導CD3/CD28刺激的來自健康供體之周邊血液單核細胞(PBMC)，且在G-Rex中擴增穩定修飾之T細胞(圖13)。

實例6：當與GD3陽性標靶細胞共培養時GD3 CAR T細胞活化多種效應功能

為了檢查GD3重定向T細胞之效應功能及專一性，量測在與各種腫瘤細胞株共培養之後干擾素 γ (IFN- γ)之分泌、脫粒標記物CD107a之細胞表面表現及溶解活性。

正如預期的，GD3 CAR T細胞當與GD3陽性標靶細胞(G361)共培養時產生IFN γ ，在細胞表面表現CD107 α 且展示溶解活性，但當與GD3陰性細胞(MCF-7)共培養時則不然(圖14、15及16)。

參考文獻

Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." *Mol Cell Biol* 26(1): 324-33.

Atkins, J. F., N. M. Wills, et al. (2007). "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)." *Rna* 13(6): 803-10.

Bierer, B. E., G. Hollander, et al. (1993). "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology." *Curr Opin Immunol* 5(5): 763-73.

Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., and Aubry, J. (2003). Role

of tumor-associated gangliosides in cancer progression. **Biochimie** 85, 455-463.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." **Science** 326(5959): 1509-12.

Byrd, John. (2014). "Chronic Lymphocytic Leukemia." ASH Annual Meeting & Exposition.

Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." **Mol Cell Biol** 15(4): 1968-73.

Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." **Genetics** 186(2): 757-61.

Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." **Science** 339(6121): 819-23.

Cros, E. et al. (2004). "Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia". **Leukemia & Lymphoma**. 45(6):1123-1132.

Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." **Nature** 471(7340): 602-7.

Daniotti, J.L., Rosales Fritz, V., Kunda, P., Nishi, T., and Maccioni, H.J. (1997). Cloning, characterization and developmental expression of alpha2,8 sialyltransferase (GD3 synthase, ST8Sia I) gene in chick brain and retina. **Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.** 15, 767-776.

Donnelly, M. and G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." **J Virol**

75(6): 2566-74.

Doronina, V. A., C. Wu, et al. (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." **Mol Cell Biol** 28(13): 4227-39.

Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." **Nucleic Acids Res** 33(22): 7039-47.

Gardin, C. et al. (2007). "Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial". **Blood**. 109(12):5129-5135.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." **Nature** 468(7320): 67-71.

Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." **Proc Natl Acad Sci U S A** 109(39): E2579-86.

Gravotta, D., Landa, C.A., Panzetta, P., and Maccioni, H.J. (1989). In vivo and in vitro expression of gangliosides in chick retina Müller cells. **J. Neurochem.** 52, 768-776.

Guest, R.D., Hawkins, R.E., Kirillova, N., Cheadle, E.J., Arnold, J., O'Neill, A., Irlam, J., Chester, K.A., Kemshead, J.T., Shaw, D.M., et al. (2005). The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. **J. Immunother. Hagerstown Md** 1997 28, 203-211.

Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K.O., Shiku, H., Furukawa, K. (1994) "Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10455-10459.

Henderson, D. J., I. Naya, et al. (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." *Immunology* 73(3): 316-21.

Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* 337(6096): 816-21.

June, C. H. et al. (2011). "T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia". *Sci. Transl. Med.* 3(95):ra73.

Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." *Ann N Y Acad Sci* 1058: 151-61.

Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." *Nucleic Acids Res* 39(1): 359-72.

Liu, J., M. W. Albers, et al. (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." *Biochemistry* 31(16): 3896-901.

Lo, A.S.Y., Ma, Q., Liu, D.L., and Junghans, R.P. (2010). Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin. Cancer*

Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 16, 2769-2780.

Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." **Science 339**(6121): 823-6.

Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." **Science 326**(5959): 1501.

Nakayama, J., Fukuda, M.N., Hirabayashi, Y., Kanamori, A., Sasaki, K., Nishi, T., Fukuda, M. (1996). "**Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 and GT3 are synthesized by a single enzyme.**" *J. Biol. Chem.* 271:3684-369.

Paques, F. and P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." **Curr Gene Ther 7**(1): 49-66.

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." **Trends Biotechnol 29**(11): 550-7.

Peipp, M., D. Saul, et al. (2004). "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications." **J Immunol Methods 285**(2): 265-80.

Perrin, A., M. Buckle, et al. (1993). "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions." **Embo J 12**(7): 2939-47.

Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." **Nat Biotechnol 25**(7): 743-4.

Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." **Nat Biotechnol 23**(8): 967-73.

Reaman, G.H., Taylor, B.J., and Merritt, W.D. (1990). Anti-GD3 monoclonal antibody analysis of childhood T-cell acute lymphoblastic

leukemia: detection of a target antigen for antibody-mediated cytolysis. **Cancer Res.** 50, 202-205.

Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." **Mol Cell Biol** 14(12): 8096-106.

Sorek, R., C. M. Lawrence, et al. (2013). "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea." **Annu Rev Biochem.**

Yun, C.O., Nolan, K.F., Beecham, E.J., Reisfeld, R.A., and Junghans, R.P. (2000). Targeting of T lymphocytes to melanoma cells through chimeric anti-GD3 immunoglobulin T-cell receptors. **Neoplasia New York** N 2, 449-459.

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 法商瑟勒提斯公司

<120> 用於癌症免疫療法之抗-GD3專一性嵌合抗原受體

<130> P81502060PCT00

<150> PA201570296

<151> 2015-05-20

<160>?60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信號肽

<400> 1

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信號肽

<400> 2

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> FcγRIIIa銜鏈

<400> 3

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

<210> 4

<211> 45

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD8α 鉸鏈

<400> 4

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

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

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

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> IgG1 鉸鏈

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

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

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

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD8 α 跨膜域

<400> 6

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 41BB跨膜域

<400> 7

Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val
 20 25

<210> 8

<211> 42

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> 4-1BB之片段(殘基214-255)

<400> 8
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 9

<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> T細胞表面糖蛋白CD3ζ鏈之片段

<400> 9
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 10

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R24重鏈可變區

<400> 11

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R24輕鏈可變區

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ser Leu Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Trp Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Phe Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MB3.6重鏈可變區

<400> 13

Glu Val Val Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MB3.6輕鏈可變區

<400> 14

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KM641重鏈可變區

<400> 15

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KM641輕鏈可變區

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BW2121重鏈可變區

<400> 17

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BW2121輕鏈可變區

<400> 18

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Trp Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

Lys Tyr Ser Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105

<210> 19

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R24(VH VL)-FcγRIIIa~~鉸鏈~~-CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ile Asn
65 70 75 80

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

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Thr Gly Thr Arg Ser Leu Tyr
115 120 125

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
145 150 155 160

Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Asp Arg Val Ile
165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe Leu Asn Trp Tyr
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ser Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser
195 200 205

Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Trp Gly Ser Gly
210 215 220

Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Glu Glu Asp Ile Ala
225 230 235 240

Thr Phe Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser
 260 265 270

Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 275 280 285

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
 290 295 300

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
 305 310 315 320

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 325 330 335

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 340 345 350

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 355 360 365

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 370 375 380

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 385 390 395 400

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 405 410 415

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 420 425 430

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 435 440 445

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 450 455

<210> 20

<211> 486

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R24(VH VL)-CD8a_α铰链-CD8a_{TM}-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 20

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 21

<211> 672

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> R24(VH VL)-IgG1铰链- CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro
 290 295 300

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 305 310 315 320

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 325 330 335

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 340 345 350

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 355 360 365

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 370 375 380

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 405 410 415

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 420 425 430

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 435 440 445

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 450 455 460

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 465 470 475 480

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr
 485 490 495

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 500 505 510

Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 515 520 525

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 530 535 540

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 545 550 555 560

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
565 570 575

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
580 585 590

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
595 600 605

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
610 615 620

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
625 630 635 640

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
645 650 655

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
660 665 670

<210> 22

<211> 459

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MB3.6(VH VL)-FcγRIIIa 铰链-CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 22

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Val Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe
20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe
35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Trp Phe
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Ser Asn Asn Leu His Trp
 180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
 195 200 205

Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe
 225 230 235 240

Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly
 245 250 255

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile
 260 265 270

Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 275 280 285

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 290 295 300

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 305 310 315 320

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 325 330 335

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 340 345 350

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 355 360 365

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
370 375 380

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
385 390 395 400

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
405 410 415

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
420 425 430

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
435 440 445

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

<210> 23

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MB3.6(VH VL)-CD8a_α 鉸鏈-CD8a_α TM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 23

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Val Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe
20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe
35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Trp Phe
115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Ser Asn Asn Leu His Trp
 180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
 195 200 205

Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe
 225 230 235 240

Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly
 245 250 255

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

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 420 425 430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 450 455 460

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

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 24

<211> 674

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MB3.6(VH VL)-IgG1鉸鏈- CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Val Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Trp Phe
 115 120 125

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Ile Ser Asn Asn Leu His Trp
 180 185 190

Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
 195 200 205

Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe
 225 230 235 240

Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly
 245 250 255

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys
 260 265 270

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg
 290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 500 505 510
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
 530 535 540
 Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys
 545 550 555 560
 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 565 570 575
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 580 585 590
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 595 600 605
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 610 615 620
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 625 630 635 640
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 645 650 655
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 660 665 670

Pro Arg

<210> 25

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KM641(VH VL)-FcγRIIIa-铰链-CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 25

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15His Ala Ala Arg Pro Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe
20 25 30Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45Ala Phe Ser His Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys
50 55 60Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr
65 70 75 80Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser
100 105 110Ala Met Tyr Phe Cys Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp
115 120 125Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
145 150 155 160Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
165 170 175Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
180 185 190Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn
195 200 205

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
 210 215 220

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 225 230 235 240

Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 245 250 255

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe
 260 265 270

Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 275 280 285

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 290 295 300

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 305 310 315 320

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 325 330 335

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 340 345 350

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 355 360 365

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 370 375 380

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 385 390 395 400

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 405 410 415

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 420 425 430

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 435 440 445

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455

<210> 26

<211> 485
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KM641(VH VL)-CD8a~~铰链~~-CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 26
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
 165 170 175

Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 180 185 190

Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn
 195 200 205

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
 210 215 220

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 225 230 235 240

Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
 245 250 255

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
 260 265 270

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 275 280 285

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
 290 295 300

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 305 310 315 320

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys
 325 330 335

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
 355 360 365

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 370 375 380

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 385 390 395 400

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 405 410 415

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 420 425 430

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 450 455 460

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

Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 27

<211> 671
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KM641(VH VL)-IgG1鉸鏈- CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile
 165 170 175

Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 180 185 190

Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn
 195 200 205

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
 210 215 220

Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 225 230 235 240

Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly
245 250 255

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr
260 265 270

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu
290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile
485 490 495

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
500 505 510

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 515 520 525

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 530 535 540

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 545 550 555 560

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 565 570 575

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 580 585 590

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 595 600 605

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 610 615 620

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 625 630 635 640

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 645 650 655

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 660 665 670

<210> 28

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BW2121(VH VL)-FcγRIIIa_α铰链-CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 28

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser
165 170 175

Cys Trp Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ser Ser Glu Ser
195 200 205

Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Ile Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
260 265 270

Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
275 280 285

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
290 295 300

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
305 310 315 320

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
325 330 335

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 340 345 350

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 355 360 365

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 370 375 380

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 385 390 395 400

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 405 410 415

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 420 425 430

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 435 440 445

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450

<210> 29
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> BW2121(VH VL)-CD8a_α 铰链-CD8a_{TM}-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 29
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln
 145 150 155 160

Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser
 165 170 175

Cys Trp Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ser Ser Glu Ser
 195 200 205

Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220

Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
 245 250 255

Lys Leu Glu Ile Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 260 265 270

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 275 280 285

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 290 295 300

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 325 330 335

Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 340 345 350

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 355 360 365

Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 370 375 380

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 385 390 395 400

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 405 410 415

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 420 425 430

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 435 440 445

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 450 455 460

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

Pro Pro Arg

<210> 30

<211> 669

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BW2121(VH VL)-IgG1铰链- CD8aTM-41BB.IC-CD3z.IC

<400> 30

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe
 35 40 45

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

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

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

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

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser
165 170 175

Cys Trp Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ser Ser Glu Ser
195 200 205

Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Trp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Ile Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
275 280 285

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr
290 295 300

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
305 310 315 320

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
325 330 335

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
340 345 350

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
355 360 365

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 370 375 380

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 385 390 395 400

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 405 410 415

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 420 425 430

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 435 440 445

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 450 455 460

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 465 470 475 480

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala
 485 490 495

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 500 505 510

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 515 520 525

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 530 535 540

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 545 550 555 560

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 565 570 575

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 580 585 590

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 595 600 605

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 610 615 620

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 33

<211> 530

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TAL結合域TRAC_T01-R

<400> 33

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 34

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼TRAC_T01-L TALEN之多核苷酸

<400> 34

atgggcgatac	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgagc	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccggcagc	cgtagggac	cgtcgtctgc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtcggcgcc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420

gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ltgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtg	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tgttggaag	caggcgtg	agacggtcca	gcggtgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgttgccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggct	cagcggctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggag	900
cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ltgaccccgg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgtgccc	ggtgtgtg	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgttggaag	1140
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgtg	ccggtgctgt	gccaggcca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cgcagccac	gatggcggca	agcaggcgt	ggagacggct	1260
cagcggctgt	tcccgtgct	gtgccaggcc	cacggctga	ccccggagca	ggtgtggcc	1320
atcgccagca	atattgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgaggcgt	gttgccgtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	cagggtgtg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ltgaccccgg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
acggtgcagg	cgctgtgccc	ggtgtgtg	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgttggaag	caggcgtg	agacggtcca	gcggtgttg	1680
ccggtgctgt	gcccagccca	ggcttgacc	ccggagcagg	tgttgccat	cgccagcaat	1740
atgtgtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgtgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcgtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggag	1920
cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ltgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggaaggcc	ggcgctggag	agcattgtg	cccagtatc	tcgccctgat	2100
ccggcgttgg	ccgcttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tggcctgcct	cggcggcgct	2160
ccgtcgctgg	atgcagtga	aaaggattg	ggggaacct	tcagccgtc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ltgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccgg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttctcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	ggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcggccat	gtacaccgtg	ggctcccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactcgg	cggctacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	caggttcaag	ttcctgttcg	gtccggcca	ctcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cggcgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcag	atgatcaagg	ccggcacct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcggag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 35

<211> 2832

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼TRAC_T01-R TALEN之多核苷酸

<400> 35

atgggcgac	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgctcgacag	tggcgacgca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgctgcccaga	ggcgacacac	300
gaagcagatcg	ttggcgtcgg	caaacagttg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgatggcgg	caatgcaactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccggag	cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ltgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	660
acggtccagc	ggctgtgccc	ggtgtgtg	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgtg	agacggtcca	gcggtgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgttgccat	cgccagcaat	840
atgtgtggca	agcaggcgt	ggagacgggt	caggcgtgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	900


```

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgcggg tgcgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1140
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgtgccc ggtgctgtgc 1200
caggccccag gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1260
caggcgctgg agacgggtcca gcggtgtgt ccggtgctgt gccaggcccc cggcttgacc 1320
ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggctgt tggcgggtgt gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgcggg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgaccccgg agcagggtgt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggtgttggcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ggagcagggtg 1740
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtgca ggcgctgttg 1800
ccggtgtgtt gccaggcccc cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tggcgggtgt gtgccaggcc 1920
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccctag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggccaggcgg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gccttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtgaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tggccacaga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccccctc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggtgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccttga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa

```

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VH鏈之CDR1

<400> 36

Asn Phe Gly Met His

1 5

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VH鏈之CDR2

<400> 37

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Ala Asp Thr Val

1 5 10 15

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VH鏈之CDR3

<400> 38

Gly Gly Thr Gly Thr Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VL鏈之CDR1

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VL鏈之CDR2

<400> 40

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> R24 VL鏈之CDR3

<400> 41

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> MB3.6 VH鏈之CDR1

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
1 5

<210> 43

<211> 8
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> MB3.6 VH鏈之CDR2

<400> 43
 Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr
 1 5

<210> 44

<211> 13
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> MB3.6 VH鏈之CDR3

<400> 44
 Ala Arg Pro Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Trp Phe Phe Asp
 1 5 10

<210> 45

<211> 6
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> MB3.6 VL鏈之CDR1

<400> 45
 Gln Ile Ile Ser Asn Asn
 1 5

<210> 46

<211> 3
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> MB3.6 VL鏈之CDR2

<400> 46
 Tyr Ala Ser
 1

<210> 47

<211> 9
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> MB3.6 VL鏈之CDR3

<400> 47
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VH鏈之CDR1

<400> 48

His Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VH鏈之CDR2

<400> 49

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VH鏈之CDR3

<400> 50

Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VL鏈之CDR1

<400> 51

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VL鏈之CDR2

<400> 52

Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> KM641 VL鏈之CDR3

<400> 53

His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> BW2121 VH鏈之CDR1

<400> 54

Arg Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> BW2121 VH鏈之CDR2

<400> 55

Ile Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr
1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>

<223> BW2121 VH鏈之CDR3

<400> 56

Ala Arg Gly Gly Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 57

<211> 6
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> BW2121 VL鏈之CDR1

<400> 57
 Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 1 5

<210> 58

<211> 3
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> BW2121 VL鏈之CDR2

<400> 58
 Tyr Ser Ser
 1

<210> 59

<211> 9
 <212> PRT
 <213> R24 VH鏈之人工序列CDR1

<220>
 <223> BW2121 VL鏈之CDR3

<400> 59
 Gln Gln Thr Tyr Ser Trp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RQR8

<400> 60

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro
 20 25 30

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
 35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 50 55 60

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro

申請專利範圍

1. 一種抗-GD3(NTRKR1)專一性嵌合抗原受體(CAR)，其具有一種選自如圖4中所示之V1至V3之多肽結構，該結構包含：包含來自單株抗-GD3抗體之VH及VL的細胞外配位體結合域、鉸鏈、跨膜域，及包括CD3 ζ 信號傳導域及來自4-1BB之共刺激域的細胞質域。
2. 如請求項1之抗-GD3專一性CAR，其中該結構V2包含CD8 α 鉸鏈及CD8 α 跨膜域。
3. 如請求項1之抗-GD3專一性CAR，其中該結構V1包含Fc ϵ RIII α 鉸鏈及CD8 α 跨膜域。
4. 如請求項1之抗-GD3專一性CAR，其中該結構V3包含IgG1鉸鏈及CD8 α 跨膜域。
5. 如請求項1至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該VH及VL與選自SEQ ID NO.11至18之多肽序列具有至少80%一致性。
6. 如請求項1至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該VH多肽包含選自SEQ ID NO.36(CDR1)、SEQ ID NO.37(CDR2)及SEQ ID NO.38(CDR3)的R24抗體之CDR序列，且該VL多肽序列包含選自SEQ ID NO.39(CDR1)、SEQ ID NO.40(CDR2)及SEQ ID NO.41(CDR3)的R24抗體之CDR序列。
7. 如請求項1至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該VH包含選自SEQ ID NO.42(CDR1)、SEQ ID NO.43(CDR2)及SEQ ID NO.44(CDR3)的MB3.6抗體之CDR序列，且該VL包含選自SEQ ID NO.45(CDR1)、SEQ ID NO.46(CDR2)及SEQ ID NO.47(CDR3)的MB3.6抗體之CDR序列。
8. 如請求項1至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該VH多肽序

列包含選自SEQ ID NO.48(CDR1)、SEQ ID NO.49(CDR2)及SEQ ID NO.50(CDR3)的KM641抗體之CDR序列，且該VL多肽序列包含選自SEQ ID NO.51(CDR1)、SEQ ID NO.52(CDR2)及SEQ ID NO.53(CDR3)的KM641抗體之CDR序列。

9. 如請求項1至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該VH多肽序列包含選自SEQ ID NO.54(CDR1)、SEQ ID NO.55(CDR2)及SEQ ID NO.56(CDR3)的BW2121抗體之CDR序列，且該VL多肽序列包含選自SEQ ID NO.57(CDR1)、SEQ ID NO.58(CDR2)及SEQ ID NO.59(CDR3)的BW2121抗體之CDR序列。
10. 如請求項1至9中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中來自4-1BB之共刺激域與SEQ ID NO. 8具有至少80%一致性。
11. 如請求項1至10中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該CD3 ζ 信號傳導域與SEQ ID NO.9具有至少80%一致性。
12. 如請求項2之抗-GD3專一性CAR，其中該Fc γ RIII α 鉸鏈與SEQ ID NO.3具有至少80%一致性。
13. 如請求項3之抗-GD3專一性CAR，其中該CD8 α 鉸鏈與SEQ ID NO.4具有至少80%一致性。
14. 如請求項4之抗-GD3專一性CAR，其中該IgG1鉸鏈與SEQ ID NO.5具有至少80%一致性。
15. 如請求項2至4中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該CD8 α 跨膜域與SEQ ID NO.6具有至少80%一致性。
16. 如請求項1至15中任一項之抗-GD3專一性CAR，其中該4-1BB跨膜域與SEQ ID NO.7具有至少80%一致性。
17. 如請求項1至16中任一項之抗-GD3專一性CAR，其進一步包含對GD3不具有專一性之另一細胞外配位體結合域。
18. 如請求項2之具有結構V1之抗-GD3專一性CAR，其包含與SEQ

ID NO.19、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23及SEQ ID NO.26具有至少80%一致性之多肽序列。

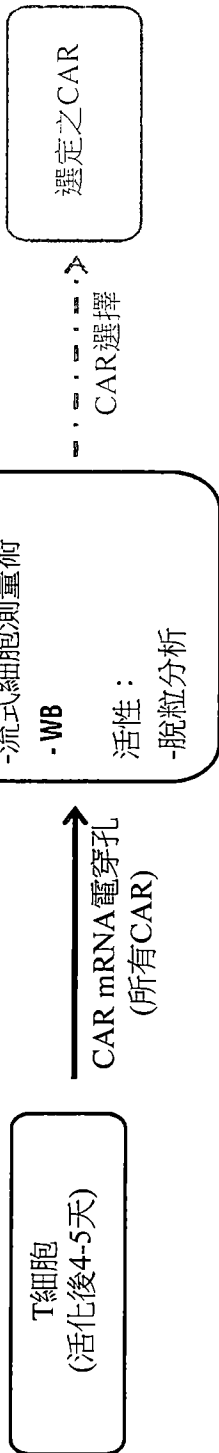
19. 如請求項3之具有結構V2之抗-GD3專一性CAR，其包含與SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.26及SEQ ID NO.29具有至少80%一致性之多肽序列。
20. 如請求項4之具有結構V3之抗-GD3專一性CAR，其包含與SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.27及SEQ ID NO.30具有至少80%一致性之多肽序列。
21. 如請求項1之抗-GD3專一性CAR，其包含與SEQ ID NO.20 (R24-v2)、SEQ ID NO.21(R24-v3)及SEQ ID NO.30(BW2121-v3)具有至少80%一致性之多肽序列。
22. 如請求項1之抗-GD3專一性CAR，其包含與SEQ ID NO.20 (R24-v2)具有至少80%一致性之多肽序列。
23. 如請求項1至22中任一項之抗-GD3專一性CAR，其進一步包含信號肽。
24. 如請求項23之抗-GD3專一性CAR，其中該信號肽與SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2具有至少80%序列一致性。
25. 一種多核苷酸，其編碼如請求項1至24中任一項之嵌合抗原受體。
26. 一種表現載體，其包含如請求項25之核酸。
27. 一種經工程改造之免疫細胞，其在該細胞表面膜表現如請求項1至24中任一項之GD3專一性嵌合抗原受體。
28. 如請求項27之經工程改造之免疫細胞，其來源於發炎性T淋巴球、細胞毒性T淋巴球、調節性T淋巴球或輔助性T淋巴球。
29. 如請求項27之經工程改造之免疫細胞，其中其係來源於NK細胞。

30. 如請求項27至29中任一項之經工程改造之細胞，其係用於療法中。
31. 如請求項27至30中任一項之經工程改造之細胞，其係用於人類療法中。
32. 如請求項27至31任一項之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該病狀係以GD3表現細胞為特徵之癌前或惡性癌症病狀。
33. 如請求項27至32中任一項之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該病狀係以GD3表現細胞過多為特徵之病狀。
34. 如請求項27至33中任一項之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該病狀為實體腫瘤。
35. 如請求項34之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該腫瘤為黑素瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤，或癌，諸如肺腫瘤、乳房腫瘤、結腸腫瘤、前列腺腫瘤或卵巢腫瘤。
36. 如請求項27至33中任一項之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該病狀為液體腫瘤。
37. 如請求項36之用於療法中之經工程改造之細胞，其中該腫瘤為T細胞急性淋巴母細胞白血病。
38. 如請求項27至34中任一項之經工程改造之細胞，其中TCR之表現在該免疫細胞中受抑制。
39. 如請求項24至38中任一項之經工程改造之細胞，其中至少一種MHC蛋白質(較佳 $\beta 2m$ 或HLA)之表現在該免疫細胞中受抑制。
40. 如請求項27至39中任一項之經工程改造之細胞，其中該細胞經突變以賦予針對至少一種免疫抑制藥物或化學療法藥物之抗性。
41. 一種損傷(impairing)血液癌細胞之方法，其包含使該細胞與有效引起該癌細胞損傷之量的如請求項27至40中任一項之經工程改

造之細胞接觸。

42. 一種工程改造免疫細胞之方法，其包含：
 - (a) 提供免疫細胞，
 - (b) 使該細胞之表面表現至少一種如請求項1至24中任一項之GD3專一性嵌合抗原受體。
43. 如請求項42之工程改造免疫細胞之方法，其包含：
 - (a) 提供免疫細胞，
 - (b) 將至少一種編碼該GD3專一性嵌合抗原受體之多核苷酸引入該細胞中，
 - (c) 使該細胞中表現該多核苷酸。
44. 如請求項43之工程改造免疫細胞之方法，其包含：
 - (a) 提供免疫細胞，
 - (b) 將至少一種編碼該GD3專一性嵌合抗原受體之多核苷酸引入該細胞中，
 - (c) 引入至少一種對GD3不具有專一性之其他嵌合抗原受體。
45. 一種治療有需要之個體之方法，其包含：
 - (a) 提供在表面表現如請求項1至24中任一項之GD3專一性嵌合抗原受體之免疫細胞；
 - (b) 向該患者投與該等免疫細胞。
46. 如請求項45之方法，其中該免疫細胞係由供體提供。
47. 如請求項45之方法，其中該免疫細胞係由該患者自身提供。

第一步篩選：



第二步篩選：

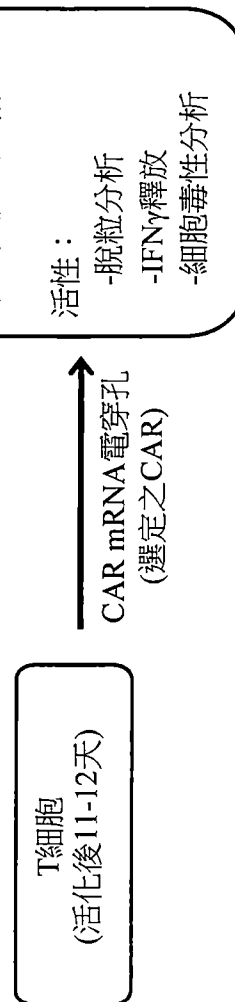


圖5

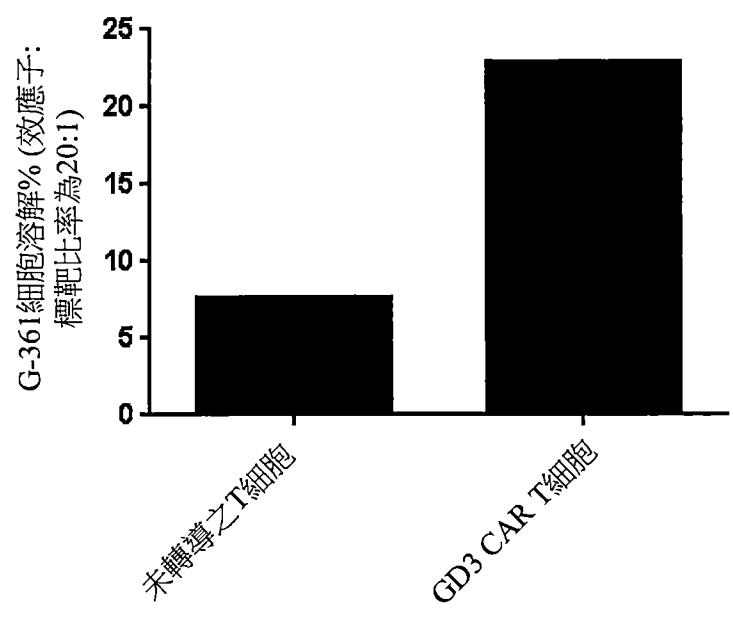


圖16