



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397864 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180028302.8

(22) 申请日 2021.04.16

(30) 优先权数据

63/011,494 2020.04.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/027648 2021.04.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/211948 EN 2021.10.21

(71) 申请人 2赛文缇生物公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 约翰·W·埃文斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书10页 说明书65页

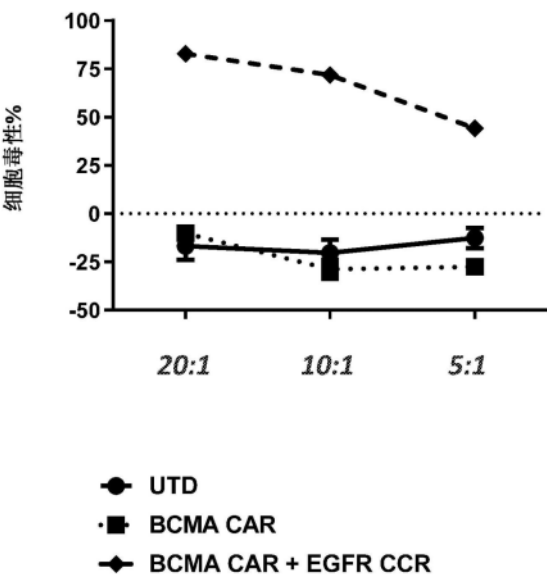
序列表20页 附图15页

(54) 发明名称

经修饰的CCR多肽和其用途

(57) 摘要

本公开提供了经改进的嵌合共刺激受体 (CCR)、融合蛋白、经基因修饰的免疫效应细胞以及这些组合物用于治疗疾病的用途。



1. 一种融合多肽,其包括:
 - a) 嵌合抗原受体 (CAR), 所述CAR包括第一铰链区;
 - b) 多肽切割信号;以及
 - c) 嵌合共刺激受体 (CCR), 所述CCR包括第二铰链区, 相比于包括未经修饰的铰链区的CCR, 所述第二铰链区被修饰成在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。
2. 一种融合多肽,其包括:
 - a) 嵌合抗原受体 (CAR), 所述CAR包括第一铰链区;
 - b) 多肽切割信号;以及
 - c) 嵌合共刺激受体 (CCR), 所述CCR包括第二铰链区, 所述第二铰链区包括被另一个氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。
3. 根据权利要求2所述的融合多肽, 其中相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR, 所述第二铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。
4. 根据权利要求2或权利要求3所述的融合多肽, 其中相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR, 所述第二铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的融合多肽, 其中所述第一铰链区是经修饰的, 并且任选地, 其中所述修饰包括一个或多个氨基酸取代或缺失。
6. 根据权利要求5所述的融合多肽, 其中经修饰的第一铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。
7. 根据权利要求6所述的融合多肽, 其中相比于包括未经修饰的第一铰链区的CAR, 所述经修饰的第一铰链区在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。
8. 根据权利要求6所述的融合多肽, 其中相比于包括未经修饰的第一铰链区的CAR, 所述经修饰的第一铰链区在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。
9. 根据权利要求2至8中任一项所述的融合多肽, 其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区内的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述第一铰链区和所述第二铰链区源自同一蛋白质。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述第一铰链区和所述第二铰链区源自不同蛋白质。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述第二铰链区包括选自以下组成的组的铰链区或其功能片段: CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD-1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽, 其中所述第一铰链区包括选自以下组成的组的铰链区或其功能片段: CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD-1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链

链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述第二铰链区为CD8 α 铰链区或其功能片段。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区为CD8 α 铰链区或其功能片段。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和所述第二铰链区为CD8 α 铰链区或其功能片段。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的融合多肽,其中所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代。

18. 根据权利要求14至16中任一项所述的融合多肽,其中所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代。

19. 根据权利要求14至16中任一项所述的融合多肽,其中所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代。

20. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

21. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

22. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

23. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

24. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

25. 根据权利要求1至16中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

26. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区为CD4铰链区或其功能片段,所述CD4铰链区包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

27. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区和/或所述第二铰链区为CD28铰链区或其功能片段,所述CD28铰链区包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

28. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为CD7铰链区或其功能片段,所述CD7铰链区包括SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%氨基酸同一性。

29. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为CD152铰链区或其功能片段,所述CD152铰链区包括SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

30. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为PD-1铰链区或其功能片段,所述PD-1铰链区包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

31. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG1铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链区包括SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

32. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG2铰链区或其功能片段,所述IgG2铰链区包括SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

33. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG3铰链区或其功能片段,所述IgG3铰链区包括SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

34. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG4铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链区包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

35. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG1铰链/CH2/CH3铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链/CH2/CH3铰链区包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

36. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG1铰链-CH3-铰链-M1铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链-CH3-铰链-M1铰链区包括SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

37. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG4铰链/CH2/CH3铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链/CH2/CH3铰链区包括SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

38. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为IgG4铰链/CH2铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链/CH2铰链区包括SEQ ID NO:19中

所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

39. 根据权利要求1至13中任一项所述的融合多肽,其中所述第一铰链区或所述第二铰链区为PD-1铰链区或其功能片段,所述PD-1铰链区包括SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中:

a) 所述CAR进一步包括第一抗体或其抗原特异性结合片段;并且

b) 所述CCR进一步包括第二抗体或其抗原特异性结合片段。

41. 根据权利要求40所述的融合多肽,其中所述第一抗体和/或所述第二抗体或其抗原特异性结合片段选自由以下组成的组: Fab'片段、F(ab')₂片段、双特异性Fab二聚体(Fab₂)、三特异性Fab三聚体(Fab₃)、Fv、单链Fv蛋白("scFv")、双scFv、(scFv)₂、VHH、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")、单结构域抗体(sdAb, 纳米抗体)和骆驼抗体(VHH)或其片段。

42. 根据权利要求41所述的融合多肽,其中所述第一抗体和/或所述第二抗体或其抗原特异性结合片段为scFv或VHH。

43. 根据权利要求40至42中任一项所述的融合多肽,其中所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原结合。

44. 根据权利要求40至42中任一项所述的融合多肽,其中所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原上的不同表位结合。

45. 根据权利要求40至42中任一项所述的融合多肽,其中所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与不同靶抗原结合。

46. 根据权利要求40至45中任一项所述的融合多肽,其中所述第一抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组: α叶酸受体(FRα)、αvβ6整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、密封蛋白-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、IL-11Rα、IL-13Rα2、κ、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、λ、路易斯-Y(Lewis-Y, LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、

含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3 (TIM-3)、肿瘤内皮标志物1 (TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关 (TEM7R)、滋养层糖蛋白 (TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2) 和威尔姆斯瘤1 (Wilms tumor 1, WT-1)。

47. 根据权利要求40至45中任一项所述的融合多肽, 其中所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: α 叶酸受体 (FR α)、 α v β 6整联蛋白、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3 (CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX (CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135 (也被称为fmc样酪氨酸激酶3; FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原 (CEA)、密封蛋白-6 (CLDN6)、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、CD2子集1 (CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4 (CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1 (CTAGE1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、上皮糖蛋白2 (EGP2)、上皮糖蛋白40 (EGP40)、上皮细胞粘附分子 (EPCAM)、肝配蛋白A型受体2 (EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白 (FAP)、Fc受体样5 (FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体 (AChR)、神经节苷脂G2 (GD2)、神经节苷脂G3 (GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2 (LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y (LeY)、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2)、黑色素瘤抗原基因 (MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原 (MelanA或MART1)、间皮素 (MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、聚唾液酸; 胎盘特异性1 (PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2 (SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3 (TIM-3)、肿瘤内皮标志物1 (TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关 (TEM7R)、滋养层糖蛋白 (TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2) 和威尔姆斯瘤1 (WT-1)。

48. 根据权利要求40至47中任一项所述的融合多肽, 其中:

a) 所述第一抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体; 并且

b) 所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体。

49. 根据权利要求40至48中任一项所述的融合多肽, 其中:

a) 所述第一抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD33、CD79a、CD79b、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、MAGE-A4、

MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体;并且

b) 所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合,所述靶抗原选自自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

50. 根据权利要求40至49中任一项所述的融合多肽,其中:

a) 所述第一抗体或抗原特异性结合片段与B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合;并且

b) 所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合,所述靶抗原选自自由以下组成的组:表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中:

a) 所述CAR进一步包括第一跨膜结构域;并且

b) 所述CCR进一步包括第二跨膜结构域。

52. 根据权利要求51所述的融合多肽,其中所述第一跨膜结构域和/或所述第二跨膜结构域源自多肽,所述多肽选自自由以下组成的组:T细胞受体的 α 链或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD1。

53. 根据权利要求51所述的融合多肽,其中所述第一跨膜结构域和/或所述第二跨膜结构域源自CD8 α 。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中:

a) 所述CAR进一步包括第一细胞内共刺激结构域;并且

b) 所述CCR进一步包括第二细胞内共刺激结构域。

55. 根据权利要求54所述的融合多肽,其中所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自共刺激分子,所述共刺激分子选自自由以下组成的组:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。

56. 根据权利要求54所述的融合多肽,其中所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自CD137 (4-1BB)。

57. 根据权利要求54所述的融合多肽,其中所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自CD28。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述CAR进一步包括初级信号传导结构域。

59. 根据权利要求58所述的融合多肽,其中所述初级信号传导结构域源自多肽,所述多肽选自自由以下组成的组:FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

60. 根据权利要求58所述的融合多肽,其中所述初级信号传导结构域源自CD3 ζ 。

61. 一种融合多肽,其包括:

a) 嵌合抗原受体 (CAR),所述CAR包括第一抗体或抗原特异性结合片段、第一铰链区、第一跨膜结构域、第一细胞内共刺激结构域和初级信号传导结构域;

b) 多肽切割信号;以及

c) 嵌合共刺激受体 (CCR),所述CCR包括第二抗体或抗原特异性结合片段、第二铰链区、

第二跨膜结构域和第二细胞内共刺激结构域,

其中所述第二铰链区包括一个或多个半胱氨酸取代或缺失,i)相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激;或者ii)相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

62.一种融合多肽,其包括:

a) CAR,所述CAR包括与BCMA结合的第一抗体或抗原特异性结合片段、源自CD8 α 的第一铰链区、源自CD8 α 的第一跨膜结构域、源自4-1BB的第一细胞内共刺激结构域和源自CD3 ζ 的初级信号传导结构域;

b) 多肽切割信号;以及

c) CCR,所述CCR包括与EGFR结合的第二抗体或抗原特异性结合片段、源自CD8 α 的第二铰链区、源自CD8 α 的第二跨膜结构域和源自CD28的第二细胞内共刺激结构域,

其中所述第二铰链区包括一个或多个半胱氨酸取代或缺失,i)相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激;或者ii)相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

63.根据权利要求62所述的融合多肽,其中所述经修饰的第二铰链区包括氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。

64.根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述肽切割信号为病毒自切割多肽。

65.根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述多肽切割信号为病毒自切割2A多肽。

66.根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽,其中所述多肽切割信号为病毒自切割多肽,所述病毒自切割多肽选自由以下组成的组:口蹄疫病毒(FMDV) 2A (F2A) 肽、马鼻肺炎病毒(ERAV) 2A (E2A) 肽、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thosea asigna virus, TaV) 2A (T2A) 肽、猪捷申病毒-1 (PTV-1) 2A (P2A) 肽、泰勒病毒2A肽(Theilovirus 2A peptide) 和脑心肌炎病毒2A肽。

67.一种多核苷酸,其编码根据前述权利要求中任一项所述的融合多肽。

68.一种载体,其包括根据权利要求67所述的多核苷酸。

69.根据权利要求68所述的载体,其中所述载体为表达载体。

70.根据权利要求68或权利要求69所述的载体,其中所述载体为游离型载体。

71.根据权利要求68至70中任一项所述的载体,其中所述载体为病毒载体。

72.根据权利要求68至71中任一项所述的载体,其中所述载体为逆转录病毒载体。

73.根据权利要求68至72中任一项所述的载体,其中所述载体为慢病毒载体。

74.一种细胞,其表达根据权利要求1至66中任一项所述的融合多肽。

75.一种细胞,其包括根据权利要求74所述的多核苷酸或根据权利要求52至57中任一项所述的载体。

76.根据权利要求72或75所述的细胞,其中所述细胞为经基因工程化的宿主细胞。

77.根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述细胞为造血细胞。

78. 根据权利要求74至77中任一项所述的细胞,其中所述细胞为造血干细胞或祖细胞。
79. 根据权利要求74至78中任一项所述的细胞,其中所述细胞为CD34⁺造血干细胞或祖细胞。
80. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述细胞为免疫效应细胞。
81. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述细胞为T细胞。
82. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述细胞为CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞。
83. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述细胞为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或辅助T细胞。
84. 根据权利要求81至83中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞为 $\alpha\beta$ -T细胞。
85. 根据权利要求81至83中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞为 $\gamma\delta$ -T细胞。
86. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述宿主细胞为自然杀伤(NK)细胞。
87. 根据权利要求86所述的细胞,其中所述自然杀伤细胞为自然杀伤T(NKT)细胞。
88. 根据权利要求74至76中任一项所述的细胞,其中所述宿主细胞为巨噬细胞。
89. 一种组合物,其包括根据权利要求74至88中任一项所述的细胞以及药学上可接受的载体。
90. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求89所述的组合物。
91. 一种用于改善与受试者的癌症相关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的足以改善与所述癌症相关的至少一种症状的根据权利要求89所述的组合物。
92. 根据权利要求91所述的方法,其中改善的所述一种或多种症状选自由以下组成的组:虚弱、疲劳、呼吸短促、容易挫伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹部肿胀或疼痛、骨骼或关节疼痛、骨折、计划外的体重减轻、食欲不振、盗汗、持续轻度发烧和排尿减少。
93. 根据权利要求90至92中任一项所述的方法,其中所述癌症为实体癌。
94. 根据权利要求90至92中任一项所述的方法,其中所述癌症为液体癌。
95. 根据权利要求94所述的方法,其中所述癌症为恶性血液肿瘤。
96. 根据权利要求94或95所述的方法,其中所述癌症为非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓性白血病(AML)或慢性骨髓性白血病(CML)。
97. 根据权利要求96所述的方法,其中所述非霍奇金氏淋巴瘤为伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)或边缘区淋巴瘤(MZL)。
98. 根据权利要求97所述的方法,其中所述非霍奇金氏淋巴瘤为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。
99. 根据权利要求94至96中任一项所述的方法,其中所述癌症为MM,所述MM选自由以下组成的组:明显多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、非分泌性骨髓瘤、IgD骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤。

100. 一种产生表达根据权利要求1至66中任一项所述的融合多肽的细胞群体的方法, 所述方法包括将根据权利要求67所述的多核苷酸或根据权利要求68至73中任一项所述的载体引入到所述细胞群体中。

101. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述细胞群体包括造血干细胞或祖细胞。

102. 根据权利要求101所述的方法, 其中所述细胞群体包括CD34⁺造血干细胞或祖细胞。

103. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述细胞群体包括免疫效应细胞。

104. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述细胞群体包括T细胞、NK细胞和/或NKT细胞。

105. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述细胞群体包括T细胞。

106. 一种减少对表达CAR和CCR两者的细胞中的T细胞信号传导的CCR共刺激的方法, 所述方法包括:

a) 获得CAR多肽和CCR多肽, 所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域, 任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;

b) 用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基, 由此产生经修饰的CCR; 以及

c) 在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。

107. 一种相比于包括未经修饰的铰链的CCR在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激的方法, 所述方法包括:

a) 获得CAR多肽和CCR多肽, 所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域, 任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;

b) 用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基, 由此产生经修饰的CCR; 以及

c) 在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。

108. 根据权利要求106或107所述的方法, 其中相比于包括未经修饰的铰链区的CCR, 在不存在CAR抗原的情况下, 所述对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激的所述铰链结构域内的所述半胱氨酸残基取代。

109. 根据权利要求106或107所述的方法, 其中相比于包括未经修饰的铰链区的CCR, 所述CCR的所述铰链结构域内的所述半胱氨酸残基取代在不存在CAR抗原的情况下减少与所述CAR的缔合。

110. 根据权利要求106至109中任一项所述的方法, 其中所述CCR和所述CAR两者包括经修饰的铰链区。

111. 根据权利要求110所述的方法, 其中所述经修饰的CAR铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。

112. 根据权利要求111所述的方法, 其中相比于包括未经修饰的铰链区的CAR, 所述CAR铰链区内被取代的所述一个或多个半胱氨酸减少所述CAR的抗原非依赖性信号传导。

113. 根据权利要求111所述的方法, 其中相比于包括未经修饰的铰链区的CAR, 所述CAR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代基减少与所述CCR的抗原非依赖性缔合。

114. 根据权利要求106至113中任一项所述的方法, 其中所述CAR铰链区和所述CCR铰链

区源自同一蛋白质。

115. 根据权利要求106至113中任一项所述的方法, 其中所述CAR铰链区和所述CCR铰链区源自不同蛋白质。

116. 根据权利要求106至113中任一项所述的方法, 其中所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。

117. 根据权利要求106至116中任一项所述的融合多肽, 其中所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区包括选自由以下组成的组的铰链区或其片段: CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152 (CTLA-4) 铰链、PD-1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。

118. 根据权利要求106至117中任一项所述的方法, 其中所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区为CD8 α 铰链区或其片段。

119. 根据权利要求106至118中任一项所述的方法, 其中所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区为CD8 α 铰链区。

120. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代。

121. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代。

122. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代。

123. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

124. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

125. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

126. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

127. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

128. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

129. 根据权利要求106或107所述的方法, 其中所述CAR和所述CCR表达为根据权利要求1至66中任一项所述的融合多肽。

130. 根据权利要求92至129中任一项所述的方法, 其中步骤(c) 包括将编码所述CAR和/或所述CCR的多核苷酸或载体引入到所述细胞中。

经修饰的CCR多肽和其用途

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求于2020年4月17日提交的美国临时申请第63/011,494号的权益,所述美国临时申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关联的序列表以文本格式提供以代替纸质副本,并且在此通过引用并入到本说明书中。包含序列表的文本文件的名称为BLUE-127_PC_ST25.txt。文本文件为27KB,于2021年4月14日创建并且通过EFS-Web以电子方式与本说明书同时提交。

技术领域

[0005] 本公开涉及用于治疗疾病的经改进的组合物和方法。更具体地,本公开涉及经改进的嵌合共刺激受体(CCR)、融合蛋白、经基因修饰的免疫效应细胞以及这些组合物用于治疗疾病的用途。

背景技术

[0006] 嵌合抗原受体(CAR)是将抗原识别和T细胞激活两者组合到单个受体中的受体蛋白。CAR是具有若干个蛋白质结构域,如抗原特异性结合结构域、铰链或间隔子序列、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域和信号传导结构域的复合蛋白质。被工程化成表达CAR的T细胞可以被重定向到表达靶抗原的特定细胞类型(例如,癌细胞)。事实上,此类CAR T细胞已证明可用于诱导表达CD19抗原的某些白血病和淋巴瘤的T细胞介导的杀伤。

[0007] 但是,尽管CAR T技术振奋人心,但设计有效的CAR仍然是一项具有挑战性且耗时的工作(参见,例如,Guedan等人,《分子疗法-方法和临床发展(Mol Ther Methods Clin Dev.)》2019年3月15日;12:145-156),并且尝试使用CAR T细胞所取得的成功有限。例如,限制CAR T细胞疗法的功效的一个主要障碍是“抗原阴性”癌症的复发。另外,还已知CAR T细胞的施用会引起不良副作用,例如,细胞因子风暴和/或神经毒性。此外,CAR中使用的给定抗原结合结构域的治疗功效可能不可预测:如果抗原结合结构域太强烈地结合,则CAR T细胞可以诱导大规模细胞因子释放,从而导致被视为“细胞因子风暴”的潜在致命免疫反应,并且如果抗原结合结构域太弱地结合,则CAR T细胞在清除癌细胞时可能不会显示出足够的治疗功效。肿瘤内的抗原表达的异质性也影响CAR T细胞疗法的功效。

[0008] 用于改进和/或增强CAR T细胞信号传导的成功策略尚未实现,并且在将CAR T疗法推广至多种癌症方面存在很大障碍。

发明内容

[0009] 本公开总体上部分涉及经改进的CCR多肽、融合蛋白和其使用方法。具体地,本发明提供了包括CAR和经修饰的CCR多肽的融合多肽以及其在治疗、预防或改善至少一种癌症症状中的用途。更具体地,CCR包括经修饰的铰链区,其中CAR/CCR融合多肽显示出抗原非依赖性信号传导,例如,在不存在CAR抗原的情况下信号传导减少。

[0010] 在各个实施例中,提供了一种融合多肽,其包括a) 嵌合抗原受体 (CAR),所述CAR包括第一铰链区;b) 多肽切割信号;以及c) 嵌合共刺激受体 (CCR),所述CCR包括第二铰链区,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,所述第二铰链区被修饰成在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。

[0011] 在各个实施例中,提供了一种融合多肽,其包括a) 嵌合抗原受体 (CAR),所述CAR包括第一铰链区;b) 多肽切割信号;以及c) 嵌合共刺激受体 (CCR),所述CCR包括第二铰链区,所述第二铰链区包括被另一个氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。

[0012] 在特定实施例中,相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述第二铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。

[0013] 在特定实施例中,相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR,所述第二铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0014] 在各个实施例中,所述第一铰链区是经修饰的,其中任选地,所述修饰包括一个或多个取代或缺失。在一些实施例中,经修饰的第一铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的第一铰链区的CAR,所述经修饰的第一铰链区在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的第一铰链区的CAR,所述经修饰的第一铰链区在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0015] 在各个实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。在一些实施例中,所述第一铰链区和所述第二铰链区源自同一蛋白质。在一些实施例中,所述第一铰链区和所述第二铰链区源自不同蛋白质。

[0016] 在各个实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括选自以下组成的组的铰链区或其功能片段:CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD-1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链-CH3-铰链-M1、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。在特定实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区为CD8 α 铰链区或其功能片段。

[0017] 在一些实施例中,所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代。在一些实施例中,所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代。在一些实施例中,所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代。

[0018] 在特定实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

[0019] 在特定实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

[0020] 在特定实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述第一铰链区和/或所述第二铰链区包括与SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施例中,CD4铰链区或其功能片段,所述CD4铰链区包括与SEQ ID NO:7中

所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,CD28铰链区或其功能片段,所述CD28铰链区包括与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,CD7铰链区或其功能片段,所述CD7铰链区包括与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,CD152铰链区或其功能片段,所述CD152铰链区包括与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,PD-1铰链区或其功能片段,所述PD-1铰链区包括与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG1铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链区包括与SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG2铰链区或其功能片段,所述IgG2铰链区包括与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG3铰链区或其功能片段,所述IgG3铰链区包括与SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG4铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链区包括与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG1铰链/CH2/CH3铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链/CH2/CH3铰链区包括与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG1铰链-CH3-铰链-M1铰链区或其功能片段,所述IgG1铰链-CH3-铰链-M1铰链区包括与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG4铰链/CH2/CH3铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链/CH2/CH3铰链区包括与SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,IgG4铰链/CH2铰链区或其功能片段,所述IgG4铰链/CH2铰链区包括与SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。在一些实施例中,PD-1铰链区或其功能片段,所述PD-1铰链区包括与SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸同一性。

[0022] 在各个实施例中,所述CAR包括第一抗体或其抗原特异性结合片段;并且所述CCR包括第二抗体或其抗原特异性结合片段。在一些实施例中,所述第一抗体和/或所述第二抗体或其抗原特异性结合片段选自自由以下组成的组:Fab'片段、F(ab')₂片段、双特异性Fab二聚体(Fab₂)、三特异性Fab三聚体(Fab₃)、Fv、单链Fv蛋白("scFv")、双scFv、(scFv)₂、VHH、

微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(“dsFv”)、单结构域抗体(sdAb, 纳米抗体)和骆驼抗体(VHH)或其片段。在一些实施例中, 所述第一抗体和/或所述第二抗体或其抗原特异性结合片段为scFv或VHH。

[0023] 在一些实施例中, 所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原结合。在一些实施例中, 所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原上的不同表位结合。在一些实施例中, 所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与不同靶抗原结合。

[0024] 在各个实施例中, 所述第一抗体和/或所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: α 叶酸受体(FR α)、 α v β 6整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3; FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、密封蛋白-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y(Lewis-Y, LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2); 黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸; 胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(Wilms tumor 1, WT-1)。

[0025] 在各个实施例中, 所述第一抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: B细胞成熟抗原(BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)和NKG2D配体; 并且所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗原选自由以下组成的组: B细胞成熟抗原(BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)和NKG2D配体。

[0026] 在各个实施例中, 所述第一抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合, 所述靶抗

原选自由以下组成的组：B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD33、CD79a、CD79b、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、MAGE-A4、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体；并且所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合，所述靶抗原选自由以下组成的组：B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

[0027] 在各个实施例中，所述第一抗体或抗原特异性结合片段与B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合；并且所述第二抗体或抗原特异性结合片段与靶抗原结合，所述靶抗原选自由以下组成的组：表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

[0028] 在各个实施例中，所述CAR进一步包括第一跨膜结构域；并且所述CCR进一步包括第二跨膜结构域。在一些实施例中，所述第一跨膜结构域和/或所述第二跨膜结构域源自多肽，所述多肽选自由以下组成的组：T细胞受体的 α 链或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD1。在一些实施例中，所述第一跨膜结构域和/或所述第二跨膜结构域源自CD8 α 。

[0029] 在各个实施例中，所述CAR进一步包括第一细胞内共刺激结构域；并且所述CCR进一步包括第二细胞内共刺激结构域。在一些实施例中，所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自共刺激分子，所述共刺激分子选自由以下组成的组：TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、肿瘤坏死因子受体2 (TNFR2) 和ZAP70。在一些实施例中，所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自CD137 (4-1BB)。在一些实施例中，所述第一共刺激结构域和/或所述第二共刺激结构域源自CD28。

[0030] 在各个实施例中，所述CAR进一步包括初级信号传导结构域。在一些实施例中，所述初级信号传导结构域源自多肽，所述多肽选自由以下组成的组：FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一些实施例中，所述初级信号传导结构域源自CD3 ζ 。

[0031] 在各个实施例中，所述CAR包括第一抗体或抗原特异性结合片段、第一铰链区、第一跨膜结构域、第一细胞内共刺激结构域和初级信号传导结构域；并且所述CCR包括第二抗体或抗原特异性结合片段、第二铰链区、第二跨膜结构域和第二细胞内共刺激结构域。

[0032] 在特定实施例中，提供了一种融合多肽，其包括：a) 嵌合抗原受体 (CAR)，所述CAR包括第一抗体或抗原特异性结合片段、第一铰链区、第一跨膜结构域、第一细胞内共刺激结构域和初级信号传导结构域；b) 多肽切割信号；以及c) 嵌合共刺激受体 (CCR)，所述CCR包括第二抗体或抗原特异性结合片段、第二铰链区、第二跨膜结构域和第二细胞内共刺激结构域；其中所述第二铰链区包括一个或多个半胱氨酸取代或缺失，i) 相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR，所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激；或者ii) 相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR，所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0033] 在特定实施例中，提供了一种融合多肽，其包括a) CAR，所述CAR包括与BCMA结合的

第一抗体或抗原特异性结合片段、源自CD8 α 的第一铰链区、源自CD8 α 的第一跨膜结构域、源自4-1BB的第一细胞内共刺激结构域和源自CD3 ζ 的初级信号传导结构域；b) 多肽切割信号；以及c) CCR，所述CCR包括与EGFR结合的第二抗体或抗原特异性结合片段、源自CD8 α 的第二铰链区、源自CD8 α 的第二跨膜结构域和源自CD28的第二细胞内共刺激结构域；其中所述第二铰链区包括一个或多个半胱氨酸取代或缺失，i) 相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR，所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激；或者ii) 相比于包括未经修饰的第二铰链区的CCR，所述一个或多个半胱氨酸取代或缺失在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0034] 在各个实施例中，经修饰的第二铰链区包括氨基酸序列，所述氨基酸序列选自自由以下组成的组：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。

[0035] 在各个实施例中，所述肽切割信号为病毒自切割多肽。在一些实施例中，所述多肽切割信号为病毒自切割2A多肽。在一些实施例中，所述多肽切割信号为病毒自切割多肽，所述病毒自切割多肽选自自由以下组成的组：口蹄疫病毒(FMDV) 2A(F2A) 肽、马鼻炎A型病毒(ERAV) 2A(E2A) 肽、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thosea asigna virus, TaV) 2A(T2A) 肽、猪捷申病毒-1(PTV-1) 2A(P2A) 肽、泰勒病毒2A肽(Theilovirus 2A peptide) 和脑心肌炎病毒2A肽。

[0036] 在特定实施例中，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码本文所述的融合多肽中的任一种融合多肽中的融合多肽。在特定实施例中，提供了一种载体，所述载体包括多核苷酸。在一些实施例中，所述载体为表达载体。在一些实施例中，所述载体为游离型载体。在一些实施例中，所述载体为病毒载体。在一些实施例中，所述载体为逆转录病毒载体。在一些实施例中，所述载体为慢病毒载体。

[0037] 在特定实施例中，提供了一种细胞，其表达本文所述的融合多肽。在一些实施例中，所述细胞包括本文所述的多核苷酸或载体。在一些实施例中，所述细胞为经基因工程化的宿主细胞。在一些实施例中，所述细胞为造血细胞。在一些实施例中，所述细胞为造血干细胞或祖细胞。在一些实施例中，所述细胞为CD34+造血干细胞或祖细胞。在一些实施例中，所述细胞为免疫效应细胞。在一些实施例中，所述细胞为T细胞。在一些实施例中，所述细胞为CD3+、CD4+和/或CD8+细胞。在一些实施例中，所述细胞为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL) 或辅助T细胞。在一些实施例中，所述T细胞为 $\alpha\beta$ -T细胞。在一些实施例中，所述T细胞为 $\gamma\delta$ -T细胞。在一些实施例中，所述宿主细胞为自然杀伤(NK) 细胞。在一些实施例中，所述自然杀伤细胞为自然杀伤T(NKT) 细胞。在一些实施例中，所述宿主细胞为巨噬细胞。

[0038] 在特定实施例中，提供了一种组合物，其包括本文所述的细胞以及药学上可接受的载体。

[0039] 在特定实施例中，提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法。在各个实施例中，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的组合物。

[0040] 在特定实施例中，提供了一种用于改善与受试者的癌症相关的一种或多种症状的方法。在各个实施例中，所述方法包括向所述受试者施用足以改善与所述癌症相关的至少一种症状的治疗有效量的本文所述的组合物。在一些实施例中，改善的所述一种或多种症状选自自由以下组成的组：虚弱、疲劳、呼吸短促、容易挫伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹

部肿胀或疼痛、骨骼或关节疼痛、骨折、计划外的体重减轻、食欲不振、盗汗、持续轻度发烧和排尿减少。

[0041] 在各个实施例中,所述癌症为实体癌。在一些实施例中,所述癌症为液体癌。在一些实施例中,所述癌症为恶性血液肿瘤。在一些实施例中,所述癌症为非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓性白血病(AML)或慢性骨髓性白血病(CML)。在一些实施例中,所述非霍奇金氏淋巴瘤为伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)或边缘区淋巴瘤(MZL)。在一些实施例中,所述非霍奇金氏淋巴瘤为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施例中,所述癌症为MM,所述MM选自由以下组成的组:明显多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、非分泌性骨髓瘤、IgD骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤。

[0042] 在特定实施例中,提供了一种产生表达本文所述的融合多肽的细胞群体的方法。在各个实施例中,所述方法包括将本文所述的多核苷酸或载体引入到所述细胞群体中。在一些实施例中,所述细胞群体包括造血干细胞或祖细胞。在一些实施例中,所述细胞群体包括CD34+造血干细胞或祖细胞。在一些实施例中,所述细胞群体包括免疫效应细胞。在一些实施例中,所述细胞群体包括T细胞、NK细胞和/或NKT细胞。在一些实施例中,所述细胞群体包括T细胞。

[0043] 在特定实施例中,提供了一种减少对表达CAR和CCR两者的细胞中的T细胞信号传导的CCR共刺激的方法。在各个实施例中,所述方法包括a)获得CAR多肽和CCR多肽,所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域,任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;b)用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基,由此产生经修饰的CCR;以及c)在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。

[0044] 在特定实施例中,提供了一种相比于包括未经修饰的铰链的CCR在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激的方法。在各个实施例中,所述方法包括a)获得CAR多肽和CCR多肽,所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域,任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;b)用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基,由此产生经修饰的CCR;以及c)在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。

[0045] 在各个实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,在不存在CAR抗原的情况下,所述对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激的所述铰链结构域内的所述半胱氨酸残基取代。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,所述CCR的所述铰链结构域内的所述半胱氨酸残基取代在不存在CAR抗原的情况下减少与所述CAR的缔合。在一些实施例中,所述CCR和所述CAR两者均包括经修饰的铰链区。在一些实施例中,所述经修饰的CAR铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR,所述CAR铰链区内被取代的所述一个或多个半胱氨酸减少所述CAR的抗原非依赖性信号传导。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR,所述CAR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代基减少与所述CCR的抗原非依赖性缔合。在一些实施例中,所述CAR铰链区和所述CCR铰链区源自同一蛋白质。在一些实施例中,所述CAR铰链区和所述

CCR铰链区源自不同蛋白质。在一些实施例中,所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区内的所述一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。

[0046] 在各个实施例中,所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区包括选自以下组成的组的铰链区或其功能片段:CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152 (CTLA-4) 铰链、PD-1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。在一些实施例中,所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区为CD8 α 铰链区或其片段。在一些实施例中,所述CCR铰链区和/或所述CAR铰链区为CD8 α 铰链区。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,所述CCR和/或所述CAR的所述CD8 α 铰链区包括与SEQ ID NO:5中所示的序列具有至少90%、至少93%、至少95%或至少97%同一性的氨基酸序列。

[0047] 在各个实施例中,所述CAR和所述CCR表达为本文所述的融合多肽中的任一种融合多肽。在各个实施例中,步骤(c)包括将编码所述CAR和/或所述CCR的多核苷酸或载体引入到所述细胞中。

附图说明

[0048] 图1A示出了在不存在或存在EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞的情况下,来自未经转导的T细胞(UTD)和具有和不具有抗EGFR CCR的表达抗BCMA CAR的CAR T细胞的IFN γ 水平。

[0049] 图1B示出了用于计算由与EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞共培养的UTD T细胞和具有和不具有抗EGFR CCR的表达抗BCMA CAR的CAR T细胞以20:1、10:1和5:1的效应子:靶标(E:T)比率诱导的细胞毒性%的阻抗数据。

[0050] 图2示出了免疫功能不全的NSG小鼠在用媒介剂、UTD T细胞以及具有和不具有抗EGFR CCR的抗BCMA CAR T细胞治疗后的人A549肿瘤体积。

[0051] 图3示出了表示CCR激活可以用以在不存在CAR抗原的情况下诱导CAR介导的信号传导的若干机制的草图。

[0052] 图4A示出了表示其铰链区中具有突变的不同CAR/CCR构建体对的草图,以及示出了来自UTD T细胞和在表达EGFR的具有和不具有BCMA的外源表达的两个不同癌细胞系中表达不同CAR/CCR对的CAR T细胞的IFN γ 水平的图。

[0053] 图4B示出了来自UTD T细胞和在表达EGFR的具有和不具有BCMA的外源表达的两个不同癌细胞系中表达不同CAR/CCR对的CAR T细胞的TNF α 水平。

[0054] 图4C示出了来自UTD T细胞和在表达EGFR的具有和不具有BCMA的外源表达的两个不同癌细胞系中表达不同CAR/CCR对的CAR T细胞的IL-2水平。

[0055] 图5A示出了示例性CAR/CCR构建体的结构域。

[0056] 图5B示出了CAR和CCR构建体在T细胞上的FACS表达。

[0057] 图6示出了来自UTD T细胞和在表达EGFR而非BCMA的两个癌症细胞系中表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞的IFN γ 水平。

[0058] 图7A示出了来自在A549细胞 (EGFR+) 和被修饰成还表达BCMA的A549细胞 (EGFR+) 中表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞的IFN γ 水平。

[0059] 图7B示出了来自在A549细胞 (EGFR+) 和被修饰成还表达BCMA的A549细胞 (EGFR+) 中表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞的IL-2水平。

[0060] 图7C示出了来自在HT-1080细胞 (EGFR+) 和被修饰成还表达BCMA的HT-1080细胞 (EGFR+) 中表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞的IFN γ 水平。

[0061] 图7D示出了来自在HT-1080细胞 (EGFR+) 和被修饰成还表达BCMA的HT-1080细胞 (EGFR+) 中表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞的IL-2水平。

[0062] 图8A示出了用于计算由在EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞中的UTD T细胞和表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞诱导的细胞毒性%的阻抗数据。

[0063] 图8B示出了用于计算由在还被修饰成表达BCMA的EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞中的UTD T细胞和表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞诱导的细胞毒性%的阻抗数据。

[0064] 图8C示出了用于计算由在EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞中的UTD T细胞和表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞诱导的细胞毒性%的阻抗数据。

[0065] 图8D示出了用于计算由在还被修饰成表达BCMA的EGFR+HT-1080纤维肉瘤细胞中的UTD T细胞和表达具有或不具有铰链C至S突变的抗BCMA CAR和抗EGFR CCR的各种组合的CAR T细胞诱导的细胞毒性%的阻抗数据。

[0066] 序列标识符简要说明

[0067] SEQ ID NO:1示出了人CD8 α 蛋白的氨基酸序列 (Swiss-Prot登录号P01732)。

[0068] SEQ ID NO:2示出了说明性野生型CD8 α 铰链区的氨基酸。

[0069] SEQ ID NO:3示出了包括位于 (C27S) 的位置27处的半胱氨酸至丝氨酸突变的说明性CD8 α 铰链的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:4示出了包括位于位置44 (C44S) 处的半胱氨酸至丝氨酸突变的说明性CD8 α 铰链的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:5示出了包括位于位置27和44 (C27S;C44S) 处的半胱氨酸至丝氨酸突变的说明性CD8 α 铰链的氨基酸序列。

- [0072] SEQ ID NO:6示出了说明性CD8 α 跨膜(TM)区的氨基酸序列。
- [0073] SEQ ID NO:7-20示出了另外的说明性铰链区的氨基酸序列。
- [0074] SEQ ID NO:21-31示出了各个接头的氨基酸序列。
- [0075] SEQ ID NO:32-56示出了蛋白酶切割位点和自切割多肽切割位点的氨基酸序列。
- [0076] 在前述序列中,X(如果存在的话)是指任何氨基酸或不存在氨基酸。

具体实施方式

[0077] A. 概述

[0078] 本公开提供了经修饰的CCR多肽、融合多肽和经基因修饰的细胞,其中CCR包括经修饰的铰链区。在特定实施例中,相比于包括未经修饰的CCR铰链区的多肽、融合多肽或细胞,被修饰成表达本文所设想的CAR和CCR的细胞显示出在不存在CAR靶抗原的情况下抗原非依赖性信号传导减少。更具体地,被修饰成表达本文所设想的CAR和CCR的细胞在存在CCR抗原和不存在CAR抗原时显示出信号传导减少。

[0079] 换句话说,本文所述的经基因修饰的细胞针对表达CAR抗原和CCR抗原两者的靶细胞激活,同时针对表达单独的CCR抗原的细胞显示出很少激活至未激活。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,设想的是,在存在CCR抗原并且不存在CAR抗原的情况下信号传导减少通过减少CCR铰链区与CAR铰链区之间的二硫键合来实现。

[0080] 在特定实施例中,CCR可用于其增强CAR信号传导的能力。此外,CCR可以被设计成靶向不同于CAR的抗原,因此潜在地增加靶细胞特异性和/或减少难治性靶细胞的出现。重要的是,呈其最纯的形式的双抗原方法可以提供利用布尔逻辑(boolean logic)(与;或;非)来靶向细胞的特定子集而不是其它子集的能力。此方法在细胞疗法中的有用性由于难以发现癌症特异性抗原而凸显(参见例如,Newick K.等人,《医学年鉴(Annu Rev Med)》2017;68:139-152)。事实上,许多抗原在其它细胞类型上和/或身体其它地方显示出至少一些表达。因此,用于克服这一问题的一个方法是区分CAR抗原特异性和CCR抗原特异性。

[0081] 在特定实施例中,疗法被设计成靶向仅表达CAR抗原和CCR抗原两者的细胞。此外,通过适当地调谐信号传导/激活的水平,排除了对仅表达抗原之一的细胞的靶向。例如,靶向表达1) CAR抗原和2) CAR抗原和CCR抗原两者的细胞,而不是仅表达CCR抗原的细胞。在其它实施例中,疗法被设计成靶向表达1) CCR抗原和2) CCR抗原和CAR抗原两者的细胞,而不是仅表达CAR抗原的细胞。因此,CAR/CCR组合和/或融合多肽的仔细选择和调谐以及布尔逻辑的使用使得能够在最小化脱靶效应的同时靶向具体细胞类型(例如,癌细胞),例如,靶向仅表达CAR抗原或CCR抗原的细胞。

[0082] 有趣的是,发明人惊讶地发现,一些CAR/CCR组合(例如,融合多肽)响应于仅表达CCR抗原的靶细胞,即针对不表达CAR抗原的靶细胞(参见例如图1A、1B和2)而表现出信号传导。如上文所讨论的,这是令人惊讶的,因为CCR不含有信号传导结构域,并且因此,理论上不应能够独自进行信号传导。此外,如果CCR抗原是在其它细胞类型(例如,EGFR抗原)上广泛表达的抗原,则在存在单独的CCR抗原的情况下进行的激活/信号传导显著降低双抗原方法的益处。另外,此类信号传导还可以诱导脱靶细胞类型的T细胞功能障碍和/或杀伤。

[0083] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下,发明人在本文中设想了,某些CCR能够通过不存在CAR抗原的情况下诱导CAR介导的T细胞信号传导的CAR铰链区与CCR铰链区之间

的半胱氨酸残基的二硫键合而与对应CAR相互作用。这种CCR抗原依赖性、CAR抗原非依赖性信号传导导致T细胞功能障碍并降低T细胞功效。如本文所述和所例示的,发明人惊讶地发现,CAR抗原非依赖性信号传导的问题可能部分地由CCR驱动,并且此类信号传导可以通过使CCR铰链区内的特定半胱氨酸残基突变来解决。在特定实施例中,表达包括本文所设想的经修饰的铰链区的CAR和CCR的免疫效应细胞针对表达CAR抗原和CCR抗原两者的细胞而被激活,同时消除/减少针对仅表达CCR抗原的细胞的激活。

[0084] 因此,本发明部分地提供了CAR多肽和CCR多肽、融合多肽以及表达CAR和CCR的经基因修饰的细胞,其中所述CCR包括经修饰的铰链区。具体地,相比于包括未经修饰的CCR铰链区的融合多肽或细胞,本文所述的多肽、融合多肽或经基因修饰的细胞显示出在不存在CAR抗原的情况下T细胞信号传导减少。更具体地,本文所述的经改进的多肽、融合多肽或经基因修饰的细胞出人意料地减少CAR抗原非依赖性信号传导,同时在存在两种抗原的情况下维持或增加T细胞信号传导(参见例如,图7A-7D)。

[0085] 在各个实施例中,提供了一种融合多肽,其包括:嵌合抗原受体(CAR);多肽切割信号;以及嵌合共刺激受体(CCR),所述CCR包括铰链区,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,所述铰链区被修饰成在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞信号传导的CCR共刺激。

[0086] 在各个实施例中,提供了一种融合多肽,其包括:嵌合抗原受体(CAR);多肽切割信号;以及嵌合共刺激受体(CCR),所述CCR包括铰链区,所述铰链区包括被另一个氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,CCR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,CCR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0087] 在各个实施例中,CCR和/或CAR包括经修饰的铰链区。在一些实施例中,经修饰的CAR铰链区和/或CCR铰链区包括被不同氨基酸(例如,丝氨酸或丙氨酸)取代的一个或多个半胱氨酸。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR和/或CCR,CAR铰链区和/或CCR铰链区内的被取代的一个或多个半胱氨酸在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激。在一些实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR和/或CCR,CAR铰链区和/或CCR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少CAR/CCR缔合。

[0088] 在各个实施例中,CAR铰链区和CCR铰链区源自同一蛋白质或不同蛋白质。在一些实施例中,铰链区源自CD8 α 铰链区(例如,SEQ ID NO:2)。在一些实施例中,CCR和/或CAR的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2(例如,SEQ ID NO:3)的位置27处的氨基酸取代。在一些实施例中,CCR和/或CAR的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2(例如,SEQ ID NO:4)的位置44处的氨基酸取代。在一些实施例中,CCR和/或CAR的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2(例如,SEQ ID NO:5)的位置27和44处的氨基酸取代。

[0089] 在各个实施例中,提供了一种融合多肽,其包括:嵌合抗原受体(CAR)、多肽切割信号和嵌合共刺激受体(CCR),其中所述CAR包括第一抗体或其抗原特异性结合片段、第一铰链区、第一跨膜结构域和第一细胞内共刺激结构域以及初级信号传导结构域;并且所述CCR包括第二抗体或其抗原特异性结合片段、第二铰链区、第二跨膜结构域和第二细胞内共刺激结构域;其中所述CCR的所述第二铰链结构域包括取代不同氨基酸的一个或多个半胱氨酸。

酸残基。

[0090] 在各个实施例中,提供了一种多核苷酸,其编码如本文所述的融合多肽。在一些实施例中,提供了一种载体,其包括如本文所述的多核苷酸。在一些实施例中,提供了一种细胞,其表达如本文所设想的融合多肽。在一些实施例中,细胞是经基因工程化的宿主细胞、造血细胞、造血干细胞、造血祖细胞、CD34⁺细胞、免疫效应细胞、T细胞、CD3⁺细胞、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、辅助T细胞、 $\alpha\beta$ -T细胞、 $\gamma\delta$ -T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞或巨噬细胞。

[0091] 在各个实施例中,提供了一种组合物,其包括本文所述的细胞。在一些实施例中,所述组合物包括药学上可接受的载体。

[0092] 在各个实施例中,提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的组合物。

[0093] 在各个实施例中,提供了一种产生表达本文所述的融合多肽的细胞群体的方法,所述方法包括将本文所述的多核苷酸或载体引入到所述细胞群体中。

[0094] 在各个实施例中,提供了一种相比于包括未经修饰的铰链区的CCR在不存在CAR抗原的情况下减少对T细胞信号传导的CCR抗原介导的刺激的方法,所述方法包括:获得CAR多肽和CCR多肽,所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域,任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基,由此产生经修饰的CCR;以及在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。在各个实施例中,提供了一种减少对表达CAR和CCR两者的细胞中的T细胞信号传导的CCR共刺激的方法,所述方法包括:a)获得CAR多肽和CCR多肽,所述CAR多肽和所述CCR多肽各自具有铰链结构域,任选地其中所述CAR和所述CCR表达为融合多肽;b)用所述CCR铰链结构域内的一个或多个半胱氨酸残基取代另一个残基,由此产生经修饰的CCR;以及c)在细胞中表达所述CAR和所述经修饰的CCR。

[0095] 用于重组(即,经工程化的)DNA、肽和寡核苷酸合成、免疫测定、组织培养、转化(例如,电穿孔、脂质转染)、酶促反应、纯化的技术以及相关技术和程序总体上可以如本说明书通篇引用和讨论的微生物学、分子生物学、生物化学、分子遗传学、细胞生物学、病毒学和免疫学中的各种通用且更具体的参考文献中所描述的来执行。参见例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y.);《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》(约翰·威利父子出版公司(Wiley and Sons),2008年7月更新);《精编分子生物学实验指南:当代分子生物学实验指南的方法概要(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会和威利跨学科出版社(Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience);Glover,《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》第I卷&第II卷(美国牛津大学出版社IRL出版社(IRL Press,Oxford Univ.Press USA),1985);《当代免疫学手册(Current Protocols in Immunology)》,编辑:John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober 2001纽约州纽约市约翰威立父子公司(John Wiley&Sons,NY,NY);《实时PCR:当前技术和应用(Real-Time PCR:Current

Technology and Applications)》,编辑:Julie Logan、Kirstin Edwards和Nick Saunders,2009,英国诺福克凯斯特学术出版社(Caister Academic Press,Norfolk,UK);Anand,《复杂基因组分析技术(Techniques for the Analysis of Complex Genomes)》,(纽约学术出版社公司(Academic Press),1992);Guthrie和Fink,《酵母遗传学和分子生物学指南(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology)》,(纽约学术出版社公司,1991);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编辑,1984);《核酸:杂交(Nucleic Acid The Hybridization)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1985);《转录和翻译(Transcription and Translation)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编辑,1986);Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984);《下一代基因组测序(Next-Generation Genome Sequencing)》(Janitz,2008Wiley-VCH出版社(Wiley-VCH));《PCR方案(分子生物学方法)(PCR Protocols(Methods in Molecular Biology))》(Park编辑,第3版,2010,胡马纳出版社(Humana Press));《固定化细胞和酶(Immobilized Cells And Enzymes)》(IRL出版社,1986);论文《酶学方法(Methods In Enzymology)》(纽约学术出版社公司);《哺乳动物细胞的基因转移载体(Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells)》(J.H.Miller和M.P.Calos编辑,1987,冷泉港实验室出版社);Harlow和Lane,《抗体(Antibodies)》,(纽约冷泉港冷泉港实验室出版社,1998);《细胞和分子生物学中的免疫化学方法(Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology)》(Mayer和Walker编辑,伦敦学术出版社公司(Academic Press,London),1987);《实验免疫学手册(Handbook Of Experimental Immunology)》,第I-IV卷(D.M.Weir和CC Blackwell编辑,1986);Roitt,《基础免疫学(Essential Immunology)》,第6版,(牛津布莱克韦尔科学出版社(Blackwell Scientific Publications,Oxford),1988);《当代免疫学方案》(Q.E.Coligan、A.M.Kruisbeek、D.H.Margulies、E.M.Shevach和W.Strober编辑,1991);《免疫学年度评论(Annual Review of Immunology)》;以及《免疫学进展(Advances in Immunology)》等期刊上的专著。

[0096] B. 定义

[0097] 在更加详细地阐述本公开之前,提供本文要使用的某些术语的定义可能有助于理解本公开。

[0098] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所了解相同的含义。尽管可以使用与本文所描述的方法和材料类似或相当的任何方法和材料来实践或测试特定实施例,但本文中描述组合物、方法和材料的优选实施例。出于本公开的目的,下文定义以下术语。

[0099] 本文使用的冠词“一(a/an)”是指一个(种)或超过一个(种)(即至少一个(种)或一个(种)或多个(种))该冠词的语法对象。举例来说,“一要素”意指一个要素或一个或多个要素。

[0100] 替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的任一个、两个或其任何组合。

[0101] 术语“和/或”应理解为意指替代方案中的一种或两种。

[0102] 如本文所使用的,术语“约(about)”或“大约(approximately)”是指与参考数量、

水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相比,变化至多15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。在一个实施例中,术语“约”或“大约”是指关于参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度,数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 或 $\pm 1\%$ 的范围。

[0103] 在一个实施例中,范围,例如1至5、约1至5或约1至约5指代所述范围所涵盖的每个数值。例如,在一个非限制性且仅说明性实施例中,范围“1至5”相当于表达1、2、3、4、5;或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0;或1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。

[0104] 如本文所使用,术语“基本上”是指数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度是参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高百分比。在一个实施例中,“基本上相同”是指数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度产生的作用,例如生理作用与参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度大致相同。

[0105] 在本说明书通篇,除非上下文另外要求,否则“包含(comprise/comprises/comprising)”一词应理解为暗指包括所述步骤或要素或一组步骤或要素,但不排除任何其它步骤或要素或任何其它组步骤或要素。“由...组成”意指包括且限于短语“由...组成”之后的事物。因此,短语“由...组成”指示所列要素是必不可少或必需的,并且不能存在其它要素。“基本上由...组成”意指包含短语后所列的任何要素,并且限于不干扰或影响关于所列要素的公开内容中所说明的活性或作用的其它要素。因此,短语“基本上由...组成”指示所列要素是必不可少的或必需的,而且不存在实质上影响所列要素的活性或作用的其它要素。

[0106] 贯穿本说明书中对“一个实施例”、“实施例”、“特定实施例”、“相关实施例”、“某个实施例”、“另外的实施例”或“进一步的实施例”或其组合的引用意味着结合所述实施例所描述的特定特征、结构或特性包含在至少一个实施例中。因此,上述短语在贯穿本说明书的各个地方的出现不一定全部是指同一个实施例。此外,特定特征、结构或特性可以通过任何适合方式组合于一个或多个实施例中。还应理解的是,在一个实施例中对特征的肯定叙述充当在特定实施例中排除所述特征的基础。

[0107] 在本公开通篇阐述了另外的定义。

[0108] C. 嵌合抗原受体(CAR)和经修饰的嵌合共刺激受体(CCR)

[0109] 在各个实施例中,免疫效应细胞被修饰成表达抗CAR和CCR,以便重定向免疫效应细胞对表达特定抗原的癌细胞的细胞毒性,并且协同地增加免疫效应细胞疗法的有效性。CAR是将针对期望抗原的基于抗体的特异性与T细胞受体初级信号传导组分和共刺激信号传导组分组合的分子。不同于CAR,CCR是将针对期望抗原的基于抗体的特异性与T细胞受体共刺激结构域组合但缺乏初级信号传导结构域分子。如本文所使用的,术语“嵌合”描述由来自不同来源的不同蛋白质或DNA部分构成。

[0110] 在特定实施例中,免疫效应细胞表达包括抗原结合结构域的CAR和包括不同抗原结合结构域的CCR。CAR包括细胞外抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和初级信号传导结构域,并且CCR包括细胞外抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内共刺激结构域并缺乏初级信号传导结构域。CCR的抗原结合结构域与抗原在靶细胞表面上的接合使CCR聚集并且将共刺激信号递送到含有CAR的细胞。CCR的主要特性是其以MHC非依赖性方式进一步重定向或微调免疫效应细胞特异性并且在存在CAR的情况下,优选地在存在CAR抗原的情况下增强免疫效应细胞应答的能力。

[0111] 在各个实施例中,CCR包括:细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域包括抗原特异性结合结构域;经修饰的铰链区;跨膜结构域;以及共刺激信号传导结构域而非初级信号传导结构域。

[0112] 在优选实施例中,CCR铰链区包括被一个或多个其它氨基酸残基(例如,一个或多个丝氨酸残基)取代的一个或多个半胱氨酸残基。

[0113] CAR和CCR组分的说明性实例在下文进一步公开。

[0114] 1. 结合结构域

[0115] 在特定实施例中,CAR和CCR包括细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域包括与在靶细胞,例如,癌细胞上表达的特定抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段。如本文所使用的,术语“结合结构域”、“细胞外结构域”、“细胞外结合结构域”、“抗原特异性结合结构域”和“细胞外抗原特异性结合结构域”可互换使用,并且为CAR和CCR提供了与所关注靶抗原特异性结合的能力。结合结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。

[0116] 如本文所使用的,术语“特异性结合亲和力(specific binding affinity)”或“特异性结合(specifically binds)”或“特异性结合的(specifically bound)”或“特异性结合(specific binding)”或“特异性靶向(specifically targets)”描述了抗体或其抗原结合片段(或包括所述抗体或其抗原结合结构域的CAR和CCR)与抗原以相比于背景结合更大的结合亲和力的结合。如果结合结构域(或包括结合结构域的CAR和CCR或含有结合结构域的融合蛋白)与抗原以例如大于或等于约 10^5M^{-1} 的亲和力或 K_a (即,特定结合相互作用的平衡缔合常数,其中单位为 $1/\text{M}$)结合或缔合,则其与抗原“特异性结合”。在某些实施例中,结合结构域(或其融合蛋白)与靶标以大于或等于约 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 或 10^{13}M^{-1} 的 K_a 结合。“高亲和力”结合结构域(或其单链融合蛋白)是指 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 10^{13}M^{-1} 或更大的那些结合结构域。

[0117] 可替代地,亲和力可以被定义为以 M 为单位的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M 或更低)。根据本公开的结合结构域多肽以及CAR蛋白质和CCR蛋白质的亲和力可以使用常规技术容易地确定,例如,通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定);或通过结合缔合;或使用所标记的配体的置换测定;或使用如可从新泽西州皮斯卡塔韦Biacore公司(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)获得的Biacore T100等表面等离子体共振装置、或如分别可从康宁公司(Corning)和珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)获得的EPIC系统或EnSpire等光学生物传感器技术(还参见,例如,Scatchard等人(1949)《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》51:660;以及美国专利第5,283,173号、第5,468,614号或等效物)。

[0118] 在一个实施例中,特异性结合亲和力为背景结合的约2倍、为背景结合的约5倍、为

背景结合的约10倍、为背景结合的约20倍、为背景结合的约50倍、为背景结合的约100倍或为背景结合的约1000倍或更多倍。

[0119] 在特定实施例中,CAR和CCR的细胞外结合结构域包括抗体或其抗原结合片段。“抗体”是指包括至少轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽的结合剂,所述轻链或重链免疫球蛋白可变区特异性地识别并结合抗原的表位,诸如肽、脂质、多糖或含有抗原决定簇的核酸,诸如通过免疫细胞识别的那些。“分离的抗体或其抗原结合片段”是指已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。

[0120] “抗原(Ag)”是指可以在动物中刺激抗体产生或T细胞应答的化合物、组合物或物质,包含注射或吸收到动物内的组合物(如包含癌症特异性蛋白的组合物)。抗原与具有特定体液或细胞免疫的产物反应,包含由如公开的抗原等异源抗原诱导的产物。

[0121] “表位”或“抗原决定簇”是指结合剂结合的抗原的区。表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位在独特的空间构象中通常包含至少3个并且更常见地至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。

[0122] 抗体包含嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)、异源缀合抗体(如双特异性抗体)和其抗原结合片段。还参见《皮尔斯目录与手册(Pierce Catalog and Handbook)》,1994-1995(伊利诺伊州罗克福德市皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL));Kuby,《免疫学期刊(J.,Immunology)》,第3版,纽约W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman&Co.,New York),1997。

[0123] 如本领域的技术人员所理解的并且如本文中其它地方所描述的,完全抗体包括两条重链和两条轻链。每条重链由可变区以及第一、第二和第三恒定区组成,而每条轻链由可变区和恒定区组成。哺乳动物重链被分类为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。哺乳动物轻链被分类为 λ 或 κ 。包括 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链的免疫球蛋白被分类为免疫球蛋白(Ig)A、IgD、IgE、IgG和IgM。完全抗体形成“Y”形状。Y的主干(stem)由结合在一起的两条重链的第二恒定区和第三恒定区(和对于IgE和IgM,第四恒定区)组成,并且(链间)二硫键在铰链中形成。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联的(在一条线上)Ig结构域构成的恒定区和用于增加柔性的铰链区;重链 μ 和 ϵ 具有由四个免疫球蛋白结构域构成的恒定区。第二恒定区和第三恒定区分别被称为“CH2结构域”和“CH3结构域”。Y的每个臂包含单条重链的与单个轻链的可变区和恒定区结合的可变区和第一恒定区。轻链和重链的可变区负责抗原结合。

[0124] 轻链和重链可变区包含被三个高变区中断的“框架”区,也被称为“互补决定区”或“CDR”。CDR可以通过常规方法,如通过根据Kabat等人(Wu,TT和Kabat,E.A.,《实验医学期刊(J Exp Med)》132(2):211-50,(1970);Borden,P.和Kabat E.A.,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,84:2440-2443(1987));(参见Kabat等人,《免疫学关注的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国卫生与公共事业部(U.S.Department of Health and Human Services),1991,所述文献通过引用并入本文)的序列或通过根据Chothia等人(Chothia,C.和Lesk,A.M.,《分子生物学期刊(J Mol Biol)》,196(4):901-917(1987);Chothia,C.等人,《自然(Nature)》,342:877-883(1989))的结构来定义或鉴定。

[0125] 用于预测轻链CDR的规则の説明性实例包含:CDR-L1开始于约残基24,之前是Cys,为约10-17个残基并且之后是Trp(通常是Trp-Tyr-Gln,但还是Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、

Trp-Tyr-Leu); CDR-L2开始于CDR-L1结束后的约16个残基,通常之前是Ile-Tyr还有Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Phe并且为7个残基;并且CDR-L3开始于CDR-L2结束后的约33个残基,之前是Cys,为7-11个残基并且之后是Phe-Gly-XXX-Gly(XXX为任何氨基酸)(SEQ ID NO:58)。

[0126] 用于预测重链CDR的规则说明性实例包含:CDR-H1开始于约残基26,之前是Cys-XXX-XXX-XXX(SEQ ID NO:59),为10-12个残基并且之后是Trp(通常是Trp-Val,但还是Trp-Ile、Trp-Ala);CDR-H2开始于CDR-H1结束后的约15个残基,通常之前是Leu-Glu-Trp-Ile-Gly(SEQ ID NO:60)或多个变型,为16-19个残基并且之后是Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala;并且CDR-H3开始于CDR-H2结束后的约33个残基,之前是Cys-XXX-XXX(通常是Cys-Ala-Arg),为3到25个残基并且之后是Trp-Gly-XXX-Gly(SEQ ID NO:61)。

[0127] 在一个实施例中,轻链CDR和重链CDR根据Kabat法确定。

[0128] 在一个实施例中,轻链CDR以及重链CDR2和CDR3根据Kabat方法确定,并且重链CDR1根据AbM方法确定,所述AbM法是Kabat方法与Clothia方法之间的折衷,参见例如,Whitelegg N.和Rees AR,《蛋白质工程(Protein Eng)》2000年12月;13(12):819-24以及《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》2004;248:51-91。用于预测CDR的程序可公开获得,例如,AbYsis(www.bioinf.org.uk/abysis/)。

[0129] 不同轻链或重链的框架区的序列在物种如人内是相对保守的。抗体的属于构成性轻链和重链的组合框架区的框架区用于在三维空间中定位和排列CDR。CDR主要负责与抗原的表位结合。每个链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N末端开始按顺序编号,并且通常还由特定CDR所在的链鉴别。因此,位于抗体的重链的可变结构域中的CDR被称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,而位于抗体的轻链的可变结构域中的CDR被称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。具有不同特异性的抗体(即,针对不同抗原具有不同组合位点)具有不同的CDR。尽管正是CDR因抗体的不同而有所不同,但是CDR内仅有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。

[0130] 提及“VL”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包含抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或如本文所设想的其它抗体片段的可变区。提及“VH”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包含抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或如本文所设想的其它抗体片段的可变区。

[0131] “单克隆抗体”是由B淋巴细胞的单个克隆或通过单个抗体的轻链和重链基因已经转染到的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过根据骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合制备杂合抗体形成细胞。单克隆抗体包含人源化单克隆抗体。

[0132] “嵌合抗体”具有来自一个物种如人的框架残基和来自另一个物种如小鼠的CDR(其通常赋予了抗原结合)。在特定优选实施例中,CAR和/或CCR包括抗原特异性结合结构域,所述抗原特异性结合结构域为嵌合抗体或其抗原结合片段。

[0133] 在特定实施例中,抗体是与人多肽特异性结合的人抗体(如人单克隆抗体)或其片段。如上所述,人抗体可以通过将选自人源性噬菌体展示文库的一个或多个Fv克隆可变结构域序列与一个或多个已知的人恒定结构域序列组合来构建。可替代地,人单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已经例如通过以下进行了描述:Kozbor,《免疫学期刊(J. Immunol)》,133:3001(1984);

Brodeur等人,《单克隆抗体产生技术与应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)》,第51-63页(纽约马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc., New York), 1987));以及Boerner等人,《免疫学期刊》,147:86(1991)。另外,转基因动物(例如,小鼠)可以用于在不存在内源免疫球蛋白产生的情况下产生完整人抗体库。参见例如, Jakobovits等人,《美国国家科学院院刊》,90:2551(1993); Jakobovits等人,《自然》,362:255(1993); Bruggermann等人,《免疫学年(Year in Immunol)》,7:33(1993)。基因改组也可以用于从非人,例如,啮齿动物抗体获得人抗体,其中所述人抗体具有与起始非人抗体类似的亲和力和特异性。(参见1993年4月1日公开的PCT WO 93/06213)。与通过CDR接枝使非人抗体常规人源化不同,这一技术提供了不具有非人源FR或CDR残基的完全人抗体。

[0134] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括“人源化”抗体。人源化抗体是包含人框架区和来自非人(例如,小鼠、大鼠或合成)免疫球蛋白的一个或多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白被称为“供体”,并且提供框架的人免疫球蛋白被称为“受体”。在一个实施例中,所有CDR均来自人源化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。不需要存在恒定区,但如果存在的话,则恒定区必须与人免疫球蛋白恒定区基本上相同,即,至少约85-90%如约95%或更多相同。因此,除了可能的CDR之外,人源化免疫球蛋白的所有部分均与天然人免疫球蛋白序列的对应部分基本上相同。人源化或其它单克隆抗体可以具有另外的保守氨基酸取代,所述保守氨基酸取代对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本上没有影响。人源化抗体可以通过基因工程构建(参见例如美国专利第5,585,089号)。

[0135] 抗体包含其抗原结合片段,如骆驼Ig、美洲驼Ig、羊驼Ig、Ig NAR、Fab'片段、F(ab')₂片段、双特异性Fab二聚体(Fab₂)、三特异性Fab三聚体(Fab₃)、Fv、单链Fv蛋白(“scFv”)、双-scFv、(scFv)₂、迷你抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定化Fv蛋白(“dsFv”)和单结构域抗体(sdAb、骆驼科动物VHH、纳米抗体)以及全长抗体的负责抗原结合的部分。抗体还包含:多克隆抗体和单克隆抗体及其抗原结合片段;鼠抗体、骆驼抗体和人抗体及其抗原结合片段;以及嵌合抗体、异源缀合抗体和人源化抗体及其抗原结合片段。还参见《皮尔斯目录与手册》,1994-1995(伊利诺伊州罗克福德市皮尔斯化学公司);Kuby,《免疫学期刊》,第3版,纽约W.H. 弗里曼公司,1997。

[0136] “重链抗体”是指含有两个VH结构域而不含有轻链的抗体(Riechmann L.等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》231:25-38(1999);W094/04678;W094/25591;美国专利第6,005,079号)。“骆驼抗体”是指含有两个VH结构域且无轻链的从骆驼、羊驼或美洲驼分离的抗体。“人源化VHH”或“人源化骆驼抗体”是指已经历人源化以降低抗体在人接受者中的潜在免疫原性的非人VHH或骆驼抗体。

[0137] “免疫球蛋白新抗原受体”的“IgNAR”是指来自鲨鱼免疫库的抗体类别,其由一个可变新抗原受体(VNAR)结构域和五个恒定新抗原受体(CNAR)结构域的同源二聚体组成。IgNAR表示已知的最小的基于免疫球蛋白的蛋白质支架中的一些并且高度稳定并且具有高效结合特性。固有稳定性可以归因于以下两者:(i)基础Ig支架,其与存在于鼠抗体中的常规抗体VH和VL结构域相比呈现出相当数量的带电和亲水表面暴露残基;以及(ii)互补决定区(CDR)回路中包含环间二硫键的稳定结构特征和环内氢键模式。

[0138] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生了两个相同的抗原结合片段,即各自具有单个抗原结合位点的所说的“Fab”片段和其名称反映了其易于结晶的能力残留“Fc”片段。胃蛋白酶处

理得到具有两个抗原组合位点并且仍然能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0139] “Fv”是包含完全抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施例中，双链Fv物种由呈紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物种中，一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接，从而使得轻链和重链可以缔合成与双链Fv物种中二聚体结构类似的“二聚体”结构。正是在这种构造中，每个可变结构域的三个高变区(HVR)相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。六个HVR共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单可变结构域(或仅包括对抗原具有特异性的三个HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力，尽管以比完整结合位点更低的亲和力进行。

[0140] Fab片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域并且还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸的重链CH1结构域的羧基末端加入几个残基。Fab'-SH是本文中对Fab'的命名，其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初是作为其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。双特异性Fab二聚体(Fab2)具有两个Fab'片段，每个片段结合不同的抗原。三特异性Fab三聚体(Fab3)具有三个Fab'片段，每个片段结合不同的抗原。

[0141] 术语“双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段，所述片段包括与同一条多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头，结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双功能抗体可以是二价的或双特异性的。双功能抗体更全面地描述于例如以下中：EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，《自然医学(Nat.Med.)》9:129-134(2003)；以及Hollinger,等人《美国国家科学院院刊》，90:6444-6448(1993)。三功能抗体和四功能抗体也描述于Hudson等人，《自然医学》9:129-134(2003)中。

[0142] “单结构域抗体”或“sdAb”或“纳米抗体”是指由抗体重链的可变区(VH结构域)或抗体轻链的可变区(VL结构域)组成的抗体片段(Holt,L.等人，《生物技术趋势(Trends in Biotechnology)》，21(11):484-490)。

[0143] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的VH结构域和VL结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中并且处于任何朝向(例如，VL-VH或VH-VL)。通常，scFv多肽进一步包括使scFv能够形成用于抗原结合的期望结构的在VH结构域与VL结构域之间的多肽接头。关于scFv的综述，参见例如，Pluckthün，《单克隆抗体药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》，第113卷，Rosenburg和Moore编辑，(纽约施普林格出版社(Springer Verlag,New York),1994)，第269-315页。

[0144] 在优选实施例中，抗原特异性结合片段为scFv或VHH。在特定实施例中，scFv为鼠、人或人源化scFv。单链抗体可以克隆自针对期望靶标具有特异性的杂交瘤的V区基因。这种杂交瘤的产生已经变得常规。可以用于克隆可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的技术已经描述于例如Orlandi等人，《美国国家科学院院刊》，1989;86:3833-3837中。

[0145] 在各个实施例中，CAR(例如，第一结合结构域)和/或CCR(例如，第二结合结构域)的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合，所述靶抗原选自由以下组成的组：α叶酸受体(FR

α)、αvβ6整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、密封蛋白-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、IL-11Ra、IL-13Ra2、κ、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、λ、路易斯-Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(WT-1)。

[0146] 在特定实施例中,抗原特异性结合结构域为scFv或VHH。

[0147] 在特定实施例中,抗原特异性结合结构域为与人BCMA或EGFR多肽结合的scFv。

[0148] 2.接头

[0149] 在某些实施例中,CAR和/或CCR包括各个结构域之间,例如,为了分子的适当间隔和构象而添加的接头残基。在特定实施例中,接头为可变区连接序列。“可变区连接序列”是氨基酸序列,所述氨基酸序列连接 V_H 结构域和 V_L 结构域并且提供与两个子结合结构域的相互作用兼容的间隔子功能,使得所得多肽保留对与包括相同轻链可变区和重链可变区的抗体相同的靶分子的特异性结合亲和力。在特定实施例中,CAR和/或CCR包括一个、两个、三个、四个或五个或更多个接头。在特定实施例中,接头的长度约为1个至约25个氨基酸、约5个至约20个氨基酸、或约10个至约20个氨基酸或任何中间长度的氨基酸。在一些实施例中,接头为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个氨基酸长。

[0150] 接头的说明性实例包含:甘氨酸聚合物(G_n);甘氨酸-丝氨酸聚合物($G_{1-5}S_{1-5}$) $_n$,其中n为至少一、二、三、四或五的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此能够充当如本文所描述的CAR或CCR等融合蛋白的结构域之间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基的限制要少得多(参见Scheraga,《计算化学综述(Rev.Computational Chem.)》11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,特定实施例中的CAR或CCR的设计可以包含完全或部分柔性的接头,使得接头可以包含柔性接头以及赋予较少柔性结构以提供期望CAR或CCR结构的一个或多个部分。

[0151] 其它示例性接头包含但不限于以下氨基酸序列:DGGGS(SEQ ID NO:21);TGEKP

(SEQ ID NO:22) (参见例如,Liu等人,《美国国家科学院院刊》55:25-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO:23) (Pomerantz等人1995,同上); (GGGS)_n, 其中n=1、2、3、4或5 (SEQ ID NO:24) (Kim等人,《美国国家科学院院刊》93,1156-1160 (1996)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO:25) (Chaudhary等人,1990,《美国国家科学院院刊》87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:26) (Bird等人,1988,《科学 (Science)》242:423-426); GGRRGGGS (SEQ ID NO:27); LRQRDGERP (SEQ ID NO:28); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO:29); LRQKD (GGGS)₂ERP (SEQ ID NO:30)。可替代地,柔性接头可以使用能够对DNA结合位点和肽两者自身进行建模的计算机程序 (Desjarlais和Berg,《美国国家科学院院刊》90:2256-2260 (1993);《美国国家科学院院刊》91:11099-11103 (1994)) 或通过噬菌体展示方法合理地设计。在一个实施例中,接头包括以下氨基酸序列:GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:31) (Cooper等人,《血液 (Blood)》,101 (4):1637-1644 (2003))。

[0152] 3. 间隔子结构域

[0153] 在特定实施例中,CAR和/或CCR的结合结构域之后是一个或多个“间隔子结构域”,所述一个或多个间隔子结构域是指使抗原结合结构域移动远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活的区 (Patel等人,《基因疗法 (Gene Therapy)》,1999;6:412-419)。间隔子结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。在某些实施例中,间隔子结构域是免疫球蛋白的一部分,包含但不限于一个或多个重链恒定区,例如,CH2和CH3。间隔子结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或更改的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0154] 在一个实施例中,间隔子结构域包括IgG1、IgG4或IgD的CH2和CH3结构域。

[0155] 4. 铰链结构域

[0156] 术语“铰链”、“铰链结构域”和“铰链区”可互换使用并且是指在将抗原结合结构域定位成远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活中起作用的柔性结构域。CAR和/或CCR的结合结构域之后通常是结合结构域与跨膜结构域(TM)之间的一个或多个铰链结构域。铰链结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。铰链结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或经更改免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链结构域包括间隔子结构域。

[0157] 如本文所使用的,术语“改变的铰链区”、“经修饰的铰链区”和“经修饰的铰链结构域”可互换使用并指代:(a) 具有至多30%氨基酸变化(例如,至多25%、20%、15%、10%或5%氨基酸取代或缺失)的天然存在的铰链区;(b) 天然存在的铰链区的长度为至少10个氨基酸(例如,至少12个、13个、14个或15个氨基酸)的具有至多30%氨基酸变化(例如,至多25%、20%、15%、10%或5%氨基酸取代或缺失)的一部分;或(c) 天然存在的铰链区的包括核心铰链区(所述核心铰链区的长度可以为4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14或15个或至少4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸)的一部分。

[0158] 在优选实施例中,经修饰的铰链区包括与如本文所述的和/或本领域已知的合适的铰链结构域/区具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,包括如本文所述的铰链序列的经修饰的铰链区具有4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/

或缺失。

[0159] 在某些实施例中,天然存在的铰链区中的一个或多个半胱氨酸残基可以被一个或多个其它氨基酸残基(例如,一个或多个丝氨酸残基)取代。在特定实施例中,改变的铰链区包括由另一种氨基酸残基(例如,丝氨酸残基)对脯氨酸残基进行的取代。

[0160] 适于在本文的特定实施例中设想的CAR和/或CCR中使用的说明性铰链结构域包含源自1型膜蛋白的细胞外区的铰链区,包括但不限于CD8 α 、CD4、CD28和CD7等,所述铰链区可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以被改变。在一个实施例中,铰链是PD-1铰链或CD152铰链。在另一实施例中,铰链结构域包括天然存在的免疫球蛋白铰链区,例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链。在另一实施例中,铰链结构域包括IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3或IgG4铰链/CH2。

[0161] 在一些实施例中,CD8 α 铰链区包括SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0162] 在一些实施例中,CD4铰链区包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0163] 在一些实施例中,CD28铰链区包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0164] 在一些实施例中,CD7铰链区包括SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0165] 在一些实施例中,CD152铰链区包括SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0166] 在一些实施例中,PD-1铰链区包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0167] 在一些实施例中,IgG1铰链区包括SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0168] 在一些实施例中,IgG2铰链区包括SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0169] 在一些实施例中,IgG3铰链区包括SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0170] 在一些实施例中,IgG4铰链区包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0171] 在一些实施例中,IgG1铰链/CH2/CH3铰链区包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0172] 在一些实施例中,IgG1铰链-CH3-铰链-M1铰链区包括SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0173] 在一些实施例中,IgG4铰链/CH2/CH3铰链区包括SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0174] 在一些实施例中,IgG4铰链/CH2铰链区包括SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或其功能片段或变体。

[0175] 在一些实施例中,PD-1铰链区包括SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列或其功能片

段或变体。

[0176] 在各个实施例中,本文所述的融合多肽包括经修饰的第一和/或第二铰链区,所述经修饰的第一和/或第二铰链区包括与上述铰链结构域/区中的任一者具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,经修饰的第一和/或第二铰链区包括如上所述的具有4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/或缺失的铰链序列。

[0177] 在某些实施例中,铰链区/结构域中的一个或多个半胱氨酸残基可以被一个或多个其它氨基酸残基取代以产生经修饰的铰链结构域。在一些实施例中,经修饰的铰链结构域包括被丝氨酸或丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的铰链结构域包括被丝氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括被丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在一些实施例中,CCR铰链结构域是经修饰的。在一些实施例中,CAR铰链结构域是未经修饰的。在一些实施例中,CAR铰链结构域和CCR铰链结构域两者均是经修饰的。

[0178] 在一优选实施例中,铰链结构域包括CD8 α 铰链区/结构域。在一个实施例中,铰链结构域包括如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸残基。在另一实施例中,CAR和/或CCR包括经修饰的CD8 α 铰链结构域。在另一实施例中,CCR包括经修饰的CD8 α 铰链结构域,并且CAR任选地包括野生型铰链序列。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括被一个或多个其它氨基酸残基取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括被丝氨酸或丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括被丝氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括被丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。

[0179] 在一个实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的半胱氨酸至丝氨酸取代。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸残基。在一特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID NO:3中所示的序列具有至少90%、93%、95%或97%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/或缺失。

[0180] 在一个实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的半胱氨酸至丝氨酸取代。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸残基。在特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID NO:4中所示的序列具有至少90%、93%、95%或97%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/或缺失。

[0181] 在一个实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的半胱氨酸至丝氨酸取代。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括如SEQ ID

N0:5中所示的氨基酸残基。在一特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID N0:5中所示的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在特定实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括与SEQ ID N0:5中所示的序列具有至少90%、93%、95%或97%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,经修饰的CD8 α 铰链结构域包括4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/或缺失。

[0182] 5. 跨膜(TM) 结构域

[0183] “跨膜结构域”是CAR和/或CCR的与细胞外结合部分和细胞内信号传导结构域融合并且将CAR和/或CCR锚定到免疫效应细胞的质膜上的一部分。TM结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。TM结构域可以源自(即,至少包括其跨膜区)T细胞受体的 α 链或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD1。在一特定实施例中,TM结构域是合成的并且主要包括如亮氨酸和缬氨酸等疏水残基。

[0184] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括源自PD1、CD152、CD28或CD8 α 的TM结构域。在另一实施例中,CAR和/或CCR包括源自PD1、CD152、CD28或CD8 α 的TM结构域和优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的视情况而定连接TM结构域和CAR和/或CCR的细胞内信号传导或共刺激结构域的短寡肽或多肽接头。基于甘氨酸-丝氨酸的接头提供了特别适合的接头。

[0185] 例如,在一个非限制性且仅说明性实施例中,跨膜结构域包括如SEQ ID N0:6中所示的CD8 α 跨膜结构域。在一特定实施例中,CD8 α 跨膜结构域包括与SEQ ID N0:6中所示的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。

[0186] 6. 细胞内信号传导结构域

[0187] 在特定实施例中,CAR包括一个或多个细胞内信号传导结构域。“细胞内信号传导结构域”是指CAR的参与将与人抗原的有效CAR结合的消息转导到免疫效应细胞的内部以引发效应细胞功能,例如,激活、细胞因子产生、增殖和细胞毒性,包含细胞毒性因子释放到CAR结合的靶细胞或用与细胞外CAR结构域的抗原结合引发的其它细胞应答的部分。

[0188] 术语“效应功能”是指免疫效应细胞的专门功能。T细胞的效应功能例如可以是溶细胞活性或辅助或活性,包含细胞因子的分泌。因此,术语“细胞内信号传导结构域”指代蛋白质的一部分,所述部分转导效应功能信号并引导细胞执行专门功能。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个结构域。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分来说,可使用这类截短部分代替整个结构域,只要其转导效应功能信号即可。术语细胞内信号传导结构域意图包括足以转导效应功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0189] 已知的是,单独通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次级信号或共刺激信号。因此,可以说T细胞激活由两种不同类别的细胞内信号传导结构域介导:初级信号传导结构域,其通过TCR(例如,TCR/CD3复合物)启动抗原依赖性初级激活;以及共刺激信号传导结构域,其是以抗原非依赖性方式起作用以提供次级信号或共刺激信号。在优选实施例中,CAR包括细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包括一个或多个

“共刺激信号传导结构域”和“初级信号传导结构域”。

[0190] 初级信号传导结构域以刺激性方式或以抑制性方式调控TCR复合物的初级激活。以刺激性方式起作用的初级信号传导结构域可含有信号传导基元,所述信号传导基元称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0191] 可用于特定实施例的含有ITAM的初级信号传导结构域的说明性实例包含源自FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在特定优选实施例中,CAR包括CD3 ζ 初级信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域。细胞内初级信号传导和共刺激信号传导结构域可以与跨膜结构域的羧基末端按任何顺序串联连接。

[0192] 在特定实施例中,CAR和/或CCR包括用于增强表达CAR受体和CCR受体的T细胞的功效和扩增的一个或多个共刺激信号传导结构域。如本文所使用的,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指共刺激分子的细胞内信号传导结构域。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子,所述细胞表面分子提供在与抗原结合后使T淋巴细胞有效激活和起作用所需的第二信号。此类共刺激分子的说明性实例包含:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、TNFR2和ZAP70。在一个实施例中,CAR和/或CCR包括选自由CD28、CD137和CD134组成的组的一个或多个共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0193] 在另一实施例中,CAR和/或CCR包括CD28和CD137共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0194] 在又另一实施例中,CAR和/或CCR包括CD28和CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0195] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括CD137和CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0196] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括CD137共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0197] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0198] 在一个实施例中,CAR和/或CCR包括CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0199] D. CAR和CCR的说明性实施例

[0200] 在一个实施例中,CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段,所述抗体或其抗原特异性结合片段与抗原结合;铰链区;跨膜结构域;来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域;以及初级信号传导结构域。

[0201] 在一个实施例中,CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段,所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌细胞上表达的抗原结合;铰链区;跨膜结构域,所述跨膜结构域源自多肽,所述多肽选自由以下组成的组:T细胞受体的 α 链或 β 链、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1;来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域,所述共刺激分子选自由以下组成的组:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、

CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70；以及来自FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0202] 在一个实施例中，CAR包括铰链结构域，所述铰链结构域选自由以下组成的组：CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。

[0203] 在一个实施例中，CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段，所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合；铰链结构域，所述铰链结构域选自由以下组成的组：CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2；跨膜结构域，所述跨膜结构域源自多肽，所述多肽选自由以下组成的组：T细胞受体的 α 链或 β 链、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1；优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的将TM结构域与CAR的细胞内信号传导结构域连接的短寡肽或多肽接头；以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域，所述共刺激分子选自由以下组成的组：TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70；以及来自FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0204] 在一特定实施例中，CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段，所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合；铰链结构域，所述铰链结构域包括CD8 α 多肽；CD8 α 跨膜结构域，所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头（例如，尾部-CD8接头）；CD137 (4-1BB) 细胞内共刺激信号传导结构域；以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0205] 在一特定实施例中，CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段，所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合；铰链结构域，所述铰链结构域包括CD8 α 多肽；CD8 α 跨膜结构域，所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头（例如，尾部-CD8接头）；CD134细胞内共刺激信号传导结构域；以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0206] 在一特定实施例中，CAR包括抗体或其抗原特异性结合片段，所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合；铰链结构域，所述铰链结构域包括CD8 α 多肽；CD8 α 跨膜结构域，所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头（例如，尾部-CD8接头）；CD28细胞内共刺激信号传导结构域；以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0207] 在各个实施例中，CAR抗体或其抗原特异性结合片段为scFv或VHH。在一些实施例中，CAR抗体或其抗原特异性结合片段为scFv。在一些实施例中，CAR抗体或其抗原特异性结合片段为VHH。

[0208] 在本文所述的实施例中的任一个实施例中，CAR铰链区可以被修饰成减少如本文所述的抗原非依赖性T细胞信号传导。在本文所述的实施例中的任一个实施例中，相比于包括未经修饰的铰链区的CAR，铰链区可以被修饰成在不存在CAR抗原的情况下减少与CCR的缔合。

[0209] 在一个实施例中,经修饰的CAR铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。在另一实施例中,一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。在一优选实施例中,经修饰的铰链区为CD8 α 铰链区。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区源自SEQ ID NO:2。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:3)。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:4)。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:5)。

[0210] 在上述实施例中的任何实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR,CAR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞信号传导的CCR共刺激。在上述实施例中的任何实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CAR,CAR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少与CCR的缔合。

[0211] 在一个实施例中,CCR包括抗体或其抗原特异性结合片段,所述抗体或其抗原特异性结合片段与抗原结合;铰链区;跨膜结构域;以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域。

[0212] 在一个实施例中,CCR包括抗体或其抗原特异性结合片段,所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合;经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸;跨膜结构域,所述跨膜结构域源自多肽,所述多肽选自自由以下组成的组:T细胞受体的 α 链或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1;以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域,所述共刺激分子选自自由以下组成的组:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。

[0213] 在一个实施例中,CCR包括经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区选自自由以下组成的组:CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2。

[0214] 在一个实施例中,CCR包括抗体或其抗原特异性结合片段,所述抗体或其抗原特异性结合片段与在癌上表达的抗原结合;经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区选自自由以下组成的组:CD8 α 铰链、CD4铰链、CD28铰链、CD7铰链、CD152铰链、PD1铰链、IgG1铰链、IgG2铰链、IgG3铰链、IgG4铰链、IgG1铰链/CH2/CH3、IgG1铰链/CH3/铰链/M1、IgG4铰链/CH2/CH3和IgG4铰链/CH2;跨膜结构域,所述跨膜结构域源自多肽,所述多肽选自自由以下组成的组:T细胞受体的 α 链或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1;优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的将TM结构域与CAR的细胞内信号传导结构域连接的短寡肽或多肽接头;以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域,所述共刺激分子选自自由以下组成的组:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM、TNFR2和ZAP70。

[0215] 在一特定实施例中,CCR包括:scFv或VHH,所述scFv或VHH与在癌上表达的抗原结合;经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区包括如本文所述的CD8 α 多肽;CD8 α 跨膜结构域,所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头(例如,尾部-CD8接头);以及CD137细胞内共刺激信号传导结构域。

[0216] 在一特定实施例中,CCR包括:scFv或VHH,所述scFv或VHH与在癌上表达的抗原结合;经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区包括如本文所述的CD8 α 多肽;CD8 α 跨膜结构域,所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头(例如,尾部-CD8接头);以及CD134细胞内共刺激信号传导结构域。

[0217] 在一特定实施例中,CCR包括:scFv或VHH,所述scFv或VHH与在癌上表达的抗原结合;经修饰的铰链区,所述经修饰的铰链区包括如本文所述的CD8 α 多肽;CD8 α 跨膜结构域,所述CD8 α 跨膜结构域包括约3个至约10个氨基酸的多肽接头(例如,尾部-CD8接头);以及CD28细胞内共刺激信号传导结构域。

[0218] 在各个实施例中,CCR抗体或其抗原特异性结合片段为scFv或VHH。在一些实施例中,CCR抗体或其抗原特异性结合片段为scFv。在一些实施例中,CCR抗体或其抗原特异性结合片段为VHH。

[0219] 在本文所述的实施例中的任一个实施例中,CCR铰链区可以被修饰成减少如本文所述的抗原非依赖性T细胞信号传导。在本文所述的实施例中的任一个实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,CCR铰链区可以被修饰成减少在不存在CAR抗原的情况下与CAR的缔合。

[0220] 在一个实施例中,经修饰的CCR铰链区包括被不同氨基酸取代的一个或多个半胱氨酸。在另一实施例中,一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸或丙氨酸取代。在一优选实施例中,经修饰的铰链区为CD8 α 铰链区。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区源自SEQ ID NO:2。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置27处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:3)。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括位于SEQ ID NO:2的位置44处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:4)。在另一实施例中,经修饰的CD8 α 铰链区包括SEQ ID NO:2的位置27和44处的氨基酸取代(即,参见SEQ ID NO:5)。

[0221] 在上述实施例中的任何实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,CCR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞信号传导的CCR共刺激。在上述实施例中的任何实施例中,相比于包括未经修饰的铰链区的CCR,CCR铰链区内的一个或多个半胱氨酸取代在不存在CAR抗原的情况下减少与CAR的缔合。

[0222] 在各个实施例中,CAR和/或CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组: α 叶酸受体(FR α)、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、密封蛋白-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂

G2 (GD2)、神经节苷脂G3 (GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2 (LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y (LeY)、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2)；黑色素瘤抗原基因 (MAGE) - A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色瘤抗原 (MelanA或MART1)、间皮素 (MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、聚唾液酸；胎盘特异性1 (PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2 (SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3 (TIM-3)、肿瘤内皮标志物1 (TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关 (TEM7R)、滋养层糖蛋白 (TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2) 和威尔姆斯瘤1 (WT-1)。在特定实施例中, 抗原特异性结合结构域为scFv或VHH。在特定实施例中, 抗原特异性结合结构域为scFv。在特定实施例中, 所述抗原特异性结合结构域为VHH。在特定实施例中, 抗原特异性结合结构域为与人BCMA或EGFR多肽结合的scFv。

[0223] 在各个实施例中, CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合, 所述靶抗原选自自由以下组成的组: α 叶酸受体 (FR α)、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3 (CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX (CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135 (也被称为fmc样酪氨酸激酶3; FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原 (CEA)、密封蛋白-6 (CLDN6)、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、CD2子集1 (CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4 (CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1 (CTAGE1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、上皮糖蛋白2 (EGP2)、上皮糖蛋白40 (EGP40)、上皮细胞粘附分子 (EPCAM)、肝配蛋白A型受体2 (EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白 (FAP)、Fc受体样5 (FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体 (AChR)、神经节苷脂G2 (GD2)、神经节苷脂G3 (GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2 (LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y (LeY)、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2)；黑色素瘤抗原基因 (MAGE) - A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色瘤抗原 (MelanA或MART1)、间皮素 (MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、聚唾液酸；胎盘特异性1 (PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2 (SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3 (TIM-3)、肿瘤内皮标志物1 (TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关 (TEM7R)、滋养层糖蛋白 (TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2) 和威尔姆斯瘤1 (WT-1)。

[0224] 在各个实施例中, CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合, 所述靶抗原选自自由以下组成的组: B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体。

[0225] 在各个实施例中, CAR的抗原特异性结合结构域与人BCMA多肽结合。

[0226] 在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组: α 叶酸受体(FR α)、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、密封蛋白-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白多糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、MUC1、MUC16、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、存活蛋白、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(WT-1)。在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原(BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、包含ErbB2(HER2)的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)和NKG2D配体。

[0227] 在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽、EGFRvIII多肽、TAG72多肽或CD20多肽结合。

[0228] 在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。在各个实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0229] 在特定实施例中,CCR的抗原特异性结合结构域为scFv或VHH。

[0230] 在各个实施例中,CAR包括第一抗体或其抗原特异性结合片段;并且所述CCR包括第二抗体或其抗原特异性结合片段。在一些实施例中,所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原结合。在一些实施例中,所述第一抗体和所述第二抗体或抗原特异性结合片段与同一靶抗原上的不同表位结合。在一些实施例中,第一抗体和第二抗体或抗原特异性结合片段与不同靶抗原结合。

[0231] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原(BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、

包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体;并且CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体。

[0232] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、CD33、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII)、包含ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、MAGE-A4、MUC1、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体;并且CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

[0233] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD33、CD79a、CD79b、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、MAGE-A4、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体;并且CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

[0234] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,为B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD33、CD79a、CD79b、C型凝集素样分子-1 (CLL-1)、MAGE-A4、MUC16、癌/睾丸抗原1 (NY-ESO-1)、黑色素瘤中优先表达的抗原 (PRAME)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72) 和NKG2D配体;并且CCR的抗原特异性结合结构域与靶抗原结合,所述靶抗原选自由以下组成的组:B细胞成熟抗原 (BCMA)、CD20、表皮生长因子受体 (EGFR)、表皮生长因子受体变体III (EGFRvIII) 和TAG72。

[0235] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人BCMA多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0236] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人BCMA多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0237] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人BCMA多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0238] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人BCMA多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0239] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD33多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0240] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD33多肽结合;并且CCR的抗

原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0241] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD33多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0242] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD33多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0243] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79a多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0244] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79a多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0245] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79a多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0246] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79a多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0247] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79b多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0248] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79b多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0249] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79b多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0250] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CD79b多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0251] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CLL-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0252] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CLL-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0253] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CLL-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0254] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人CLL-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0255] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MAGE-A4多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0256] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MAGE-A4多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0257] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MAGE-A4多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0258] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MAGE-A4多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0259] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0260] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0261] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0262] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0263] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NY-ESO-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0264] 在各个实施例中,抗原特异性结合结构域与人NY-ESO-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0265] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NY-ESO-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0266] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NY-ESO-1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0267] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人PRAME多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0268] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人PRAME多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0269] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人PRAME多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0270] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人PRAME多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0271] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人ROR1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0272] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人ROR1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0273] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人ROR1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0274] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人ROR1多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0275] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0276] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0277] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0278] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NKG2D配体多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人EGFR多肽结合。

[0279] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NKG2D配体多肽结合;并且CCR

的抗原特异性结合结构域与人EGFRvIII多肽结合。

[0280] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NKG2D配体多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人CD20多肽结合。

[0281] 在各个实施例中,CAR的抗原特异性结合结构域与人NKG2D配体多肽结合;并且CCR的抗原特异性结合结构域与人TAG72多肽结合。

[0282] 特定实施例中设想的CAR和CCR的设计在表达CAR和CCR的T细胞中相比于未经修饰的T细胞或被修饰成表达其它CAR的T细胞实现了改进的扩增、长期的持续性和细胞毒性性质。

[0283] E. 多肽

[0284] 本文设想了各种多肽、融合多肽和多肽变体,包括但不限于CAR多肽、CCR多肽、其融合多肽及其片段。在特定实施例中,本文设想的示例性多肽包含包括经修饰的铰链区和相关融合多肽的CCR。具体地,相比于包括未经修饰的CCR铰链区的多肽或细胞,本文所述的多肽显示出在不存在CAR抗原的情况下T细胞信号传导减少。更具体地,本文所述的经改进的多肽出人意料地减少CCR介导的CAR抗原非依赖性信号传导,同时在存在CAR抗原和CCR抗原两者的情况下增加T细胞信号传导。

[0285] 除非作相反说明,否则“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且根据常规含义,即,定义为氨基酸序列。多肽不限于特定长度,例如,其可以包括全长多肽或多肽片段,并且可以包含多肽的一个或多个翻译后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等以及本领域已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。

[0286] 如本文所使用的,“分离的多肽”等是指从细胞环境中以及从与细胞的其它组分的缔合中体外合成、分离和/或纯化的肽或多肽分子,即所述肽或多肽分子未与体内物质显著缔合。在特定实施例中,分离的多肽是合成多肽、半合成多肽或从重组来源获得或源自重组来源的多肽。

[0287] 多肽包括“多肽变体”。多肽变体与天然存在的多肽的不同之处可以在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入。这种变体可以是天然存在的或可以通过合成生成,例如通过修饰上述多肽序列中的一个或多个。例如,在特定实施例中,可以期望通过将一个或多个取代、缺失、添加和/或插入引入到结合结构域、铰链、TM结构域、共刺激信号传导结构域或初级信号传导结构域(如果存在的话)中来改进CAR和/或CCR的结合亲和力和/或其它生物学性质。在特定实施例中,多肽包含与本文所涵盖的参考序列中的任何一个有至少约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%或99%氨基酸同一性的多肽,通常其中变体维持参考序列的至少一种生物活性。在特定实施例中,生物活性是结合亲和力。在特定实施例中,生物活性是溶细胞活性。

[0288] 多肽包含“多肽片段”。多肽片段是指可以是单体的或多体的具有天然存在的或重组产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失或取代的多肽。生物活性多肽片段的说明性实例包含抗体片段。如本文所使用的,术语“生物活性片段”或“最小生物活性片段”是指保留天然存在的多肽活性的至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%或至少5%的多肽片段。在优选实施例中,生物活性是与独特型的结合亲和力。在某些实施例中,多肽片段可以包括至少5个

到约500个氨基酸长的氨基酸链。应当理解的是,在某些实施例中,片段长至少5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、150个、200个、250个、300个、350个、400个或450个氨基酸。特别有用的多肽片段包含功能性结构域,所述功能性结构域包含抗原结合结构域或抗体片段。

[0289] 多肽也可以使用相同读框融合或与接头或其它序列缀合,以便合成、纯化或鉴定多肽(例如,聚-His)或增强多肽与固体支持物的结合。

[0290] 如上文中指出的,在特定实施例中,可以以各种方式来改变多肽,包含氨基酸取代、缺失、截短和插入。用于此类操纵的方法是本领域公知的。例如,可以通过DNA的突变来制备参考多肽的氨基酸序列变体。用于诱变和核苷酸序列改变的方法是本领域熟知的。参见,例如,Kunkel (1985,《美国国家科学院院刊》82:488-492);Kunkel等人,(1987,《酶学方法》,154:367-382);美国专利第4,873,192号;Watson,J.D.等人,《基因的分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,第四版,加利福尼亚门洛帕克本杰明-卡明斯公司(Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.), 1987)以及本文引用的参考文献。关于不影响所关注蛋白质的生物活性的适当氨基酸取代的指导可以在Dayhoff等人,(1978),《蛋白质序列和结构图集(Atlas of Protein Sequence and Structure)》(华盛顿特区美国国家生物医学研究基金会(Natl.Biomed.Res.Found., Washington, D.C.))的模型中找到。

[0291] 在某些实施例中,多肽变体包括一个或多个保守取代。“保守取代”是其中氨基酸被具有类似性质的另一个氨基酸取代从而使得肽化学领域的技术人员预期多肽的二级结构和亲水性基本上未改变的取代。修饰可以针对特定实施例中设想的多核苷酸和多肽的结构进行并且仍然获得了对具有期望特性的变体或衍生多肽进行编码的功能分子。当期望更改多肽的氨基酸序列以产生等效的或甚至经改进的变体多肽时,本领域技术人员例如可以例如根据表1改变编码DNA序列的密码子中的一个或多个。

[0292] 表1—氨基酸密码子

[0293]

氨基酸	单字母代码	三字母代码	密码子				
丙氨酸	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU	
半胱氨酸	C	Cys	UGC	UGU			
天冬氨酸	D	Asp	GAC	GAU			
谷氨酸	E	Glu	GAA	GAG			
苯丙氨酸	F	Phe	UUC	UUU			
甘氨酸	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU	
组氨酸	H	His	CAC	CAU			
异亮氨酸	I	Iso	AUA	AUC	AUU		
赖氨酸	K	Lys	AAA	AAG			
亮氨酸	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG CUU
甲硫氨酸	M	Met	AUG				
天冬酰胺	N	Asn	AAC	AAU			
脯氨酸	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU	
谷氨酰胺	Q	Gln	CAA	CAG			

[0294]

精氨酸	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
丝氨酸	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
苏氨酸	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
缬氨酸	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
色氨酸	W	Trp	UGG					
酪氨酸	Y	Tyr	UAC	UAU				

[0295] 可以使用本领域中公知的计算机程序如DNASTAR、DNA Strider、Geneious、Mac Vector或Vector NTI软件找到关于确定哪些氨基酸残基可以被取代、插入或缺失而不消除生物活性的指南。优选地,本文所公开的蛋白质变体的氨基酸改变是保守氨基酸改变,即带类似电荷或不带电荷的氨基酸的取代。保守氨基酸改变涉及在侧链方面相关的氨基酸的家族中的一个氨基酸的取代。天然存在的氨基酸通常分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和极性不带电氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同分类为芳香族氨基酸。在肽或蛋白质中,适当的氨基酸保守取代对于本领域的技术人员来说是已知的,并且通常可以在不改变所得分子的生物活性的情况下进行。本领域的技术人员认识到,通常,多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不会改变生物活性(参见,例如, Watson等人《基因的分子生物学》,第4版,1987,本杰明/卡明斯出版公司,第224页)。

[0296] 如上文所概述的,氨基酸取代可以基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。

[0297] 多肽变体进一步包含糖基化形式、与其它分子的聚集缀合物和与不相关化学部分(例如,聚乙二醇化分子)的共价缀合物。如本领域中已知的,可以通过将功能与在氨基酸链中或在N末端或C末端残基处发现的基团连接来制备共价变体。变体还包含等位基因变体、物种变体和突变蛋白。不影响蛋白质的功能活性的区截短或缺失也是变体。

[0298] 在特定实施例中,期望CAR和CCR在相同细胞中表达。编码CAR和CCR的多核苷酸序列可以由本文其它地方讨论的IRES序列分离。

[0299] 在优选实施例中,本文设想了融合多肽。

[0300] 在一特定优选实施例中,CAR和CCR可表达为包括一个或多个分离CAR和CCR的自切割多肽序列的融合多肽。

[0301] 融合多肽和融合蛋白指代具有至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个多肽区段的多肽。融合多肽通常是C末端连接到N末端,但其也可以是C末端连接到C末端、N末端连接到N末端或N末端连接到C末端。融合蛋白的多肽可以采取任何顺序或指定的顺序。在一个实施例中,融合蛋白包括CAR、多肽切割信号和CCR。在另一实施例中,融合蛋白包括CCR、多肽切割信号和CAR。

[0302] 在一个实施例中,融合蛋白包括CAR、多肽切割信号和CCR。在另一实施例中,融合蛋白包括CCR、多肽切割信号和CAR。

[0303] 在特定实施例中,融合蛋白包括CAR,所述CAR包括与在癌上表达的抗原结合的scFv、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和初级信号传导结构域;多肽切割信号;以及CCR,所述CCR包括与抗原结合的scFv、如本文所述的经修饰的铰链区、跨膜结构域和共刺激结构域。示例性结构域/区可以选自本文所述的那些结构域/区。

[0304] 在优选实施例中,融合蛋白包括CAR,所述CAR包括与在癌上表达的抗原结合的scFv、CD8 α 铰链、跨膜结构域、CD137共刺激结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域;多肽切割信号;以及CCR,所述CCR包括与抗原结合的scFv、如本文所述的经修饰的CD8 α 铰链、跨膜结构域和CD28共刺激结构域。

[0305] 示例性多肽切割信号包含多肽切割识别位点,如蛋白酶切割位点、核酸酶切割位点(例如,稀有限制酶识别位点、自切割核酶识别位点)和自切割病毒寡肽(参见deFelipe和Ryan,2004.《转运(Traffic)》,5(8),616-26)。

[0306] 合适的蛋白酶切割位点和自切割肽是技术人员已知的(参见例如,Ryan等人,1997,《普通病毒学杂志(J.Gener.Virol.)》78,699-722;Scymczak等人(2004)《自然生物科技(Nature Biotech.)》5,589-594)。示例性蛋白酶切割位点包括但不限于以下的切割位点:马铃薯Y病毒NIa蛋白酶(例如,烟草蚀斑病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒HC蛋白酶、马铃薯Y病毒P1(P35)蛋白酶、byo病毒NIa蛋白酶、byo病毒RNA-2编码蛋白酶、口疮病毒属L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、小rna 3C蛋白酶、豇豆花叶病毒24K蛋白酶、线虫传多面体病毒24K蛋白酶、RTSV(水稻东格鲁球状病毒)3C样蛋白酶、PYVF(欧防风黄点病毒)3C样蛋白酶、肝素、凝血酶、因子Xa和肠激酶。由于其高切割严格性,在一个实施例中优选TEV(烟草蚀斑病毒)蛋白酶切割位点,例如,EXXYXQ(G/S)(SEQ ID NO:32),例如,ENLYFQG(SEQ ID NO:33)以及ENLYFQS(SEQ ID NO:34),其中X表示任何氨基酸(在Q与G之间或Q与S之间发生由TEV进行的切割)。

[0307] 在特定实施例中,多肽切割信号是病毒自切割肽或核糖体跳跃序列。

[0308] 核糖体跳跃序列的说明性实例包含但不限于:2A或2A样位点、序列或结构域(Donnelly等人,2001,《普通病毒学杂志》82:1027-1041)。在一特定实施例中,病毒2A肽是口疮病毒2A肽、马铃薯Y病毒2A肽或心脏病毒2A肽。

[0309] 在一个实施例中,病毒2A肽选自由以下组成的组:口蹄疫病毒(FMDV)2A肽、马鼻炎

A型病毒 (ERAV) 2A肽、明脉扁刺蛾β四体病毒 (TaV) 2A肽、猪捷申病毒-1 (PTV-1) 2A肽、泰勒病毒2A肽以及脑心肌炎病毒2A肽。

[0310] 表2中提供了2A位点的说明性实例。

[0311] 表2

[0312]

SEQ ID NO:35	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:36	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:37	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:38	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:39	EGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:40	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:41	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:42	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:43	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:44	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:46	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:47	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:48	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:49	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:50	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:51	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:52	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:53	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO:54	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:55	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:56	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0313] 在优选实施例中，融合多肽包括如本文所述的CAR、T2A自切割多肽和如本文所述的CCR。

[0314] F. 多核苷酸

[0315] 在优选实施例中，提供了编码一种或多种CAR多肽、CCR多肽或包括CAR、2A肽和CCR的融合多肽的多核苷酸。如本文所使用的，术语“多核苷酸”或“核酸”是指脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 和DNA/RNA杂交体。多核苷酸可以是单链的或双链的以及重组的、合成的或分离的。多核苷酸包含但不限于：前信使RNA (前mRNA)、信使RNA (mRNA)、RNA、基因组DNA (gDNA)、PCR扩增DNA、互补DNA (cDNA)、合成DNA或重组DNA。多核苷酸是指长度为至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少1000个、至少5000个、至少10000个或至少15000个或更多个核苷酸以及所有中间长度的核苷酸的聚合形式，或者是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者是任一类型核苷酸的修饰形式。容易理解的是，在此上下文中，“中间长度”意指所引用值之间的任何长度，如6、7、8、9等，101、102、103等；151、152、153等；201、

202、203等。在特定实施例中，多核苷酸或变体与参考序列具有至少或约50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0316] 如本文所使用的，“分离的多核苷酸”是指已经从其两侧的处于天然存在状态的序列纯化的多核苷酸，例如，已经从通常与片段相邻的序列中移除的DNA片段。在特定实施例中，“分离的多核苷酸”是指互补DNA (cDNA)、重组DNA、或自然界中不存在但已经通过人手制成的其它多核苷酸。在具体实施例中，分离的多核苷酸是合成多核苷酸、半合成多核苷酸或获自或源自重组来源的多核苷酸。

[0317] 在各个实施例中，多核苷酸包括编码本文所设想的多肽的mRNA。在某些实施例中，mRNA包括帽、一个或多个核苷酸和poly (A) 尾部。

[0318] 在特定实施例中，多核苷酸可以是密码子优化的。如本文所使用的，术语“密码子优化的”指代取代编码多肽的多核苷酸中的密码子以增加多肽的表达、稳定性和/或活性。影响密码子优化的因素包含但不限于以下中的一种或多种：(i) 两个或更多个生物体或基因之间的密码子偏倚或者合成地构成的偏倚表格的变化；(ii) 生物体、基因或基因组内的密码子偏倚度的变化；(iii) 包含背景在内的密码子的系统变化；(iv) 密码子根据其解码tRNA的变化；(v) 密码子根据GC%在总体上或在三联体中的一个位置处的变化；(vi) 与参考序列例如天然存在的序列的相似度的变化；(vii) 密码子频率截止的变化；(viii) 从DNA序列转录的mRNA的结构性质；(ix) 关于设计密码子取代组所基于的DNA序列的功能的先验知识；(x) 每个氨基酸的密码子组的系统变化；和/或(xi) 假性翻译起始位点的经过分离的移除。

[0319] 如本文所使用的，术语“多核苷酸变体”和“变体”等是指显示出与参考多核苷酸序列或在下文中定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸具有实质性序列同一性的多核苷酸。这些术语包含与参考多核苷酸相比其中已添加或缺失、或用不同核苷酸替代一个或多个核苷酸的多核苷酸。在此方面，本领域中充分理解的是，可以对参考多核苷酸作出包括突变、添加、缺失以及取代在内的某些改变，由此所改变的多核苷酸保留所述参考多核苷酸的生物功能或活性。

[0320] 多核苷酸变体包含编码生物活性多肽片段或变体的多核苷酸片段。如本文所使用，术语“多核苷酸片段”是指长度为至少5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个、1000个、1100个、1200个、1300个、1400个、1500个、1600个、1700个或更多个核苷酸的多核苷酸片段，其编码保留至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%或至少5%的天然存在的多肽活性的多肽变体。多核苷酸片段指代编码多肽的多核苷酸，所述多肽具有天然存在的或重组产生的多肽的一个或多个氨基酸的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失或取代。

[0321] 如本文所使用,叙述“序列同一性”或例如包含“与...50%一致的序列”是指在核苷酸与核苷酸基础上或在氨基酸与氨基酸基础上,序列在比较窗内一致的程度。因此,“序列同一性百分比”可以通过以下方式计算:在比较窗内比较两个最佳地比对的序列,测定的一致核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或一致氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys以及Met)在两个序列中出现的位置的数目以得到相配位置的数目,用相配位置的数目除以比较窗中的位置总数(即,窗大小)并将结果乘以100,得到序列同一性百分比。包含与本文所述的参考序列中的任一个具有至少约50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、86%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸和多肽,通常其中多肽变体维持参考多肽的至少一种生物活性。

[0322] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“基本同一性”。“参考序列”的长度是至少12个,但常常是15个至18个且通常是至少25个单体单元,包括核苷酸和氨基酸残基在内。因为两个多核苷酸可以各自包括(1)在两个多核苷酸之间类似的序列(即,仅完整多核苷酸序列的一部分);和(2)在两个多核苷酸之间相异的序列,两个(或更多个)多核苷酸之间的序列比较通常通过在“比较窗”内比较两个多核苷酸的序列以鉴别并比较序列局部区域的相似性来进行。“比较窗”是指具有至少6个、通常约50个至约100个、更通常约100个至约150个连续位置的概念性区段,其中在最佳地比对一个序列与具有相同数目连续位置的参考序列之后,比较所述两个序列。为了对两条序列进行最佳比对,比较窗可以包含相较于参考序列(不包含添加或缺失的序列),约20%或更低百分比的添加或缺失(即,空位)。用于比对比较窗口的序列的最佳比对可以通过算法的计算机化实施例(美国威斯康星州麦迪逊的科学大道575号的遗传学计算机集团(Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)的威斯康星遗传学软件包7.0版本(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0)的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或者通过检查和由所选择的各种方法中的任何一种方法生成的最佳比对(即,产生了比较窗口内的最高同源性百分比)来进行。还可以参考例如通过Altschul等人,1997,《核酸研究》25:3389所公开的BLAST程序家族。序列分析的详细讨论可以见于Ausubel等人,《当代分子生物学实验手册》,约翰威立父子公司(John Wiley&Sons, Inc.), 1994-1998,第15章,第19.3单元。

[0323] 描述多核苷酸的朝向的术语包含:5' (通常是具有游离磷酸基的多核苷酸的端部)和3' (通常是具有游离羟基(OH)的多核苷酸的端部)。多核苷酸序列可以按5'-3'朝向或3'-5'朝向注释。对于DNA和mRNA,5'-3'链被指定为“有义”链、“正”链或“编码”链,因为其序列与前信使(前mRNA)的序列是一致的[RNA中的尿嘧啶(U)而非DNA中的胸腺嘧啶(T)除外]。对于DNA和mRNA,作为通过RNA聚合酶转录的链的3'-5'互补链被命名为“模板”、“反义”、“负”或“非编码”链。如本文所使用的,术语“相反朝向”是指以3'-5'朝向书写的5'-3'序列或以5'-3'朝向书写的3'-5'序列。

[0324] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对规则相关的多核苷酸(即,核苷酸序列)。例如,DNA序列5' A G T C A T G 3'的互补链是3' T C A G T A C 5'。后一个序列常常写成左边为5'端且右边为3'端的反向补体5' C A T G A C T 3'。与其反向补体相等的序列

被称为回文序列。互补性可以是“部分的”，其中核酸的碱基中仅一些碱基根据碱基配对规则是匹配的。或者，在核酸之间可以存在“完全”或“全部”的互补性。

[0325] 此外，本领域的普通技术人员应理解，由于遗传密码的简并性，存在许多对多肽或其变体片段进行编码的核苷酸序列，如本文所描述的。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。尽管如此，在特定实施例具体地设想由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸，例如针对人和/或灵长类动物密码子选择而优化的多核苷酸。此外，还可以使用包括本文所提供的多核苷酸序列的基因的等位基因。等位基因是由于如核苷酸的缺失、添加和/或取代等一个或多个突变而改变的内源基因。

[0326] 如本文所使用的，术语“核酸盒”或“表达盒”是指载体内可以表达RNA和随后表达多肽的基因序列。在一个实施例中，核酸盒含有所关注基因，例如，所关注多核苷酸。在另一个实施例中，核酸盒含有一个或多个表达控制序列，例如启动子、增强子、poly(A)序列和所关注基因，例如所关注多核苷酸。载体可以包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个核酸盒。核酸盒在载体内定位且顺序地朝向，使得可以将盒中的核酸转录成RNA并在必要时翻译成蛋白质或多肽、经历在转化细胞中具有活性所需的适当的翻译后修饰并且通过将适合的细胞内隔区靶向细胞外隔区或分泌到细胞外隔区而易位到适合的隔区以具有生物活性。优选地，盒使其3'端和5'端适于准备插入到载体中，例如，其在每一端均具有限制性核酸内切酶位点。在一优选实施例中，核酸盒编码CAR和/或CCR。盒可以作为单个单元移除并插入到质粒或病毒载体中。

[0327] 多核苷酸包含一个或多个所关注多核苷酸。如本文所术语，术语“所关注多核苷酸”是指编码多肽、多肽变体或融合多肽的多核苷酸。载体可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个所关注多核苷酸。在某些实施例中，所关注多核苷酸编码在治疗或预防疾病或病症中提供治疗效果的多肽。所关注多核苷酸和从其编码的多肽包括编码野生型多肽的多核苷酸以及其功能变体和片段。在特定实施例中，功能变体与对应的野生型参考多核苷酸或多肽序列具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的同一性。在某些实施例中，功能变体或片段具有对应的野生型多肽的生物活性的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0328] 如本文其它地方所公开的或如本领域已知的，无论编码序列本身的长度如何，本文所涵盖的多核苷酸可以与其它DNA序列组合，如启动子和/或增强子、非翻译区(UTR)、信号序列、Kozak序列、多腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、内部核糖体进入位点(IRES)、重组酶识别位点(例如，LoxP位点、FRT位点和Att位点)、终止密码子、转录终止信号以及对自切割多肽、表位标记进行编码的多核苷酸，使得所述多核苷酸的总长度可以显著变化。因此，在特定实施例中设想可以采用几乎任何长度的多核苷酸片段，其总长度优选地受制备的容易性和在预期的重组DNA方案中的使用的限制。

[0329] 可以使用本领域中熟知且可获得的各种既定技术来制备、操纵和/或表达多核苷酸。为了表达所期望的多肽，可以将对多肽进行编码的核苷酸序列插入到适当的载体中。

[0330] 载体的说明性实例包括但不限于质粒、自主复制序列和转座元件，例如piggyBac、睡美人、Mos1、Tc1/mariner、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince以及其衍生物。

[0331] 载体的另外的说明性实例包含但不限于：质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体如酵母

人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 源性人工染色体 (PAC)、如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体等噬菌体以及动物病毒。

[0332] 可用作载体的病毒的说明性实例包含但不限于逆转录病毒 (包含慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯性疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳多空病毒 (例如, SV40)。

[0333] 表达载体的说明性实例包含但不限于: 用于在哺乳动物细胞中表达的 pCIneo 载体 (普洛麦格公司 (Promega)); 用于在哺乳动物细胞中进行慢病毒介导的基因转移和表达的 pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM 和 pLenti6.2/V5-GW/lacZ (英杰公司 (Invitrogen))。在特定实施例中, 本文所公开的多肽的编码序列可以连接到用于在哺乳动物细胞中表达多肽的此类表达载体中。

[0334] 在特定实施例中, 载体是游离型载体或在染色体外维持的载体。如本文所使用的, 术语“附加型”是指能够复制而不整合到宿主的染色体 DNA 中且不会从分裂的宿主细胞中逐渐丧失的载体, 这还意味着所述载体在染色体外或附加地复制。

[0335] 表达载体中存在的“控制元件”或“调节序列”是载体的非翻译区—复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号 (Shine Dalgarno 序列或 Kozak 序列)、内含子、聚腺苷酸化序列、5' 和 3' 非翻译区—其与宿主细胞蛋白相互作用以实施转录和翻译。这种元件的强度和特异性可以有所不同。取决于所利用的载体系统和宿主, 可以使用任何数量的适合的转录和翻译元件, 包含普遍存在的启动子和诱导型启动子。

[0336] 在特定实施例中, 载体包括但不限于表达载体和病毒载体, 将包括外源、内源或异源控制序列, 诸如启动子和/或增强子。“内源”控制序列是与基因组中的给定基因天然连接的序列。“外源”控制序列是通过基因操纵 (即, 分子生物技术) 被放置成与基因并置, 使得所述基因的转录由所连接的增强子/启动子引导的控制序列。“异源”控制序列是来自与被基因操纵的细胞不同的物种的外源序列。

[0337] 如本文所使用的, 术语“启动子”指代 RNA 聚合酶所结合的多核苷酸 (DNA 或 RNA) 的识别位点。RNA 聚合酶引发并转录可操作地连接到启动子的多核苷酸。在特定实施例中, 哺乳动物细胞中可操作的启动子包括定位在引发转录的位点上游大约 25 个到 30 个碱基处的 AT 富含区和/或发现于距离转录起始点上游 70 个到 80 个碱基处的另一个序列, 即 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任何核苷酸。

[0338] 术语“增强子”指代含有能够提供增强的转录并且在一些情况下可以不依赖于其相对于另一个控制序列的朝向而起作用的序列的 DNA 片段。增强子可以与启动子和/或另一个增强子元件协作地或加性地起作用。术语“启动子/增强子”指代含有能够提供启动子功能和增强子功能两者的序列的 DNA 片段。

[0339] 术语“可操作地连接”指代并置, 其中所描述的组分处于允许所述组分按其预期方式起作用的关系。在一个实施例中, 所述术语是指核酸表达控制序列 (如启动子和/或增强子) 与第二多核苷酸序列, 例如, 所关注的多核苷酸之间的功能性连接, 其中表达控制序列引导对应于第二序列的核酸的转录。

[0340] 如本文所使用的, 术语“组成型表达控制序列”是指连续地或连续不断地允许可操作地连接的序列的转录的启动子、增强子或启动子/增强子。组成型表达控制序列可以是允许在各种各样的细胞和组织类型中表达的“普遍存在的”启动子、增强子或启动子/增强子

或分别允许在受限种类的细胞和组织类型中表达的“细胞特异性”、“细胞类型特异性”、“细胞谱系特异性”或“组织特异性”启动子、增强子或启动子/增强子。

[0341] 适合于在特定实施例中的使用的示例性普遍存在的表达控制序列包括但不限于：巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、病毒猿猴病毒40 (SV40) (例如, 早期或晚期)、莫洛尼鼠白血病毒 (MoMLV) LTR启动子、Rous肉瘤病毒 (RSV) LTR、单纯疱疹病毒 (HSV) (胸苷激酶) 启动子、H5、来自牛痘病毒的P7.5启动子和P11启动子、延伸因子1- α (EF1a) 启动子、早期生长应答1 (EGR1)、铁蛋白H (FerH)、铁蛋白L (FerL)、甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、真核翻译起始因子4A1 (EIF4A1)、热休克70kDa蛋白5 (HSPA5)、热休克蛋白90kDa β 、成员1 (HSP90B1)、热休克蛋白70kDa (HSP70)、 β -驱动蛋白 (β -KIN)、人ROSA26基因座 (Irions等人,《自然生物技术 (Nature Biotechnology)》,25,1477-1482 (2007))、泛素C启动子 (UBC)、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白 (CAG) 启动子、 β -肌动蛋白启动子和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子阴性对照区缺失并且dl587rev引物结合位点取代的 (MND) U3启动子 (Haas等人,《病毒学期刊 (Journal of Virology)》2003;77 (17):9439-9450)。

[0342] 在一个实施例中,载体包括MNDU3启动子。

[0343] 在一个实施例中,载体包括包含人EF1a基因的第一内含子的EF1a启动子。

[0344] 在一个实施例中,载体包括缺少人EF1a基因的第一内含子的EF1a启动子。

[0345] 如本文所使用的,“条件表达”可以是指任何类型的条件表达,包括但不限于:诱导型表达;可阻遏型表达;在具有特定生理、生物或疾病状态等的细胞或组织中的表达。此定义不旨在排除细胞类型或组织特异性表达。某些实施例提供了所关注多核苷酸的条件表达,例如通过使细胞、组织、生物体等经受导致多核苷酸表达或导致由所关注多核苷酸编码的多核苷酸的表达增加或减少的治疗或病状来控制表达。

[0346] 诱导型启动子/系统的说明性实例包括但不限于类固醇诱导型启动子,如对糖皮质激素或雌性激素受体进行编码的基因的启动子(可通过用相应激素处理来诱导)、巯基金属结合蛋白启动子(可通过用各种重金属处理来诱导)、MX-1启动子(可通过干扰素来诱导)、“基因开关 (GeneSwitch)”米非司酮可调系统 (Sirin等人,2003,《基因》,323:67)、cumate诱导型基因开关 (W02002/088346)、四环素依赖性调控系统等。

[0347] 还可以通过使用位点特异性DNA重组酶实现条件表达。根据某些实施例,载体包括由位点特异性重组酶介导的重组的至少一个(通常两个)位点。如本文所使用的,术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包含切除或整合蛋白、酶、辅因子或参与涉及一个或多个重组位点(例如,两个、三个、四个、五个、七个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、五十个等)的重组反应的相关蛋白,所述蛋白可以是野生型蛋白质(参见Landy,《生物技术当前述评 (Current Opinion in Biotechnology)》3:699-707 (1993))或突变体、衍生物(例如,含有重组蛋白序列或其片段的融合蛋白)、片段和其变体。适于在特定实施例中的使用的重组酶的说明性实例包括但不限于:Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、 Φ C31、Cin、Tn3解离酶、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1和ParA。

[0348] 载体可以包括各种各样的位点特异性重组酶中的任何位点特异性重组酶的一个或多个重组位点。应理解,位点特异性重组酶的靶位点是整合载体,例如逆转录载体或慢病毒载体,所需的任何一个或多个位点的补充。如本文所使用的,术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点”指代重组酶识别和结合的特定核酸序列。

[0349] 例如,Cre重组酶的一个重组位点是loxP,其是34碱基对序列,所述碱基对序列包括8碱基对核心序列两侧的两个13碱基对反向重复序列(用作重组酶结合位点)(参见图1中Sauer,B.,《生物技术当前述评》,5:521-527(1994))。其它示例性loxP位点包含但不限于:lox511(Hoess等人,1996;Bethke和Sauer,1997);lox5171(Lee和Saito,1998);lox2272(Lee和Saito,1998);m2(Langer等人,2002);lox71(Albert等人,1995);以及lox66(Albert等人,1995)。

[0350] FLP重组酶的合适识别位点包含但不限于:FRT(McLeod等人,1996);F₁、F₂、F₃(Schlake和Bode,1994);F₄、F₅(Schlake和Bode,1994);FRT(LE)(Senecoff等人,1988);FRT(RE)(Senecoff等人,1988)。

[0351] 识别序列的其它实例为通过重组酶 λ 整合酶,例如phi-c31,识别的attB、attP、attL和attR序列。 ϕ C31 SSR仅介导异型位点attB(长度为34bp)与attP(长度为39bp)之间的重组(Groth等人,2000)。分别以细菌和噬菌体基因组上用于噬菌体整合酶的衔接位点命名的attB和attP均含有可能由 ϕ C31同源二聚体结合的不完全的反向重复序列(Groth等人,2000)。产物位点attL和attR对另外的 ϕ C31介导的重组具有有效惰性(Belteki等人,2003),从而使反应不可逆。对于催化插入,已经发现,相比于attP位点插入到基因组attB位点中,attB携带的DNA更容易插入到基因组attP位点中(Thyagarajan等人,2001;Belteki等人,2003)。因此,典型的策略通过同源重组将携带attP的“对接位点”定位到限定的基因座中,然后所述基因座与携带attB的进入序列配合以便插入。

[0352] 如本文所使用的,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入顺反子(蛋白编码区)的如ATG等起始密码子由此导致基因的帽非依赖性翻译的元件。参见例如,Jackson等人,1990《生物化学科学趋势(Trends Biochem Sci)》15(12):477-83)以及Jackson和Kaminski 1995.《RNA》1(10):985-1000。在特定实施例中,载体包含编码一个或多个多肽的一个或多个所关注多核苷酸。在特定实施例中,为了实现多个多肽中的每一个多肽的有效翻译,可以通过一个或多个IRES序列或编码自切割多肽的多核苷酸序列来分离多核苷酸序列。在一个实施例中,本文设想的多核苷酸中使用的IRES是EMCV IRES。

[0353] 如本文所使用的,术语“Kozak序列”是指大大促进mRNA与核糖体的小亚单元的初始结合并增加翻译的短核苷酸序列。共有Kozak序列为(GCC)RCCATGG(SEQ ID NO:57),其中R为嘌呤(A或G)(Kozak,1986.《细胞(Cell)》44(2):283-92以及Kozak,1987.《核酸研究(Nucleic Acids Res)》15(20):8125-48)。在特定实施例中,载体包括具有共有Kozak序列并编码期望多肽(例如,CAR)的多核苷酸。

[0354] 引导异源核酸转录物的高效终止和聚腺苷酸化的元件将增加异源基因表达。转录终止信号通常存在于多腺苷酸化信号的下游。在特定实施例中,载体包括对待表达的多肽进行编码的多核苷酸的3'处的多腺苷酸化序列。如本文所使用的,术语“polyA位点”或“polyA序列”表示通过RNA聚合酶II引导新生RNA转录物的终止和多腺苷酸化二者的DNA序列。多腺苷酸化序列可以通过向编码序列的3'端添加polyA尾部来促进mRNA稳定性,并且因此有助于提高翻译效率。切割和多腺苷酸化由RNA中的poly(A)序列引导。哺乳动物前mRNA的核心poly(A)序列具有位于切割-多腺苷酸化位点两侧的两个识别元件。通常,几乎不变的AAUAAA六聚体位于富含U或GU残基的更加可变元件的上游20至50个核苷酸处。新生转录

物的切割发生在这两种元件之间,并且与向5'切割产物添加的多达250个腺苷偶联。在特定实施例中,核心poly(A)序列是理想的polyA序列(例如,AATAAA、ATTAAA、AGTAAA)。在特定实施例中,poly(A)序列是SV40polyA序列、牛生长激素polyA序列(BGHpA)、兔 β -球蛋白polyA序列(r β gpA)、其变体或本领域已知的另一适合的异源或内源polyA序列。

[0355] 在一些实施例中,多核苷酸或含有多核苷酸的细胞利用自杀基因,包含用于减小直接毒性和/或不受控制的增殖的风险的诱导型自杀基因。在具体方面,自杀基因对含有多核苷酸或细胞的宿主不产生免疫性。可以使用的自杀基因的某个实例是胱天蛋白酶-9或胱天蛋白酶-8或胞嘧啶脱氨酶。可以使用特定的二聚化学诱导剂(CID)来激活胱天蛋白酶-9。

[0356] G. 载体

[0357] 在某些实施例中,通过非病毒或病毒载体将编码CAR和CCR的一个或多个多核苷酸引入到细胞(例如,免疫效应细胞)中。在特定实施例中,通过非病毒或病毒载体将编码CAR和CCR的多顺反子多核苷酸引入到细胞中。在特定实施例中,通过非病毒或病毒载体将编码融合蛋白的多顺反子多核苷酸引入到细胞中,所述融合蛋白编码CAR、2A自切割多肽和CCR。

[0358] 术语“载体”在本文中用于是指能够转移或转运另一个核酸分子的核酸分子。所转移的核酸通常连接到,(例如,插入)载体核酸分子。载体可以包含在细胞中引导自主复制的序列,或可以包含足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。在特定实施例中,非病毒载体用于将本文所设想的一个或多个多核苷酸递送到T细胞。在一个实施例中,载体是编码多顺反子信使的体外合成的或合成制备的mRNA,所述多顺反子信使编码CAR和CCR。

[0359] 在一个实施例中,载体是编码融合蛋白的体外合成的或合成制备的mRNA,所述融合蛋白编码CAR、2A自切割多肽和CCR。

[0360] 非病毒载体的说明性实例包含但不限于mRNA、质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒以及细菌人工染色体。

[0361] 特定实施例中所设想的多核苷酸或载体的非病毒递送的说明性方法包含但不限于:电穿孔、声致穿孔、脂质转染、显微注射、基因枪法、病毒体、脂质体、免疫脂质体、纳米颗粒、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、DEAE-右旋糖酐介导的转移、基因枪和热休克。

[0362] 在特定实施例中所设想的适合在特定实施例中使用的多核苷酸递送系统的说明性实例包含但不限于由阿马夏生物系统公司(Amaxa Biosystems)、马克赛特公司(Maxcyte, Inc.)、BTX分子递送系统公司(BTX Molecular Delivery Systems)和哥白尼治疗公司(Copernicus Therapeutics Inc.)提供的系统。脂质转染试剂是商业销售的(例如,TransfectamTM和LipofectinTM)。已经在文献中描述了适于多核苷酸的高效受体识别脂质转染的阳离子脂质和中性脂质。参见,例如,Liu等人,(2003),《基因疗法》10:180-187;以及Balazs等人(2011)《药物递送杂志(Journal of Drug Delivery)》2011:1-12。在特定实施例中还设想了抗体靶向的、源自细菌的、基于无生命纳米细胞的递送。

[0363] 在各个实施例中,多核苷酸是引入细胞中的mRNA,以便瞬时表达所期望的多肽。如本文所使用,“瞬时”是指未整合的转基因在数小时、数天或数周的时间段内表达,其中表达的时间段小于多核苷酸(如果整合到基因组中或包含在细胞中的稳定质粒复制子内)的表达时间段。

[0364] 在特定实施例中,编码多肽的mRNA是体外转录的mRNA。如本文所使用,“体外转录

的RNA”是指已在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生体外转录RNA的模板。

[0365] 在特定实施例中,mRNA还可以包含5'帽或修饰的5'帽和/或poly(A)序列。如本文所使用,5'帽(也称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m^{7G}帽)是在转录开始后不久添加到真核信使RNA的“前”或5'端的修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽包含与第一转录核苷酸连接并且被核糖体识别并且保护免受RNA酶影响的末端基团。可修饰封端部分以调节mRNA的功能性,诸如其稳定性或翻译效率。在一特定实施例中,mRNA包括约50个与约5000个腺嘌呤的poly(A)序列。在一个实施例中,mRNA包括约100个至约1000个碱基、约200个至约500个碱基或约300个至约400个碱基之间的poly(A)序列。在一个实施例中,mRNA包括约65个碱基、约100个碱基、约200个碱基、约300个碱基、约400个碱基、约500个碱基、约600个碱基、约700个碱基、约800个碱基、约900个碱基或约1000个或更多个碱基的poly(A)序列。poly(A)序列可以被化学或酶促修饰为调节mRNA功能,如定位、稳定性或翻译效率。

[0366] 如下文所描述的,包括在特定实施例中所设想的多核苷酸的病毒载体可以通过向个体患者施用进行体内递送,通常通过全身施用(例如,静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或颅内输注)或局部应用。可替代地,载体可以离体递送到细胞,如从个体患者移植的细胞(例如,动员的外周血、淋巴细胞、骨髓抽吸物、组织活检等)或通用供体造血干细胞,然后将细胞再植入患者体内。

[0367] 在一个实施例中,将包括编码CAR和CCR的多核苷酸的病毒载体直接施用于生物体,用于在体内转导细胞。在一个实施例中,将包括编码CAR、2A自切割多肽和CCR的多核苷酸的病毒载体直接施用于生物体,用于在体内转导细胞。可替代地,可以施用裸DNA。通过通常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径施用,包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用这种核酸的合适的方法是本领域技术人员可获得的并且是公知的,并且尽管可以使用多于一种途径来施用特定组合物,但是特定途径通常可以提供比另一条途径更直接且更有效的反应。

[0368] 适合于在本文所设想的特定实施例中使用的病毒载体系统的说明性实例包括但不限于腺病毒伴随病毒(AAV)、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒以及痘苗病毒载体。

[0369] 在各个实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)转导细胞将编码多顺反子信使的一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞,例如,T细胞中,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0370] AAV是一种小型(约26nm)复制缺陷型、主要是附加型无包膜病毒。AAV可以感染分裂和非分裂细胞,并且可以将其基因组并入到宿主细胞的基因组中。重组AAV(rAAV)通常至少由转基因和其调节序列以及5'和3'AAV反向末端重复序列(ITR)构成。ITR序列的长度约为145bp。在特定实施例中,rAAV包括从AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10分离的ITR和衣壳序列。

[0371] 在一些实施例中,使用嵌合rAAV,从一种AAV血清型分离ITR序列,并从不同的AAV血清型分离衣壳序列。例如,具有源自AAV2的ITR序列和源自AAV6的衣壳序列的rAAV被称为AAV2/AAV6。在特定实施例中,rAAV载体可以包括来自AAV2的ITR以及来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中任一种的衣壳蛋白。在一优选实施例中,rAAV包括源自AAV2的ITR序列和源自AAV6的衣壳序列。在一优选实施例中,rAAV包括源自AAV2的

ITR序列和源自AAV2的衣壳序列。

[0372] 在一些实施例中,工程化和选择方法可以应用于AAV衣壳,以使其更有可能转导所关注细胞。

[0373] rAAV载体的构建、产生和其纯化已经在以下公开:例如在美国专利第9,169,494号;第9,169,492号;第9,012,224号;第8,889,641号;第8,809,058号;和第8,784,799号,所述美国专利中的每一个通过引用以其整体并入本文中。

[0374] 在各个实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的逆转录病毒,例如,慢病毒属,转导细胞将编码多顺反子信使的一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞中,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0375] 如本文所使用的,术语“逆转录病毒”是指RNA病毒,所述RNA病毒将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并且随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中。适于特定实施例使用的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。

[0376] 如本文所使用的,术语“慢病毒”是指复杂逆转录病毒的组(或属)。说明性慢病毒包括但不限于:HIV(人类免疫缺陷病毒;包含HIV 1型和HIV2);维斯纳-梅迪病毒(visna-maedi virus,VMV)病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施例中,优选基于HIV的载体主链(即,HIV顺式作用序列元件)。

[0377] 在各个实施例中,本文所设想的慢病毒载体包括一个或多个LTR以及以下附属元件中的一种或多种或全部:cPPT/FLAP、Psi(Ψ)包装信号、输出元件、poly(A)序列,并且可以任选地包括WPRE或HPRE、绝缘子元件、可选择标志物和细胞自杀基因,如本文其它地方所讨论的。

[0378] 在特定实施例中,本文所设想的慢病毒载体可以是整合的或非整合的或整合缺陷型慢病毒。如本文所使用的,术语“整合缺陷型慢病毒”或“IDLV”是指具有缺乏将病毒基因组整合到宿主细胞的基因组的能力的整合酶的慢病毒。专利申请WO 2006/010834中已经描述了无整合能力的病毒载体,所述专利申请通过引用以其整体并入本文。

[0379] 适于降低整合酶活性的HIV-1pol基因的说明性突变包括但不限于:H12N、H12C、H16C、H16V、S81R、D41A、K42A、H51A、Q53C、D55V、D64E、D64V、E69A、K71A、E85A、E87A、D116N、D116I、D116A、N120G、N120I、N120E、E152G、E152A、D35E、K156E、K156A、E157A、K159E、K159A、K160A、R166A、D167A、E170A、H171A、K173A、K186Q、K186T、K188T、E198A、R199c、R199T、R199A、D202A、K211A、Q214L、Q216L、Q221L、W235F、W235E、K236S、K236A、K246A、G247W、D253A、R262A、R263A和K264H。

[0380] 在一个实施例中,HIV-1整合酶缺陷型pol基因包括D64V、D116I、D116A、E152G或E152A突变;D64V、D116I和E152G突变;或D64V、D116A和E152A突变。

[0381] 在一个实施例中,HIV-1整合酶缺陷型pol基因包括D64V突变。

[0382] 术语“长末端重复序列(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对的结构域,在其天然序列环境中是直接重复序列并含有U3、R和U5区。

[0383] 如本文所使用的,术语“FLAP元件”或“cPPT/FLAP”指代序列包含逆转录病毒,例如HIV-1或HIV-2,的中心多嘌呤段和中心终止序列(cPPT和CTS)的核酸。合适的FLAP元件描述于美国专利第6,682,907号和Zennou等人,2000,《细胞》,101:173。在另一实施例中,慢病毒载体含有在cPPT和/或CTS元件中具有一种或多种突变的FLAP元件。在又一个实施例中,慢病毒载体包括cPPT或CTS元件。在又一实施例中,慢病毒载体不包括cPPT或CTS元件。

[0384] 如本文所使用的,术语“包装信号”或“包装序列”是指位于逆转录病毒基因组内的psi[Ψ]序列,所述序列是将病毒RNA插入病毒衣壳或颗粒中所需要的,参见例如Clever等人,1995,《病毒学杂志》,第69卷,第4期;第2101到2109页。

[0385] 术语“输出元件”是指调节RNA转录物从细胞的细胞核向细胞质转运的顺式作用转录后调节元件。RNA输出元件的实例包含但不限于人免疫缺陷病毒(HIV) rev应答元件(RRE)(参见例如,Culle等人,1991,《病毒学杂志》65:1053;以及Culle等人,1991《细胞》58:423)以及乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

[0386] 在特定实施例中,通过将转录后调节元件、高效的多腺苷酸化位点和任选地转录终止信号结合到载体中来增加异源序列在病毒载体中的表达。各种转录后调节元件可以增加异源核酸在蛋白质处的表达,例如土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE;Zufferey等人,1999,《病毒学杂志》,73:2886);存在于乙型肝炎病毒中的转录后调节元件(HPRE)(Huang等人,《分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,5:3864);等等(Liu等人,1995,《基因与发育(Genes Dev)》,9:1766)。

[0387] 由于对LTR进行修饰,所以慢病毒载体优选地含有几种安全性增强。“自失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如其中被称为U3区的右(3')LTR增强子-启动子区已经被修饰(例如,通过缺失或取代)成防止第一轮病毒复制之外的病毒转录。通过用异源启动子替换5'LTR的U3区来提供额外的安全性增强,以驱动病毒基因组在产生病毒颗粒期间的转录。可以使用的异源启动子的实例包含例如病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如即刻早期)、莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、劳氏肉瘤病毒(RSV)以及单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。

[0388] 如本文所使用,术语“假型”或“假型包装”是指具有病毒包膜蛋白的病毒,所述病毒包膜蛋白已被具有优选特性的另一种病毒的包膜蛋白取代。例如,HIV可以用水疱性口炎病毒G蛋白(VSV-G)包膜蛋白进行假型包装,这允许HIV感染更广泛的细胞,因为HIV包膜蛋白(由env基因编码)通常将病毒靶向CD4⁺呈递细胞。

[0389] 在某些实施例中,慢病毒载体根据已知方法产生。参见例如,Kutner等人,《BMC生物技术(BMC Biotechnol)》2009;9:10.Doi:10.1186/1472-6750-9-10;Kutner等人《自然实验手册(Nat.Protoc.)》2009;4(4):495-505.Doi:10.1038/nprot.2009.22。

[0390] 根据本文所设想的某些具体实施例,大多数或所有病毒载体主链序列都源自慢病毒,例如,HIV-1。然而,应理解,可以使用多种不同来源的逆转录病毒和/或慢病毒序列,或某些慢病毒序列可以容纳大量取代和变化的组合而不损害转移载体执行本文所描述功能的能力。此外,各种慢病毒载体是本领域已知的,参见Naldini等人,(1996a、1996b和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利第6,013,516号;以及第5,994,136号,所述文献中的许多文献可以适于产生本文所设想的病毒载体或转移质粒。

[0391] 在各个实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的腺病毒转导细胞将编码多顺

反子信使的一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞中,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0392] 基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高转导效率并且并不需要细胞分裂。使用这种载体,已经获得了高滴度和高表达水平。此载体可以在相对简单的系统中大量制备。将大多数腺病毒载体工程化,使得转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后,使复制缺陷型载体在以反式提供缺失的基因功能的人293细胞中繁殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包含如在肝、肾和肌肉中发现的非分裂的分化细胞。常规Ad载体具有很大的承载能力。

[0393] 复制缺陷的当前腺病毒载体的产生和繁殖可以利用命名为293的独特辅助细胞系,所述辅助细胞系通过Ad5DNA片段从人胚胎肾细胞转化并组成性地表达E1蛋白(Graham等人,1977)。由于E3区可从腺病毒基因组中分配出来(Jones和Shenk,1978),所以目前的腺病毒载体在293细胞的帮助下在E1、D3区或两个区中携带外源DNA(Graham和Prevec,1991)。腺病毒载体已经用于真核基因表达(Levrero等人,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗开发(Grunhaus和Horwitz,1992;Graham和Prevec,1992)。向不同的组织施用重组腺病毒方面的研究包含气管滴注(Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射(Ragot等人,1993)、外周静脉注射(Herz和Gerard,1993)以及立体定向脑内接种(Le Gal La Salle等人,1993)。在临床试验中使用Ad载体的实例涉及用于伴随肌内注射的抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等人,《人基因疗法(Hum.Gene Ther.)》7:1083-9(1998))。

[0394] 在各个实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的单纯性疱疹病毒,例如HSV-1、HSV-2,转导细胞将编码多顺反子信使的一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞中,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0395] 成熟HSV病毒粒子由包膜的二十面体衣壳组成,其中病毒基因组由152kb的线性双链DNA分子组成。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体缺乏一个或多个必需或非必需的HSV基因。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体为复制缺陷型。大多数复制缺陷型HSV载体含有缺失以去除一个或多个中早期、早期或晚期HSV基因从而防止复制。例如,HSV载体可能缺乏立即早期基因,所述立即早期基因选自由以下组成的组:ICP4、ICP22、ICP27、ICP47及其组合。HSV载体的优点是其进入可以导致长期DNA表达的潜伏期的能力,以及其可以容纳高达25kb的外源DNA插入物的大型病毒DNA基因组。基于HSV的载体在例如以下专利中有描述:美国专利第5,837,532号、第5,846,782号和第5,804,413号及国际专利申请W0 91/02788、W0 96/04394、W0 98/15637和W0 99/06583,所述专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0396] H. 经基因修饰的细胞

[0397] 在各个实施例中,提供了被基因修饰成表达本文所设想的CAR和CCR以用于治疗癌症的细胞。如本文所使用的,术语“经基因工程化的”或“经基因修饰的”是指将额外的遗传物质以DNA或RNA的形式添加到细胞中的总遗传物质中。术语“经基因修饰的细胞”、“经修饰细胞”和“重定向细胞”可互换使用。如本文所使用的,术语“基因疗法”是指将额外遗传物质以DNA或RNA的形式引入到细胞中的总遗传物质中,所述额外的遗传物质恢复、校正或修饰基因的表达或出于表达CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白的目的。

[0398] 在特定实施例中,将本文所设想的CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白引入到免疫效应细胞中并在免疫效应细胞中表达,以便重定向其对所关注靶抗原的

特异性。“免疫效应细胞”是免疫系统的任何细胞,其具有一种或多种效应功能(例如,细胞毒性细胞杀伤活性、细胞因子分泌、ADCC和/或CDC的诱导)。本文所设想的说明性免疫效应细胞为T淋巴细胞,包含但不限于细胞毒性T细胞(CTL;CD8+T细胞)、TIL和辅助T细胞(HTL;CD4+T细胞)。在一特定实施例中,所述细胞包括 α BT细胞。在一特定实施例中,所述细胞包括 γ δ T细胞。在一实施例中,免疫效应细胞包含自然杀伤(NK)细胞。在一个实施例中,免疫效应细胞包含自然杀伤T(NKT)细胞。

[0399] 免疫效应细胞可以是自体的(autologous/autogeneic) (“自身的”)或非自体的 (“非自身的”,例如同种异体的、同基因的或异种的)。如本文所使用的,“自体”指代来自同一受试者的细胞。如本文所使用的,“同种异体”指代同一物种的与相比之下的细胞在基因上有所不同的细胞。如本文所使用的,“同基因”指代不同受试者的与相比之下的细胞在基因上相同的细胞。如本文所使用的,“异种”指代与相比之下的细胞属于不同物种的细胞。在优选实施例中,细胞是自体的。

[0400] 与在特定实施例中设想的CAR和CCR一起使用的说明性免疫效应细胞包含T淋巴细胞。术语“T细胞”或“T淋巴细胞”是本领域公认的并且旨在包含胸腺细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或激活T淋巴细胞。T细胞可以是T辅助(Th)细胞,例如T辅助1(Th1)细胞或T辅助2(Th2)细胞。T细胞可以是辅助T细胞(HTL;CD4+T细胞)CD4+T细胞、细胞毒性T细胞(CTL,CD8+T细胞)、CD4+CD8+T细胞、CD4-CD8-T细胞或任何其它T细胞亚群。适于在特定实施例中使用的其它说明性T细胞群体包含原始T细胞(TN)、T记忆干细胞(TSCM)、中心记忆T细胞(TCM)、效应记忆T细胞(TEM)和效应T细胞(TEFF)。

[0401] 如本领域的技术人员所理解的,其它细胞还可以用作具有本文所设想的CAR和CCR的免疫效应细胞。具体地,免疫效应细胞还包含NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞。免疫效应细胞还包含效应细胞的祖细胞,其中可以在体内或体外诱导这种祖细胞分化成免疫效应细胞。因此,在特定实施例中,免疫效应细胞包含免疫效应细胞的祖细胞,如源自脐带血、骨髓或动员外周血的CD34+细胞群体内含有的造血干细胞(HSC),所述HSC在施用于受试者时分化为成熟免疫效应细胞或者可以在体外诱导以分化为成熟免疫效应细胞。

[0402] 如本文所使用的,术语“CD34+细胞”是指在其细胞表面上表达CD34蛋白的细胞。如本文所使用的,“CD34”是指通常充当细胞—细胞粘附因子并且参与T细胞进入淋巴结的细胞表面糖蛋白(例如,唾液黏蛋白)。CD34+细胞群含有造血干细胞(HSC),其在施用给患者时分化并促成所有造血谱系,包含T细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

[0403] 在特定实施例中,提供了用于制备表达本文所设想的CAR和CCR的免疫效应细胞的方法。在一个实施例中,所述方法包括转染或转导从个体中分离的免疫效应细胞,使得免疫效应细胞表达多顺反子信使,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。在某些实施例中,免疫效应细胞从个体分离并经基因修饰而无需在体外进一步操纵。然后,可以将这种细胞直接再次施用到个体。在另外的实施例中,免疫效应细胞在被基因修饰成表达CAR和CCR之前首先在体外被激活和刺激以增殖。在这方面,免疫效应细胞可以在被基因修饰(即,被转导或转染成表达本文所设想的CAR和CCR)之前和/或之后培养。

[0404] 在特定实施例中,在本文所述的免疫效应细胞的体外操纵或基因修饰之前,从受

试者获得细胞来源。在特定实施例中,经修饰免疫效应细胞包括T细胞。

[0405] 在特定实施例中,PBMC可以使用本文所设想的方法被直接基因修饰成表达多顺反子信使,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。在某些实施例中,在PBMC分离之后,将T淋巴细胞进一步分离,并且在某些实施例中,可以在基因修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助T淋巴细胞分选到原始、记忆和效应T细胞亚群中。

[0406] 如T细胞等免疫效应细胞可以在分离之后使用已知方法进行基因修饰,或者免疫效应细胞可以在进行基因修饰之前进行体外激活和扩增(或在祖细胞的情况下分化)。在一特定实施例中,如T细胞等免疫效应细胞用本文所设想的嵌合抗原受体进行基因修饰(例如,用包括编码多顺反子信使的核酸的病毒载体进行转导,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白),并且然后在体外进行激活和扩增。在各个实施例中,可以在基因修饰之前或之后使用如例如以下所述的方法对T细胞进行激活和扩增:美国专利第6,352,694号;第6,534,055号;第6,905,680号;第6,692,964号;第5,858,358号;第6,887,466号;第6,905,681号;第7,144,575号;第7,067,318号;第7,172,869号;第7,232,566号;第7,175,843号;第5,883,223号;第6,905,874号;第6,797,514号;第6,867,041号;以及美国专利申请公开第20060121005号。

[0407] 在一个实施例中,CD34+细胞用本文所设想的核酸构建体转导。在某些实施例中,经转导的CD34+细胞在施用于受试者,通常是细胞最初从其分离的受试者之后在体内分化成成熟免疫效应细胞。在另一实施例中,CD34+细胞可以在暴露于以下细胞因子中的一种或多种细胞因子之前或在用所述一种或多种细胞因子进行基因修饰之后根据前述方法在体外进行刺激:Flt-3配体(FLT3)、干细胞因子(SCF)、巨核细胞生长和分化因子(TPO)、IL-3和IL-6(Asheuer等人,2004;Imren,等人,2004)。

[0408] 在特定实施例中,用于治疗癌症的修饰的免疫效应细胞群体包括本文所设想的CAR和CCR。例如,经修饰的免疫效应细胞群体由从被诊断患有本文所述的B细胞恶性肿瘤的患者(自体供体)获得的外周血单核细胞(PBMC)制备。PBMC形成可以是CD4+、CD8+或CD4+和CD8+的T淋巴细胞的异质群体。

[0409] PBMC还可包括其它细胞毒性淋巴细胞,如NK细胞或NKT细胞。将携带特定实施例中设想的CAR和CCR的编码序列的表达载体引入人供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。在特定实施例中,携带表达载体的成功转导的T细胞可以使用流式细胞术分选,以分离CD3阳性T细胞,并且接着除了使用抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和IL-2或如本文其它地方所述本领域已知的任何其它方法进行细胞激活之外,进一步增殖以增加这些表达CAR和CCR的T细胞的数目。标准程序用于T细胞的冷冻保存,以用于人类受试者中的储存和/或制备。在一个实施例中,在不存在非人动物衍生产物如胎牛血清(fetal calf serum/fetal bovine serum)的情况下进行T细胞的体外转导、培养和/或扩增。由于PBMC的异质群体被基因修饰,因此所得经转导的细胞是包括多顺反子信使和多核苷酸的经修饰的细胞的异质群体,所述多顺反子信使编码CAR和CCR,所述多核苷酸编码本文所设想的CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0410] 在一另外的实施例中,例如一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同表达载体的混合物可用于基因修饰免疫效应细胞的供体群,其中每个载体编码如本文所涵盖的不同嵌

合抗原受体蛋白。所得的经修饰免疫效应细胞形成经修饰细胞的混合群体。

[0411] I. T细胞制造方法

[0412] 在各个实施例中,通过与刺激CD3TCR复合物相关联的信号的药剂和刺激T细胞的表面上的共刺激分子的配体接触来扩增经基因修饰的T细胞。

[0413] 在特定实施例中,使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂,如可溶性抗CD3和抗CD28抗体或附接到珠粒或其它表面的抗体在具有适当细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15等的培养基中接触。

[0414] 在特定实施例中,使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂,如可溶性抗CD3和抗CD28抗体或附接到珠粒或其它表面的抗体在具有适当细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15和/或PI3K抑制剂等的培养基中接触。

[0415] 在一个实施例中,外周血单核细胞(PBMC)在本文所涵盖的T细胞制造方法中用作T细胞的来源。PBMC形成可为CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺的T淋巴细胞异源群并且可以包括其它单核细胞,诸如单核细胞、B细胞、NK细胞和NKT细胞。将包括编码多顺反子信使的多核苷酸的表达载体引入到人供体T细胞、NK细胞或NKT细胞群体中,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码特定实施例中所设想的CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。在一特定实施例中,携带表达载体的成功转导的T细胞可以使用流式细胞术分选。以分离CD3阳性T细胞,并且然后除了使用抗CD3抗体和/或抗CD28抗体以及IL-2、IL-7和/或IL-15进行细胞激活之外,进一步增殖以增加经修饰T细胞的数目。

[0416] 为了实现足够治疗剂量的T细胞组合物,通常对T细胞进行一轮或多轮刺激、激活和/或扩增。通常可以使用例如以下中所述的方法对T细胞进行激活和扩增:美国专利第6,352,694号;第6,534,055号;第6,905,680号;第6,692,964号;第5,858,358号;第6,887,466号;第6,905,681号;第7,144,575号;第7,067,318号;第7,172,869号;第7,232,566号;第7,175,843号;第5,883,223号;第6,905,874号;第6,797,514号;和第6,867,041号,所述美国专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0417] 在优选实施例中,通过本文所涵盖的方法制造的T细胞提供了经改进的过继性免疫疗法组合物。不希望受任何特定理论的束缚,据信通过本文所涵盖的特定实施例中的方法制造的T细胞组合物具有优异的特性,包括增加的存活率、在相对无分化的情况下的扩增以及体内持久性。在一个实施例中,制造T细胞的方法包括使细胞与一种或多种调节PI3K细胞信号传导路径的药剂接触。

[0418] 在一特定实施例中,通过在存在一种或多种刺激信号和任选地PI3K抑制剂的情况下刺激T细胞以使其被激活并增殖来制造T细胞。

[0419] T细胞然后可以被修饰成表达多顺反子信使、CAR和CCR或编码CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。在一个实施例中,T细胞通过用包括多顺反子信使的病毒载体转导T细胞来进行修饰,所述多顺反子信使编码CAR和CCR或编码本文所设想的CAR、2A自切割多肽和CCR的融合蛋白。在某个实施例中,T细胞在刺激和激活之前进行修饰。在另一实施例中,T细胞在刺激和激活之后进行修饰。在一特定实施例中,T细胞在刺激和激活的12小时、24小时、36小时或48小时内进行修饰。在特定实施例中,T细胞在存在或不存在PI3K抑制剂的情况下进行激活、刺激和/或修饰。

[0420] 在T细胞转导之后,对细胞进行培养以增殖。T细胞可培养至少1、2、3、4、5、6或7天,

至少2周、至少1、2、3、4、5或6个月或更长时间,伴随1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多轮扩增。在一特定实施例中,对T细胞进行培养以增殖。

[0421] 在各个实施例中,在PI3K抑制剂的存在下制造T细胞组合物。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,设想了在制造过程的刺激、激活和/或扩增阶段的任一个阶段、其任何组合或所有阶段期间用一种或多种PI3K通路抑制剂处理T细胞或使T细胞与所述抑制剂接触优先增加年轻T细胞,由此产生优质治疗性T细胞组合物。

[0422] 如本文所用,术语“PI3K抑制剂”是指结合到PI3K并抑制其至少一种活性的核酸、肽、化合物或小型有机分子。PI3K蛋白可以分为三类:1类PI3K、2类PI3K和3类PI3K。1类PI3K作为由四个p110催化亚基(p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ)之一和两个调控亚基家族之一组成的异二聚体存在。PI3K抑制剂优选靶向1类PI3K抑制剂。在一个实施例中,PI3K抑制剂对1类PI3K抑制剂的一种或多种同种型将显示出选择性(即,对p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 以及p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 中的一种或多种的选择性)。另一方面,PI3K抑制剂将不显示出同种型选择性并被认为是“泛PI3K抑制剂”。在一个实施例中,PI3K抑制剂将与ATP竞争结合到PI3K催化结构域。

[0423] 在某些实施例中,PI3K抑制剂可以例如靶向PI3K以及PI3K-AKT-mTOR路径中的另外的蛋白质。在特定实施例中,靶向mTOR和PI3K两者的PI3K抑制剂可被称为mTOR抑制剂或PI3K抑制剂。仅靶向PI3K的PI3K抑制剂可以被称为选择性PI3K抑制剂。在一个实施例中,选择性PI3K抑制剂可以理解为指相对于PI3K表现出50%抑制浓度的药剂,所述抑制浓度为抑制剂相对于mTOR和/或通路中的其它蛋白质的IC₅₀的至少1/10、至少1/20、至少1/30、至少1/50、至少1/100、至少1/1000或甚至更低。

[0424] 在一特定实施例中,示例性PI3K抑制剂以约200nM或更低,优选约100nm或更低、甚至更优选约60nM或更低、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更低的IC₅₀(抑制50%活性的浓度)抑制PI3K。在一个实施例中,PI3K抑制剂以约2nM至约100nm、更优选地约2nM至约50nM、甚至更优选地约2nM至约15nM的IC₅₀抑制PI3K。

[0425] 适用于特定实施例中所涵盖的T细胞制备方法中的PI3K抑制剂的说明性实例包括但不限于BKM120(1类PI3K抑制剂,Novartis)、XL147(1类PI3K抑制剂,Exelixis)、(pan-PI3K抑制剂,GlaxoSmithKline)和PX-866(1类PI3K抑制剂;p110 α 、p110 β 和p110 γ 同种型,Oncothyreon)。

[0426] 选择性PI3K抑制剂的其它说明性实例包含但不限于:BYL719、GSK2636771、TGX-221、AS25242、CAL-101、ZSTK474和IPI-145。

[0427] 泛PI3K抑制剂的另外的说明性实例包含但不限于:BEZ235、LY294002、GSK1059615、TG100713和GDC-0941。

[0428] 在一优选实施例中,PI3K抑制剂为ZSTK474。

[0429] 在一特定实施例中,提供了一种用于增加表达经工程化改造的T细胞受体的T细胞的增殖的方法。此类方法可以包括例如从受试者中收获T细胞来源,刺激和激活T细胞,修饰T细胞以表达CAR和CCR,以及使T细胞在培养物中扩增,其中T细胞是在存在一种或多种PI3K抑制剂的情况下在制造过程中的多个步骤中的任一个步骤中制备。

[0430] 本文所设想的制造方法可以进一步包括冷冻保存经修饰的T细胞以进行储存和/或制备以供在人类受试者中使用。在一个实施例中,储存经基因修饰的免疫效应细胞的方法

法包括冷冻保存免疫效应细胞,使得细胞在解冻后保持活力。将T细胞冷冻保存,使得细胞在解冻后保持活力。当需要时,可使冷冻保存的转化的免疫效应细胞解冻、生长和扩增更多此类细胞。如本文所使用的,“冷冻保存”是指通过冷却到零下温度来保存细胞,如(典型地)77K或-196℃(液氮的沸点)。冷冻保护剂通常在零下温度下用于防止细胞因在低温下冷冻或升温到室温而受损。冷冻保护剂和最佳冷却速率可以防止细胞损伤。可以使用的低温保护剂包括但不限于二甲基亚砜(DMSO)(Lovell和Bishop,Nature,1959;183:1394-1395; Ashwood-Smith,Nature,1961;190:1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷(Rinfret,《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.》,1960;85:576)和聚乙二醇(Sloviter和Ravdin,《自然》,1962;196:48)。优选的冷却速率为1℃到3℃/分钟。在至少两小时之后,T细胞已经达到-80℃的温度并且可以直接置于液氮(-196℃)中以如在长期冷冻储存容器中永久储存。

[0431] J.组合物和调配物

[0432] 在特定实施例中,对药学上可接受的载体溶液的调配对本领域的技术人员来说是熟知的,这和开发用于将本文所描述的特定组合物用于各种治疗方案中的适合的给药和治疗方案一样,包含例如肠内和肠胃外,例如血管内、静脉内、动脉内、骨内、心室内、脑内、颅内、脊柱内、鞘内和髓内施用和调配。本领域的技术人员应当理解,本文所设想的特定实施例可以包括如制药领域中熟知并且在例如以下各项中描述的调配物等其它调配物:《雷明顿:药学科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第I卷和第II卷,第22版,编辑:Loyd V.Allen Jr,宾夕法尼亚州费城:医药出版社(Philadelphia,PA: Pharmaceutical Press);2012,所述文献通过引用以其整体并入本文。

[0433] 本文所设想的组合物可以包括一种或多种如本文所涵盖的CAR多肽、CCR多肽、多核苷酸、包括其的载体、基因修饰的免疫效应细胞等。组合物包括但不限于药物组合物。在优选实施例中,组合物包括:被修饰成表达CAR和CCR的一种或多种细胞;编码CAR、自切割多肽和CCR的融合蛋白;或编码CAR、自切割多肽和CCR的融合蛋白。

[0434] “药物组合物”是指单独地或与一种或多种其它治疗方式组合地施用于细胞或动物的在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中调配的组合物。还应理解,如果需要,组合物也可以与其它药剂组合施用,例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药学活性剂。对组合物中还可以包含的其它组分实际上不存在限制,条件是另外的药剂不会不利地影响组合物递送预期疗法的能力。在优选实施例中,药物组合物包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂以及被修饰成表达CAR和CCR或编码CAR和CCR的融合蛋白的一种或多种细胞。

[0435] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在正确医学判断的范围内适合于与人和动物的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏性应答或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0436] 如本文所使用的,“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包含但不限于任何已经被美国食品和药品管理局批准为可用于人类或家畜的佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性药学上可接受的载体包含但不限于糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动植物油、石蜡、硅酮、膨润

土、硅酸、氧化锌；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，如丙二醇；多元醇，如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液 (Ringer's solution)；乙醇；磷酸盐缓冲溶液；以及药物调配物中采用的任何其它相容性物质。

[0437] 在特定实施例中，组合物包括一定量的本文所设想的表达CAR和CCR的免疫效应细胞。如本文所使用，术语“量”是指实现有益或期望的预防或治疗结果（包括临床结果）的基因修饰的治疗细胞，例如T细胞的“有效的量”或“有效量”。

[0438] “预防有效量”是指有效实现所需预防结果的经基因修饰的治疗细胞的量。通常，但不一定，因为预防剂量是在疾病之前或疾病早期用于受试者的，所以预防有效量小于治疗有效量。

[0439] 基因修饰的治疗细胞的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及干细胞和祖细胞在个体中引发所需反应的能力等因素而变化。治疗有效量也是其中治疗有益效果超过病毒或转导的治疗细胞的任何毒性或有害作用的量。术语“治疗有效量”包含有效地“治疗”受试者（例如，患者）的量。当指示治疗量时，待施用的组合物的精确量可以由内科医生涵盖年龄、体重、肿瘤大小、感染程度或转移程度以及患者（受试者）的病状的个体差异来确定。

[0440] 通常可以说，包括本文所述的T细胞的药物组合物可以以10²个到10¹⁰个细胞/kg体重，优选地10⁵个到10⁶个细胞/kg体重，包含那些范围内的所有整数值，的剂量施用。细胞的数目将取决于组合物期望的最终用途，其中包含的细胞的类型也是如此。对于本文所提供的用途，细胞的体积通常为一升或更少，可以为500mL或更少，甚至250mL或100mL或更少。因此，期望细胞的密度典型地大于10⁶个细胞/mL，并且通常大于10⁷个细胞/mL，通常10⁸个细胞/mL或更大。临床相关数量的免疫细胞可以分配到多次输注中，所述多次输注累积等于或超过10⁵个、10⁶个、10⁷个、10⁸个、10⁹个、10¹⁰个、10¹¹个或10¹²个细胞。在一些方面，特别是由于所有输注的细胞将被重定向至特定靶抗原，所以可以施用范围为10⁶/千克（10⁶-10¹¹/患者）的较低数量的细胞。组合物可以以这些范围内的剂量多次施用。对于进行治疗的患者，细胞可以是同种异体的、同基因的、异种的或自体的。如果期望，治疗还可以包含施用如本文所描述的有丝分裂原（例如，PHA）或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子（例如，IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等）以增强对免疫应答的诱导。

[0441] 通常，包括如本文所描述的激活和扩增的细胞的组合物可以用于治疗和预防免疫受损的个体出现的疾病。在特定实施例中，包括被修饰成表达CAR和CCR或编码本文所设想的CAR和CCR的融合蛋白的免疫效应细胞的组合物用于治疗癌症。经修饰的免疫效应细胞可以单独施用，或作为药物组合物与载体、稀释剂、赋形剂和/或与如IL-2等其它组分或其它细胞因子或细胞群组合施用。在特定实施例中，药物组合物包括与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的一定量的基因修饰的T细胞。

[0442] 包括被修饰成表达CAR和CCR或编码CAR和CCR的融合蛋白的免疫效应细胞群体，如T细胞，的药物组合物可以包括缓冲液，如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水；碳水化合物，如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸，如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂，如EDTA或谷胱甘肽；佐剂（例如，氢氧化铝）；以及防腐剂。组合物优选地被调配成用于肠

胃外施用,例如,血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌肉内施用。

[0443] 液体药物组合物,无论其是溶液、悬浮液还是其它类似形式,均可以包含以下中的一种或多种:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、如可以用作溶剂或悬浮培养基的合成甘油单酯或甘油二酯等固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的药剂,如氯化钠或右旋糖。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0444] 在一个实施例中,在药学上可接受的细胞培养基中调配本文所设想的T细胞组合物。这类组合物适合于向人类受试者施用。在特定实施例中,药学上可接受的细胞培养基是无血清培养基。

[0445] 无血清培养基相比于含有血清的培养基具有若干优点,包含组合物得到简化且得到更好定义、污染物程度得到减小、可能的传染剂来源得到消除以及成本降低。在各个实施例中,无血清培养基是无动物的并且可以任选地是无蛋白质的。任选地,培养基可以含有生物药学上可接受的重组蛋白。“无动物”培养基是指组合物源自非动物来源的培养基。重组蛋白替代无动物培养基中的天然动物蛋白质,并且营养物从合成的、植物或微生物来源获得。相比之下,“无蛋白质”培养基被定义为基本上不含蛋白质。

[0446] 特定实施例中使用的无血清培养基的说明性实例包括但不限于QBSF-60(质量生物有限公司(Quality Biological, Inc.))、StemPro-34(生命技术公司(Life Technologies))和X-VIVO 10。

[0447] 在一个优选实施例中,包括本文所涵盖的免疫效应细胞的组合物在包含PlasmaLyte A的溶液中配制。

[0448] 在另一优选实施例中,包括本文所涵盖的免疫效应细胞的组合物在包含低温保存介质的溶液中配制。例如,可以使用具有低温保存药剂的低温保存培养基以在解冻后保持高细胞存活率结果。特定实施例中使用的低温保存培养基的说明性实例包括但不限于CryoStor CS10、CryoStor CS5和CryoStor CS2。

[0449] 在一更优选实施例中,包括本文所设想的免疫效应细胞的组合物在包括50:50PlasmaLyte A:CryoStor CS10的溶液中配制。

[0450] 在一特定实施例中,组合物包括有效量的免疫效应细胞,所述免疫效应细胞被修饰成单独或与一种或多种治疗剂组合表达CAR和CCR或编码CAR和CCR的融合蛋白。因此,表达CAR的免疫效应细胞可以单独施用或与其它已知的癌症治疗组合施用,如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力疗法等。组合物还可以与抗生素组合施用。本领域可接受这种治疗剂作为如本文所描述的如特定癌症等特定疾病状态的标准治疗。在具体实施例中设想的示例性治疗剂包含细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化学治疗剂、放射治疗剂、治疗性抗体或其它活性剂和辅助剂。

[0451] 在某些实施例中,包括被修饰成表达CAR和CCR或编码CAR和CCR的融合蛋白的免疫效应细胞的组合物可以与任何数量的化学治疗剂一起施用。

[0452] 多种其它治疗剂可以与本文所述的组合物结合使用。在一个实施例中,包括免疫效应细胞、CAR和CCR或编码CAR和CCR的融合蛋白的组合物与抗炎剂一起施用。

[0453] 在一个实施例中,包括免疫效应细胞、CAR和CCR或编码所述CAR和CCR的融合蛋白的组合物与治疗性抗体一起施用。适于与特定实施例中设想的CAR修饰的T细胞组合的治疗性抗体的说明性实例包含但不限于阿特殊单抗 (atezolizumab)、阿维鲁单抗 (avelumab)、巴维昔单抗 (bavituximab)、贝伐珠单抗 (bevacizumab) (阿瓦斯汀)、莫比伐珠单抗 (bivatuzumab)、博纳吐单抗 (blinatumomab)、可那木单抗 (conatumumab)、克唑替尼 (crizotinib)、达雷木单抗 (daratumumab)、杜利他单抗 (duligotumab)、达西珠单抗 (dacetuzumab)、达洛珠单抗 (dalotuzumab)、度伐单抗 (durvalumab)、埃罗妥珠单抗 (elotuzumab) (HuLuc63)、吉妥珠单抗 (gemtuzumab)、替伊莫单抗 (ibritumomab)、因达单抗 (indatuximab)、奥妥珠单抗 (inotuzumab)、伊匹单抗 (ipilimumab)、罗沃单抗 (lorvotuzumab)、卢卡珠单抗 (lucatumumab)、米拉珠单抗 (milatuzumab)、莫西姆单抗 (moxetumomab)、纳武单抗 (nivolumab)、奥卡鲁单抗 (ocaratumumab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、派姆单抗 (pembrolizumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、西妥昔单抗 (siltuximab)、四丙珠单抗 (teprotumumab) 和乌布妥昔单抗 (ublituximab)。

[0454] K. 治疗方法

[0455] 表达本文所设想的CAR和CCR的经基因修饰的免疫效应细胞提供了用于在预防、治疗和改善癌症中使用或用于预防、治疗或改善与癌症相关的至少一种症状的过继性免疫疗法的经改进的方法。

[0456] 在各个实施例中,本文所设想的经基因修饰的免疫效应细胞提供了用于在增加受试者的癌细胞中的细胞毒性中使用,或用于在减少受试者的癌细胞的数量中使用的过继性免疫疗法的经改进的方法。

[0457] 在特定实施例中,通过用本文所设想的CAR和/或CCR对初级免疫效应细胞进行基因修饰,将初级免疫效应细胞的特异性重定向至表达特定抗原的细胞,例如癌细胞。在各个实施例中,使用病毒载体以对具有编码CAR和CCR的特定多核苷酸的免疫效应细胞进行基因修饰。

[0458] 在一个实施例中,提供了一种类型的细胞疗法,其中T细胞被基因修饰成表达靶向表达癌细胞的特定抗原的CAR和/或CCR,并且T细胞被输注至有需要的受体。输注的细胞能够杀死在受体中引起疾病的细胞。与抗体疗法不同,T细胞疗法能够在体内复制,导致可以导致持续癌症治疗的长期持久性。

[0459] 在一个实施例中,表达CAR和CCR的T细胞可以经历强大的体内T细胞扩增,并且可以持续延长的时间量。在另一实施例中,表达CAR和CCR的T细胞演变成特异性记忆T细胞或干细胞记忆T细胞,所述细胞可以被再激活以抑制任何另外的肿瘤形成或生长。

[0460] 在特定实施例中,包括表达本文所设想的CAR和CCR的免疫效应细胞的组合物用于治疗与表达癌细胞或癌症干细胞的特定抗原相关的病状。

[0461] 在特定实施例中设想了可以使用表达CAR和CCR的免疫效应细胞治疗、预防或改善的病状的说明性实例。

[0462] 在一特定实施例中,包括表达本文所设想的CAR和CCR的T细胞的组合物用于治疗骨肉瘤或尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)。

[0463] 在一特定实施例中,包括表达本文所设想的CAR和CCR的T细胞的组合物用于治疗液体癌或血液癌。

[0464] 在某些实施例中,所述液体癌或所述血液癌选自由以下组成的组:白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0465] 在某些实施例中,所述液体癌或所述血液癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病、红白血病、毛细胞白血病(HCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和慢性粒细胞白血病(CML)、慢性髓单核细胞白血病(CMML)和真性红细胞增多症、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤、塞扎里氏综合征(Sézary syndrome)、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、明显多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、非分泌性骨髓瘤、IgD骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤。

[0466] 在某些实施例中,液体癌或血液癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性髓性白血病(AML)或慢性粒细胞白血病(CML)。

[0467] 在优选实施例中,液体癌或血液癌是DLBCL。

[0468] 在优选实施例中,液体癌或血液癌是复发性/难治性DLBCL。

[0469] 在特定实施例中,提供了包括以下的方法:向有需要的患者单独或与一种或多种治疗剂组合施用治疗有效量的表达本文所设想的CAR和CCR的免疫效应细胞或包括所述免疫效应细胞的组合物。在某些实施例中,所述细胞用于治疗有风险患上与癌细胞相关的病状的患者。因此,在特定实施例中,用于治疗或预防或改善癌症的至少一种症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的表达本文所设想的CAR和CCR的经修饰的T细胞。

[0470] 如本文所使用的,术语“个体”和“受试者”通常可互换使用并且指代表现出可以用本文其它地方设想的基因治疗载体、基于细胞的治疗和方法治疗的疾病、病状或病症的症状的任何动物。在优选实施例中,受试者包括表现出与可以用基因治疗载体、基于细胞的治疗剂和本文其它地方涵盖的方法治疗的癌症相关的疾病、病症或病状的症状的任何动物。适合的受试者(例如,患者)包括实验用动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(如猫或狗)。包含非人灵长类和优选地人类患者。典型的受试者包含患有、已经被诊断为患有或有风险患有癌症的人类患者。

[0471] 如本文所使用,术语“患者”是指已经诊断为患有可以用基因治疗载体、基于细胞的治疗剂和本文其它地方公开的方法治疗的特定疾病、病症或症状的受试者。

[0472] 如本文所使用的,“治疗(treatment或treating)”包含对疾病或病理状况的症状或病理的任何有益的或期望的效果并且甚至可以包含正在治疗的疾病或病症的一个或多个可测量标志物的最低限度的减少。治疗可以涉及任选地减少疾病或病症或者延迟疾病或病症的进展。“治疗”不一定指示完全根除或治愈疾病或病症或其相关症状。

[0473] 如本文所使用的,“预防(prevent)”和如“预防(prevented/preventing)”等类似词语指示用于预防、抑制或减少疾病或病症发生或复发的可能性。预防还是指延迟疾病或病症的发作或复发或者延迟疾病或病症的症状的发生或复发。如本文所使用的,“预防

(prevention)”和类似词语还包含在疾病或病症发作或复发之前减少疾病或病症的强度、效果、症状和/或负担。

[0474] 如本文所使用的,短语“减轻……的至少一种症状”是指减少正在治疗的受试者的疾病或病症的一种或多种症状。在特定实施例,被治疗的疾病或病状是癌症,其中所减轻的所述一种或多种症状包含但不限于虚弱、疲劳、呼吸短促、容易挫伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹部肿胀或疼痛(由于腹部器官肿大)、骨骼或关节疼痛、骨折、意外体重减轻、食欲不振、盗汗、持续性轻度发烧以及排尿减少(由于肾功能受损)。

[0475] “增强”或“促进”或者“增加”或“扩增”通常是指相比于由媒介剂或对照分子/组合物引起的响应,本文所设想的组合物,例如表达CAR和CCR的经基因修饰的T细胞能够产生、引发或引起更大的生理响应(即,下游效应)。可测量的生理响应可以包括T细胞扩增、激活、持续性的增加和/或癌细胞杀伤能力的增加以及从本领域的理解和本文中的描述中显而易见的其它方面。“增加的”或“增强的”量通常是“统计上显著”的量,并且可以包含1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含所有整数以及其之间且超过1的小数点,例如1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)于由媒介剂或对照组合物产生的响应的增加。

[0476] “减小”或“减弱”或“变少”或“减少”或“减轻”通常是指与由媒介剂或对照分子/组合物引起的响应相比,本文所设想的组合物能够产生、引发或引起更少的生理响应(即,下游效应)。“减小的”或“减少的”量通常是“统计上显著”的量,并且可以包含1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含所有整数以及其之间且超过1的小数点,例如1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)于由媒介剂、对照组合物产生的响应(参考响应)或特定细胞谱系中的应答的减少。

[0477] “维持(maintain或maintenance)”或“保持”或“无变化”或“无实质变化”或“无实质减小”通常是指与由媒介物、对照分子/组合物引起的响应或特定细胞谱系中的响应相比,本文所涵盖的组合物能够在细胞中产生、引发或引起类似的生理响应(即,下游效应)。相当的应答是与参考应答没有显著差异或可测量的差异的应答。

[0478] 在一个实施例中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括施用有效量,例如治疗有效量的包括本文所设想的经基因修饰的免疫效应细胞的组合物。施用的数量和频率将由如患者的病状以及患者的疾病类型和严重程度等因素确定,但是适当的剂量可以通过临床试验确定。

[0479] 在一个实施例中,向受试者施用的组合物中免疫效应细胞,例如表达CAR和CCR的T细胞,的量为至少 0.1×10^5 个细胞、至少 0.5×10^5 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 5×10^5 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 0.5×10^7 个细胞、至少 1×10^7 个细胞、至少 0.5×10^8 个细胞、至少 1×10^8 个细胞、至少 0.5×10^9 个细胞、至少 1×10^9 个细胞、至少 2×10^9 个细胞、至少 3×10^9 个细胞、至少 4×10^9 个细胞、至少 5×10^9 个细胞或至少 1×10^{10} 个细胞。

[0480] 在特定实施例中,向受试者施用约 1×10^7 个T细胞至约 1×10^9 个T细胞、约 2×10^7 个T细胞至约 0.9×10^9 个T细胞、约 3×10^7 个T细胞至约 0.8×10^9 个T细胞、约 4×10^7 个T细胞至约 0.7×10^9 个T细胞、约 5×10^7 个T细胞至约 0.6×10^9 个T细胞、或约 5×10^7 个T细胞至约 0.5×10^9 个T细胞。

[0481] 在一个实施例中,向受试者施用的组合物中免疫效应细胞,例如表达CAR和CCR的T细胞,的量为至少 0.1×10^4 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^4 个细胞/kg体重、至少 1×10^4 个细胞/

kg体重、至少 5×10^4 个细胞/kg体重、至少 1×10^5 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^6 个细胞/kg体重、至少 1×10^6 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^7 个细胞/kg体重、至少 1×10^7 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^8 个细胞/kg体重、至少 1×10^8 个细胞/kg体重、至少 2×10^8 个细胞/kg体重、至少 3×10^8 个细胞/kg体重、至少 4×10^8 个细胞/kg体重、至少 5×10^8 个细胞/kg体重或至少 1×10^9 个细胞/kg体重。

[0482] 在特定实施例中,向受试者施用约 1×10^6 个T细胞/kg体重至约 1×10^8 个T细胞/kg体重、约 2×10^6 个T细胞/kg体重至约 0.9×10^8 个T细胞/kg体重、约 3×10^6 个T细胞/kg体重至约 0.8×10^8 个T细胞/kg体重、约 4×10^6 个T细胞/kg体重至约 0.7×10^8 个T细胞/kg体重、约 5×10^6 个T细胞/kg体重至约 0.6×10^8 个T细胞/kg体重、或约 5×10^6 个T细胞/kg体重至约 0.5×10^8 个T细胞/kg体重。

[0483] 本领域的普通技术人员将认识到,可能需要多次施用本文所设想的组合物以实现期望疗法。例如,组合物可以在1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长的跨度内施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或更多次。

[0484] 在某些实施例中,可能希望向受试者施用激活的免疫效应细胞,并且随后重新抽血(或进行单采血液成分术)、从中激活免疫效应细胞并且向患者重新输注这些激活的和扩增的免疫效应细胞。可以每隔几周进行多次此过程。在某些实施例中,可以抽取10cc到400cc的血来激活免疫效应细胞。在某些实施例中,抽取20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc或400cc或更多量的血来激活免疫效应细胞。不受理论束缚,使用该多次抽血/多次重新输注方案可以用于选出某些免疫效应细胞群体。

[0485] 本文所设想的组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。在一优选实施例中,肠胃外施用组合物。本文所使用的短语“肠胃外施用(parenteral administration和administered parenterally)”意指除了肠内施用和局部施用以外的通常通过注射进行的施用方式,并且包含但不限于:血管内、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、瘤内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内以及胸骨内注射和输注。在一个实施例中,本文所设想的组合物通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位向受试者施用。

[0486] 在一个实施例中,向有需要的受试者施用有效量的组合物以增加对受试者的B细胞相关病症的细胞免疫应答。免疫应答可以包含由能够杀死感染细胞、调节性T细胞和辅助T细胞应答的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫应答。还可以诱导主要由能够激活B细胞从而导致抗体产生的辅助T细胞介导的体液免疫应答。可以使用多种技术来分析由组合物诱导的免疫应答的类型,所述多种技术在本领域中详细描述;例如,《当代免疫学手册》,编辑: John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober (2001) 纽约州纽约市约翰威立父子公司。

[0487] 在一个实施例中,提供了一种治疗被诊断为患有癌症的受试者的方法,所述方法包括从所述受试者体内取出免疫效应细胞,用包括编码本文所设想的CAR和CCR的核酸的载体对所述免疫效应细胞进行基因修饰,由此产生经修饰的免疫效应细胞群体,以及将所述经修饰的免疫效应细胞群体施用于所述同一受试者。在一优选实施例中,免疫效应细胞包

括T细胞。

[0488] 在某些实施例中,提供了用于刺激对受试者的靶细胞群体的免疫效应细胞介导的免疫调节剂应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用表达编码CAR和CCR的核酸构建体的免疫效应细胞群体的步骤。

[0489] 用于施用特定实施例中所设想的细胞组合物的方法包含有效引起在受试者体内重新引入直接表达CAR和CCR的离体经基因修饰的免疫效应细胞或对重新引入免疫效应细胞的经基因修饰的祖细胞有效的方法,所述免疫效应细胞在引入到受试者体内时分化为表达CAR和CCR的成熟免疫效应细胞。一种方法包括用本文所设想的核酸构建体离体转导外周血T细胞,并且将转导的细胞返回到受试者中。

[0490] L. 序列表

[0491]

描述	序列	SEQ ID NO:
人 CD8 α 蛋白 (Swiss-Prot 登录号 P01732)	MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQF RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYYFCSALSN SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV	1
CD8 α 铰链	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFACD	2
CD8 α 铰链 (C27S)	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEASRPA AGGAVHTRGL DFACD	3
CD8 α 铰链 (C44S)	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFASD	4
CD8 α 铰链 (C27S; C44S)	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEASRPA AGGAVHTRGL DFASD	5
CD8 α TM 区	IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI T	6
CD4 铰链	SGQVLLESNI KVLPTWSTPV QP	7
CD28 铰链	KHLCPSPLFP GPSKP	8
CD7 铰链	APPRASALPA PPTGSALPDP QTASALPDPP AASALP	9
CD152 铰链	DTGLYICKVE LMYPPPYLG IGNGTQIYVI DPEPCPDSD	10
PD-1 铰链	QIKESLRAEL RVTERRAEVP TAHPSPSRP AGQFQTLV	11
IgG1 铰链	EPKSCDKTHT CPPCP	12
IgG2 铰链	ERKCCVECPCP CP	13
IgG3 铰链	ELKTPLGDDT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK SCDTPPPCPR CP	14
IgG4 铰链	ESKYGPPCPS CP	15
IgG1 铰链- CH2-CH3	EPKSCDKTHT CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMIART PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	16
IgG1 铰链- CH3-铰链-M1	EPKSCDKTHT CPPCPGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GKGLQLDETC AEAQDGELDG	17
IgG4 铰链- CH2-CH3	ESKYGPPCPS CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFQS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK	18
IgG4 铰链-CH2	SSESKYGPPC PSCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF QSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAK	19
PD1 铰链 (长)	SGTYLCGAIS LAPKAQIKES LRAELRVTER RAEVPTAHPS PSPRPAGQFQ TLV	20

[0492]

[0493] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请和经发布专利通过引用并入本文,如同每个单独的出版物、专利申请或经发布专利具体地且单独地指示通过引用并入一样。

[0494] 尽管已经出于清楚理解的目的通过说明和举例的方式稍为详细地描述了前述实施例,但是根据本文设想的教导,本领域的普通技术人员将容易清楚的是,可以在不脱离随附权利要求的精神或范围的情况下对其进行某些改变和修改。提供以下实例仅作为说明并且不具有限制性。本领域的技术人员将容易认识到可以被改变或修改以产生本质上类似的结果的各种非关键参数。

[0495] 实例

[0496] 实例1

[0497] 在存在单独的CCR抗原的情况下对T细胞信号传导的激活

[0498] T细胞使用慢病毒转导被修饰成递送编码CAR分子或CAR和CCR (CAR/CCR) 分子的构建体。CAR构建体表达与4-1BB和CD3z信号传导结构域 (BBz) 融合的抗BCMA scFv。CAR+CCR构建体表达BBz抗BCMA CAR和与CD28信号传导结构域CCR融合的形成CCR的抗EGFR scFv。使用2A核糖体跳跃元件将CAR+CCR构建体内的CAR序列和CCR序列分离。

[0499] 然后将经修饰的T细胞与缺乏内源BCMA表达的EGFR+HT-1080肿瘤细胞系共培养。在图1A中,在24小时后收集培养物上清液,并且通过Luminex测定评估IFN γ 产生。如图1A所示,未经修饰的T细胞 (UTD) 或抗BCMA CAR T细胞在不存在抗原暴露的情况下未能分泌IFN γ 。另一方面,尽管仅暴露于EGFR, CAR+CCR T细胞产生可检测量的IFN γ 。

[0500] 类似地,在图1B中,仅CAR+CCR T细胞能够在标准4小时体外杀伤/细胞毒性测定期间以剂量依赖性方式杀伤EGFR+肿瘤靶标。

[0501] 实例2

[0502] CCR依赖性信号传导减小肿瘤体积

[0503] 对免疫受损的NSG小鼠皮下植入了内源表达EGFR但缺乏BCMA表达的人A549肿瘤细胞。在植入后大约20天,用未经修饰的T细胞 (UTD)、抗BCMA CAR T细胞或抗BCMA CAR+抗EGFR CCR T细胞对小鼠进行处理,并且评估肿瘤体积。如图2中所示出的,未经转导的T细胞或抗BCMA CAR T细胞均不能够控制肿瘤生长,并且最终那些小鼠死于肿瘤发生。可替代地,用抗BCMA CAR+抗EGFR CCR T细胞处理的小鼠在研究持续期间看到完全肿瘤消退。

[0504] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下,图3描绘了三个说明性和非限制性模型,这解释了赋予了CAR和CCR的T细胞如何能够与表达CCR抗原同时缺乏CAR抗原的肿瘤靶细胞反应。CCR能够与CCR抗原结合,并且随后不依赖于CAR分子转导信号 (图3,左图)。通过进行抗原非依赖性基础CAR信号传导。CD3z通过CCR共刺激信号增强到现在可通过标准体外实验检测到并且表现为体内肿瘤对照的水平 (图3,左图)。CAR分子与CCR分子之间存在分子相互作用,使得CCR通过CCR抗原的接合启动信号转导并触发T细胞激活。

[0505] 实例3

[0506] CAR和CCR铰链突变调节CAR T细胞信号传导

[0507] 实验被设计成测试CAR和CCR的CD8a铰链区中的四种半胱氨酸 (CAR中的两个半胱氨酸和CCR中的两个半胱氨酸) 中的任一种半胱氨酸是否负责两种不同蛋白质之间的分子相互作用。产生了六种不同的CAR+CCR构建体,所述构建体改变了其在CAR或CCR的CD8a铰链的位置289和306处 (对应于SEQ ID NO:2的位置27和44) 对半胱氨酸和丝氨酸的使用,并且

所述构建体被转导到T细胞中。C1是在所有四个位置中利用半胱氨酸的亲本CAR+CCR构建体。C2在CAR中含有两个丝氨酸,并且在CCR中含有两个半胱氨酸。C3在CAR中含有两个半胱氨酸,并且在CCR中含有两个丝氨酸。C4在CAR的SEQ ID NO:2的位置27处含有丝氨酸,并且在SEQ ID NO:2的位置44处含有半胱氨酸;并且在CCR的SEQ ID NO:2的位置27处含有半胱氨酸,并且在SEQ ID NO:2的位置44处含有丝氨酸。C5在CAR的SEQ ID NO:2的位置27处含有半胱氨酸,并且在SEQ ID NO:2的位置44处含有丝氨酸,并且在CCR的SEQ ID NO:2的位置27处含有丝氨酸,并且在SEQ ID NO:2的位置44处含有半胱氨酸。C6在所有四个位置中利用丝氨酸。

[0508] 用上述六种构建体以及以下两种对照对T细胞进行修饰:抗BCMA BBz CAR和抗BCMA CAR的用丝氨酸替代SEQ ID NO:2的位置27和44处的半胱氨酸的变体。然后将每种T细胞条件与仅表达EGFR的多种肿瘤细胞(A549和HT-1080)或表达BCMA和EGFR两者的肿瘤细胞(A549.BCMA和HT-1080.BCMA)共培养。24小时后评估IFN γ 产生。如图4A-4C中所示出的,对照抗BCMA CAR T细胞仅在存在表达BCMA的肿瘤细胞的情况下培养时产生细胞因子。当与表达BCMA的肿瘤细胞一起培养时,在抗BCMA CAR中的SEQ ID NO:2的位置27和44处引入丝氨酸导致IFN γ 产生减少。被工程化成表达亲本CAR+CCR构建体(C1)的T细胞对表达BCMA和EGFR或单独的EGFR的肿瘤细胞作出响应。这些实验中使用的其它CAR+CCR变体均不能保留对仅表达EGFR的肿瘤细胞的完全反应性。有趣的是,构建体C4是对表达EGFR的肿瘤细胞表现出部分响应性的唯一变体。这些数据一起证明了铰链半胱氨酸在介导CAR/CCR分子相互作用中的重要性。

[0509] 实例4

[0510] CAR融合多肽和CCR融合多肽的设计和表达。

[0511] 图5A描绘了用于构建抗EGFR CCR的模块化蛋白质结构域、含有两个半胱氨酸至丝氨酸突变的抗EGFR CCR和对应CAR+CCR构建体(分别为C1和C3)。C3是编码与SEQ ID NO:2的位置27和44相对应的抗BCMA CAR和在CD8a铰链内具有代替半胱氨酸的丝氨酸的抗EGFR CCR的构建体。C1是具有存在于CAR和CCR中的所有四种半胱氨酸的亲本CAR+CCR构建体。

[0512] 从3个不同供体中将构建体中的每个构建体转导到T细胞中,并且使用了流式细胞术来评估相比于不表达CAR或CCR的UTD对照,CAR和CCR两者的细胞表面表达。如图5B中所展示的,SEQ ID NO:2的位置27和44处存在丝氨酸不影响仅CCR构建体的总体转导效率。类似地,用C1或C3构建体转导的T细胞导致CAR和CCR两者在细胞表面上的表达。尽管在CCR的两个位置处都存在丝氨酸,但对转导效率没有影响。

[0513] 实例5

[0514] CCR铰链双重突变在不存在CAR抗原的情况下减少T细胞激活

[0515] 将用实例4中所述的构建体转导的T细胞与仅表达针对CCR、EGFR的抗原的A549或HT-1080肿瘤细胞共培养,并且在24小时后评估IFN γ 产生。图6证明了CAR+CCR T细胞对表达EGFR但缺乏BCMA的肿瘤细胞的响应性,这表明这些T细胞不仅靶向BCMA+肿瘤,还靶向仅表达EGFR的肿瘤。在CCR的SEQ ID NO:2的位置27和44处引入丝氨酸后,这种反应性降低到与阴性对照一致的水平,这表明CCR铰链内的半胱氨酸对于介导对EGFR单一阳性肿瘤细胞的反应性很重要。

[0516] 这些结果通过图7A-7D和8A-8D中的数据进一步得到证实,所述数据证明了靶向

BCMA和EGFR的CAR+CCR T细胞增加了BCMA+肿瘤细胞的细胞因子释放和杀伤,不论其半胱氨酸的使用如何。然而,仅在CCR的铰链结构域内含有其天然半胱氨酸的细胞能够消除EGFR单一阳性肿瘤细胞,而在CCR的铰链中含有代替半胱氨酸的丝氨酸的那些T细胞不能够在不存在BCMA的情况下杀死那些肿瘤细胞(图8A-8D)。

[0517] 通常,在以下权利要求书中,所使用的术语不应当被解释为将权利要求书限制于本说明书和权利要求书中所公开的特定实施例,而是应当被解释为包含所有可能的实施例连同此类权利要求有权获得的等效物的整个范围。因此,权利要求书并不受本公开的限制。

序列表

<110> 蓝鸟生物公司(bluebird bio, Inc.)

Evans, John W.

<120> 经修饰的CCR多肽和其用途

<130> BLUE-127.PC

<150> US 63/011,494

<151> 2020-04-17

<160> 61

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
 195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
 210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 225 230 235

<210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

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

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

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

<210> 3

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 在实验室中制备 - 经修饰的CD8 α 铰链

<400> 3

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

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

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

<210> 4

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 在实验室中制备 - 经修饰的CD8 α 铰链

<400> 4

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

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

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

<210> 5

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 在实验室中制备 - 经修饰的CD8 α 铰链

<400> 5

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

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

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

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

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

Ser Leu Val Ile Thr
20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp
1 5 10 15

Ser Thr Pro Val Gln Pro
20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 36

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Ala Pro Pro Arg Ala Ser Ala Leu Pro Ala Pro Pro Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Asp Pro Gln Thr Ala Ser Ala Leu Pro Asp Pro Pro Ala Ala
 20 25 30
 Ser Ala Leu Pro
 35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro
 20 25 30
 Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 35

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 20 25 30
 Gln Phe Gln Thr Leu Val
 35

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 62

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

50 55 60

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 231

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

<210> 17
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 17

50				55				60							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
65				70				75				80			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
85				90				95							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
100				105				110							
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Leu	Asp	Glu
115				120				125							
Thr	Cys	Ala	Glu	Ala	Gln	Asp	Gly	Glu	Leu	Asp	Gly				
130				135				140							
<210> 18															
<211> 229															
<212> PRT															
<213> 智人(Homo sapiens)															
<400> 18															
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
1				5				10				15			
Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
20				25				30							
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
35				40				45							
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
50				55				60							
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Gln	Ser
65				70				75				80			
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
85				90				95							
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser
100				105				110							
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
115				120				125							
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
130				135				140							
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
145				150				155				160			
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
165				170				175							
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu

180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser
195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser
210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys		
225		
<210> 19		
<211> 229		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 19		
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys	Pro Ser Cys Pro Ala Pro	Glu Phe
1	5	10
Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr
20	25	30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val
35	40	45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val	Gln Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val
50	55	60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Phe Gln Ser
65	70	75
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu
85	90	95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Gly	Leu Pro Ser
100	105	110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro
115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Gln Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln
130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr
165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Arg Leu
180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser
195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser

210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys		
225		
<210> 20		
<211> 53		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 20		
Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln		
1	5	10 15
Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala		
20 25 30		
Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln		
35 40 45		
Phe Gln Thr Leu Val		
50		
<210> 21		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 肽接头序列		
<400> 21		
Asp Gly Gly Gly Ser		
1	5	
<210> 22		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 肽接头序列		
<400> 22		
Thr Gly Glu Lys Pro		
1	5	
<210> 23		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> 肽接头序列

<400> 23

Gly Gly Arg Arg

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 25

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1

5

10

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 26

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1

5

10

15

Leu Asp

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 27

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 28

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 29

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro

1 5 10

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 30

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro

1 5 10 15

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 31

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 由TEV蛋白酶进行的切割序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (3)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa为任何氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa = Gly或Ser
<400> 32
Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa
1 5
<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 由TEV蛋白酶进行的切割序列
<400> 33
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5
<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 由TEV蛋白酶进行的切割序列
<400> 34
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 36

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 37

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 38

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 39

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1

5

10

15

Gly Pro

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 40

Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

1

5

10

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 41

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

1

5

10

15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 42

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 46

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 47

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 48

Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 49

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 50

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly

1 5 10 15

Pro

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 51

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 52

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 52

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 53

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 53

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys

20

25

30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr

35 40

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 54

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 55

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 55

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val

1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

35 40

<210> 56

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 包括2A位点的自切割多肽

<400> 56

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly

20 25 30

Pro

<210> 57

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 共有Kozak序列
<400> 57
gccrccatgg 10
<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于确定轻链CDR-L3基序的示例性规则
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa为任何氨基酸
<400> 58
Phe Gly Xaa Gly
1
<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于确定重链CDR-H1基序的示例性规则
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (4)
<223> Xaa为任何氨基酸
<400> 59
Cys Xaa Xaa Xaa
1
<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于确定重链CDR-H2基序的示例性规则
<400> 60
Leu Glu Trp Ile Gly

1 5
<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于确定重链CDR-H3基序的示例性规则
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa为任何氨基酸
<400> 61
Trp Gly Xaa Gly
1

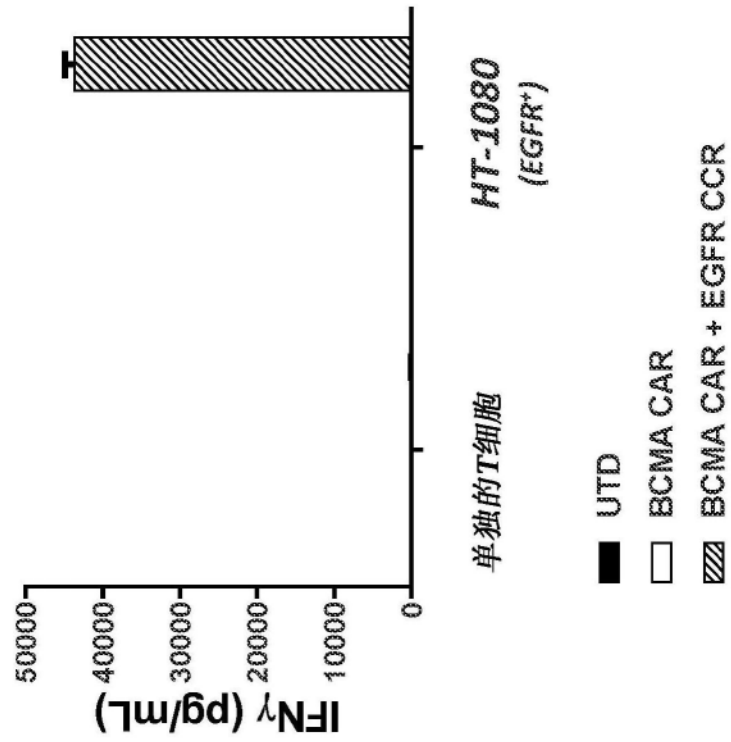


图1A

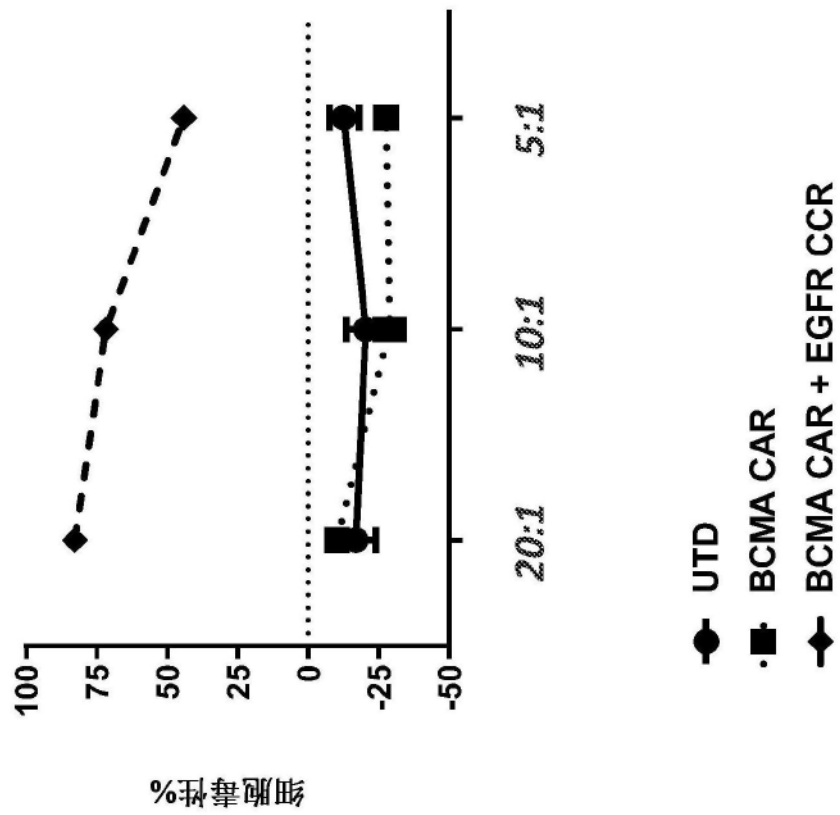
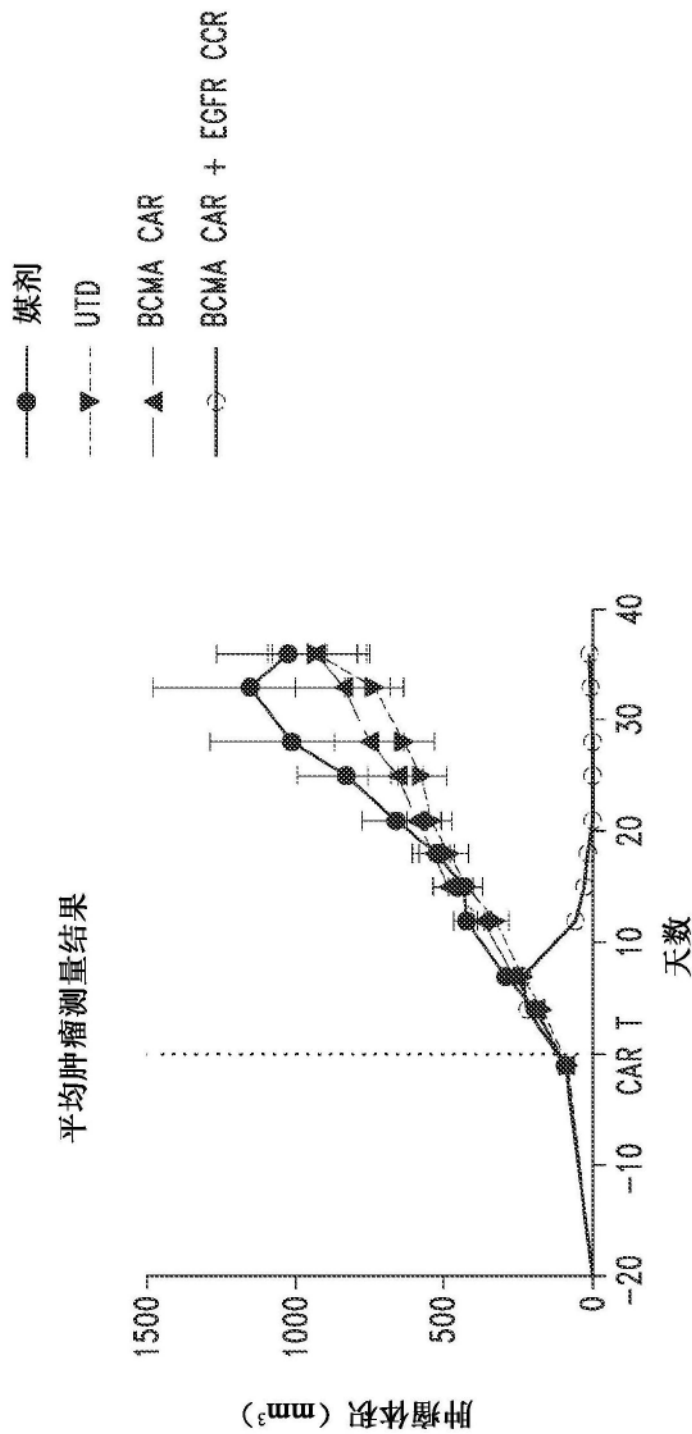


图1B



*从媒剂组中去除了动物。动物的肿瘤大小超出了3,000 mm³的IACUC限值并且被处死。

图2

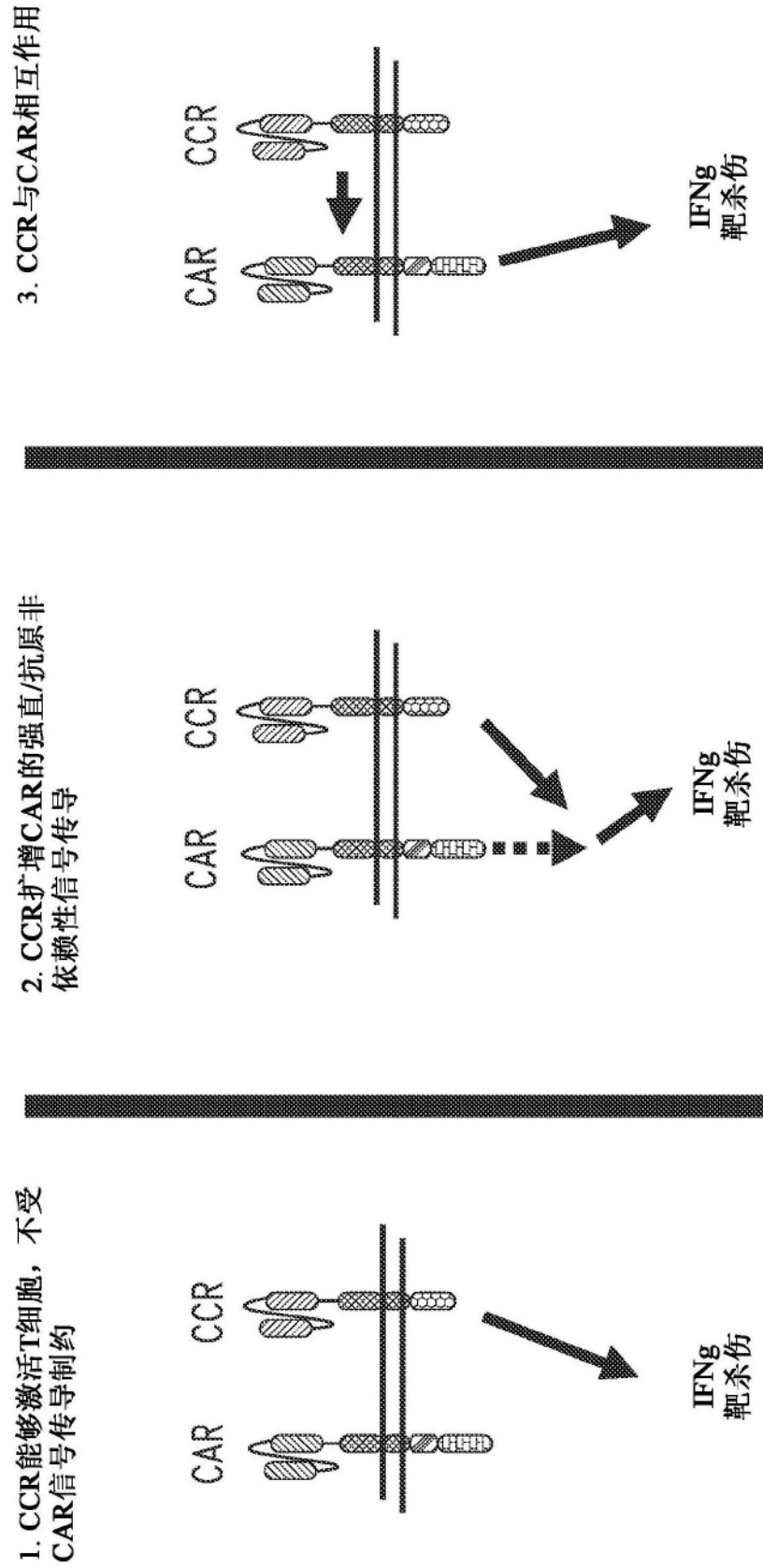


图3

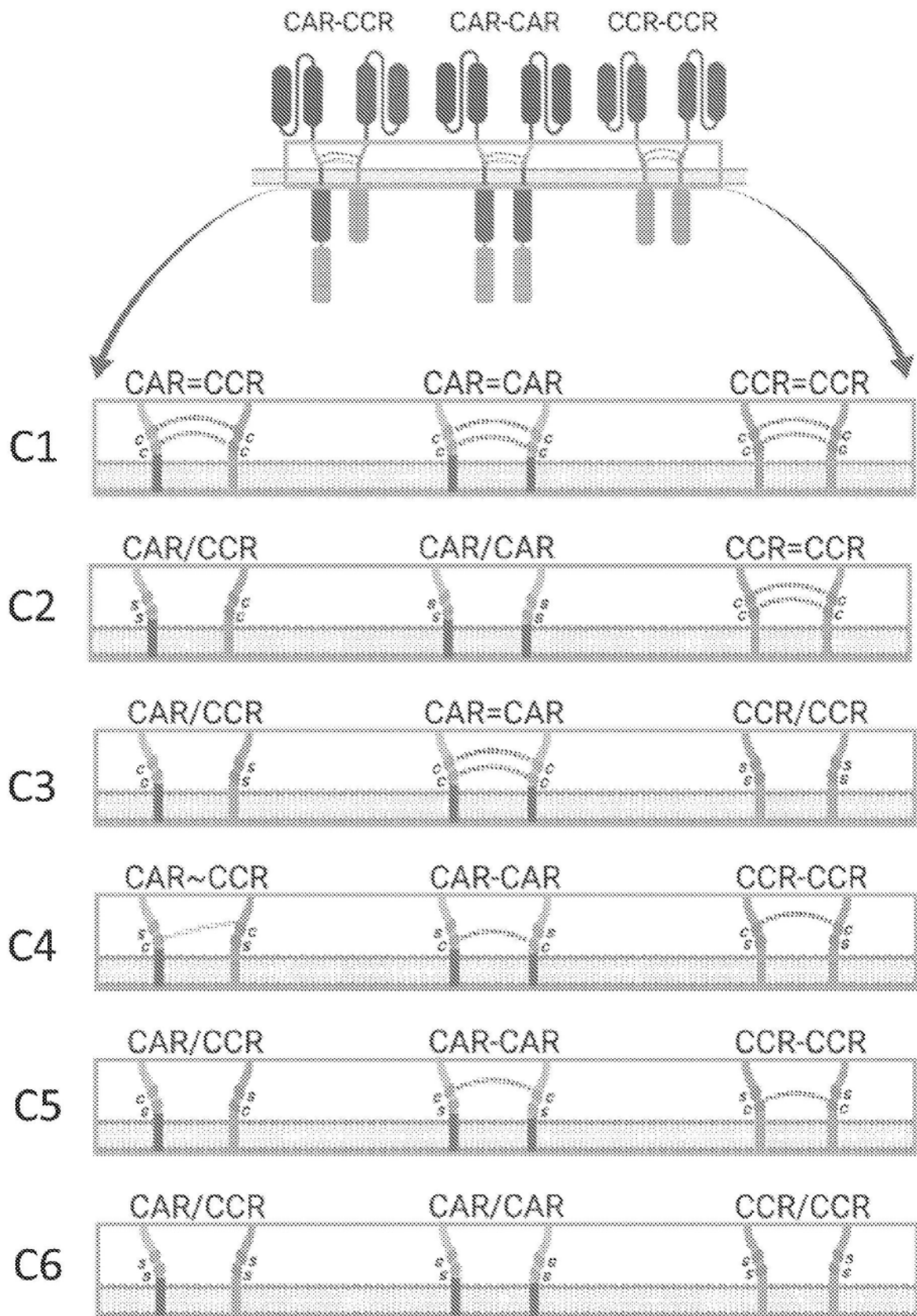


图4A

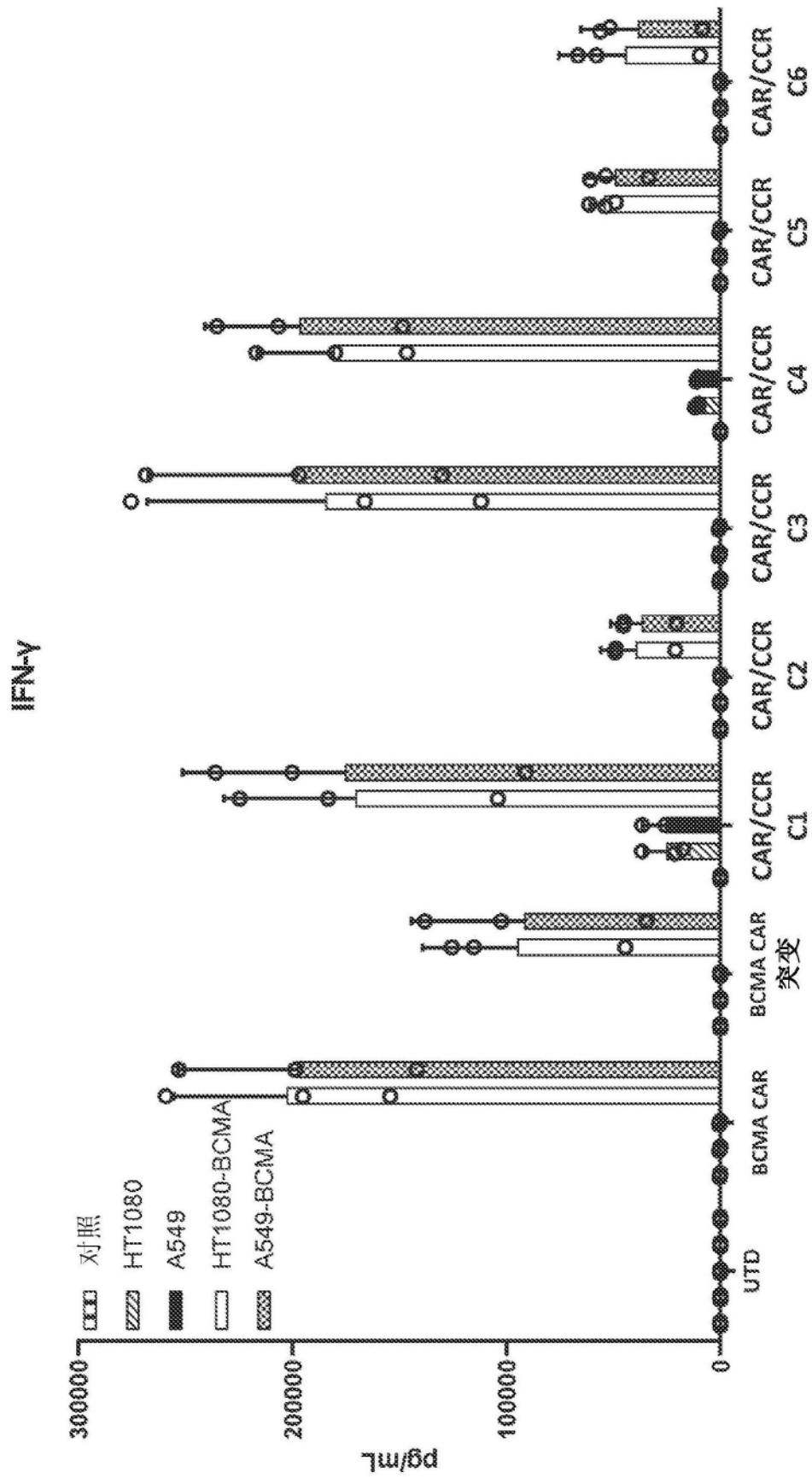


图4A (续)

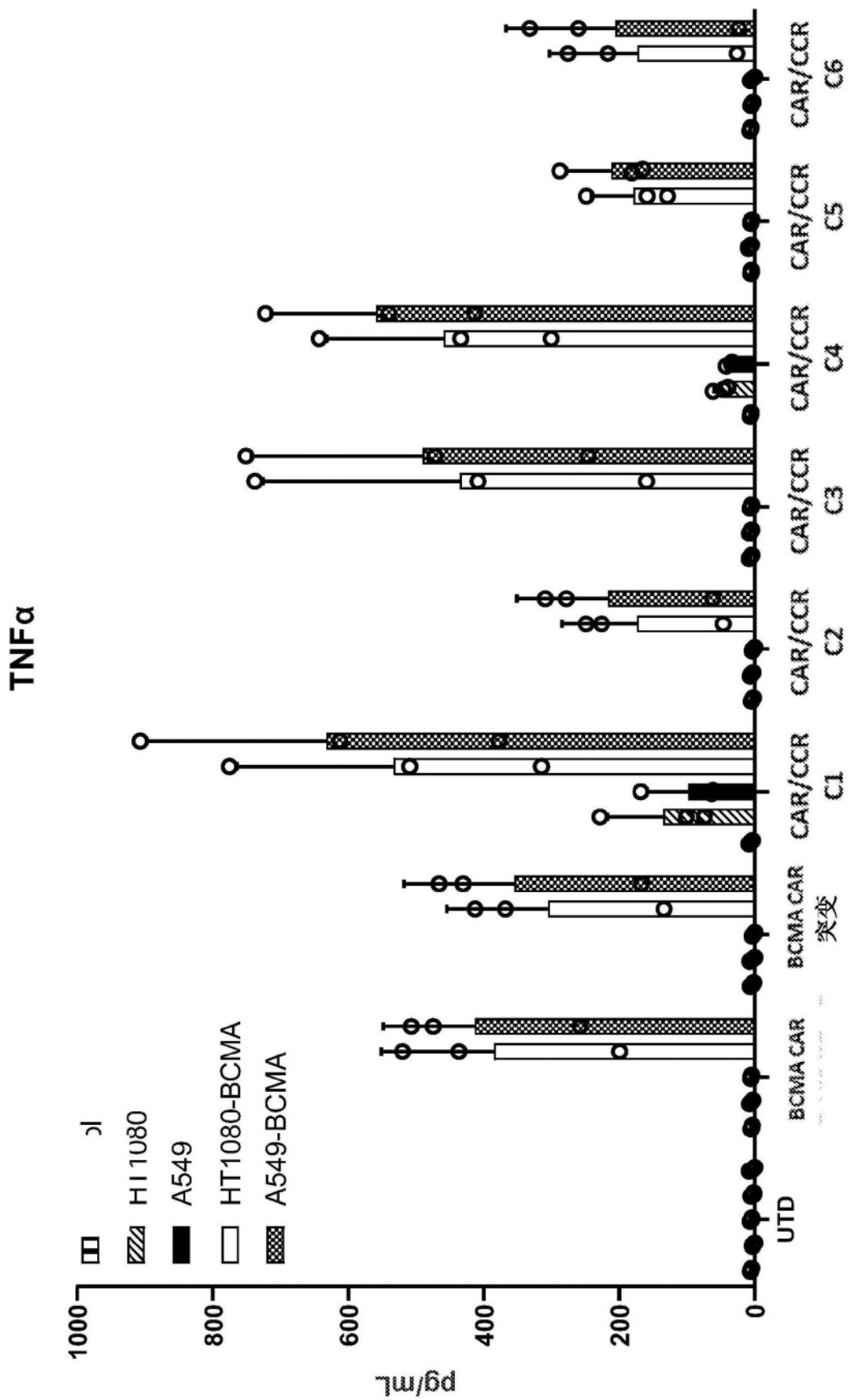


图4B

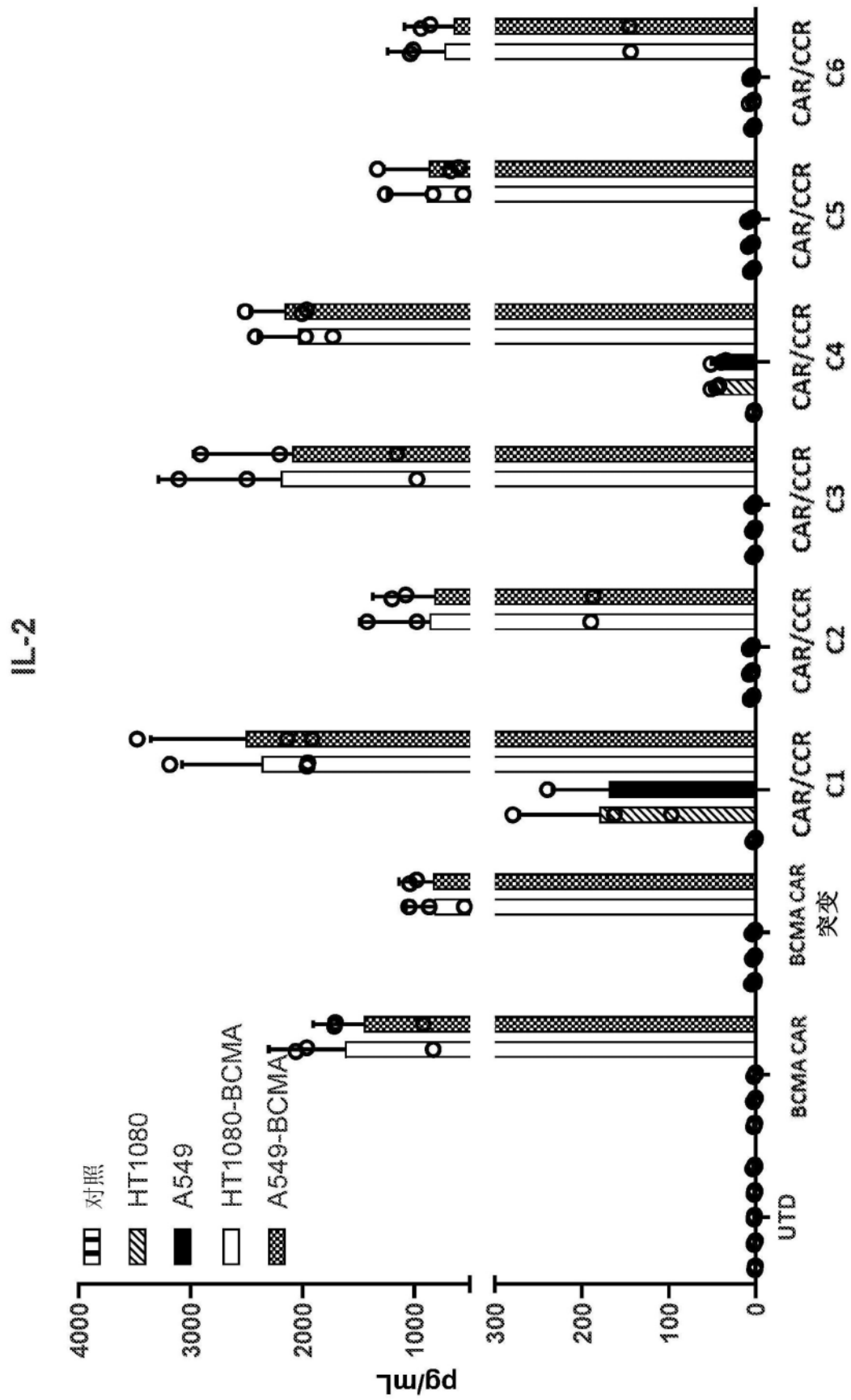


图4C

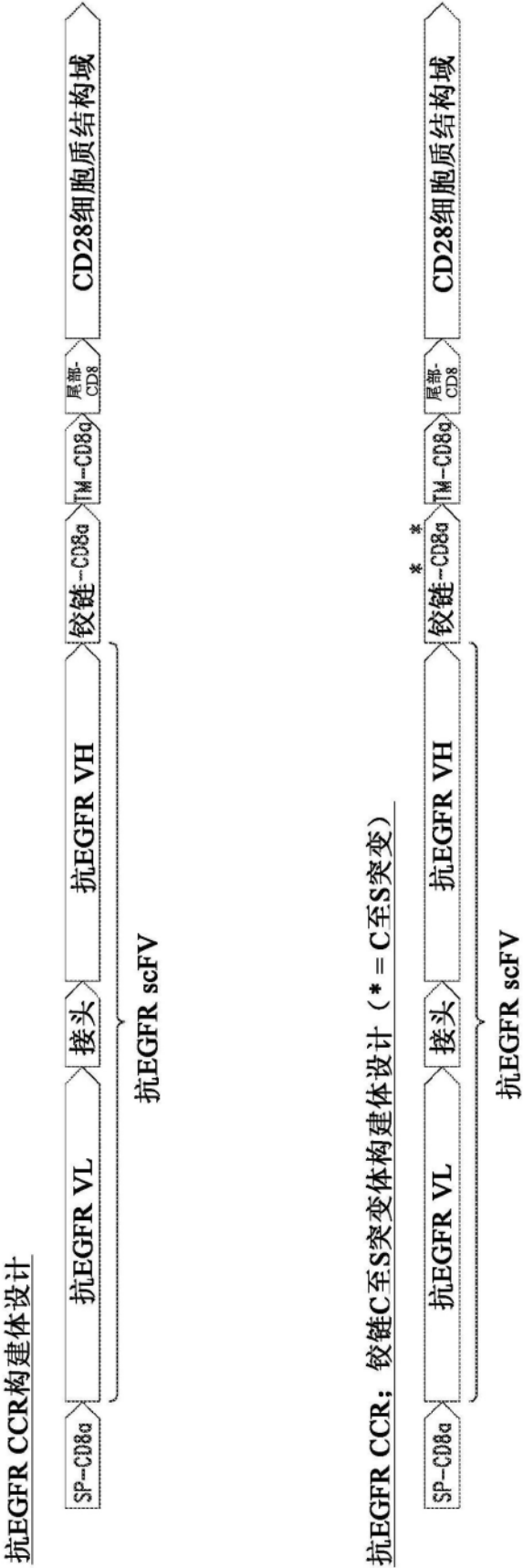
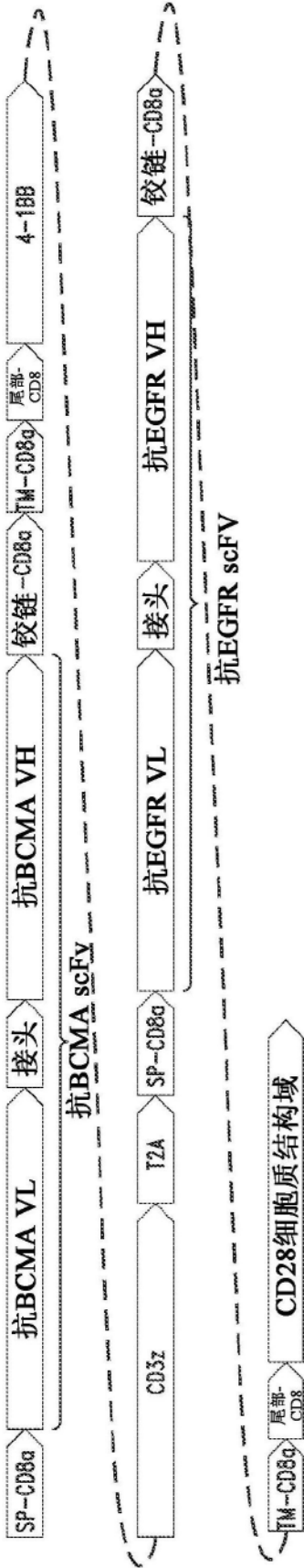


图5A

C1 (抗BCMA/抗EGFR CCR)



C3 (抗BCMA/抗EGFR CCR; 铰链C至S突变体) (* = C至S突变)

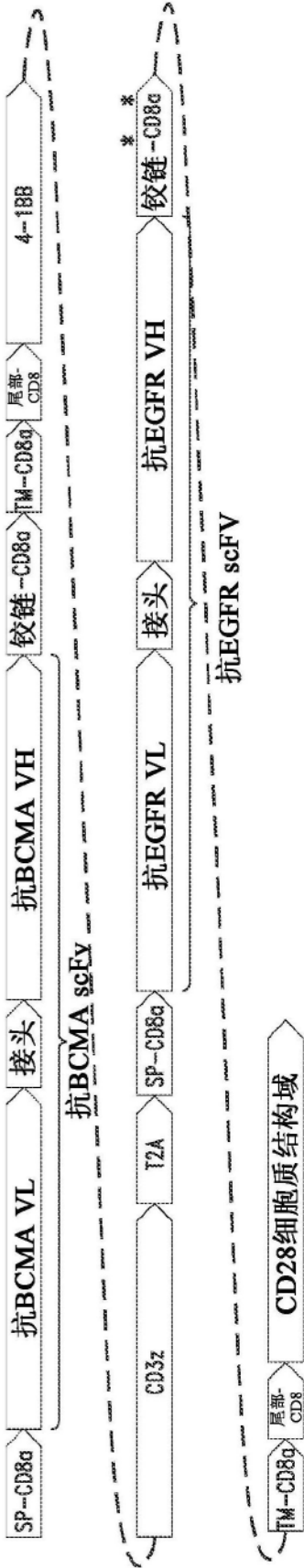


图5A (续)

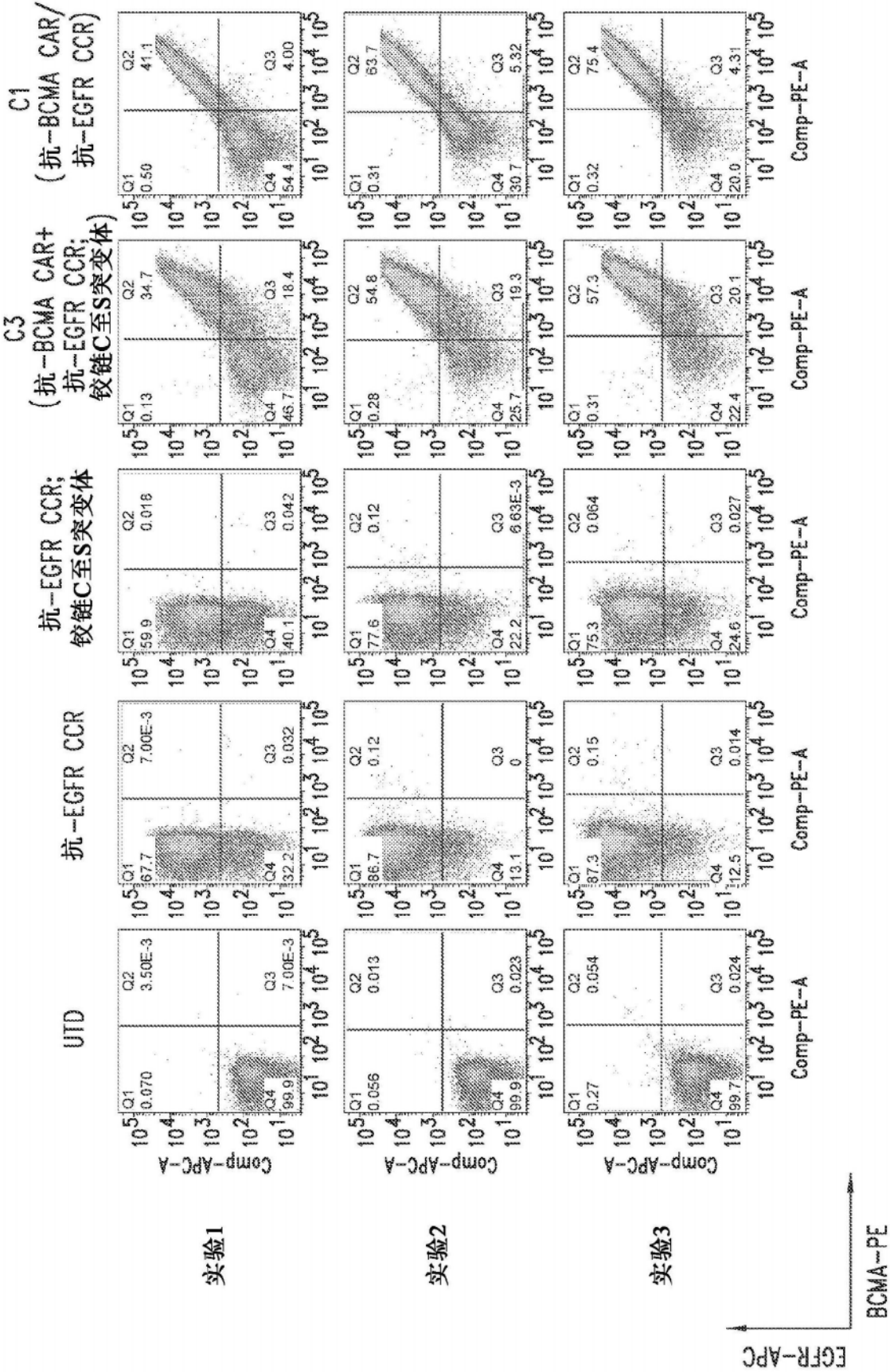


图5B

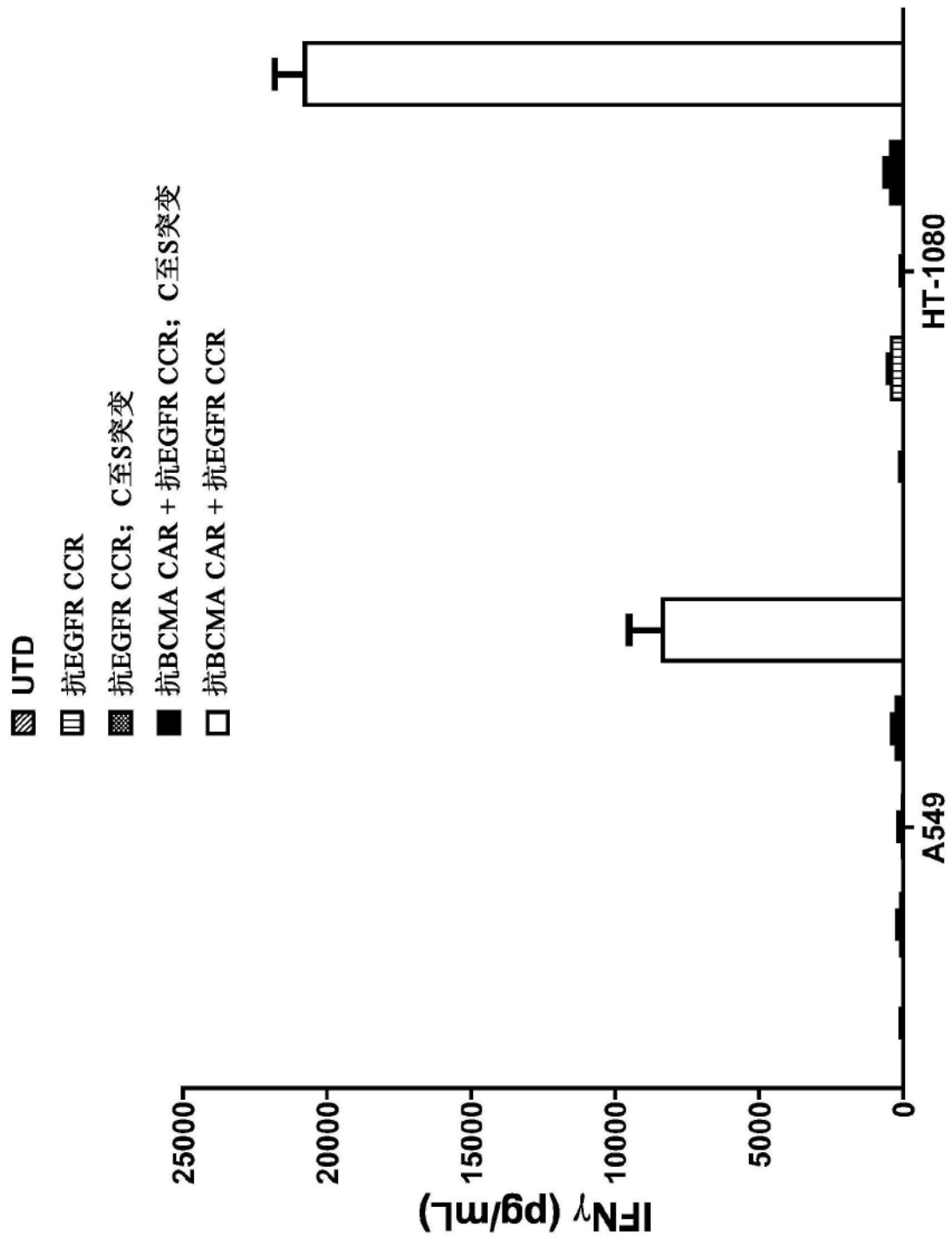


图6

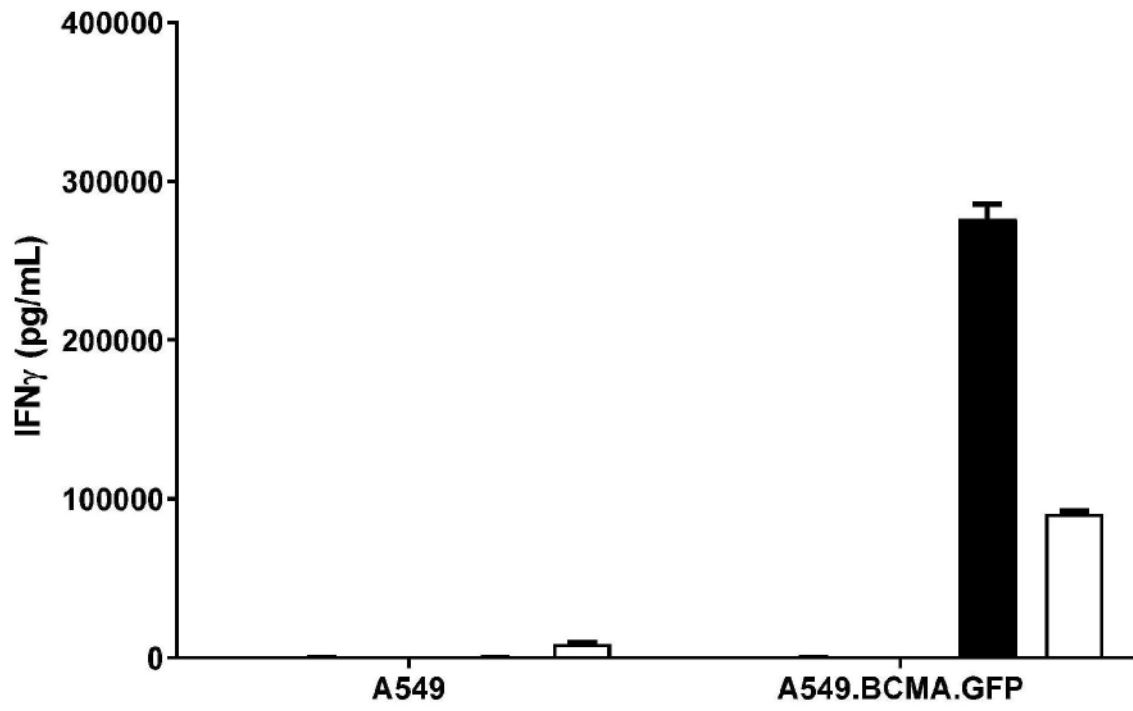


图7A

- ▨ UTD
- ▤ 抗EGFR CCR
- ▩ 抗EGFR CCR; C至S突变
- 抗BCMA CAR + 抗EGFR CCR; C至S突变
- 抗BCMA CAR + 抗EGFR CCR

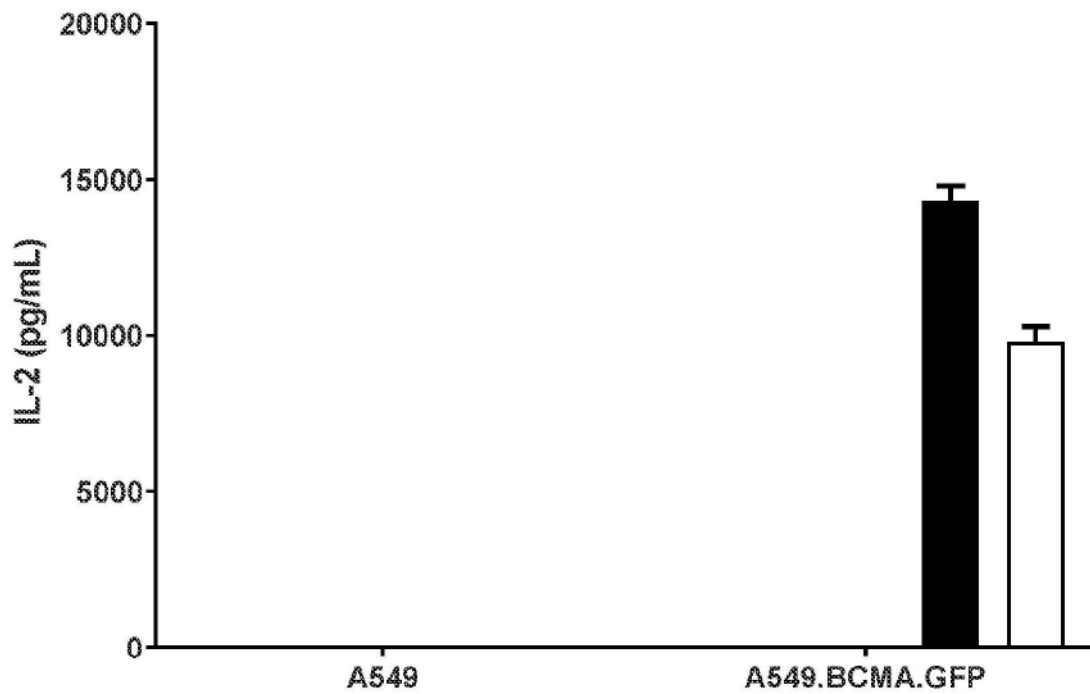


图7B

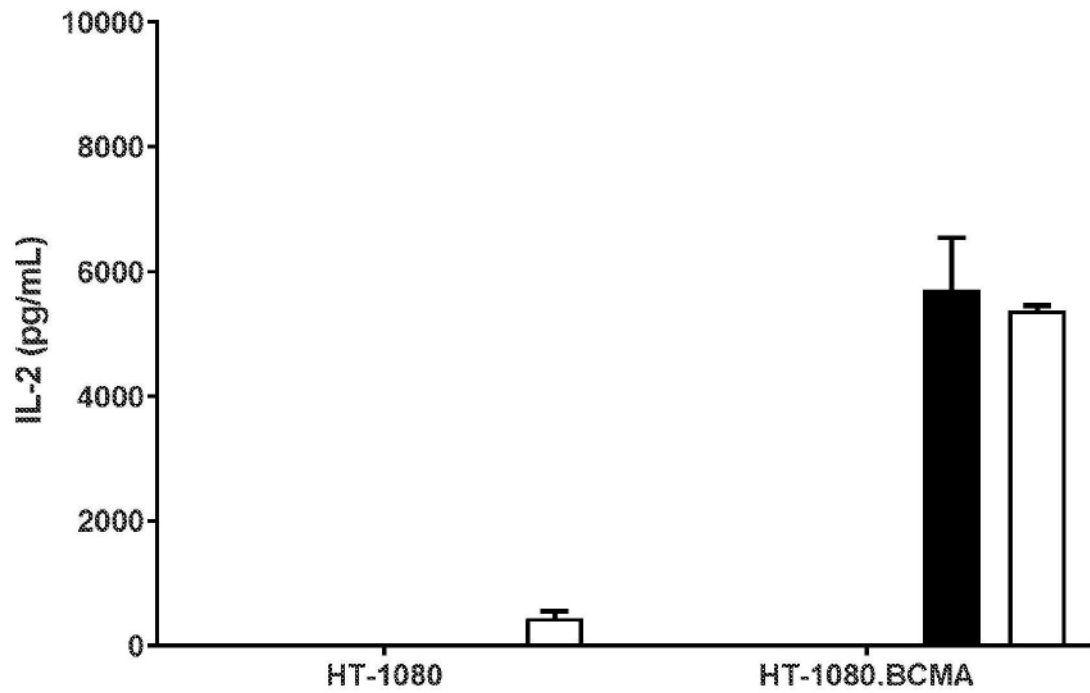
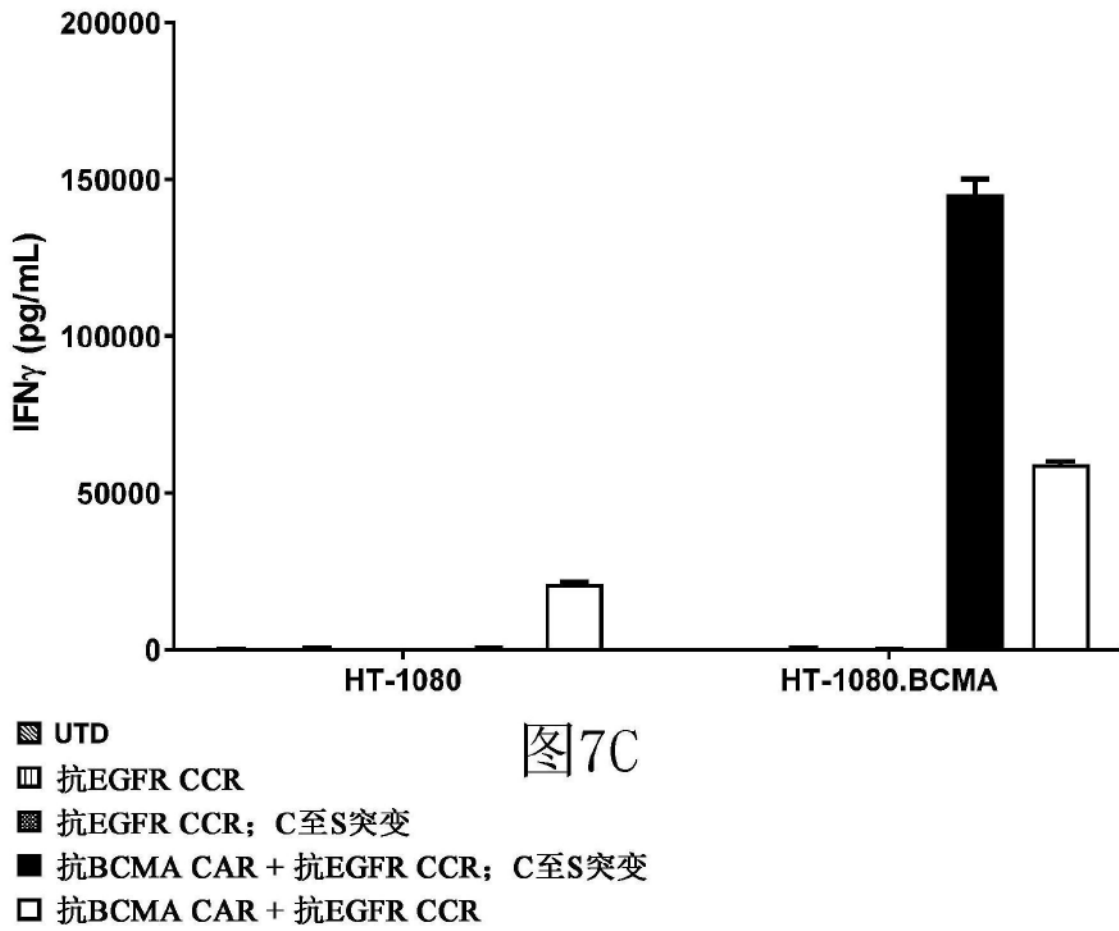


图7D

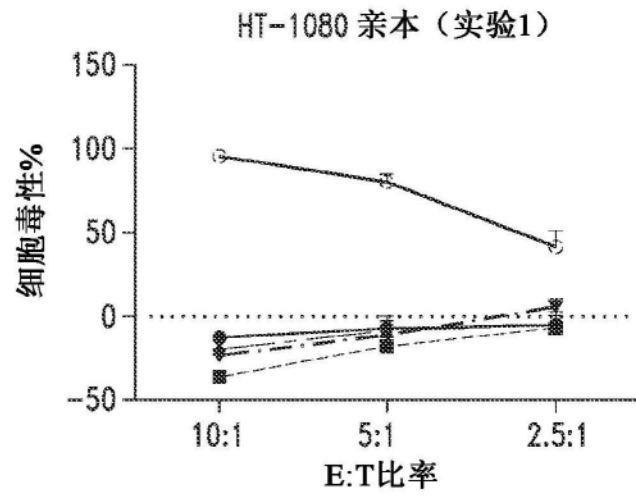


图8A

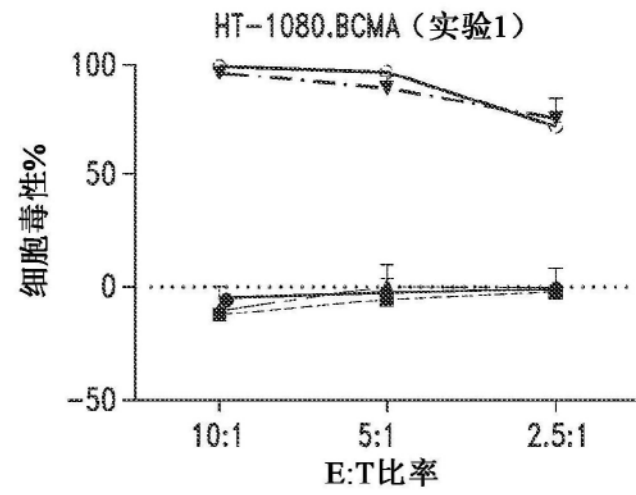
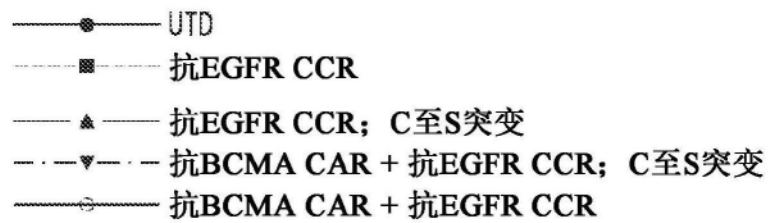


图8B



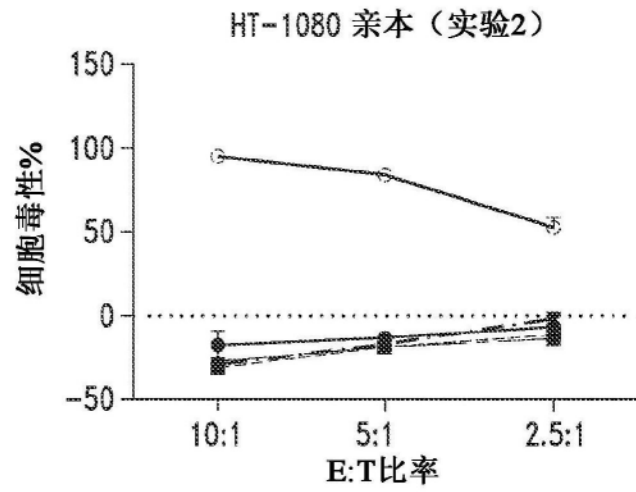


图8C

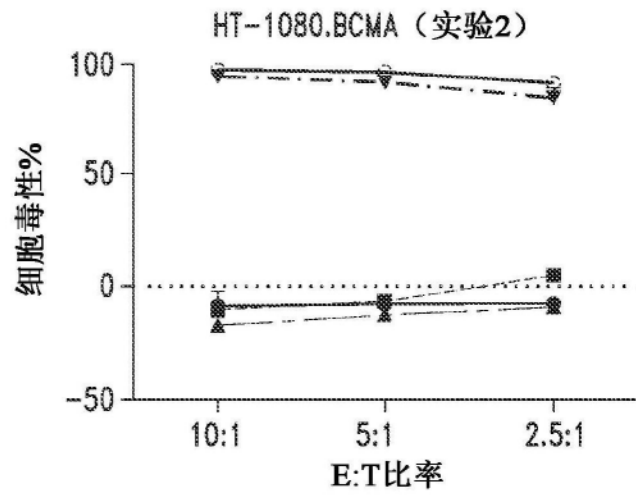


图8D

