



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104126009 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201280060330.9
 (22)申请日 2012.10.05
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104126009 A
 (43)申请公布日 2014.10.29
 (30)优先权数据
 2011-222510 2011.10.07 JP
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.06.06
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2012/076034 2012.10.05
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02013/051718 JA 2013.04.11
 (73)专利权人 国立大学法人三重大学
 地址 日本三重县津市
 专利权人 宝生物工程株式会社
 (72)发明人 珠玖洋 织户由贵 峰野纯一
 冈本幸子 天石泰典
 (74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 孔青 梁谋
 (51)Int.Cl.
 C12N 15/09(2006.01)
 C07K 14/705(2006.01)
 C07K 19/00(2006.01)
 C12N 5/10(2006.01)
 (56)对比文件
 US 6103521 A,2000.08.15,

Michel Sadelain et al..The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors.《Current Opinion in Immunology》.2009,第21卷摘要,第216页表1,第218页左栏第3段.

Simona Ronchetti et al..Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein Lowers the Threshold of CD28 Costimulation in CD8+T Cell.《J.Immunol.》.2007,第179卷第5916页左栏第2段.

Edward M.Esparza et al..Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Functions as a Costimulatory Receptor That Promotes Survival in Early Phase of T Cell Activation.《The Journal of Immunology》.2005,第174卷第7869-7874页.

Adam P.Kohm et al..CD28 regulates glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene expression on CD4+T cells via IL-2-dependent mechanisms.《Cellular Immunology》.2005,第235卷第56-64页.

Fumiko Kanamaru et al..Costimulation via Glucocorticoid-Induced TNF Receptor in Both Conventional and CD25+ Regulatory CD4+T Cells.《The Journal of Immunology》.2004,第172卷第7306-7314页.

审查员 王婷

权利要求书1页 说明书17页
 序列表43页 附图12页

(54)发明名称
 嵌合抗原受体
 (57)摘要
 本发明提供:嵌合抗原受体,其包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域,其特征在于,含有糖皮质激素诱导的

肿瘤坏死因子受体(GITR)的胞内结构域作为胞内结构域;编码所述嵌合抗原受体的核酸;表达所述嵌合抗原受体的细胞;和制备所述细胞的方法。

CN 104126009 B

1. 编码嵌合抗原受体的核酸,所述嵌合抗原受体包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域,其特征在于,所述胞内结构域为自N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域和糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体简称GITR的胞内结构域;自N-末端侧开始依次连接的CD28的胞内结构域、CD3 ζ 的胞内结构域和GITR的胞内结构域;或者,自N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域、GITR的胞内结构域和CD28的胞内结构域。

2. 权利要求1的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述抗原是肿瘤抗原。

3. 权利要求1的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述能够结合抗原的胞外结构域是结合抗原的抗体的单链可变区片段。

4. 嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域,其特征在于,所述胞内结构域为自N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域和糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体简称GITR的胞内结构域;自N-末端侧开始依次连接的CD28的胞内结构域、CD3 ζ 的胞内结构域和GITR的胞内结构域;或者,自N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域、GITR的胞内结构域和CD28的胞内结构域。

5. 权利要求4的嵌合抗原受体,其中所述抗原是肿瘤抗原。

6. 权利要求4的嵌合抗原受体,其中所述能够结合抗原的胞外结构域是结合抗原的抗体的单链可变区片段。

7. 制备嵌合抗原受体表达细胞的方法,所述方法包括将权利要求1-3中任一项的核酸引入细胞的步骤,该步骤离体进行。

8. 权利要求7的制备嵌合抗原受体表达细胞的方法,其中所述细胞是T细胞或含有T细胞的细胞群。

9. 嵌合抗原受体表达细胞,其中引入了权利要求1-3中任一项的核酸。

10. 权利要求9的嵌合抗原受体表达细胞,其中所述细胞是T细胞或含有T细胞的细胞群。

嵌合抗原受体

技术背景

[0001] 本发明涉及编码嵌合抗原受体的核酸和表达嵌合抗原受体的细胞,它们可用于肿瘤的过继免疫基因治疗领域。

背景技术

[0002] 作为肿瘤的治疗策略,可以预期将能够结合特异性抗原的T细胞受体(TCR)的基因引入任何T细胞,以制备靶向目标抗原的T细胞。根据该策略,已经尝试了过继免疫基因治疗,其使用靶向许多肿瘤抗原的TCR基因,所述抗原例如,WT1、MART1、gp100、CEA、CD19和mHAG HA-2抗原。

[0003] 作为新的肿瘤过继免疫基因治疗,注意力已经集中在基因-修饰的T细胞治疗上。基因修饰的T细胞治疗包括:将编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸引入T细胞,其中CAR对肿瘤细胞表面抗原具有特异性并具有激活T细胞的能力;离体培养由此获得的引入基因的T细胞;然后将所述细胞注入患者中。该治疗据信具有比抗体药物更强更持久的抗肿瘤效果,并因此非常期待其临床效果。

[0004] CAR的代表性结构包含识别肿瘤细胞表面抗原的单链可变片段(scFv)、跨膜结构域和激活T细胞的TCR复合物CD3 ζ 的胞内结构域。具有这种构造的CAR称为第一代CAR。单链可变片段部分的基因分离自例如产生识别靶抗原的单克隆抗体的杂交瘤。表达CAR的T细胞独立于肿瘤细胞上的主要组织相容性抗原I型的表达而直接识别肿瘤细胞表面抗原,并且在同时,激活T细胞并因此表达CAR的T细胞可以有效杀伤肿瘤细胞。

[0005] 为了增强第一代CAR激活T细胞的能力的目的,已经开发出第二代CAR,其中将作为T细胞的共刺激分子的CD28的胞内结构域与第一代CAR相连接。作为进一步改善的形式,也已经开发出第三代CAR,其中将衍生自作为肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的CD137 (4-1BB)或CD134 (OX40)的胞内结构域串联连接到第一代CAR上。因此,已经报道了靶向肿瘤抗原的许多CAR分子(非专利文献1)。然而,用作当前报道的第二代和第三代CAR的胞内结构域的共刺激分子是有限的。已知当连接到CAR上时,衍生自T细胞的每种共刺激分子的胞内结构域并不能一致地强烈刺激T细胞以破坏靶肿瘤细胞。例如,已经报道连接有胞内结构域衍生自CD137的胞内结构域的第二代CAR表现出的细胞毒活性的程度仅与第一代CAR相同,也就是说,该胞内结构域在改善CAR的功能中无效(非专利文献2)。因此,需要找寻新的当连接CAR时是有效的共刺激分子。

[0006] 作为在T细胞亚群即调节性T细胞上表达的基因而被发现的糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)是在细胞表面上的跨膜蛋白受体,并且是TNF受体超家族一个成员(非专利文献3)。已经证明GITR组成型地存在于非活化的T细胞上。GITR结合到称为GITR配体(以下称为GITRL)的另一跨膜蛋白上。已经证明GITR的激动性抗体消除调节性T细胞的免疫抑制活性,这表明GITRL发挥经由GITR而控制调节性T细胞的活性的功能性作用(参见非专利文献4)。

[0007] 引用文献列表

- [0008] 非专利文献
- [0009] 非专利文献1: Current Opinion in Immunology, 第21卷, 第215-223页(2009)
- [0010] 非专利文献2: J. Immunology, 第172卷, 第104-113页(2004)
- [0011] 非专利文献3: Immunol. Rev., 第182卷, 第18-32页(2001)
- [0012] 非专利文献4: Immunity, 第16卷, 第311-323页(2002)。
- [0013] 发明概述
- [0014] 本发明要解决的问题
- [0015] 本发明的目的是提供编码CAR的核酸和表达CAR的细胞,所述CAR特异性结合到靶抗原上并将针对靶细胞的高细胞毒活性赋予细胞。
- [0016] 解决问题的方法
- [0017] 本发明人集中地作出努力以解决上述问题,结果发现了表达具有GITR胞内结构域的CAR的细胞特异性结合到靶抗原胞内结构域,并具有针对靶细胞的高细胞毒活性。因此,完成了本发明。
- [0018] 本发明主要涉及以下方面。
- [0019] [1] 编码嵌合抗原受体的核酸,所述嵌合抗原受体包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域,其中所述胞内结构域包括糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)的胞内结构域。
- [0020] [2] 根据[1]的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述抗原是肿瘤抗原。
- [0021] [3] 根据[1]的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述能够结合抗原的胞外结构域是结合抗原的抗体的单链可变片段。
- [0022] [4] 根据[1]的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述胞内结构域进一步包括CD3 ζ 胞内结构域。
- [0023] [5] 根据[4]的编码嵌合抗原受体的核酸,其中所述GITR的胞内结构域配置在CD3 ζ 胞内结构域的C-末端侧。
- [0024] [6] 嵌合抗原受体,包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域,其中所述胞内结构域包括GITR的胞内结构域。
- [0025] [7] 根据[6]的嵌合抗原受体,其中所述抗原是肿瘤抗原。
- [0026] [8] 根据[6]的嵌合抗原受体,其中所述能够结合抗原的胞外结构域是结合抗原的抗体的单链可变片段。
- [0027] [9] 根据[6]的嵌合抗原受体,其中所述胞内结构域进一步包括CD3 ζ 胞内结构域。
- [0028] [10] 根据[9]的嵌合抗原受体,其中所述GITR的胞内结构域配置在CD3 ζ 胞内结构域的C-末端侧。
- [0029] [11] 制备嵌合抗原受体表达细胞的方法,所述方法包括将根据[1]至[5]中任一项的核酸引入细胞的步骤。
- [0030] [12] 根据[11]的制备嵌合抗原受体表达细胞的方法,其中所述细胞是T细胞或含有T细胞的细胞群。
- [0031] [13] 嵌合抗原受体表达细胞,其中引入了根据[1]至[5]中任一项的核酸。
- [0032] [14] 根据[13]的嵌合抗原受体表达细胞,其中所述细胞是T细胞或含有T细胞的细胞群。

[0033] 发明效果

[0034] 根据本发明,提供嵌合抗原受体、编码嵌合抗原受体的核酸和表达嵌合抗原受体的细胞,它们可用于靶向抗原例如肿瘤抗原的过继免疫基因治疗领域。当将本发明的嵌合抗原受体引入细胞时,所述嵌合抗原受体在细胞中的表达量高,并且所述细胞表现出高细胞毒活性。

[0035] 附图简述

[0036] [图1] 图1显示制备用于各实施例的CAR的程序。抗CEA (癌胚抗原)单克隆抗体的scFv显示为“CEA-scFv”,铰链区显示为“CD8铰链”,CD28跨膜结构域显示为“CD28 TM”,CD28胞内结构域显示为“CD28 ICD (胞内结构域)”,CD3 ζ 胞内结构域显示为“CD3 ζ ”,末端重复序列显示为“LTR”,剪接供体序列显示为“SD”,剪接受体序列显示为“SA”,包装信号序列显示为“ ψ ”。

[0037] [图2] 图2显示用于各实施例的CAR的结构。结合抗原的抗体的scFv显示为“scFv”,间隔结构域(spacer domain)显示为“间隔结构域”,CD28跨膜结构域显示为“CD28 TM”,CD28胞内结构域显示为“CD28 ICD”,GITR跨膜结构域显示为“GITR TM”,GITR胞内结构域显示为“GITR ICD”,CD3 ζ 胞内结构域显示为“CD3 ζ ”。在本说明书中,CDR结构分别缩写为(1) z、(2) 28z、(3) z28、(4) Gz、(5) zG、(6) 28Gz、(7) G28z、(8) zG28、(9) 28zG和(10) z28G。

[0038] [图3] 图3显示CEA与引入CAR的细胞的结合率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0039] [图4] 图4显示标记的CEA与引入CAR的细胞的结合的荧光强度,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0040] [图5] 图5显示CEA与引入CAR的细胞的结合率。

[0041] [图6] 图6显示标记的CEA与引入CAR的细胞的结合的荧光强度。

[0042] [图7] 图7显示引入CAR的细胞的细胞毒活性。

[0043] [图8] 图8显示CEA与引入CAR的细胞的结合率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0044] [图9] 图9显示标记的CEA与引入CAR的细胞的结合的荧光强度,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0045] [图10] 图10显示引入CAR的细胞的细胞毒活性。

[0046] [图11] 图11显示CEA与引入CAR的细胞的结合率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0047] [图12] 图12显示标记的CEA与引入CAR的细胞的结合的荧光强度,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0048] [图13] 图13显示产生细胞因子IFN γ 的细胞比率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0049] [图14] 图14显示细胞因子IFN γ 的产量,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0050] [图15] 图15显示产生细胞因子TNF α 的细胞比率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0051] [图16] 图16显示细胞因子TNF α 的产量,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0052] [图17] 图17显示EGFR (表皮生长因子受体)与引入CAR的细胞的结合率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0053] [图18] 图18显示标记的EGFR与引入CAR的细胞的结合的荧光强度,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0054] [图19] 图19显示产生细胞因子的细胞比率,相对于逆转录病毒拷贝数。

[0055] [图20] 图20显示细胞因子的产量,相对于逆转录病毒拷贝数。

具体实施方式

[0056] 如本文所用,“嵌合抗原受体(CAR)”是指包含能够结合抗原的胞外结构域、衍生自不同于衍生胞外结构域的多肽的跨膜结构域和至少一个胞内结构域的融合蛋白。“嵌合抗原受体(CAR)”有时称为“嵌合受体”、“T-body”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合抗原的胞外结构域”是指可结合特定抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”是指已知在细胞中作为传输信号以引起生物过程的活化或抑制的结构域起作用的任何寡肽或多肽。

[0057] 如本文所用,“肿瘤抗原”是指具有抗原性的生物分子,新近认识到其表达与细胞癌化相关。检测,例如,肿瘤抗原的免疫学检测可用于区分癌化细胞及其母细胞。本发明中的肿瘤抗原包括肿瘤特异性抗原(仅在肿瘤细胞中存在、而在其它正常细胞中不存在的抗原)和肿瘤相关抗原(也存在于其它器官和组织或异质和同种异体的正常细胞中的抗原,或在发育和分化过程中表达的抗原)。

[0058] 如本文所用,“糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)”是指作为糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关基因(糖皮质激素诱导的TNF受体家族相关基因)的产物的蛋白。GITR是在细胞表面上的跨膜蛋白受体,并且是TNF受体(TNFR)超家族的一个成员。显示GITR组成型地存在于非活化的T细胞上,并结合称为GITR配体(GITRL)的另一跨膜蛋白。GITR的氨基酸序列描述于NCBI参考序列(NCBI RefSeq): NP_004186.1, Curr. Biol., 第9卷, 第4期, 第215-218页(1999)。

[0059] 如本文所用,“单链可变片段(scFv)”是指衍生自抗体的单链多肽,其保留结合抗原的能力。scFv的实例包括经重组DNA技术形成的抗体多肽并且其中免疫球蛋白重链(H链)和轻链(L链)片段的Fv区经由间隔序列连接。制备scFv的多种方法是已知的,包括描述于以下文献的方法:美国专利号4694778;Science, 第242卷, 第423-442页(1988);Nature, 第334卷, 第54454页(1989);和Science, 第242卷, 第1038-1041页(1988)。

[0060] 如本文所用,“结构域”是指多肽中的一个区,其独立于其它区而折叠成为特定结构。

[0061] (1) 本发明的CAR

[0062] 本发明的CAR特征在于,它从N-末端侧开始依次包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域,并且所述胞内结构域包括GITR的胞内结构域。本发明的CAR在细胞中高水平表达。本发明的表达CAR的细胞具有高增殖率,产生大量细胞因子,并且针对在表面上具有CAR所结合的抗原的细胞具有高细胞毒活性。

[0063] (a) 胞外结构域

[0064] 用于本发明的CAR的“能够结合抗原的胞外结构域”是包含可以结合靶抗原的寡肽或多肽的结构域,并且包括例如抗体的抗原结合结构域和受体的配体结合结构域。该结构域结合抗原(例如细胞表面上存在的抗原)并与之相互作用,并因此将特异性赋予表达CAR的细胞。本发明中的胞外结构域的特别有用的实例包括衍生自抗体(H链和L链)和TCR的可变区(TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ)、CD8 α 、CD8 β 、CD11A、CD11B、CD11C、CD18、CD29、CD49A、CD49B、CD49D、CD49E、CD49F、CD61、CD41和CD51的胞外结构域。完整蛋白可被有效使用,然而,具体地讲,可以使用能够结合抗原或配体的结构域,例如,抗体Fab片段、抗体可变区[H链的V区

(VH)和L链的V区(VL)]或受体的胞外结构域。尤其是,优选可使用scFv。

[0065] 本发明CAR的胞外结构域可以是仅结合一个抗原或配体的胞外结构域,或者结合2个或更多个抗原或配体的胞外结构域。另外,本发明同时包括包含一个胞外结构域的和包含2个或更多个胞外结构域的和。

[0066] 胞外结构域可以选自识别靶抗原的抗体或与该抗原相互作用的分子。抗原的实例包括病毒抗原、细菌(尤其是感染性细菌)抗原、寄生虫抗原、在靶细胞上与特定病况相关的细胞表面标志物(例如肿瘤抗原)和免疫相关细胞的表面分子。

[0067] 作为本发明的一个方面,提供能够结合衍生自以下病毒的抗原的CAR:逆转录病毒科(例如人免疫缺陷病毒例如HIV-1和HIV-LP)、小核糖核酸病毒科(例如脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒和埃可病毒)、风疹病毒、冠状病毒、疱疹性口炎病毒、狂犬病毒、伊波拉病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒、流感病毒、乙肝病毒、细小病毒、腺病毒科、疱疹病毒科[例如1型和2型单纯疱疹病毒(HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)和疱疹病毒]、痘病毒科(例如天花病毒、痘苗病毒和痘病毒)或丙肝病毒。

[0068] 作为本发明的另一方面,提供能够结合衍生自以下细菌菌株的抗原的CAR:葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、假单胞菌或沙门氏菌。尤其是,提供能够结合衍生自例如以下感染性细菌的抗原的CAR:幽门螺杆菌(*Helicobacter pyloris*)、嗜肺性军团菌(*Legionella pneumophilia*)、分枝杆菌菌株(例如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、禽分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)或*M. goodsonii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、A组链球菌(Group A Streptococcus)、B组链球菌(Group B Streptococcus)(无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*))、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)或破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)。

[0069] 作为本发明的另一方面,提供能够结合例如以下肿瘤抗原的CAR:5T4、 $\alpha 5\beta 1$ -整联蛋白、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、 β -联蛋白/m、Bcr-ab1、MN/C IX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100、HAGE、HER-2/new、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、肌球蛋白/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、PAP、蛋白酶-3、p190 minor bcr-ab1、Pml/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1或RU2、SAGE、SART-1或SART-3、生存蛋白、TEL/AML1、TGF β 、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT1、NY-Eso-1或NY-Eso-B。也提供了能够结合细胞表面粘附分子、在自身免疫性疾病中出现的炎性细胞表面分子或导致自身免疫的TCR的CAR。

[0070] (b) 胞内结构域

[0071] 用于本发明的胞内结构域是当相同分子内存在的胞外结构域结合抗原(或与之相互作用)时可将信号传递到细胞内的分子。

[0072] 本发明的CAR特征在于它包含GITR的胞内结构域作为胞内结构域。GITR的胞内结构域包括具有相同功能的其变体。术语“变体”是指包含一个或几个至多个氨基酸的取代、缺失或添加的任何变体,条件是所述变体基本上保留原始序列所具有的共同功能。本发明所用的GITR的胞内结构域的实例包括包含GITR (NCBI RefSeq: NP_004186.1)的氨基酸编号193-241 (SEQ ID No.: 28)的胞内结构域。

[0073] 对于本发明的CAR,除了GITR的胞内结构域之外,衍生自其它多肽的胞内结构域也可使用。这样的胞内结构域的实例包括衍生自TCR复合物和共刺激分子的胞质序列和具有与这些序列共同功能的任何变体。

[0074] 已知仅经由TCR复合物产生的信号不足以激活T细胞,并且也需要次级或共刺激信号。天然T细胞激活由2类不同胞质信号转导序列传递,也就是说,经由TCR复合物的启动抗原-依赖性初级激活的序列(初级胞质信号转导序列)和以抗原-非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的序列(次级胞质信号转导序列)。在优选的方面,本发明的CAR包含初级胞质信号转导序列和/或次级胞质信号转导序列作为胞内结构域。

[0075] 初级胞质信号转导序列调节TCR复合物的初级激活。刺激激活的初级胞质信号转导序列可包含信号转导基序,其已知是基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM) [Nature, 第338卷, 第383-384页(1989)]。另一方面,以抑制方式起作用的初级胞质信号转导序列包含信号转导基序,其已知是基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM) [J Immunol., 第162卷, 第2期, 第897-902页(1999)]。在本发明中,可以使用具有ITAM或ITIM的胞内结构域。

[0076] 可用于本发明的具有ITAM的胞内结构域的实例包括具有衍生自以下的ITAM的胞内结构域:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。具体地讲,ITAM的实例包括具有以下序列的肽:CD3 ζ (NCBI RefSeq: NP_932170.1)的氨基酸编号51-164 (SEQ ID No.: 26)、Fc ϵ RI γ (NCBI RefSeq: NP_004097.1)的氨基酸编号45-86、Fc ϵ RI β (NCBI RefSeq: NP_000130.1)的氨基酸编号201-244、CD3 γ (NCBI RefSeq: NP_000064.1)的氨基酸编号139-182、CD3 δ (NCBI RefSeq: NP_000723.1)的氨基酸编号128-171、CD3 ϵ (NCBI RefSeq: NP_000724.1)的氨基酸编号153-207、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2)的氨基酸编号402-495、CD22 (NCBI RefSeq: NP_001762.2)的氨基酸编号707-847、CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1)的氨基酸编号166-226、CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1)的氨基酸编号182-229和CD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2)的氨基酸编号177-252,及其与这些肽具有共同功能的变体。根据本文所述的NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编号是根据各蛋白的全长前体(包含信号肽序列等)而编号。

[0077] 包含可用于本发明的次级胞质信号转导序列的胞内结构域的实例包括衍生自以下的序列:CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137、ICOS和CD154。其具体实例包括具有以下序列的肽:CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2)的氨基酸编号236-351、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1)的氨基酸编号421-458、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2)的氨基酸编号402-495、CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3)的氨基酸编号207-235、CD8 β (GenBank: AAA35664.1)的氨基酸编号196-210、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1)的氨基酸编号181-220 (SEQ ID No.: 25)、CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP_001552.2)的氨基酸编号214-255、CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP_003318.1)的氨基酸编号241-277和ICOS (NCBI RefSeq: NP_036224.1)的氨基酸编号166-199,及其与这些肽具有共同功能的

变体。

[0078] 本发明包括仅包含GITR的胞内结构域作为胞内结构域的CAR,以及除GITR的胞内结构域之外还包含一个或多个(例如2或3个)胞内结构域的CAR。特别优选的实例包括包含GITR的胞内结构域和CD3 ζ 的胞内结构域作为胞内结构域的CAR,以及包含GITR的胞内结构域、CD3 ζ 的胞内结构域和CD28的胞内结构域作为胞内结构域的CAR。本发明也包括包含串联连接的两个或更多个相同胞内结构域的CAR。一方面,本发明提供其中GITR的胞内结构域配置在CD3 ζ 的胞内结构域的C-末端侧的CAR,即包含从N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域和GITR的胞内结构域的CAR。本发明也包括:通过将CD28的胞内结构域进一步添加到上述CAR而得到的CAR,即包含自N-末端侧开始依次连接的CD28的胞内结构域、CD3 ζ 的胞内结构域和GITR的胞内结构域的CAR;以及包含自N-末端侧开始依次连接的CD3 ζ 的胞内结构域、GITR的胞内结构域和CD28的胞内结构域的CAR。作为另一方面,本发明也包括其中GITR的胞内结构域配置在C-末端侧的CAR。

[0079] 在包含多个胞内结构域的CAR中,可在胞内结构域之间插入寡肽接头或多肽接头以连接各结构域。优选地,可使用长度为2-10个氨基酸的接头。尤其是,可使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头。

[0080] (c) 跨膜结构域和间隔结构域

[0081] 本发明的CAR包含跨膜结构域。跨膜结构域可以衍生自天然多肽,或者可以经人工设计。衍生自天然多肽的跨膜结构域可以得自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。例如,可以使用以下的跨膜结构域:T细胞受体 α 或 β 链、CD3 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154或GITR。经人工设计的跨膜结构域是主要包含疏水性残基例如亮氨酸和缬氨酸的多肽。优选的是在合成的跨膜结构域的每端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体。任选地,可将短的寡肽接头或多肽接头(例如长度2-10个氨基酸的接头)配置在跨膜结构域和胞内结构域之间,如上(b)所述。尤其是,可以使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头序列。

[0082] 作为本发明的一个方面,具有CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1)的氨基酸编号153-180 (SEQ ID No.: 24)序列的跨膜结构域可用作跨膜结构域。另一方面,可使用具有GITR (NCBI RefSeq: NP_004186.1)的氨基酸编号162-183 (SEQ ID No.: 27)序列的跨膜结构域。

[0083] 在本发明的CAR中,可将间隔结构域配置在胞外结构域和跨膜结构域之间,或配置在胞内结构域和跨膜结构域之间。间隔结构域是指用于连接跨膜结构域与胞外结构域和/或连接跨膜结构域与胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔结构域包含至多300个氨基酸,优选10-100个氨基酸,和最优选25-50个氨基酸。

[0084] 间隔结构域优选地具有促进CAR与抗原结合并增强信号向细胞内转导的序列。预期促进结合的氨基酸的实例包括半胱氨酸、带电荷氨基酸以及在潜在糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可以用作构成间隔结构域的氨基酸。

[0085] 作为间隔结构域,可使用完整或部分的:CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3) 铰链区的氨基酸编号118-178 (SEQ ID No.: 23)、CD8 β (GenBank: AAA35664.1)的氨基酸编号135-195、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1)的氨基酸编号315-396或CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1)的氨基酸编号137-152。另外,作为间隔结构域,可使用部分的抗体H链或L链

的恒定区(CH1区或CL区,例如,具有SEQ ID No.: 34所示的氨基酸序列的肽)。此外,间隔结构域可以是人工合成序列。

[0086] 可以设计本发明的CAR,以便形成聚合物,尤其是二聚体。例如,将半胱氨酸插入到间隔结构域和/或跨膜结构域,以使CAR多聚化(二聚化)。

[0087] 此外,在本发明的CAR中,可将信号肽序列连接到N-末端。信号肽序列存在于许多分泌蛋白和膜蛋白的N-末端上,并且长度为15-30个氨基酸。因为上述作为胞内结构域的许多蛋白分子具有信号肽序列,所以该信号肽可用作本发明CAR的信号肽。

[0088] (2) 编码CAR的核酸

[0089] 本发明提供编码以上(1)所述的CAR的核酸。可通过常规方法,自指定CAR的氨基酸序列,容易地制备编码CAR的核酸。编码氨基酸序列的碱基序列可得自上述每个域的氨基酸序列的NCBI RefSeq ID或GenBank检索号,并且可使用标准分子生物学和/或化学程序制备本发明的核酸。例如,可根据碱基序列合成核酸,并且可通过将使用聚合酶链式反应(PCR)得自cDNA文库的DNA片段组合来制备本发明的核酸。

[0090] 可将本发明的核酸连接到另一核酸,以便在合适启动子控制之下表达。启动子的实例包括组成型地促进基因表达的启动子,通过药物等(例如四环素或多柔比星)的作用而诱导基因表达的启动子。为了达到核酸的有效转录,也可将本发明的核酸连接到与启动子协作的其它调节元件或转录起始位点,例如包含增强子序列或终止子序列的核酸。除了本发明的核酸之外,也可掺入可为证实核酸表达的标志物的基因(例如抗药性基因、编码报道酶的基因或编码荧光蛋白的基因)。

[0091] 本发明提供组合物,其包含作为活性成分的本发明的核酸以及药学上可接受的赋形剂。合适的药学上可接受的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。药学上可接受的赋形剂的实例包括磷酸缓冲盐水(例如0.01 M磷酸盐、0.138 M NaCl、0.0027 M KCl、pH 7.4)、含无机酸盐(例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐或硫酸盐)的水溶液、盐水、乙二醇或乙醇的溶液、以及有机酸的盐(乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐或苯甲酸盐)。也可使用佐剂例如润湿剂或乳化剂以及pH缓冲剂。作为药学上可接受的赋形剂,可以适当使用描述于以下文献的赋形剂:Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991) (其通过引用结合到本文中)。可将本发明的组合物配制成适合胃肠外给药(例如注射或输注)的已知形式。此外,本发明的组合物可包含制剂添加剂,例如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂,以及在贮存期间用于延长有效期的防腐剂。组合物可以呈干燥形式,在使用前用合适的无菌液体重配。对于细颗粒-介导的给药,颗粒例如显微大小的金颗粒可包被DNA。

[0092] 当将本发明的核酸引入离体的细胞时,除了上述赋形剂之外,可将本发明的核酸与促进核酸向细胞内转移的物质混合,所述物质例如,用于引入核酸的试剂,例如脂质体或阳离子型脂质。或者,也可使用携带本发明核酸的载体,如稍后所述。尤其是,含有合适载体所携带的本发明核酸的适于活体给药形式的组合物适于体内基因治疗。

[0093] 可给予包含本发明核酸作为活性成分的组合物,用于治疗例如癌症[血癌(白血病)、实体瘤等]、炎症疾病/自身免疫性疾病(哮喘、湿疹)、肝炎、以及诱因为病毒(例如流感和HIV)、细菌或真菌的感染性疾病,例如,结核病、MRSA、VRE或深部真菌病,这取决于由核酸编码的CAR所结合的抗原。可将包含本发明核酸作为活性成分的组合物通过胃肠外给予(例如注射或输注)而皮内、肌内、皮下、腹膜内、鼻内、动脉内、静脉内、瘤内给予,或给予输入淋

巴管,但是给药途径并未具体限制。

[0094] (3) 制备表达CAR的细胞的方法

[0095] 制备本发明的表达CAR的细胞的方法包括将以上(2)所述的编码CAR的核酸引入细胞的步骤。该步骤离体进行。例如,可用携带本发明核酸的病毒载体或非病毒载体来离体转化细胞,以制备本发明的表达CAR的细胞。

[0096] 在本发明的方法中,可使用来自哺乳动物的细胞(例如人细胞)或来自非人哺乳动物(例如猴、小鼠、大鼠、猪、马或狗)的细胞。用于本发明方法的细胞不受具体限制,任何细胞都可使用。例如,可使用采集、分离、纯化或诱导自体液、组织或器官例如血(外周血、脐带血等)或骨髓的细胞。可使用外周血单核细胞(PBMC)、免疫细胞[树突细胞、B细胞、造血干细胞、巨噬细胞、单核细胞、NK细胞或造血细胞(嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞)]、脐带血单核细胞、成纤维细胞、脂肪细胞前体、肝细胞、皮肤角质细胞、间充质干细胞、脂肪干细胞、多种癌细胞株或神经干细胞。在本发明中,尤其是,使用T细胞、T细胞的前体细胞(造血干细胞、淋巴细胞前体细胞等)或含有它们的细胞群是优选的。T细胞的实例包括CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、调节性T细胞、细胞毒性T细胞和肿瘤浸润的淋巴细胞。含T细胞和T细胞前体细胞的细胞群包括PBMC。上述细胞可采集自活体,经采集自活体的细胞培养物扩繁而获得,或建立为细胞株。当希望将所产生的CAR表达细胞或分化自所产生的CAR表达细胞的细胞移植到活体中时,优选将核酸引入采集自该活体本身或其同种活体的细胞中。

[0097] 可将编码本发明CAR的核酸插入载体,并且可将该载体引入细胞。例如,可使用病毒载体例如逆转录病毒载体(包括致癌逆转录病毒载体、慢病毒载体和假型载体)、腺病毒载体、腺伴随病毒(AAV)载体、猿猴病毒载体、痘苗病毒载体或仙台病毒载体、Epstein-Barr病毒(EBV)载体和HSV载体。作为病毒载体,优选使用缺乏复制能力因而无法在感染细胞中自我复制的病毒载体。

[0098] 另外,非病毒载体也可与脂质体和缩合剂一起用于本发明,所述缩合剂例如以下文献所述的阳离子型脂质:WO 96/10038、WO 97/18185、WO 97/25329、WO 97/30170和WO 97/31934(其通过引用结合到本文中)。也可通过磷酸钙转导、DEAE-葡聚糖、电穿孔或粒子轰击,将本发明的核酸引入细胞。

[0099] 例如,当使用逆转录病毒载体时,可通过根据载体所具有的LTR序列和包装信号序列选择合适的包装细胞,并使用包装细胞制备逆转录病毒颗粒,来进行本发明的方法。包装细胞的实例包括PG13(ATCC CRL-10686)、PA317(ATCC CRL-9078)、GP+E-86和GP+envAm-12(美国专利号5,278,056)和Psi-Crip[Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第85卷,第6460-6464页(1988)]。也可使用具有高转染效率的293细胞或293T细胞制备逆转录病毒颗粒。根据逆转录病毒而产生的许多种类的逆转录病毒载体和可用于包装逆转录病毒载体的包装细胞是许多公司广泛市售的。

[0100] 在将核酸引入细胞的步骤中,也可使用改善引入效率的功能性物质[例如WO 95/26200和WO 00/01836(其通过引用结合到本文中)]。改善引入效率的物质的实例包括具有与病毒载体结合能力的物质,例如,纤连蛋白和纤连蛋白片段。优选地,可使用具有肝素结合位点的纤连蛋白片段,例如,作为RetroNectin(注册商标,CH-296,由TAKARA BIO INC.制造)市售的片段。另外,可以使用polybrene(其是合成的聚阳离子,具有改善逆转录

病毒感染细胞的效率的作用)、成纤维细胞生长因子、V型胶原、聚赖氨酸或DEAE-葡聚糖。

[0101] 在本发明的优选方面,功能性物质可以以固定在合适固相上的状态使用,所述固相例如细胞培养容器(板、培养皿、瓶或袋)或载体(微珠等)。

[0102] (4) 表达CAR的细胞

[0103] 本发明的表达CAR的细胞是这样的细胞:其中已引入以上(2)所述的编码CAR的核酸并且由以上(3)所述的制备方法而表达。

[0104] 本发明的细胞经由CAR结合特异性抗原,从而将信号传递到细胞中,作为结果,所述细胞被激活。表达CAR的细胞的激活因宿主细胞和CAR胞内结构域的种类不同而异,并且可根据例如以下而得以证实:细胞因子的释放,细胞增殖率的改善,细胞表面分子的改变等作为指标。例如,自活化的细胞的细胞毒性细胞因子(肿瘤坏死因子、淋巴毒素等)的释放导致表达抗原的靶细胞的破坏。另外,细胞因子的释放或细胞表面分子的改变刺激其它免疫细胞,例如,B细胞、树突细胞、NK细胞和巨噬细胞。

[0105] 表达CAR的细胞可用作疾病的治疗药。所述治疗药包含表达CAR的细胞作为活性成分,并且可进一步包含合适的赋形剂。赋形剂的实例包括上述用于包含本发明核酸作为活性成分的组合物的药学上可接受的赋形剂、不同细胞培养基和等渗氯化钠。给予表达CAR的细胞所针对的疾病不受具体限制,只要该疾病显示出对该细胞的敏感性即可。疾病的实例包括癌症[血癌(白血病)、实体瘤等]、炎性疾病/自身免疫性疾病(哮喘、湿疹)、肝炎、以及诱因为病毒(例如流感和HIV)、细菌或真菌的感染性疾病,例如,结核病、MRSA、VRE或深部真菌病。给予本发明的表达CAR的细胞以治疗上述疾病,其中本发明的表达CAR的细胞与希望减少或消除的细胞所具有的抗原(即肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原等)结合,以治疗所述疾病。本发明的细胞也可用于在骨髓移植或暴露给辐射之后预防感染性疾病,用于以缓解复发性白血病等为目的的供体淋巴细胞输注。包含表达CAR的细胞作为活性成分的治疗药可以通过胃肠外给予(例如注射或输注)而皮内、肌内、皮下、腹膜内、鼻内、动脉内、静脉内、瘤内给予,或给予输入淋巴管,但是给药途径不受具体限制。

实施例

[0106] 以下通过实施例更具体地解释本发明,但本发明并不受以下实施例的限定。

[0107] 在本文所述的程序中,根据以下文献所述的方法进行基本程序:Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版,编辑:T. Maniatis等人,出版:Cold Spring Harbor Laboratory,2001(其通过引用结合到本文中)。

[0108] 实施例1 抗CEA-CAR表达载体的制备

[0109] 首先,进行PCR,使用SEQ ID NO: 1所示的3MSCV5引物和SEQ ID NO: 2所示的3MSCV3引物,使用pMSCVneo(由Clontech制造)作为模板,以扩增MSCV3' LTR位点。由此得到的扩增片段用限制酶XhoI和EcoRI切割,并克隆到pM载体[pM载体,描述于Gene Therapy第7卷,第797-804页(2000)]的XhoI-EcoRI位点中,以制备pMS-MC。此外,将pMEI-5载体(由TAKARA BIO INC.制造)用限制酶MluI和XhoI切割,并插入到pMS-MC的MluI-XhoI位点中,以制备pMS3-MC。PMS3-MC含有衍生自MMLV的5' LTR、衍生自MMLV的SD、衍生自MMLV的 ψ 、衍生自人EF1 α 基因的SA和由衍生自MSCV的U3区组成的3' LTR以及衍生自MMLV的其它区,其顺序是从5'端开始。

[0110] 如图1A和1B所示,制备了SEQ ID NO: 3所示的碱基序列的人工合成基因(在图1A中,称为抗CEA-28z-CAR)和SEQ ID NO: 4所示的碱基序列的人工合成基因(在图1B中,称为抗CEA-z28-CAR)。这些人工合成基因编码一个分子的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白由以下组成:结合癌抗原CEA(癌胚抗原)的抗CEA单克隆抗体的scFv(其氨基酸序列由SEQ ID NO: 22所示)、具有SEQ ID NO: 23所示的氨基酸序列的CD8 α 链铰链结构域、具有SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列的CD28跨膜结构域,具有SEQ ID NO: 25所示的氨基酸序列的CD28胞内结构域和具有SEQ ID NO: 26所示的氨基酸序列的CD3 ζ 胞内结构域。在图1中,抗CEA单克隆抗体的scFv被称为“CEA-scFv”,铰链结构域被称为“CD8铰链”,跨膜结构域被称为“CD28 TM”,CD28胞内结构域被称为“CD28 ICD(胞内结构域)”,CD3 ζ 胞内结构域被称为“CD3 ζ ”,末端重复序列被称为“LTR”,剪接供体序列被称为“SD”,剪接受体序列被称为“SA”,包装信号序列被称为“ Ψ ”。将包含这些人工合成基因的核酸片段克隆到用BglII-BamHI消化的pMS3-MC载体,以制备:表达CAR的pMS3-CEA-28z-CAR载体,其中CD28胞内结构域配置在CD3 ζ 胞内结构域的N-末端侧;以及表达CAR的pMS3-CEA-z28-CAR载体,其中CD3 ζ 胞内结构域配置在CD28胞内结构域的N-末端侧。

[0111] 实施例2 携带GITR基因的CAR表达载体的制备

[0112] 制备SEQ ID NO: 5所示的人工合成基因。该人工合成基因编码具有SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列的GITR跨膜结构域和具有SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列的GITR胞内结构域。使用该人工合成基因作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 6所示的28TM-G-F引物和SEQ ID NO: 7所示的G-z-R引物,以获得扩增的DNA片段A;进行PCR,使用SEQ ID NO: 8所示的z-G-F引物和SEQ ID NO: 9所示的G-MC-R引物,以获得扩增的DNA片段B;进行PCR,使用SEQ ID NO: 10所示的28SD-G-F引物和SEQ ID NO: 7所示的G-z-R引物,以获得扩增的DNA片段C;进行PCR,使用SEQ ID NO: 11所示的铰链-G-F引物和SEQ ID NO: 12所示的G-28SD-R引物,以获得扩增的DNA片段D;和进行PCR,使用SEQ ID NO: 8所示的z-G-F引物和SEQ ID NO: 13所示的G-28SD-R2引物,以获得扩增的DNA片段E。

[0113] 使用实施例1中制备的pMS3-CEA-28z-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 14所示的28TM-R引物和SEQ ID NO: 15所示的z-F引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段A,使用In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit(由Clontech制造),以制备pMS3-CEA-Gz-CAR载体。

[0114] 同样,使用实施例1中制备的pMS3-CEA-z28-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 16所示的z-R引物和SEQ ID NO: 17所示的END-MC-F引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段B,以制备pMS3-CEA-zG-CAR载体。该载体表达的CEA-zG-CAR的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 29。

[0115] 使用pMS3-CEA-28z-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 18所示的28SD-R引物和SEQ ID NO: 15所示的z-F引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段C,以制备pMS3-CEA-28Gz-CAR载体。

[0116] 使用pMS3-CEA-28z-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 19所示的铰链-R引物和SEQ ID NO: 20所示的28SD-F引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段D,以制备pMS3-CEA-G28z-CAR载体。

[0117] 使用pMS3-CEA-z28-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 16所示的z-R引

物和SEQ ID NO: 21所示的28SD-F2引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段E,以制备pMS3-CEA-zG28-CAR载体。该载体表达的CEA-zG28-CAR的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 30。

[0118] 使用pMS3-CEA-28z-CAR载体作为模板,进行PCR,使用SEQ ID NO: 16所示的z-R引物和SEQ ID NO: 17所示的END-MC-F引物。向由此获得的扩增产物中克隆扩增的DNA片段B,以制备pMS3-CEA-28zG-CAR载体。

[0119] 由所制备的载体表达的CAR结构分别对应于图2中所示的结构(2)至(9)。也就是说,pMS3-CEA-28z-CAR载体表达具有(2) 28z的结构CAR,pMS3-CEA-z28-CAR载体表达具有(3) z28的结构CAR,pMS3-CEA-Gz-CAR载体表达具有(4) Gz的结构CAR,pMS3-CEA-zG-CAR载体表达具有(5) zG的结构CAR,pMS3-CEA-28Gz-CAR载体表达具有(6) 28Gz的结构CAR,pMS3-CEA-G28z-CAR载体表达具有(7) G28z的结构CAR,pMS3-CEA-zG28-CAR载体表达具有(8) zG28的结构CAR,和pMS3-CEA-28zG-CAR载体表达具有(9) 28zG的结构CAR。

[0120] 实施例3 逆转录病毒溶液的制备

[0121] 用实施例1和2中制备的质粒载体转化大肠杆菌JM109,以获得转化体。使用QIAGEN Plasmid Midi Kit (由Qiagen制造),纯化这些转化体所携带的质粒DNA,并将其作为用于转染的DNA进行以下步骤。

[0122] 将由此制备的用于转染的DNA以及Retrovirus Packaging Kit Eco (由TAKARA BIO INC.制造)中含有的pGP载体和pEco载体转染到293T细胞中。根据该试剂盒的产品方案进行该操作。从由此获得的各转化细胞得到含有亲嗜性病毒的上清液,并用0.45 μm滤器(Millex HV, 由Millipore制造)过滤。使用该上清液,通过使用polybrene的方法,用亲嗜性病毒感染PG13细胞(ATCC CRL-10686)。回收由此获得的细胞培养上清液,并用0.45 μm滤器过滤,以获得逆转录病毒溶液,用于表达抗CEA-CAR。根据病毒表达的CAR结构,各病毒分别称为(2) CEA-28z,(3) CEA-z28,(4) CEA-Gz,(5) CEA-zG,(6) CEA-28Gz,(7) CEA-G28z,(8) CEA-zG28,和(9) CEA-28zG。

[0123] 实施例4 抗CEA-CAR逆转录病毒感染人PBMC - 1

[0124] 外周血单核细胞(PBMC)分离自获得知情同意后采集的人外周血,通过标准方法,使用RetroNectin (注册商标,由TAKARA BIO INC.制造),用实施例3中制备的用于表达抗CEA-CAR的各种逆转录病毒溶液对PBMC感染两次,以制备表达各种抗CEA-CAR的PBMC。对于每种逆转录病毒溶液,制备3组PBMC,并使用3个系列稀释液(2倍、4倍和8倍稀释液)的逆转录病毒溶液进行感染。第二次病毒感染后5天,使用FastPure DNA Kit (由TAKARA BIO INC.制造)自感染的细胞提取基因组DNA。使用Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (由TAKARA BIO INC.制造)和CycleavePCR Core Kit (由TAKARA BIO INC.制造),测定掺入基因组的逆转录病毒的拷贝数。

[0125] 另外,第二次病毒感染后3天,将使用Biotin-Labeling Kit-NH₂ (由DOJINDO LABORATORIES制造)进行了生物素标记的CEA蛋白加入到感染的细胞中,接着用链霉抗生物素-PE (藻红蛋白:由Becton Dickinson制造)和FITC-标记的抗人CD8抗体(由Becton Dickinson制造)染色。使用流式细胞仪,对染色的细胞测定在FITC-阳性细胞中的PE-阳性细胞比率,也就是说,在CD8-阳性细胞中对于结合CEA的CAR而言阳性的细胞比率。另外,测

定荧光染料PE的平均荧光强度。平均荧光强度反映出在抗CEA-CAR-阳性细胞中的抗CEA-CAR的表达量。结果证实了,在所有细胞中,细胞表面上的CAR是阳性的。尤其是,与用(4) CEA-zG感染的细胞相比,用(5) CEA-zG感染的细胞具有较高的抗CEA-CAR阳性率和较高的平均荧光强度。关于用(2) CEA-28z、(3) CEA-z28和(5) CEA-zG感染的细胞,抗CEA-CAR-阳性率(纵轴)和掺入基因组的逆转录病毒拷贝数(横轴)之间的关系示于图3,衍生自生物素标记的CEA蛋白阳性细胞的PE的平均荧光强度(纵轴)和掺入基因组的逆转录病毒拷贝数(横轴)之间的关系示于图4。如图3和图4所示,发现与其它引入抗CEA-CAR的没有GITR胞内结构域的PBMC相比,其中引入抗CEA-zG-CAR [(5) CEA-zG]的PBMC具有较高的抗CEA-CAR-阳性率并且也具有较高的抗CEA-CAR表达量。

[0126] 实施例5 抗CEA-CAR逆转录病毒感染人PBMC - 2

[0127] 在获得知情同意后采集人PBMC,通过标准方法,使用RetroNectin (注册商标,由TAKARA BIO INC.制造),用实施例3中制备的用于表达抗CEA-CAR的逆转录病毒溶液对PBMC感染两次,所述病毒溶液为:(2) CEA-28z的4倍、6倍或8倍稀释液,(5) CEA-zG的未稀释的溶液或2倍或4倍稀释液,或(9) CEA-28zG或(8) CEA-zG28的2倍、4倍或8倍稀释液,以制备表达各抗CEA-CAR的PBMC。第二次病毒感染后6天,回收感染的细胞,并按照与实施例4相同的方式对其测定掺入基因组的病毒拷贝数。选择具有相对接近的逆转录病毒拷贝数的抗CEA-CAR-表达细胞[(2) CEA-28z: 0.27拷贝,(5) CEA-zG: 1.3拷贝,(9) CEA-28zG: 0.81拷贝,(8) CEA-zG28: 0.65拷贝],然后对其进行染色并按照与实施例4相同的方式测量其在CD8-阳性细胞中的抗CEA-CAR阳性细胞比率和PE的平均荧光强度。图5显示抗CEA-CAR阳性率,图6显示阳性细胞的PE平均荧光强度。如图5和图6所示,发现与用(2) CEA-28z感染的细胞相比,用(5) CEA-zG、(9) CEA-28zG和(8) zG28感染的细胞具有较高的表达抗CEA-CAR的细胞比率并且也具有较高的抗CEA-CAR表达量。

[0128] 另外,第二次病毒感染后11天,回收感染的细胞并通过Calsein释放测定,在96孔板上测量细胞毒活性。当将Calsein-AM (由DOJINDO LABORATORIES制造)掺入CEA-阳性细胞株MKN-45和CEA-阴性细胞株MKN-1 (这两种都可得自RIKEN BioResource Center)之后,加入 1.0×10^5 细胞/mL细胞株悬液,其量为100 μ L/孔。另外,将如上所述的引入抗CEA-CAR的PBMC和作为对照的未引入载体的PBMC (NGMC)悬浮,并将100 μ L悬液加入孔中,使ET比例为30、10、3或1。向孔中加入100 μ L培养基以代替PBMC的孔作为低对照(Low control),或加入100 μ L 0.1% Triton X-100以代替PBMC的孔作为高对照(High control),进行制备。制备了细胞和对照之后,将96孔板在用5.0% CO₂气体平衡的CO₂培养箱中在37°C孵育4小时。然后对100 μ L上清液在 $\lambda_{ex}=490$ nm和 $\lambda_{em}=515$ nm处测定荧光强度,并测量释放的Calsein的量。通过下式求出细胞毒活性(细胞溶解),结果见图7。

[0129] 细胞毒活性(%) = $100 \times (\text{各孔测量值} - \text{低对照测量值}) / (\text{高对照测量值} - \text{低对照测量值})$

[0130] 如图7所示,在CEA-阳性细胞株MKN-45中观察了引入抗CEA-CAR的PBMC的细胞毒活性。尤其是,引入(5) CEA-zG的PBMC、引入(9) CEA-28zG的PBMC和引入(8) CEA-zG28的PBMC表现出强的细胞毒活性,并且发现具有GITR的胞内结构域的CAR可用于治疗癌症。

[0131] 实施例6 CEA-zG28的再次制备和逆转录病毒溶液的制备

[0132] 因为在用于实施例5的CEA-zG28的CD28胞内结构域的编码区中发现移码,制备了

其中该移码已被修复的质粒DNA,并使用QIAGEN Plasmid Midi Kit (由Qiagen制造)将其纯化。使用该纯化的质粒DNA作为用于转染的DNA,按照与实施例3相同的方式制备病毒溶液。由此获得的逆转录病毒溶液称为(8) CEA-zG28_r。

[0133] 实施例7 抗CEA-CAR逆转录病毒载体感染人PBMC-3

[0134] 在获得知情同意后采集人PBMC,用实施例6中制备的(8) CEA-zG28_r或(9) CEA-28zG的未稀释的溶液或2倍、4倍或8倍稀释液感染所述PBMC,然后按照与实施例4相同的方式,对其测量掺入基因组的病毒拷贝数、在CD8-阳性细胞中的抗CEA-CAR阳性细胞比率和PE的平均荧光强度。图8显示相对于拷贝数的抗CEA-CAR阳性率。图9显示相对于拷贝数的PE平均荧光强度。如图8和图9所示,证实了用(8) CEA-zG28_r感染的细胞表达抗CEA-CAR。

[0135] 另外,第二次病毒感染后6天,选择具有相对接近的逆转录病毒拷贝数的抗CEA-CAR表达细胞[(9) CEA-28zG: 2.22拷贝,(8) CEA-zG28_r: 2.12拷贝]并回收,然后按照与实施例5相同的方式测定针对CEA-阳性细胞株MKN-45和CEA-阴性细胞株MKN-1的细胞毒活性。结果见图10。如图10所示,每种引入抗CEA-CAR的PBMC都表现出针对CEA-阳性细胞株MKN-45的类似的细胞毒活性。

[0136] 实施例8 抗CEA-CAR逆转录病毒载体感染人PBMC-4

[0137] 制备实施例3中制备的(5) CEA-zG和(9) CEA-28zG的未稀释的溶液和2倍、4倍和8倍稀释液,以及实施例3中制备的(2) CEA-28z的未稀释的溶液和2倍、4倍、8倍和16倍稀释液。在获得知情同意后采集人PBMC,通过标准方法,使用上述逆转录病毒载体稀释液和RetroNectin (注册商标),对所述PBMC感染两次,以制备表达各抗CEA-CAR的PBMC。第二次病毒感染后5天,回收感染的细胞,并按照与实施例4相同的方式对其测定掺入基因组的病毒拷贝数、在CD8-阳性细胞中的抗CEA-CAR阳性细胞比率和PE的平均荧光强度。图11显示相对于拷贝数的抗CEA-CAR阳性率。图12显示相对于拷贝数的PE平均荧光强度。如图11和图12所示,相对于拷贝数的表达抗CEA-CAR的细胞比率在所有情况下都是类似的,和(5) CEA-zG表现出相对于拷贝数的最高的PE平均荧光强度,也就是说,最高表达量。

[0138] 另外,第二次病毒感染后6天,回收感染的细胞,并如下所述地在96孔板中对其进行胞内细胞因子染色。将如上所述的引入抗CEA-CAR的PBMC悬浮在含胞内转运抑制剂布雷菲德菌素A (由Sigma制造)的培养基中,至 1.0×10^6 细胞/mL。将该悬液以100 μ L/孔的量加入板中。此外,将100 μ L 1.0×10^6 细胞/mL CEA-阳性细胞株MKN-45的悬液加入孔中,并共培养5小时。共培养的细胞用APCCy7-标记的抗人CD8抗体(由Becton Dickinson制造)染色,用IntraPrep试剂(由Beckman Coulter制造)处理,然后再用PE-标记的抗人IFN γ 抗体(由Beckman Coulter制造)和APC-标记的抗人TNF α 抗体(由eBioscience制造)染色。使用流式细胞仪,对染色的细胞测定在CD8-阳性细胞中的IFN γ 产生细胞比率和荧光染料PE的平均荧光强度,并且也测定在CD8-阳性细胞中的TNF α 产生细胞比率和荧光染料APC的平均荧光强度。平均荧光强度反映了在抗CEA-CAR阳性细胞中IFN γ 和TNF α 的胞内细胞因子量。

[0139] 图13显示IFN γ 产生细胞比率(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系。图14显示PE平均荧光强度(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系。如图13所示,与(2) CEA-28z相比,(9) CEA-28zG表现出较低的IFN γ 产率。然而,如图14所示,证实了(9) CEA-28zG表现出IFN γ 产量相当于(2) CEA-28z的产量。也就是说,对于IFN γ 产生细胞中的IFN γ 产量,在引入(9) CEA-28zG的细胞中较高。

[0140] 同样,图15显示TNF α 产生细胞比率(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系,和图16显示APC平均荧光强度(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系。如图15所示,与(2) CEA-28z相比,(9) CEA-28zG表现出较低TNF α 产率。然而,如图16所示,(9) CEA-28zG表现出较高的TNF α 产量。也就是说,类似于IFN γ 的情况,引入(9) CEA-28zG的细胞导致在TNF α 产生细胞中较高的TNF α 产量。

[0141] 因此,发现了可以通过在具有CD28胞内结构域的CAR中进一步装载GITR胞内结构域而产生具有增强的产生细胞因子的能力的细胞。

[0142] 实施例9 抗EGFR-CAR表达逆转录病毒载体的制备

[0143] 制备了SEQ ID NO: 31所示的碱基序列的人工合成基因。该人工合成基因编码是抗EGFR-CAR的EGFR-z,即一分子的嵌合蛋白,其由以下组成:具有SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列的人IgG前导序列、具有SEQ ID NO: 33所示的氨基酸序列的结合癌抗原EGFR(表皮生长因子受体)的抗EGFR单克隆抗体的scFv、具有SEQ ID NO: 34所示的氨基酸序列的人IgG-LC(轻链恒定区)结构域、具有SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列的CD28跨膜结构域和具有SEQ ID NO: 26所示的氨基酸序列的CD3 ζ 胞内结构域。将包含该人工合成基因的核酸片段克隆到用NotI-XhoI消化的pMS3-MC载体中,以制备表达仅具有CD3 ζ 胞内结构域作为胞内结构域的(1) EGFR-z的pMS3-EGFR-LC-z-CAR。CAR的结构对应于图2中的(1)。

[0144] 实施例10 携带GITR基因的抗EGFR-CAR表达载体的制备

[0145] 根据实施例9中制备的pMS3-EGFR-LC-z-CAR,制备表达具有SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列的(2) EGFR-28z的pMS3-EGFR-LC-28z-CAR。同样,制备了表达具有SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列的(5) EGFR-zG的pMS3-EGFR-LC-zG-CAR,表达具有SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列的(9) EGFR-28zG的pMS3-EGFR-LC-28zG-CAR,表达具有SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列的(10) EGFR-z28G的pMS3-EGFR-LC-z28G-CAR,和表达具有SEQ ID NO: 39所示的氨基酸序列的(7) EGFR-G28z的pMS3-EGFR-LC-G28z-CAR。这些CAR的结构分别对应于图2中的(2)、(5)、(9)、(7)和(10)。

[0146] 实施例11 逆转录病毒溶液的制备

[0147] 按照与实施例3相同的方式,自实施例9和10中制备的质粒载体制备病毒溶液。根据病毒所表达的CAR的结构,相应的病毒命名为(1) EGFR-z,(2) EGFR-28z,(5) EGFR-zG,(9) EGFR-28zG,(10) EGFR-z28G和(7) EGFR-G28z。

[0148] 实施例12 抗EGFR-CAR逆转录病毒载体感染人PBMC

[0149] 在获得知情同意后采集人PBMC,通过标准方法,使用RetroNectin(注册商标),用实施例11中制备的各病毒溶液的未稀释的溶液或2倍、4倍或8倍稀释液对所述PBMC感染两次,以制备表达各抗EGFR-CAR的PBMC。

[0150] 第二次病毒感染后5天,将其C末端被His-标签修饰的重组人EGFR(由Sino Biological制造)加入到感染的细胞中,然后加入生物素标记的抗His-标签抗体(由Miltenyi Biotec K.K.制造)。然后,将细胞用链霉抗生物素-PE(藻红蛋白:由Becton Dickinson制造)和FITC-标记的抗人CD8抗体(由Becton Dickinson制造)染色。使用流式细胞仪,对染色的细胞测定在FITC-阳性细胞中的PE-阳性细胞比率,即在CD8-阳性细胞中的结合EGFR的CAR阳性细胞比率。另外,测定了荧光染料PE的平均荧光强度。此外,在第二次病毒感染后5天回收感染的细胞,并按照与实施例4相同的方式对其测定掺入基因组的病毒拷

贝数。图17显示相对于逆转录病毒拷贝数的抗EGFR-CAR阳性细胞比率。图18显示相对于逆转录病毒拷贝数的PE平均荧光强度。如图17和图18所示,证实了所有抗EGFR-CAR的表达。

[0151] 另外,第二次病毒感染后6天,回收感染的细胞,除了使用EGFR-阳性细胞株HeLa之外,按照与实施例8相同的方式对其进行胞内细胞因子染色。除了IFN γ 和TNF α 之外,用FITC-标记的抗人IL-2 (由Becton Dickinson制造)对IL-2进行染色。使用流式细胞仪,对染色的细胞测定产生各细胞因子的细胞比率和荧光染料平均荧光强度。平均荧光强度反映了在抗CEA-CAR-阳性细胞中IL-2、IFN γ 和TNF α 的胞内细胞因子量。

[0152] 图19显示产生各细胞因子的细胞比率(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系。图20显示平均荧光强度(各细胞因子的产量)(纵轴)相对于逆转录病毒拷贝数(横轴)的关系。如图19和图20所示,发现与CAR表达量相比,携带GITR的胞内结构域的CAR趋向于表现出较高细胞因子产量。

[0153] 工业应用性

[0154] 根据本发明,提供了特异性结合靶抗原并将针对靶细胞的高细胞毒活性赋予细胞的CAR、编码该CAR的核酸和表达该CAR的细胞。该CAR、核酸和细胞可用于靶向抗原(例如肿瘤抗原)的过继免疫基因治疗领域。

[0155] 序列表自由文本

[0156] SEQ ID NO:1: 3MSCV5引物

[0157] SEQ ID NO:2: 3MSCV3引物

[0158] SEQ ID NO:3: 抗CEA-28z-CAR片段序列

[0159] SEQ ID NO:4: 抗CEA-z28-CAR片段序列

[0160] SEQ ID NO:5: GITR跨膜区和胞质结构域编码序列

[0161] SEQ ID NO:6: 28TM-G-F引物

[0162] SEQ ID NO:7: G-z-R引物

[0163] SEQ ID NO:8: z-G-F引物

[0164] SEQ ID NO:9: G-MC-R引物

[0165] SEQ ID NO:10: 28SD-G-F引物

[0166] SEQ ID NO:11: 铰链-G-F引物

[0167] SEQ ID NO:12: G-28SD-R引物

[0168] SEQ ID NO:13: G-28SD-R2引物

[0169] SEQ ID NO:14: 28TM-R引物

[0170] SEQ ID NO:15: z-F引物

[0171] SEQ ID NO:16: z-R引物

[0172] SEQ ID NO:17: END-MC-F引物

[0173] SEQ ID NO:18: 28SD-R引物

[0174] SEQ ID NO:19: 铰链-R引物

[0175] SEQ ID NO:20: 28SD-F引物

[0176] SEQ ID NO:21: 28SD-F2引物

[0177] SEQ ID NO:22: 抗CEA scFv

[0178] SEQ ID NO:23: 人CD8 α 链铰链区

- [0179] SEQ ID NO:24: 人CD28跨膜结构域
- [0180] SEQ ID NO:25: 人CD28胞质结构域
- [0181] SEQ ID NO:26: 人CD3 ζ 链胞质结构域
- [0182] SEQ ID NO:27: 人GITR跨膜结构域
- [0183] SEQ ID NO:28: 人GITR胞质结构域
- [0184] SEQ ID NO:29: 抗CEA-zG-CAR序列
- [0185] SEQ ID NO:30: 抗CEA-zG28-CAR序列
- [0186] SEQ ID NO:31: 抗EGFR-LC-z-CAR编码序列
- [0187] SEQ ID NO:32: 人IgG前导序列
- [0188] SEQ ID NO:33: 抗EGFR单克隆抗体scFv序列
- [0189] SEQ ID NO:34: 人IgG CL序列
- [0190] SEQ ID NO:35: 抗EGFR-28z-CAR序列
- [0191] SEQ ID NO:36: 抗EGFR-zG-CAR序列
- [0192] SEQ ID NO:37: 抗EGFR-28zG-CAR序列
- [0193] SEQ ID NO:38: 抗EGFR-z28G-CAR序列
- [0194] SEQ ID NO:39: 抗EGFR-G28z-CAR序列。

- <110> MIE UNIVERSITY
 TAKARA BIO INC.
- <120> 嵌合抗原受体
- <130> 671198
- <150> JP 2011-222510
 <151> 2011-10-7
- <160> 39
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工的
- <220>
 [0001] <223> 3MSCV5 引物
- <400> 1
 tacctcgagc gataaaataa aagattttat ttag 34
- <210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工的
- <220>
 <223> 3MSCV3 引物
- <400> 2
 tacgaattcg attgaatccg tcgactgaaa gacccccogct gacgg 45
- <210> 3
 <211> 1515
 <212> DNA

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 抗 CEA-28z-CAR 片段序列	
	<400> 3	
	atgagtgtgc ccaactcaggt cctggggttg ctgetgctgt ggcttacagg tgccagatgt	60
	gacatecaga tgactcagtc tccagectec etttctgcat ctgtgggaga cactgtcacc	120
	atcacatgtc gagcaagtga gaacatttat agttatttag catggtatca gcagaaacag	180
	ggaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaggcct tatcagaagg tgtgccgtca	240
	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ggatcaacag cctgcagcct	300
	gaagattttg gggattatta ctgtcaacat cattataatt ctcttatac gttcggaggg	360
	gggaccaaac tggaaataaa gggttctacc tctggttctg gtaaactctc tgaaggtaaa	420
	ggtcagatcc agttgggtgca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag	480
[0002]	atctctgca aggettctgg ttattccttc acaaacgatg gaataaactg ggtgaagcag	540
	gctccaggaa agggttttaa gtacatgggc tggataaaca ccatcactgg agagccaaca	600
	tatactgaag acttcaaggg gcggtttgc tctcttttg aaacctctgc cagcactgcc	660
	tatttgcaga tcaacaacct caaagatgag gacacggcta catttttctg tgcaaagggg	720
	actgggacga gcgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc aactagtctg	780
	agcaactcca tcatgtactt cagccacttc gtgccgtct tectgccagc gaagcccacc	840
	acgacgccag cgcccgacc accaacaccg gcgccacca tgcgctgca gccctgtcc	900
	ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac	960
	tctagatfff ggggtctggt ggtggttggg ggagtcttg cttgctatag cttgctagta	1020
	acagtggcct ttattatfff ctgggtgagg agtaagagga gcaggtcct gcacagtgac	1080
	tacatgaaca tgactceccg ccgccccggg cccaccegea agcattacca gccctatgcc	1140

	ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgtccc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	1200
	gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	1260
	gaggagtacg atgttttggg caagagacgt gcccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1320
	cagagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	1380
	gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc	1440
	ctttaccagg gtctcagtae agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc	1500
	ctgccccctc gctaa	1515
	<210> 4	
	<211> 1515	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
[0003]	<223> 抗 CEA-z28-CAR 片段序列	
	<400> 4	
	atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt	60
	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctttctgcat ctgtgggaga cactgtcacc	120
	atcacatgtc gagcaagtga gaacatttat agttatttag catggtatca gcagaaacag	180
	ggaaaatctc ctgagctcct ggtctataat gcaaaggcct taccagaagg tgtgccgtca	240
	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ggatcaacag cctgcagcct	300
	gaagattttg gggattatta ctgtcaacat cattataatt ctcttatac gttcggaggg	360
	gggaccaaac tggaaataaa gggttctacc tctggttctg gtaaactctc tgaaggtaaa	420
	ggtcagatcc agttggtgca gtctggacct gagctgaaga agcctggaga gacagtcaag	480
	atctcctgca aggettctgg ttattccttc acaaacgatg gaataaactg ggtgaagcag	540
	gctccaggaa agggttttta gtacatgggc tggataaaca ccatcactgg agagccaaca	600

tatactgaag acttcaaggg gcggtttgcc ttctctttgg aaacctctgc cagcaactgcc	660
tatttgcaga tcaacaacct caaagatgag gacacggcta catttttctg tgcaaagggg	720
actgggacga gcgcttactg gggccaaggg actctgtgca ctgtctctgc aactagtctg	780
agcaactcca tcatgtactt cagccaacttc gtgcgggtct tctgcccagc gaagcccacc	840
acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca tcgcgtcgca gccctgtcc	900
ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcgag tgcacacgag ggggctggac	960
tctagatfff ggggtctggt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta	1020
acagtggcct ttattatfff ctgggtgagg ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	1080
gccccgcgt acccagcagg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	1140
gaggagtacg atgttttggg caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1200
cagagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	1260
[0004] gaggctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgcggga ggggcaaggg gcacgatggc	1320
ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc	1380
ctgccccctc gcagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc	1440
cgccgccccg ggcccaccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca	1500
gcctatcgct cctaa	1515
<210> 5	
<211> 240	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> GITR 跨膜区和胞质结构域编码序列	
<400> 5	
ccgcttgggt ggetgaccgt cgtctctctg gcggtggcgg cctgctctct cctctgacc	60

	tcggcccagc ttggactgca catctggcag ctgaggagtc agtgcattgtg gccccgagag	120
	accagctgc tgetggaggt gccgccgtcg accgaagacg ccagaagctg ccagttcccc	180
	gaggaagagc ggggcgagcg atcggcagag gagaaggggc ggctgggaga cctgtgggtg	240
	<210> 6	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 28TM-G-F 引物	
	<400> 6	
	atctctctggg tgaggaggag tcagtgcattg ttgcc	35
	<210> 7	
	<211> 35	
	<212> DNA	
[0005]	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> G-z-R 引物	
	<400> 7	
	gaacttcaact ctcagcaccc acaggtctcc cagcc	35
	<210> 8	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> z-G-F 引物	
	<400> 8	
	gccctgcccc ctcgcaggag tcagtgcattg ttgcc	35
	<210> 9	

<211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> G-MC-R 引物

 <400> 9
 ttatcgetcg agttacaccc acaggtctcc cagcc 35

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 28SD-G-F 引物

 <400> 10
 gcagcctatc gctccaggag tcagtgcattg tggcc 35

[0006]

<210> 11
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 铰链-G-F 引物

 <400> 11
 acgagggggc tggacceget tgggtggetg accgt 35

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> G-28SD-R 引物

 <400> 12

	actgtgcagg agcctcaccc acaggtctcc cagcc	35
	<210> 13	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> G-28SD-R2 引物	
	<400> 13	
	cctgtctctc ttactcaccc acaggtctcc cagcc	35
	<210> 14	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
[0007]	<223> 28TM-R 引物	
	<400> 14	
	cctcacccag aaaataataa aggccac	27
	<210> 15	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> z-F 引物	
	<400> 15	
	ctgagagtga agttc	15
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	

	<220>		
	<223>	z-R 引物	
	<400>	16	
		gcgagggggc agggcctgca	20
	<210>	17	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	END-MC-F 引物	
	<400>	17	
		taactcgagc gataaaataa	20
	<210>	18	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
[0008]	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	28SD-R 引物	
	<400>	18	
		ggagcgatag gctgc	15
	<210>	19	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	铰链-R 引物	
	<400>	19	
		gtccagccccc ctcgt	15
	<210>	20	

<211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 28SD-F 引物

 <400> 20
 agtaagagga gcagg 15

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 28SD-F2 引物

 <400> 21
 agtaagagga gcaggctcct 20

[0009]

<210> 22
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 抗 CEA scFv

 <400> 22

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

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Ala Leu Ser Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

[0010] Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Gln Ile Gln
 130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Asp Gly Ile Asn
 165 170 175

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Tyr Met Gly Trp Ile
 180 185 190

Asn Thr Ile Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Lys Gly Arg
 195 200 205

Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
 210 215 220

Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Lys Gly
 225 230 235 240

Thr Gly Thr Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 245 250 255

Ala

<210> 23

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 CD8 α 链铰链结构域

[0011]

<400> 23

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
 1 5 10 15

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 20 25 30

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 35 40 45

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 50 55 60

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 CD28 跨膜结构域

<400> 24

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 20 25

<210> 25

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 CD28 胞质结构域

[0012]

<400> 25

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 CD3 ζ 链胞质结构域

<400> 26

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

[0013] Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 85 90 95

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

Pro Arg

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人 GITR 跨膜结构域

<400> 27

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val

1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu

 20 25 30

<210> 28
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人 GITR 胞质结构域

<400> 28

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val

1 5 10 15

[0014]

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu

 20 25 30

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp

 35 40 45

Val

<210> 29
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗 CEA-zG-CAR 序列

<400> 29

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1	5	10	15
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser			
	20	25	30
Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn			
	35	40	45
Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro			
	50	55	60
Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Ala Leu Ser Glu Gly Val Pro Ser			
	65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn			
	85	90	95
[0015]			
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr			
	100	105	110
Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly			
	115	120	125
Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Gln Ile Gln			
	130	135	140
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys			
	145	150	155
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Asp Gly Ile Asn			
	165	170	175
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Tyr Met Gly Trp Ile			

	180		185		190
Asn Thr Ile Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Asp Phe Lys Gly Arg					
	195		200		205
Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile					
	210		215		220
Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ala Lys Gly					
225		230		235	240
Thr Gly Thr Ser Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser					
		245		250	255
Ala Thr Ser Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro					
	260		265		270
[0016]					
Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro					
	275		280		285
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu					
	290		295		300
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp					
305		310		315	320
Ser Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr					
		325		330	335
Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Leu Arg					
	340		345		350
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln					

355

360

365

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 370 375 380

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 385 390 395 400

Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 405 410 415

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

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

[0017]

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
 485 490 495

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
 500 505 510

Val

<210> 30

<211> 553
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 抗 CEA-zG28-CAR 序列

<400> 30

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

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

[0018] Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Ala Leu Ser Glu Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr
 100 105 110

Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly Gln Ile Gln
 130 135 140

	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys
	145					150					155					160
	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Asp	Gly	Ile	Asn
					165					170						175
	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Phe	Lys	Tyr	Met	Gly	Trp	Ile
				180					185						190	
	Asn	Thr	Ile	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Thr	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg
			195					200						205		
	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile
	210					215						220				
[0019]	Asn	Asn	Leu	Lys	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Phe	Phe	Cys	Ala	Lys	Gly
	225					230					235					240
	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
					245					250						255
	Ala	Thr	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	Val	Pro
				260					265						270	
	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro
			275					280					285			
	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
	290						295						300			
	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp
	305					310					315					320

Ser Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr
 325 330 335

Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Leu Arg
 340 345 350

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 355 360 365

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 370 375 380

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 385 390 395 400

[0020] Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 405 410 415

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

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

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu
 485 490 495

Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp
 500 505 510

Val Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 515 520 525

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 530 535 540

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 545 550

<210> 31

<211> 1545

<212> DNA

<213> 人工序列

[0021]

<220>

<223> 抗 EGFR-LC-z-CAR 编码序列

<400> 31

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtccag 60

gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtcctcacc 120

tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt agtagttact actgggctg gatccgccag 180

ccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctatt atagtgggag cacctactac 240

aaccgtccc tcaagagtgc agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctec 300

ctgaagetga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacttct 360

atggttacga tgcctttga ctactggggc cagggaacce tggtcaccgt ctcgagaggc 420

ggtggcggat caggtggcgg tggaaagtgc ggtggtgggt ccatggcctc ctatgtgctg 480

actcagccac cctcagtgtc agtggcccca ggaaagacgg ccaggattac ctgtggggga 540

aacaacattg gaagtaaaag tgtgcactgg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg	600
ctggatcatct attatgatag cgaccgcccc tcagggatecc ctgagcgatt ctctggctcc	660
aactctggga acacggccac cctgaccatc agcagggtcg aagccgggga tgaggccgac	720
tattactgtc aggtgtggga tagtagtagt gatcatgtgg tatteggcgg agggaccaag	780
ctgaccgtcc taggtcagcc caaggtgcc cctcgggtca ctctgttccc gcctcctct	840
gaggagcttc aagccaacaa ggccacactg gtgtgtctca taagtgactt ctacceggga	900
gccgtgacag tggcttgaa ggcagatagc agccccgtca aggcgggagt ggagaccacc	960
acaccctcca aacaaagcaa caacaagtac gggccagca gctatctgag cctgaccgct	1020
gagcagtga agtcccacag aagctacagc tgccaggtea cgcataagg gagcacctg	1080
gagaagacag tgccccctac agaatgttcg actagatctt ggggtctgtt ggtggttgg	1140
ggagtccctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatctt ctgggtgagg	1200
[0022] ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac gcccccgct accagcagg ccagaaccag	1260
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtaag atgttttga caagagacgt	1320
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg cagagaagga agaaccctca ggaaggcctg	1380
tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggectaca gtgagattgg gatgaaagc	1440
gagcgcgga ggggcaagg gcaagatgac ctttaccagg gtctcagta agccaccaag	1500
gacacctag acgccttca catgcagcc ctgccccctc gctaa	1545

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG 前导序列

<400> 32

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 33

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 EGFR 单克隆抗体 scFv 序列

<400> 33

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

[0023]

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 145 150 155 160

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

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 180 185 190

[0024]

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 195 200 205

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

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Leu
 245

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgG CL 序列

<400> 34

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

[0025]

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 35

<211> 554

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 EGFR-28z-CAR 序列

<400> 35

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1	5	10	15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys			
	20	25	30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile			
	35	40	45
Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys			
	50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr			
65	70	75	80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys			
	85	90	95
[0026]			
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala			
	100	105	110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr			
	115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser			
	130	135	140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu			
145	150	155	160
Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile			
	165	170	175
Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln			

		180						185						190			
Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Asp		
		195						200						205			
Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn		
		210						215						220			
Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp		
225								230					235				240
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Val	Val	Phe	Gly		
								245						250			255
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser		
								260						265			270
[0027]																	
Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala		
								275						280			285
Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val		
								290						295			300
Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr		
								305						310			315
Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu		
								320						325			330
Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln		
								335						340			345
Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu		

355 360 365

Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
370 375 380

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
385 390 395 400

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
405 410 415

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
420 425 430

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
435 440 445

[0028]

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
450 455 460

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
465 470 475 480

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro
485 490 495

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
500 505 510

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
515 520 525

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

530

535

540

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

545

550

<210> 36

<211> 563

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 EGFR-zG-CAR 序列

<400> 36

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1

5

10

15

[0029]

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20

25

30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35

40

45

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50

55

60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

65

70

75

80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

85

90

95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100

105

110

	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr																		
	115						120							125					
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser																		
	130						135							140					
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu																		
	145						150							155					160
	Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile																		
							165							170					175
	Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln																		
							180							185					190
[0030]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp																		
	195													200					205
	Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn																		
	210													215					220
	Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp																		
	225													230					235
	Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly																		
														245					250
																			255
	Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser																		
														260					265
																			270
	Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala																		
	275																		280
																			285

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

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
 305 310 315 320

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
 325 330 335

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
 340 345 350

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
 355 360 365

[0031]

Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
 370 375 380

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 385 390 395 400

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 405 410 415

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

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 435 440 445

Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 450 455 460

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
465 470 475 480

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
485 490 495

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
500 505 510

Pro Arg Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu
515 520 525

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

[0032] Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp
545 550 555 560

Leu Trp Val

<210> 37

<211> 603

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 EGFR-28zG-CAR 序列

<400> 37

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

	20		25		30	
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile						
	35		40		45	
Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys						
	50		55		60	
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr						
65		70		75		80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys						
		85		90		95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala						
	100		105		110	
[0033]						
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr						
	115		120		125	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser						
	130		135		140	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu						
	145		150		155	160
Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile						
		165		170		175
Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln						
	180		185		190	
Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp						

195 200 205

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
210 215 220

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
260 265 270

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

[0034]

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

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
305 310 315 320

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
325 330 335

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
340 345 350

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
355 360 365

Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala

370 375 380

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
385 390 395 400

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
405 410 415

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
420 425 430

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
435 440 445

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
450 455 460

[0035]

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
465 470 475 480

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro
485 490 495

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
500 505 510

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
515 520 525

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
530 535 540

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ser Gln Cys Met Trp

545 550 555 560

Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp
 565 570 575

Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala
 580 585 590

Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
 595 600

<210> 38
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 [0036] <223> 抗 EGFR-z28G-CAR 序列

<400> 38

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

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

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr
115 120 125

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu
145 150 155 160

[0037] Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
165 170 175

Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
180 185 190

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

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
210 215 220

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
 260 265 270

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

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

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
 305 310 315 320

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
 325 330 335

[0038]

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
 340 345 350

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
 355 360 365

Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala
 370 375 380

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 385 390 395 400

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 405 410 415

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

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 435 440 445

Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 450 455 460

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 465 470 475 480

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 485 490 495

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 500 505 510

[0039] Pro Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 515 520 525

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 530 535 540

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Ser Gln Cys Met Trp
 545 550 555 560

Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp
 565 570 575

Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala
 580 585 590

Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
 595 600

<210> 39

<211> 603

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 EGFR-G28z-CAR 序列

<400> 39

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

[0040]

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

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

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Met Val Thr Met Ser Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Val Leu
145 150 155 160

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

Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
180 185 190

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

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
210 215 220

[0041]

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly
245 250 255

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
260 265 270

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

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

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr

305	310	315	320
Thr Pro Ser Lys	Gln Ser Asn Asn Lys	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu	
	325	330	335
Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln			
	340	345	350
Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu			
	355	360	365
Cys Ser Thr Arg Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala			
	370	375	380
Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg			
385	390	395	400
[0042]			
Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val			
	405	410	415
Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu			
	420	425	430
Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp			
	435	440	445
Val Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr			
	450	455	460
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro			
465	470	475	480
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg			

485

490

495

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 500 505 510

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 515 520 525

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn
 530 535 540

[0043]

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 545 550 555 560

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 565 570 575

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 580 585 590

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 595 600

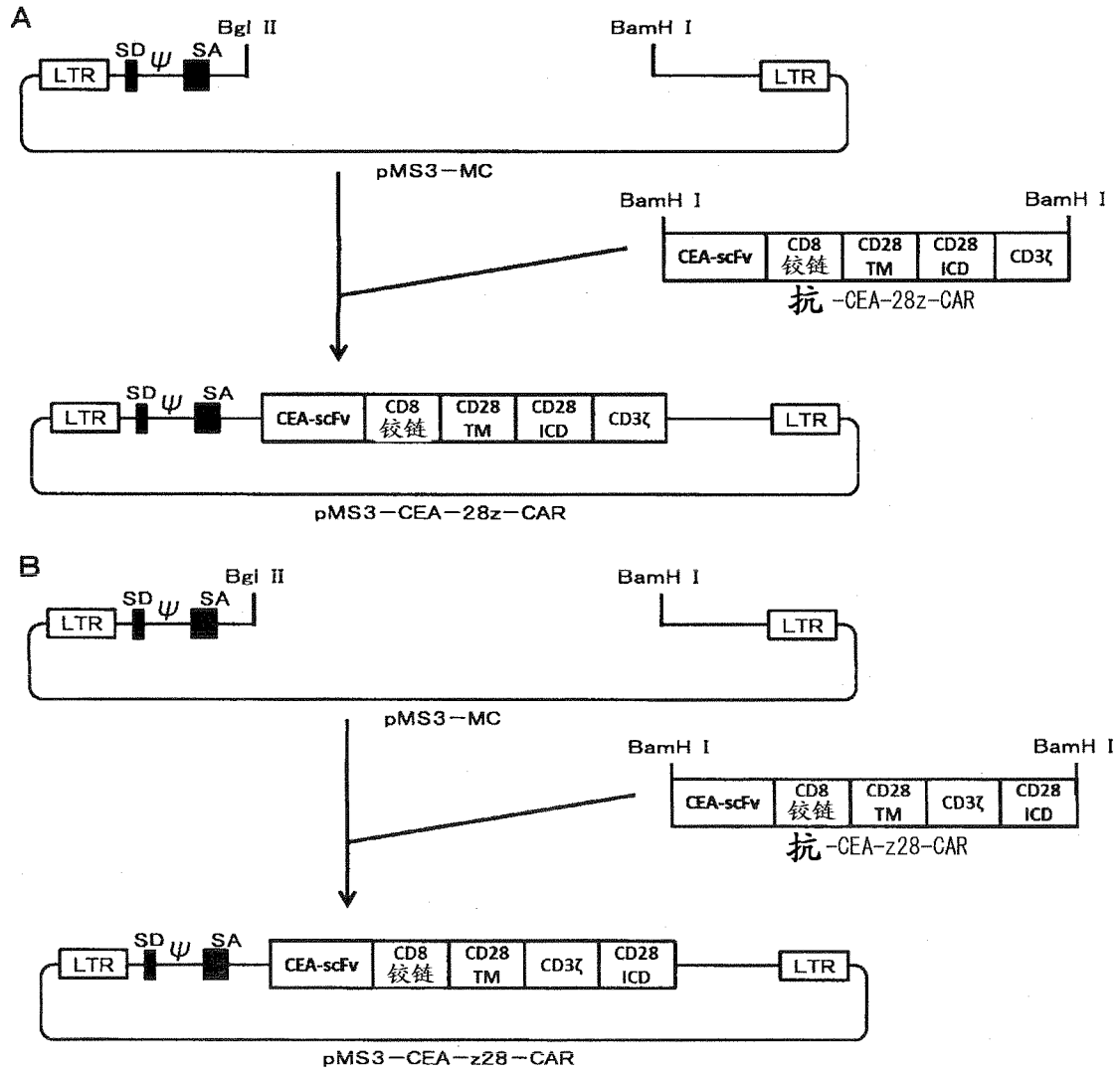


图 1

scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD3 ζ			(1) z
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD28 ICD	CD3 ζ		(2) 28z
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD3 ζ	CD28 ICD		(3) z28
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	GITR ICD	CD3 ζ		(4) Gz
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD3 ζ	GITR ICD		(5) zG
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD28 ICD	GITR ICD	CD3 ζ	(6) 28Gz
scFv	间隔 结构域	GITR TM	GITR ICD	CD28 ICD	CD3 ζ	(7) G28z
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD3 ζ	GITR ICD	CD28 ICD	(8) zG28
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD28 ICD	CD3 ζ	GITR ICD	(9) 28zG
scFv	间隔 结构域	CD28 TM	CD3 ζ	CD28 ICD	GITR ICD	(10) z28G

图 2

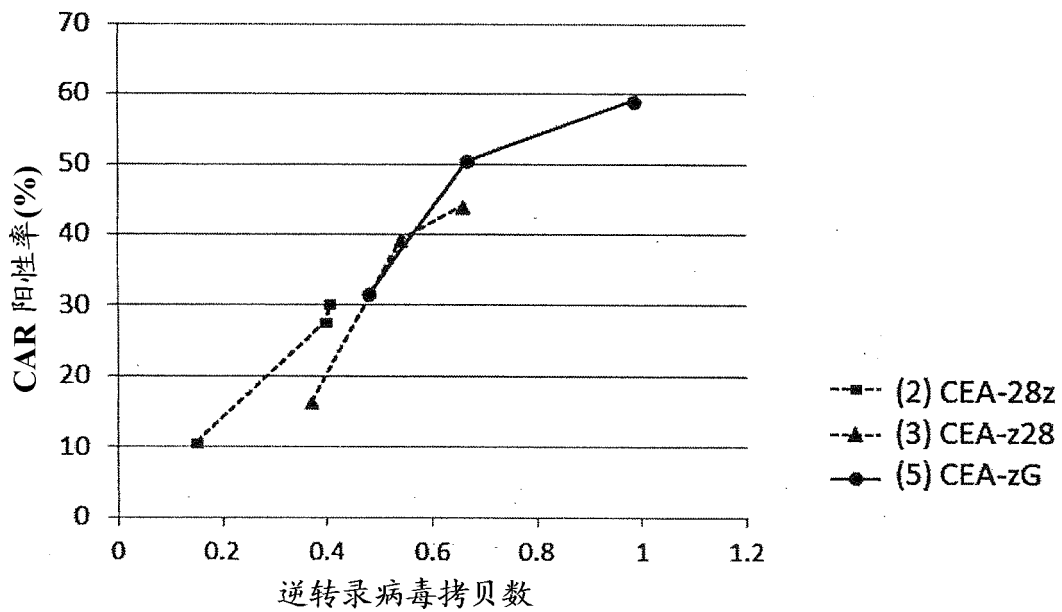


图 3

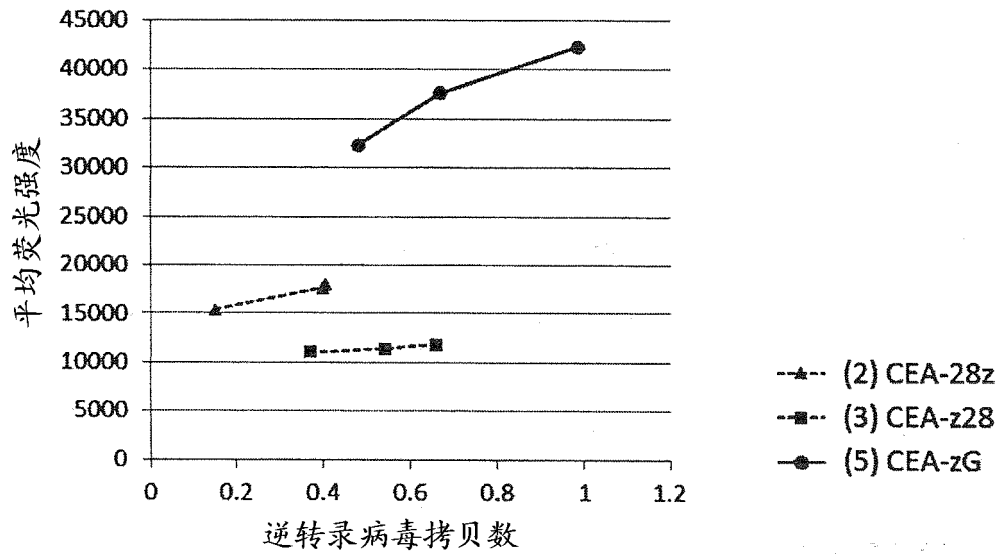


图 4

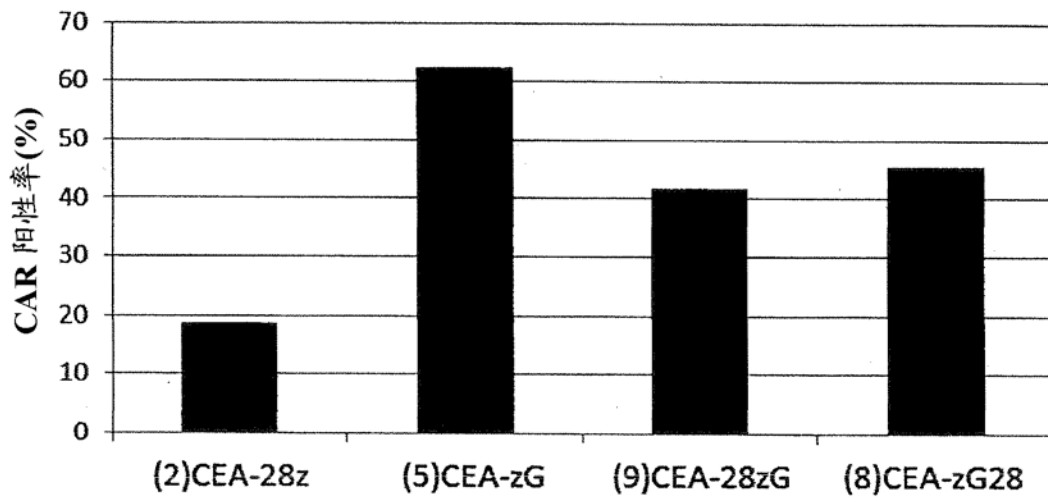


图 5

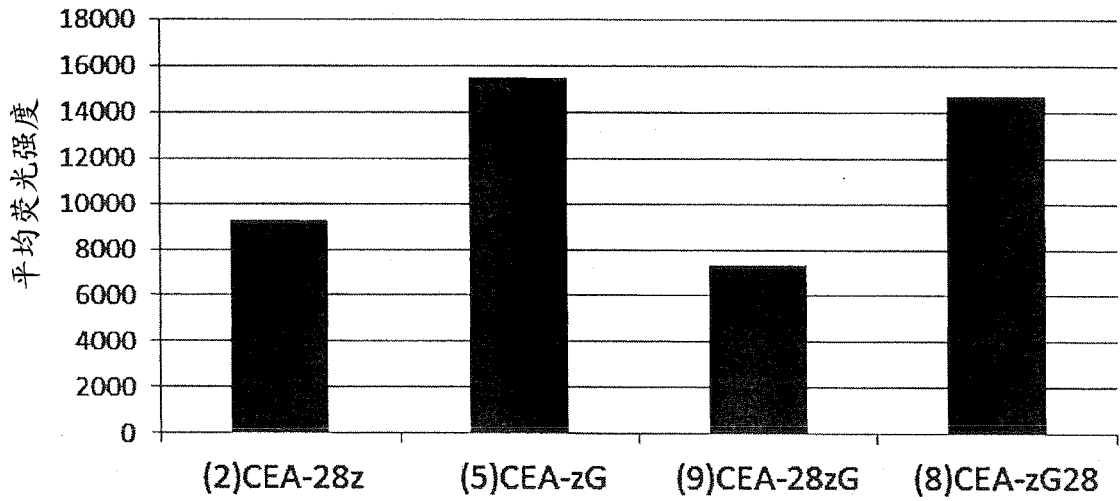


图 6

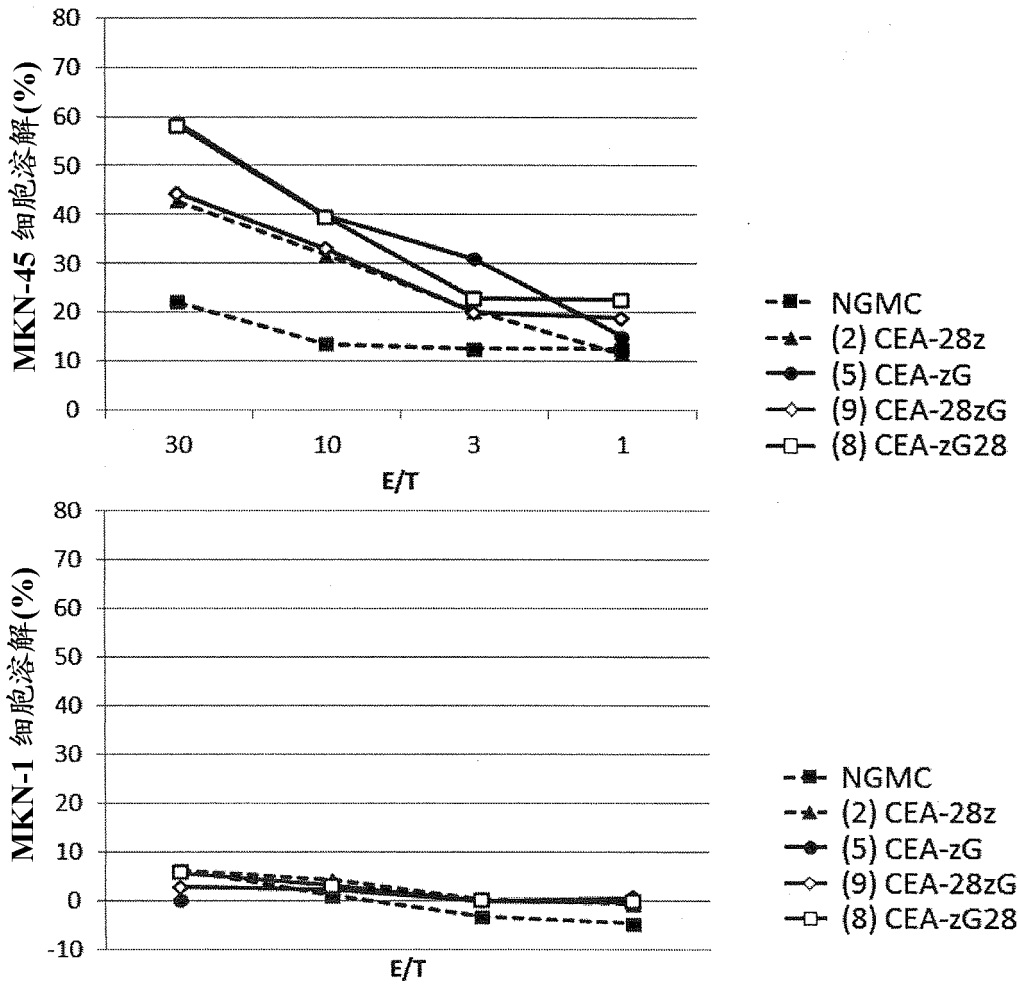


图 7

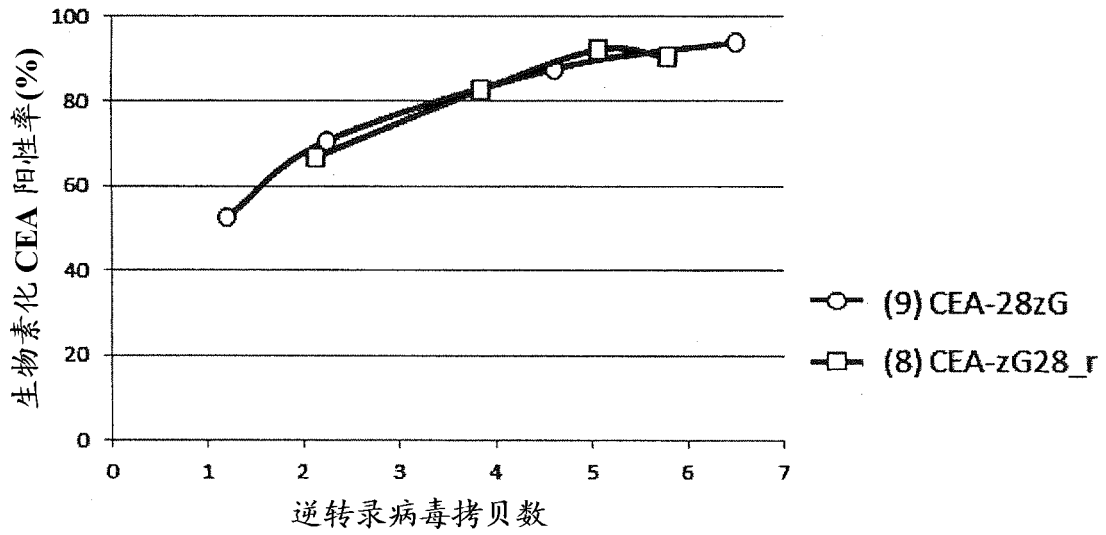


图 8

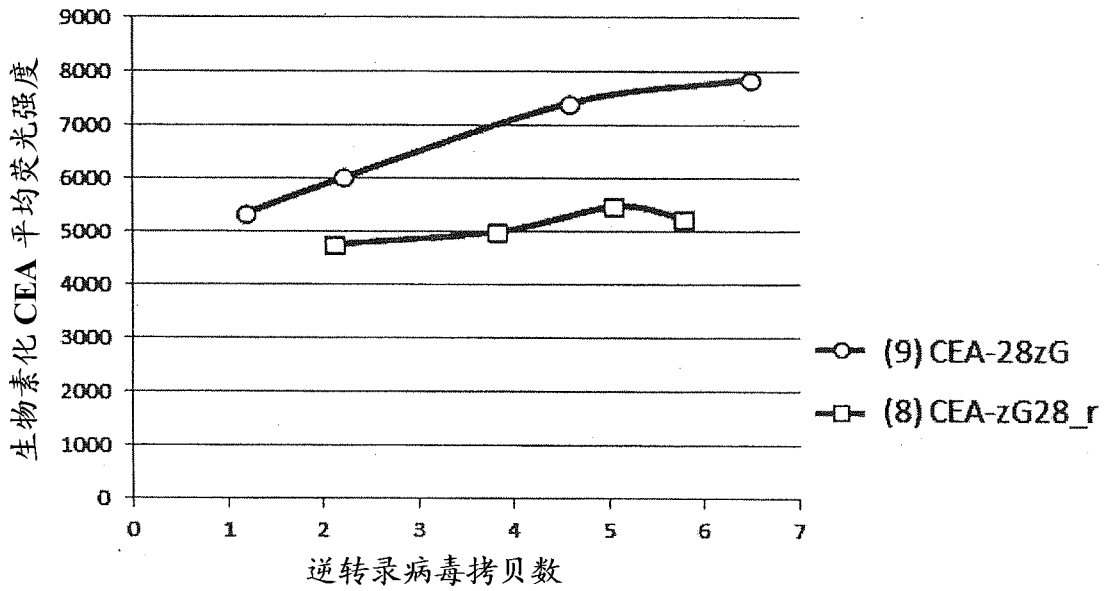


图 9

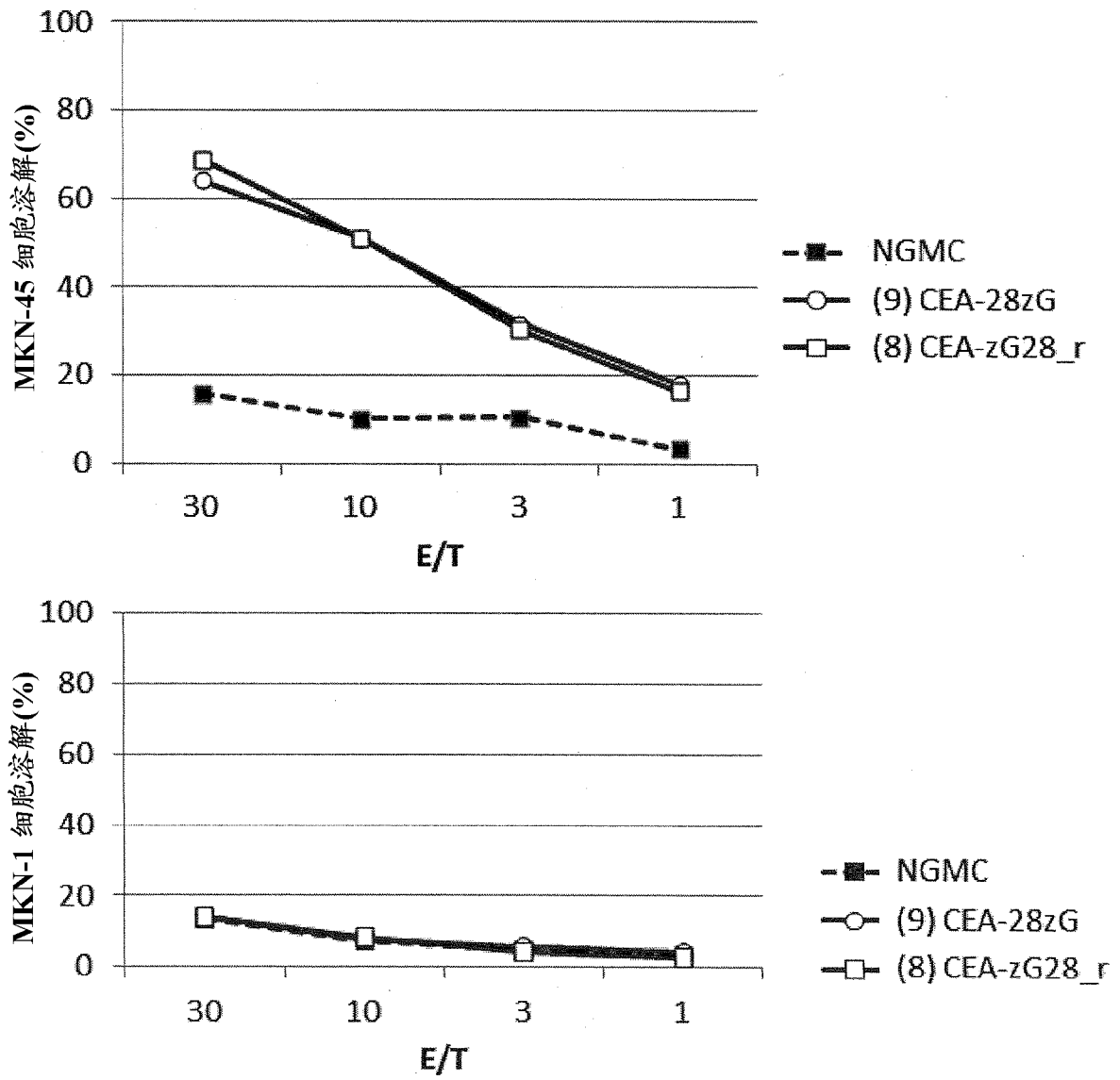


图 10

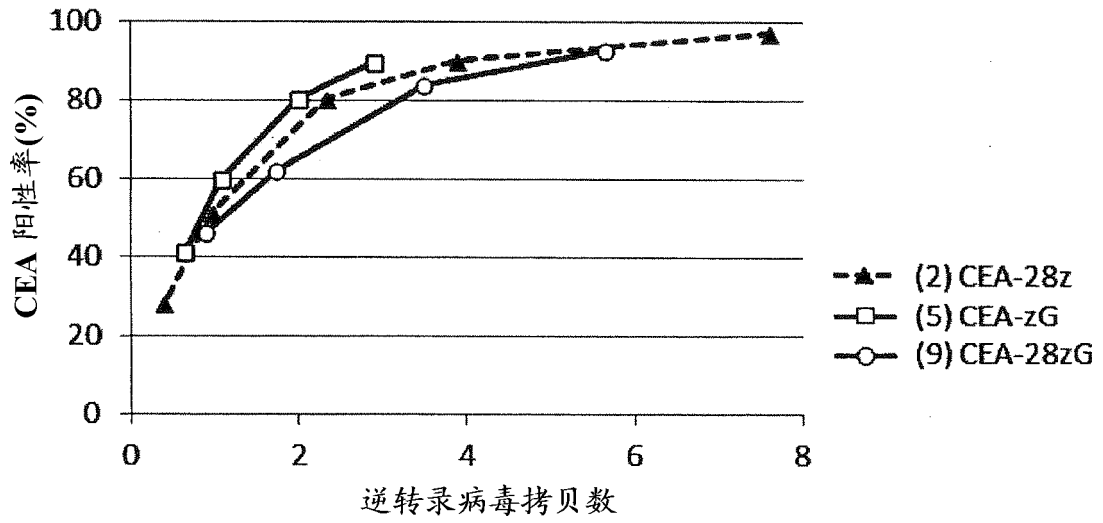


图 11

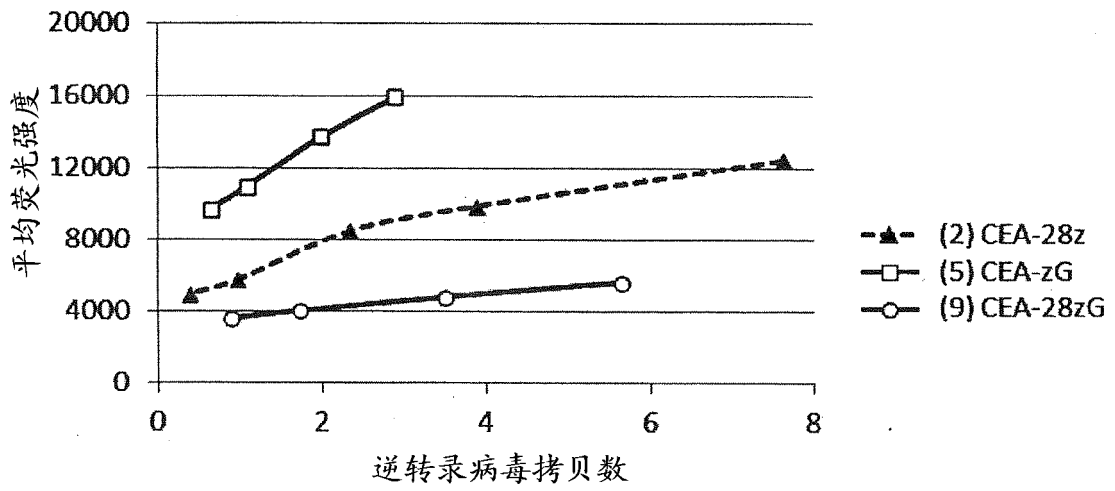


图 12

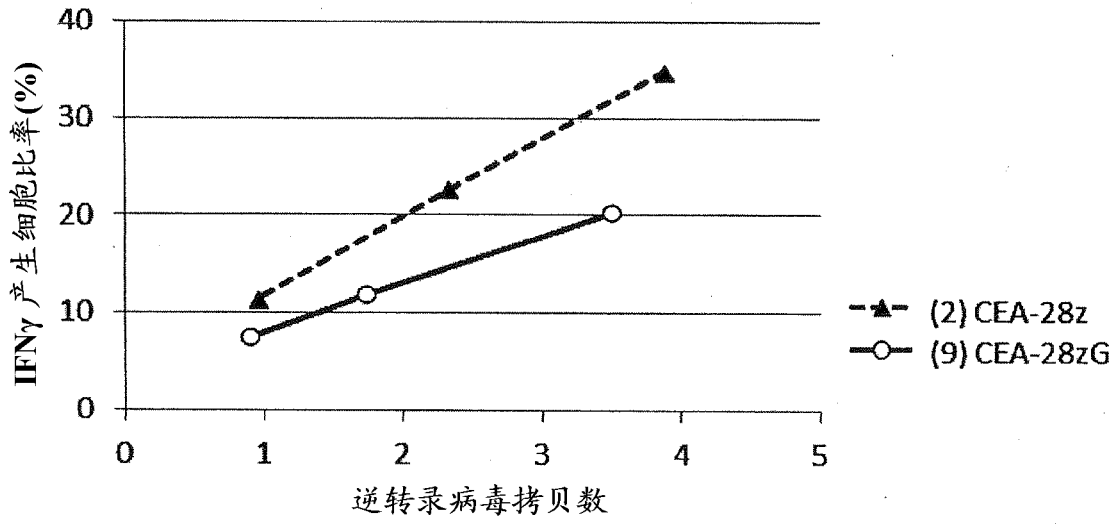


图 13

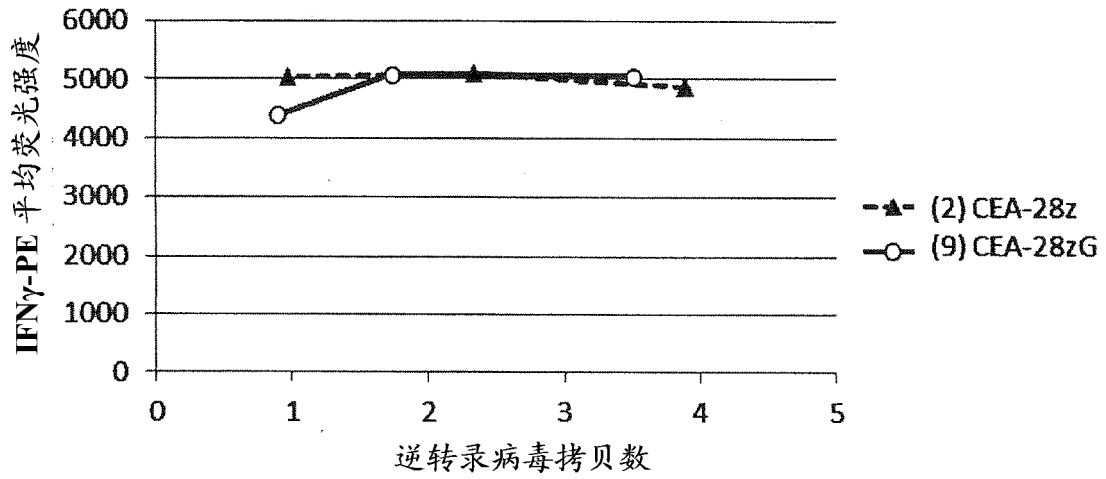


图 14

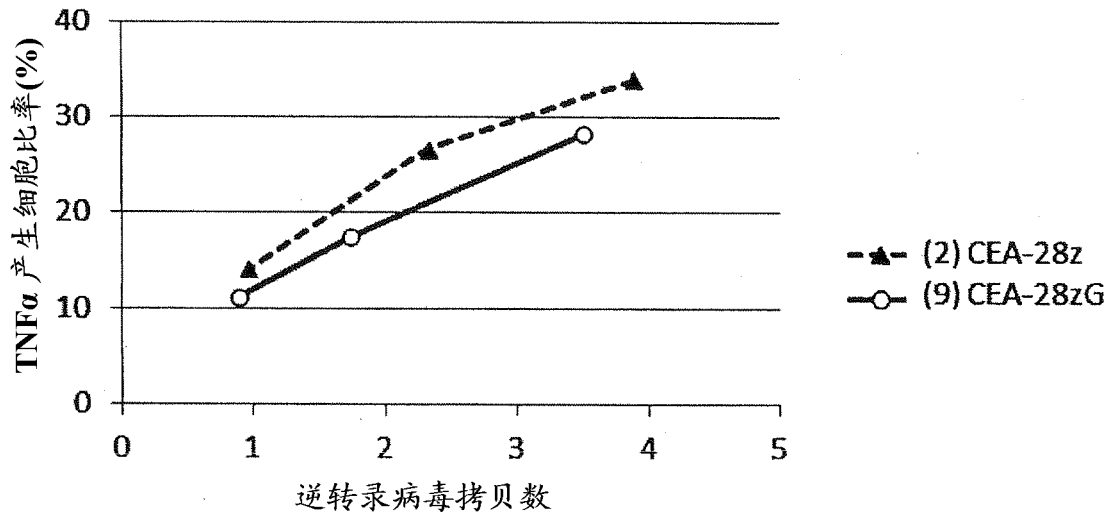


图 15

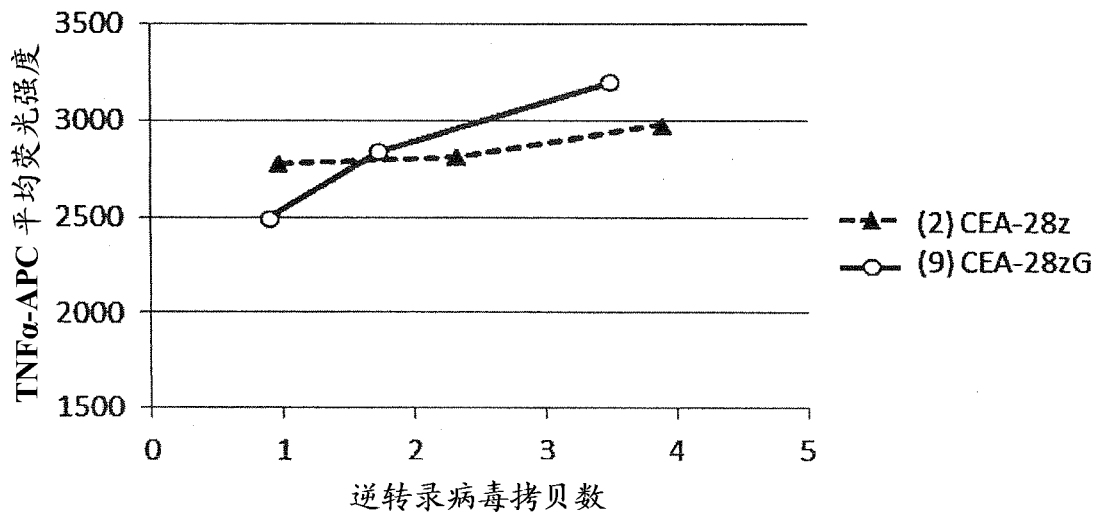


图 16

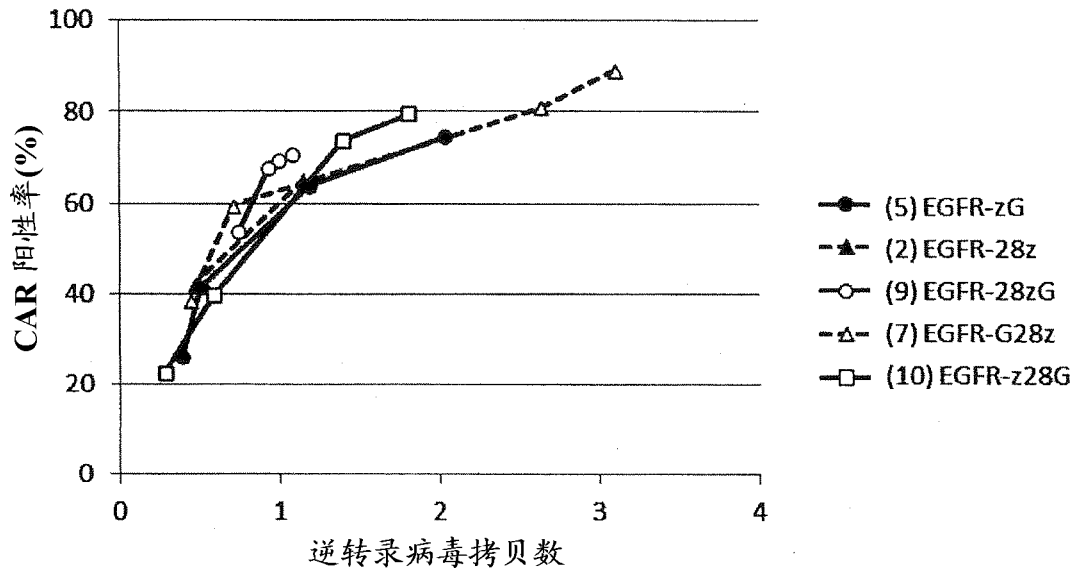


图 17

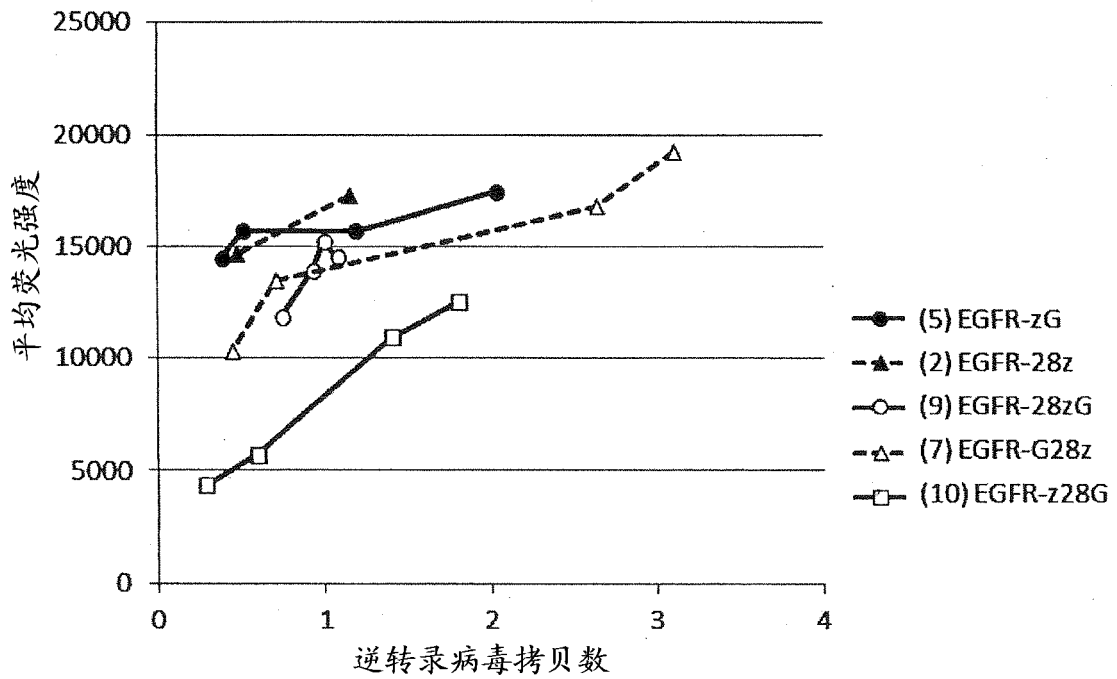


图 18

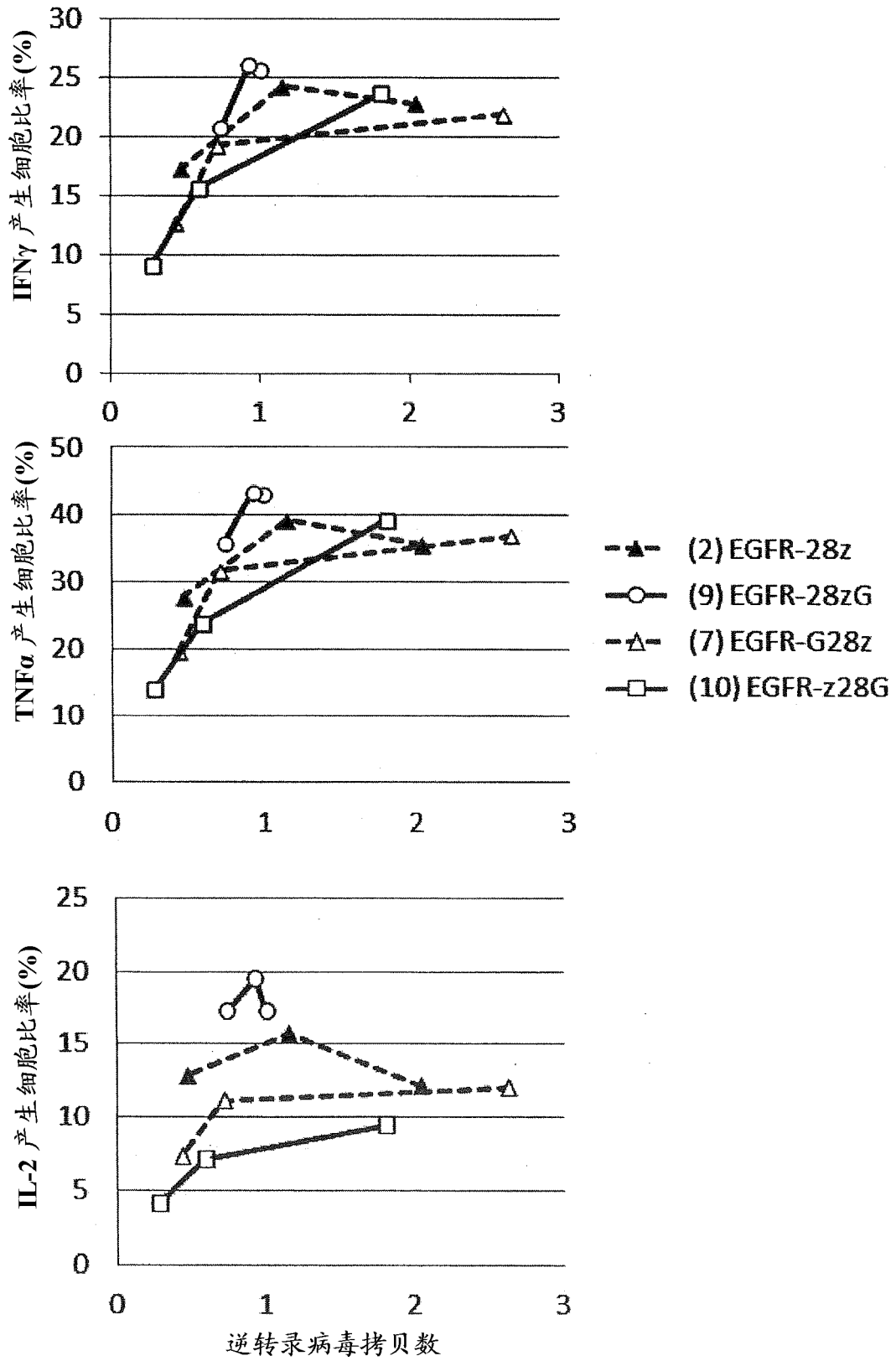


图 19

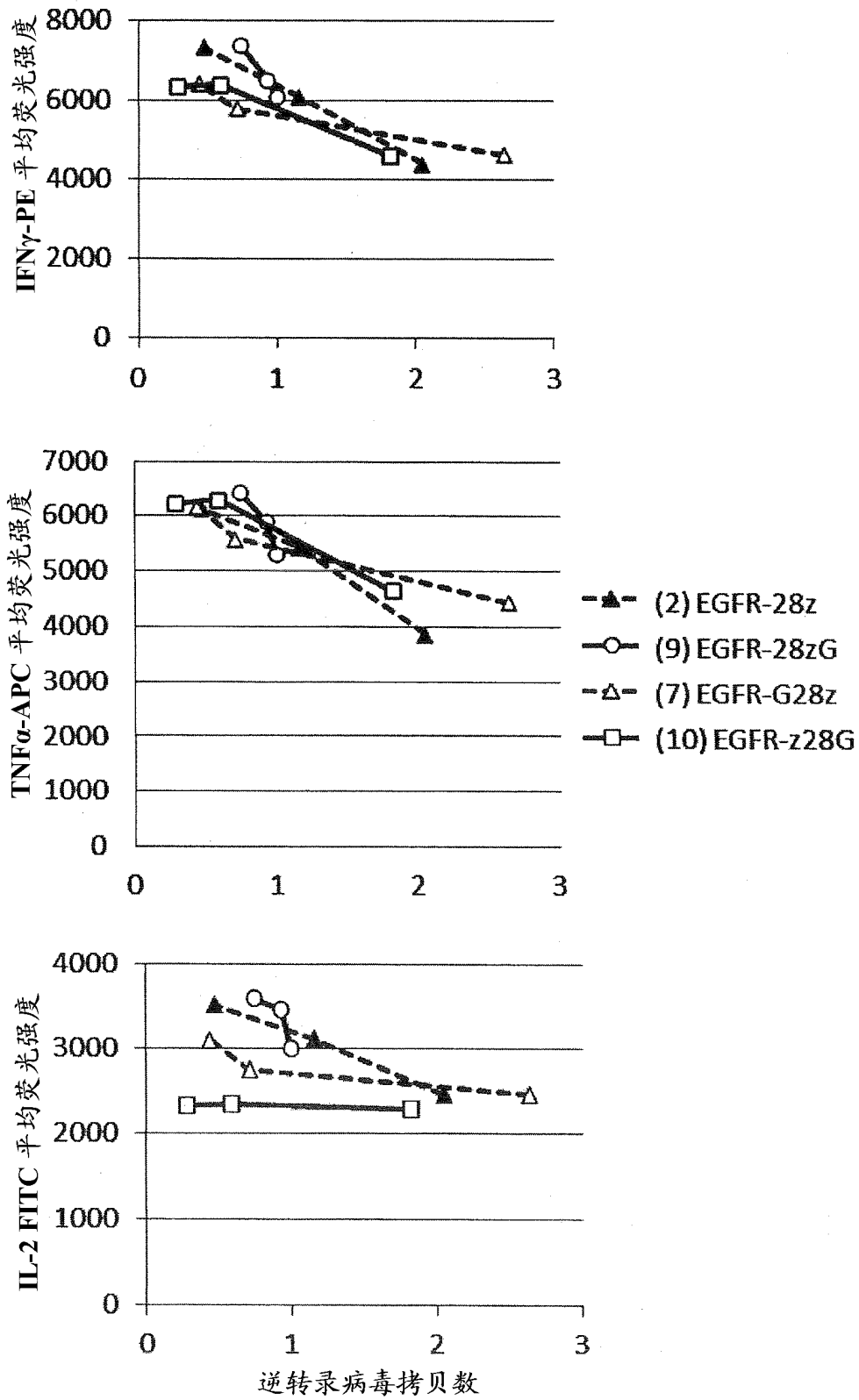


图 20