



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118581046 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202410674061.X

(22) 申请日 2017.11.22

(30) 优先权数据

62/425,398 2016.11.22 US

62/543,696 2017.08.10 US

(62) 分案原申请数据

201780073071.6 2017.11.22

(71) 申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡

(72) 发明人 达里奥·坎帕纳

娜塔莎·维纳尼卡 神谷尚宏

方语甜

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

专利代理师 钟海胜 宋琴芝

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书44页

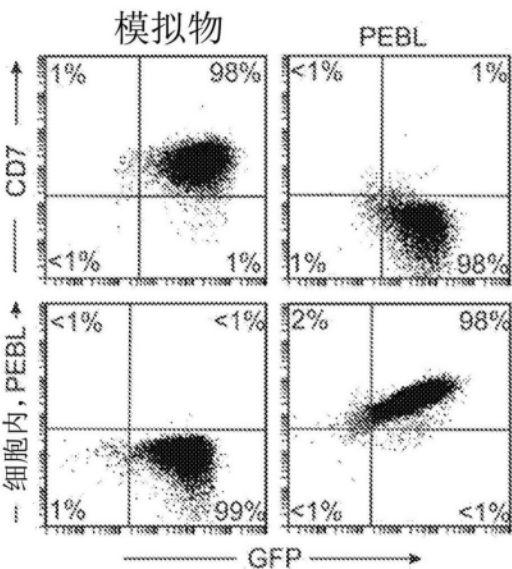
序列表(电子公布) 附图32页

(54) 发明名称

用于T细胞恶性肿瘤免疫疗法的CD7表达阻滞剂和嵌合抗原受体

(57) 摘要

本发明提供了包含抗CD7嵌合活化受体(CAR)和抗CD7蛋白表达阻滞剂的组合物,及在癌症治疗中使用此类组合物的方法。



1. 一种工程化免疫细胞,其包含:
  - i) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和
  - ii) 包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。
2. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段(scFv)。
3. 根据权利要求1或2所述的工程化免疫细胞,其中与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。
6. 根据权利要求1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。
7. 一种工程化免疫细胞,其包含
  - i) 与定位结构域连接的靶结合分子,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和
  - ii) 嵌合抗原受体 (CAR),其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。
8. 一种药物组合物,其包含权利要求1至7中任一项所述的工程化免疫细胞和药学上可接受的载体。
9. 一种产生权利要求1至8中任一项所述的工程化免疫细胞的方法,所述方法包括:
  - i) 向免疫细胞内引入
    - a) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的第一核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和
    - b) 包含编码CAR的核苷酸序列的第二核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体;并且
  - ii) 分离包含与所述定位结构域连接的所述靶结合分子和所述CAR的工程化免疫细胞,从而产生所述工程化免疫细胞。
10. 一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的工程化免疫细胞,从而治疗有需要的所述受试者中的癌症,  
其中所述工程化免疫细胞包含:
  - i) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和
  - ii) 包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信

号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

## 用于T细胞恶性肿瘤免疫疗法的CD7表达阻滞剂和嵌合抗原受体

[0001] 申请是申请日为2017年11月22日、申请号为201780073071.6、发明名称为“用于T细胞恶性肿瘤免疫疗法的CD7表达阻滞剂和嵌合抗原受体”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2017年11月22日、申请号为(PCT/US2017/063048)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年11月22日提交的美国临时申请第62/425,398号,2017年8月10日提交的美国临时申请第62/543,696号的权益,其明确地通过引用整体并入用于所有目的。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,该序列表已经以ASCII格式用电子方式提交并据此通过引用整体并入。2017年11月21日创建的所述ASCII副本命名为119419-5002-WO\_ST25.txt且大小为20,928字节。

### 发明背景

[0007] 嵌合抗原受体(CAR)可以使免疫细胞重新定向以特异性识别并杀伤肿瘤细胞。CAR是人工多分子蛋白,由通过跨膜结构域与信号传导分子连接的抗体单链可变区(scFv)构成。当scFv连接其同源抗原时,触发信号转导,导致表达CAR的细胞毒性T淋巴细胞杀伤肿瘤细胞(Eshhar Z、Waks T等,PNAS USA.90(2):720-724,1993;Geiger TL等,J Immunol.162(10):5931-5939,1999;Brentjens RJ等,Nat Med.9(3):279-286,2003;Cooper LJ等,Blood 101(4):1637-1644,2003;Imai C等,Leukemia.18:676-684,2004)。用表达CAR的自体T淋巴细胞进行的临床试验已经证实患有B细胞难治性白血病和淋巴瘤的患者中有阳性反应(参见例如,Ti11 BG等,Blood 119(17):3940-3950,2012;Maude SL等,N Engl J Med.371(16):1507-1517,2014)。

[0008] 靶向T细胞恶性肿瘤的CAR技术的发展远远落后于其B细胞对应物的发展。需要针对T细胞恶性肿瘤的新型疗法,但迄今为止进展缓慢。具体而言,缺乏有效的免疫治疗选择,并且T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)的治疗依赖于强化化疗和造血干细胞移植。尽管这些方法的发病率和死亡率改善,但结果远不能令人满意。

[0009] 总之,对于患有T细胞恶性肿瘤的患者而言,对于新治疗选择的需要明显未被满足。

### 发明内容

[0010] 一方面,本发明提供了一种工程化免疫细胞,其包含:(i)包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和(ii)包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0011] 在一些实施方案中,与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段

(scFv)。在某些实施方案中,与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。

[0012] 在一些实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在某些实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0013] 在一些实施方案中,所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列:内质网(ER)滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。在一些实施方案中,所述定位结构域包含内质网(ER)滞留序列,其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$ 铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。在一些实施方案中,靶结合分子(例如,scFv)的蛋白酶体定位通过将scFv序列连接至含三联基序的蛋白21(TRIM21)靶向结构域序列并且使编码人TRIM21 E3泛素连接酶蛋白的核酸序列共表达来实现。

[0014] 在一些实施方案中,所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。还有其它实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0017] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0018] 另一方面,本发明提供了一种工程化免疫细胞,其包含(i)与定位结构域连接的靶结合分子,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和(ii)嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0019] 在一些实施方案中,与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。

[0020] 在一些实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在某些实施方案中,所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0021] 在一些实施方案中,所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列:内质网(ER)滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。在一些实施方案中,所述定位结构域包含内质网(ER)滞留序列,其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$ 铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。还有其它实施方案中,所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0025] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0026] 在一些实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含本文所述的工程化免疫细胞和药学上可接受的载体。

[0027] 另一方面,本文提供了产生本文所述的工程化免疫细胞的方法。所述方法可包括:(i)向免疫细胞内引入(a)包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的第一核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和(b)包含编码CAR的核苷酸序列的第二核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体;并且(ii)分离包含与所述定位结构域连接的所述靶结合分子和所述CAR的工程化免疫细胞,从而产生所述工程化免疫细胞。

[0028] 再一方面,本发明提供了治疗有需要的受试者(例如,患者)中的癌症的方法,其包括向所述患者施用治疗量的工程化免疫细胞,从而治疗有需要的受试者中的癌症。在一些实施方案中,工程化免疫细胞包含:(i)包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和(ii)包含编码嵌合抗

原受体 (CAR) 的核苷酸序列的核酸, 其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0029] 在一些实施方案中, 与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中, 与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。

[0030] 在一些实施方案中, 所述第一单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中, 所述第一单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在某些实施方案中, 所述第一单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0031] 在一些实施方案中, 所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列: 内质网(ER) 滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。在一些实施方案中, 所述定位结构域包含内质网(ER) 滞留序列, 其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在其它实施方案中, 所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$ 铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。

[0032] 在一些实施方案中, 所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中, 所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方案中, 所述第二单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。在其它实施方案中, 所述第二单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。还有其它实施方案中, 所述第二单链可变片段(scFv) 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0035] 在一些实施方案中, 所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK) 细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0036] 在一些实施方案中, 通过静脉内输注、动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位或鞘内施用, 将工程化细胞施用给所述受试者(例如, 患者)。

[0037] 在一些实施方案中, 所述癌症为T细胞恶性肿瘤。在一个实施方案中, 所述T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)。

[0038] 本公开提供了工程化免疫细胞及其用于治疗T细胞血液恶性肿瘤的使用方法。本领域的技术人员认识到当CAR-T效应细胞用于治疗T细胞白血病时, 可发生CAR T细胞自我

杀伤或互相残杀以及对正常T细胞的杀伤。因此,需要最小化或消除T细胞兄弟姐妹的工程化免疫细胞和治疗方法。

[0039] 本文所述的工程化免疫细胞和治疗方法利用抗互相残杀的新型CAR-T细胞,如工程化抗CD7 PEBL和抗CD7 CAR-T细胞。工程化免疫细胞可在患有T细胞恶性肿瘤(包括复发T细胞恶性肿瘤)的患者中引发有效且持久的治疗效果。此类细胞可导致有效靶向和杀伤恶性T细胞,无显著的T细胞互相残杀。

## 附图说明

[0040] 图1A-图1D说明T-ALL中的CD7表达。示出了在诊断、复发时和化疗(MRD)期间表达CD7的ALL细胞的百分比;每个阶段研究的骨髓样品的数量(图1A)。来自相同样品的T-ALL细胞和剩余正常T细胞中的CD7平均荧光强度(MFI) ( $n=19$ ;通过配对t检验,  $P<0.0001$ ) (图1B)。在诊断或复发时("D/R")的T-ALL细胞中以及在经MRD的随访骨髓样品中的CD7 MFI ( $n=18$ ) (图1C)。流式细胞术等高线图说明了一名代表患者在诊断、MRD和复发时T-ALL细胞(CD3阴性)和正常T细胞(CD3阳性)中的CD7表达。

[0041] 图2A-图2E示出了抗CD7 CAR的设计、表达和信号传导。抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ 构建体的示意图(图2A)。用单独的GFP("模拟物")或GFP加上抗CD7 CAR转导的Jurkat细胞的流式细胞术分析。点阵图说明在用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体和链霉亲和素-APC (Jackson ImmunoResearch) 染色后的GFP荧光和CAR表达(图2B)。Jurkat细胞中的CAR表达的蛋白质印迹(Western blot)分析(图2C)。经模拟物和CAR转导的Jurkat细胞的细胞裂解物在还原或非还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离。用小鼠抗人CD3 $\zeta$ 抗体(8D3; BD Biosciences)和与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG(R&D Systems)探测印迹膜。用Clarity Western ECL底物(Bio-Rad)显示抗体结合。抗CD7 CAR诱导活化标志物在连接后表达。条柱示出了在有或无CD7+MOLT-4细胞的情况下24小时后,经CAR和模拟物转导的Jurkat细胞中的CD25和CD69 MFI的平均值( $\pm$ SD)。示出了通过t检验的显著差异的p值( $*=0.016$ ;  $***<0.001$ ) (图2D)。图2E提供了图2D中所示实验的代表性流式细胞术直方图。

[0042] 图3A-图3I说明人外周血T细胞中抗CD7 CAR的表达导致互相残杀,通过CD7下调而阻止互相残杀。在有或无抗CD7 CAR mRNA的情况下电穿孔24小时后恢复的活T细胞的百分比( $n=7$ ) (图3A)。通过流式细胞术对活细胞进行计数。与来自于用单独的GFP("模拟物")转导的相同供体的细胞相比,用逆转录病毒载体进行CAR转导24小时后恢复的活T细胞的百分比( $n=10$ ) (图3B)。经CAR和模拟物转导,在转导后的一周内恢复的活T细胞的百分比(图3C)。示出了图3B中所示10个实验中的5个实验的随访结果。在有或无抗CD7 CAR mRNA的情况下电穿孔后T细胞内的CD107a百分比(图3D)。示出了三次重复测量的平均值( $\pm$ SD)。抗CD7蛋白表达阻滞剂(PEBL)构建体的示意图(图3E)。代表性流式细胞术直方图说明了在3种抗CD7 PEBL逆转录病毒转导或单独的GFP模拟物转导("模拟物")后的T淋巴细胞中的CD7表达(图3F)。用抗CD7-PE(M-T701; BD Biosciences)对T细胞染色。用抗CD7 PEBL-1逆转录病毒转导或模拟物转导的T细胞中的CD7百分比( $n=5$ ) (图3G)。流式细胞术点阵图说明了通过PEBL转导对T细胞中的CD7表达的下调,连同在有或无CAR mRNA的情况下电穿孔12小时后抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的表达。用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体和链霉亲和素-APC (Jackson ImmunoResearch) 对细胞进行染色。与用抗CD7 CAR mRNA电穿孔但用不含CD7



PEBL的载体转导的细胞相比,用抗CD7 PEBL转导,抗CD7 CAR mRNA电穿孔24小时后恢复的活T细胞的百分比( $n=6$ ) (图3I)。通过流式细胞术测量活细胞的数量。\*\*, $P<0.01$ ;\*\*\*, $P<0.001$ 。

[0043] 图4A-图4F显示,CD7受PEBL下调并未改变T细胞表型、扩增和功能性。用抗CD7 PEBL或单独的GFP(“模拟物”)进行逆转录病毒转导7-14天后CD4和CD8细胞的百分比(图4A)。每个符号对应不同的T细胞供体。用200IU/mL IL-2维持14天的经PEBL和模拟物转导的T细胞(来自3个供体)的生长速率(图4B)。符号表示三次重复测量的平均值( $\pm$ SD)。经PEBL和模拟物转导的T细胞用抗CD 19-41BB-CD3 $\zeta$ CAR mRNA或不用mRNA进行电穿孔(图4C)。流式细胞术点阵图说明了电穿孔12小时后的GFP和CAR表达。用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体和链霉亲和素-APC(Jackson ImmunoResearch)检测CAR。在有或无抗CD19 CAR mRNA的情况下电穿孔的经PEBL和模拟物转导的T细胞针对CD19+ALL细胞(OP-1)的细胞毒性(图4D)。条柱示出了在1:1E:T下4小时细胞毒性的平均值( $\pm$ SD)。图4E示出了来自于与图4D中描述的那些相同的实验的T细胞中的CD107a表达。图4F示出了在有或无抗CD19 CAR mRNA的情况下电穿孔,并且与OP-1在E:T 1:1下共同培养6小时的经PEBL或模拟物转导的T细胞中的IFN  $\gamma$  的产生。条柱表示三次重复实验的平均值( $\pm$ SD)。\*\*\*, $P<0.001$ ;\*\*\*\*, $P<0.0001$ 。

[0044] 图5A-图5F显示CD7受PEBL下调的T细胞在CD7 CAR表达之后获得针对CD7+白血病细胞的有力细胞毒性。在有或无抗CD7 CAR mRNA的情况下电穿孔的经抗CD7 PEBL转导的T细胞针对CD7+细胞系的细胞毒性(图5A)。示出了在1:1E:T下4小时测定的数据。符号表示各自来自MOLT-4、CCRF-CEM和Jurkat的4个供体和Loucy和KG1a的5个供体的T细胞进行的3次测量的平均值(对于每次比较而言 $P<0.001$ )。在有或无抗CD7 CAR mRNA的情况下电穿孔的经抗CD7 PEBL转导的T细胞针对来自T-ALL患者的原代白血病细胞的细胞毒性(图5B)。示出了在指定E:T下4小时测定的数据。符号是指3次测量的平均值( $\pm$ SD)。图5C示出了用抗CD7 PEBL或单独的GFP(“模拟物”)转导的T细胞在用抗CD7 CAR mRNA电穿孔后针对5个CD7+细胞系的总体特异性细胞毒性。在4小时测定中,在1:1E:T下测试来自3个供体的T细胞。每个符号表示减去用在无mRNA的情况下电穿孔的相同T细胞获得的百分比细胞毒性后,针对CD7+细胞系的特异性百分比细胞毒性。水平柱表示每个组的中值。来自3个供体的经抗CD7 PEBL或模拟物转导的T细胞在有或无抗CD7 CAR mRNA的情况下电穿孔(图5D)。在4小时测定中,在1:1E:T下测试针对MOLT-4的细胞毒性。示出了抗CD107a-PE(H4A3;BD Biosciences)的平均荧光强度(MFI)。条柱表示三次重复实验的平均值( $\pm$ SD)。经抗CD7 PEBL转导的T细胞用抗CD7 CAR逆转录病毒转导或模拟物转导,并针对来自T-ALL患者的原代白血病细胞进行测试(图5E)。每个符号表示三次重复实验的平均值( $\pm$ SD)。经模拟物或PEBL转导的T细胞,依次在有或无抗CD7 CAR的情况下转导,单独地或在每周添加的经Streck处理的MOLT-4细胞和120IU/mL IL-2的存在下培养(图5F)。符号表示三次重复培养中相对于输入细胞数量的细胞恢复平均( $\pm$ SD)百分比。\*\*, $P<0.01$ ,\*\*\*, $P<0.001$ ;\*\*\*\*, $P<0.0001$ 。

[0045] 图6A-图6D显示经PEBL转导的表达CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的T细胞在异种移植物中发挥抗肿瘤活性。NOD-SCID-IL2RG裸小鼠静脉(i.v.)输注 $1 \times 10^6$ 个经荧光素酶标记的CCRF-CEM细胞。在分别向3只和5只小鼠输注白血病细胞后第7天(图6A)或第3天和第7天(图6B),静脉施用 $2 \times 10^7$ 个PEBL-CAR T细胞。剩余小鼠接受经模拟物转导的T细胞,或接受RPMI-1640代替细胞(“对照”)。所有小鼠每两天经腹腔内(i.p.)接受20,000IU IL-2。示出了D-萤

光素腹腔内注射后白血病细胞生长的体内成像。示出了图6B中第3天小鼠的腹侧图像,具有增强的敏感性证明所有小鼠中的CCRF-CEM移植。整套的发光图像在图14中。图6C示出了图6A和图6B中所示所有小鼠中的白血病细胞生长,表示为每秒钟的光子数。每个符号对应于每只小鼠中的生物发光测量,将其归一化为CAR-T细胞输注之前所有小鼠中腹侧加上背侧信号的平均值。Kaplan-Meier曲线示出了不同组中小鼠(每组8只)的总体存活率(图6D)。当总生物发光信号达到每秒 $1 \times 10^{10}$ 个光子时,对小鼠施安乐死。通过对数秩检验(log-rank test)计算P值。

[0046] 图7A-图7E示出了患者来源的异种移植物(PDX)模型中PEBL-CAR-T细胞针对ETP-ALL的活性。在10只NOD-SCID-IL2RG裸小鼠中按每只小鼠 $2 \times 10^6$ 个细胞,静脉(i.v.)输注先前在NOD-SCID-IL2RG裸小鼠中增殖的原代ETP-ALL细胞(图7A)。留下五只小鼠(“对照”)未处理。剩余5只小鼠在指定时间点(灰色箭头)接受PEBL-CAR T细胞的单次静脉输注(在PEBL-CAR#1中 $2 \times 10^7$ 个,在剩余4只小鼠中 $2 \times 10^6$ 个),以及每两天经腹腔内接受20,000 IU IL-2;也向5只对照小鼠中的2只施用IL-2。黑色符号(左侧y轴)指示外周血中计数的ETP-ALL细胞数/mL。灰色符号(右侧y轴)示出了PEBL-CAR T细胞的数量。当血液单核细胞中的ETP-ALL细胞百分比达到 $\geq 80\%$ 时,对小鼠施安乐死。5只未处理的小鼠的各种器官中的ETP-ALL百分比(分母,人加上小鼠CD45+细胞总数)(图7B)。T细胞输注7天后经处理(PEBL-CAR#1)和未处理的ETP-ALL的血液涂片;PEBL-CAR T细胞后血液中的破碎细胞突出(图7C)。流式细胞术点阵图显示在患有ETP-ALL的未处理的对照小鼠的组织中存在CD7+CD3-ETP-ALL细胞并且在用PEBL-CAR-T细胞处理的PEBL-CAR#1小鼠中存在CD7-CD3+PEBL-CAR T细胞(图7D)。在经处理的小鼠中未检测到ETP-ALL( $<0.01\%$ )。所示事件归一化为对照小鼠中所示对应点所获取的事件。经处理的(PEBL-CAR#1)和未处理的小鼠的脾脏(图7E)。

[0047] 图8A-图8C示出了抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的特异性和功能。用从经抗CD7 scFv转导或经仅含GFP的载体(“对照”)转导的Jurkat细胞收集的上清液孵育OP-1(CD7-)和MOLT-4(CD7+)(图8A)。洗涤后,用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体,接着用链霉亲和素-APC(Jackson ImmunoResearch)孵育细胞。流式细胞术直方图说明抗CD7 scFv与MOLT-4而不是OP-1结合。用抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR、抗CD19-41BB-CD3 $\zeta$ CAR或含单独的GFP的载体转导Jurkat细胞(图8B)。将这些细胞与CD7+MOLT-4或CCRF-CEM细胞,或与CD7-细胞OP-1一起以1:1E:T共同培养。靶细胞用钙黄绿素红-橙色AM(Invitrogen)标记。孵育30分钟后,通过流式细胞术测量细胞双联体的百分比。条柱说明了三次重复测量的平均值( $\pm$ SD)。图8C显示通过用可溶性形式的抗CD7 scFv预先孵育靶细胞抑制了CAR介导的细胞聚集。\*\*\*P<0.001。

[0048] 图9A和图9B示出了人外周血T淋巴细胞中抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的表达。图9A提供了用Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28(ThermoFisher Scientific)和IL-2活化7天,并用抗CD7 CAR转导的T淋巴细胞的代表性流式细胞术点阵图。流式细胞术点阵图说明了GFP荧光和CAR表达,后者通过用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体,接着用链霉亲和素-APC(Jackson ImmunoResearch)染色来显示。图9B示出了CAR表达的蛋白质印迹分析。经模拟物和CAR转导的T细胞的细胞裂解物在还原或非还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离。用小鼠抗人CD3 $\zeta$ 抗体(8D3;BD Biosciences),接着用与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG(R&D Systems)探测印迹膜。用Clarity Western ECL底物(Bio-Rad)显示抗体结合。

[0049] 图10A和图10B说明CD7表达受抗CD7 PEBL下调。流式细胞术点阵图说明了GFP表达(x轴)、CD7表达(y轴,顶行)和细胞内抗CD7 PEBL-1表达(y轴,底行)(图10A)。T淋巴细胞用抗CD7 PEBL-1或含单独的GFP的载体(“模拟物”)进行逆转录病毒转导。将T细胞用与藻红蛋白偶联的抗CD7抗体(M-T701;BD Biosciences)染色。用PE偶联的抗Myc抗体(9B11;Cell Signaling Technology)测试PEBL-1的细胞内表达,所述抗体与并入ER结合基序中的序列EQKLISEEDL(SEQ ID NO:40)结合。抗体标记之前,用8E试剂(我们实验室开发的一种透化试剂)使细胞透化。图10B示出了CD7 mRNA表达的RT-PCR分析。源自从用PEBL1-3、单独的GFP(“模拟物”)转导或未转导(“WT”)的Jurkat细胞提取的总mRNA的cDNA用作模板。用以下引物扩增CD7 cDNA(723 bp):正向,ATGGCCGGGCCTCCG(SEQ ID NO:38);反向,TCCTGGTACTGGTTGGG(SEQ ID NO:39)。用SYBR安全凝胶染料(ThermoFisher)在1%琼脂糖凝胶上进行电泳。也未示出模板对照。平行扩增甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的87bp(第676-762个核苷酸)区域作为对照。

[0050] 图11A和图11B显示抗CD7 CAR信号在通过抗CD7 PEBL敲低CD7表达的T细胞中引发较高细胞因子分泌。将来自3个供体的T淋巴细胞用抗CD7PEBL或单独的GFP(“模拟物”)转导,用抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ mRNA或不用mRNA进行电穿孔。测量与MOLT4一起共同培养6小时后T细胞中的细胞内IFN  $\gamma$  (图11A)和TNF $\alpha$  (图11B)表达。条柱表示三次重复MFI测量的平均值( $\pm$ SD)。\*\*, $P<0.01$ ;\*\*\*, $P<0.001$ ;\*\*\*\*, $P<0.0001$ 。

[0051] 图12显示表达抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的CD7阴性T细胞针对CD7+细胞系发挥抗肿瘤细胞毒性。示出了用经CD7 PEBL转导,然后经CD7-41BB-CD3 $\zeta$ 或仅GFP(“模拟物”)转导的T细胞进行的4-小时细胞毒性测定的结果。符号表示在指定E:T比率下三次重复实验的平均值( $\pm$ SD)。对于所有比较而言, $P<0.001$ 。

[0052] 图13A-图13E提供了抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ 和抗CD19-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的功能比较。图13A示出了先前用抗CD7 PEBL转导的外周血T细胞中抗CD19和抗CD7 CAR(在含mCherry的载体中)的表达。流式细胞术点阵图说明了T细胞的mCherry表达和用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体,接着用与别藻蓝蛋白偶联的链霉亲和素(Jackson ImmunoResearch)染色。还示出了用含有单独的mCherry的载体(“模拟物”)转导的T细胞的结果。用含有CD19和GFP的载体转导的CCRF-CEM和Jurkat细胞中CD19的表达(图13B)。用抗CD19APC(Miltenyi Biotech)检测CD19。靶向不同E:T比率的CD19+CCRF-CEM或CD19+Jurkat细胞与抗CD19或抗CD7 PEBL-CAR-T细胞的4-小时细胞毒性测定(图13C)。符号指示三次重复测量的平均值( $\pm$ SD)。对于用CAR与模拟物转导的T细胞在所有E:T比率下的数据而言 $P<0.001$ 。正如用IncuCyte Zoom系统(Essen Bioscience)通过肝细胞图像分析所测量的,抗CD19或抗CD7PEBL-CAR-T细胞在不同E:T比率下的长期细胞毒性(图13D)。符号指示在含有CAR-T细胞、经模拟物转导的T细胞或不含细胞的孔中CD19+CCRF-CEM(上部)或CD19+Jurkat细胞(下部)的3次测量的平均值( $\pm$ SD)。以4-小时间隔进行测量。与和未与CD19+Jurkat细胞共同培养的抗CD19和抗CD7PEBL-CAR-T细胞的扩增能力(图13E)。将抗CD7 PEBL转导的T细胞,依次用抗CD19或抗CD7 CAR或单独的mCherry转导,单独地或在每周添加的经辐照的CD19+Jurkat细胞和120IU/mL IL-2的存在下培养。符号指示三次重复培养中相对于输入细胞数量的细胞恢复平均( $\pm$ SD)百分比。

[0053] 图14A-图14C说明经PEBL转导的表达抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的T细胞在小鼠模型中

发挥抗肿瘤活性。NOD-SCID-IL2RG裸小鼠静脉(i.v.)输注 $1 \times 10^6$ 个经荧光素酶标记的CCRF-CEM细胞。在分别向3只和5只小鼠输注白血病细胞后第7天(图14A)或第3天和第7天(图14B),静脉施用 $2 \times 10^7$ 个PEBL-CAR T细胞。剩余小鼠接受经模拟物转导的T细胞,或接受RPMI-1640代替细胞(“对照”)。所有小鼠每两天经腹腔内(i.p.)接受20,000IU IL-2一次。在D-荧光素腹腔内注射后进行白血病细胞生长的体内成像。示出了图14B中第3天小鼠的腹侧图像,具有增强的敏感性证明所有小鼠中的白血病细胞移植。白血病细胞生长表示为每秒钟的光子数,将其归一化为CAR-T细胞输注之前所有小鼠中腹侧加上背侧信号的平均值(图14C)。每个符号对应于每只小鼠中的生物发光测量。

[0054] 图15A和15B说明经PEBL转导的表达抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的T细胞在小鼠模型中发挥抗肿瘤活性并且针对在复发时收集的细胞保持活性。图15A示出了在来自于静脉输注经荧光素酶标记的CCRF-CEM细胞,然后用经PEBL-CAR转导的T细胞、经模拟物转导的T细胞或如图6C所述的RPMI-1640代替细胞(“对照”)静脉处理的NOD-SCID-IL2RG裸小鼠的血液中的白血细胞中CCRF-CEM细胞的百分比。对于“对照”和“模拟物”而言,从白血病细胞输注17-23天后达到 $10^{10}$ 个光子/秒的生物发光阈值的安乐死老鼠获得血液。对于PEBL-CAR小鼠,在CCRF-CEM输注后第24天经由脸颊穿刺获得血液。培养复发时从用PEBL-CAR处理的小鼠的脾脏和肝脏收集的CCRF-CEM细胞2天(图15B)。然后在4-小时细胞毒性测定中以E:T 1:1,使用最初用于输注的经PEBL-CAR或模拟物转导的T细胞,将培养的细胞用作靶标。还用相同批次的用于产生异种植物的表达荧光素酶的CCRF-CEM细胞进行比较。添加BrightGlo荧光素酶测定系统(Promega)后,由生物发光信号的板测量值确定百分比细胞毒性。条柱示出了三次重复测量的平均值( $\pm$ SD);每个白色柱和灰色柱对应于来自一只小鼠的细胞。

[0055] 图16提供了在诊断时和在NOD-SCID-IL2RG裸小鼠中增殖后ETP-ALL的免疫表型特征。流式细胞术等高线图示出了在这项研究中用于开发PDX模型的ETP-ALL的免疫表型诊断骨髓样品以及从图7所示对照小鼠之一的脾脏恢复的ETP-ALL细胞的免疫表型诊断骨髓样品。使用以下抗体:CD7-PE、CD45-APC-H7、CD34-PerCP、CD8-BV510、CD5-PE-Cy7、CD3-PerCP(用于细胞质染色)、CD3-V450(用于表面染色),全部来自于BD Biosciences;CD33-BV421(Biolegend);CD1a-PE(Beckman Coulter)。基于用与相同荧光物偶联的同种型匹配的非活性抗体进行的染色来绘制象限。

[0056] 图17提供了本发明的示例性实施方案的图解。

## 具体实施方式

[0057] 下面是对本发明的示例实施方案的描述。

[0058] 本发明部分基于嵌合抗原受体(CAR)的设计,该嵌合抗原受体针对CD7,一种40kDa的I型跨膜糖蛋白,其是T细胞恶性肿瘤的主要标志物,并且在所有T细胞ALL情况,包括早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)中高度表达。如本文所述,抗CD7 CAR诱导T细胞对T细胞恶性肿瘤发挥特异性细胞毒性。此外,当抗CD7 CAR与效应T细胞上CD7表达的下调组合使用时,显示T细胞的细胞毒性显著增加。如本文所证明的,CD7的下调(例如,消除、减少和/或重定位)阻止了相应的抗CD7 CAR发挥的互相残杀效应,允许与保留靶抗原(例如,CD7)的细胞相比,在CAR表达后更高的T细胞恢复,以及对T白血病/淋巴瘤细胞更有效的细胞毒性。

[0059] 因此,一方面,本发明涉及一种工程化免疫细胞,其包含:包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和与分化群7(CD7)特异性结合的抗体。本发明的CAR在本文中有时称为“抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ ”。图17中描绘了示例性实施方案。

[0060] 如本文所用,“工程化”免疫细胞包括与天然存在的免疫细胞相比,已经基因修饰的免疫细胞。例如,根据本方法产生的工程化T细胞携带包含在其所来源的T细胞中并非天然存在的核苷酸序列的核酸。

[0061] 在某些实施方案中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。在某些实施方案中,工程化免疫细胞是工程化T细胞。如本文所用,术语“核酸”是指包含多个核苷酸单体(例如,核糖核苷酸单体或脱氧核糖核苷酸单体)的聚合物。“核酸”包括,例如,基因组DNA、cDNA、RNA和DNA-RNA杂交分子。核酸分子可以是天然存在的、重组的或合成的。另外,核酸分子可为单链、双链或三链。在某些实施方案中,核酸分子可以经修饰。在双链聚合物的情况下,“核酸”可以指分子的任一条或两条链。

[0062] 关于核酸,术语“核苷酸序列”是指通过共价键连接的一系列连续核苷酸,例如磷连键(例如磷酸二酯、烷基和芳基磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸三酯键),和/或非磷连键(例如,肽和/或氨基磺酸酯键)。在某些实施方案中,编码例如与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列是异源序列(例如,不同物种或细胞类型来源的基因)。

[0063] 术语“核苷酸”和“核苷酸单体”是指天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体,及其非天然存在的衍生物和类似物。因此,核苷酸可包括,例如,包含天然存在的碱基(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、肌苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷或脱氧胞苷)的核苷酸和包含本领域已知的经修饰碱基的核苷酸。

[0064] 如本领域技术人员所理解的,在一些方面,核酸还包含质粒序列。质粒序列可包括,例如,启动子序列、选择标记序列或基因座靶向序列中的一种或多种序列。

[0065] 如本文所用,“抗体”意指完整抗体或抗体的抗原结合片段,包括已经修饰或工程化,或为人抗体的完整抗体或抗原结合片段。已经修饰或工程化的抗体的实例为嵌合抗体、人源化抗体、多互补位(multiparatopic)抗体(例如,双互补位(biparatopic)抗体)和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗原结合片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单链抗体(例如,scFv)、微抗体(minibody)和双抗体(diabody)。

[0066] 当提及蛋白质或肽时,术语“特异性(或选择性)结合”或“与……特异性(或选择性)免疫反应”是指确定蛋白质存在的结合反应,常常是在异源蛋白质群体和其它生物制剂中。因此,在指定的免疫测定条件下,指定抗体与特定蛋白质结合,为背景的至少两倍且更通常超过背景的10至100倍。在此类条件下与抗体的特异性结合需要针对特定蛋白质的特异性而选择的抗体。例如,可以选择多克隆抗体以仅获得那些与所选抗原而不与其它蛋白质特异性免疫反应的多克隆抗体。这种选择可以通过减去与其它分子交叉反应的抗体来实现。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,按常规使用固相ELISA免疫测定来选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(对于可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述,参见,例如,Harlow&Lane,Using Antibodies,A Laboratory Manual(1998))。

[0067] 在某些实施方案中,结合CD7的抗体是单链可变片段抗体(“scFv抗体”)。scFv是指包含抗体的VH和VL结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单多肽链中。通常,Fv多肽还包含介于VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun(1994) *The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies*, 第113卷,Rosenburg和Moore编辑Springer-Verlag, New York, 第269-315页。还参见PCT公布第W0 88/01649号和美国专利第4,946,778号和第5,260,203号。如本领域技术人员所理解的,可以设计各种合适的接头并测试以获得最佳功能,如本领域所提供和如本文所公开的。

[0068] 在某些实施方案中,抗CD7 scFv包含可变重链(重链可变区或VH)和可变轻链(轻链可变区或VL),其具有的氨基酸序列各自与SEQ ID NO:1和2分别所示的VH和VL序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。重链可变区可与SEQ ID NO:1的VH序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。轻链可变区可与SEQ ID NO:2的VL序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在一些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:1所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:1所示的序列中包含10个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸取代。在一些情况下,轻链可变区在SEQ ID NO:2所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,轻链可变区在SEQ ID NO:2所示的序列中包含10个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸取代。在一些实施方案中,编码VH的核酸序列与SEQ ID NO:23所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在其它实施方案中,编码VL的核酸序列与SEQ ID NO:24所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0069] 在某些实施方案中,抗CD7 scFv包含可变重链(重链可变区或VH)和可变轻链(轻链可变区或VL),其具有的序列各自与SEQ ID NO:14和15分别所示的VH和VL序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。重链可变区可与SEQ ID NO:14的VH序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%

序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。轻链可变区可与SEQ ID NO:15的VL序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0070] 在一些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:14所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:14所示的序列中包含10个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸取代。在一些情况下,轻链可变区在SEQ ID NO:15所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:15所示的序列中包含10个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸取代。

[0071] 在一些实施方案中,编码VH的核酸序列与SEQ ID NO:25所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在其它实施方案中,编码VL的核酸序列与SEQ ID NO:26所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0072] 在某些实施方案中,抗CD7 scFv包含可变重链(重链可变区或VH)和可变轻链(轻链可变区或VL),其具有的序列各自与SEQ ID NO:16和17分别所示的VH和VL序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。重链可变区可与SEQ ID NO:16的VH序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。轻链可变区可与SEQ ID NO:17的VL序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0073] 在一些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:16所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:14所示的序列中包含13个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个)氨基酸取代。在一些情况下,轻链可变区在SEQ ID NO:17所示的序列中包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,重链可变区在SEQ ID NO:17所示的序列中包含5个或更少(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个)氨基酸取代。在一些实施方案中,编码VH的核酸序列与SEQ ID NO:27所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至

少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在其它实施方案中,编码VL的核酸序列与SEQ ID NO:28所示的核酸序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的scFv包含与抗CD7抗体的可变重链序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性的可变重链序列。在一些实施方案中,本发明的scFv包含与抗CD7抗体的可变轻链序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性的可变轻链序列。例如,抗CD7抗体可以是本领域技术人员公认的任何此类抗体。

[0075] 表1.抗CD7 scFv的VH区和VL区的氨基酸序列

	组分	氨基酸序列
[0076]	TH69	VH EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQTPEKRLWVA SISGGFTYYPD SVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARD EVRGYLDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)
		VL AAYKDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKL PYTFGGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:2)
	3a1f	VH QVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIG KINPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR GGVYYDLYYYALDYWGQGTSTTVSS (SEQ ID NO:14)
		VL DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQGISNNLHWYQQKSHESPRLLIK SASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPYTF GGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:15)
[0077]	T3-3 A1	VH DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMHWRQAPEKGLEWVA YISSGSSTLHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR WGNYPHYAMDYWGQGTSTTVSS (SEQ ID NO:16)
		VL DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYSYMHWYQQKPGQPPK LLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAVTYYCQHSREL PYTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:17)

[0078] 表2.抗CD7 scFv的VH区和VL区的核酸序列



[0079]

	组分	核酸序列
TH69	VH	GAGGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGATC TCTGAAACTGAGTTGTGCCGCTTCAGGCCTGACCTTCTCAAGCTACGCCA TGAGCTGGGTGCGACAGACACCTGAGAAGCGGCTGGAATGGGTGCGTAGC ATCTCCTCTGGCGGGTTCACATACTATCCAGACTCCGTGAAAGGCAGATT TACTATCTCTCGGGATAACGCAAGAAATATTCTGTACCTGCAGATGAGTT CACTGAGGAGCGAGGACACCGCAATGTACTATTGTGCCAGGGACGAAGTG CGCGGCTATCTGGATGTCTGGGGAGCTGGCACTACCGTACCGTCTCCAG C (SEQ ID NO:23)
	VL	GCCGCATACAAGGATATTTCAGATGACTCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGC CTCCCTGGGAGACCGAGTGACAATCTCTTGCACTGCATCAGAGGAATTA GCAACTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACTGTGAACTG CTGATCTACTATACCTCTAGTCTGCACAGTGGGGTCCCCTCACGATTTCAG CGGATCCGGCTCTGGGACAGACTACAGCCTGACTATCTCCAACCTGGAGC CCGAAGATATTGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCAAGCTGCCTTAT ACCTTTGGCGGGGAACAAAGCTGGAGATTAAGG (SEQ ID NO:24)
3a1f	VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCAGGGGCAAG CGTCAAACCTGTCTGCAAGGCCCTCTGGATATACATTCACTAGCTACTGGA TGCACTGGGTGAAACAGAGACCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGGAAAG ATTAACCCTAGCAATGGCAGGACCAACTACAACGAAAAGTTTAAATCCAA GGCAACCCTGACAGTGGACAAGAGCTCCTCTACAGCCTACATGCAGCTGA GTTCACTGACTTCAGAGGATAGCGCAGTGTACTATTGCGCCAGAGGCGGG GTCTACTATGACCTGTACTATTACGCCCTGGATTATTGGGGGCAGGGAAAC CACAGTGACTGTCAGCTCC (SEQ ID NO:25)
	VL	GACATCGAGCTGACCCAGAGTCCTGCTACACTGAGCGTGACTCCAGGCGA TTCTGTCACTGTGTCATGTCGGGCAAGCCAGTCCATCTCTAACAATCTGC ACTGGTACCAGCAGAAATCCCATGAATCTCCACGACTGCTGATTAAGAGT GCCTCACAGAGCATCTCCGGCATTCCTCCCGGTTCTCTGGCAGTGGGTC AGGAAGTGAATTTACCCTGAGTATTAAGTCACTGGAGACAGAAGATTTTCG GCATGTATTTTGGCAGCAGAGCAATTCCTGGCCCTACACTTTTCGGAGGC GGGACCAAACCTGGAGATCAAGCGG (SEQ ID NO:26)
T3-3 A1	VH	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTC CCGGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCTTTGGAA TGCACTGGGTTCGTCAGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATAC  ATTAGTAGTGGCAGTAGTACCCTCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCG ATTCAACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTTCTGCAAATGA CCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGATGGGGT AACTACCCTCACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC CGTCTCCTCA (SEQ ID NO:27)

[0080]

	VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCA GAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTGCATCTGGCT ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTC CTCATCTATCTTGCACTCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGG AGGAGGATGCTGTAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGTAC ACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:28)
--	----	--

[0081] 术语“序列同一性”意指两个核苷酸序列或两个氨基酸序列,当最佳比对时,例如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重,共有至少例如70%序列同一性,或至少80%序列同一性,或至少85%序列同一性,或至少90%序列同一性,或至少95%序列同一性或更多。对于序列比较,通常一个序列充当参考序列(例如,亲本序列),将测试序列与之进行比

较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如有必要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,该序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0082] 用于比较的序列的最佳比对可以,例如通过Smith和Waterman的局部同源性算法, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), 通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), 通过Pearson和Lipman的相似性搜索方法, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), 通过这些算法的计算机化实现 (Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 或通过目视检查 (通常参见Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology*) 来进行。适于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法, 这在Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990) 中有描述。用于进行BLAST分析的软件通过国家生物技术信息中心可公开获得 (通过美国国立卫生研究院NCBI网络服务器可公开获得)。通常, 可以使用默认程序参数进行序列比较, 但也可以使用自定义参数。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用字长 (W) 为3, 期望值 (E) 为10和BLOSUM62评分矩阵作为默认值 (参见Henikoff和Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989))。

[0083] 正如本领域的技术人员将认识到的, 在某些实施方案中, 本文公开的各种组分 (例如, scFv、胞内信号传导结构域、铰链、接头、定位序列及其组合) 的任何序列可与本文公开的特定相应序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。例如, 在某些实施方案中, 胞内信号传导结构域4-1BB可与SEQ ID NO:3具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性, 只要其拥有所需功能。在某些实施方案中, 4-1BB的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3所示的序列 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL)。

[0084] 再如, 在某些实施方案中, 胞内信号传导结构域4-1BB可以被来自于共刺激分子诸如CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的另一胞内信号传导结构域置换。在一些实施方案中, CAR的胞内信号传导结构域可与CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的胞内信号传导结构域具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0085] 再如, 在某些情况中, 4-1BB的胞内信号传导结构域还可包括来自于共刺激分子诸如CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的另一胞内信号传导结构域。在一些实施方案中, 附加胞内信号传导结构域可与CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的胞内信号传导结构域具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列

同一性。在其它实施方案中,附加胞内信号传导结构域与CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的一个或多个胞内信号传导结构域片段包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0086] 再如,在某些情况中,胞内信号传导结构域CD3 $\zeta$ 可与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性,只要其拥有所需功能。在某些实施方案中,胞内信号传导结构域CD3 $\zeta$ 包含SEQ ID NO:4所示的序列(RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR)。

[0087] 在一些情况下,胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)或其部分,只要其拥有所需功能。CAR的胞内信号传导结构域可包括与ITAM具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性的序列。在某些实施方案中,胞内信号传导结构域可与Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD4、CD7、CD8、CD28、OX40或H2-Kb具有至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性,只要其拥有所需功能。

[0088] 在某些实施方案中,抗CD7 CAR还包含铰链和跨膜序列。适合用于本发明中的铰链和跨膜序列是本领域已知的,并且在例如通过引用整体并入的公开案W02016/126213中有提供。在某些实施方案中,铰链序列包含SEQ ID NO:5所示的序列(TTTPAPRPPTPTAPTASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD)。在某些实施方案中,跨膜序列包含SEQ ID NO:6所示的序列(IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC)。在一些实施方案中,抗CD7 CAR的铰链和跨膜结构域可包括来自于CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、FGFR2B或另一跨膜蛋白的信号传导结构域(例如,跨膜结构域)。

[0089] 在某些实施方案中,抗CD7 CAR还包含CD8 $\alpha$ 信号肽(MALPVTALLLPLALLLHAARP; SEQ ID NO:7)。图17中描绘了包含本文所述的实施方案的抗CD7 CAR的示意图。

[0090] 在本发明的某些方面中,嵌合抗原受体(CAR)可与细胞表面表达的分子结合,包括但不限于CD1糖蛋白家族的成员、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD28、CD30、CD38、CD45、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD57、CD99、CD127和CD137。

[0091] 如本文所述,当抗CD7 CAR与效应T细胞上CD7表达的下调组合使用时,显示T细胞的细胞毒性显著增加。如本文所证明的,CD7的下调(例如,消除、减少和/或重定位)阻止了相应的抗CD7 CAR发挥的互相残杀效应,允许与保留靶抗原(例如,CD7)的细胞相比,在CAR表达后更高的T细胞恢复,以及对T白血病/淋巴瘤细胞更有效的细胞毒性。如本领域技术人员所理解的,可以根据多种已知方法实现效应T细胞上CD7表达的下调,所述方法包括例如针对CD7的“胞内抗体(intrabody)”(如W02016/126213中所述),针对CD7的RNAi或基因编辑方法,例如大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas9和锌指核酸酶。

[0092] 在某些实施方案中,工程化免疫细胞还包含核酸,其包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列。“与定位结构域连接的靶结合分子”在本文中有时称为蛋白表达阻滞剂(PEBL)或在一些情况下称为“胞内抗体”,如W02016/126213中所述,其教导内容通过引用整体并入。图3E和图17中示出了PEBL的示例性实施方案。

[0093] 如本文所用,在蛋白质表达阻滞剂的上下文中“连接”是指编码靶结合分子的基因与编码一个或多个定位结构域的一个或多个基因直接在框内(例如,没有接头)相邻。或者,编码靶结合分子的基因可以通过接头序列连接到编码一个或多个定位结构域的一个或多个基因,例如,如W02016/126213中所述。如本领域技术人员所理解的,此类接头序列以及此类接头序列的变体是本领域已知的。设计并入接头序列的构建体的方法以及评估功能性的方法对于本领域技术人员而言是容易获得的。

[0094] 在某些实施方案中,靶结合分子是结合CD7的抗体。在某些实施方案中,抗体为scFv。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的VL序列。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:14所示的VH序列和SEQ ID NO:15所示的VL序列。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:16所示的VH序列和SEQ ID NO:17所示的VL序列。如本文所述,在某些实施方案中,scFv包含VH和VL,其具有的序列各自与SEQ ID NO:1和2分别所示的VH和VL序列;SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15分别所示的VH和VL序列;或SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17分别所示的VH和VL序列具有至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0095] 在一些实施方案中,编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白重链可变区的SEQ ID NO:23的核酸序列和编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白轻链可变区的SEQ ID NO:24的核酸序列用于产生抗CD7蛋白表达阻滞剂。在其它实施方案中,编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白重链可变区的SEQ ID NO:25的核酸序列和编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白轻链可变区的SEQ ID NO:26的核酸序列用于产生抗CD7蛋白表达阻滞剂。在某些实施方案中,编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白重链可变区的SEQ ID NO:27的核酸序列和编码抗CD7 scFv的免疫球蛋白轻链可变区的SEQ ID NO:28的核酸序列用于产生抗CD7蛋白表达阻滞剂。

[0096] 在某些实施方案中,如本文所述,在CAR的背景下结合CD7的抗体可以不同于在靶结合分子(PEBL)的背景下结合CD7的抗体。仅举例说明,在CAR的背景下结合CD7的抗体可包含SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的VL序列,而在PEBL的背景下结合CD7的抗体可包含SEQ ID NO:14所示的VH序列和SEQ ID NO:15所示的VL序列。在某些实施方案中,如本文所述,在CAR的背景下结合CD7的抗体可以与在靶结合分子(PEBL)的背景下结合CD7的抗体相同。

[0097] 在某些实施方案中,PEBL的定位结构域包含内质网(ER)或高尔基体滞留序列;蛋白体定位序列;源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。在某些实施方案中,如本文所述,定位结构域包含内质网(ER)滞留肽EQKLISEEDLKDEL (SEQ ID NO:8)、(GGGGS)<sub>4</sub>AEKDEL (SEQ ID NO:9),或CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域(TTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLY) (SEQ ID NO:10),接着是

KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO:11)。根据应用,定位结构域可以将PEBL引导至特定的细胞区室,例如高尔基体或内质网、蛋白酶体或细胞膜。ER或高尔基体滞留序列包含氨基酸序列KDEL (SEQ ID NO:18);KKXX,其中X为任意氨基酸 (SEQ ID NO:19);KXD/E (诸如KXD或KXE),其中X为任意氨基酸 (SEQ ID NO:20);或YQRL (SEQ ID NO:21)。蛋白酶体定位序列可包含PEST (SEQ ID NO:22) 基序。

[0098] 在一些实施方案中,蛋白酶体定位通过将scFv序列连接至含三联基序的蛋白21 (TRIM21) 靶向结构域序列并且使编码人TRIM21 E3泛素连接酶蛋白的核酸序列共表达来实现。TREVI21以高亲和力结合抗体的Fc结构域,并且可以募集泛素-蛋白体复合物以降解与抗体结合的分子 (例如,蛋白质和肽)。TRIM21靶向结构域序列编码选自人免疫球蛋白G (IgG) 恒定区 (Fc) 基因 (诸如IgG1、IgG2或IgG4) 的氨基酸序列,并用于形成包含scFv和Fc结构域的融合蛋白。在该实施方案中,外源表达的TREVI21蛋白结合与靶蛋白 (例如,CD7) 结合的scFv-Fc融合蛋白,并将复合物引导至蛋白酶体进行降解。

[0099] 人TRIM21 E3连接酶蛋白的氨基酸序列的详情可以在例如NCBI蛋白质数据库中在NCBI Ref.Seq.No.NP\_003132.2下找到。编码人TRIM21 E3连接酶蛋白的核酸序列的详情可以在例如NCBI蛋白质数据库中在NCBI Ref.Seq.No.NM\_003141.3中找到。

[0100] 在某些实施方案中,蛋白质表达阻滞剂是如W02016/126213中公开的抗CD7 PEBL中的任何一种或多种,本公开内容通过引用整体并入本文用于所有目的。因此,如W02016/126213中所述,本文所述的工程化免疫细胞可包含与CD7结合的PEBL (与定位结构域连接的靶结合分子)。抗CD7胞内抗体组分的序列如图2以及W02016/126213的表1和2中所述。图3E和图17中描绘了抗CD7 PEBL的示例性实施方案。

[0101] 表3.抗CD7 PEBL选定组分的氨基酸序列信息

[0102]

组分	序列
CD8 $\alpha$ 信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:7)
VH-VL 接头	GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:12)
CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO:10)
以 myc 拴系至 scFv 的定位结构域 KDEL(“myc KDEL”)	EQKLISEEDLKDEL (SEQ ID NO:8)
定位结构域 “连接的 (20)AEKDEL”	(GGGS) <sub>4</sub> AEKDEL (SEQ ID NO:9)
定位结构域 “mb DEKKMP”	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO:13)
抗 CD7 scFv VH 结构域 (TH69)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGLTFSSYAMSWVRQTPPEKRL EWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDT AMYYCARDEVRGYLDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)
抗 CD7 scFv VL 结构域 (TH69)	AAYKDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPD GTVKLLIYYTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATY YCOOYSKLPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:2)

[0103] 在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,SEQ ID NO:2的氨基酸序列和VH-VL接头。VH-VL接头可以是(GGGGS)<sub>n</sub>接头,其中n的范围可为1至6,例如1、2、3、4、5或6。在一个实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,SEQ ID NO:2的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:2的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在其它实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一

性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13所示的任一序列的定位结构域。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 信号肽,诸如但不限于SEQ ID NO:7所示的含CD8 $\alpha$ 信号肽。在其它情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域,诸如但不限于SEQ ID NO:10所示的CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域。

[0104] 在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,SEQ ID NO:15的氨基酸序列和VH-VL接头。VH-VL接头可以是(GGGGS)<sub>n</sub>接头,其中n的范围可为1至6,例如1、2、3、4、5或6。在一个实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,SEQ ID NO:15的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:15的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,与SEQ ID NO:15具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在其它实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:14具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:15具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13所示的任一序列的定位结构域。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 信号肽,诸如但不限于SEQ ID NO:7所示的含CD8 $\alpha$ 信号肽。在其它情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域,诸如但不限于SEQ ID NO:10所示的CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域。

[0105] 在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,SEQ ID NO:17的氨基酸序列和VH-VL接头。VH-VL接头可以是(GGGGS)<sub>n</sub>接头,其中n的范围可为1至5,例如1、2、3、4、5或6 (SEQ ID NO:29)。在一个实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,SEQ ID NO:17的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:17的氨基酸序列和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,与SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在其它实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:16具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:17具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:13所示的任一序列的定位结构域。在一些情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 信号肽,诸如但不限于SEQ ID NO:7所示的含CD8 $\alpha$ 信号肽。在其它情况下,抗CD7蛋白表达阻滞剂还包含CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域,诸如但不限于SEQ ID NO:10所示的CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域。

[0106] 在一些实施方案中,编码抗CD7 PEBL的核酸序列包含表4所示的一个或多个核酸序列。在一些实施方案中,PEBL的抗CD7 scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:23的核苷酸序列并且PEBL的抗CD7 scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列。在某些实施方案中,PEBL的抗CD7 scFv的VH结构域包含与SEQ ID NO:23具有至少90%序列同一性(例如,90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的核苷酸序列,并且PEBL的抗CD7 scFv的VL结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少90%序列同一性(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的核苷酸序列。

[0107] 表4.基于TH69的抗CD7 PEBL的选定组分的核酸序列信息

组分	序列
CD8 $\alpha$ 信号肽	ATGGCTCTGCCTGTGACCGCACTGCTGCTGCCCCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCAAGACCT (SEQ ID NO:30)
抗 CD7 scFv VL (TH69)	GCCGCATACAAGGATATTCAGATGACTCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGCCTCCCTGGGAGACCGAGTGACAATCTCTTGACAGTGCATCACAGGGAATTAGCAACTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACTGTGAACTGCTGATCTACTATACCTCTAGTCTGCACAGTGGGGTCCCCTCACGATTCAGCGGATCCGGCTCTGGGACAGACTACAGCCTGACTATCTCCAACCTGGAGCCCGAAGATATTGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCAAGCTGCCTTATACCTTTGGCGGGGAACAAAGCTGGAGATTAAAAGG (SEQ ID NO:24)
抗 CD7 scFv VH (TH69)	GAGGTGCAGCTGGTTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGATCTCTGAACTGAGTTGTGCCGCTTCAGGCCTGACCTTCTCAAGCTACGCCATGAGCTGGGTGCGACAGACACCTGAGAAGCGGCTGGAATGGGTGCTAGCATCTCCTCTGGCGGGTTCACATCTATCCAGACTCCGTGAAAGGCAGATTTACTATCTCTCGGGA TAACGCAAGAAATATTCTGTACCTGCAGATGAGTTCAGTGAGGAGCGAGGACACCGCAATGTACTATTGTGCCAGGGACGAAGTGC GCGGCTATCTGGATGTCTGGGGAGCTGGCACTACCGTCACCGTCTCCAGC (SEQ ID NO:25)
VH-VL 接头	GGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGCGGGGGATCTGGAGGAGGAGGAAGT (SEQ ID NO:31)
以 myc 拴系至 scFv 的 ER 定位结构域 KDEL(“myc KDEL”)	GAGCAGAACTGATTAGCGAAGAGGACCTGAAAGATGAACTG (SEQ ID NO:32)

[0109] 在一些实施方案中,编码抗CD7蛋白表达阻滞剂的定位结构域的核酸序列包含选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的序列,或其密码子优化变体。



[0110] 在本发明的某些方面,蛋白表达阻滞剂可与细胞表面表达的分子结合,包括但不限于CD1糖蛋白家族的成员、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD28、CD30、CD38、CD45、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD57、CD99、CD127和CD137。

[0111] 在本发明的一些方面,CD1糖蛋白家族的成员、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD28、CD30、CD38、CD45、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD57、CD99、CD127或CD137的表达可以使用基因编辑方法下调,诸如但不限于采用大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas9和锌指核酸酶的基因编辑技术。例如,在一些实施方案中,使用通过Cas9/CRISPR的基因组编辑敲除CD7表达。在其它实施方案中,使用通过Cas9/CRISPR的基因组编辑敲除CD5表达。

[0112] 如上所述,可以根据多种其它已知的方法实现效应T细胞上CD7表达的下调,所述方法包括例如用大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas9和锌指核酸酶的基因编辑方法。因此,在某些实施方案中,工程化免疫细胞还包含经修饰的CD7基因,该修饰使得CD7基因或蛋白质无功能。举例来说,本发明的工程化免疫细胞还包含经修饰的(例如,非功能性)CD7基因(使用例如大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas9或锌指核酸酶修饰),其防止或减少CD7的表达,和/或以其它方式损害(例如,在结构上)CD7蛋白质不被抗CD7 CAR识别。使用此类方法修饰基因表达的方法是容易获得的并且是本领域熟知的。

[0113] 使用CRISPR/Cas6技术灭活免疫细胞中的靶基因的方法在例如美国专利公布第2016/0272999、2017/0204372和2017/0119820号中有描述。

[0114] CRISPR/Cas系统是用于诱导靶向遗传改变(基因组修饰)的系统。Cas9蛋白的靶标识别需要向导RNA(gRNA)内的“种子”序列和在gRNA结合区上游,含有前间区序列邻近基序(PAM)序列的保守多核苷酸。因此可以通过重新设计细胞系、原代细胞和工程化细胞中的gRNA来工程化CRISPR/Cas系统以裂解基本上任何DNA序列。CRISPR/Cas系统可以通过使单个Cas9蛋白与两个或更多个gRNA共表达而同时靶向多个基因组基因座,使得该系统特别适合靶基因的多基因编辑或协同活化。用于抑制基因表达的CRISPR/Cas系统的实例在美国公布第2014/0068797号和美国专利第8,697,359号和第8,771,945号中有描述。该系统诱导永久性基因破坏,其利用RNA导向的Cas9内切核酸酶引入DNA双链断裂,DNA双链断裂触发易错修复途径以导致移码突变。在一些情况下,也可以使用其它内切核酸酶,包括但不限于Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Cs5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、T7、Fok1,本领域已知的其它核酸酶,其同源物或其修饰形式。

[0115] 将对靶基因有特异性的gRNA序列和Cas内切核酸酶引入细胞并形成使Cas内切核酸酶能够在靶基因处引入双链断裂的复合物时,发生CRISPR/Cas基因破坏。在一些情况下,CRISPR系统包含一种或多种表达载体,其包含编码Cas内切核酸酶的核酸序列和对靶基因有特异性的向导核酸序列。向导核酸序列对基因有特异性,并且靶向该基因进行Cas内切核酸酶诱导的双链断裂。向导核酸序列的序列可以处于基因的基因座内。在一些实施方案中,向导核酸序列的长度为至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50个或更多个核苷酸。向导核酸序列包括RNA序列、DNA序列、其组合(RNA-DNA组合序列),或具有合成核苷酸的序列,诸如肽核酸(PNA)或

锁核酸(LNA)。向导核酸序列可以是单分子或双分子。在一个实施方案中,向导核酸序列包含单一向导RNA。

[0116] 在一些实施方案中,可以通过CRISPR/Cas系统修饰本发明的工程化免疫细胞以灭活人CD7基因。人CD7基因的基因组结构和序列的详情可以例如在NCBI基因数据库中在GeneID No.924下找到。

[0117] 用于敲除特定靶基因的市售试剂盒、gRNA载体和供体载体可例如从Origene (Rockville,Md.)、GenScript (Atlanta,Ga.)、Applied Biological Materials (ABM; Richmond,British Columbia)、BioCat (Heidelberg,Germany) 等获得。例如,用于通过CRISPR敲除CD7的市售试剂盒或试剂盒组分包括例如按目录号KN201231、KN201231G1、KN201231G2和KN201231D获得的那些(各自均可从OriGene获得),以及按目录号sc-4072847、sc-4072847-K0-2、sc-4072847-HDR-2、sc-4072847-NIC、sc-4072847HDR-2和sc-4072847-NIC-2获得的那些(各自均可从Santa Cruz Biotechnology获得)。

[0118] 在一些实施方案中,可使用CRISPR/Cas系统将本文所述的嵌合抗原受体引入到人CD7基因基因座中。

[0119] 在某些实施方案中,提供了一种工程化免疫细胞,其包含:i) 包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和与分化群7(CD7)特异性结合的抗体;和ii) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是结合CD7的抗体,并且所述定位结构域包含内质网滞留序列。在某些实施方案中,在CAR的背景下以及在靶结合分子背景下,结合CD7的抗体包含:SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的VL序列;SEQ ID NO:14所示的VH序列和SEQ ID NO:15所示的VL序列;或SEQ ID NO:16所示的VH序列和SEQ ID NO:17所示的VL序列。如本文所述,在某些实施方案中,抗体包含VH和VL,其具有的序列各自与SEQ ID NO:1和2分别所示的VH和VL序列;SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15分别所示的VH和VL序列;或SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17分别所示的VH和VL序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在某些实施方案中,如本文所述,在CAR的背景下结合CD7的抗体可以不同于在靶结合分子(蛋白表达阻滞剂或PEBL)的背景下结合CD7的抗体。在某些实施方案中,4-1BB的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3所示的序列。在某些实施方案中,CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4所示的序列。

[0120] 另一方面,还提供了包含编码CAR的核苷酸序列的核酸,如本文所述,其中CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,和结合CD7的抗体。

[0121] 在某些实施方案中,抗体是scFv。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的可变轻链VL序列。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:14所示的VH序列和SEQ ID NO:15所示的可变轻链VL序列。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:16所示的VH序列和SEQ ID NO:17所示的可变轻链VL序列。如本文所述,在某些实施方案中,scFv包含VH和VL,其具有的序列各自与SEQ ID NO:1和2分别所示的VH和VL序列;SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15分别所示的VH和VL序列;或SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17分别所示的VH和VL序列包含至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一

性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在某些实施方案中,CAR还包含铰链和跨膜序列。

[0122] 在某些实施方案中,本发明的分离的核酸包含编码根据表5的CAR的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸包含编码根据表5的CAR的组分的核苷酸序列。

[0123] 表5.抗CD7 CAR的选定组分的氨基酸序列信息

组分	氨基酸序列
抗 CD7 VH (TH69)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASIS SGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYICARDEVRGYL DVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
抗 CD7 VL (TH69)	AAYKDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDATYYCQYSKLPYTFGG GTKLEIKR (SEQ ID NO: 2)
4-1BB 的胞内 信号传导结构 域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:3)
胞内信号传导 结构域 CD3ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR (SEQ ID NO:4)
CD8α 的铰链 和跨膜结构域	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 10)

[0125] 在一些实施方案中,抗CD7 CAR包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、SEQ ID NO:2的氨基酸序列、4-1BB胞内信号传导结构域、CD3ζ胞内信号传导结构域和CD8铰链和跨膜结构域。在一些实施方案中,抗CD7 CAR还包括VH-VL接头,诸如但不限于 (GGGS)<sub>n</sub>接头,其中n的范围可为1至6,例如1、2、3、4、5或6。

[0126] 在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列、SEQ ID NO:2的氨基酸序列、SEQ ID NO:3的氨基酸序列、SEQ ID NO:4的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:3的氨基酸序列,SEQ ID NO:4的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:3具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:4的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID NO:3的氨基酸序列,与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和SEQ ID

N0:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID N0:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID N0:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,SEQ ID N0:3的氨基酸序列,SEQ ID N0:4的氨基酸序列,和与SEQ ID N0:10具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD7蛋白表达阻滞剂包含与SEQ ID N0:1具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID N0:2具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID N0:3具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,与SEQ ID N0:4具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,和与SEQ ID N0:10具有至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0127] 在某些实施方案中,本发明的分离的核酸包含表6的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述核酸包含如表6所示的CAR组分的核苷酸序列。

[0128] 表6.抗CD7 CAR的选定组分的氨基酸序列信息

组分	核酸序列
抗 CD7 VH (TH69)	GAGGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGAAGCCAGGAGGATCTC TGAAACTGAGTTGTGCCGCTTCAGGCCTGACCTTCTCAAGCTACGCCATGAG CTGGGTGCGACAGACACCTGAGAAGCGGCTGGAATGGGTGCTAGCATCTCC TCTGGCGGGTTACATACTATCCAGACTCCGTGAAAGGCAGATTTACTATCT CTCGGGATAACGCAAGAAATATTCTGTACCTGCAGATGAGTTCAGTGGAGGAG CGAGGACACCGCAATGTACTATTGTGCCAGGGACGAAAGTGCAGCGGCTATCTG GATGTCTGGGGAGCTGGCACTACCGTCACCGTCTCCAGC (SEQ ID NO:23)
抗 CD7 VL (TH69)	GCCGCATACAAGGATATTTCAGATGACTCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGCCT CCCTGGGAGACCGAGTGACAATCTCTTGAGTGCATCAGAGGAATTAGCAA CTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACTGTGAACTGCTGATC TACTATACCTCTAGTCTGCACAGTGGGGTCCCCCTCACGATTACGCGGATCCG GCTCTGGGACAGACTACAGCCTGACTATCTCCAACCTGGAGCCCGAAGATAT TGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCAAGCTGCCTTATACCTTTGGCGGG GGAACAAAGCTGGAGATTAAAAGG (SEQ ID NO:24)
[0129] 4-1BB 的胞内 信号传导结 构域	AAGCGGGGGCGCAAAAACTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCTTTCATGAGAC CAGTGCAGACAACCCAGGAGGAAGATGGGTGCTCATGCCGTTTCCCGAGGA GGAGGAAGGCGGCTGCGAGCTG (SEQ ID NO:35)
CD3 $\zeta$ 的胞内 信号传导结 构域	AGGGTGAAGTTTTCCCGCTCAGCAGATGCTCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTGTATAATGAGCTGAACCTGGGCAGACGCGAAGAGTATGATGTGCT GGACAAAAGGCGGGGAAGAGACCCCGAAATGGGAGGGAAGCCAAGGCGGAAA AACCCCGAGGAGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAGG CTTACAGTGAGATTGGGATGAAGGGAGAGAGACGGAGGGGAAAAGGGCACGA TGGCCTGTACCAGGGGCTGAGCACAGCAACCAAGATACTTATGACGCACTG CACATGCAGGCACTGCCACCCAGA (SEQ ID NO:36)
CD8 $\alpha$ 的铰链 和跨膜结构 域	ACCACTACACCTGCACCAAGGCCTCCACACCCGCTCCCACTATCGCTTCCC AGCCACTGTCCCTGAGGCCCGAGGCCTGCAGGCCAGCAGCTGGCGGAGCCGT GCATACTAGGGGGCTGGACTTCGCTTGCGACATCTACATCTGGGCCCCACTG GCAGGGACATGCGGAGTCTGCTGCTGTCCCTGGTCATCACACTGTAC (SEQ ID NO:37)

[0130] 在某些实施方案中,如本文所述,核酸还包含编码与定位结构域连接的靶结合分

子的核苷酸序列。在某些实施方案中,靶结合分子是结合CD7的抗体。在某些实施方案中,所述抗体为scFv。在一些实施方案中,scFv包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%序列同一性(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的VH序列和与SEQ ID NO:2的序列具有至少90%序列同一性(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性)的VL序列。在某些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的VL序列。在一些实施方案中,抗CD7 scFv的VH结构域包含SEQ ID NO:23的核苷酸序列并且抗CD7 scFv的VL结构域包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列。

[0131] 在其它方面中,还提供了一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,其包括向所述受试者施用治疗量的具有本文所述任何实施方案的工程化免疫细胞,从而治疗有需要的所述受试者中的癌症。

[0132] 在某些实施方案中,所述方法包括施用治疗量的工程免疫细胞,所述工程免疫细胞包含含有编码CAR的核苷酸序列的核酸,其中如本文所述,所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,及结合CD7的抗体。

[0133] 在某些实施方案中,所述方法包括施用治疗量的工程免疫细胞,所述工程免疫细胞还包含具有编码如本文所述与定位结构域连接的靶结合分子(例如,抗CD7蛋白表达阻滞剂)的核苷酸序列的核酸。

[0134] 在某些实施方案中,所述癌症为T细胞恶性肿瘤,例如T细胞白血病或T细胞淋巴瘤,诸如T细胞急性淋巴母细胞性白血病、T细胞幼淋巴细胞白血病、T细胞大颗粒性淋巴细胞性白血病、肠病相关T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、蕈样真菌病、Sezary综合征、原发性皮肤 $\gamma$ - $\delta$ T细胞淋巴瘤、未另行规定的外周T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤。在某些实施方案中,T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)。

[0135] 如本文所用,术语“治疗”是指对抗医学病状(例如,与T细胞恶性肿瘤相关的病状),达到根据临床上可接受的标准,医学病状改善的程度。

[0136] 如本文所用,“受试者”是指哺乳动物(例如人、非人灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠)。在某些实施方案中,受试者为人。“有需要的受试者”是指患有或有风险发展可通过诱导T细胞对恶性T细胞发挥特异性细胞毒性而治疗(例如,改善、好转、预防)的疾病或病状的受试者(例如,患者)。

[0137] 如本文所定义,“治疗量”是指当施用给受试者时,足以在施用条件下在受试者中实现所需治疗效果(治疗与T细胞恶性肿瘤相关的病状)的量。待施用药剂的有效量可由普通技术的临床医师使用本文提供的指导和本领域已知的其它方法确定,并且取决于若干因素,包括例如所选择的特定药剂、受试者的年龄、敏感性、对药物的耐受性和整体健康。

[0138] 在一些实施方案中,工程化免疫细胞是需要治疗(例如,癌症治疗)的受试者自体的。在其它实施方案中,工程化免疫细胞是需要治疗的受试者是同种异体的。

[0139] 在某些实施方案中,通过静脉内输注、动脉内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位、鞘内施用和眼内施用,将所述工程化细胞施用给所述受试者。

[0140] 在某些实施方案中,通过输注将工程化细胞施用给受试者。输注免疫细胞(例如,

同种异体或自体免疫细胞)的方法是本领域已知的。将足够量的细胞施用给受者以便使疾病的症状好转。通常,在单次设置下输注剂量为 $10^7$ 至 $10^{10}$ 个细胞,例如剂量为 $10^9$ 个细胞。输注按单次 $10^9$ 个细胞的剂量施用或分成几个 $10^9$ 个细胞的剂量。若需要或指定,输注频率可为每天,每2至30天或甚至更长的间隔。输注的量通常为每位受试者至少输注1次并且优选至少输注3次(如耐受的),或直至疾病症状已经好转。可以50-250ml/小时的速率在静脉内输注细胞。其它合适的施用方式包括动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位、鞘内施用。使本发明适于此类递送模式的方法对于本领域技术人员而言是容易获得的。

[0141] 在某些实施方案中,根据本发明的治疗癌症的方法与至少一种其它已知的癌症疗法,例如放射疗法、化学疗法或其它免疫疗法组合。

[0142] 在其它方面,还提供了具有本文所述的任何实施方案的工程化免疫细胞用于治疗癌症的用途,其包括向有需要的受试者施用治疗量的工程化免疫细胞。在某些实施方案中,所述癌症为T细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴细胞性白血病(ETP-ALL)。

[0143] 在某些实施方案中,通过静脉内输注、动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位和鞘内施用,将工程化细胞施用给所述受试者。

[0144] 另一方面,还提供了用于产生具有本文所述的任何实施方案的工程化免疫细胞的方法,该方法包括向免疫细胞中引入包含编码CAR的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域以及结合CD7的抗体。

[0145] 在某些实施方案中,该方法还包括向免疫细胞中引入包含编码与定位结构域连接的靶结合分子(例如,抗CD7蛋白表达阻滞剂或抗CD7 PEBL)的核苷酸序列的核酸。在某些实施方案中,将编码CAR的核苷酸序列和编码抗CD7PEBL的核苷酸序列引入单个质粒上。

[0146] 在各个方面中,还提供了用于产生本文所述的工程化免疫细胞的试剂盒。本试剂盒可用于产生例如具有抗CD7 CAR介导的细胞毒活性的同种异体或自体T细胞。在一些实施方案中,该试剂盒可用于产生具有抗CD7 CAR介导的细胞毒活性的同种异体效应T细胞。在某些实施方案中,该试剂盒可用于产生具有抗CD7 CAR介导的细胞毒活性的自体效应T细胞。

[0147] 因此,本文提供了一种包含核酸的试剂盒,所述核酸包含编码CAR的核苷酸序列,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域以及结合CD7的抗体。编码抗CD7 CAR的核苷酸序列可根据本文所述的任何实施方案设计。在某些实施方案中,核苷酸序列编码根据图1A中的示意图的抗CD7CAR(“抗-CD7-41BB-CD3 $\zeta$ 构建体”)。

[0148] 在某些实施方案中,所述试剂盒还包含具有编码如本文所述与定位结构域连接的靶结合分子(例如,本文所述的抗CD7 PEBL分子)的核苷酸序列的核酸。编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列可根据本文所述的任何实施方案设计。

[0149] 在某些实施方案中,编码抗-CD7 CAR的核苷酸序列和/或编码抗-CD7PEBL的核苷酸序列还包含允许例如克隆和/或表达的序列(例如,质粒或载体序列)。例如,核苷酸序列可以作为质粒的一部分提供,以易于克隆到其它质粒和/或载体(表达载体或病毒表达载体)中用于例如转染、转导或电穿孔到细胞(例如,免疫细胞)中。在某些实施方案中,编码抗

CD7 CAR的核苷酸序列和编码抗CD7 PEBL的核苷酸序列在单个质粒或载体上提供(例如,包含抗CD7CAR和抗CD7 PEBL的单个构建体)。在某些实施方案中,核苷酸序列在单独的质粒或载体(表达载体或病毒表达载体)上提供。

[0150] 通常,试剂盒被分隔以易于使用,并且可以包括一个或多个具有试剂的容器。在某些实施方案中,所有试剂盒组分均包装在一起。或者,试剂盒的一个或多个独立组分可以与其它试剂盒组分在单独的包装中提供。所述试剂盒还可以包括使用试剂盒组分的说明书。

[0151] 在一些实施方案中,本文提供了一种工程化免疫细胞,其包含含有编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,以及结合分化群7(CD7)的抗体。在某些实施方案中,抗体是单链可变片段(scFv)。在一些情况下,scFv包含SEQ ID NO:1所示的重链可变结构域(VH)序列和SEQ ID NO:2所示的轻链可变结构域(VL)序列。

[0152] 在一些实施方案中,CAR还包含铰链和跨膜序列,诸如但不限于包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的铰链和跨膜结构域。

[0153] 在一些实施方案中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0154] 在一些实施方案中,所述工程化免疫细胞还包含含有编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸。在某些实施方案中,靶结合分子是结合CD7的抗体。在某些实施方案中,所述抗体为scFv。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:1所示的VH序列和SEQ ID NO:2所示的VL序列。在一些实施方案中,定位结构域包含内质网(ER)或高尔基体滞留序列;蛋白体定位序列;源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。

[0155] 在一些实施方案中,本文提供了一种工程化免疫细胞,其包含:(i)包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,和结合分化群7(CD7)的抗体;(ii)包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是结合CD7的抗体,并且所述定位结构域包含内质网滞留序列,并且其中结合CD7的抗体包含SEQ ID NO:1所示的可变重链(VH)序列和SEQ ID NO:2所示的可变轻链(VL)序列。在一些实施方案中,4-1BB的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3所示的序列并且CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4所示的序列。

[0156] 在一些实施方案中,本文提供了一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,其包括向受试者施用治疗量的本文所述的工程化免疫细胞,从而治疗有需要的受试者中的癌症。在一些实施方案中,所述癌症是T细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,所述T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)。在某些实施方案中,通过静脉内输注、动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位、鞘内施用,将所述工程化细胞施用给所述受试者。

[0157] 在一些实施方案中,本文提供了包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域,以及结合分化群7(CD7)的抗体。

[0158] 在其它实施方案中,本文提供了本文所述的用于治疗癌症的工程化免疫细胞,其包括向有需要的受试者施用治疗量的工程化免疫细胞。在一些实施方案中,所述癌症是T细胞恶性肿瘤。在某些实施方案中,所述T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞

性白血病 (ETP-ALL)。在某些实施方案中,通过静脉内输注、动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位、鞘内施用,将所述工程化细胞施用给所述受试者。

[0159] 在一些实施方案中,本文提供了用于产生本文所述的工程化免疫细胞的方法。该方法可包括:向免疫细胞中引入包含编码CAR的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和结合CD7的抗体,从而产生工程化免疫细胞。该方法还可包括向免疫细胞中引入包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸。

[0160] 本发明提供了针对CD7的嵌合抗原受体 (CAR)。如本文所证明的,抗CD7CAR在免疫细胞诸如效应T细胞中的表达诱导T细胞对T细胞恶性肿瘤发挥特异性细胞毒性。当使用靶向CD7进行下调的基于抗体的分子(蛋白表达阻滞剂或PEBL)下调效应T细胞上CD7的表达时,显示这种细胞毒性作用增强。因此,本发明提供了一种用于治疗癌症(例如,T细胞恶性肿瘤)的免疫治疗方法。

[0161] 在一些方面,本发明提供了一种工程化免疫细胞,其包含含有编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和结合分化群7 (CD7) 的抗体。在一些实施方案中,本文概述的工程化免疫细胞还包括包含编码与定位结构域连接的靶结合分子(例如,蛋白表达阻滞剂或PEBL)的核苷酸序列的核酸。本文还概述了一种用于产生此类工程化免疫细胞的方法和试剂盒。

[0162] 在一些方面,本发明提供了工程化免疫细胞(例如,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK/T细胞、单核细胞、巨噬细胞或树突细胞),其包含(i)包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和特异性结合CD7的抗体;(ii)包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是结合CD7的抗体,并且所述定位结构域包含内质网滞留序列,并且其中结合CD7的抗体包含SEQ ID NO:1所示的可变重链(VH)序列和SEQ ID NO:2所示的可变轻链(VL)序列。

[0163] 在其它方面,本发明提供了一种治疗有需要的受试者中的癌症(例如,T细胞恶性肿瘤)的方法。该方法包括向受试者施用治疗量的本文所述的任何工程化免疫细胞,从而治疗有需要的受试者中的癌症。本公开还阐述了本文概述的任何工程化免疫细胞用于治疗癌症的用途。

[0164] 在其它方面,本发明提供了包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域和特异性结合CD7的抗体。

[0165] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0166] 1.一种工程化免疫细胞,其包含:

[0167] i) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和

[0168] ii) 包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸,其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0169] 2.根据实施方式1所述的工程化免疫细胞,其中与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段(scFv)。

[0170] 3.根据实施方式1或2所述的工程化免疫细胞,其中与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。



[0171] 4.根据实施方式1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0172] 5.根据实施方式1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0173] 6.根据实施方式1至3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0174] 7.根据实施方式1至4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列:内质网(ER)滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。

[0175] 8.根据实施方式7所述的工程化免疫细胞,其中所述定位结构域包含内质网(ER)滞留序列,其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0176] 9.根据实施方式7所述的工程化免疫细胞,其中所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$ 铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。

[0177] 10.根据实施方式1至9中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0178] 11.根据实施方式1至10中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述CAR还包含铰链和跨膜结构域。

[0179] 12.根据实施方式11所述的工程化免疫细胞,其中所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0180] 13.根据实施方式1至12中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0181] 14.根据实施方式1至12中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0182] 15.根据实施方式1至12中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0183] 16.根据实施方式1至15中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0184] 17.一种工程化免疫细胞,其包含

[0185] i) 与定位结构域连接的靶结合分子,其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体;和

[0186] ii) 嵌合抗原受体 (CAR), 其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0187] 18. 根据实施方式17所述的工程化免疫细胞, 其中与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段 (scFv)。

[0188] 19. 根据实施方式17或18所述的工程化免疫细胞, 其中与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段 (scFv)。

[0189] 20. 根据实施方式17至19中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第一单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0190] 21. 根据实施方式17至19中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第一单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0191] 22. 根据实施方式17至19中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第一单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0192] 23. 根据实施方式17至19中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列: 内质网 (ER) 滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR  $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。

[0193] 24. 根据实施方式23所述的工程化免疫细胞, 其中所述定位结构域包含内质网 (ER) 滞留序列, 其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0194] 25. 根据实施方式23所述的工程化免疫细胞, 其中所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$  铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。

[0195] 26. 根据实施方式17至25中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0196] 27. 根据实施方式17至26中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述CAR还包含铰链和跨膜结构域。

[0197] 28. 根据实施方式27所述的工程化免疫细胞, 其中所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0198] 29. 根据实施方式17至28中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第二单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0199] 30. 根据实施方式17至28中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第二单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0200] 31. 根据实施方式17至28中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述第二单链可变片段 (scFv) 包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0201] 32. 根据实施方式17至31中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0202] 33. 一种药物组合物, 其包含实施方式1至32中任一项所述的工程化免疫细胞和药学上可接受的载体。

[0203] 34. 一种产生实施方式1至32中任一项所述的工程化免疫细胞的方法, 所述方法包括:

[0204] i) 向免疫细胞内引入

[0205] a) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的第一核酸, 其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体; 和

[0206] b) 包含编码CAR的核苷酸序列的第二核酸, 其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体; 并且

[0207] ii) 分离包含与所述定位结构域连接的所述靶结合分子和所述CAR的工程化免疫细胞, 从而产生所述工程化免疫细胞。

[0208] 35. 一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法, 其包括向所述受试者施用治疗有效量的工程化免疫细胞, 从而治疗有需要的所述受试者中的癌症,

[0209] 其中所述工程化免疫细胞包含:

[0210] i) 包含编码与定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸, 其中所述靶结合分子是与CD7特异性结合的第一抗体; 和

[0211] ii) 包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸, 其中所述CAR包含4-1BB胞内信号传导结构域、CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域和与CD7特异性结合的第二抗体。

[0212] 36. 根据实施方式35所述的方法, 其中与CD7特异性结合的所述第一抗体是第一单链可变片段(scFv)。

[0213] 37. 根据实施方式35或36所述的方法, 其中与CD7特异性结合的所述第二抗体是第二单链可变片段(scFv)。

[0214] 38. 根据实施方式35至37中任一项所述的方法, 其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0215] 39. 根据实施方式35至37中任一项所述的方法, 其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0216] 40. 根据实施方式35至37中任一项所述的方法, 其中所述第一单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0217] 41. 根据实施方式35至38中任一项所述的方法, 其中所述定位结构域包含选自下组的氨基酸序列: 内质网(ER)滞留序列、高尔基体滞留序列、蛋白酶定位序列和源自CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B的跨膜结构域序列。

[0218] 42. 根据实施方式41所述的方法, 其中所述定位结构域包含内质网(ER)滞留序列,

其包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0219] 43.根据实施方式41所述的方法,其中所述定位结构域包含源自CD8 $\alpha$ 铰链的跨膜结构域序列和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的跨膜结构域序列。

[0220] 44.根据实施方式35至43中任一项所述的方法,其中所述4-1BB胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列并且其中所述CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0221] 45.根据实施方式35至44中任一项所述的方法,其中所述CAR还包含铰链和跨膜结构域。

[0222] 46.根据实施方式45所述的方法,其中所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0223] 47.根据实施方式35至46中任一项所述的方法,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0224] 48.根据实施方式35至46中任一项所述的方法,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0225] 49.根据实施方式35至46中任一项所述的方法,其中所述第二单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变结构域和与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域。

[0226] 50.根据实施方式35至49中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。

[0227] 51.根据实施方式35至50中任一项所述的方法,其中通过静脉内输注、动脉内输注、腹腔内输注、直接注射到肿瘤内和/或手术后肿瘤床灌注、在人工支架内植入肿瘤部位或鞘内施用,将所述工程化细胞施用给所述受试者。

[0228] 52.根据实施方式35至51中任一项所述的方法,其中所述癌症为T细胞恶性肿瘤。

[0229] 53.根据实施方式52所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)。

[0230] 实施例

[0231] 实施例1:阻滞T细胞中的CD7表达以便嵌合抗原受体有效靶向T细胞恶性肿瘤

[0232] 该实施例说明用新型方法阻断CD7表达,与第二代CAR组合,产生高度有效的抗CD7 CAR-T细胞。该实用策略为患有高危T细胞恶性肿瘤(包括ETP-ALL)的患者提供了新的治疗选择。

[0233] 摘要

[0234] 缺乏对T细胞恶性肿瘤的有效免疫疗法。发明了基于嵌合抗原受体(CAR)重新定向的T淋巴细胞的新型方法。CD7由于其在T细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL)(包括最具侵袭性的亚型,早期T细胞前体(ETP)-ALL)中的一致性表达而被选择作为靶标。在49份诊断的T-ALL样品(包括14份ETP-ALL)中,中值CD7表达>99%;复发时(n=14)和在化疗期间(n=54)CD7表达仍然很高。以第二代CAR(抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ )靶向CD7,但T淋巴细胞中的CAR表达

引起互相残杀,这是由于T细胞中本身存在CD7。为了下调CD7和控制互相残杀,应用了一种基于和胞内滞留结构域偶合的抗CD7单链可变片段的新方法(蛋白表达阻滞剂,PEBL)。抗CD7 PEBL的转导在所有转导的T细胞中引起表面CD7表达几乎瞬时消除; $2.0\% \pm 1.7\%$ 为CD7<sup>+</sup>,相比于模拟物转导的T细胞为 $98.1\% \pm 1.5\%$  ( $n=5$ ;  $P<0.0001$ )。PEBL表达不会损害T细胞增殖、IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 分泌或细胞毒性,并且消除了CAR介导的互相残杀。PEBL-CAR-T细胞对体外CD7<sup>+</sup>白血病细胞具有高度细胞毒性,并且始终比免于互相残杀的CD7<sup>+</sup>T细胞更有效。它们在细胞系来源的和患者来源的T-ALL异种移植物中也显示出强烈的抗白血病活性。这里描述的策略非常适合现有的临床级细胞制造工艺,并且可以快速实施用于治疗患有高危T细胞恶性肿瘤的患者。

#### [0235] 介绍

[0236] 可以通过嵌合抗原受体(CAR)的表达诱导T淋巴细胞特异性识别和杀伤肿瘤细胞。<sup>1-5</sup>有效应用该技术的核心是鉴定适合CAR的靶标。这必须是由肿瘤细胞高度表达的,并且应该是在正常细胞中缺乏的,或者是仅由临床上可管理其临时缺乏的正常细胞表达的。<sup>6</sup>因此,B细胞来源的白血病和淋巴瘤可以用针对通常仅由B淋巴细胞表达的CD19<sup>5,7</sup>或CD22<sup>8</sup>的CAR靶向。<sup>9,10</sup>在患有B细胞难治性白血病和淋巴瘤的患者中输注表达抗CD19 CAR的自体T细胞产生主要的临床反应。<sup>11-18</sup>这些令人兴奋的结果为这项技术的力量提供了无可争辩的证据,并且表明了肿瘤学中更广泛应用的可能性。

[0237] 用于T细胞恶性肿瘤的CAR-T细胞疗法的发展远远落后于其B细胞对应物的发展。由于与一些T细胞白血病和淋巴瘤亚型相关的不良预后,该领域中对有效疗法的需要尤为迫切。例如,在所有ALL患者中,患有早期T细胞祖细胞急性淋巴母细胞性白血病(ETP-ALL)的儿童和青少年对初始疗法的反应最差。<sup>19-21</sup>强化化疗和/或异基因造血干细胞移植往往不能预防治疗难治性复发;对于这些患者,以及具有其它高危特征(诸如成年)的那些患者,缺少治疗选择。<sup>19,22-25</sup>

[0238] 开发对T细胞恶性肿瘤有效的CAR-T细胞的一个主要障碍是恶性T细胞(通常缺乏CD19或CD22表达)的表面标志物特性与活化T淋巴细胞的表面标志物特性大致重叠。<sup>19,26</sup>针对此类靶标的CAR可能导致CAR-T细胞自我消除。<sup>27,28</sup>本文描述了用于ETP-ALL和其它T-ALL细胞亚型的CAR-T细胞疗法的实用技术的开发和应用。首先,制备针对CD7的CAR。正如人们所认识到的,CD7是一种40kDa的I型跨膜糖蛋白,其是T细胞恶性肿瘤的主要标志物,<sup>29-32</sup>并且在所有T细胞ALL情况,包括ETP-ALL中高度表达。<sup>19</sup>其次,开发了一种快速有效地下调T细胞中的CD7表达的方法。选择该方法是因为它避免了CAR-T细胞疗法的互相残杀效应,不牵涉基因编辑,并且可以立即转化为临床应用。

#### [0239] 材料和方法

#### [0240] 细胞和培养条件

[0241] 白血病细胞系Jurkat、CCRF-CEM、Loucy、MOLT4和KG1a来自于美国模式培养物保藏所(ATCC;Rockville,MD)。B谱系ALL细胞系OP-1是我们实验室开发的。<sup>33</sup>用含有萤火虫荧光素酶基因的鼠干细胞病毒(MSCV)-内部核糖体进入位点-(IRES)-绿色荧光蛋白(GFP)逆转录病毒载体(来自于田纳西州孟菲斯市,圣犹大儿童研究医院的载体开发和生产共享资源)转导CCRF-CEM细胞。使用相同的载体转导具有从RS4的cDNA克隆的CD19基因的CCRF-CEM和Jurkat细胞;11B细胞系(ATCC)。将细胞系保持在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-

链霉素的RPMI-1640(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)中。

[0242] 外周血样品获自来自于新加坡国立大学医院血库的健康成年供体的丢弃的匿名血小板捐赠副产物。获得来自ALL患者的骨髓穿刺液用于诊断性免疫表型分析,和治疗反应的监测,<sup>19,26</sup>经新加坡国立大学机构审查委员会的批准,在一些实验中库存剩余材料。通过在Lymphoprep密度步骤(Axis-Shield,Oslo,Norway)离心分离单核细胞,并在RPMI-1640中洗涤两次。用Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28(ThermoFisher)富集T细胞,并在RPMI-1640、10% FBS、1%青霉素-链霉素和白细胞介素-2(IL-2;120IU/mL;Proleukin,Novartis,Basel,Switzerland)中培养。

[0243] 基因克隆和逆转录病毒转导

[0244] 将抗CD7单克隆抗体TH69<sup>34</sup>的单链可变片段(scFv)连接到CD8 $\alpha$ 信号肽、CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域,以及先前我们实验室开发的抗CD19-41BB-CD3 $\zeta$ CAR的4-1BB和CD3 $\zeta$ 的胞内结构域。<sup>5</sup>将相同scFv连接到CD8 $\alpha$ 信号肽和编码内质网(ER)/高尔基体滞留肽EQKLISEEDLKDEL(SEQ ID NO:8)、(GGGS)<sub>4</sub>AEKDEL(SEQ ID NO:9),或CD8 $\alpha$ 铰链和跨膜结构域的序列,接着是定位序列(SEQ ID NO:13)。将这些亚克隆到有或无GFP或mCherry的MSCV载体中。

[0245] 逆转录病毒上清液的制备和转导如先前所述进行。<sup>5,35</sup>简言之,将pMSCV逆转录病毒载体条件培养基添加到涂有RetroNectin(Takara,Otsu,Japan)的聚丙烯管中;离心并取出上清液后,将T细胞添加到管中并且留在37°C下12小时;另外连续两天添加新鲜的病毒上清液。将T淋巴细胞保持在含有FBS、抗生素和200IU/mL IL-2的RPMI-1640中。

[0246] 为了CAR瞬时表达,将抗CD7和抗CD19 CAR构建体亚克隆到pVAX1载体(ThermoFisher Scientific)的EcoRI和XhoI位点,并使用T7 mScript(CellScript, Madison,WI)转录为mRNA。为了mRNA电穿孔,使细胞悬浮在含有200 $\mu$ g CAR mRNA的电穿孔缓冲液(Amaxa细胞系核转染剂试剂盒V;Lonza,Basel,Switzerland)中,并用Amaxa转染剂2b(Lonza)使用程序X-001进行电穿孔。<sup>36,37</sup>未用mRNA电穿孔的细胞用作对照。

[0247] CAR、PEBL和表面标志物的检测

[0248] 用生物素偶联的山羊抗小鼠F(ab')<sub>2</sub>抗体(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA),接着用别藻蓝蛋白(APC)偶联的链霉亲和素(Jackson ImmunoResearch)检测CAR。藻红蛋白(PE)或APC偶联的抗CD7(M-T701)、CD4(RPA-T4)、CD8(RPA-T8)、CD3(SK7)和同种型匹配的非活性抗体来自于BD Biosciences(San Jose,CA);CD19(LT19)来自于Miltenyi Biotech。使用Accuri C6、Fortessa或LSRII流式细胞仪(BD Biosciences),用Diva(BD Biosciences)或FlowJo软件(FlowJo,Ashland,OR)分析细胞染色。

[0249] 如先前所述进行蛋白质印迹分析。<sup>35</sup>简言之,使用CellLytic M细胞裂解试剂(Sigma-Aldrich,Saint Louis,MO)提取细胞裂解物,之后用Pierce BCA蛋白测定试剂盒(ThermoFisher)进行蛋白质定量。用4x Laemmli样品缓冲液(Bio-rad,Hercules,CA)稀释细胞裂解物并且在还原或非还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上通过电泳分离。用小鼠抗人CD3 $\zeta$ 抗体(8D3;BD Biosciences)和辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG(R&D Systems,Minneapolis,MN)和Clarity Western ECL底物(Bio-Rad)探测印迹膜。使用ChemiDoc触摸成像仪(Bio-Rad)使染色可视化。

[0250] 细胞聚集测定、细胞毒性测定和细胞因子产生

[0251] 为测量细胞间聚集,将Jurkat细胞与用钙黄绿素红-橙色AM(ThermoFisher)标记

的CD7<sup>+</sup>或CD7<sup>-</sup>细胞共同培养30分钟;通过流式细胞术对细胞双联体计数。在一些实验中,将靶细胞预孵育10分钟,之后用获自经不含跨膜或信号传导序列的scFv组成的构建体转导的Jurkat或293T细胞的上清液的可溶性抗CD7 scFv共同培养。

[0252] 为测试细胞毒性,将靶细胞用钙黄绿素红-橙色AM标记并置于96孔圆底板(Corning Costar, Corning, NY)中。将T细胞按不同的效应子:靶标(E:T)比率随靶细胞一起添加并且在37℃和5% CO<sub>2</sub>下培养4小时。过流式细胞术对活的靶细胞计数。38为了测量裂解性颗粒的细胞毒性,向共同培养物中添加抗人CD107a-PE(H4A3;BD Biosciences)。1小时后,添加莫能菌素(BD GolgiStop),并且再继续培养3小时,之后进行流式细胞术分析。

[0253] 为评估细胞增殖,单独地或在1:1E:T的MOLT-4细胞的存在下,在含有FBS和120IU/mL IL-2的RPMI-1640中在37℃和5% CO<sub>2</sub>下培养T细胞。每7天向培养物中添加受辐照或用Streck细胞防腐剂(Streck Laboratories, Omaha, NE)处理以抑制增殖的靶细胞。通过流式细胞术确定活的GFP<sup>+</sup>或mCherry<sup>+</sup>T细胞的数目。为了产生IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ ,如上所述接种1:1E:T的靶细胞和效应细胞。1小时后,向培养物中添加布雷菲德菌素A(BD GolgiPlug),再继续培养5小时。随后,用抗IFN $\gamma$ -PE(克隆25723.11;BD Biosciences)或抗TNF $\alpha$ -PE(6401.1111;BD Biosciences)进行细胞内染色,之后进行流式细胞术分析。

[0254] 异种移植模型

[0255] 按在NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ(NOD/scid IL2R<sup>Gnull</sup>)小鼠(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)中按每只小鼠 $1 \times 10^6$ 个细胞,静脉(i.v.)注射经荧光素酶转导的CCRF-CEM细胞。3天和/或7天后,小鼠按每只小鼠 $2 \times 10^7$ 个T细胞接受CD7和抗CD7 CAR表达下调的T细胞。其它小鼠接受经单独的GFP转导的T细胞,或含10% FBS的RPMI-1640代替T细胞。所有小鼠每2天经腹腔内(i.p.)接受20,000IU的IL-2。经腹腔内注射D-萤光素钾盐水溶液(Perkin Elmer, Waltham, MA)(每只小鼠2mg)后,使用Xenogen IVIS-200系统(Caliper Life Sciences, Waltham, MA)测定肿瘤负荷。用Living Image 3.0软件分析发光。当发光达到每秒 $1 \times 10^{10}$ 个光子时,或者如果出现需要安乐死的体征则更早地,对小鼠实施安乐死。

[0256] 对于患者来源的异种移植模型(PDX)模型,在NOD/scid IL2R<sup>Gnull</sup>中静脉注射原代ETP-ALL细胞并使其增殖后续7-8代。然后在用PEBL-CAR-T处理或未处理的NOD/scid IL2R<sup>Gnull</sup>中再次注射ETP-ALL细胞。通过流式细胞术监测外周血和组织中ALL细胞的存在。<sup>19,26</sup>用裂解缓冲液(Sigma-Aldrich)进行红细胞裂解后,用抗小鼠CD45-PE-花青7(30-F11, Biolegend),以及抗人CD45-APC-H7(2D1)、CD7-PE(M-T701)、CD3-APC(SK7)、CD34-多甲藻素叶绿素蛋白(8G12)(全部来自于BD Biosciences)和CD33-亮紫421(WM53, Biolegend)对细胞进行染色。用Fortessa流式细胞仪,使用Diva和FlowJo软件来分析细胞。

[0257] 结果

[0258] 证实CD7为白血病中CAR-T细胞疗法的靶标

[0259] 在来自于获自49名T-ALL患者(包括14名ETP-ALL患者)的诊断骨髓样品的白血病细胞中,CD7表达中值百分比>99%(范围,79%->99%)。在仅3例(6.1%)中,CD7低于99%:在两例中为98%,且在一例中为79%(图1A)。在从14名患有复发性T-ALL的患者收集的样品中也观察到高的CD7表达(图1A)。诊断或复发时白血病细胞中CD7的平均荧光强度(MFI)始终超过在相同样品中的残留正常T细胞中测量的平均荧光强度。中值(范围)MFI在T-ALL细

胞中为20,617 (4,105-66,674),而在正常T细胞中为3,032 (1,301-9,582) ( $n=19$ ;  $P<0.0001$ ) (图1B)。

[0260] 为了确定化疗是否影响CD7表达,检查了在治疗期间收集的含有微小残留病(MRD)的骨髓样品。在所有54个样品(来自21名患者)中,>99%的残留白血病细胞为CD7+ (图1A)。在18名患者中,在疾病过程中监测CD7水平。如图1C和图1D所示,CD7在治疗期间仍然很高。这些结果证实CD7为T-ALL中CAR-T细胞疗法的靶标。

[0261] 抗CD7 CAR的设计和表达

[0262] 为了靶向CD7,设计了由抗CD7抗体TH69的scFv通过CD8 $\alpha$ 的铰链和跨膜结构域连接到4-1BB(CD137)和CD3 $\zeta$ 的信号传导结构域组成的抗CD7CAR(图2A)。该构建体在Jurkat细胞中的逆转录病毒转导导致抗CD7 CAR的高表达(图2B),其通过蛋白质印迹作为单体、二聚体和寡聚体出现(图2C)。

[0263] 为了确认TH69 scFv可以结合CD7,它以可溶形式产生并在CD7+MOLT-4和CD7-OP-1细胞上测试;MOLT-4细胞经标记而OP-1未标记(图8A)。此外,当MOLT-4细胞用抗CD7 scFv上清液预孵育时,用抗CD7单克隆抗体进行的染色显著减少;CD7 MFI( $\pm$ SD)从 $31,730 \pm 1,144$ 至 $5,987 \pm 241$  ( $n=3$ )。表达抗CD7CAR的Jurkat细胞与CD7+MOLT-4细胞形成聚集体,而仅用GFP或用抗CD19CAR转导的细胞不形成聚集体;相反,抗CD19 CAR诱导细胞与CD19+OP-1细胞聚集,而抗CD7 CAR不会(图8B)。将MOLT-4或CCRF-CEM与可溶性抗CD7 scFv预孵育防止聚集体形成(图8C)。

[0264] 为了确定抗CD7 CAR是否具功能性,在与MOLT4共同培养24小时后,在Jurkat细胞中测量活化标志物CD25和CD69的水平。在表达抗CD7 CAR的细胞中存在两种活化标志物的明显上调(图2D和2E)。总之,抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR可以与其同源抗原结合,并在连接时转导活化信号。

[0265] T细胞中抗CD7 CAR的表达引起互相残杀

[0266] 为了确定抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR在外周血T淋巴细胞中的作用,使用两种不同的方法来使其表达:逆转录病毒转导(图9A)和mRNA电穿孔。然而,它显著降低了T细胞活力。mRNA电穿孔后24小时的平均( $\pm$ SD)T细胞恢复率是未用mRNA电穿孔后恢复率的 $39.8\% \pm 13.0$  ( $n=7$ ) (图3A);如果通过病毒转导引入CAR,则细胞恢复率是经模拟物转导的T细胞的 $25.1\% \pm 16.2\%$  ( $n=10$ ) (图3B);总体而言,CAR表达在24小时后将细胞恢复率降低到 $31.1\% \pm 16.3\%$  ( $n=17$ )。延长细胞培养进一步增加了经CAR和模拟物转导的细胞之间的数量差异(图3C)。在不存在靶细胞的情况下,CAR表达诱导通过CD107a表达而显示的裂解性颗粒的胞吐作用(图3D),表明细胞恢复率受损是由互相残杀引起的。

[0267] CD7下调防止T细胞互相残杀并且不会影响T细胞功能。

[0268] 如果T细胞恢复率较差是通过由CAR与T细胞表达的CD7结合所介导的互相残杀引起的,则它应该在CAR表达之前通过下调CD7来改善。为了检验该预测,应用了最近基于与含有ER滞留结构域KDEL或KKMP[抗CD7蛋白表达阻断剂(PEBL)]的氨基酸序列连接的抗CD7 scFv的表达而开发的一种快速且实用的方法。(图3E)。这些将构建体固定在ER/高尔基体上,防止靶向蛋白的分泌或膜表达。<sup>39,40</sup>测试了3种抗-CD7 PEBL构建体,并且选择PEBL-1,将PEBL-1用于接下来的实验(图3E和图3F)。在用该构建体转导的所有T细胞中基本上消除了CD7表面表达,而保留了CD7 mRNA表达(图3F、图10A和图10B);在5个实验中, $98.1\% \pm 1.5\%$



经模拟物转导的T细胞是CD7<sup>+</sup>,而用抗CD7 PEBL转导的T细胞为2.0%±1.7% (P<0.0001) (图3G)。当在CD7下调的细胞中通过电穿孔使抗CD7 CAR表达时,通过流式细胞术可以清楚地检测到抗CD7 CAR (图3H)。通过在CD7敲低的细胞中表达CAR,T细胞活力显著改善 (图3I);在6个配对实验中,在先前已经用抗CD7 PEBL转导的T细胞中,CAR mRNA电穿孔后的活细胞恢复率始终较高 (P=0.008)。

[0269] 在抗CD7 PEBL转导后,CD4和CD8细胞的比例与经模拟物转导的细胞的比例相似 (图4A)。表面膜上不存在CD7表达不影响培养物中的T细胞存活 (图4B)。为了进一步探测用抗CD7 PEBL转导的T细胞的功能能力,将细胞工程化以表达抗CD19-CAR (图4C)。测试了它们在CD19+ALL细胞的存在下发挥细胞毒性,释放细胞毒性颗粒和分泌IFN  $\gamma$  的能力。如图4D、4E和4F所示,PEBL转导和表面CD7的缺乏并未改变CAR介导的细胞功能。

[0270] 抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR诱导针对CD7<sup>+</sup>白血病细胞的有力细胞毒性。

[0271] 使用抗CD7 PEBL制备CD7阴性T细胞,并用抗CD7-41BB-CD3 $\zeta$ CAR mRNA电穿孔。在与CD7<sup>+</sup>白血病细胞系MOLT-4、CCRF-CEM、Jurkat、Loucy或KG1a的共培养物中评估CD7阴性T细胞的抗白血病能力。如图5A所示,CAR表达显著增加细胞毒性。PEBL-CAR T细胞针对从患者获得的原代T-ALL细胞也非常有效 (图5B)。

[0272] 将PEBL-CAR T细胞的细胞毒性与未用PEBL转导的细胞中在CAR电穿孔后恢复的残留T细胞的细胞毒性进行比较。在用来自3个供体的细胞进行的45个实验中,PEBL-CAR细胞的细胞毒性始终超过非PEBL T细胞的细胞毒性 (图5C)。当比较CD107a (图5D)、IFN  $\gamma$  (图11A)和TNF $\alpha$  (图11B)的表达时,也观察到前者细胞的优良活性。通过依次逆转录病毒转导表达PEBL和CAR也对患者来源的T-ALL细胞 (图5E)和细胞系 (图12)产生有力的细胞毒性。在CD7<sup>+</sup>靶细胞的存在下抗CD7 PEBL-CAR-T细胞的增殖远高于没有通过PEBL下调CD7的CAR-T的增殖 (P<0.01) (图5F)。最后,将抗CD7 PEBL-CAR T细胞发挥的细胞毒性与表达抗CD19-41BB-CD3 $\zeta$ CAR<sup>5</sup>的T细胞针对相同靶细胞的细胞毒性进行比较。为此,用CD19转导CCRF-CEM和Jurkat细胞,并且还在先前用抗CD7 PEBL转导的细胞中表达CAR (图13A和13B)。抗CD7和抗CD19 CAR T细胞具有相似的短期和长期细胞毒性 (图13C和13D);在CD9+CD7<sup>+</sup>靶细胞存在下的长期增殖能力对于抗CD7 CAR-T细胞而言略低 (图13E),这可能是由于靶细胞上CD7相对于CD19的较低表达所致 (图13B)。

[0273] 鼠T-ALL模型中抗CD7 PEBL-CAR T细胞的抗白血病活性

[0274] 为了进一步测量抗CD7 PEBL-CAR T细胞的抗肿瘤能力,为NCR/scid IL2R<sup>gnull</sup>植入CCRF-CEM细胞。用抗CD7 PEBL和抗CD7 CAR进行逆转录病毒转导的T细胞产生相当大的抗白血病作用,白血病细胞负载显著降低并且白血病细胞生长减少 (图6A-6C;图14A和14B)。白血病细胞注射后3周,通过流式细胞术检测的外周血中的CCRF-CEM细胞中值百分比,对于对照小鼠 (n=5)而言为68%并且对于接受单独GFP-T细胞的患者 (n=5)而言为67%,但是它们在用抗CD7 PEBL-CAR T细胞处理的小鼠中无法检测到 (图15A)。抗CD7 PEBL-CAR T细胞处理后发生的复发不是由于缺乏CD7的CCRF-CEM细胞亚群引起的;白血病细胞继续表达高水平的CD7,并且对抗CD7 CAR细胞毒性的敏感性仍然很高,无论CCRF-CEM细胞是源自复发小鼠的肝脏或脾脏还是直接源自原始细胞培养物 (图15B)。

[0275] 为了在体内针对原代白血病细胞来测试PEBL-CAR T细胞,使用ETP-ALL的PDX模型。PDX模型允许在诊断时源自ETP-ALL患者的白血病细胞在NOD/scid IL2R<sup>gnull</sup>小鼠中增

殖。白血病细胞保留了与诊断时确定的免疫表型匹配的免疫表型,有CD7、CD34、CD33表达而缺乏表面CD3、CD1a、CD8和CD5(图16);细胞不能存活和离体扩增,需要注射到小鼠体内进行增殖。在CAR-T处理时,所有小鼠的外周血中均具有ETP-ALL(图7A)。如图7B所示,ETP-ALL细胞代表骨髓、脾脏和肺部中的大多数白细胞。在施用PEBL-CAR T细胞(在一只小鼠中施用 $2 \times 10^7$ 个,其余4只中施用 $2 \times 10^6$ 个)后,外周血中的白血病细胞数量急剧减少,而PEBL-CAR-T细胞在所有小鼠中变得可检测到(图7A)。在血液涂片中,破碎细胞突出,表明白白血病细胞裂解(图7C)。在所有5只对照小鼠中白血病进展,当ETP-ALL $\geq$ 外周血单核细胞的80%后,对这些小鼠施安乐死。用 $2 \times 10^7$ 个PEBL-CAR-T细胞处理的小鼠在PEBL-CAR-T细胞输注后23天死于明显的移植物抗宿主病(GvHD)。在血液、骨髓、肝脏、脾脏、肺部和脑中无法检测到ETP-ALL,而在所有组织中均可检测到PEBL-CAR T细胞(图7D和7E)。用 $2 \times 10^6$ 个PEBL-CAR T细胞处理的4只小鼠在输注后25天(n=1)至39天(n=3)存活,无GvHD体征。

#### [0276] 讨论

[0277] 用CAR-T细胞可以实现B细胞白血病和淋巴瘤患者的持久缓解,但对于T细胞恶性肿瘤患者而言缺乏有效选择。为了弥补这一差距,本文开发并描述了可以快速转化为临床干预的CAR-T细胞方法。靶向CD7,一种广泛表达的T细胞标志物,其甚至在暴露于化疗的T-ALL细胞中也高度稳定。设计了第二代抗CD7 CAR。确定抑制T细胞中CD7表面表达是必要的;没有它,CAR导致T细胞严重损失,并且无法实现CAR-T细胞的全部功能潜力。抗CD7 PEBL的转导导致CD7表达几乎瞬时消除。抗CD7 CAR在此类细胞中的表达在体外以及在T-ALL的异种移植物和PDX模型中产生有力的抗白血病活性。因此,通过使用该策略,快速产生大量CAR-T细胞并用于对T细胞恶性肿瘤(包括最具侵袭性的形式之一ETP-ALL)发挥强大且特异性的细胞毒性。

[0278] 本文所述的下调内源性CD7的PEBL技术基于使用针对与ER/高尔基体滞留基序偶合的靶向抗原的scFv。以这种方式,任何新合成的CD7保持锚定在ER和/或高尔基体中,并且防止其表面表达。这种方法在下调CD7和抑制CAR介导的互相残杀方面非常有效。重要的是,CD7的细胞内滞留不会改变T细胞功能并允许正常扩增、细胞因子分泌和细胞毒性。这与CD7缺陷小鼠的研究结果一致,该小鼠在淋巴组织中显示出正常淋巴细胞群。<sup>41,42</sup>下调CD7的另一种方法是应用基因编辑方法,诸如大范围核酸酶、TALEN或CRISPR/Cas9。<sup>43</sup>为此,最近的一项研究报道了在通过CRISPR/Cas9而使CD7基因缺失的T细胞中表达的抗CD7 CAR。<sup>9,44</sup>除了可具有临床影响的共刺激分子的差异外(本文所述的CAR具有4-1BB而不是CD28),<sup>45,46</sup>PEBL策略的高特异性和实用性使其对于当前的临床应用而言特别有吸引力。这种方法需要用携带CAR的相同病毒载体进行简单转导,作为两次连续转导或用携带两种构建体的双顺反子载体进行单次转导。它非常适合已建立的临床级细胞制造工艺,并且不会引起与脱靶活性相关的可能调控问题。<sup>47,48</sup>

[0279] CD7是早期T细胞分化的标志性分子;它几乎普遍在T-ALL中表达,在正常细胞中,其表达仅限于T细胞。<sup>19,29-32</sup>在T细胞淋巴瘤患者中使用抗CD7-蓖麻毒蛋白-A-链免疫毒素进行的临床研究中,剂量限制性毒性是血管渗漏综合征,一种用其它毒素偶联物所见到的副作用;在各种组织的内皮细胞中未发现抗CD7的结合。<sup>49</sup>然而,在评估抗CD7 PEBL-CAR T细胞的急性毒性潜力的早期研究中可能会考虑通过mRNA电穿孔进行的CAR瞬时表达。抗CD7CAR疗法的一个问题是输注的细胞会引起正常T细胞耗尽,导致免疫缺陷。可以设想最初应用该

技术作为降低高危T-ALL患者的MRD的手段,从而使异基因造血干细胞移植的成功率最大化。<sup>50</sup>在此类情况下,抗CD7 CAR T细胞将通过移植调适而消除并且T细胞区室从供体干细胞重组。在移植环境外,一旦实现白血病根除,“自杀基因”就可以激活。<sup>51</sup>最终,这可能不成问题,因为输注的抗CD7 T细胞(保留其内源性CD3/TCR复合物)可能重组足够广泛的T细胞库。为此,应该注意到,已经描述了人血淋巴细胞中不表达CD7的CD4记忆和CD8效应T细胞亚群,<sup>52,53</sup>并且T-ALL细胞表达CD7的水平高于正常T细胞。因此,即使在CD7定向治疗后,CD7-dim亚群也可能有助于重新填充T细胞库。

[0280] 对于高危疾病患者而言T-ALL的标准治疗主要依赖于强化化疗加上造血干细胞移植。结果远不能令人满意,并且具有相当大的发病率和死亡率。<sup>54,55</sup>本文提出的研究结果表明,输注抗CD7 PEBL-CAR T细胞可以显著增强或者可能取代现有的基于化疗和移植物的策略。可以想象,CAR表达与T细胞中靶向抗原的下调一起也应适用于其它T细胞标志物,诸如CD3、CD2和CD5,其表达在T细胞淋巴组织增生性肿瘤中普遍存在。因为一部分高危急性髓性白血病病例表达CD7,<sup>19,30,56</sup>所以测试抗CD7 CAR-T细胞对这种白血病亚型的潜力也是有根据的。

[0281] 参考文献

[0282] 1.Eshhar Z,Waks T,Gross G,Schindler DG.Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.Proc Natl Acad Sci USA 1993;90(2):720-724。

[0283] 2.Geiger TL,Leitenberg D,Flavell RA.The TCR zeta-chain immunoreceptor tyrosine-based activation motifs are sufficient for the activation and differentiation of primary T lymphocytes.J Immunol 1999;162(10):5931-5939。

[0284] 3.Brentjens RJ,Latouche JB,Santos E等人,Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15.Nat Med 2003;9(3):279-286。

[0285] 4.Cooper LJ,Topp MS,Serrano LM等人,T-cell clones can be rendered specific for CD 19:toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect.Blood 2003;101(4):1637-1644。

[0286] 5.Imai C,Mihara K,Andreansky M,Nicholson IC,Pui CH,Campana D.Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia.Leukemia 2004;18:676-684。

[0287] 6.Rosenberg SA,Restifo NP.Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.Science 2015;348(6230):62-68.7.Brentjens RJ,Santos E,Nikhamin Y等人,Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts.Clin Cancer Res 2007;13(18Pt1):5426-5435。

[0288] 8.Haso W,Lee DW,Shah NN等人,Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.Blood 2013;121(7):1165-1174。

- [0289] 9.Nadler LM,Anderson KC,Marti G等人,B4,a human Blymphocyte-associated antigen expressed on normal,mitogen-activated,and malignant B lymphocytes.J Immunol 1983;131(1):244-250。
- [0290] 10.Campana D,Janossy G,Bofill M等人,Human B cell development.I.Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue.J Immunol 1985;134(3):1524-1530。
- [0291] 11.Porter DL,Levine BL,Kalos M,Bagg A,June CH.Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med2011;365(8):725-733。
- [0292] 12.Grupp SA,Kalos M,Barrett D等人,Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.N Engl J Med 2013;368(16):1509-1518。
- [0293] 13.Till BG,Jensen MC,Wang J等人,CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28and 4-1BB domains:pilot clinical trial results.Blood 2012;119(17):3940-3950。
- [0294] 14.Kochenderfer JN,Dudley ME,Feldman SA等人,B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD 19chimeric-antigen-receptor-transduced T cells.Blood 2012;119(12):2709-2720。
- [0295] 15.Davila ML,Riviere I,Wang X等人,Efficacy and Toxicity Management of19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.Sci Transl Med 2014;6(224):224ra225。
- [0296] 16.Maude SL,Frey N,Shaw PA等人,Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med 2014;371(16):1507-1517。
- [0297] 17.Lee DW,Kochenderfer IN,Stetler-Stevenson M等人,T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase 1dose-escalation trial.Lancet 2015;385(9967):517-528。
- [0298] 18.Turtle CJ,Hanafi LA,Berger C等人,CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+composition in adult B cell ALL patients.J Clin Invest 2016;126(6):2123-2138。
- [0299] 19.Coustan-Smith E,Mullighan CG,Onciu M等人,Early T-cell precursor leukaemia:a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia.Lancet Oncol 2009;10(2):147-156。
- [0300] 20.Zhang J,Ding L,Holmfeldt L等人,The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.Nature 2012;481(7380):157-163。
- [0301] 21.Inukai T,Kiyokawa N,Campana D等人,Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia:results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15.Br J Haematol 2012;156(3):358-365。
- [0302] 22.Neumann M,Heesch S,Gokbuget N等人,Clinical and molecular

characterization of early T-cell precursor leukemia:a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations.Blood Cancer J 2012;2(1):e55。

[0303] 23.Jain N,Lamb AV,O'Brien S等人,Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL)in adolescents and adults:ahigh-risk subtype.Blood 2016;127(15):1863-1869。

[0304] 24.Marks DI,Rowntree C.Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia.Blood 2017;129(9):1134-1142。

[0305] 25.Campana D,Pui CH.Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia.Blood 2017;129(14):1913-1918。

[0306] 26.Coustan-Smith E,Sancho J,Hancock ML等人,Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia.Blood 2002;100:2399-2402。

[0307] 27.Mihara K,Yanagihara K,Takigahira M等人,Activated T-cell-mediated immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 in B-cell non-Hodgkin lymphoma.J Immunother 2009;32(7):737-743。

[0308] 28.Mamonkin M,Rouce RH,Tashiro H,Brenner MK.A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies.Blood 2015;126(8):983-992。

[0309] 29.Haynes BF,Eisenbarth GS,Fauci AS.Human lymphocyte antigens: production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets.Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76(11):5829-5833。

[0310] 30.Vodinelich L,Tax W,Bai Y,Pegram S,Capel P,Greaves MF.A monoclonal antibody (WT1)for detecting leukemias of T-cell precursors(T-ALL) .Blood 1983; 62(5):1108-1113。

[0311] 31.Janossy G,Coustan-Smith E,Campana D.The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases.Leukemia 1989;3(3):170-181。

[0312] 32.Yeoh EJ,Ross ME,Shurtleff SA等人,Classification,subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling.Cancer Cell 2002;1:133-143。

[0313] 33.Manabe A,Coustan-Smith E,Kumagai M等人,Interleukin-4 induces programmed cell death(apoptosis)in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia.Blood 1994;83(7):1731-1737。

[0314] 34.Peipp M,Kupers H,Saul D等人,A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells.Cancer Res 2002;62(10):2848-2855。

[0315] 35.Kudo K,Imai C,Lorenzini P等人,T lymphocytes expressing a CD 16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing.Cancer

Res2014;74(1):93-103。

[0316] 36.Shimasaki N,Fujisaki H,Cho D等人,A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies.Cytotherapy.2012;14(7):830-40。

[0317] 37.Shimasaki N,Campana D.Natural killer cell reprogramming with chimeric immune receptors.Methods Mol Biol 2013;969:203-220。

[0318] 38.Chang YH,Connolly J,Shimasaki N,Mimura K,Kono K,Campana D.AChimeric Receptor with NKG2D Specificity Enhances Natural Killer Cell Activation and Killing of Tumor Cells.Cancer Res 2013;73(6):1777-1786。

[0319] 39.Munro S,Pelham HR.AC-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins.Cell 1987;48(5):899-907。

[0320] 40.Jackson MR,Nilsson T,Peterson PA.Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum.EMBO J1990;9(10):3153-3162。

[0321] 41.Bonilla FA,Kokron CM,Swinton P,Geha RS.Targeted gene disruption of murine CD7.Int Immunol 1997;9(12):1875-1883。

[0322] 42.Lee DM,Staats HF,Sundy JS等人,Immunologic characterization of CD7-deficient mice.J Immunol 1998;160(12):5749-5756。

[0323] 43.Boettcher M,McManus MT.Choosing the right tool for the job:RNAi,TALEN,or CRISPR.Mol Cell 2015;58(4):575-585。

[0324] 44.Gomes-Silva D,Srinivasan M,Sharma S等人,CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies.Blood.2017May 24.pii:blood-2017-01-761320。

[0325] 45.Campana D,Schwarz H,Imai C.4-1BB chimeric antigen receptors.Cancer J 2014;20(2):134-140。

[0326] 46.Zhao Z,Condomines M,van der Stegen SJ等人,Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells.Cancer Cell 2015;28(4):415-428。

[0327] 47.Tsai SQ,Joung JK.Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases.Nat Rev Genet 2016;17(5):300-312。

[0328] 48.Cameron P,Fuller CK,Donohoue PD等人,Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage.Nat Methods 2017;14(6):600-606。

[0329] 49.Frankel AE,Laver JH,Willingham MC,Burns LJ,Kersey JH,Vallera DA.Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin.Leuk Lymphoma1997;26(3-4):287-298。

[0330] 50.Leung W,Pui CH,Coustan-Smith E等人,Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia.Blood 2012;120(2):

468-72。

[0331] 51. Straathof KC, Spencer DM, Sutton RE, Rooney CM. Suicide genes as safety switches in T lymphocytes. *Cytotherapy* 2003;5(3):227-230。

[0332] 52. Reinhold U, Abken H, Kukel S 等人, CD7-T cells represent a subset of normal human blood lymphocytes. *J Immunol* 1993;150(5):2081-2089。

[0333] 53. Aandahl EM, Sandberg JK, Beckerman KP, Tasken K, Moretto WJ, Nixon DF. CD7 is a differentiation marker that identifies multiple CD8 T cell effector subsets. *J Immunol* 2003;170(5):2349-2355。

[0334] 54. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;2016(1):580-588。

[0335] 55. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015;121(15):2517-2528。

[0336] 56. Kita K, Miwa H, Nakase K 等人, Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. *The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. Blood* 1993;81(9):2399-2405。

[0337] 本文引用的所有专利、公开的申请和参考文献的教导通过引用整体并入。

[0338] 虽然已经参考本发明的示例实施例具体示出和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不脱离由所附权利要求所涵盖的本发明的范围的情况下,可以在形式和细节上做各种变化。

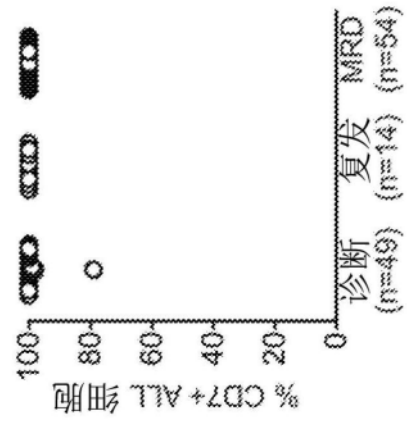


图1A

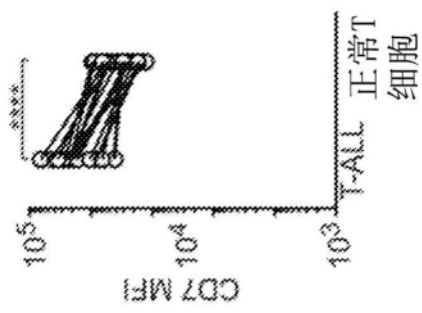


图1B

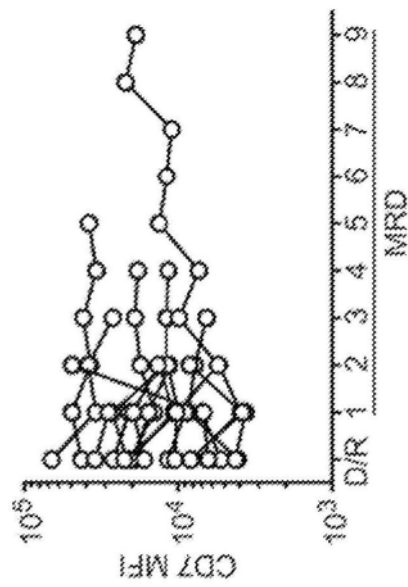


图1C



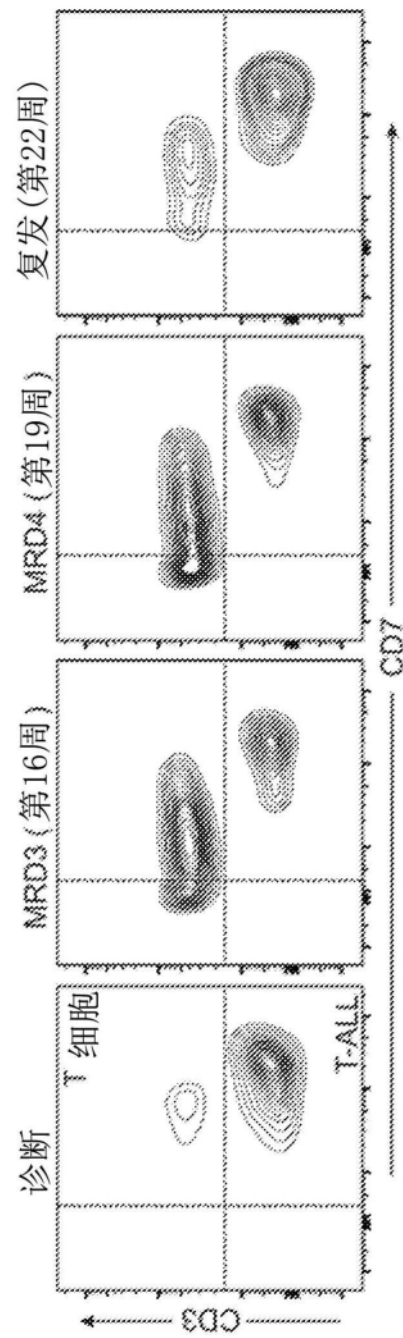


图1D

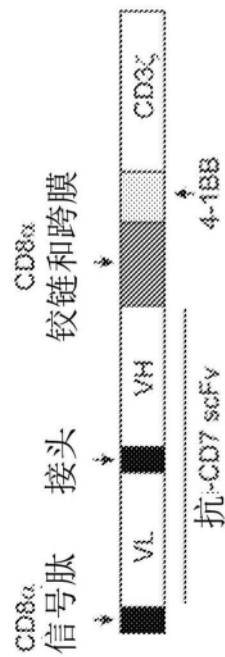


图2A

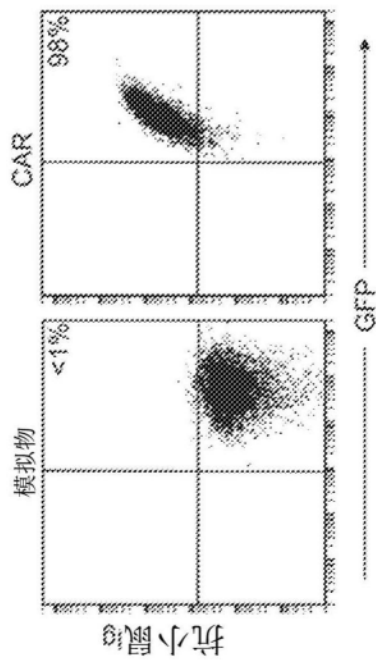


图2B

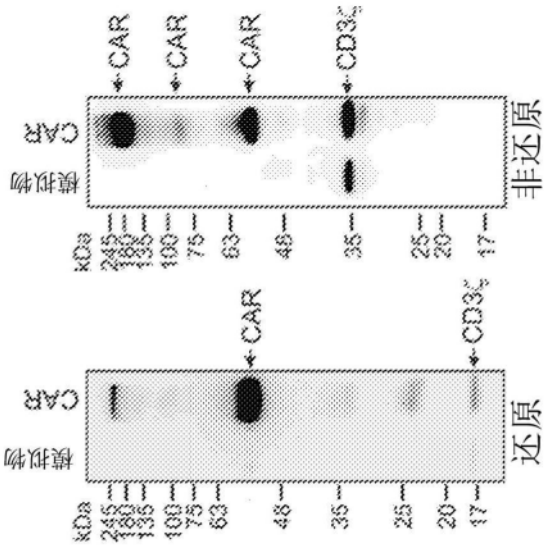


图2C

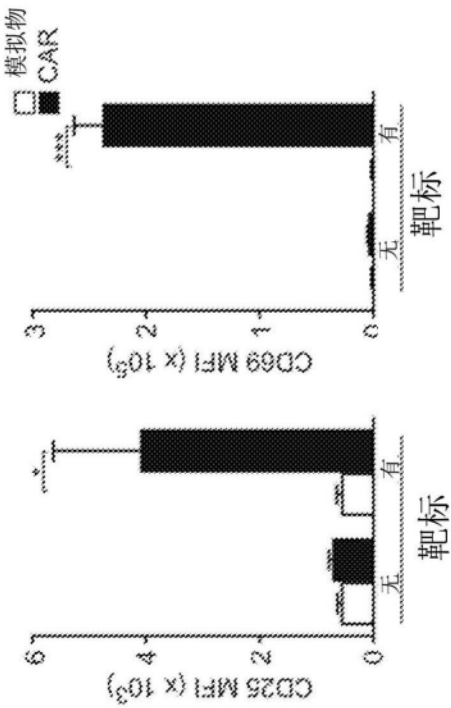


图2D

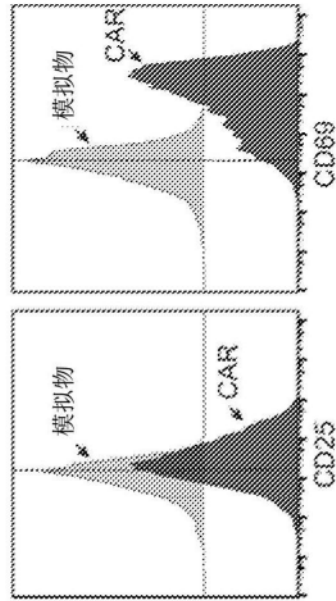


图2E

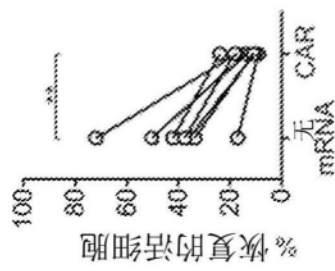


图3A

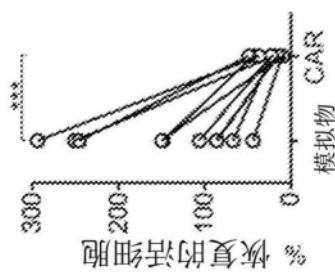


图3B

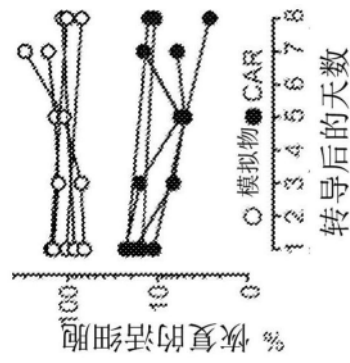


图3C

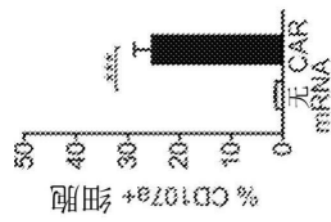


图3D

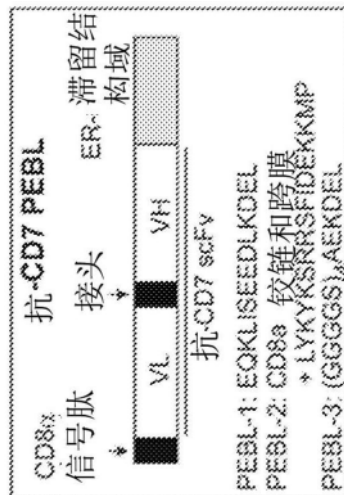


图3E

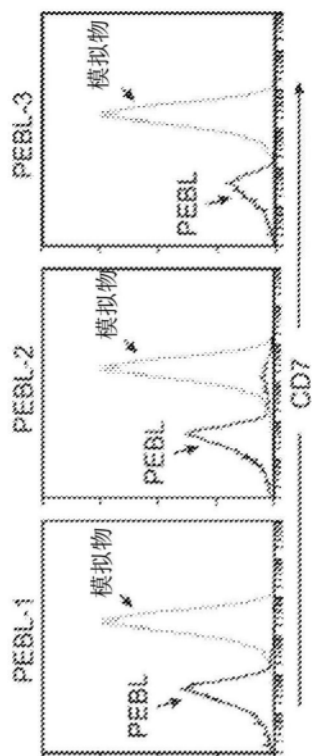


图3F

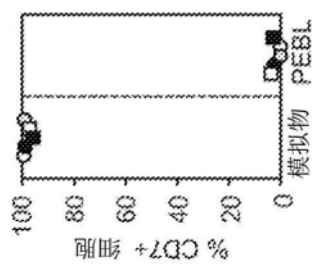


图3G

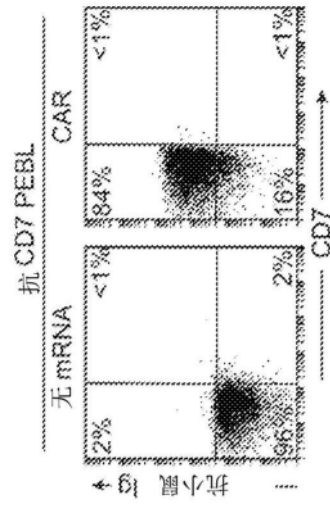


图3H

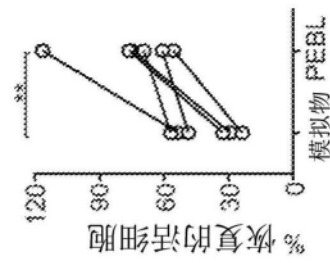


图3I

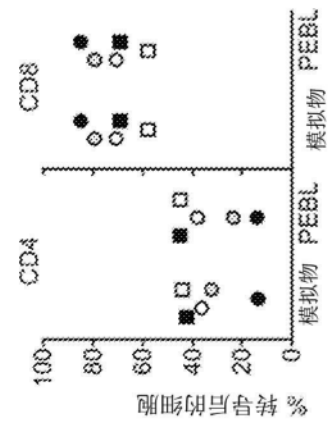


图4A

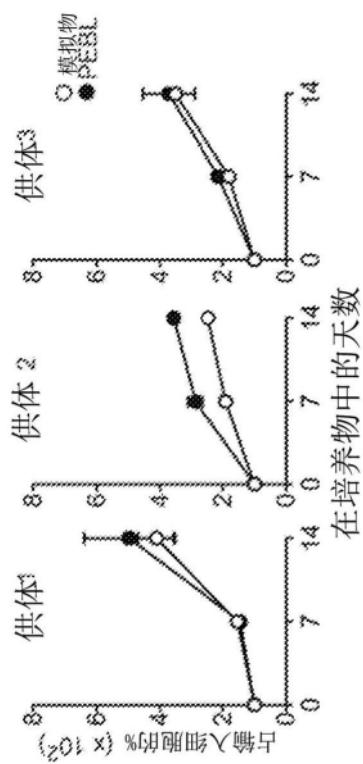


图4B





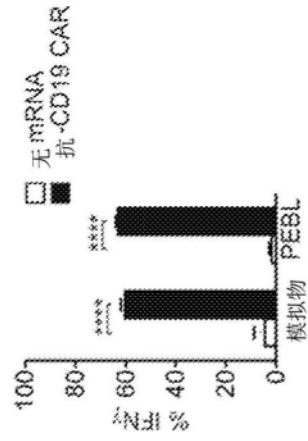


图 4F

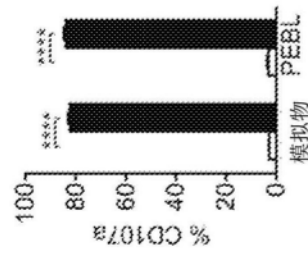


图 4E

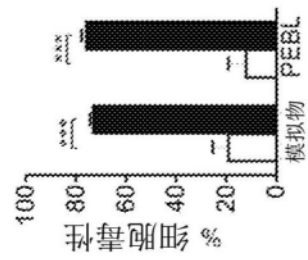


图 4D

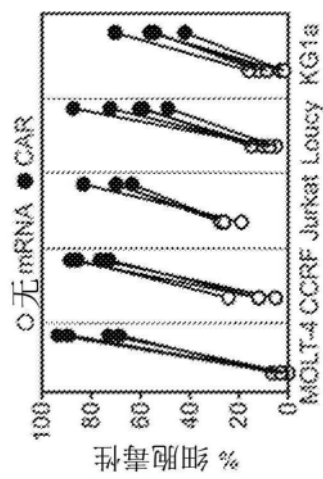


图5A

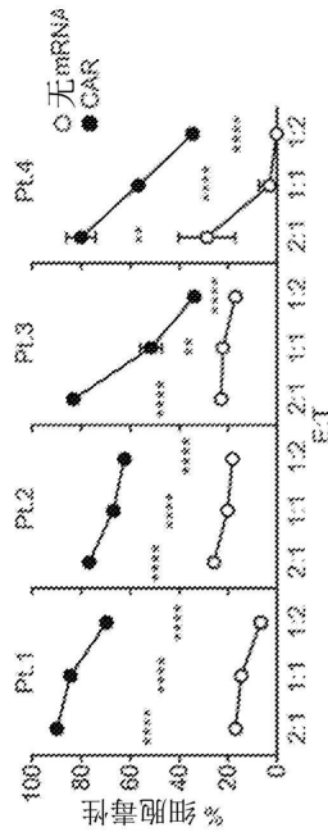


图5B

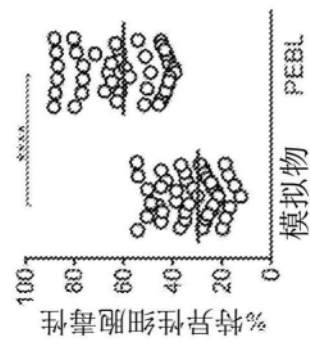


图5C

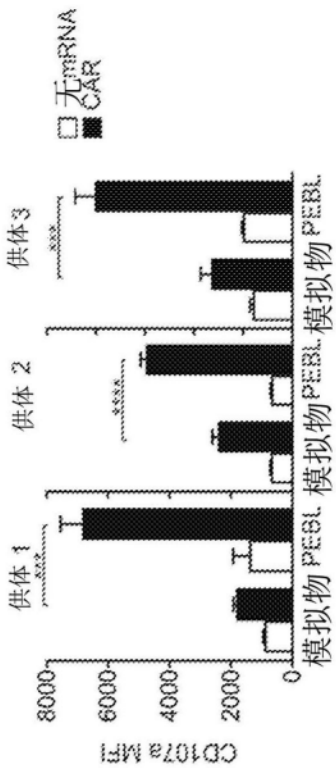


图5D

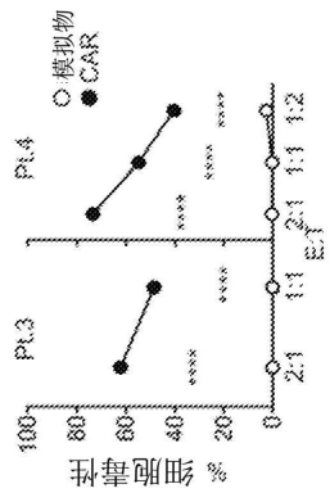


图5E

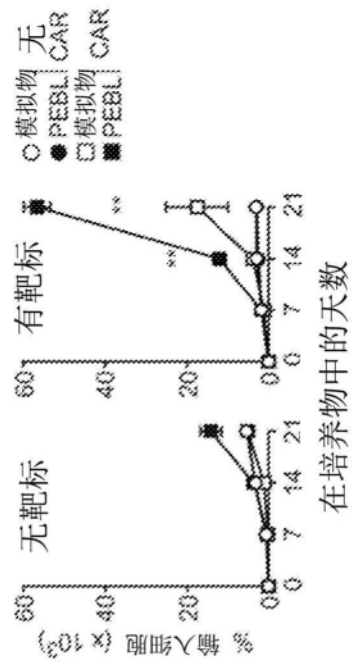


图5F

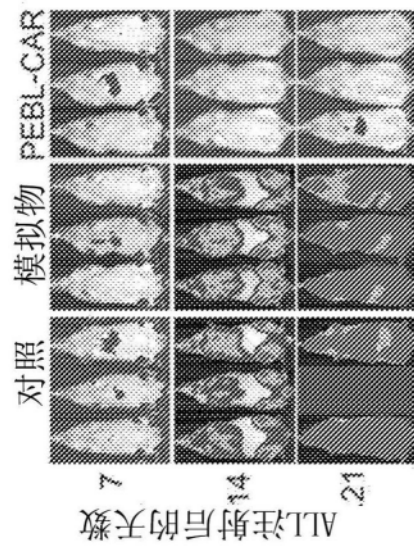


图6A

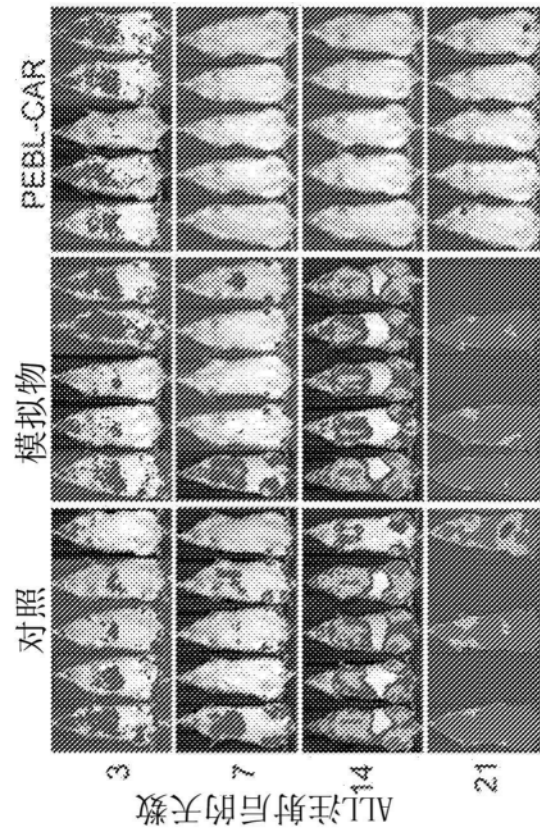


图6B

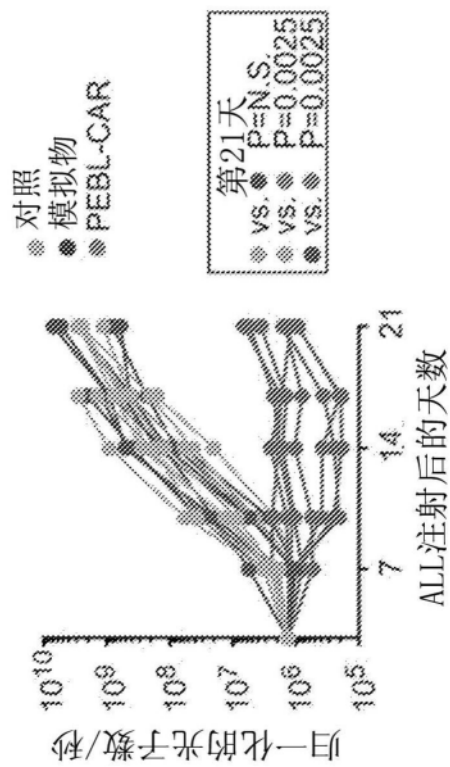


图6C

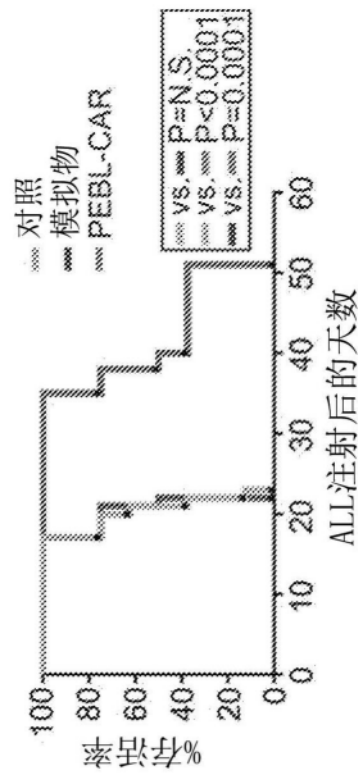


图6D

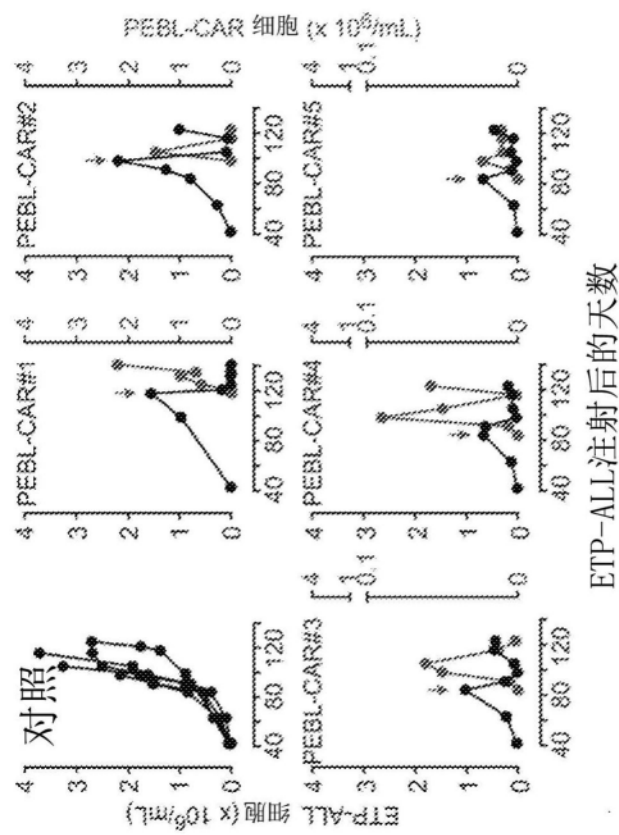


图7A

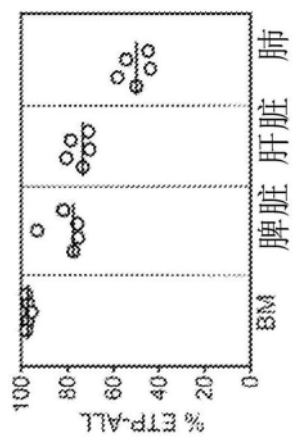


图7B



图7C



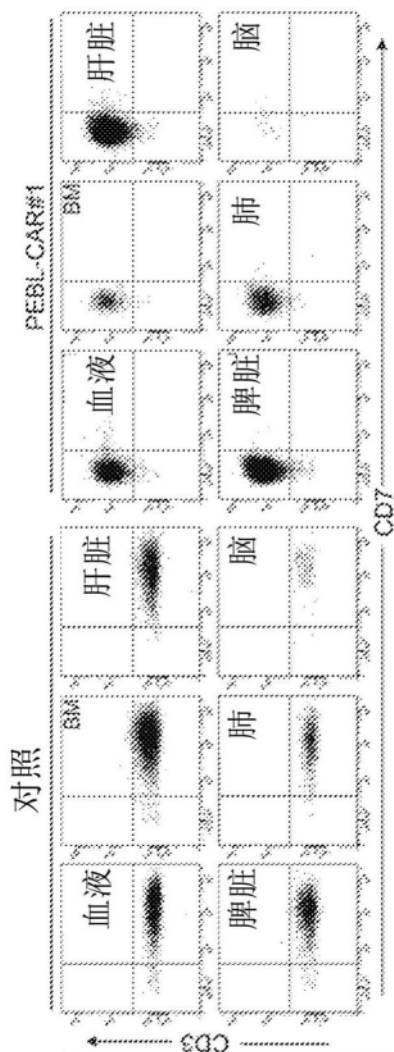


图7D

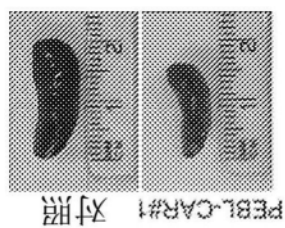


图7E

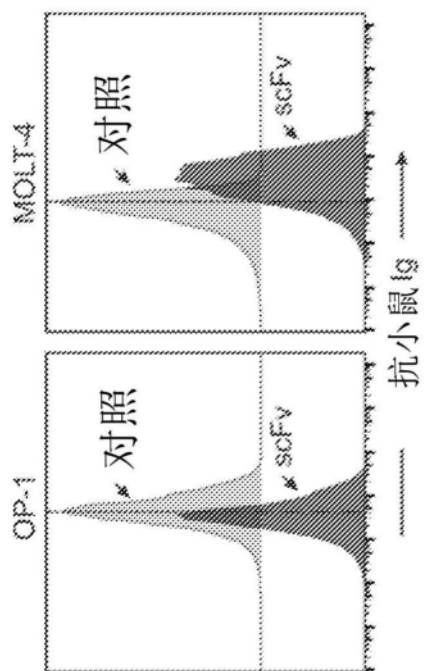


图8A

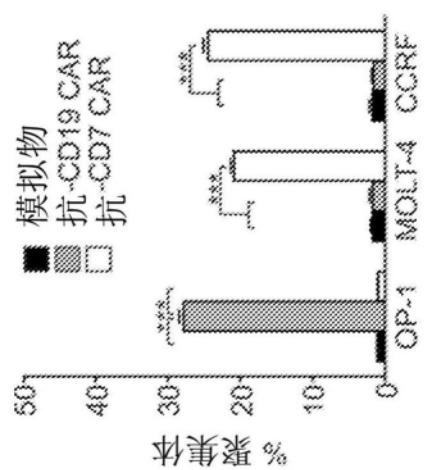


图8B

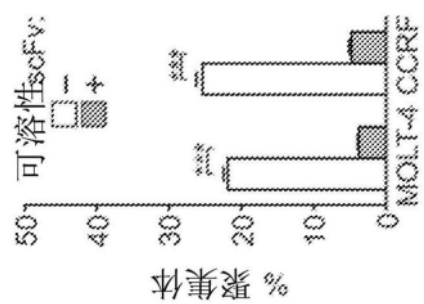


图8C

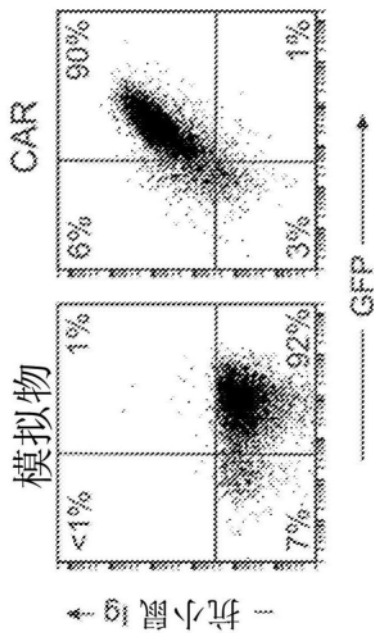


图9A

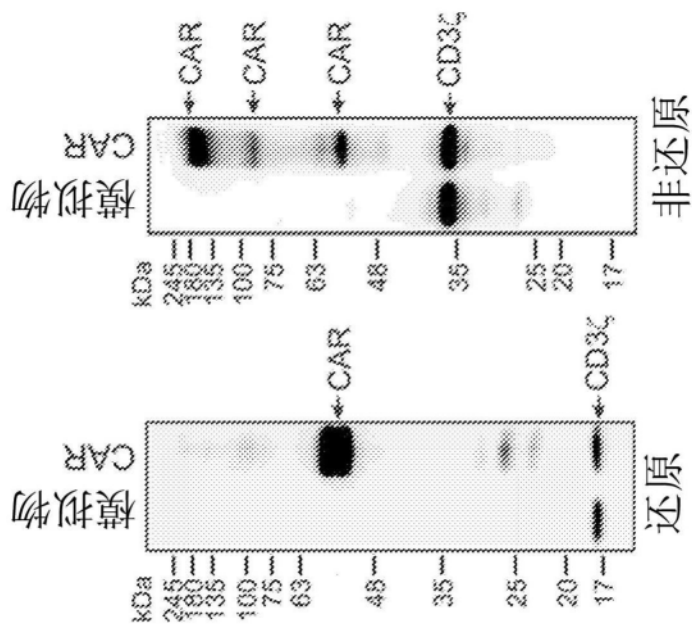


图9B

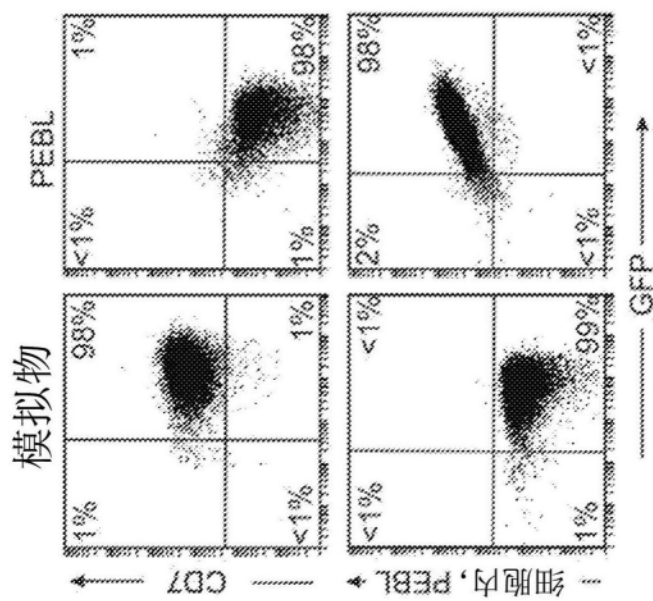


图10A

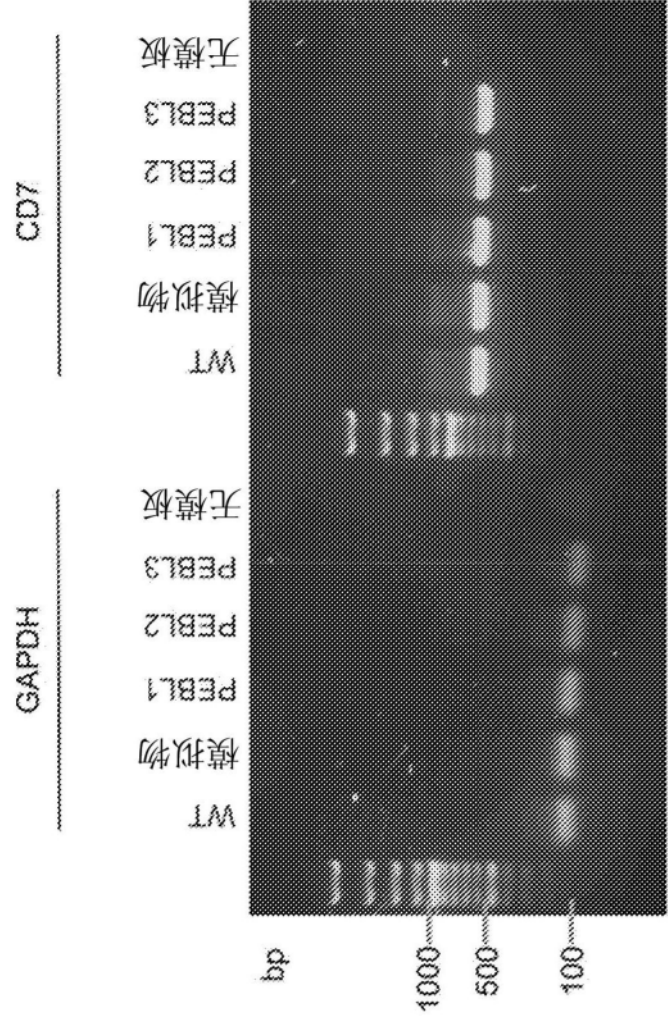


图10B

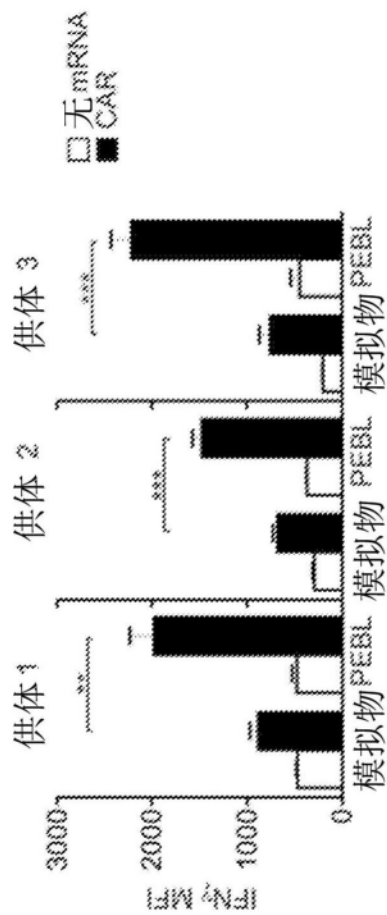


图11A

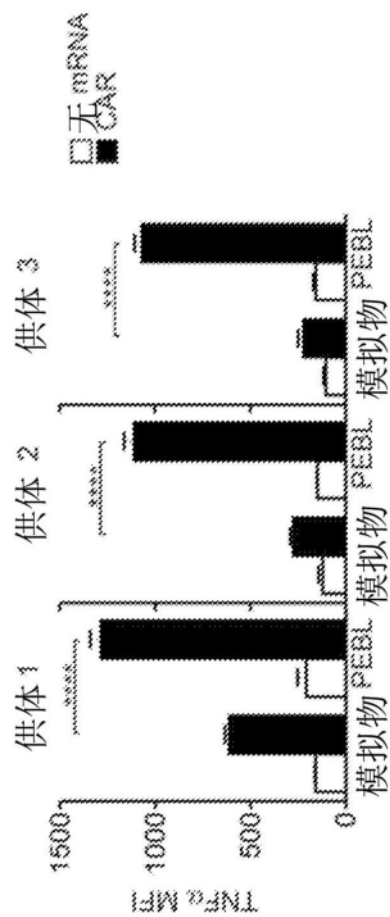


图11B

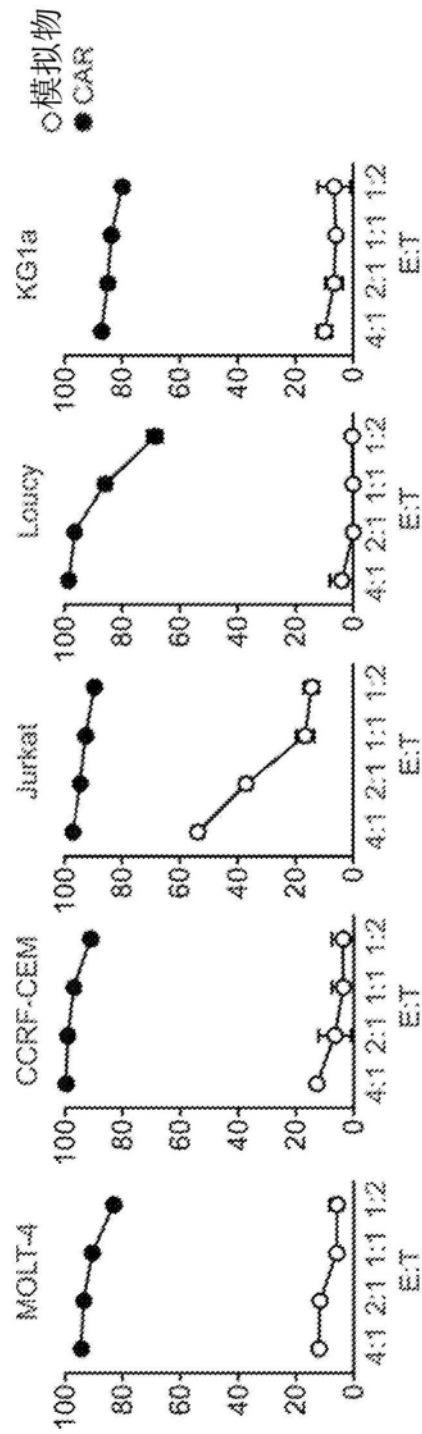


图12



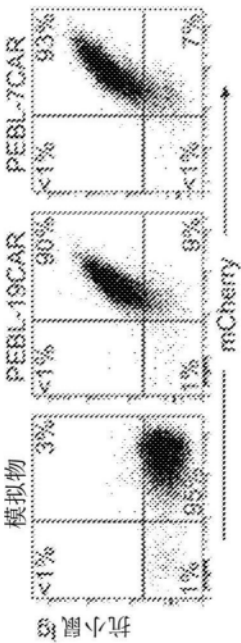


图13A

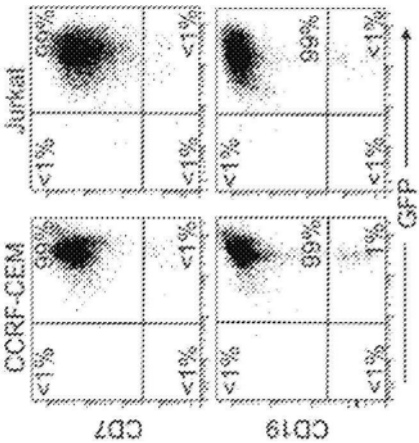


图13B

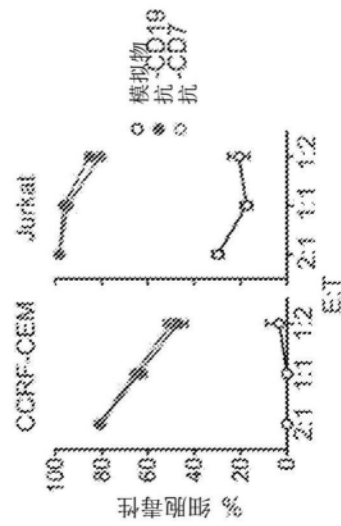


图13C

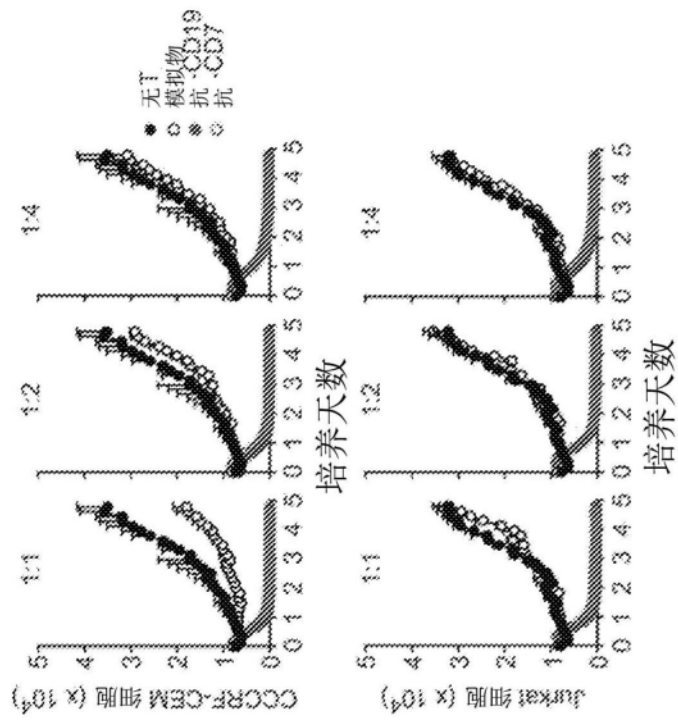


图13D

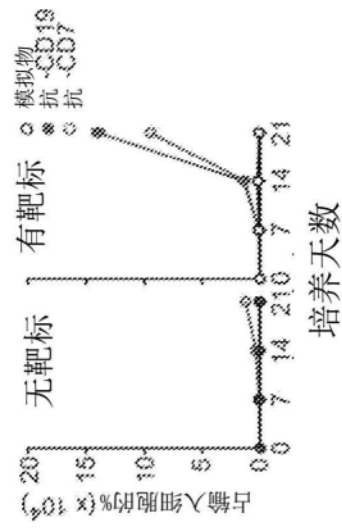


图13E

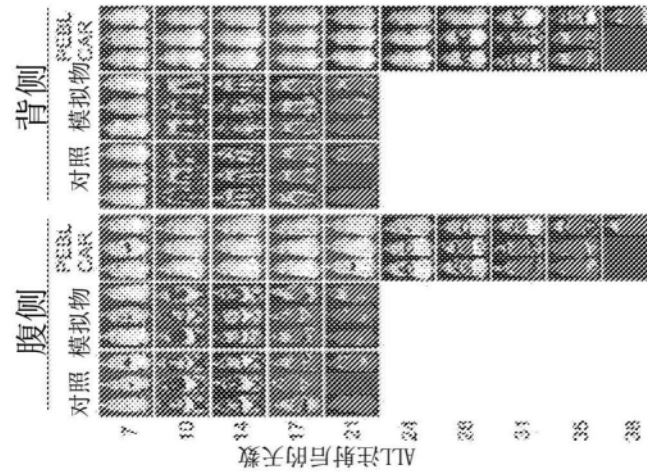


图14A

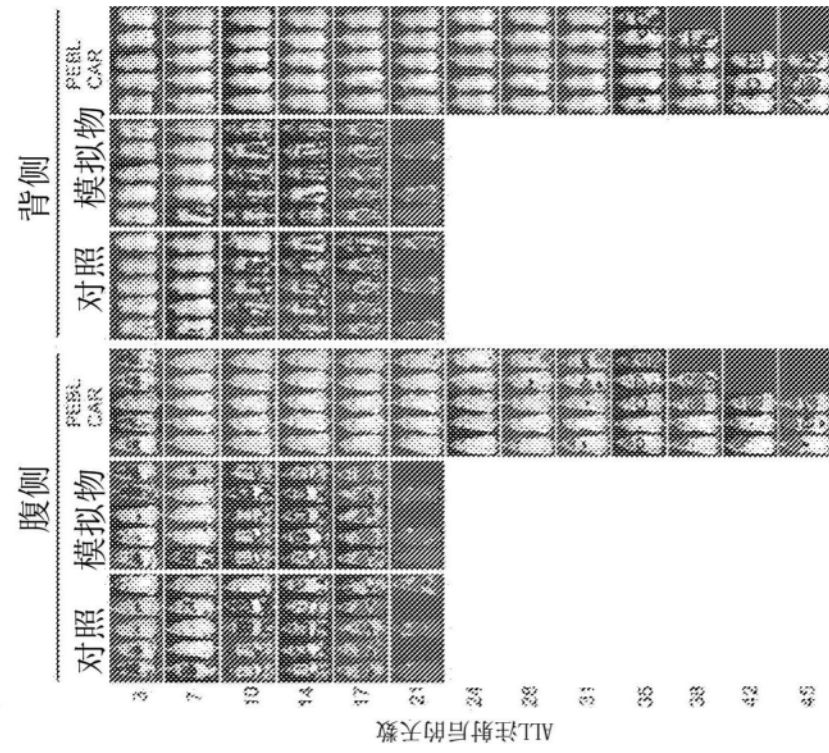


图14B

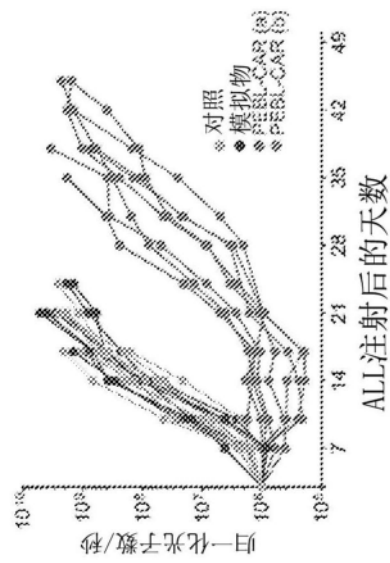


图14C

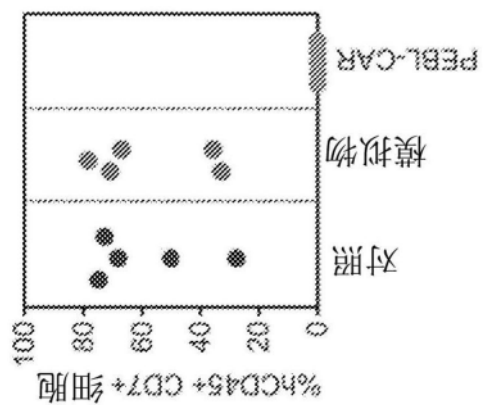


图15A

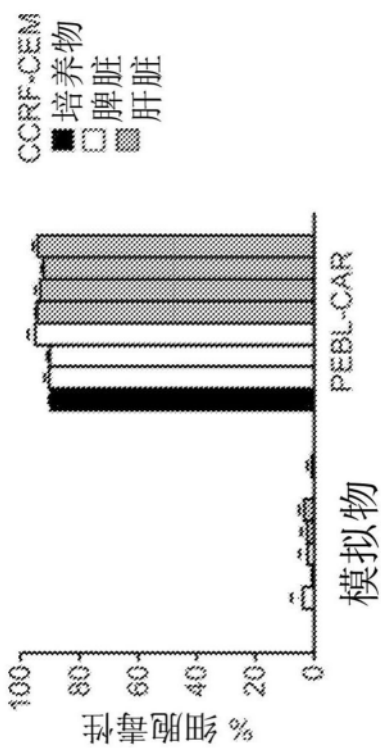


图15B

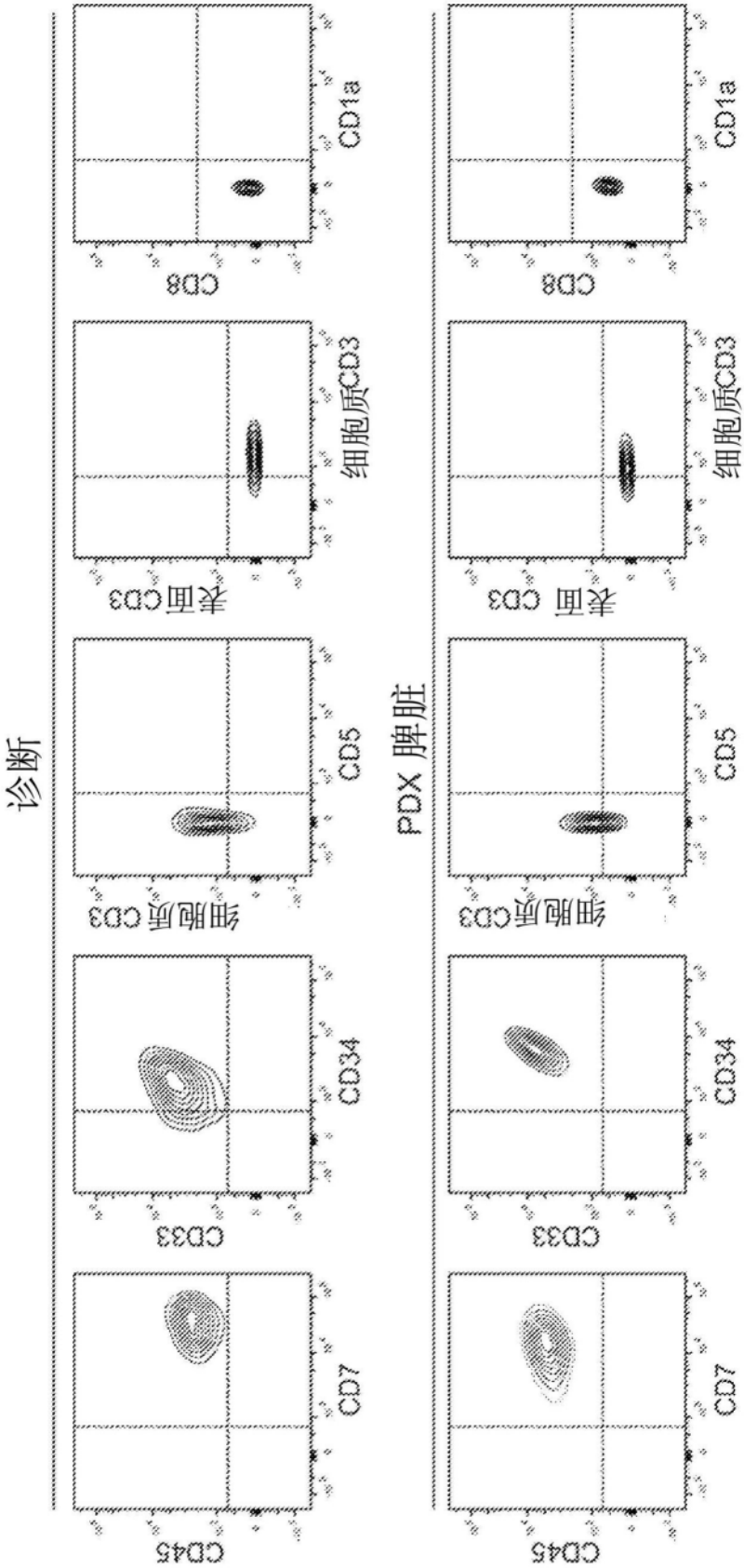


图16

