



(10) 授权公告号 CN 112368021 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 21

(21) 申请号 201980045873.5

(22) 申请日 2019.06.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112368021 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(30) 优先权数据
62/685,078 2018.06.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/037270 2019.06.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/241685 EN 2019.12.19

(73) 专利权人 2赛文缇生物公司
地址 美国马萨诸塞州剑桥宾尼街60号

(72) 发明人 凯文·弗里德曼
莫莉·里德·帕金斯

(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.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103974977 A, 2014.08.06
CN 106536549 A, 2017.03.22

审查员 郝明媚

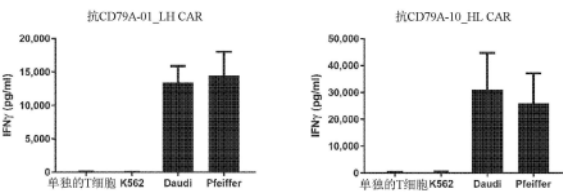
权利要求书2页 说明书60页
序列表38页 附图6页

(54) 发明名称

CD79A嵌合抗原受体

(57) 摘要

本发明提供用于表达CD79A的癌症的过继性
细胞疗法的改进的组合物。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: 胞外域, 所述CAR包含:
 - a) 结合人类CD79A多肽的一个或多个表位的抗CD79A抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列, 其包含SEQ ID NO: 1-3中所阐述的CDRL1-CDRL3序列, 和可变重链序列, 其包含SEQ ID NO: 4-6中所阐述的CDRH1-CDRH3序列;
 - b) 来自CD8 α 的跨膜域;
 - c) 来自CD137的胞内共刺激信号传导域; 和
 - d) 来自CD3 ζ 的初级信号传导域,其中所述抗CD79A抗体或其抗原结合片段的可变重链位于所述可变轻链的C端。
2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中结合所述人类CD79A多肽的所述抗CD79A抗体或抗原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和(scFv)₂。
3. 根据权利要求1所述的CAR, 其中结合所述人类CD79A多肽的所述抗CD79A抗体或抗原结合片段选自由以下组成的组: 微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体和二硫键稳定的Fv蛋白 ("dsFv")。
4. 根据权利要求1所述的CAR, 其中结合所述人类CD79A多肽的所述抗CD79A抗体或抗原结合片段为scFv。
5. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO: 7中所述的可变轻链序列, 和如SEQ ID NO: 8中所述的可变重链序列。
6. 根据权利要求1所述的CAR, 其进一步包含铰链区多肽。
7. 根据权利要求6所述的CAR, 其中所述铰链区多肽包含CD8 α 的铰链区。
8. 根据权利要求1所述的CAR, 其进一步包含间隔区。
9. 根据权利要求1所述的CAR, 其进一步包含信号肽。
10. 根据权利要求9所述的CAR, 其中所述信号肽包含IgG1重链信号多肽、CD8 α 信号多肽或人类GM-CSF受体 α 信号多肽。
11. 根据权利要求1所述的CAR, 其包含如SEQ ID NO: 26中所述的氨基酸序列。
12. 一种多肽, 其包含根据权利要求1至11中任一项所述的CAR的氨基酸序列。
13. 一种聚核苷酸, 其编码根据权利要求1至11中任一项所述的CAR。
14. 一种聚核苷酸, 其包含如SEQ ID NO: 32中所阐述的序列。
15. 一种载体, 其包含根据权利要求13或14所述的聚核苷酸。
16. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为表达载体。
17. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为游离型载体。
18. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为病毒载体。
19. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为逆转录病毒载体。
20. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为慢病毒载体。
21. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体为选自以下的慢病毒载体: 人类免疫缺陷病毒1 (HIV-1); 人类免疫缺陷病毒2 (HIV-2); 维斯纳-梅迪病毒 (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); 和猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。
22. 根据权利要求15所述的载体, 其包含左 (5') 逆转录病毒LTR、Psi (Ψ) 包装信号、中

央多嘌呤段/DNA瓣 (cPPT/FLAP)、逆转录病毒导出元件;可操作地连接于根据权利要求13或14所述的聚核苷酸的启动子;和右(3')逆转录病毒LTR。

23. 根据权利要求15所述的载体,其进一步包含异源聚腺苷酸化序列。

24. 根据权利要求15所述的载体,其进一步包含乙型肝炎病毒转录后调节元件 (HPRE) 或土拔鼠转录后调节元件 (WPRE)。

25. 根据权利要求22所述的载体,其中所述5'LTR的所述启动子经异源启动子置换。

26. 根据权利要求25所述的载体,其中所述异源启动子为巨细胞病毒 (CMV) 启动子、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子或猿猴病毒40 (SV40) 启动子。

27. 根据权利要求22所述的载体,其中所述5'LTR或3'LTR为慢病毒LTR。

28. 根据权利要求22所述的载体,其中所述3'LTR包含一个或多个修饰。

29. 根据权利要求22所述的载体,其中所述3'LTR包含一个或多个缺失。

30. 根据权利要求22所述的载体,其中所述3'LTR为自我失活 (SIN) LTR。

31. 根据权利要求22所述的载体,其中所述可操作地连接于根据权利要求13或14所述的聚核苷酸的启动子选自:巨细胞病毒立即早期基因启动子 (CMV)、延伸因子1 α 启动子 (EF1- α)、磷酸甘油酸激酶-1启动子 (PGK)、泛素-C启动子 (UBQ-C)、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAG)、多瘤增强子/单纯疱疹胸苷激酶启动子 (MC1)、 β 肌动蛋白启动子 (β -ACT)、猿猴病毒40启动子 (SV40) 和骨髓增生肉瘤病毒增强子、阴性对照区经缺失、dl587rev引物结合位点经取代 (MND) U3启动子。

32. 一种免疫效应细胞,其包含根据权利要求15至31中任一项所述的载体。

33. 根据权利要求32所述的免疫效应细胞,其中所述免疫效应细胞选自:T淋巴细胞、自然杀手 (NK) 细胞和NKT细胞。

34. 一种组合物,其包含根据权利要求32或33所述的免疫效应细胞和生理学上可接受的赋形剂。

35. 一种产生包含根据权利要求1至11中任一项所述的CAR的免疫效应细胞群体的方法,其包含向免疫效应细胞群体中引入根据权利要求13或14所述的聚核苷酸,或根据权利要求15至31中任一项所述的载体。

36. 根据权利要求35所述的方法,其进一步包含通过使免疫效应细胞与结合CD3的抗体和结合于CD28的抗体接触来刺激所述细胞和诱导所述细胞增殖;由此产生扩充的免疫效应细胞群体。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述免疫效应细胞包含T细胞、NK细胞和/或NKT细胞。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述免疫效应细胞包含T细胞。

39. 权利要求34所述的组合物在制备用于治疗有需要的受试者的癌症的药物中的用途,其中所述癌症为伯基特氏淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤。

CD79A嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2018年6月14日提交的美国临时申请第62/685,078号的权益,所述申请以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 关于序列表的陈述

[0004] 以文本格式代替纸本拷贝提供与本申请相关的序列表,并且在此以引用的方式并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称为BLBD_100_01W0_ST25.txt。文本文件为64KB,创建于2019年6月14日,且通过EFS-Web以电子方式提交,与本说明书同时提交。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于治疗癌症的改进的组合物和方法。更确切地说,本发明涉及改进的抗CD79A嵌合抗原受体(CAR)、遗传修饰的免疫效应细胞和这些组合物用于有效治疗表达CD79A的癌症的用途。

背景技术

[0006] 癌症为全世界范围内重大的健康问题。基于2008-2010的速率,40.76%当今出生的男性和女性将在其一生的某个时间诊断患有某种形式的癌症。相比于女性的15.30%,20.37%的男性将在其50岁与70岁之间罹患癌症。在2010年1月1日,美国约有13,027,914名具有癌症病史的男性和女性存活-6,078,974名男性和6,948,940名女性。据估计,在2013年美国将有1,660,290名男性和女性(854,790男性和805,500女性)诊断患有癌症且全国将有580,350名男性和女性死于癌症。Howlader等人2013。

[0007] B细胞的恶性转化导致癌症,包括但不限于淋巴瘤,例如多发性骨髓瘤和非霍奇金氏淋巴瘤。大部分患有B细胞恶性肿瘤,包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)和多发性骨髓瘤(MM)的患者是癌症死亡率的重要贡献者。B细胞恶性肿瘤对各种形式的治疗的反应是混合的。治疗B细胞恶性肿瘤的传统方法,包括化疗和放射线疗法由于毒性副作用而效用有限。利用抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD23、抗CD52、抗CD80和抗HLA-DR治疗抗体的免疫疗法所提供的成功有限,部分是由于药物动力学概况不佳、抗体被血清蛋白酶和肾小球处的过滤快速消除以及渗透至肿瘤部位和目标抗原在癌细胞上的表达水平有限。使用表现嵌合抗原受体(CAR)的遗传修饰细胞的尝试也成功有限。另外,特定CAR中所用的给定抗原结合域的治疗功效可能是不可预测的:如果抗原结合域太强地结合,则CAR T细胞可诱导大量的细胞因子释放,导致被视为“细胞因子风暴(cytokine storm)”的潜在致命的免疫反应,且如果抗原结合域太弱地结合,则CAR T细胞可能不在清除癌细胞中显示足够的治疗功效。

发明内容

[0008] 本发明总体上提供用于产生过继性细胞疗法的改进的载体和其使用方法。更具体地说,本发明提供抗CD79A CAR分子和其在治疗、预防或改善表达CD79A的癌症中的用途。

[0009] 在各种实施例中,提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:包含以下的胞外域:a)结

合人类CD79A多肽的一个或多个表位的抗CD79A抗体或其抗原结合片段,其中抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,其包含SEQ ID NO:1-3、9-11或17-19中所阐述的CDRL1-CDRL3序列,和/或和可变重链序列,其包含SEQ ID NO:4-6、12-14或20-22中所阐述的CDRH1-CDRH3序列;b)跨膜域;c)一个或多个胞内共刺激信号传导域;和/或d)初级信号传导域。

[0010] 在特定实施例中,结合人类CD79A多肽的抗CD79A抗体或抗原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、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")和单域抗体(sdAb,纳米抗体)。

[0011] 在某些实施例中,结合人类CD79A多肽的抗CD79A抗体或抗原结合片段为scFv。

[0012] 在特定实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:1-3中的任一个中所述的一个或多个轻链CDR,和/或如SEQ ID NO:4-6中的任一个中所述的一个或多个重链CDR。

[0013] 在一些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:9-11中的任一个中所述的一个或多个轻链CDR,和/或如SEQ ID NO:12-14中的任一个中所述的一个或多个重链CDR。

[0014] 在一些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:17-19中的任一个中所述的一个或多个轻链CDR,和/或如SEQ ID NO:20-22中的任一个中所述的一个或多个重链CDR。

[0015] 在一些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:7、15或23中的任一个中所述的可变轻链序列,和/或如SEQ ID NO:8、16或24中的任一个中所述的可变重链序列。

[0016] 在某些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7、15或23中的任一个中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的可变轻链序列,和/或与SEQ ID NO:8、16或24中的任一个中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的可变重链序列。

[0017] 在另外的实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:7中所述的可变轻链序列和/或如SEQ ID NO:8中所述的可变重链序列。

[0018] 在另外的实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:15中所述的可变轻链序列和/或如SEQ ID NO:16中所述的可变重链序列。

[0019] 在另外的实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:23中所述的可变轻链序列和/或如SEQ ID NO:24中所述的可变重链序列。

[0020] 在另外的实施例中,跨膜域来自选自由以下组成的组的多肽:T细胞受体的 α 或 β 链、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD154和PD1。

[0021] 在其它实施例中,跨膜域来自选自由以下组成的组的多肽:CD8 α 、CD28、CD4、CD45、PD1和CD152。

[0022] 在一些实施例中,跨膜域来自CD8 α 。

[0023] 在另外的实施例中,一个或多个共刺激信号传导域来自选自以下组成的组的共刺激分子: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。

[0024] 在某些实施例中,一个或多个共刺激信号传导域来自选自以下组成的组的共刺激分子:CD28、CD134和CD137。

[0025] 在一些实施例中,一个或多个共刺激信号传导域来自CD137。

[0026] 在特定实施例中,初级信号传导域是从选自以下组成的组的多肽分离:FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

[0027] 在特定实施例中,初级信号传导域是从CD3 ζ 分离。

[0028] 在其它实施例中,CAR进一步包含铰链区多肽。

[0029] 在某些实施例中,铰链区多肽包含CD8 α 之铰链区。

[0030] 在其它实施例中,CAR进一步包含间隔区。

[0031] 在另外的实施例中,CAR进一步包含信号肽。

[0032] 在特定实施例中,信号肽包含IgG1重链信号多肽、CD8 α 信号多肽或人类GM-CSF受体 α 信号多肽。

[0033] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:25至30中的任一个中所阐述的氨基酸序列。

[0034] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:25中所阐述的氨基酸序列。

[0035] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:26中所阐述的氨基酸序列。

[0036] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:27中所阐述的氨基酸序列。

[0037] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:28中所阐述的氨基酸序列。

[0038] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:29中所阐述的氨基酸序列。

[0039] 在特定实施例中,CAR包含SEQ ID NO:30中所阐述的氨基酸序列。

[0040] 在各种实施例中,提供包含本文所涵盖的CAR的氨基酸序列的多肽。

[0041] 在各种实施例中,提供编码本文中所涵盖的CAR的聚核苷酸。

[0042] 在特定实施例中,编码本文所涵盖的CAR的聚核苷酸包含SEQ ID NO:31-36中的任一个中所阐述的序列。

[0043] 在各种实施例中,提供包含编码本文所涵盖的CAR的聚核苷酸的载体。

[0044] 在某些实施例中,载体为表达载体。

[0045] 在特定实施例中,载体为游离型载体。

[0046] 在另外的实施例中,载体为病毒载体。

[0047] 在另外的实施例中,载体为逆转录病毒载体。

[0048] 在特定实施例中,载体为慢病毒载体。

[0049] 在另外的实施例中,慢病毒载体选自基本上由以下组成的组:人类免疫缺陷病毒1 (HIV-1);人类免疫缺陷病毒2 (HIV-2);维斯纳-梅迪病毒 (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);和猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。

[0050] 在特定实施例中,载体包含左 (5') 逆转录病毒LTR、Psi (Ψ) 包装信号、中央多嘌呤段/DNA瓣 (cPPT/FLAP)、逆转录病毒导出元件;可操作地连接于聚核苷酸的启动子;和右

(3') 逆转录病毒LTR。

[0051] 在另外的实施例中,载体进一步包含异源聚腺苷酸化序列。

[0052] 在特定实施例中,载体进一步包含乙型肝炎病毒转录后调节元件 (HPRE) 或土拨鼠转录后调节元件 (WPRE)。

[0053] 在其它实施例中,5'LTR的启动子被异源启动子置换。

[0054] 在另外的实施例中,异源启动子为巨细胞病毒 (CMV) 启动子、劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子或猿猴病毒40 (SV40) 启动子。

[0055] 在一些实施例中,5'LTR或3'LTR为慢病毒LTR。

[0056] 在某些实施例中,3'LTR包含一个或多个修饰。

[0057] 在某些实施例中,3'LTR包含一个或多个缺失。

[0058] 在特定实施例中,3'LTR为自我失活 (SIN) LTR。

[0059] 在特定实施例中,聚腺苷酸化序列为牛生长激素聚腺苷酸化或信号兔 β -球蛋白聚腺苷酸化序列。

[0060] 在其它实施例中,聚核苷酸包含最佳化Kozak序列。

[0061] 在其它实施例中,可操作地连接于聚核苷酸的启动子选自由以下组成的组:巨细胞病毒立即早期基因启动子 (CMV)、延伸因子1 α 启动子 (EF1- α)、磷酸甘油酸激酶-1启动子 (PGK)、泛素-C启动子 (UBQ-C)、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAG)、多瘤增强子/单纯疱疹胸苷激酶启动子 (MC1)、 β 肌动蛋白启动子 (β -ACT)、猿猴病毒40启动子 (SV40) 和骨髓增生肉瘤病毒增强子、阴性对照区经缺失、d1587rev引物结合位点经取代 (MND) 启动子。

[0062] 在各种实施例中,提供一种免疫效应细胞,其包含编码本文所涵盖的CAR的载体。

[0063] 在特定实施例中,免疫效应细胞选自由以下组成的组:T淋巴细胞、自然杀手 (NK) 细胞和NKT细胞。

[0064] 在一些实施例中,免疫效应细胞经本文所涵盖的载体转导,且在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激,由此相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的转导免疫效应细胞的增殖而维持转导免疫效应细胞的增殖。

[0065] 在特定实施例中,相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的免疫效应细胞,在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激的免疫效应细胞已增加以下各者的表达:i) 选自由CD62L、CD127、CD197和CD38组成的组的一个或多个标记,或ii) 所有的标记CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0066] 在特定实施例中,相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的免疫效应细胞,在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激的免疫效应细胞已增加以下各者的表达:i) 选自由CD62L、CD127、CD27和CD8组成的组的一个或多个标记,或ii) 所有的标记CD62L、CD127、CD27和CD8。

[0067] 在一个实施例中,PI3K抑制剂为ZSTK474。

[0068] 在各种实施例中,提供一种组合物,其包含本文所涵盖的免疫效应细胞和生理学上可接受的赋形剂。

[0069] 在各种实施例中,提供一种产生包含本文所涵盖的CAR的免疫效应细胞群体的方法,其包含向免疫效应细胞群体中引入编码本文所涵盖的CAR的载体。

[0070] 在特定实施例中,所述方法进一步包含通过使细胞与结合CD3的抗体和结合于CD28的抗体接触来刺激免疫效应细胞和诱导细胞增殖;由此产生扩充的免疫效应细胞群体。

[0071] 在某些实施例中,免疫效应细胞被刺激和诱导以在引入载体之前增殖。

[0072] 在其它实施例中,免疫效应细胞群体包含T细胞。

[0073] 在一些实施例中,免疫效应细胞群体包含NK细胞。

[0074] 在特定实施例中,细胞在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激,由此相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的免疫效应细胞的增殖而维持转导免疫效应细胞的增殖。

[0075] 在一些实施例中,相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的免疫效应细胞,在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激的免疫效应细胞已增加以下各者的表达:i)选自由CD62L、CD127、CD197和CD38组成的组的一个或多个标记,或ii)所有的标记CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0076] 在特定实施例中,相比于在不存在PI3K路径抑制剂的情况下被活化和刺激的免疫效应细胞,在PI3K路径抑制剂存在下被活化和刺激的免疫效应细胞已增加以下各者的表达:i)选自由CD62L、CD127、CD27和CD8组成的组的一个或多个标记,或ii)所有的标记CD62L、CD127、CD27和CD8。

[0077] 在一个实施例中,PI3K抑制剂为ZSTK474。

[0078] 在各种实施例中,提供增加受试者中表达CD79A的癌细胞的细胞毒性的方法,其包含向受试者给予如下量的本文所涵盖的组合物:相比于给予之前的表达CD79A的癌细胞的细胞毒性,足以增加表达CD79A的癌细胞的细胞毒性。

[0079] 在各种实施例中,提供减少受试者中表达CD79A的癌细胞的数目的方法,其包含向受试者给予如下量的本文所涵盖的组合物:相比于给予之前的表达CD79A的癌细胞的数目,足以减少表达CD79A的癌细胞的数目。

[0080] 在各种实施例中,提供一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包含向受试者给予治疗有效量的本文所涵盖的组合物。

[0081] 在某些实施例中,癌症为液体癌。

[0082] 在一些实施例中,癌症为恶性血液肿瘤。

[0083] 在另外的实施例中,癌症为肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾上腺癌、黑色素瘤、子宫癌、睾丸癌或膀胱癌、非霍奇金氏淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓白血病(AML)或慢性骨髓白血病(CML)。

[0084] 在特定实施例中,非霍奇金氏淋巴瘤为小淋巴细胞性淋巴瘤(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)。

[0085] 在某些实施例中,癌症为急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓白血病(AML)或慢性骨髓白血病(CML)。

[0086] 在特定实施例中,癌症为弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0087] 在特定实施例中,癌症为选自由以下组成的组的MM:明显多发性骨髓瘤、郁积性多

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。

[0088] 在各种实施例中,提供一种改善受试者的与表达CD79A的癌症相关的一种或多种症状的方法,其包含向受试者给予足以改善与表达CD79A的癌细胞相关的至少一种症状的量的本文所涵盖的组合物。

[0089] 在特定实施例中,所改善的一种或多种症状选自由以下组成的组:虚弱、疲劳、呼吸急促、容易瘀伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹胀或腹痛、骨头或关节疼痛、骨折、非计划体重减轻、食欲不振、盗汗、持续性轻度发热和排尿减少。

附图说明

[0090] 图1展示靶细胞上的CD79A表达、CAR表达和在表达CD79A的靶细胞存在下的抗CD79A CAR T细胞抗原依赖性活性。A) 此图展示CD79A在Pfeiffer和Daudi细胞上表达,但不在K562细胞上表达。B) 此图展示使用流式细胞测量术测量的T细胞上的代表性抗CD79A CAR表达。C) 此图展示在不存在靶细胞的情况下或与K562细胞(CD79A⁻)、Daudi细胞(CD79A⁺,高表达)或Pfeiffer细胞(CD79A⁺,低表达)一起共培养的抗CD79A CAR T细胞的IFN γ 分泌。

[0091] 图2展示CAR表达、靶细胞上的CD79A表达和在表达CD79A的靶细胞存在下的抗CD79A CAR T细胞抗原依赖性活性。A) 此图展示在Daudi、NU-DUL-1、SU-DHL-2和Pfeiffer细胞上的CD79A受体密度。B) 此图展示使用流式细胞测量术测量的T细胞上的代表性抗CD79A CAR表达。C) 此图展示在不存在靶细胞的情况下或与Huh7细胞(CD79A⁻)、Huh7.CD79a细胞(CD79A⁺)、Daudi细胞(CD79A⁺)、NU-DUL-1(CD79A⁺)、SU-DHL-2(CD79A⁺)或Pfeiffer细胞(CD79A⁺)一起共培养的抗CD79A CAR T细胞的IFN γ 分泌。

[0092] 序列标识符的简要说明

[0093] SEQ ID NO:1-24阐述本文所涵盖的CAR抗CD79A的例示性轻链CDR序列、重链CDR序列、可变域轻链和可变域重链的氨基酸序列。

[0094] SEQ ID NO:25-30阐述例示性抗CD79A CAR的氨基酸序列。

[0095] SEQ ID NO:31-36阐述例示性抗CD79A CAR的核酸序列。

[0096] SEQ ID NO:37-38阐述例示性人类CD79A多肽的氨基酸序列。

[0097] SEQ ID NO:39-49阐述各种连接子的氨基酸序列。

[0098] SEQ ID NO:50-74阐述蛋白酶裂解位点和自裂解多肽裂解位点的氨基酸序列。

具体实施方式

[0099] A. 概述

[0100] 本发明大体上涉及用于预防或治疗表达CD79A的癌症或预防、治疗或改善至少一种与表达CD79A的癌症相关的症状的改进的组合物和方法。在特定实施例中,本发明涉及表达CD79A的癌症的改进的过继性细胞疗法,所述细胞疗法使用经遗传修饰的免疫效应细胞。遗传方法提供增强免疫识别和消除癌细胞的潜在手段。一种有前景的策略是对免疫效应细胞进行遗传工程改造以表达将细胞毒性重定向至癌细胞的嵌合抗原受体(CAR)。

[0101] 本文所涵盖的过继性细胞疗法的改进的组合物和方法提供经遗传修饰的免疫效应细胞,其可易于扩增、在体内展现长期存留且展示针对表达CD79A的细胞的抗原依赖性细

胞毒性,CD79A也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链、膜结合免疫球蛋白相关蛋白(MB1、MB-1)、表面IgM相关蛋白和Ig- α (IGA)。编码CD79a的聚核苷酸序列的说明性实例包括但不限于:NM_001783.3、NM_021601.3、ENST00000221972(uc002orv.3)、ENST00000597454(uc060zdz.1)、ENST00000444740(uc002oru.4)、Hs.631567和AK223371。编码CD79a的多肽序列的说明性实例包括但不限于:P11912-1、P11912-2、

ENSP00000400605ENSP00000468922、ENSP00000221972、NP_001774.1和NP_067612.1。

[0102] CD79由两种蛋白质,即CD79A和CD79B组成。CD79A位于染色体19q13.2处且编码大约47kDa的226个氨基酸的糖蛋白。精确分子量取决于糖基化程度。CD79B位于染色体17q23处且编码大约37kDa的229个氨基酸的糖蛋白。CD79A和CD79B共用外显子-内含子结构,两者均含有单一IgSF Ig域(对于CD79A为111个残基的C型且对于CD79B为129个残基的V型)。各自还含有高度保守的跨膜域和61个(CD79A)或48个(CD79B)氨基酸的胞质尾区,所述胞质尾区也展现显著的氨基酸进化保守。CD79A和CD79B由最早期定型B细胞祖细胞表达。也在不存在 μ 重链的情况下在早期B细胞祖细胞的表面上观察到CD79A/B杂二聚体,尽管不需要任一蛋白质以使祖细胞定型至B细胞谱系。随后在发育中,CD79A和CD79B与B细胞表面上的所有同型的Ig一起共表达为成熟BCR复合物。CD79蛋白对B谱系具有特异性且在整个B淋巴细胞生成中表达。CD79A和CD79B可用作鉴别B细胞赘瘤,包括DLBCL、大部分前体B细胞类型的急性白血病、B细胞系、B细胞淋巴瘤和一些骨髓瘤的标记。

[0103] 在各种实施例中,包含抗CD79A抗体序列的CAR为高度有效的;经历稳定体内扩增;且识别表达CD79A的癌细胞且展示针对表达CD79A的癌细胞细胞毒性活性。

[0104] 在一个实施例中,提供一种包含抗CD79A抗体或抗原结合片段、跨膜域和一个或多个胞内信号转导域的CAR。

[0105] 在一个实施例中,免疫效应细胞经遗传修饰以表达CAR。表达CAR的T细胞在本文中称为CAR T细胞或CAR修饰的T细胞。

[0106] 在各种实施例中,向具有表达CD79A的癌细胞,包括但不限于液体肿瘤和恶性血液肿瘤的受试者给予经遗传修饰的免疫效应细胞。在一个实施例中,向患有DLBCL的受试者给予抗CD79A CAR T细胞。

[0107] 用于重组(即,工程改造的)DNA、肽和寡核苷酸合成的技术、免疫分析、组织培养、转化(例如电穿孔、脂质体转染)、酶促反应、纯化以及相关技术和程序一般可以如本说明书通篇引用和论述的微生物学、分子生物学、生物化学、分子遗传学、细胞生物学、病毒学及免疫学中的各种通用且更特定的参考文献中所描述来执行。参见例如Sambrook等人,《分子克隆:实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;《现代分子生物学实验技术(Current Protocols in Molecular Biology)》(John Wiley and Sons,2008年7月更新);《分子生物学简明方案:现代分子生物学实验技术方法概略(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)》,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,《DNA克隆实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》,第I和II卷(Press,Oxford Univ.Press USA,1985);《免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology)》(由以下编辑:John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober

2001 John Wiley & Sons, 纽约州纽约);《实时PCR:当前技术和应用(Real-Time PCR:Current Technology and Applications)》,由Julie Logan, Kirstin Edwards及Nick Saunders编辑,2009, Caister Academic Press, 英国诺福克郡(Norfolk, UK); Anand,《复杂基因组分析技术(Techniques for the Analysis of Complex Genomes)》, (Academic Press, 纽约, 1992); Guthrie和Fink,《酵母遗传学和分子生物学指南(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology)》(Academic Press, 纽约, 1991);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编, 1984);《核酸杂交(Nucleic Acid The Hybridization)》(B.Hames和S.Higgins编, 1985);《转录与翻译(Transcription and Translation)》(B.Hames和S.Higgins编, 1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编, 1986); Perbal,《分子克隆实践指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984);《新一代基因组测序(Next-Generation Genome Sequencing)》(Janitz, 2008 Wiley-VCH);《PCR方案(PCR Protocols)》(分子生物学方法)(Park编, 第3版, 2010 Humana Press);《固定化细胞和酶(Immobilized Cells And Enzymes)》(IRL Press, 1986); 论文《酶学方法(Methods In Enzymology)》(Academic Press, Inc., 纽约);《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, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow和Lane,《抗体(Antibodies)》(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约冷泉港, 1998);《(细胞和分子生物学的免疫化学方法)》(Mayer和Walker编, Academic Press, 伦敦(London), 1987);《实验免疫学手册(Handbook Of Experimental Immunology)》, 第I-IV卷(D.M.Weir和CC Blackwell编, 1986); Roitt,《免疫学基础(Essential Immunology)》, 第6版, (Blackwell Scientific Publications, 牛津(Oxford), 1988);《免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology)》(Q.E.Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Margulies, E.M.Shevach及W.Strober编, 1991);《免疫学年评(Annual Review of Immunology)》;以及如《免疫学进展(Advances in Immunology)》之类杂志中的专论。

[0108] B. 定义

[0109] 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。

[0110] 除非另外规定, 否则本文中所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中所描述的方法和材料类似或等效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。为了本公开的目的, 下文定义以下术语。贯穿本公开阐述额外定义。

[0111] 本文中使用的冠词“一(a/an)”和“所述”是指所述冠词的语法对象中的一个或超过一个(即至少一个或一个或多个)。作为实例, “一个元件”意思指一个元件或一个或多个元件。

[0112] 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。

[0113] 术语“和/或”应理解为意指替代方案中的一个或两个。

[0114] 如本文所用, 术语“约”或“大约”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度与参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长

度相比,变化多达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在一个实施例中,术语“约”或“大约”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的范围,所述范围为参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%。

[0115] 在一个实施例中,范围,例如1至5、约1至5或约1至约5是指所述范围所涵盖的每个数值。举例来说,在一个非限制性和仅说明性实施例中,范围“1至5”与表述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等效。

[0116] 如本文中所用,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。在一个实施例中,“基本上相同”是指某个数量、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、重量或长度产生的作用大致相同。

[0117] 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”打算包括并且限于短语“由……组成”之后的任何事物。因此,短语“由……组成”指示所列要素为需要或必需的,并且不能存在其它要素。“基本上由……组成”打算包括短语后所列的任何要素,并且限于不干扰或影响本公开中指定的所列要素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。

[0118] 本说明书通篇提到的“一个实施例”、“一实施例”、“一个特定实施例”、“一个相关实施例”、“某一实施例”、“一个另外的实施例”或“另一实施例”或其组合意味着,结合所述实施例描述的特定特征、结构或特性被包括在至少一个实施例中。因此,贯穿本说明书中的各处出现的前述短语不一定全部指代同一实施例。此外,在一个或一个以上实施例中,特定特征、结构或特性可以任何合适方式组合。还应理解,在一个实施例中对一个特征的正面叙述用作在一个特定实施例中排除所述特征的基础。

[0119] C. 嵌合抗原受体

[0120] 在各种实施例中,提供将免疫效应细胞的细胞毒性重定向至表达CD79A的癌细胞的经遗传工程改造的受体。这些经遗传工程改造的受体在本文中称为嵌合抗原受体(CAR)。CAR为如下的分子:将针对所需抗原(例如CD79A)与活化T细胞受体的细胞内域的基于抗体的特异性组合以产生展现特异性抗CD79A细胞免疫活性的嵌合蛋白。如本文中所使用,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。

[0121] 在特定实施例中,CAR包含结合至CD79A的胞外域(也称为结合域或抗原特异性结合域)、跨膜域和胞内信号传导域。CAR的抗CD79A抗原结合域与CD79A在靶细胞的表面上接合使得CAR聚集,且将活化刺激物递送至含有CAR的细胞。CAR的主要特征是其能够再引导免疫效应细胞特异性,由此触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或能够以与主要组织相容性

(MHC) 无关的方式介导目标抗原表达细胞的细胞死亡的分子的产生, 利用单克隆抗体、可溶性配位体或细胞特异性共受体的细胞特异性靶向能力。

[0122] 在各种实施例中, CAR含有包含CD79A特异性结合域的胞外结合域; 跨膜域; 和一个或多个胞内共刺激信号传导域和/或初级信号传导域。

[0123] 在特定实施例中, CAR含有包含抗CD79A抗体或其抗原结合片段的胞外结合域; 一个或多个铰链域或间隔子域; 跨膜域包括; 和一个或多个胞内共刺激信号传导域和/或初级信号传导域。

[0124] 1. 结合域

[0125] 在特定实施例中, CAR包含胞外结合域, 其包含特异性结合于在靶细胞, 例如癌细胞上表达的人类CD79A多肽的抗CD79A抗体或其抗原结合片段。如本文所用, 术语“结合域”、“胞外域”、“胞外结合域”、“抗原特异性结合域”以及“胞外抗原特异性结合域”可互换使用, 且提供能够特异性结合至所关注的靶抗原 (例如CD79A) 的CAR。结合域可来源于天然、合成、半合成或重组来源。

[0126] 如本文所用, 术语“特异性结合亲和力”或“特异性结合 (specifically binds)”或“特异性结合 (specifically bound)”或“特异性结合 (specific binding)”或“特异性靶向”描述抗CD79A抗体或其抗原结合片段 (或包含其的CAR) 以比背景结合更大的结合亲和力结合至CD79A。若结合域 (或包含结合域的CAR或含有结合域的融合蛋白) 以例如大于或等于约 10^5M^{-1} 的亲和力或 K_a (即, 以 $1/\text{M}$ 为单位的特定结合相互作用的平衡缔合常数) 结合至CD79A或与CD79A缔合, 则其“特异性结合”至CD79A多肽。在某些实施例中, 结合域 (或其融合蛋白) 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 结合于靶。 “高亲和力”结合域 (或其单链融合蛋白) 是指具有至少 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 K_a 的那些结合域。

[0127] 或者, 亲和力可以定义为特定结合相互作用的平衡解离常数 (K_d) 且以M为单位 (例如 10^{-5}M 至 10^{-13}M , 或更低)。根据本发明的结合域多肽和CAR蛋白的亲和力可易于使用常规技术测定, 例如通过竞争性酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 或通过结合缔合, 或使用标记配体的位移分析, 或使用表面等离子共振装置, 如可获自Biacore, Inc., Piscataway, NJ的Biacore T100, 或光学生物传感器技术, 如可分别获自Corning和Perkin Elmer的EPIC系统或EnSpire (另外参见例如Scatchard等人 (1949) 《纽约科学院年报 (Ann. N. Y. Acad. Sci.)》51:660; 和美国专利第5,283,173号; 第5,468,614号或等效物)。

[0128] 在一个实施例中, 特异性结合的亲和力比背景结合高约2倍、比背景结合高约5倍、比背景结合高约10倍、比背景结合高约20倍、比背景结合高约50倍、比背景结合高约100倍、或比背景结合高约1000倍或更高。

[0129] 在特定实施例中, CAR的胞外结合域包含抗体或其抗原结合片段。“抗体”是指结合剂, 其为多肽, 至少包含特异性地识别和结合抗原的表位的轻链或重链免疫球蛋白可变区, 如肽、脂质、多糖或含有抗原决定簇的核酸, 如由免疫细胞识别的那些。“经分离抗体或其抗原结合片段”是已从其天然环境的组分鉴别和分离和/或回收。

[0130] “抗原 (Ag)”是指可刺激动物中抗体产生或T细胞应答的化合物、组合物或物质, 其包括注入或吸入动物中的组合物 (如包括癌症特异性蛋白质的组合物)。抗原与特异性体液

或细胞免疫产物反应,所述产物包括由异源抗原(如所公开的抗原)诱导的产物。在特定实施例中,靶抗原为CD79A多肽的表位。

[0131] “表位”或“抗原决定簇”是指与结合剂结合的抗原的区域。表位可以由连续氨基酸形成,或者由蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常保留,而由三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常丢失。表位通常以独特空间构象包括至少3个,且更通常至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。

[0132] 抗体包括其抗原结合片段,如Camel Ig、Ig NAR、Fab片段、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、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”)和单域抗体(sdAb,纳米抗体)以及负责抗原结合的全长抗体的部分。术语还包括遗传工程改造形式,如嵌合抗体(例如人类化鼠抗体)、异结合抗体(例如双特异性抗体)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(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,《免疫学(Immunology)》,第3版,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0133] 如熟练人员将理解和如本文中其它地方所描述,完全抗体包含两个重链和两个轻链。每个重链由可变区和第一、第二和第三恒定区组成,而每个轻链由可变区和恒定区组成。哺乳动物重链分类为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。哺乳动物轻链被分类为 λ 或 κ 。包含 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的干由结合在一起的两个重链的第二和第三恒定区(对于IgE和IgM,第四恒定区)组成且二硫键(链间)形成于铰链中。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联(呈一排)Ig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域构成的恒定区。第二和第三恒定区分别称为“CH2域”和“CH3域”。Y的每个臂包括结合于单个轻链的可变区和恒定区的单个重链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。

[0134] 轻链和重链可变区含有间杂有三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)的“构架”区。CDR可通过常规方法定义或鉴别,如通过根据Kabat等人(Wu,TT和Kabat,E.A.,《实验医学杂志(J Exp Med.)》132(2):211-50,(1970);Borden,P.和Kabat E.A.,PNAS,84:2440-2443(1987)的序列;(参见Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国卫生与公众服务部,1991,其以引用的方式并入本文中),或通过根据Chothia等人(Chothia,C.和Lesk,A.M.,《分子生物学杂志(J Mol.Biol.)》,196(4):901-917(1987),Chothia,C.等人,《自然(Nature)》,342:877-883(1989))的结构。

[0135] 用于预测轻链CDR的规则说明性实例包括:CDR-L1约在残基24处开始,前面是Cys,为约10-17个残基,且之后为Trp(通常为Trp-Tyr-Gln,以及Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、Trp-Tyr-Leu);CDR-L2在CDR-L1末端之后约16个残基处开始,一般前面是Ile-Tyr,以及Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Phe,且为7个残基;且CDR-L3在CDR-L2末端之后约33个残基处开始,前面是Cys,为7-11个残基,且之后为Phe-Gly-XXX-Gly(SEQ ID NO:76)(XXX为任何氨基酸)。

[0136] 用于预测重链CDR的规则说明性实例包括:CDR-H1约在残基26处开始,前面是Cys-XXX-XXX-XXX(SEQ ID NO:77),为10-12个残基且之后为Trp(通常为Trp-Val,以及Trp-

Ile、Trp-Ala) ; CDR-H2在CDR-H1末端之后约15个残基处开始,一般前面是Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO:78),或多种变异体,为16-19个残基,且之后为Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala;且CDR-H3在CDR-H2末端之后约33个残基处开始,前面是Cys-XXX-XXX (通常为Cys-Ala-Arg),为3至25个残基,且之后为Trp-Gly-XXX-Gly (SEQ ID NO:79)。

[0137] 在一个实施例中,轻链CDR和重链CDR根据Kabat方法测定。

[0138] 在一个实施例中,轻链CDR以及重链CDR2和CDR3是根据卡巴特方法测定,且重链CDR1是根据AbM方法测定,所述AbM方法包含在Kabat和Clothia方法之间,参见例如Whitelegg N&Rees AR,《蛋白质工程 (Protein Eng.)》2000年12月;13(12):819-24和《分子生物学方法 (Methods Mol Biol.)》2004;248:51-91。用于预测CDR的程序公开可用,例如AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/)。

[0139] 不同轻链或重链的构架区的序列在物种(如人类)内具有相对保存性。抗体的构架区(其是成分轻链和重链的组合构架区)用于在三维空间中定位和对准CDR。CDR主要负责与抗原的表位结合。每个链的CDR通常称为CDR1、CDR2和CDR3,从N端开始依序编号,并且也通常通过具体CDR所位于的链鉴别。因此,位于抗体的重链的可变域中的CDR被称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,而位于抗体的轻链的可变域的中CDR被称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。具有不同特异性(即针对不同抗原的不同组合位点)的抗体具有不同CDR。尽管抗体与抗体之间的CDR不同,但CDR内仅有限数目的氨基酸位置直接涉及抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定基(SDR)。适合于构建特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR的轻链CDR的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO:1-3、9-11和17-19中所阐述的CDR序列。适合于构建特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR的重链CDR的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO:4-6、12-14和20-22中所阐述的CDR序列。

[0140] 提及的“V_L”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包括如本文所预期的抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或其它抗体片段的可变区。适合于构建特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR的轻链可变区的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO:7、15和23中所阐述的轻链可变区序列。

[0141] 提及的“V_H”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包括如本文所预期的抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或其它抗体片段的可变区。适合于构建特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR的重链可变区的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO:8、16和24中所阐述的重链可变区序列。

[0142] “单克隆抗体”是由B淋巴细胞的单一克隆或由其中已转染单一抗体的轻链和重链基因的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过所属领域的技术人员已知的方法制得,例如通过由骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合体制备形成抗体的杂交细胞。单克隆抗体包括人类化单克隆抗体。

[0143] “嵌合抗体”具有来自一个物种(如人类)的构架残基和来自另一物种(如小鼠)的CDR(一般赋予抗原结合)。在特定的优选实施例中,CAR包含为嵌合抗体或其抗原结合片段的抗原特异性结合域。

[0144] 在优选实施例中,抗体为特异性结合于人类CD79A多肽的人类抗体(例如人类单克隆抗体)或其片段。人类抗体可通过组合选自具有如上文所述的已知人类恒定域序列的人

源噬菌体呈现库的Fv克隆可变域序列构建。或者,人类单克隆抗体可通过融合瘤方法制备。用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人类杂交骨髓瘤细胞系已例如通过Kozbor《免疫学杂志(J.Immunol.)》,133:3001(1984);Brodeur等人,《单克隆抗体产生技术和应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)》,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》,147:86(1991)描述。另外,可使用转基因动物(例如小鼠)在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人类抗体的完整谱。参见例如Jakobovits等人,《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》,90:2551(1993);Jakobovits等人,《自然(Nature)》,362:255(1993);Bruggermann等人,《免疫学年会(Year in Immunol.)》,7:33(1993)。还可以使用基因混编从非人类,例如啮齿动物抗体衍生人类抗体,其中人类抗体具有与起始非人类抗体相似的亲和力和特异性。(参见1993年4月1日公布的PCT WO 93/06213)。不同于通过CDR接枝进行的非人类抗体的传统人类化,此技术提供完全人类抗体,其不具有非人类来源的FR或CDR残基。

[0145] 在一个实施例中,CAR包含“人类化”抗体。“人类化”抗体是包括人类构架区和一个或多个来自非人类(例如小鼠、大鼠或合成)免疫球蛋白的CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人类免疫球蛋白称为“供体”,并且提供构架的人类免疫球蛋白称为“受体”。在一个实施例中,所有CDR都来自人类化免疫球蛋白中的供体免疫球蛋白。恒定区未必存在,但如果其存在,则其必须与人类免疫球蛋白恒定区大体上一致,即至少约85至90%,如约95%或更加一致。因此,人类化免疫球蛋白的所有部分(可能排除CDR)与天然人类免疫球蛋白序列的相应部分大体上一致。人类化或其它单克隆抗体可以具有其它保守性氨基酸取代,其对抗原结合或其它免疫球蛋白功能基本无影响。人类化抗体可借助于基因工程改造构建(参见例如美国专利第5,585,089号)。

[0146] 在特定实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包括但不限于Camel Ig(骆驼抗体(VHH))、Ig NAR、Fab片段、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抗体(“scFv”)、双scFv、(scFv)₂、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”)和单域抗体(sdAb,纳米抗体)。

[0147] 如本文所用的“Camel Ig”或“骆驼VHH”是指重链抗体的已知最小抗原结合单位(Koch-Nolte等人,《美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J.)》,21:3490-3498(2007))。“重链抗体”或“骆驼抗体”是指含有两个VH域且不含轻链的抗体(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)。

[0148] “免疫球蛋白新抗原受体”的“IgNAR”是指来自鲨鱼免疫系统全部的抗体的类别,所述抗体由一个可变新抗原受体(VNAR)域和五个恒定新抗原受体(CNAR)域的均二聚体组成。IgNAR表示一些基于免疫球蛋白的已知最小蛋白质骨架且高度稳定并具有有效的结合特征。固有稳定性可归因于(i)底层Ig支架,其相比于鼠类抗体中发现的常规抗体VH和VL域呈现相当大数目的暴露于带电和亲水性表面的残基;和(ii)互补决定区(CDR)环中的稳定化结构特征,包括环间二硫桥键,和环内氢键的模式。

[0149] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有单一抗原结合位点;和剩余的“Fc”片段,其名字反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,所述片段具有两个抗原组合位点且仍然能够交联抗原。

[0150] “Fv”为含有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物种由一个重链可变域与一个轻链可变域经由非共价紧密缔合而成的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物种中,一个重链可变域与一个轻链可变域可以通过柔性肽连接子共价连接,因此轻链和重链可以类似于双链Fv物种的“二聚”结构缔合。在这一配置中,每个可变域的三个高变区(HVR)相互作用以界定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。六个HVR共同地对抗体赋予抗原结合特异性。然而,尽管单个可变域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR的Fv的一半)能够识别并结合抗原,但亲和力低于整个结合位点。

[0151] Fab片段含有重链和轻链可变域且还含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段不同之处在于,重链CH1域的羧基末端增添了几个残基,包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH为本文中用于Fab'的名称,其中恒定域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初产生为在其之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对。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,其各自结合不同抗原。三特异性Fab三聚体(Fab₃)具有三个Fab'片段,其各自结合不同抗原。

[0152] 术语“双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述片段包含连接到同一多肽链(VH-VL)中的轻链可变域(VL)的重链可变域(VH)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个域之间配对的连接子,域被迫与另一条链的互补域配对并且产生两个抗原结合位点。双功能抗体可为二价或双特异性的。双功能抗体更充分地描述于例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,《自然医学(Nat.Med.)》9:129-134(2003);和Hollinger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-6448(1993)中。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。

[0153] “单域抗体”或“sdAb”或“纳米抗体”是指由抗体重链的可变区(VH域)或抗体轻链的可变区(VL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)。

[0154] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL域,其中这些域存在于单多肽链中且以任一取向(例如VL-VH或VH-VL)存在。一般来说,scFv多肽还包含VH和VL域之间的多肽连接子,使scFv能够形成抗原结合的所需结构。为了审查scFv,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,(Springer-Verlag,New York,1994),第269-315页。

[0155] 在优选实施例中,抗CD79A抗原结合片段为scFv。在特定实施例中,scFv为鼠类、人类或人类化scFv。单链抗体可从对所需靶标具有特异性的杂交瘤的V区基因克隆。这类杂交瘤的产生已变得常规。可用于克隆可变区重链(V_H)和可变区轻链(V_L)的技术已描述于例如Orlandi等人,《美国国家科学院院刊》,1989;86:3833-3837中。

[0156] 在各种实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,其包含SEQ ID NO:1-3、9-11或17-19中所阐述的CDRL1-CDRL3序列,和/或可变重链序列,其包含SEQ ID NO:4-6、12-14中所阐述的CDRH1-CDRH3序列。在一些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:7、15或23中的任一个中所述的可变轻链序列,和/或如SEQ ID NO:8、16或24中的任一个中所述的可变重链序列。

[0157] 在特定实施例中,抗原特异性结合域为结合人类CD79A多肽的scFv。

[0158] 例示性CD79A特异性结合域为包含至少一个人类构架区的对CD79A具有特异性的免疫球蛋白可变区。“人类构架区”是指人类免疫球蛋白可变区的野生型(即,天然存在的)构架区;人类免疫球蛋白可变区的改变的构架区,其中所述区中的小于约50%(例如优选小于约45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)的氨基酸经缺失或取代(例如经对应位置处的非人类免疫球蛋白构架区的一个或多个氨基酸残基);或非人类免疫球蛋白可变区的改变的构架区,其中所述区中的小于约50%(例如小于45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%或5%)的氨基酸经缺失或取代(例如在暴露残基的位置处和/或经对应位置处的人类免疫球蛋白构架区的一个或多个氨基酸残基),以使得在一个方面中,免疫原性降低。

[0159] 在某些实施例中,人类构架区为人类免疫球蛋白可变区的野生型构架区。在某些其它实施例中,人类构架区为在一、二、三、四、五、六、七、八、九、十个或更多个位置处具有氨基酸缺失或取代的人类免疫球蛋白可变区的改变的构架区。在其它实施例中,人类构架区为在一、二、三、四、五、六、七、八、九、十个或更多个位置处具有氨基酸缺失或取代的非人类免疫球蛋白可变区的改变的构架区。

[0160] 在特定实施例中,CD79A特异性结合域包含至少一、二、三、四、五、六、七或八个选自以下的人类构架区(FR):人类轻链FR1、人类重链FR1、人类轻链FR2、人类重链FR2、人类轻链FR3、人类重链FR3、人类轻链FR4和人类重链FR4。

[0161] 可存在于CD79A特异性结合域中的人类FR还包括本文提供的例示性FR的变异体,其中例示性FR的一、二、三、四、五、六、七、八、九、十个或更多个氨基酸已被取代或缺失。

[0162] 在某些实施例中,CD79A特异性结合域包含(a)人类化轻链可变区,其包含人类轻链FR1、人类轻链FR2、人类轻链FR3和人类轻链FR4,和(b)人类化重链可变区,其包含人类重链FR1、人类重链FR2、人类重链FR3和人类重链FR4。

[0163] 本文提供的CD79A特异性结合域还包含一、二、三、四、五或六个CDR。此类CDR可为选自以下的非人类CDR或改变的非人类CDR:轻链的CDRL1、CDRL2和CDRL3,以及重链的CDRH1、CDRH2和CDRH3。在某些实施例中,CD79A特异性结合域包含(a)轻链可变区,其包含轻链CDRL1、轻链CDRL2和轻链CDRL3,和(b)重链可变区,其包含重链CDRH1、重链CDRH2和重链CDRH3。

[0164] 在一些实施例中,抗CD79A抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,其包含与SEQ ID NO:1-3、9-11或17-19中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的CDRL1-CDRL3序列,和/或可变重链序列,其包含与SEQ ID NO:4-6、12-14或20-22中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的CDRH1-CDRH3序列。

[0165] 在一个实施例中,CD79A特异性结合域包含SEQ ID NO:1-3、9-11或17-19中所阐述的轻链CDR序列。在特定实施例中,CD79A特异性结合域包含与SEQ ID NO:1-3、9-11或17-19中所阐述的轻链CDR序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的轻链CDR序列。

[0166] 在一个实施例中,CD79A特异性结合域包含SEQ ID NO:4-6、12-14或20-22中所阐述的重链CDR序列。在特定实施例中,CD79A特异性结合域包含与SEQ ID NO:4-6、12-14或20-22中所阐述的重链CDR序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的重链CDR序列。

[0167] 在一些实施例中,抗独特型抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:7、15或23中的任一个中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的可变轻链序列,和/或与SEQ ID NO:8、16或24中的任一个中所阐述的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸一致性的可变重链序列。

[0168] 2. 连接子

[0169] 在某些实施例中,抗CD79A CAR包含不同域之间的连接子残基,例如为了分子的适当间距和构象而添加。在特定实施例中,连接子为可变区连接序列。“可变区连接序列”为氨基酸序列,其连接 V_H 和 V_L 域且提供与两个子结合域的相互作用相容的间隔功能,使得所得多肽保留对与包含相同轻链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包含一个、两个、三个、四个或五个或更多个连接子。在特定实施例中,连接子的长度是约1至约25个氨基酸、约5至约20个氨基酸,或约10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,连接子的长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个氨基酸。

[0170] 连接子的说明性实例包括甘氨酸聚合物(G_n);甘氨酸-丝氨酸聚合物($G_{1-5}S_{1-5}$) $_n$,其中 n 是至少一、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;和所属领域中已知的其它柔性连接子。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物为相对非结构化的,且因此可能充当融合蛋白,诸如本文所述之CAR之域之间的中性系栓物。甘氨酸进入甚至比丙氨酸显著更多的 Φ - Ψ 空间,且比具有较长侧链的残基受到的限制少得多(参见Scheraga,《计算化学评论(Rev.Computational Chem.)》11173-142(1992))。所属领域的一般技术人员应认识到,特定实施例中的CAR的设计可包括完全或部分柔性的连接子,使得连接子可包括柔性连接子以及一个或多个赋予柔性较低结构的部分,以得到所需CAR结构。

[0171] 其它例示性连接子包括但不限于以下氨基酸序列:DGGGS(SEQ ID NO:39);TGEKP(SEQ ID NO:40)(参见例如Liu等人,《美国国家科学院院刊》5525-5530(1997));GGRR(SEQ ID NO:41)(Pomerantz等人1995,前述);(GGGS) $_n$,其中 $n=1,2,3,4$ 或5(SEQ ID NO:42)(Kim等人,《美国国家科学院院刊》93,1156-1160(1996.);EGKSSGSGSESKVD(SEQ ID NO:43)(Chaudhary等人,1990,《美国国家科学院院刊》87:1066-1070);KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:44)(Bird等人,1988,《科学(Science)》242:423-426);GGRRGGGS(SEQ ID NO:45);LRQRDGERP(SEQ ID NO:46);LRQKDGGGSERP(SEQ ID NO:47);LRQKD(GGGS) $_2$ ERP(SEQ ID NO:48)。或者,柔性连接子可以使用能够模型化DNA-结合位点和肽本身的计算机程序(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))或通过噬菌体呈现方法合理地设计。在一个实施例中,连接子包含以下氨基酸序列:GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:49)(Cooper等人,《血液(Blood)》,101(4):1637-1644(2003))。

[0172] 3. 间隔子域

[0173] 在特定实施例中,抗CD79A CAR的结合域之后是在一个或多个“间隔子域”,间隔子域是指移动抗原结合域远离效应细胞表面以便能实现适当细胞/细胞接触、抗原结合和活化(Patel等人,《基因疗法(Gene Therapy)》,1999;6:412-419)。铰链域可以来源于天然、合

成、半合成或重组来源。在某些实施例中,间隔子域为免疫球蛋白的一部分,所述免疫球蛋白包括但不限于一个或多个重链恒定区,例如CH2和CH3。间隔子域可包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0174] 在一个实施例中,间隔子域包含IgG1、IgG4或IgD的CH2和CH3。

[0175] 4. 铰链域

[0176] 抗CD79A CAR的结合域之后一般是一个或多个“铰链域”,其在使抗原结合域远离效应细胞表面定位以便能实现适当细胞/细胞接触、抗原结合和活化中起作用。抗CD79A CAR通常在结合域与跨膜域(TM)之间包含一个或多个铰链域。铰链域可以来源于天然、合成、半合成或重组来源。铰链域可以包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0177] “改变的铰链区”是指(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)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)的长度为至少10个氨基酸(例如至少12、13、14或15个氨基酸)的天然存在的铰链区的一部分;或(c)包含核心铰链区的天然存在的铰链区的一部分(其长度可为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个,或至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸)。在某些实施例中,天然存在的免疫球蛋白铰链区中的一个或多个半胱氨酸残基可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。改变的免疫球蛋白铰链区或者或另外可以具有被另一氨基酸残基(例如丝氨酸残基)取代的野生型免疫球蛋白铰链区的脯氨酸残基。

[0178] 适用于本文所描述的CAR中的例示性铰链域包括来源于1型膜蛋白如CD8 α 和CD4的细胞外区域的铰链区,其可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以改变。在一个实施例中,铰链为PD-1铰链或CD152铰链。在另一实施例中,铰链域包含CD8 α 铰链区。

[0179] 5. 跨膜(TM)域

[0180] “跨膜域”是抗CD79A CAR中融合胞外结合部分和胞内信号传导域且将CAR锚定至免疫效应细胞的质膜的部分。TM域可以来源于天然、合成、半合成或重组来源。TM域可以来源于(即,至少包含T细胞受体的 α 或 β 链的跨膜区、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD154和PD1。在特定实施例中,TM域为合成的且主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。

[0181] 在一个实施例中,CAR包含来源于PD1、CD152、CD28或CD8 α 的TM域。在另一实施例中,CAR包含来源于PD1、CD152、CD28或CD8 α 的TM域,和长度优选在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸之间的短寡肽或多肽连接子,其连接CAR的TM域和胞内信号传导域。基于甘氨酸-丝氨酸的连接子提供尤其适合的连接子。

[0182] 6. 胞内信号传导域

[0183] 在特定实施例中,抗CD79A CAR包含一个或多个胞内信号转导域。“胞内信号传导域”是指CAR中参与将有效抗CD79A CAR结合至人类CD79A多肽的信息转导至免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能的部分,所述效应细胞功能例如为活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括细胞毒性因子释放至结合CAR的靶细胞中,或由抗原结合至胞外CAR域引发的其它细胞反应。

[0184] 术语“效应功能”是指免疫效应细胞的专用功能。T细胞的效应功能例如可以是细

胞溶解活性或帮助或活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“胞内信号传导域”是指转导效应功能信号且导引细胞执行专用功能的蛋白质的部分。尽管通常可采用整个胞内信号传导域,但在许多情况下不必使用整个域。就使用胞内信号传导域的截短部分来说,可使用这类截短部分代替整个域,只要其转导效应功能信号即可。术语细胞内信号传导域意图包括足以转导效应功能信号的细胞内信号传导域的任何截短部分。

[0185] 众所周知,仅经由TCR产生的信号不足以完全活化T细胞且还需要二次或共刺激信号。因此,可将T细胞活化称为由两个不同类别的胞内信号转导域介导:经由TCR(例如TCR/CD3复合物)起始抗原依赖性初级活化的初级信号传导域和以不依赖抗原的方式起作用以提供二级或共刺激信号的共刺激信号传导域。在优选实施例中,CAR包含胞内信号传导域,所述胞内信号传导域包含一个或多个“共刺激信号传导域”和一个“初级信号传导域”。

[0186] 初级信号传导域以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式起作用的初级信号传导域可以含有信号传导基元,所述信号传导基元称为基于免疫受体酪氨酸的活化基元或ITAM。

[0187] 适用于特定实施例的含有ITAM的初级信号传导域的说明性实例包括来源于FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在特定的优选实施例中,抗CD79A CAR包含CD3 ζ 初级信号传导域和一个或多个共刺激信号传导域。胞内初级信号传导域和共刺激信号传导域可按任何次序串列连接至跨膜域的羧基端。

[0188] 在特定实施例中,CAR包含一个或多个共刺激信号传导域以增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。如本文所用,术语“共刺激信号传导域”或“共刺激域”是指共刺激分子的胞内信号传导域。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体以外的细胞表面分子,其在结合于抗原时提供T淋巴细胞的有效活化和功能所需的第二信号。此类共刺激分子的说明性实例包括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。在一个实施例中,CAR包含一个或多个选自由CD28、CD137和CD134组成的组的共刺激信号传导域,以及一个CD3 ζ 初级信号传导域。

[0189] 在另一实施例中,CAR包含CD28和CD137共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0190] 在另一实施例中,CAR包含CD28和CD134共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0191] 在一个实施例中,CAR包含CD137和CD134共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0192] 在一个实施例中,CAR包含CD137共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0193] 在一个实施例中,CAR包含CD134共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0194] 在一个实施例中,CAR包含CD28共刺激信号传导域和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0195] 在特定实施例中,CAR包含特异性结合至表达于癌细胞上的CD79A多肽的抗CD79A抗体或其抗原结合片段。

[0196] 在一个实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;来源于选自由以下组成的组的多肽的跨膜域:T细胞受体的 α 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;和来自选自由以下组成的组的共刺激分子的一个或多个胞内共刺激信号传导域: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;和来自以下各者的初级信号传导域:FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

[0197] 在一个实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;选自由以下组成的组的铰链域:IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3、PD1铰链、CD152铰链和CD8 α 铰链;来源于选自由以下组成的组的多肽的跨膜域:T细胞受体的 α 或 β 链、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1;和来自选自由以下组成的组的共刺激分子的一个或多个胞内共刺激信号传导域: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;和来自以下的初级信号传导域:FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

[0198] 在一个实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;选自由以下组成的组的铰链域:IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3、PD1铰链、CD152铰链和CD8 α 铰链;来源于选自由以下组成的组的多肽的跨膜域:T细胞受体的 α 或 β 链、CD δ 、CD3 ϵ 、CD γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD154、AMN1和PD1;长度优选在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸之间的短寡肽或多肽连接子,其连接CAR的TM域和胞内信号传导域;和来自选自由以下组成的组的共刺激分子的一个或多个胞内共刺激信号传导域: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;和来自以下的初级信号传导域:FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。

[0199] 在特定实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;包含IgG1铰链/CH2/CH3多肽和CD8 α 多肽的铰链域;包含约3至约10个氨基酸的多肽连接子的CD8 α 跨膜域;CD137胞内共刺激信号传导域;和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0200] 在特定实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;包含CD8 α 多肽的铰链域;包含约3至约10个氨基酸的多肽连接子的CD8 α 跨膜域;CD134胞内共刺激信号传导域;和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0201] 在特定实施例中,CAR包含结合CD79A多肽的抗CD79A scFv;包含CD8 α 多肽的铰链域;包含约3至约10个氨基酸的多肽连接子的CD8 α 跨膜域;CD28胞内共刺激信号传导域;和CD3 ζ 初级信号传导域。

[0202] 特定实施例中所涵盖的CAR的设计使得相比于未经修饰的T细胞或经修饰以表达其它CAR的T细胞能够在表达CAR的T细胞中实现改进的扩增、长期存留和细胞毒性特性。

[0203] D. 多肽

[0204] 本文所涵盖的各种多肽、融合多肽和多肽变异体包括但不限于CAR多肽和其片段。在优选实施例中,提供包含一个或多个CAR的多肽。在特定实施例中,CAR为包含如SEQ ID NO:25-30中的任一个中所述的氨基酸序列的抗CD79A CAR。

[0205] 除非有相反说明,否则“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以互换使用,并且根据常规意义使用,即作为氨基酸序列。多肽不限于特定长度,例如其可包含全长多肽或多肽片段,且可包括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,以及所属领域中已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。在各种实施例中,CAR多肽在蛋白质的N末端处包含信号(或前导)序列,其共翻译或翻译后导引蛋白质的转移。适用于特定实施例中所涵盖的CAR的合适的信号序列的说明性实例包括但不限于IgG1重链信号多肽、CD8 α 信号多肽或人类GM-CSF受体 α 信号多肽。多肽可以使用多种众所周知的重组和/或合成技术中的任一种制备。本文所涵盖的多肽涵盖本公开的CAR,或具有本文所涵盖的CAR的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的序列。

[0206] 如本文所用,“分离的多肽”等是指体外合成、从细胞环境以及从与细胞中其它组分的缔合分离和/或纯化的肽或多肽分子,即,其不与体内物质明显缔合。在特定实施例中,分离的多肽为合成多肽、半合成多肽或从重组来源获得或得出的多肽。

[0207] 多肽包括“多肽变异体”。多肽变异体与天然存在的多肽的不同之处可在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入。这类变异体可天然存在或可例如通过修饰上文多肽序列中的一种或多种来合成地产生。举例来说,在特定实施例中,可能需要通过向CAR多肽的结合域、铰链、TM域、共刺激信号传导域或初级信号传导域中引入一个或多个取代、缺失、添加和/或插入来改进CAR的结合亲和力和/或其它生物特性。在特定实施例中,多肽包括与本文中所涵盖的参考序列中的任一个具有至少约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%氨基酸一致性的多肽,通常其中变异体维持参考序列的至少一种生物活性。在特定实施例中,生物活性为结合亲和力。在特定实施例中,生物活性为溶细胞活性。

[0208] 多肽包括“多肽片段”。多肽片段是指多肽,其可为具有天然产生或以重组方式制得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单体或多聚体。生物活性多肽片段的说明性实例包括抗体片段。如本文中所使用,术语“生物活性片段”或“最小生物活性片段”是指保留至少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片段。在优选实施例中,生物活性为针对独特型的结合亲和力。在某些实施例中,多肽片段可包含长度为至少5至约500个氨基酸的氨基酸链。应了解,在某些实施例中,片段长度为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400或450个氨基酸。特别有用的多肽片段包括官能性域,包括抗原结合域或抗体片段。在抗CD79A抗体的情况下,有用的片段包括但不限于:CDR区;重链或轻链的CDR3区;重链或轻链的可变区;抗体链或可变区的一部分,包括两个CDR;等。

[0209] 多肽还可以与连接子或其它序列框内融合或结合以易于合成、纯化或鉴别多肽(例如聚His),或促进多肽与固体支撑物的结合。

[0210] 如上文所述,在特定实施例中,多肽可以不同方式改变,包括氨基酸取代、缺失、截短和插入。用于这类操控的方法通常是所属领域中已知的。举例来说,参考多肽的氨基酸序列变异体可以通过DNA中的突变来制备。用于突变诱发和核苷酸序列改变的方法是所属领

域中众所周知的。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 (Methods in Enzymol) 》,154:367-382);美国专利第4,873,192号;Watson,J.D.等人(《基因分子生物学 (Molecular Biology of the Gene) 》,第四版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) 以及其中引用的参考文献。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见于Dayhoff等人, (1978)《蛋白序列和结构图集 (Atlas of Protein Sequence and Structure) 》(《国家生物医学研究基础 (Natl.Biomed.Res.Found.) 》, 华盛顿 (Washington, D.C.)) 的模型中。

[0211] 在某些实施例中,多肽变异体包含一个或多个保守性取代。“保守性取代”为氨基酸经另一个具有类似特性的氨基酸取代,使得肽化学方法领域的技术人员将预期多肽的二级结构和亲水性质大体上不变。可对特定实施例中涵盖的聚核苷酸和多肽的结构进行修饰且仍获得编码具有期望特征的变异体或衍生多肽的功能分子。当期望改变多肽的氨基酸序列以产生等效或甚至改进的变异多肽时,举例来说,所属领域的技术人员可改变例如根据表1的编码DNA序列的密码子中的一个或多个。

[0212] 表1-氨基酸密码子

氨基酸	单字母码	三字母码	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				
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				

[0215] 可以使用所属领域中熟知的计算机程序,如DNASTAR、DNA Strider、Geneious、Mac Vector或Vector NTI软件发现确定可以取代、嵌入或缺失而不消除生物活性的氨基酸残基的指导。优选地,本文中所公开的蛋白质变异体中的氨基酸变化是保守性氨基酸变化,即,带类似电荷或不带电氨基酸的取代。保守性氨基酸变化涉及侧链相关的氨基酸家族中的一个的取代。天然存在的氨基酸一般被分成四个家族: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)和不带电极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸)。

氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同归类为芳香族氨基酸。在肽或蛋白质中,氨基酸的合适的保守性取代是所属领域的技术人员已知的并且通常在不改变所得分子的生物活性下进行。所属领域的技术人员认识到,一般来说,多肽的非必需区中的单氨基酸取代不显著改变生物活性(参见例如Watson等人《基因分子生物学》,第4版,1987,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页)。

[0216] 如上文所概述,氨基酸取代可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。

[0217] 多肽变异体进一步包括糖基化形式、与其它分子的聚集共轭物和与不相关化学部分(例如聚乙二醇化分子)的共价共轭物。如所属领域中已知,共价变异体可以通过使官能团与氨基酸链或N或C末端残基处发现的基团连接。变异体还包括等位基因变异体、物种变异体和突变蛋白。不影响蛋白质的功能活性的区域的截短或缺失也是变异体。

[0218] 在一个实施例中,在需要两种或更多种多肽的表达的情况下,编码所述多肽的聚核苷酸序列可通过如本文中其它地方所论述的IRES序列分离。在另一实施例中,两种或更多种多肽可表述为包含一个或多个自裂解多肽序列的融合蛋白。

[0219] 特定实施例中所涵盖的多肽包括融合多肽。在优选实施例中,提供融合多肽和编码融合多肽的聚核苷酸,例如CAR。融合多肽和融合蛋白是指具有至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个多肽片段的多肽。融合多肽通常是C端连接至N端,不过其还可以是C端连接至C端、N端连接至N端、或N端连接至C端。融合蛋白的多肽可以按任何次序或指定次序。融合多肽或融合蛋白还可以包括保守修饰变异体、多态变异体、等位基因、突变异体、子序列和种间同系物,只要保存融合多肽的所需转录活性即可。融合多肽可通过化学合成方法或通过两个部分之间的化学连接制得或一般可使用其它标准技术制备。包含融合多肽的经连接DNA序列可操作地连接于如本文中其它地方所论述的合适的转录或翻译控制元件。

[0220] 在一个实施例中,融合搭配物包含有助于表达蛋白质(表达增强剂)的产率高于天然重组蛋白的序列。可选择其它融合搭配物以便提高蛋白质的溶解度或使得蛋白质靶向所需胞内区室或促进融合蛋白传输穿过细胞膜。

[0221] 融合多肽可进一步在本文所述的多肽域中的每一个之间包含多肽裂解信号。此外,可将多肽裂解位点置于任何连接肽序列中。例示性多肽裂解信号包括多肽裂解识别位点,如蛋白酶裂解位点、核酸酶裂解位点(例如罕见限制酶识别位点、自裂解核糖核酸酶识别位点)和自裂解病毒寡肽(参见deFelipe和Ryan,2004.《交通(Traffic)》,5(8);616-26)。

[0222] 合适的蛋白酶裂解位点和自裂解肽为技术人员已知的(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)《自然生物技术(Nature Biotech.)》5,589-594)。例示性蛋白酶裂解位点包括但不限于马铃薯Y病毒属NIa蛋白酶(例如烟草蚀刻病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒属HC蛋白酶、马铃薯Y病毒属P1(P35)蛋白酶、byo病毒NIa蛋白酶、byo病毒RNA-2-经编码蛋白酶、口疮病毒属L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、细小核糖核酸3C蛋白酶、豇豆花叶病毒组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和肠激酶的裂解位点。在一个实施例中,烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶裂解位点因其较高的裂解严格度而成为优选的,例如EXXYXQ(G/S)(SEQ ID NO:50),例如

ENLYFQG (SEQ ID NO:51) 和ENLYFQS (SEQ ID NO:52), 其中X表示任何氨基酸 (TEV裂解发生在Q与G或Q与S之间)。

[0223] 在特定实施例中, 多肽裂解信号为病毒自裂解肽或核糖体跳跃序列。

[0224] 核糖体跳跃序列的说明性实例包括但不限于: 2A或2A样位点、序列或域 (Donnelly 等人, 2001.《普通病毒学杂志 (J.Gen.Virol.)》82:1027-1041)。在特定实施例中, 病毒2A肽是口疮病毒属2A肽、马铃薯Y病毒属2A肽或心病毒属 (cardiovirus) 2A肽。

[0225] 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病毒 (ERAV) 2A肽、明脉扁刺蛾 β 四体 (Thosea asigna) (TaV) 2A肽、猪捷申病毒-1 (PTV-1) 2A肽、泰勒病毒 (Theilovirus) 2A肽和脑心肌炎病毒2A肽。

[0226] 2A位点的说明性实例提供于表2中。

[0227] 表2

[0228]

SEQ ID NO:53	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:54	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:55	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO:56	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:57	EGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:58	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO:59	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:60	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:61	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:62	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:63	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:64	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:65	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:66	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:67	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:68	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:69	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:70	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:71	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO:72	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:73	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:74	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0229] 在优选实施例中, 多肽包含抗CD79A CAR多肽。

[0230] E. 聚核苷酸

[0231] 在优选实施例中, 提供编码一种或多种CAR多肽的聚核苷酸。如本文所使用, 术语“聚核苷酸”或“核酸”是指脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 和DNA/RNA杂交体。聚核苷酸可以是单链或双链的并且是重组、合成或分离的。聚核苷酸包括但不限于: 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。聚核苷酸是指至少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个或更多个核苷酸长度,以及所有中间长度的核苷酸,即核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型核苷酸的修饰形式的聚合物形式。将容易理解的是,在此情形下,“中间长度”意指所引述值之间的任何长度,例如6、7、8、9等,101、102、103等,151、152、153等,201、202、203等。在特定实施例中,聚核苷酸或变异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%序列一致性。

[0232] 聚核苷酸的说明性实例包括但不限于SEQ ID NO:31-36和编码SEQ ID NO:1-30的聚核苷酸。

[0233] 如本文所用,“分离的聚核苷酸”是指已经从在天然存在的状态下侧接其的序列纯化的聚核苷酸,例如从通常与片断相邻的序列移出的DNA片段。在特定实施例中,“分离的聚核苷酸”也指互补DNA(cDNA)、重组DNA或在自然界中不存在且已通过人工制得的其它聚核苷酸。在特定实施例中,分离的聚核苷酸是合成聚核苷酸、半合成聚核苷酸或从重组来源获得或得出的聚核苷酸。

[0234] 在各种实施例中,聚核苷酸包含编码本文中所涵盖的多肽的mRNA。在某些实施例中,mRNA包含帽、一个或多个核苷酸和poly(A)尾。

[0235] 在特定实施例中,聚核苷酸可以经历密码子优化。如本文中所使用,术语“密码子优化”是指取代编码多肽的聚核苷酸中的密码子以便增加所述多肽的表达、稳定性和/或活性。影响密码子优化的因素包括但不限于以下中的一个或多个:(i)两种或更多种生物体或基因之间密码子偏好的变化或以合成方式构建的偏好表;(ii)生物体、基因或基因集内密码子偏好程度的变化;(iii)包括环境在内的密码子的系统性变化;(iv)根据解码tRNA得到的密码子变化;(v)根据总体或三联体的一个位置中的GC%得到的密码子变化;(vi)与参考序列,例如天然存在的序列的相似程度的变化;(vii)密码子频率截止值的变化;(viii)由DNA序列转录的mRNA的结构特性;(ix)有关作为设计密码子取代集合的基础的DNA序列的功能的先验知识;(x)每个氨基酸的密码子集合的系统性变化;和/或(xi)分离去除的伪翻译起始位点。

[0236] 如本文中所用,术语“聚核苷酸变异体”和“变异体”等是指与参考聚核苷酸序列呈现相当大的序列一致性的聚核苷酸或在下文所定义的严格条件下与参考序列杂交的聚核苷酸。这些术语包括相比于参考聚核苷酸来说一个或多个核苷酸添加或缺失或经不同核苷酸置换的聚核苷酸。在这点上,在本领域中充分理解,可以对参考聚核苷酸进行包括突变、添加、缺失和取代的某些改变,由此改变的聚核苷酸保持参考聚核苷酸的生物功能或活性。

[0237] 聚核苷酸变异体包括编码生物活性多肽片段或变异体的聚核苷酸片段。如本文所使用,术语“聚核苷酸片段”是指长度为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700个或更多个核苷酸的聚核苷酸片段,其编码保持至少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%的天然存在的多肽的活性的多肽变异体。聚核苷酸片段是指这样一种聚核苷酸,所述聚核苷酸编码具有天然存在或以重组方式产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或一个或多个氨基酸内部缺失或取代的多肽。

[0238] 如本文所用,叙述“序列一致性”或例如包含“与……50%一致的序列”是指比较窗口上逐核苷酸计或逐氨基酸计的序列相同程度。因此,“序列一致性百分比”可以通过以下方式计算:在比较窗口上比较两个最优比对序列,测定两个序列中存在相同核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数获得匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数(即窗口大小),并且将结果乘以100获得序列一致性百分比。包括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%序列一致性的核苷酸和多肽,通常其中多肽变异体维持参考多肽的至少一种生物活性。

[0239] 用于描述两个或更多个聚核苷酸或多肽的序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗口”、“序列一致性”、“序列一致性百分比”和“大体一致性”。“参考序列”的长度是至少12个,但通常是15到18个,并且通常是至少25个单体单元,包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个聚核苷酸可各自包含(1)两个聚核苷酸之间类似的序列(即完全聚核苷酸序列的仅一部分),和(2)在两个聚核苷酸之间相异的序列,两个(或更多个)聚核苷酸之间的序列比较通常通过在“比较窗口”上比较两个聚核苷酸的序列以鉴别和比较局部区域的序列相似性来进行。“比较窗口”是指至少6个,通常约50至约100个,更通常约100至约150个相邻位置的概念性区段,其中在将两个序列最佳比对后,将序列与具有相同数目的相邻位置的参考序列比较。对于最佳对准的两个序列,比较窗口可以包含与参考序列(不包含添加或缺失的序列)相比,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最佳比对可以通过计算机化执行算法(美国威斯康星州的威斯康星州遗传学软件包7.0版本,遗传学计算机组,575科学驱动麦迪逊(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过多种选择方法中的任一个产生的检查和最佳比对(即在比较窗口上导致最高同源性百分比)来进行。还可以参考如例如Altschul等人,1997,《核酸研究(Nucl. Acids Res.)》25:3389所公开的BLAST程序家族。序列分析的详细论述可以见于Ausubel等人,《现代分子生物学实验技术(Current Protocols in Molecular Biology)》, John Wiley&Sons Inc, 1994-1998,第15章的19.3单元中。

[0240] 描述聚核苷酸的定向的术语包括:5' (通常是聚核苷酸的具有游离磷酸酯基的末端)和3' (通常是聚核苷酸的具有游离羟基(OH)的末端)。可以按5'至3'定向或3'至5'定向标注聚核苷酸序列。对于DNA和mRNA,5'到3'股被命名为“有义”、“正”或“编码”股,因为其序列与前信使(前mRNA)的序列相同[除了RNA中是尿嘧啶(U),而非DNA中是胸腺嘧啶(T)]。对于DNA和mRNA,互补3'至5'股(其为由RNA聚合酶转录的股)被命名为“模板”股、“反义”股、“负”股或“非编码”股。如本文所用,术语“反向定向”是指以3'至5'定向书写的5'至3'序列

或以5'至3'定向书写的3'至5'序列。

[0241] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对规则相关联的聚核苷酸(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'。后一序列通常写成在左侧具有5'端且在右侧具有3'端的反向互补序列5'C A T G A C T 3'。与其反向互补序列相等的序列被称为回文序列。互补可为“部分”,其中仅一些核酸的碱基根据碱基配对规则匹配。或者,核酸之间可以存在“完全”或“全部”互补性。

[0242] 此外,所属领域的一般技术人员应了解,如本文所述,由于遗传密码的简并,存在多种编码多肽或其变异体的片段的核苷酸序列。这些聚核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列携有最小同源性。尽管如此,在特定实施例中专门涵盖归因于密码子使用差异而变化的聚核苷酸,例如针对人类和/或灵长类动物密码子选择而优化的聚核苷酸。此外,还可以使用包含本文所提供的聚核苷酸序列的基因的等位基因。等位基因是由于核苷酸的一个或多个突变(例如缺失、添加和/或取代)而改变的内源基因。

[0243] 如本文中所使用的术语“核酸盒”或“表达盒”是指可以表达RNA并且随后表达多肽的载体内的基因序列。在一个实施例中,核酸盒含有所关注基因,例如所关注聚核苷酸。在另一实施例中,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)序列以及一个或多个所关注基因,例如一个或多个所关注聚核苷酸。载体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核酸盒。核酸盒位置上并且依序地定向在载体内,使得盒中的核酸可以转录成RNA,并且当需要时翻译成蛋白质或多肽,经历转化的细胞的活性所需要的适当翻译后修饰,并且通过靶向适当胞内区室或分泌到胞外区室中而易位到适当区室以获得生物活性。优选地,盒使其3'和5'端适合于简便插入至载体中,例如其在每一端具有限制性核酸内切酶位点。在优选实施例中,核酸盒含有用于增加表达CD79A的癌细胞的细胞毒性的嵌合抗原受体的序列。盒可以单一单位的形式移出并插入至质粒或病毒载体中。

[0244] 聚核苷酸包括所关注聚核苷酸。如本文所用,术语“所关注聚核苷酸”是指编码多肽、多肽变异体或融合多肽的聚核苷酸。载体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种所关注聚核苷酸。在某些实施例中,所关注聚核苷酸编码在治疗或预防疾病或病症方面提供治疗效果的多肽。所关注聚核苷酸和由其编码的多肽包含编码野生型多肽的聚核苷酸以及其功能变异体和片段两者。在特定实施例中,功能变异体与相应野生型参考聚核苷酸或多肽序列具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%一致性。在某些实施例中,功能变异体或片段具有相应野生型多肽的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的生物活性。

[0245] 如本文其它地方所公开或如所属领域中已知,本文中涵盖的聚核苷酸(无关于编码序列本身的长度)可与其它DNA序列组合,所述序列如启动子和/或增强子、非翻译区(UTR)、信号序列、Kozak序列、聚腺苷酸化信号、其它限制酶位点、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、FRT和Att位点)、终止密码子、转录终止信号和编码自裂解多肽的聚核苷酸、表位标签,使得其总长度可以显著变化。因此预期在特定实施例中可以采用几乎任何长度的聚核苷酸片段,其中总长度优选受预期重组DNA方案的制备和使用便利性限制。

[0246] 聚核苷酸可使用本领域中已知且可用的多种公认技术中的任一种制备、操纵和/或表达。为了表达所需多肽,编码多肽的核苷酸序列可插入到适当载体中。

[0247] 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因子,例如piggyBac、Sleeping Beauty、Mos1、Tc1/mariner、Tol2、微型Tol2 (mini-Tol2)、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince和其衍生物。

[0248] 载体的其它说明性实例包括但不限于质粒;噬菌粒;粘粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC);噬菌体,例如 λ 噬菌体或M13噬菌体;和动物病毒。

[0249] 可用作载体的病毒的说明性实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒以及乳多泡病毒(例如SV40)。

[0250] 表达载体的说明性实例包括但不限于用于在哺乳动物细胞中表达的pCIneo载体(Promega);用于慢病毒介导的基因转移和在哺乳动物细胞中表达的pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM和pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)。在特定实施例中,本文所公开的多肽的编码序列可接合到用于表达哺乳动物细胞中的多肽的此类表达载体中。

[0251] 在特定实施例中,载体为游离型载体或维持在染色体外的载体。如本文所用,术语“游离型”是指载体能够复制而不整合到宿主的染色体DNA中并且不由分裂宿主细胞逐渐丧失,还意指所述载体在染色体外或游离地复制。

[0252] 存在于表达载体中的“控制元件”或“调节序列”为载体的那些非翻译区-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执行转录和翻译。这类元件可以在其强度和特异性方面变化。取决于所利用的载体系统和宿主,可使用多种适合的转录与翻译元件,包括遍在启动子和诱导型启动子。

[0253] 在特定实施例中,包括但不限于表达载体和病毒载体的载体将包括外源、内源或异源控制序列,如启动子和/或增强子。“内源”控制序列是天然地与基因组中的既定基因连接的控制序列。“外源”控制序列是借助于遗传操纵(即,分子生物技术)与基因并接定位以使得所述基因的转录是由所连接的增强子/启动子来导引的控制序列。“异源”控制序列是来自与遗传操纵的细胞不同的物种的外源序列。

[0254] 如本文所用,术语“启动子”是指RNA聚合酶所结合到的聚核苷酸(DNA或RNA)的识别位点。RNA聚合酶起始并且转录可操作地连接到启动子的聚核苷酸。在特定实施例中,在哺乳动物细胞中可操作的启动子包含位于转录起始位点上游约25到30个碱基处的富AT区,和/或见于转录起始上游70至80个碱基处的另一序列,N可以是任何核苷酸的CNCAAT区。

[0255] 术语“增强子”是指含有能够提供增强的转录的序列并且在一些情况下可以独立于其相对于另一个控制序列的定向起作用的一段DNA。增强子可以与启动子和/或其它增强子元件协作地或叠加地起作用。术语“启动子/增强子”是指含有能够提供启动子和增强子功能的序列的一段DNA。

[0256] 术语“可操作地连接”是指所描述的组分处于允许其以其预期方式起作用的关系的并接。在一个实施例中,所述术语是指核酸表达控制序列(例如启动子和/或增强子)与第二聚核苷酸序列(例如所关注聚核苷酸)之间的功能性连接,其中表达控制序列导引对应于第二序列的核酸的转录。

[0257] 如本文所用,术语“组成型表达控制序列”是指不断地或连续地引起可操作地连接

的序列转录的启动子、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多种细胞和组织类型中表达的“遍在”启动子、增强子或启动子/增强子,或允许分别在多种限定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。

[0258] 适用于特定实施例的说明性遍在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 (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) LTR启动子、劳斯肉瘤病毒 (RSV) LTR、单纯疱疹病毒 (HSV) (胸苷激酶) 启动子、来自牛痘病毒的H5、P7.5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ROSA 26基因座 (Irions等人,《自然·生物技术》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生肉瘤病毒增强子、阴性对照区经缺失、d1587rev引物结合位点经取代 (MND) U3启动子 (Haas等人,病毒学杂志 (Journal of Virology.) 2003;77 (17):9439-9450)。

[0259] 在一个实施例中,载体包含MNDU3启动子。

[0260] 在一个实施例中,载体包含EF1a启动子,所述启动子包含人类EF1a基因的第一内含子。

[0261] 在一个实施例中,载体包含缺乏人类EF1a基因的第一内含子的EF1a启动子。

[0262] 在特定实施例中,可能需要从T细胞特异性启动子表达包含CAR的聚核苷酸。

[0263] 如本文所用,“条件表达”可以指任何类型的条件表达,包括但不限于诱导型表达;阻抑型表达;在具有特定生理、生物或疾病状态的细胞或组织中的表达;等。这一定义不打算排除细胞类型或组织特异性表达。某些实施例提供所关注聚核苷酸的条件表达,例如通过使细胞、组织、生物体等经历可以引起聚核苷酸表达或引起由所关注聚核苷酸编码的聚核苷酸的表达增加或减少的处理或条件来控制表达。

[0264] 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,如用于编码糖皮质激素或雌激素受体的基因的启动子(可以通过用相应激素处理来诱导);金属硫蛋白启动子(可以通过用各种重金属处理来诱导);MX-1启动子(可以通过干扰素来诱导);“GeneSwitch”米非司酮可调节系统 (Sirin等人,2003,《基因》,323:67);cumate诱导型基因开关 (WO 2002/088346);四环素依赖性调节系统;等。

[0265] 条件表达还可以通过使用位点特异性DNA重组酶实现。根据某些实施例,载体包含用于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。如本文所用,术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包括参与涉及一个或多个(例如二、三、四、五、七、十、十二、十五、二十、三十、五十个等)重组位点的重组反应的切除型或整合型蛋白、酶、辅因子或相关蛋白,其可以是野生型蛋白(参见Landy,《生物技术新见 (Current Opinion in Biotechnology)》3:699-707 (1993))或其突变体、衍生物(例如含有重组蛋白序列或其片段的融合蛋白)、片段和变异体。适用于特定实施例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。

[0266] 载体可以包括用于多种位点特异性重组酶中的任何一种的一个或多个重组位点。应理解,除了例如逆转录病毒载体或慢病毒载体的载体的整合所需的任何位点之外,还需要用于位点特异性重组酶的靶位点。如本文中所使用,术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点”是指重组酶所识别并且结合的具体核酸序列。

[0267] 举例来说,Cre重组酶的一个重组位点是loxP,其为34个碱基对的序列,包含侧接8个碱基对的核心序列的两个13个碱基对的反向重复序列(充当重组酶结合位点)(参见Sauer B.,《生物技术新见》5:521-527(1994)中的图1)。其它例示性loxP位点包括但不限于: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)。

[0268] 适合FLP重组酶的识别位点包括但不限于: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)。

[0269] 识别序列的其它实例是attB、attP、attL和attR序列,其由重组酶 λ 整合酶,例如 ϕ -c31识别。 ϕ C31 SSR介导仅在异型位点attB(长度是34bp)与attP(长度是39bp)之间的重组(Groth等人,2000)。分别针对细菌和噬菌体基因组上的噬菌体整合酶的连接位点而命名的attB和attP都含有可能与 ϕ C31同源二聚体结合的不完美反向重复序列(Groth等人,2000)。产物位点attL和attR对进一步 ϕ C31介导的重组实际上是惰性的(Belteki等人,2003),使得反应不可逆。对于催化插入,已经发现,与attP位点插入到基因组attB位点中相比,携有attB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,典型策略通过同源重组将携有attP的“对接位点”安置到既定基因座中,所述基因座接着与携有attB的进入序列搭配用于插入。

[0270] 如本文中所使用,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进直接内部核糖体进入顺反子(蛋白质编码区)的起始密码子(如ATG),由此引起基因的与帽无关的翻译的元件。参见例如Jackson等人,1990.《生化科学趋势(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,载体包括编码一个或多个多肽的一个或多个所关注聚核苷酸。在特定实施例中,为了实现多种多肽中的每一种的高效翻译,聚核苷酸序列可以通过一个或多个编码自裂解多肽的IRES序列或聚核苷酸序列隔开。在一个实施例中,本文所涵盖的聚核苷酸中所用的IRES是EMCV IRES。

[0271] 如本文所用,术语“Kozak序列”是指极大地促进mRNA与核糖体的小亚单位的初始结合并且增加翻译的短核苷酸序列。共同Kozak序列是(GCC)RCCATGG(SEQ ID NO:75),其中R是嘌呤(A或G)(Kozak,1986.《细胞》.44(2):283-92;和Kozak,1987.《核酸研究》15(20):8125-48)。在特定实施例中,载体包含具有共有Kozak序列并且编码所需多肽(例如CAR)的聚核苷酸。

[0272] 导引异源核酸转录物的有效终止和聚腺苷酸化的元件增加异源基因表达。转录终止信号通常见于聚腺苷酸化信号的下流。在特定实施例中,载体包含编码待表达的多肽的聚核苷酸的聚腺苷酸化序列3'。如本文所用,术语“polyA位点”或“polyA序列”表示通过RNA聚合酶II导引初生RNA转录物的终止和聚腺苷酸化两者的DNA序列。聚腺苷酸化序列能够通

过将polyA尾添加到编码序列的3'端而提升mRNA稳定性,并且因此促成翻译效率增加。裂解和聚腺苷酸化是由RNA中的聚腺苷酸序列导引。哺乳动物前mRNA的核心poly(A)序列具有两个侧接裂解-聚腺苷酸化位点的识别元件。典型地,几乎不变的AAUAAA六聚物位于富含U或GU残基的可变性较高的元件上游20-50个核苷酸处。新生转录物的切割发生在这两个元件之间并偶联以将多达250个腺苷加入5'裂解产物。在特定实施例,核心聚腺苷酸序列是理想的聚腺苷酸序列(例如AATAAA、ATTAAA、AGTAAA)。在特定实施例,聚腺苷酸序列是SV40聚腺苷酸序列、牛生长激素聚腺苷酸序列(BGHPA)、兔 β -珠蛋白聚腺苷酸序列(r β gpA)或所属领域中已知的另一种适合的异源或内源性聚腺苷酸序列。

[0273] 在一些实施例中,聚核苷酸或具有所述聚核苷酸的细胞利用自杀基因(包括诱导型自杀基因)来降低直接毒性和/或不受控增殖的风险。在特定方面,自杀基因对具有所述聚核苷酸或细胞的宿主不具有免疫原性。可以使用的自杀基因的某一实例是半胱天冬酶-9或半胱天冬酶-8或胞嘧啶脱氨酶。半胱天冬酶-9可以使用特定化学二聚诱导剂(CID)活化。

[0274] 在特定实施例中,通过非病毒或病毒载体将一个或多个编码抗CD79A CAR的聚核苷酸引入至细胞(例如免疫效应细胞)中。

[0275] 术语“载体”在本文中用于指能够转移或输送另一个核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常连接到载体核酸分子,例如插入到载体核酸分子中。载体可以包括在细胞中直接自主复制的序列,或可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。在特定实施例中,使用非病毒载体将本文所涵盖的一个或多个聚核苷酸递送至T细胞中。在一个实施例中,载体是编码抗CD79A CAR的体外合成或以合成方式制备的mRNA。

[0276] 非病毒载体的例示性实例包括但不限于mRNA、质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒和细菌人工染色体。

[0277] 在特定实施例中涵盖的聚核苷酸的非病毒递送的说明性方法包括但不限于:电穿孔、声致穿孔、脂质体转染、微注射、基因枪(biolistics)、病毒颗粒、脂质体、免疫脂质体、纳米粒子、聚阳离子或脂质:核酸共轭物、裸DNA、人工病毒粒子、DEAE-右旋糖苷介导的转移、基因枪(gene gun)和热休克。

[0278] 特定实施例中所涵盖的适用于特定实施例中的聚核苷酸递送系统的说明性实例包括但不限于由Amaya Biosystems、Maxcyte, Inc.、BTX Molecular Delivery Systems和Copernicus Therapeutics Inc.提供的那些。脂质体转染试剂是市售的(例如TransfectamTM和LipofectinTM)。适于聚核苷酸的高效受体识别脂质体转染的阳离子性和中性脂质在文献中已有描述。参见例如Liu等人(2003)《基因疗法(Gene Therapy.)》10:180-187;和Balazs等人(2011)《药物递送杂志(Journal of Drug Delivery.)》2011:1-12。抗体靶向的递送、细菌衍生的递送、基于非生命纳米单元的递送也涵盖在特定实施例中。

[0279] 在各种实施例中,聚核苷酸是被引入至细胞中以瞬时表达所需多肽的mRNA。如本文所用,“瞬时”是指持续几小时、几天或几周的时段表达非整合转基因,其中表达的时段小于聚核苷酸在整合至基因组中或含于细胞中的稳定质粒复制子内的情况下的表达的时段。

[0280] 在特定实施例中,编码多肽的mRNA是体外转录的mRNA。如本文所用,“体外转录的RNA”是指已体外合成的RNA,优选mRNA。一般来说,体外转录的RNA由体外转录的载体产生。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0281] 在特定实施例中,mRNAs可进一步包含5'帽或经修饰的5'帽和/或poly(A)序列。如

本文所用,5'帽(也称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m^{7G}帽)是在转录开始之后不久被添加至真核信使RNA的“前端”或5'端的经修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽包含端基,其连接至第一经转录核苷酸且被核糖体识别且被保护免受RNA酶侵害。加帽部分可被修饰以调节mRNA的功能性,例如其稳定性或翻译效率。在特定实施例中,mRNA包含约50至约5000个腺嘌呤的poly(A)序列。在一个实施例中,mRNA包含约100至约1000个碱基、约200至约500个碱基或约300至约400个碱基的poly(A)序列。在一个实施例中,mRNA包含约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)序列可以化学方式或以酶方式经修饰以调节mRNA功能性,例如定位、稳定性或翻译效率。

[0282] 包含特定实施例中所涵盖的聚核苷酸的病毒载体可以通过向各个患者给药来体内递送,典型地通过全身给药(例如静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或颅内输注)或局部施用,如下文所描述。或者,可将载体递送至离体细胞,如从各个患者取出的细胞(例如流动的周边血液、淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检样品等)或全适供血者造血干细胞,随后将所述细胞再植入患者体内。

[0283] 在一个实施例中,将包含编码抗CD79A CAR的聚核苷酸的病毒载体直接给予生物体以在体内转导细胞。或者,可以给予裸DNA。给药是通过通常用于引入分子以与血液或组织细胞最终接触的途径中的任一种进行,包括但不限于注射、输注、表面施用和电致孔。给予这类核酸的合适的方法是所属领域的技术人员可用且众所周知的,并且尽管可以使用超过一种途径给予具体组合物,但具体途径通常可以提供比另一途径更迅速且更有效的反应。

[0284] 适用于本文所涵盖的特定实施例中的病毒载体系统的例示性实例包括但不限于腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒和牛痘病毒载体。

[0285] 在各种实施例中,通过用包含一个或多个编码抗CD79A CAR的聚核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)转导细胞来将所述一个或多个聚核苷酸引入至免疫效应细胞(例如T细胞)中。

[0286] AAV是小型(约26nm)复制缺陷型,主要是游离型、无包膜病毒。AAV可以感染分裂和非分裂细胞两者且可将其基因组合并到宿主细胞的基因组中。重组AAV(rAAV)通常在最低限度上由转基因和其调节序列,以及5'和3'AAV反向末端重复(ITR)构成。ITR序列的长度是约145bp。在特定实施例中,rAAV包含ITR和从AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10分离的衣壳序列。

[0287] 在一些实施例中,嵌合rAAV使用了从一种AAV血清型分离ITR序列和从不同AAV血清型分离的衣壳序列。举例来说,具有来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV6的衣壳序列的rAAV被称为AAV2/AAV6。在具体实施例中,rAAV载体可包含来自AAV2的ITR,以及来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的任一个的衣壳蛋白。在优选实施例中,rAAV包含来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV6的衣壳序列。在优选实施例中,rAAV包含来源于AAV2的ITR序列和来源于AAV2的衣壳序列。

[0288] 在一些实施例中,可将工程改造和选择方法应用于AAV衣壳以使其更容易地转导目的细胞。

[0289] rAAV载体的构造、其生产和纯化已公开于例如美国专利第9,169,494号;第9,169,

492号;第9,012,224号;第8,889,641号;第8,809,058号;以及第8,784,799号中,所述专利各自以全文引用的方式并入本文中。

[0290] 在各种实施例中,通过用包含一个或多个编码抗CD79A CAR的聚核苷酸的逆转录病毒(例如慢病毒)转导细胞来将所述一个或多个聚核苷酸引入免疫效应细胞中。

[0291] 如本文所用,术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录成线性双链DNA拷贝并且随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。适用于特定实施例中的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠(Harvey murine)肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病毒(GaLV)、猫白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗兰德鼠(Friend murine)白血病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)和慢病毒。

[0292] 如本文所用,术语“慢病毒”是指复杂逆转录病毒组(或属)。说明性慢病毒包括但不限于:HIV(人类免疫缺陷病毒;包括1型HIV和2型HIV);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);和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施例中,基于HIV的载体主链(即,HIV顺式作用序列元件)是优选的。

[0293] 在各种实施例中,本文中所涵盖的慢病毒载体包含一种或多种LTR,和以下辅助元件中的一种或多种或全部:cPPT/FLAP、Psi (Ψ) 包装信号、导出元件、聚(A)序列,且可以任选地包含如本文中其它地方所论述的WPRE或HPRE、绝缘子元件、可选标记物和细胞自杀基因。

[0294] 在特定实施例中,本文中所涵盖的慢病毒载体可以为整合或非整合或整合缺陷型慢病毒。如本文中所使用,术语“整合缺陷型慢病毒”或“IDLV”是指具有不能将病毒基因组整合到宿主细胞的基因组中的整合酶的慢病毒。整合不胜任型病毒载体已描述于专利申请WO 2006/010834中,所述专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0295] 适合于降低整合酶活性的HIV-1 pol基因中的说明性突变包括但不限于:H12N、H12C、H16C、H16V、S81 R、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、Q221 L、W235F、W235E、K236S、K236A、K246A、G247W、D253A、R262A、R263A和K264H。

[0296] 在一个实施例中,HIV-1整合酶缺陷型pol基因包含D64V、D116I、D116A、E152G或E152A突变;D64V、D116I和E152G突变;或D64V、D116A和E152A突变。

[0297] 在一个实施例中,HIV-1整合酶缺陷型pol基因包含D64V突变。

[0298] 术语“长末端重复序列(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA的末端处的碱基对域,其在其天然序列情形下是直接重复序列并且含有U3、R和U5区。

[0299] 如本文所用,术语“FLAP元件”或“cPPT/FLAP”是指这样一种核酸,其序列包括逆转录病毒,例如HIV-1或HIV-2的中央多嘌呤段和中央终止序列(cPPT和CTS)。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中。在另一实施例中,慢病毒载体含有在cPPT和/或CTS元件中具有一个或多个突变的FLAP元件。在又一个实施例中,慢病毒载体包含cPPT或CTS元件。在又一个实施例中,慢病毒载体不含cPPT或CTS元

件。

[0300] 如本文所使用,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,所述序列是病毒RNA插入病毒衣壳或粒子中所需的,参见例如Clever等人,1995.《病毒学杂志(J.of Virology)》,第69卷,第4期;第2101-2109页。

[0301] 术语“导出元件”是指调节RNA转录物从细胞的细胞核输送到细胞质的顺式作用的转录后调节元件。RNA输出元件的实例包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV) rev反应元件(RRE)(参见例如Cullen等人,1991.《病毒学杂志(J.Virol.)》65:1053;和Cullen等人,1991.《细胞》58:423)和乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

[0302] 在特定实施例中,病毒载体中异源序列的表达通过将转录后调节元件、高效聚腺苷酸化位点和任选地转录终止信号并入到载体中而增加。多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》,5:3864);等(Liu等人,1995,《基因与发育(Genes Dev.)》,9:1766)。

[0303] 慢病毒载体优选地含有因修饰LTR而引起的若干安全性增强。“自我失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如其中称为U3区的右(3′)LTR增强子-启动子区已被修饰(例如通过缺失或取代)以防止病毒转录超出第一轮病毒复制。额外安全性增强通过用异源启动子置换5′LTR的U3区以在病毒颗粒产生期间驱动病毒基因组的转录而提供。可以使用的异源启动子的实例包括例如病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如立即早期)、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。

[0304] 如本文所用,术语“假型”或“假型化”是指病毒包膜蛋白质已被另一具有优选特征的病毒的病毒包膜蛋白质取代的病毒。举例来说,HIV可以经水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)包膜蛋白假型化,所述包膜蛋白使得HIV感染更广泛范围的细胞,因为HIV包膜蛋白(由env基因编码)通常使病毒靶向CD4+呈现细胞。

[0305] 在某些实施例中,根据已知方法制备慢病毒载体。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。

[0306] 根据本文所涵盖的某些特定实施例,大部分或所有的病毒载体主链序列都来源于慢病毒,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,或可以在不削弱转移载体执行本文所描述功能的能力的情况下对某些慢病毒序列提供组合并且众多的取代和变化。此外,多种慢病毒载体是所属领域中已知的,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号和第5,994,136号,其中有许多适用于产生本文所涵盖的病毒载体或转移质粒。

[0307] 在各种实施例中,通过用包含一种或多种聚核苷酸的腺病毒转导细胞来将一种或多种编码抗CD79A CAR的聚核苷酸引入至免疫效应细胞中。

[0308] 基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中实现极高转导效率且不需要细胞分裂。利用这类载体,已获得高效价和高水平表达。这种载体可以在相对简单的系统中大量制备。大多数腺病毒载体经工程改造使得转基因置换Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后,复制缺陷型

载体在供应反式缺失基因功能的人类293细胞中繁殖。Ad载体可以体内转导多种类型的组织,其包括非分裂分化细胞,如在肝脏、肾和肌肉中发现的那些。常规的Ad载体具有较大运载能力。

[0309] 当前复制缺乏型腺病毒载体的产生和传送可以利用称为293的独特辅助细胞系,这种细胞系利用Ad5 DNA片段转型人胚肾细胞且组成性表达E1蛋白质(Graham等人,1977)。由于E3区在腺病毒基因组中是可有可无的(Jones和Shenk,1978),所以当前的腺病毒载体借助于293细胞在E1、D3或两个区域中携带外来DNA(Graham和Prevec,1991)。腺病毒载体已用于真核基因表达(Levrero等人,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗研究(Grunhaus和Horwitz,1992;Graham和Prevec,1992)中。向不同组织给予重组型腺病毒的研究包括气管灌輸(Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射(Ragot等人,1993)、周边静脉注射(Herz和Gerard,1993)和立体定向接种到大脑(Le Gal La Salle等人,1993)。在临床试验中使用Ad载体的实例包含利用肌肉内注射进行抗肿瘤免疫接种的聚核苷酸疗法(Sterman等人,《人类基因治疗(Hum. Gene Ther.)》7:1083-9(1998))。

[0310] 在各种实施例中,通过用包含一种或多种聚核苷酸的单纯疱疹病毒,例如HSV-1、HSV-2转导细胞来将一种或多种编码抗CD79A CAR的聚核苷酸引入至免疫效应细胞中。

[0311] 成熟HSV病毒粒子由二十面体衣壳包覆由152kb的线性双链DNA分子组成的病毒基因组组成。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体缺乏一种或多种必需或非必需HSV基因。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体是复制缺陷型。大多数复制缺乏型HSV载体含有缺失以移除一种或多种中早期、早期或晚期HSV基因从而防止复制。举例来说,HSV载体可缺乏选自以下组成的组的中早期基因:ICP4、ICP22、ICP27、ICP47和其组合。HSV载体的优势在于,它能够进入潜伏期以引起长期DNA表达并且其具有较大的病毒DNA基因组,由此可以容纳长达25kb的外源性DNA插入序列。基于HSV的载体描述于例如美国专利第5,837,532号、第5,846,782号和第5,804,413号,以及国际专利申请WO 91/02788、WO 96/04394、WO 98/15637和WO 99/06583中,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0312] F. 经遗传修饰的细胞

[0313] 在各种实施例中,提供经遗传修饰以表达本文所涵盖的CAR的细胞,用于治疗癌症。如本文所用,术语“经遗传工程改造”或“经遗传修饰”是指添加呈DNA或RNA形式的额外遗传物质到细胞中的总遗传物质中。术语“经遗传修饰的细胞”、“经修饰的细胞”和“重定向的细胞”可互换使用。如本文所用,术语“基因治疗”是指将呈DNA或RNA形式的额外遗传物质引入至细胞中的总遗传物质中,其恢复、纠正或修饰基因的表达或用于表达治疗性多肽(例如CAR)的目的。

[0314] 在特定实施例中,在免疫效应细胞中引入和表达本文所涵盖的抗CD79A CAR,以将其特异性重定向至所关注的靶抗原,例如CD79A多肽。“免疫效应细胞”是免疫系统中的具有一种或多种效应子功能(例如细胞毒性细胞杀伤活性、细胞因子的分泌、ADCC和/或CDC的诱导)的任何细胞。本文所涵盖的说明性免疫效应细胞是T淋巴细胞,包括但不限于细胞毒性T细胞(CTL;CD8⁺ T细胞)、TIL和辅助T细胞(HTL;CD4⁺ T细胞。在特定实施例中,细胞包含 $\alpha\beta$ T细胞。在特定实施例中,细胞包含 $\gamma\delta$ T细胞。在一个实施例中,免疫效应细胞包括自然杀手(NK)细胞。在一个实施例中,免疫效应细胞包括自然杀手T(NKT)细胞。

[0315] 免疫效应细胞可为自身的(autologous/autogeneic) (“自”)或非自身的 (“非自”,

例如同种异体的、同基因的或异基因的)。如本文所使用,“自体”是指来自同一受试者的细胞。如本文所用,“同种异体”是指来自同一物种的与比较细胞在基因上不同的细胞。如本文所用,“同基因”是指来自不同受试者的在基因上与比较细胞相同的细胞。如本文所用,“异种”是指来自与比较细胞不同的物种的细胞。在优选实施例中,细胞是同种异体的。

[0316] 用于特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR的说明性免疫效应细胞包括T淋巴细胞。术语“T细胞”或“T淋巴细胞”是领域公认的并且意图包括胸腺细胞、未成熟的T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或活化的T淋巴细胞。T细胞可以是T辅助(Th)细胞,例如T辅助1(Th1)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细胞子组。适用于特定实施例的其它说明性T细胞群体包括原初T细胞(T_N)、T记忆干细胞(T_{SCM})、中央记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})和效应T细胞(T_{EFF})。

[0317] 如技术人员将理解,其它细胞也可以用作具有如本文所涵盖的抗CD79A CAR的免疫效应细胞。具体来说,免疫效应细胞还包括NK细胞、NKT细胞、嗜中性白细胞和巨噬细胞。免疫效应细胞还包括效应细胞的祖细胞,其中所述祖细胞可以在体内或体外经诱导以分化成免疫效应细胞。因此,在特定实施例中,免疫效应细胞包括免疫效应细胞的祖细胞,例如含于衍生自脐血、骨髓或流动周边血液的CD34⁺细胞群体内的造血干细胞(HSC),其在向受试者给予后分化为成熟免疫效应细胞,或其可以在体外经诱导以分化为成熟免疫效应细胞。

[0318] 如本文所用,经遗传工程改造以含有CD79A特异性CAR的免疫效应细胞可以被称为“CD79A特异性重定向免疫效应细胞”。

[0319] 如本文所用,术语“CD34⁺细胞”是指在其细胞表面上表达CD34蛋白的细胞。如本文所用,“CD34”是指通常充当细胞-细胞粘附因子并且参与T细胞进入淋巴结中的细胞表面糖蛋白(例如唾液粘蛋白)CD34⁺细胞群体含有造血干细胞(HSC),其在向患者给予后分化并且贡献于所有造血谱系(包括T细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜中性白细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞)。

[0320] 在特定实施例中提供制备免疫效应细胞的方法,所述免疫效应细胞表达本文所涵盖的抗CD79A CAR。在一个实施例中,所述方法包含转染或转导从个体分离的免疫效应细胞,使得免疫效应细胞表达一种或多种本文所涵盖的抗CD79A CAR。在某些实施例中,免疫效应细胞从个体分离并且在无进一步体外操纵的情况下经遗传修饰。所述细胞然后可以直接再给予到个体。在其它实施例中,免疫效应细胞首先在体外经活化和刺激以增殖,随后经遗传修饰以表达抗CD79A CAR。在这点上,免疫效应细胞可以在经遗传修饰(即,转导或转染以表达本文所涵盖的抗CD79A CAR)之前和/或之后进行培养。

[0321] 在特定实施例中,在体外操纵或遗传修饰本文所描述的免疫效应细胞之前,细胞来源是获自受试者。在特定实施例中,CAR修饰的免疫效应细胞包含T细胞。

[0322] 在特定实施例中,PBMC可使用本文所涵盖的方法经直接遗传修饰以表达抗CD79A CAR。在某些实施例中,在分离PBMC之后,T淋巴细胞经进一步分离,并且在某些实施例中,细胞毒性和辅助T淋巴细胞两者都可以在遗传修饰和/或扩增之前或之后分选成原初、记忆和效应T细胞亚群。

[0323] 免疫效应细胞,如T细胞可在分离之后使用已知方法进行遗传修饰,或免疫效应细

胞可在经遗传修饰之前在体外被活化和扩增(或在祖细胞的情况下被分化)。在特定实施例中,免疫效应细胞,如T细胞利用本文所涵盖的嵌合抗原受体进行遗传修饰(例如用包含编码抗CD79A CAR的核酸的病毒载体转导),且接着在体外被活化和扩增。在各种实施例中,T细胞可在使用如例如以下各者中所描述的方法进行遗传修饰以表达CAR之前或之后被活化和扩增:美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开案第20060121005号。

[0324] 在一个实施例中,CD34⁺细胞利用本文所涵盖的核酸构建体转导。在某些实施例中,转导的CD34⁺细胞在向受试者,总体上最初分离出所述细胞的受试者给予之后在体内分化为成熟免疫效应细胞。在另一实施例中,CD34⁺细胞可在暴露于如本文所述的CAR之前或在经如本文所述的CAR遗传修饰之后根据先前所描述的方法经以下细胞因子中的一种或多种体外刺激:F1t-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)。

[0325] 在特定实施例中,用于治疗癌症的经修饰免疫效应细胞群体包含如本文所涵盖的CAR。举例来说,经修饰免疫效应细胞群体由获自诊断患有本文所述的B细胞恶性肿瘤的患者(自体供体)的周边血液单核细胞(PBMC)制备。PBMC形成可为CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺的非均质T淋巴细胞群体。

[0326] PBMC还可包括其它细胞毒性淋巴细胞,如NK细胞或NKT细胞。携有特定实施例中所涵盖的CAR的编码序列的表达载体被引入至人类供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。在特定实施例中,携有表达载体的成功转导的T细胞可使用流式细胞测量术进行分选以分离CD3阳性T细胞,且接着进一步繁殖以增加这些表达CAR蛋白的T细胞的数目,外加使用抗CD3抗体和或抗CD28抗体和IL-2进行细胞活化,或如本文中其它地方所描述的所属领域中已知的任何其它方法。标准程序用于冻存表达CAR蛋白T细胞的T细胞,以储存和/或制备用于人类受试者。在一个实施例中,在不存在非人类动物衍生产物,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。由于非均质PBMC群体经遗传修饰,所得转导细胞为包含如本文所涵盖的抗CD79A CAR的非均质修饰细胞群体。

[0327] 在另一实施例中,例如一、二、三、四、五或更多种不同表达载体的混合物可用于遗传修饰免疫效应细胞的供体群体,其中各载体编码如本文所涵盖的不同嵌合抗原受体蛋白。所得经修饰的免疫效应细胞形成混合的修饰细胞群体,其中一定比例的修饰细胞表达超过一种不同的CAR蛋白。

[0328] G.T细胞制造方法

[0329] 在各种实施例中,通过使刺激CD3 TCR复合物相关信号的试剂与刺激共刺激分子的配体在T细胞的表面上接触来扩展遗传修饰的T细胞。

[0330] 在特定实施例中,使PBMC或分离的T细胞与附着至珠粒或其它表面的刺激试剂和共刺激试剂(如可溶性抗CD3和抗CD28抗体)在具有适当细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)的培养基中接触。

[0331] 在特定实施例中,使PBMC或分离的T细胞与附着至珠粒或其它表面的刺激试剂和共刺激试剂(如可溶性抗CD3和抗CD28抗体)在具有适当细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-

15) 和/或一种或多种调节PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导路径的试剂的培养基中接触。

[0332] 在优选实施例中,由本文所涵盖的方法制造的T细胞提供改进的过继免疫治疗组合物。不希望受任何特定理论束缚,相信由本文中所涵盖的特定实施例中的方法制造的T细胞组合物具有优良特性,包括增加的存活率、在相对不存在分化的情况下的扩增和体内存留。在一个实施例中,制造T细胞的方法包含使细胞与一种或多种调节PI3K细胞信号传导路径的试剂接触。在一个实施例中,制造T细胞的方法包含使细胞与一种或多种调节PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导路径的试剂接触。在各种实施例中,T细胞可获自任何来源且与试剂在制造方法的活化和/或扩增阶段期间接触。所得T细胞组合物富含发育有力的T细胞,所述T细胞能够增殖和表达以下生物标记中的一个或多个:CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、CD38和CD8。在一个实施例中,包含已用一种或多种PI3K抑制剂处理的T细胞的细胞群体富含共表达以下生物标记中的一种或多种或全部的CD8⁺ T细胞群体:CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0333] 在一个实施例中,包含已用一种或多种PI3K抑制剂处理的T细胞的细胞群体富含共表达以下生物标记中的一种或多种或全部的CD8⁺ T细胞群体:CD62L、CD127、CD27和CD8。

[0334] 在一个实施例中,制造包含维持的增殖水平和减少的分化的经修饰的T细胞。在特定实施例中,如下地制造T细胞:通过在一种或多种刺激信号和作为PI3K细胞信号传导路径的抑制剂的试剂存在下刺激T细胞以变得活化和增殖。

[0335] T细胞可接着经修饰以表达抗CD79A CAR。在一个实施例中,通过用包含本文所涵盖的抗CD79A CAR的病毒载体转导T细胞来修饰T细胞。在某一实施例中,在PI3K细胞信号传导路径的抑制剂存在下进行刺激和活化之前修饰T细胞。在另一实施例中,在PI3K细胞信号传导路径的抑制剂存在下进行刺激和活化之后修饰T细胞。在特定实施例中,在PI3K细胞信号传导路径的抑制剂存在下进行刺激和活化的12小时、24小时、36小时或48小时内修饰T细胞。

[0336] 在使T细胞活化之后,培养细胞以使其增殖。可培养T细胞持续至少1、2、3、4、5、6或7天、至少2周、至少1、2、3、4、5或6个月或更久,与1、2、3、4、5、6、7、8、9或10轮或更多轮扩增。

[0337] 在各种实施例中,在一种或多种PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导路径抑制剂存在下制造T细胞组合物。抑制剂可靶向路径中的一种或多种活性或单一活性。不希望受任何特定理论束缚,预期在制造方法的刺激、活化和/或扩增阶段期间用PI3K路径的一种或多种抑制剂处理T细胞或使T细胞与所述一种或多种抑制剂接触会优先增加幼T细胞,由此产生优良的治疗T细胞组合物。

[0338] 在特定实施例中,提供一种增加表达工程改造的T细胞受体的T细胞的增殖的方法。此类方法可包含例如从受试者收集T细胞源,在一种或多种PI3K路径抑制剂存在下刺激和活化T细胞,修饰T细胞以表达抗CD79A CAR,和扩增培养的T细胞。

[0339] 在某一实施例中,涵盖一种用于产生T细胞群体的方法,所述T细胞群体经富集以表达以下生物标记中的一种或多种:CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197、CD38和CD8。在一个实施例中,幼T细胞包含以下生物标记物中的一种或多种,或全部:CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0340] 在一个实施例中,幼T细胞包含以下生物标记中的一种或多种或全部:CD62L、CD127、CD27和CD8。

[0341] 在一个实施例中,提供不表达CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3的幼T细胞。如本文中其它地方所论述,幼T细胞生物标记的表达水平与此类标记在更分化的T细胞或免疫效应细胞群体中的表达水平相关。

[0342] 在一个实施例中,周边血液单核细胞(PBMC)用作本文所涵盖的T细胞制造方法中的T细胞来源。PBMC形成T淋巴细胞的非均质群体,所述T淋巴细胞可为CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺,且可包括其它单核细胞,如单核球、B细胞、NK细胞和NKT细胞。将包含编码特定实施例中所涵盖的工程改造的TCR或CAR的聚核苷酸的表达载体引入至人类供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。在特定实施例中,携有表达载体的成功转导的T细胞可使用流式细胞测量术分选以分离CD3阳性T细胞,且接着进一步繁殖以增加经修饰的T细胞的数目,外加使用抗CD3抗体和或抗CD28抗体和IL-2、IL-7和/或IL-15进行细胞活化。

[0343] 本文所涵盖的制造方法可进一步包含冻存经修饰的T细胞以储存和/或制备用于人类受试者。在一个实施例中,储存表达免疫效应细胞(其靶向表达CD79A的细胞)的遗传修饰的鼠类、人类或人类化CAR蛋白的方法包含冻存免疫效应细胞以使得细胞在解冻时保持活力。一部分表达CAR蛋白的免疫效应细胞可通过所属领域中已知的方法冻存,以提供此类细胞的永久来源,以供将来治疗受表达CD79A的癌细胞折磨的患者。T细胞被冻存以使得细胞在解冻时保持活力。必要时,冻存的经转型免疫效应细胞可被解冻、生长和扩增以得到更多此类细胞。如本文所用,“冻存”是指通过冷却至零下温度,如(通常)77K或-196°C(液氮的沸点)来保存细胞。通常在零下温度使用冷冻保护剂以防止保存的细胞由于低温下的冷冻或升温至室温而受损。冷冻保护剂和最佳冷却速率可防止细胞受损。可使用的冷冻保护剂包括但不限于二甲亚砜(DMSO)(Lovelock和Bishop,《自然》,1959;183:1394-1395; Ashwood-Smith,《自然》,1961;190:1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷(Rinfret,《纽约科学院年报》,1960;85:576)和聚乙二醇(Sloviter和Ravdin,《自然》,1962;196:48)。优选的冷却速率为每分钟1°C至3°C。在至少两小时之后,T细胞已达到-80°C的温度且可直接放入液氮(-196°C)中以永久储存,例如在长期低温储存器皿中。

[0344] 1. T细胞

[0345] 在特定实施例中提供改进的CAR T细胞组合物的制造。用于CAR T细胞制备的T细胞可以是自身的/自体的(“自”)或非自身的(“非自”,例如同种异体的、同基因的或异基因的)。在优选实施例中,T细胞获自哺乳动物受试者。在一更优选实施例中,T细胞获自灵长类动物受试者。在最优选实施例中,T细胞获自人类受试者。

[0346] T细胞可以获自多种来源,包括但不限于周边血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染位点的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施例中,T细胞可以获自使用多种为技术人员已知的技术(例如沉降,例如FICOLL™分离)从受试者收集的血液单位。在一个实施例中,来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术获得。单采血液成分术产物典型地含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白血细胞、红细胞及血小板。在一个实施例中,通过单采血液成分术收集的细胞可以经洗涤以去除血浆部分并且将细胞放在适当缓冲液或培养基中用于后续加工。细胞可以用PBS或用不具有钙、镁和大多数(如果不是全部)其它二价阳离子的另一适合溶液洗涤。如所属领域的一般技术人员将理解,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法(例如通过使用半自动化流通式离心机)实现。举例来说,Cobe 2991细胞加工器、Baxter CytoMate等。在洗涤

之后,细胞可以再悬浮于多种生物相容性缓冲液或具有或不具有缓冲液的其它生理盐水溶液中。在某些实施例中,单采血液成分术样品的不合需要的组分可以在细胞直接再悬浮的培养基中被去除。

[0347] 在特定实施例中,包含T细胞的细胞(例如PBMC)群体用于本文所涵盖的制造方法中。在其它实施例中,分离的或纯化的T细胞群体用于本文所涵盖的制造方法中。细胞可以通过以下方式从周边血液单核细胞(PBMC)分离:例如借助于通过PERCOLL™梯度离心而溶解红血细胞和耗尽单核细胞。在一些实施例中,在分离PBMC之后,细胞毒性和辅助T淋巴细胞都可以在活化、扩增和/或遗传修饰之前或之后分选成原初、记忆和效应T细胞亚群。

[0348] 在特定实施例中,包含T细胞的细胞(例如PBMC)群体用于本文所涵盖的制造方法中。在其它实施例中,分离的或纯化的T细胞群体用于本文所涵盖的制造方法中。细胞可以通过以下方式从周边血液单核细胞(PBMC)分离:例如借助于通过PERCOLL™梯度离心而溶解红血细胞和耗尽单核细胞。在一些实施例中,在分离PBMC之后,细胞毒性和辅助T淋巴细胞都可以在活化、扩增和/或遗传修饰之前或之后分选成原初、记忆和效应T细胞亚群。

[0349] 在特定实施例中,免疫效应细胞群体由使用本文所涵盖的方法进行遗传修饰以表达CAR,但不经受阳性或阴性选择的PBMC制成。在某些实施例中,在分离PBMC之后,T淋巴细胞经进一步分离,并且在某些实施例中,细胞毒性和辅助T淋巴细胞两者都可以在遗传修饰和/或扩增之前或之后分选成原初、记忆和效应T细胞亚群。

[0350] 在某些实施例中,表达以下标记中的一种或多种的T细胞的特定亚群可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离:CD3、CD4、CD8、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62、CD127和HLA-DR。在一个实施例中,表达选自由以下组成的组的标记中的一种或多种的T细胞的特定亚群通过阳性或阴性选择技术进一步分离:i) CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197;ii) CD62L、CD127、CD197和CD38;或iii) CD62L、CD127、CD27和CD8。在各种实施例中,所制造的T细胞组合物不表达或基本上不表达以下标记中的一种或多种:CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3。

[0351] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,选自由以下组成的组的标记中的一种或多种的表达增加了至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍或更多倍:i) CD62L、CD127、CD197和CD38或ii) CD62L、CD127、CD27和CD8。在一个实施例中,T细胞包含CD8⁺ T细胞。

[0352] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,选自由以下组成的群组的标记中的一种或多种的表达减少了至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍或更多倍:CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3。在一个实施例中,T细胞包含CD8⁺ T细胞。

[0353] 在一个实施例中,本文所涵盖的制造方法增加了包含原初或发育有力的T细胞的一种或多种标记的CAR T细胞的数目。不希望受任何特定理论束缚,本发明人相信,用一种或多种PI3K抑制剂处理包含T细胞的细胞群体导致发育有力的T细胞的扩增增加,并且提供了相比于现有CAR T细胞疗法更稳定并且有效的过继CAR T细胞免疫疗法。

[0354] 使用特定实施例中所涵盖的方法制造的T细胞中增加的原初或发育有力的T细胞的标记的说明性实例包括但不限于i) CD62L、CD127、CD197和CD38,或ii) CD62L、CD127、CD27

和CD8。在特定实施例中,原初T细胞不表达或不实质上表达以下标记中的一种或多种:CD57、CD244、CD160、PD-1、BTLA、CD45RA、CTLA4、TIM3和LAG3。

[0355] 相对于T细胞,由本文所涵盖的各种扩增方法产生的T细胞群体可以取决于所利用的条件而具有多种特定表型性质。在各种实施例中,扩增的T细胞群体包含以下表型标记中的一种或多种:CD62L、CD27、CD127、CD197、CD38、CD8和HLA-DR。

[0356] 在一个实施例中,此类表型标记包括CD62L、CD127、CD197和CD38中的一种或多种或全部的增强的表达。在特定实施例中,使特征在于原初T细胞的表型标记(包括CD62L、CD127、CD197和CD38)的表达的CD8⁺ T淋巴细胞扩增。

[0357] 在一个实施例中,此类表型标记包括CD62L、CD127、CD27和CD8中的一种或多种或全部的增强的表达。在特定实施例中,使特征在于原初T细胞的表型标记(包括CD62L、CD127、CD27和CD8)的表达的CD8⁺ T淋巴细胞扩增。

[0358] 在特定实施例中,使特征在于中央记忆T细胞的表型标记(包括CD45RO、CD62L、CD127、CD197和CD38)的表达并且对于粒酶B呈阴性的T细胞扩增。在一些实施例中,中央记忆T细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺ T细胞。

[0359] 在某些实施例中,使特征在于原初CD4⁺细胞的表型标记(包括CD62L)的表达并且对于CD45RA和/或CD45RO的表达呈阴性的CD4⁺ T淋巴细胞扩增。在一些实施例中,特征在于中央记忆CD4⁺细胞的表型标记(包括CD62L和CD45RO)的表达的CD4⁺细胞阳性。在一些实施例中,效应CD4⁺细胞是CD62L阳性并且CD45RO阴性的。

[0360] 在某些实施例中,T细胞从个体分离,并且在体外经活化和刺激以增殖,随后经遗传修饰以表达抗CD79A CAR。在这点上,T细胞可以在经遗传修饰(即,转导或转染以表达本文所涵盖的抗CD79A CAR)之前和/或之后进行培养。

[0361] 2.活化和扩增

[0362] 为了实现T细胞组合物的充足治疗剂量,T细胞通常经历一轮或多轮刺激、活化和/或扩增。T细胞可以通常使用如例如美国专利6,352,694、6,534,055、6,905,680、6,692,964、5,858,358、6,887,466、6,905,681、7,144,575、7,067,318、7,172,869、7,232,566、7,175,843、5,883,223、6,905,874、6,797,514和6,867,041中所描述的方法来活化和扩增,所述美国专利各自以全文引用的方式并入本文中。经修饰以表达抗CD79A CAR的T细胞可以在T细胞经修饰之前和/或之后经活化和扩增。另外,T细胞可以在活化和/或扩增之前、期间和/或之后与一种或多种调节PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导路径的试剂接触。在一个实施例中,通过本文所涵盖的方法制造的T细胞经历一轮、两轮、三轮、四轮或五轮或更多轮活化和扩增,其中的每一者可包括一种或多种调节PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导路径的试剂。

[0363] 相比于使用天然APC,人工抗原呈递细胞(aAPC)支持功能性人类CD8⁺ T细胞的离体生长和长期扩增,而不需要添加外源细胞因子。在特定实施例中,使PBMC或经分离T细胞与一般附着到珠粒或其它表面的刺激试剂和共刺激试剂(如抗CD3和抗CD28抗体)在具有合适的细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)的培养基中接触。

[0364] 在其它实施例中,人工APC(aAPC)通过工程改造K562、U937、721.221、T2和C1R细胞以导引多种共刺激分子和细胞因子的稳定表达和分泌而制备。在特定实施例中,使用K32或U32 aAPC导引一种或多种基于抗体的刺激分子在AAPC细胞表面上的呈现。T细胞群体可以通过表达多种共刺激分子(包括但不限于CD137L(4-1BBL)、CD134L(OX40L)和/或CD80或

CD86)的aAPC来扩增。aAPC提供有效的平台用以扩增经遗传修饰的T细胞且维持在CD8⁺ T上的CD28表达。在WO 03/057171和US2003/0147869中提供的aAPC以全文引用的方式并入本文中。

[0365] 在一个实施例中,共刺激配体呈现于特异性结合T细胞上的同源共刺激分子的抗原呈递细胞(例如aAPC、树突状细胞、B细胞等)上,由此除了通过例如结合TCR/CD3复合物而提供的初级信号之外,还提供介导所需T细胞应答的信号。适合共刺激配体包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、ILT3、ILT4、结合To11配体受体的激动剂或抗体、以及特异性结合B7-H3的配体。

[0366] 在特定实施例中,共刺激配体包含特异性结合至存在于T细胞上的共刺激分子的抗体或其抗原结合片段,包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83的配体。

[0367] 适合共刺激配体进一步包括靶抗原,其可以以可溶形式提供或表达于结合表达于经修饰的T细胞上的经工程改造的TCR或CAR的APC或aAPC上。

[0368] 在各种实施例中,本文所涵盖的制造T细胞的方法包含活化包含T细胞的细胞群体和使T细胞群体扩增。T细胞活化可以通过经由T细胞TCR/CD3复合物或经由刺激CD2表面蛋白提供初级刺激信号和通过经由辅助分子(例如CD28)提供二级共刺激信号而实现。

[0369] TCR/CD3复合物可以通过使T细胞与适合CD3结合剂(例如CD3配体或抗CD3单克隆抗体)接触而受刺激。CD3抗体的说明性实例包括但不限于OKT3、G19-4、BC3和64.1。

[0370] 在另一实施例中,CD2结合剂可以用于向T细胞提供初级刺激信号。CD2结合剂的说明性实例包括但不限于CD2配体和抗CD2抗体,例如T11.3抗体与T11.1或T11.2抗体的组合(Meuer, S.C.等人(1984)《细胞》36:897-906)和9.6抗体(其识别与TI 1.1相同的表位)与9-1抗体的组合(Yang, S.Y.等人(1986)《免疫学杂志》137:1097-1100)。也可以使用结合到与以上所描述抗体中的任一种相同的表位的其它抗体。其它抗体或抗体组合可以通过如本文中其它地方所公开的标准技术来制备和鉴别。

[0371] 除了经由TCR/CD3复合物或经由CD2提供的初级刺激信号之外,诱导T细胞应答需要第二共刺激信号。在特定实施例中,CD28结合剂可以用于提供共刺激信号。CD28结合剂的说明性实例包括但不限于:天然CD 28配体,例如CD28的天然配体(例如B7蛋白质家族的成员,例如B7-1 (CD80)和B7-2 (CD86));和能够交联CD28分子的抗CD28单克隆抗体或其片段,例如单克隆抗体9.3、B-T3、XR-CD28、KOLT-2、15E8、248.23.2和EX5.3D10。

[0372] 在一个实施例中,提供初级刺激信号的分子(例如经由TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)与共刺激分子偶合至相同表面。

[0373] 在某些实施例中,提供刺激和共刺激信号的结合剂定位于细胞表面上。这可以通过用编码结合剂(呈适用于其于细胞表面上表达的形式)的核酸转染或转导细胞、或者通过使结合剂偶合到细胞表面而实现。

[0374] 在另一实施例中,提供初级刺激信号的分子(例如经由TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)与共刺激分子呈现于抗原呈现细胞上。

[0375] 在一个实施例中,提供初级刺激信号的分子(例如经由TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)与共刺激分子提供于独立表面上。

[0376] 在某一实施例中,提供刺激和共刺激信号的结合剂之一是可溶的(提供于溶液中)并且其它结合剂提供于一个或多个表面上。

[0377] 在特定实施例中,提供刺激和共刺激信号的结合剂都以可溶形式提供(提供于溶液中)。

[0378] 在各种实施例中,本文所涵盖的制造T细胞的方法包含用抗CD3和抗CD28抗体活化T细胞。

[0379] 由特定实施例中所涵盖的方法制造的T细胞组合物包含在一种或多种抑制PI3K细胞信号传导路径的试剂存在下活化和/或扩增的T细胞。经修饰以表达抗CD79A CAR的T细胞可以在T细胞经修饰之前和/或之后经活化和扩增。在特定实施例中,T细胞群体经活化,经修饰以表达抗CD79A CAR,且接着经培养以便扩增。

[0380] 在一个实施例中,通过本文所涵盖的方法制造的T细胞包含增加数目的表达指示高增殖潜力并且能够自我更新的标记但不表达或实质上表达不可检测的T细胞分化标记的T细胞。这些T细胞可以以稳定方式反复地活化和扩增并且由此提供改进的治疗T细胞组合物。

[0381] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,在一种或多种抑制PI3K细胞信号传导路径的试剂存在下活化和扩增的T细胞群体扩增至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少1000倍或更多倍。

[0382] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,特征在于幼龄T细胞标记的表达的T细胞群体在一种或多种抑制PI3K细胞信号传导路径的试剂存在下活化和扩增,扩增至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少1000倍或更多倍。

[0383] 在一个实施例中,使通过本文所涵盖的方法活化的T细胞扩增进一步包含培养包含T细胞的细胞群体持续几小时(约3小时)至约7天至约28天或中间的任何每小时整数值。在另一实施例中,可以培养T细胞组合物14天。在一特定实施例中,培养T细胞约21天。在另一实施例中,培养T细胞组合物约2-3天。还可能需若干刺激/活化/扩增循环,使得T细胞的培养时间可以是60天或更久。

[0384] 在特定实施例中,适合于T细胞培养的条件包括适当培养基(例如最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-Vivo 15(Lonza));和一种或多种为增殖和存活所需要的因子,包括但不限于血清(例如胎牛或人类血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或熟练技术人员已知的适用于细胞生长的任何其它添加剂。

[0385] 细胞培养基的其它说明性实例包括但不限于RPMI 1640、Clicks、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,具有添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或对于T细胞的生长和扩增足够的量的细胞因子。

[0386] 其它用于T细胞扩增的添加剂的说明性实例包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白制剂、pH缓冲剂(例如HEPES)和还原剂(例如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇)。

[0387] 抗生素(例如青霉素和链霉素)仅包括于实验培养物中,不包括于待输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞维持在支持生长所必需的条件下,例如适当温度(例如37℃)和气氛(例如空气加5%CO₂)。

[0388] 3. 试剂

[0389] 在各种实施例中,提供了一种使未分化的或发育有力的T细胞扩增的制造T细胞的方法,其包含使T细胞与调节细胞中的PI3K路径的试剂接触。在各种实施例中,提供了一种使未分化的或发育有力的T细胞扩增的制造T细胞的方法,其包含使T细胞与调节细胞中的PI3K/AKT/mTOR路径的试剂接触。细胞可以在活化和扩增之前、期间和/或之后进行接触。T细胞组合物保留充足T细胞效力,使得其可以经历多轮扩增而不使分化实质性增加。

[0390] 如本文所用,术语“调节”、“调节剂(modulator)”或“调节剂(modulatory agent)”或类似术语是指试剂引发细胞信号传导路径的变化的能力。调节剂可以增加或减小路径组分的量、活性或增加或减小细胞信号传导路径的所要效果或结果。在一个实施例中,调节剂是抑制剂。在另一实施例中,调节剂是活化剂。

[0391] “试剂”是指用于调节PI3K/AKT/mTOR路径的化合物、小分子(例如小有机分子)、核酸、多肽或其片段、同工型、变异体、类似物或衍生物。

[0392] “小分子”是指分子量小于约5kD、小于约4kD、小于约3kD、小于约2kD、小于约1kD或小于约.5kD的组合物。小分子可以包含核酸、肽、多肽、肽模拟物、类肽、碳水化合物、脂质、其组分或其它有机或无机分子。化学和/或生物混合物库(例如真菌、细菌或藻类提取物)在所属领域中是已知的并且可以用任一分析来筛选。合成分子库的方法的实例可以见于(Carell等人,1994a;Carell等人,1994b;Cho等人,1993;DeWitt等人,1993;Gallop等人,1994;Zuckermann等人,1994)中。

[0393] “类似物”是指具有与化合物、核苷酸、蛋白质或多肽或化合物类似或相同的活性或功能的小有机化合物、核苷酸、蛋白质或多肽,或具有所需活性,但未必包含与优选实施例的序列或结构类似或相同的序列或结构的化合物。

[0394] “衍生物”是指包含已经通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变的亲本蛋白质或多肽、或已经通过引入核苷酸取代或缺失、添加或突变而修饰的核酸或核苷酸的氨基酸序列的化合物、蛋白质或多肽。衍生核酸、核苷酸、蛋白质或多肽具有与亲本多肽类似或相同的功能。

[0395] 在各种实施例中,调节PI3K路径的试剂活化路径组分。“活化剂”或“激动剂”是指促进、增加或诱导PI3K/AKT/mTOR路径中的分子的一种或多种活性的试剂,包括但不限于活化PI3K的一种或多种活性的分子。

[0396] 在各种实施例中,调节PI3K路径的试剂抑制路径组分。“抑制剂”或“拮抗剂”是指抑制、减少或降低PI3K/AKT/mTOR路径中的分子的一种或多种活性的试剂,包括但不限于抑制PI3K的一种或多种活性的分子。在一个实施例中,抑制剂是双重分子抑制剂。在特定实施例中,抑制剂可以抑制一类具有相同或实质上类似活性的分子(泛抑制剂)或可以特异性抑制分子的活性(选择性或特异性抑制剂)。抑制还可以是不可逆或可逆的。

[0397] 在一个实施例中,抑制剂的IC₅₀是至少1nM、至少2nM、至少5nM、至少10nM、至少50nM、至少100nM、至少200nM、至少500nM、至少1μM、至少10μM、至少50μM或至少100μM。IC₅₀测定可以使用所属领域中已知的任何常规技术实现。举例来说,IC₅₀可以通过测量既定酶

在一系列浓度的研究抑制剂存在下的活性而测定。然后绘制以实验方式获得的酶活性值相对于所用抑制剂浓度。展示出50%酶活性(相比于在不存在任何抑制剂的情况下的活性)的抑制剂的浓度被视为“IC₅₀”值。类似地,可以通过活性的恰当测定定义其它抑制性浓度。

[0398] 在各种实施例中,T细胞与一种或多种以下浓度的PI3K/AKT/mTOR路径调节剂接触或经其处理或培养:至少1nM、至少2nM、至少5nM、至少10nM、至少50nM、至少100nM、至少200nM、至少500nM、至少1 μ M、至少10 μ M、至少50 μ M、至少100 μ M或至少1M。

[0399] 在特定实施例中,T细胞可以与一种或多种PI3K/AKT/mTOR路径调节剂接触或经其处理或培养,持续至少12小时、18小时、至少1、2、3、4、5、6或7天、至少2周、至少1、2、3、4、5或6个月或更久,与1、2、3、4、5、6、7、8、9或10轮或更多轮扩增。

[0400] 磷脂酰-肌醇-3激酶/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶路径充当整合生长因子信号传导与细胞增殖、分化、代谢和存活的渠道。PI3K是高度保守的胞内脂质激酶家族。IA类PI3K直接地或经由与胰岛素受体底物家族的衔接分子相互作用由生长因子受体酪氨酸激酶(RTK)活化。此活性导致产生3,4,5-三磷酸磷脂酰-肌醇(PIP₃),丝氨酸/苏氨酸激酶Akt的调节子。mTOR通过典型PI3K路径经由2种各自特征在于赋予独特活性的不同结合伴侣的独特复合物作用。mTORC1(mTOR与PRAS40、raptor和mLST8/GbL的复合物)充当PI3K/Akt信号传导的下游效应子,使生长因子信号与蛋白质翻译、细胞生长、增殖和存活相关。mTORC2(mTOR与rictor、mSIN1、protor和mLST8的复合物)充当Akt的上游活化子。

[0401] 在生长因子受体介导的PI3K活化后,Akt经由其普列克底物蛋白同源域与PIP₃的相互作用募集到膜,因此暴露其活化环并且通过组成型活性的磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)实现苏氨酸308(Thr308)处的磷酸化。为获得最大活化,Akt还通过mTORC2在其C末端疏水性基序的丝氨酸473(Ser473)处磷酸化。DNA-PK和HSP也已经显示在调节Akt活性方面很重要。Akt经由TSC2的抑制性磷酸化活化mTORC1,TSC2与TSC1一起通过抑制Rheb GTP酶(mTORC1的正调节子)来负调节mTORC1。mTORC1具有2种定义明确的底物,p70S6K(下文称为S6K1)和4E-BP1,其均审慎地调节蛋白质合成。因此,mTORC1是PI3K的重要下游效应子,使生长因子信号传导与蛋白质翻译和细胞增殖相关。

[0402] a.PI3K抑制剂

[0403] 如本文所用,术语“PI3K抑制剂”是指结合到PI3K并且抑制其至少一种活性的核酸、肽、化合物或小有机关分子。PI3K蛋白可以分成三类,1类PI3K、2类PI3K和3类PI3K。1类PI3K以由四种p110催化亚单位(p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ)之一和两种调节亚单位家族之一组成的杂二聚体形式存在。PI3K抑制剂优选靶向1类PI3K抑制剂。在一个实施例中,PI3K抑制剂将呈现对1类PI3K抑制剂的一种或多种同工型的选择性(即,对p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 、或p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 中的一种或多种的选择性)。在另一方面,PI3K抑制剂将不呈现同工型选择性并且被视为“泛PI3K抑制剂”。在一个实施例中,PI3K抑制剂将与ATP为结合到PI3K催化域而竞争。

[0404] 在某些实施例中,PI3K抑制剂可以例如靶向PI3K以及PI3K-AKT-mTOR路径中的其它蛋白质。在特定实施例中,靶向mTOR和PI3K两者的PI3K抑制剂可以被称为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展现比关于mTOR和/或路径中的其它蛋白质的抑制剂IC₅₀低至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍的关于PI3K的

50%抑制浓度的试剂。

[0405] 在特定实施例中,例示性PI3K抑制剂以约200nM或更小、优选约100nM或更小、甚至更优选约60nM或更小、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更小的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、更优选约2nM至约50nM、甚至更优选约2nM至约15nM的IC₅₀抑制PI3K。

[0406] 适用于特定实施例中所涵盖的T细胞制造方法中的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)、(泛PI3K抑制剂,GlaxoSmithKline)和PX-866(1类PI3K抑制剂;p110 α 、p110 β 和p110 γ 同工型,Oncothyreon)。

[0407] 选择性PI3K抑制剂的其它说明性实例包括但不限于BYL719、GSK2636771、TGX-221、AS25242、CAL-101、ZSTK474和IPI-145。

[0408] 泛-PI3K抑制剂的其它说明性实例包括但不限于BEZ235、LY294002、GSK1059615、TG100713和GDC-0941。

[0409] 在优选实施例中,PI3K抑制剂是ZSTK474。

[0410] b. AKT抑制剂

[0411] 如本文所用,术语“AKT抑制剂”是指抑制AKT的至少一种活性的核酸、肽、化合物或小有有机分子。AKT抑制剂可以分组成若干类,包括基于脂质的抑制剂(例如靶向AKT的防止AKT定位到质膜的普列克底物蛋白(pleckstrin)同源性域的抑制剂)、ATP竞争性抑制剂和变构抑制剂。在一个实施例中,AKT抑制剂通过结合到AKT催化位点而作用。在特定实施例中,Akt抑制剂通过抑制下游AKT靶(例如mTOR)的磷酸化而作用。在另一实施例中,AKT活性通过经由抑制例如AKT的DNA-PK活化、AKT的PDK-1活化和/或Akt的mTORC2活化来抑制活化Akt的输入信号而受抑制。

[0412] AKT抑制剂可以靶向所有三种AKT同工型AKT1、AKT2、AKT3,或可以是同工型选择性的并且仅靶向一种或两种AKT同工型。在一个实施例中,AKT抑制剂可以靶向AKT以及PI3K-AKT-mTOR路径中的其它蛋白质。仅靶向AKT的AKT抑制剂可以被称为选择性AKT抑制剂。在一个实施例中,选择性AKT抑制剂可以理解为指展现比关于途径中的其它蛋白质的抑制剂IC₅₀低至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍的关于AKT的50%抑制浓度的试剂。

[0413] 在特定实施例中,例示性AKT抑制剂以约200nM或更小、优选约100nM或更小、甚至更优选约60nM或更小、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更小的IC₅₀(抑制50%活性的浓度)抑制AKT。在一个实施例中,AKT以约2nM至约100nM、更优选约2nM至约50nM、甚至更优选约2nM至约15nM的IC₅₀抑制AKT。

[0414] 与基于奥瑞他汀的抗体-药物结合物组合使用的AKT抑制剂的说明性实例包括例如哌立福新(Keryx)、MK2206(Merck)、VQD-002(VioQuest)、XL418(Exelixis)、GSK690693、GDC-0068和PX316(PROLX Pharmaceuticals)。

[0415] 选择性Akt1抑制剂的说明性非限制性实例是A-674563。

[0416] 选择性Akt2抑制剂的说明性非限制性实例是CCT128930。

[0417] 在特定实施例中,Akt抑制剂Akt的DNA-PK活化、Akt的PDK-1活化、Akt的mTORC2活化或Akt的HSP活化。

[0418] DNA-PK抑制剂的说明性实例包括但不限于NU7441、PI-103、NU7026、PIK-75和PP-121。

[0419] c.mTOR抑制剂

[0420] 术语“mTOR抑制剂”或“抑制mTOR的试剂”是指抑制其至少一种底物(例如p70S6激酶1、4E-BP1、AKT/PKB和eEF2)上的mTOR蛋白的至少一种活性(例如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性)的核酸、肽、化合物或小有机分子。mTOR抑制剂能够直接结合到并且抑制mTORC1、mTORC2或mTORC1和mTORC2两者。

[0421] mTORC1和/或mTORC2活性的抑制可以通过PI3K/Akt/mTOR路径的信号转导的降低来测定。多种多样的读出可以用以确立所述信号传导路径的输出的降低。一些非限制性示例性读出包括(1)包括但不限于5473和T308的残基处Akt磷酸化的降低;(2)Akt活化的降低,如例如Akt底物(包括但不限于FoxO1/3a T24/32、GSK3 α /β、S21/9和TSC2 T1462)的磷酸化的降低所证明;(3)mTOR下游的信号传导分子(包括但不限于核糖体S6 S240/244、70S6K T389和4EBP1 T37/46)的磷酸化的降低;和(4)癌细胞的增殖的抑制。

[0422] 在一个实施例中,mTOR抑制剂是活性位点抑制剂。这些是结合到mTOR的ATP结合位点(也称为ATP结合袋)并且抑制mTORC1和mTORC2两者的催化活性的mTOR抑制剂。适用于特定实施例中所涵盖的T细胞制造方法的一类活性位点抑制剂是靶向并且直接抑制PI3K和mTOR两者的双重特异性抑制剂。双重特异性抑制剂结合到mTOR和PI3K两者的ATP结合位点。所述抑制剂的说明性实例包括但不限于:咪唑并喹唑啉、渥曼青霉素、LY294002、PI-103 (Cayman Chemical)、SF1126 (Semafore)、BGT226 (Novartis)、XL765 (Exelixis) 和NVP-BEZ235 (Novartis)。

[0423] 适用于特定实施例中所涵盖的方法的另一类mTOR活性位点抑制剂相对于一种或多种I型磷脂酰肌醇3激酶(例如PI3激酶 α 、 β 、 γ 或 δ)选择性地抑制mTORC1和mTORC2活性。这些活性位点抑制剂结合至mTOR的活性位点但不结合至PI3K的活性位点。所述抑制剂的说明性实例包括但不限于:吡唑并嘧啶、Torin1 (Guertin和Sabatini)、PP242 (2-(4-氨基-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-1H-吡唑-5-醇)、PP30、Ku-0063794、WAY-600 (Wyeth)、WAY-687 (Wyeth)、WAY-354 (Wyeth) 和AZD8055 (Liu等人,自然综述 (Nature Review), 8,627-644,2009)。I

[0424] 在一个实施例中,选择性mTOR抑制剂是指展现比关于一种、两种、三种或更多种I型PI3激酶或所有I型PI3激酶的抑制剂IC₅₀低至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍的关于mTORC1和/或mTORC2的50%抑制浓度(IC₅₀)的试剂。

[0425] 另一类mTOR抑制剂在本文中称为“雷帕霉素类似物”。如本文所用,术语“雷帕霉素类似物”是指特异性结合到mTOR FRB域(FKBP雷帕霉素结合域)、结构上与雷帕霉素相关并且保留mTOR抑制性质的化合物。术语雷帕霉素类似物排除了雷帕霉素。雷帕霉素类似物包括雷帕霉素的酯、醚、肟、腈和羟胺以及雷帕霉素核心结构上的官能团已经通过还原或氧化而改性的化合物。所述化合物的药学上可接受的盐也被视为雷帕霉素衍生物。适用于特定实施例中所涵盖的方法的雷帕霉素类似物的说明性实例包括但不限于坦罗莫司(temsirolimus) (CC1779)、依维莫司(everolimus) (RAD001)、地磷莫司(deforolimus) (AP23573)、AZD8055 (AstraZeneca) 和OSI-027 (OSI)。

[0426] 在一个实施例中,试剂是mTOR抑制剂雷帕霉素(西罗莫司(sirolimus))。

[0427] 在特定实施例中, 例示性mTOR抑制剂以约200nM或更小、优选约100nM或更小、甚至更优选约60nM或更小、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更小的IC₅₀ (抑制50%活性的浓度) 抑制mTORC1、mTORC2或mTORC1和mTORC2两者。在一个方面, mTOR抑制剂以约2nM至约100nM、更优选约2nM至约50nM、甚至更优选约2nM至约15nM的IC₅₀抑制mTORC1、mTORC2或mTORC1和mTORC2两者。

[0428] 在一个实施例中, 例示性mTOR抑制剂以约200nM或更小、优选约100nM或更小、甚至更优选约60nM或更小、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更小的IC₅₀ (抑制50%活性的浓度) 抑制PI3K和mTORC1或mTORC2或mTORC1和mTORC2两者和PI3K。在一个方面, mTOR抑制剂以约2nM至约100nM、更优选约2nM至约50nM、甚至更优选约2nM至约15nM的IC₅₀抑制PI3K和mTORC1或mTORC2或mTORC1和mTORC2两者和PI3K。

[0429] 适用于特定实施例中的mTOR抑制剂的其它说明性实例包括但不限于AZD8055、INK128、雷帕霉素、PF-04691502和依维莫司。

[0430] mTOR据显示对生理底物蛋白p70 S6核糖体蛋白激酶I (p70S6K1) 和eIF4E结合蛋白1 (4EBP1) 展现稳定并且特异性催化活性, 如在蛋白质印迹法 (Western blotting) 中通过磷光体特异性抗体所测量。

[0431] 在一个实施例中, PI3K/AKT/mTOR路径的抑制剂是选自由以下组成的组的s6激酶抑制剂: BI-D1870、H89、PF-4708671、FMK和AT7867。

[0432] H. 组合物和调配物

[0433] 本文所涵盖的组合物可包含一种或多种如本文所涵盖的CAR多肽、聚核苷酸、包含其的载体、经遗传修饰的免疫效应细胞等。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指调配于药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中用于单独或与一种或多种其它治疗模式组合向细胞或动物给予的组合物。还应理解, 必要时, 组合物还可以与其它试剂 (例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种医药学活性剂) 组合给予。对也可以包括于组合物中的其它组分几乎没有限制, 只要其它试剂不会不利地影响组合物传递预期治疗的能力即可。

[0434] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理医学判断范围内, 适用于与人类和动物的组织接触而无过量毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症, 与合理效益/风险比相称的那些化合物、物质、组合物和/或剂型。

[0435] 如本文所用, “药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已经由美国食品和药物管理局 (the United States Food and Drug Administration) 批准为对于用于人类或家畜可接受的任何佐剂、载剂、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、风味增强剂、表面活性剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等张剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。例示性医药学上可接受的载剂包括但不限于糖, 例如乳糖、葡萄糖和蔗糖; 淀粉, 例如玉米淀粉和马铃薯淀粉; 纤维素和其衍生物, 例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素; 黄蓍胶; 麦芽; 明胶; 滑石; 可可脂、蜡、动物和植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌; 油, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; 二醇, 例如丙二醇; 多元醇, 例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇; 酯, 例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; 海藻酸; 无热原质水; 等张生理盐水; 林格氏溶液 (Ringer's solution); 乙醇; 磷酸盐缓冲溶液; 以及医药调配物中采用的任何其它相容物

质。

[0436] 在特定实施例中,组合物包含一定量的本文中所涵盖的表达CAR的免疫效应细胞。如本文所用,术语“量”是指经遗传修饰的治疗细胞(例如T细胞)实现有益或所需预防性或治疗性结果(包括临床结果)的“有效的量”或“有效量”。

[0437] “预防有效量”是指经遗传修饰的治疗细胞有效实现所要预防结果的量。典型地但未必,因为预防性剂量在疾病之前或在疾病的较早阶段用于受试者,所以预防有效量小于治疗有效量。

[0438] 经遗传修饰的治疗细胞的“治疗有效量”可以根据例如以下的因素而变化:疾病状态;个体的年龄、性别和体重;以及干细胞和祖细胞引发个体中的所需应答的能力。治疗有效量还是病毒或转导的治疗细胞的任何毒性或有害效果被治疗有益效果超过的量。术语“治疗有效量”包含有效“治疗”受试者(例如患者)的量。当指定治疗量时,待给予的组合物的精确量可以由医师在考虑个体在年龄、重量、肿瘤尺寸、感染或癌转移程度以及患者(受试者)的病况方面的差异情况下确定。通常可以规定,包含本文所描述T细胞的药物组合物可以按 10^2 至 10^{10} 个细胞/kg体重、优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重(包括那些范围内的所有整数值)的剂量给予。细胞数目将取决于组合物预期用于的最终用途和其中包括的细胞的类型。对于本文所提供的使用,细胞的体积一般为一升或更少,可以为500mL或更少、甚至250mL或100mL或更少。因此,所要细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/毫升,并且通常大于 10^7 个细胞/毫升,通常是 10^8 个细胞/毫升或更大。临床相关数目的免疫细胞可以分配成多个累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} 个细胞的输注。在一些方面,特别是由于全部输注细胞将重定向至特定靶抗原,所以可以给予较低数目的细胞,在 10^6 个/千克(每名患者 10^6 - 10^{11} 个)范围内。表达CAR的细胞组合物可以按这些范围内的剂量多次给予。细胞对于经历治疗的患者可以是同种异体的、同基因的、异基因的或自身的。必要时,治疗还可以包括如本文所述给予有丝分裂原(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)以增强免疫应答的诱导。

[0439] 一般来说,包含如本文所述活化和扩增的细胞的组合物可以用于治疗和预防在免疫功能不全的个体中产生的疾病。在特定实施例中,包含本文所涵盖的CAR修饰的T细胞的组合物用于治疗癌症。CAR修饰的T细胞可以单独给予或以与载剂、稀释剂、赋形剂和/或其它组分(例如IL-2或其它细胞因子或细胞群体)组合的药物组合物形式给予。在特定实施例中,药物组合物包含一定量的经遗传修饰的T细胞,以及一种或多种药理学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0440] 包含表达CAR的免疫效应细胞群体(例如T细胞)的药物组合物可以包含缓冲剂,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸,例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。组合物优选经调配以用于肠胃外给予,例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌肉内给予。

[0441] 液体药物组合物(其呈溶液、悬浮液或其它类似形式)可包括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、等张氯化钠;不挥发性油,如可充当溶剂或悬浮介质的合成单或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;

抗细菌剂,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、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以将肠胃外制剂密封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。

[0442] 在一个实施例中,本文所涵盖的T细胞组合物在医药学上可接受的细胞培养基中调配。这类组合物适于向人类受试者给予。在特定实施例中,医药学上可接受的细胞培养基是无血清培养基。

[0443] 与含有血清的培养基相比,无血清培养基具有几个优点,包括组成简化且更明确、污染程度降低、潜在感染物来源消除并且成本更低。在各种实施例中,无血清培养基无动物成分,且可以任选地无蛋白质。任选地,培养基可以含有生物药学上可接受的重组蛋白。“无动物成分”培养基是指其中组分来源于非动物来源的培养基。重组蛋白置换无动物成分培养基中的天然动物蛋白质并且营养是从合成、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。

[0444] 用于特定组合物中的无血清培养基的说明性实例包括但不限于QBSF-60 (Quality Biological, Inc.)、StemPro-34 (Life Technologies) 和X-VIVO 10。

[0445] 在一个优选实施例中,包含本文所涵盖的免疫效应细胞的组合物是在包含PlasmaLyte A的溶液中调配。

[0446] 在另一优选实施例中,包含本文所涵盖的免疫效应细胞的组合物是在包含冻存培养基的溶液中调配。例如,可以使用含冻存剂的冻存培养基在解冻后维持高细胞活力结果。特定组合物中所用的冻存培养基的说明性实例包括但不限于CryoStor CS10、CryoStor CS5和CryoStor CS2。

[0447] 在一个更优选实施例中,包含本文所涵盖的免疫效应细胞的组合物是在包含50:50PlasmaLyte A:CryoStor CS10的溶液中调配。

[0448] 在特定实施例中,组合物包含有效量的单独或与一种或多种治疗剂组合的表达CAR的免疫效应细胞。因此,表达CAR的免疫效应细胞组合物可以单独或其它已知癌症治疗(例如辐射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力疗法等)组合给予。组合物还可以与抗生素组合给予。这类治疗剂在所属领域中可以接受为如本文所述的特定疾病状态(例如特定癌症)的标准治疗。特定实施例中所涵盖的例示性治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、消炎剂、化学治疗剂、放射治疗剂、治疗抗体或其它活性和辅助性试剂。

[0449] 在某些实施例中,包含本文所公开的表达CAR的免疫效应细胞的组合物可以与多种化学治疗剂结合给予。化学治疗剂的说明性实例包括烷基化剂,例如噻替派和环磷酰胺(CYTOXANTM);烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,例如苯唑多巴、卡波醌、米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;氮芥,例如氯芥苯丁酸、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、二氯甲二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、胆固醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲洛磷胺、尿嘧啶芥末;亚硝基脲,例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀

(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷诺莫司汀(ranimustine); 抗生素, 例如阿克拉霉素、放射菌素、奥斯拉菌素、氮杂丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡奇霉素、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾达霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泼非霉素、嘌呤霉素、奎那霉素、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin); 抗代谢物, 例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 例如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙; 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双去氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷、5-FU; 雄激素, 例如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺, 例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 例如亚叶酸; 醋葡萄糖内酯; 醛磷酸胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 安吡啶; 倍思塔布(bestrabucil); 比山群(bisantrene); 艾达曲克(edatraxate); 得弗伐胺(defofamine); 秋水仙碱; 地吡醌; 艾福米辛(elformithine); 乙酸依利铵; 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脞; 米托蒽醌; 莫派达醇; 尼曲吡啶; 喷司他汀(pentostatin); 凡那明; 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼酸; 2-乙酰肼; 丙卡巴肼; **PSK®**; 雷佐生; 西佐喃; 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2"-三氯三乙胺; 乌拉坦; 长春地辛; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露氮芥; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 甲托辛; 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酸胺; 噻替派; 类紫杉醇, 例如太平洋紫杉醇(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 和多西他赛(doxetaxel) (**TAXOTERE®**, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 氯芥苯丁酸; 吉西他滨(gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷(etoposide) (VP-16); 异环磷酸胺; 丝裂霉素C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨; 诺维本(navelbine); 诺安托(novantrone); 替尼泊苷(teniposide); 道诺霉素; 氨基嘌呤; 希罗达(xeloda); 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 视黄酸衍生物, 例如Targretin™(贝瑟罗汀(bexarotene))、Panretin™(亚利崔托宁(alitretinoin)); ONTAK™(地尼白介素(denileukin diftitox)); 埃斯波霉素(esperamicins); 卡培他滨(capecitabine); 和以上中的任一种的医药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义中还包括用以调节或抑制激素对癌症的作用的抗激素剂, 例如抗雌激素, 包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通(Fareston)); 和抗雄激素, 例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林; 以及以上中的任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0450] 多种其它治疗剂可以与本文所描述的组合物结合使用。在一个实施例中, 包含表达CAR的免疫效应细胞的组合物与消炎剂一起给予。消炎剂或药物包括但不限于类固醇和糖皮质激素(包括倍他米松(betamethasone)、布地奈德(budesonide)、地塞米松(dexamethasone)、乙酸氢皮质酮(hydrocortisone acetate)、氢皮质酮(hydrocortisone)、氢皮质酮、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、泼尼松龙

(prednisolone)、泼尼松(prednisone)、曲安西龙(triamcinolone));非类固醇消炎药物(NSAIDs),包括阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、甲氨蝶呤(methotrexate)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、来氟米特(leflunomide)、抗TNF药剂、环磷酰胺和霉酚酸酯(mycophenolate)。

[0451] 其它例示性NSAID选自由以下组成的组:布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2抑制剂(例如VIOXX®(罗非昔布(rofecoxib)) and CELEBREX®(塞内昔布(celecoxib)))和噻液酸酯。例示性止痛剂选自由以下组成的组:对乙酰氨基酚、羟考酮、曲马多的丙氧吩盐酸盐。例示性糖皮质激素选自由以下组成的组:可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙或泼尼松。例示性生物应答修饰剂包括针对细胞表面标记(例如CD4、CD5等)的分子、细胞因子抑制剂(例如TNF拮抗剂(例如依那西普(etanercept)(ENBREL®)、阿达木单抗(adalimumab)(HUMIRA®)和英利昔单抗(infliximab)(REMICADE®)))、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答修饰剂包括单克隆抗体以及分子的重组形式。例示性DMARD包括硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢霉素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟氯奎宁、金(口服(金诺芬)和肌肉内)和米诺环素。

[0452] 适用于与特定实施例中所涵盖的CAR修饰的T细胞组合的治疗抗体的说明性实例包括但不限于阿特殊单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、巴维昔单抗(bavituximab)、贝伐单抗(bevacizumab)(avastin)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、布林莫单抗(blinatumomab)、康纳木单抗(conatumumab)、克卓替尼(crizotinib)、达土木单抗(daratumumab)、杜丽戈图单抗(duligotumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达罗吐珠单抗(dalotuzumab)、度伐单抗(durvalumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)(HuLuc63)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、布突默单抗(ibritumomab)、茚达昔单抗(indatuximab)、伊珠单抗(inotuzumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、洛沃珠单抗(lorvotuzumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、米拉珠单抗(milatumuzumab)、莫昔土莫单抗(moxetumomab)、纳武单抗(nivolumab)、奥卡拉珠单抗(ocaratuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、派立珠单抗(pembrolizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、思图昔单抗(siltuximab)、替普罗木单抗(teprotumumab)和乌比妥昔单抗(ublitzumab)。

[0453] 在某些实施例中,本文所描述的组合物与细胞因子结合给予。如本文所用,“细胞因子”意指由一种细胞群体释放的以胞间介体形式作用于另一细胞的蛋白质的通称。这类细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统多肽激素。细胞因子中包括生长激素,例如人类生长激素、N-甲硫氨酰人类生长激素和牛生长激素;副甲状腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,例如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和 β ;苗勒氏(mullerian)抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子,例如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,例如干扰素- α 、 β 和 γ ;集落刺激因子(CSF),例如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15;肿瘤坏死因子,例如TNF- α 或TNF- β ;和其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。如本文所用,术语细胞因子包括来自

天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质,和天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0454] 在特定实施例中,组合物包含本文所涵盖的CAR T细胞,所述细胞在如本文所涵盖的PI3K抑制剂存在下培养且表达以下标记中的一种或多种:CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127和HLA-DR,可通过阳性或阴性选择技术进一步分离。在一个实施例中,组合物包含表达选自以下组成的组的标记中的一种或多种的特定T细胞亚群:i) CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197; ii) CD62L、CD127、CD197、CD38; 和 iii) CD62L、CD27、CD127和CD8,所述T细胞亚群通过阳性或阴性选择技术进一步分离。在各种实施例中,组合物不表达或不实质上表达以下标记中的一种或多种:CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3。

[0455] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,选自由以下组成的群组的标记中的一种或多种的表达增加了至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍或更多倍:CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0456] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,选自由CD62L、CD127、CD27和CD8组成的组的标记中的一种或多种的表达增加了至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍或更多倍。

[0457] 在一个实施例中,相比于在无PI3K抑制剂的情况下活化和扩增的T细胞群体,选自由以下组成的群组的标记中的一种或多种的表达减少了至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少25倍或更多倍:CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3。

[0458] I. 靶细胞和抗原

[0459] 在特定实施例中提供经遗传修饰的免疫效应细胞,其重定向到靶细胞,例如癌细胞,且包含具有结合至靶细胞上的CD79A的结合域的CAR。如本文所用,术语“癌症”大体上涉及异常细胞不受控制地分裂且可侵袭邻近组织的一类疾病或病况。

[0460] 如本文所用,术语“恶性”是指一种癌症,其中肿瘤细胞组呈现以下中的一种或多种:不受控生长(即,超过正常限度的分裂)、侵袭(即,浸入和破坏相邻组织)和转移(即,通过淋巴或血液扩散到身体中的其它位置)。如本文所用,术语“转移”是指癌症从身体的一个部分扩散到另一部分。由已扩散的细胞所形成的肿瘤称为“转移瘤”或“癌转移”。转移性肿瘤含有的细胞与原始(原发性)肿瘤中的细胞相似。

[0461] 如本文所用,术语“良性”或“非恶性”是指可以长大但不会扩散到身体的其它部分的肿瘤。良性肿瘤是自限性的且典型地不会侵袭或转移。

[0462] “癌细胞”是指癌症生长或组织的单独细胞。癌细胞包括实体癌和液体癌两者。“肿瘤”或“肿瘤细胞”一般指代由细胞的异常生长所形成的肿胀或病变,其可为良性的、癌前的或恶性的。大多数癌症形成肿瘤,但液体癌,例如白血病不必形成肿瘤。对于形成肿瘤的癌症,术语“癌症(细胞)”和“肿瘤(细胞)”可互换地使用。个体中肿瘤的量是“肿瘤负荷”,其可以按肿瘤的数目、体积或重量形式测量。

[0463] 术语“复发”是指在改善或缓解一段时间后,诊断到癌症恢复,或癌症恢复的征象和症状。

[0464] “缓解”也称为“临床缓解”且包括部分和完全缓解两者。在部分缓解中,癌症的一些但并非全部征象和症状消失。在完全缓解中,癌症的全部征象和症状消失,但癌症仍可能存在于身体中。

[0465] “难治性”是指癌症对使用特定治疗剂的疗法具有抵抗性或对其无应答。癌症可从治疗开始难治(即,对初始暴露于治疗剂无应答),或历经第一治疗时段过程或在后续治疗时段期间,由于对治疗剂产生抗性而难治。

[0466] 在一个实施例中,靶细胞表现抗原,例如在其它正常(所需)细胞的表面上基本上未发现的靶抗原。

[0467] 在一些实施例中,靶细胞是造血细胞、淋巴细胞或骨髓细胞。

[0468] 在某些实施例中,靶细胞是血液、淋巴组织或骨髓组织的一部分。

[0469] 在特定实施例中,靶细胞是表达CD79A的癌细胞或癌症干细胞。

[0470] 在特定实施例中,靶细胞是表达CD79A的液体癌细胞或血液癌细胞。

[0471] 可由特定实施例中所涵盖的组合物预防、治疗或改善的液体癌或血液癌的说明性实例包括但不限于:白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0472] 可由特定实施例中所涵盖的抗CD79A CAR靶向的细胞的说明性实例包括但不限于以下白血病的细胞:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病、红白血病、毛细胞白血病(HCL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和慢性骨髓白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)和真性红细胞增多症。

[0473] 可由特定实施例中所涵盖的组合物和方法靶向的细胞的说明性实例包括但不限于以下淋巴瘤的细胞:霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,包括但不限于B细胞非霍奇金淋巴瘤:伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、成免疫细胞性大细胞淋巴瘤、前体B成淋巴细胞性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤;以及T细胞非霍奇金淋巴瘤:蕈样真菌病、多形性大细胞淋巴瘤、塞氏综合症(Sézary syndrome)和前体T成淋巴细胞性淋巴瘤。

[0474] 可由特定实施例中所涵盖的组合物和方法靶向的细胞的说明性实例包括但不限于以下多发性骨髓瘤的细胞:明显多发性骨髓瘤、郁积性多发性骨髓瘤(MGUS)、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。

[0475] 在优选实施例中,表达靶细胞的CD79A是DLBCL癌细胞。

[0476] J. 治疗方法

[0477] 本文所涵盖的经遗传修饰的免疫效应细胞提供改良的过继免疫治疗方法,用于预防、治疗和改善表达CD79A的癌症或预防、治疗或改善与表达CD79A的癌症相关的至少一种症状。

[0478] 在各种实施例中,本文所涵盖的经遗传修饰的免疫效应细胞提供改良的过继免疫治疗方法,用于增加受试者中的表达CD79A的癌细胞的中的细胞毒性或用于减少受试者中的表达CD79A的癌细胞的数目。

[0479] 在特定实施例中,初级免疫效应细胞的特异性通过用本文所涵盖的CAR遗传修饰初级免疫效应细胞而重定向至表达CD79A的细胞,例如癌细胞。在各种实施例中,病毒载体

用于用特定聚核苷酸来遗传修饰免疫效应细胞,所述聚核苷酸编码包含以下的CAR:结合CD79A多肽的抗CD79A抗原结合域;铰链域;跨膜(TM)域;将TM域连接至CAR的胞内信号传导域的短寡肽或多肽连接子;和一个或多个胞内共刺激信号传导域;和初级信号传导域。

[0480] 在一个实施例中,提供一类细胞疗法,其中T细胞经遗传修饰以表达靶向表达CD79A的癌细胞的抗CD79A CAR,且将CAR T细胞输注至有需要的接受者。输注的细胞能够杀死接受者中的导致疾病的细胞。不同于抗体疗法,CAR T细胞能够在体内复制,导致长期存留,其可以导致癌症疗法持续。

[0481] 在一个实施例中,抗CD79A CAR T细胞可以经历稳定体内T细胞扩增并且可以长时间存留。在另一实施例中,抗CD79A CAR T细胞进化为可经再活化以抑制任何额外肿瘤形成或生长的特异性记忆T细胞或干细胞记忆T细胞。

[0482] 在特定实施例中,含有包含本文所涵盖的CAR的免疫效应细胞的组合物用于治疗与表达CD79A的癌细胞或癌症干细胞相关的病况。

[0483] 可使用包含特定实施例中所涵盖的CAR的免疫效应细胞治疗、预防或改善的病况的说明性实例

[0484] 在特定实施例中,包含本文所涵盖的CAR修饰的T细胞的组合物用于治疗液体癌或血液癌。

[0485] 在某些实施例中,液体癌或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。

[0486] 在某些实施例中,液体癌或血液癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病、红白血病、毛细胞白血病(HCL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和慢性骨髓白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)和真性红细胞增多症、霍奇金淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、成免疫细胞性大细胞淋巴瘤、前体B成淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、蕈样真菌病、多形性大细胞淋巴瘤、塞氏综合症、前体T成淋巴细胞性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、明显多发性骨髓瘤、郁积性多发性骨髓瘤、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。

[0487] 在某些实施例中,液体癌或血液癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓白血病(AML)或慢性骨髓白血病(CML)。

[0488] 在优选实施例中,液体癌或血液癌为DLBCL。

[0489] 在优选实施例中,液体癌或血液癌为复发性/难治性DLBCL。

[0490] 在特定实施例中,提供了方法,其包含向有需要的患者单独或与一种或多种治疗剂组合给予治疗有效量的本文所涵盖的表达抗CD79A CAR的免疫效应细胞或包含其的组合物。在某些实施例中,细胞用于治疗有患上与表达CD79A的癌细胞相关的病况的风险的患者。因此,在特定实施例中,治疗或预防或改善癌症的至少一种症状的方法包含向有需要的受试者给予治疗有效量的本文所涵盖的CAR修饰的细胞。

[0491] 如本文所用,术语“个体”和“受试者”通常可互换使用,并且是指展现可用本文中其它地方涵盖的基因疗法载体、基于细胞的治疗剂和方法治疗的疾病、病症或病况的症状

的任何动物。在优选实施例中,受试者包括展现与癌症相关的疾病、病症或病况的症状的任何动物,所述癌症可用本文中其它地方涵盖的基因疗法载体、基于细胞的治疗剂和方法治疗。合适的受试者(例如患者)包括实验动物(例如小鼠、大鼠、兔或天竺鼠)、农畜和家畜或宠物(如猫或狗)。包括非人类灵长类动物,并且优选地人类患者。典型的受试者包括患有表达CD79A的癌症、已诊断患有表达CD79A的癌症或有患表达CD79A的癌症(例如DLBCL)的风险的人类患者。

[0492] 如本文所用,术语“患者”是指已经被诊断患有可以用本文其它地方所公开的基因疗法载体、基于细胞的治疗剂和方法治疗的特定疾病、病症或病况的受试者。

[0493] 如本文所用,“治疗(treatment/treating)”包括对疾病或病理学病况的症状或病变的任何有益或理想作用,并且甚至可以包括所治疗疾病或病况的一个或多个可测量标记的最小降低。治疗可任选地涉及减轻疾病或病况,或延迟疾病或病况的进展。“治疗”并非必须指示完全根除或治愈疾病或病况或其相关症状。

[0494] 如本文中所用,“预防(prevent)”和类似词语,如“预防(prevented)”、“预防(preventing)”等,表示用于预防、抑制疾病或病况出现或复发或降低疾病或病况出现或复发的可能性的方法。其也指延缓疾病或病况的发作或复发或延缓疾病或病况的症状出现或复发。如本文所用,“预防”和类似词语还包括在疾病或病况发作或复发之前降低疾病或病况的强度、影响、症状和/或负荷。

[0495] 如本文所用,短语“改善……的至少一种症状”是指减少受试者正在治疗的疾病或病况的一种或多种症状。在特定实施例中,所治疗的疾病或病况是癌症,其中所改善的一种或多种症状包括但不限于虚弱、疲劳、呼吸急促、容易瘀伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹胀或腹痛(由于腹部器官增大)、骨头或关节疼痛、骨折、非计划性体重减轻、食欲不振、盗汗、持续性轻度发热和排尿减少(由于肾功能损伤)。

[0496] “增强”或“促进”或“增加”或“扩增”通常是指本文所涵盖的组合物(例如编码CAR的经遗传修饰的T细胞或载体)相比于由媒介剂或对照分子/组合物引起的应答能够产生、引发或引起更大生理应答(即,下游作用)。可测量的生理应答可尤其包括T细胞扩增、活化、存留的增加和/或癌细胞杀伤能力的增加,从所属领域中的理解和本文中的描述显而易见。“增加的”或“增强的”量典型地是“统计显著”量,并且可以包括为由媒介剂或对照组合物产生的应答的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如500、1000倍)(包括在中间并且超过1的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。

[0497] “减小”或“降低”或“减轻”或“减少”或“减弱”通常是指本文所涵盖的组合物相比于由媒介剂或对照分子/组合物引起的应答能够产生、引发或引起更小生理应答(即,下游作用)。“减小的”或“减少的”量典型地是“统计显著”量,并且可以包括为由媒介剂、对照组合物产生的应答(参考应答)或特定细胞谱系中的应答的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如500、1000倍)(包括在中间并且超过1的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的减小。

[0498] “维持(maintain)”或“保持”或“维持(maintenance)”或“无变化”或“无实质性变化”或“无实质性减小”通常是指本文所涵盖的组合物相比于由媒介剂、对照分子/组合物引起的应答或特定细胞谱系中的应答能够在细胞中产生、引发或引起类似的生理应答(即,下游作用)。相当的应答是与参考应答并无显著不同或可测量不同的应答。

[0499] 在一个实施例中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包含给予有效量,例如治疗有效量的包含本文所涵盖的经遗传修饰的免疫效应细胞的组合物。给予的量和频率将由例如患者的病况以及患者疾病的类型和严重程度的因素决定,但适当剂量可以通过临床试验确定。

[0500] 在一个实施例中,向受试者给予的组合物中的免疫效应细胞(例如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。

[0501] 在特定实施例中,向受试者给予约 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。

[0502] 在一个实施例中,向受试者给予的组合物中的免疫效应细胞(例如T细胞)的量为至少 0.1×10^4 个细胞/千克体重、至少 0.5×10^4 个细胞/千克体重、至少 1×10^4 个细胞/千克体重、至少 5×10^4 个细胞/千克体重、至少 1×10^5 个细胞/千克体重、至少 0.5×10^6 个细胞/千克体重、至少 1×10^6 个细胞/千克体重、至少 0.5×10^7 个细胞/千克体重、至少 1×10^7 个细胞/千克体重、至少 0.5×10^8 个细胞/千克体重、至少 1×10^8 个细胞/千克体重、至少 2×10^8 个细胞/千克体重、至少 3×10^8 个细胞/千克体重、至少 4×10^8 个细胞/千克体重、至少 5×10^8 个细胞/千克体重、或至少 1×10^9 个细胞/千克体重。

[0503] 在特定实施例中,向受试者给予约 1×10^6 个T细胞/千克体重至约 1×10^8 个T细胞/千克体重、约 2×10^6 个T细胞/千克体重至约 0.9×10^8 个T细胞/千克体重、约 3×10^6 个T细胞/千克体重至约 0.8×10^8 个T细胞/千克体重、约 4×10^6 个T细胞/千克体重至约 0.7×10^8 个T细胞/千克体重、约 5×10^6 个T细胞/千克体重至约 0.6×10^8 个T细胞/千克体重、或约 5×10^6 个T细胞/千克体重至约 0.5×10^8 个T细胞/千克体重。

[0504] 所属领域的普通技术人员应认识到,可能需要多次给予本文所涵盖的组合物以实现所需疗法。举例来说,组合物可以跨越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年或更久的时间间隔给予1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或更多次。

[0505] 在某些实施例中,可能需要向受试者投与活化的免疫效应细胞,且接着随后再抽取血液(或进行单采血液成分术),由其活化免疫效应细胞,并且向患者再输注这些经活化和扩增的免疫效应细胞。这一过程可以每几周执行多次。在某些实施例中,免疫效应细胞可以由10cc到400cc的抽血活化。在某些实施例中,免疫效应细胞由20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc或400cc或更多的抽血活化。不受理论束缚,使用此多次抽血/多次再输注方案可以用以选出某些免疫效应细胞群体。

[0506] 本文所涵盖的组合物的给予可以按任何适宜方式执行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄入、输注、植入或移植。在优选实施例中,组合物是肠胃外给予。如本文所用,短语“肠胃外给予(parenteral administration/administered parenterally)”是指除经肠和局部给予以外的给予模式,通常通过注射并且包括但不限于血管内、静脉内、肌肉内、动脉内、

鞘内、囊内、眶内、瘤内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊椎内和胸骨内注射和输注。在一个实施例中,本文中所涵盖的组合物通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染位点中来向受试者给予。

[0507] 在一个实施例中,向有需要的受试者给予有效量的组合物以增加受试者中对B细胞相关病况的细胞免疫应答。免疫应答可以包括由能够杀伤受感染细胞的细胞毒性T细胞、调节T细胞和辅助T细胞应答介导的细胞免疫应答。主要由能够活化B细胞、因此导致抗体产生的辅助T细胞介导的体液免疫应答还可以是诱导性的。多种技术可用于分析组合物诱导的免疫应答的类型,所述技术充分描述于所属领域中;例如《免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology)》,John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober编(2001)John Wiley&Sons,纽约,纽约州。

[0508] 在T细胞介导的杀伤的情况下,CAR-配体结合引发CAR信号传导到T细胞,导致通过各种机制诱导T细胞产生或释放能够诱导靶细胞细胞凋亡的蛋白质的多种T细胞信号传导路径活化。这些T细胞介导的机制包括(但不限于)胞内细胞毒性颗粒从T细胞向靶细胞中的转移;可以直接(或经由其它杀伤效应细胞的募集间接)诱导靶细胞杀伤的促炎性细胞因子的T细胞分泌;和T细胞表面上在结合到靶细胞上的其同源死亡受体(例如Fas)之后诱导靶细胞细胞凋亡的死亡受体配体(例如FasL)的上调。

[0509] 在一个实施例中,提供一种治疗诊断患有表达CD79A的癌症的受试者的方法,其包含从诊断患有表达CD79A的癌症的受试者去除免疫效应细胞,用包含编码本文所涵盖的CAR的核酸的载体对所述免疫效应细胞进行遗传修饰,由此产生经修饰的免疫效应细胞群体,和向相同受试者给予经修饰的免疫效应细胞群体。在优选实施例中,免疫效应细胞包含T细胞。

[0510] 在某些实施例中,提供针对受试者中的靶细胞群体刺激免疫效应细胞介导的免疫调节剂反应的方法,其包含向受试者给予表达编码CAR分子的核酸构建体的免疫效应细胞群体的步骤。

[0511] 给予特定实施例中涵盖的细胞组合物的方法包括如下的任何方法:向受试者有效地再引入直接表达CAR的离体遗传修饰的免疫效应细胞,或再引入免疫效应细胞的遗传修饰的祖细胞,所述细胞在引入至受试者中时分化成表达CAR的成熟免疫效应细胞。一种方法包含用本文所涵盖的核酸构建体离体转导周边血液T细胞,和使转导的细胞返回到受试者中。

[0512] 本说明书中所引用的所有公开案、专利申请案和授权专利案都以引用的方式并入本文中,其引用的程度如同每个个别公开案、专利申请案或授权专利案经特定并且独立地指示以引用的方式并入一般。

[0513] 尽管已经出于清楚理解的目的,通过说明和实例相当详细地描述了前述实施例,但根据本文所涵盖的传授内容,本领域的普通技术人员将易于了解,可以在不脱离所附权利要求书的精神或范围的情况下对其作出某些改变和修改。提供以下实例仅作为说明并且不具有限制性。所属领域的技术人员将容易识别出多种可以被改变或修改以产生基本类似结果的非关键参数。

[0514] 实例

[0515] 实例1

[0516] 构建抗CD79A CAR

[0517] 含有人类化抗CD79A scFv抗体的CAR经设计以含有可操作地连接于抗CD79A scFv的MND启动子,铰链和跨膜域(来自CD8 α)和CD137共刺激域,接着是CD3 ζ 链的胞内信号传导域。抗CD79A CAR包含用于在免疫效应细胞上进行表面表达的CD8 α 信号肽(SP)序列。表3展示例示性抗CD79A CAR慢病毒载体的不同核苷酸区段的标识、Genbank参考、源名称和引用文件。例示性CD79A CAR多肽序列阐述于SEQ ID NO:25-30中,且例示性CD79A CAR聚核苷酸序列阐述于SEQ ID NO:31-36中。

[0518] 表3.

[0519]

核苷酸	标识	GenBank 参考	源名称	引用文件
1-185	pUC19 质粒骨架	登录号 L09137.2 nt 1 - 185	pUC19	New England Biolabs
185-222	连接子	不适用	合成	不适用
223-800	CMV	不适用	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R、U5、PBS 和包装序列	登录号 M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志 (J Virol)》: 65(11):5732-43
1137-1139	Gag 起始密码子(ATG) 变成终止密码子 (TAG)	不适用	合成	不适用
1140-1240	HIV-1 gag 序列	登录号 M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
1241-1243	HIV-1 gag 序列变成第二终止密码子	不适用	合成	不适用
1244-1595	HIV-1 gag 序列	登录号 M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	登录号 M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, 分离株 HXB3 env 区 (RRE)	登录号 M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. 《自然》(1988) 335:181-183
2518-2693	HIV-1 env 序列 S/A	登录号 M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
2694-2708	连接子	不适用	合成	不适用
2709-3096	MNDU3	不适用	rSPA.mPro.MND	Haas 等人 《病毒学杂志 (Journal of Virology)》 . 2003;77(17): 9439-9450
3097-3125	连接子	不适用	合成	不适用
3126-3188	信号肽		合成	不适用
可变	抗 CD79A scFv	不适用	合成	不适用
3927-3935	连接子	不适用	合成	不适用
3936-4142	CD8 α 铰链和 TM	登录号 NM_001768	合成	Milone 等人 (2009) 《分子疗法 (Mol Ther)》 17(8):1453-64
4143-4268	CD137 (4-1BB)信号传导域	登录号 NM_001561	合成	Milone 等人 (2009) 《分子疗法》 17(8):1453-64
4269-4607	CD3- ζ 信号传导域	登录号 NM_000734	合成	Milone 等人 (2009) 《分子疗法》 17(8):1453-64

[0520]

核苷酸	标识	GenBank 参考	源名称	引用文件
4608-4718	U3 的 HIV-1 ppt 和部分	登录号 M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
4719-4835	U3 (399bp 缺失) 和 R 的 HIV-1 部分	登录号 M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli 等人 (1991) 《病毒学杂志》: 65(11):5732-43
4836-4859	合成 polyA	不适用	合成	Levitt, N. 《基因与发育 (Genes & Dev)》 (1989) 3:1019-1025
4860-4878	连接子	不适用	合成	不适用 ¹
4879-7351	pUC19 骨架	登录号 L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	新英格兰生物实验室 (New England Biolabs) (随附)

[0521] 实例2

[0522] 人类抗CD79A CAR T细胞的评估

[0523] 关于CAR表达和针对表达CD79A的细胞的生物活性来评估对CD79A具有特异性的嵌合抗原受体 (CAR) (例如SEQ ID NO:25、27、29和30)。

[0524] 靶抗原表达

[0525] 在一个实验中,使用抗CD79A抗体关于CD79A表达对K562细胞、Pfeiffer细胞和Daudi靶细胞进行询问。将细胞与CD79A抗体一起培育且通过流式细胞术来评定表达。CD79A表达在K562细胞上不可检测到,在Pfeiffer细胞上适度表达,且在Daudi细胞上高度表达。图1A。

[0526] 在另一实验中,使用抗CD79A抗体在Daudi、NU-DUL-1、SU-DHL-2和Pfeiffer靶细胞上测量CD79A表达。将细胞与CD79A抗体一起培育且通过流式细胞仪来评定表达。CD79A表达同样在Daudi细胞上最高,接着在NU-DUL-1、SU-DHL-2和Pfeiffer细胞上逐渐减少。图2A。

[0527] 抗CD79A CAR表达

[0528] 使用可直接扩展为大型临床制造方法的系统来产生CAR T细胞。简单来说,将周边血液单核细胞 (PBMC) 在含有IL-2 (CellGenix) 和对CD3和CD28具有特异性的抗体 (Miltenyi Biotec) 的培养基中培养。在培养开始之后一天添加编码抗CD79A CAR的慢病毒。通过在总共十天的培养内添加含有IL-2的新鲜培养基而使抗CD79A CAR T细胞维持于对数期。在培养结束时,使用流式细胞测量术关于表达对抗CD79A CAR T细胞进行询问。在一个实验中,用表达慢病毒的抗CD79A CAR工程改造的原初人类T细胞使用结合至生物素的山羊抗小鼠 (GaM) 染色且用结合PE的抗生蛋白链菌素进行检测。图1B。在另一实验中,用山羊抗小鼠 (GaM) 染色来评估T细胞上的抗CD79A CAR表达,且通过用标记有藻红蛋白 (PE) 的CD79a胞外域-Fc融合蛋白染色来评估可溶性CD79A抗原与抗CD79A CAR-T细胞的结合。图2B。这些试剂特异性鉴别表达抗CD79A CAR的T细胞。

[0529] 抗原依赖性抗CD79A CAR T细胞活性

[0530] 在一个实验中,使用干扰素- γ (IFN γ) 释放分析来评估抗CD79A CAR T细胞针对CD79A阳性 (Pfeiffer和Daudi) 和CD79A阴性 (K562) 细胞系的生物活性。将抗CD79A CAR T细胞在不存在靶细胞的情况下或与K562 (CD79A-)、Pfeiffer细胞 (CD79A-低) 和Daudi细胞 (CD79A-高) 一起共培养24小时。抗CD79A CAR T细胞仅在CD79A阳性细胞株存在下释放IFN

γ 。图1C。

[0531] 在另一实验中,使用干扰素- γ (IFN γ) 释放分析来评估抗CD79A CAR T细胞针对CD79A阳性 (Huh7.CD79A、Daudi、NU-DUL-1、SU-DHL-2和Pfeiffer) 和CD79A阴性 (Huh7) 细胞系的生物活性。将抗CD79A CAR T细胞在不存在靶细胞 (单独的T细胞) 的情况下或与Huh7细胞 (CD79A-)、Huh7.CD79a细胞 (CD79A+)、Daudi细胞 (CD79A+)、NU-DUL-1 (CD79A+)、SU-DHL-2 (CD79A+) 或Pfeiffer细胞 (CD79A+) 一起共培养。图2C。

[0532] 一般来说,在以下权利要求书中,所用术语不应被解释为将权利要求书限于本说明书和权利要求书中所公开的特定实施例,而应被解释为包含所有可能的实施例以及这份权利要求书所有权获得的等效物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 蓝鸟生物公司(bluebird bio, Inc.)
- [0003] 凯文·弗里德曼(FRIEDMAN, Kevin)
- [0004] 莫莉·里德·帕金斯(PERKINS, Molly Reed)
- [0005] <120> CD79A嵌合抗原受体
- [0006] <130> BLBD-100/01W0 315698-2947
- [0007] <150> US 62/685,078
- [0008] <151> 2018-06-14
- [0009] <160> 79
- [0010] <170> PatentIn版本3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 16
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0015] <220>
- [0016] <221>
- [0017] <222>
- [0018] <223> 实验室制备-轻链CDR1
- [0019] <400> 1
- [0020] Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
- [0021] 1 5 10 15
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 7
- [0024] <212> PRT
- [0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0026] <220>
- [0027] <221>
- [0028] <222>
- [0029] <223> 实验室制备-轻链CDR2
- [0030] <400> 2
- [0031] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
- [0032] 1 5
- [0033] <210> 3
- [0034] <211> 9
- [0035] <212> PRT
- [0036] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0037] <220>
- [0038] <221>
- [0039] <222>
- [0040] <223> 实验室制备-轻链CDR3
- [0041] <400> 3

[0042]	Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
[0043]	1 5
[0044]	<210> 4
[0045]	<211> 10
[0046]	<212> PRT
[0047]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048]	<220>
[0049]	<221>
[0050]	<222>
[0051]	<223> 实验室制备-重链CDR1
[0052]	<400> 4
[0053]	Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Asn
[0054]	1 5 10
[0055]	<210> 5
[0056]	<211> 17
[0057]	<212> PRT
[0058]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0059]	<220>
[0060]	<221>
[0061]	<222>
[0062]	<223> 实验室制备-重链CDR2
[0063]	<400> 5
[0064]	Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
[0065]	1 5 10 15
[0066]	Gly
[0067]	<210> 6
[0068]	<211> 11
[0069]	<212> PRT
[0070]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0071]	<220>
[0072]	<221>
[0073]	<222>
[0074]	<223> 实验室制备-重链CDR6
[0075]	<400> 6
[0076]	Phe Tyr Tyr Gly Asn Thr Phe Ala Met Asp Tyr
[0077]	1 5 10
[0078]	<210> 7
[0079]	<211> 112
[0080]	<212> PRT
[0081]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082]	<220>
[0083]	<221>

[0084]	<222>
[0085]	<223> 实验室制备-可变轻链
[0086]	<400> 7
[0087]	Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0088]	1 5 10 15
[0089]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
[0090]	20 25 30
[0091]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0092]	35 40 45
[0093]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0094]	50 55 60
[0095]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0096]	65 70 75 80
[0097]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
[0098]	85 90 95
[0099]	Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0100]	100 105 110
[0101]	<210> 8
[0102]	<211> 120
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0105]	<220>
[0106]	<221>
[0107]	<222>
[0108]	<223> 实验室制备-可变重链
[0109]	<400> 8
[0110]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0111]	1 5 10 15
[0112]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Ser
[0113]	20 25 30
[0114]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0115]	35 40 45
[0116]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
[0117]	50 55 60
[0118]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0119]	65 70 75 80
[0120]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0121]	85 90 95
[0122]	Glu Arg Phe Tyr Tyr Gly Asn Thr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0123]	100 105 110
[0124]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0125]	115 120

[0126] <210> 9
[0127] <211> 16
[0128] <212> PRT
[0129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0130] <220>
[0131] <221>
[0132] <222>
[0133] <223> 实验室制备-轻链CDR1
[0134] <400> 9
[0135] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
[0136] 1 5 10 15
[0137] <210> 10
[0138] <211> 7
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141] <220>
[0142] <221>
[0143] <222>
[0144] <223> 实验室制备-轻链CDR2
[0145] <400> 10
[0146] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[0147] 1 5
[0148] <210> 11
[0149] <211> 10
[0150] <212> PRT
[0151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0152] <220>
[0153] <221>
[0154] <222>
[0155] <223> 实验室制备-轻链CDR3
[0156] <400> 11
[0157] Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr
[0158] 1 5 10
[0159] <210> 12
[0160] <211> 10
[0161] <212> PRT
[0162] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0163] <220>
[0164] <221>
[0165] <222>
[0166] <223> 实验室制备-重链CDR1
[0167] <400> 12

[0168]	Gly Tyr Ala Phe Ser Phe Ser Trp Met Asn									
[0169]	1			5					10	
[0170]	<210> 13									
[0171]	<211> 17									
[0172]	<212> PRT									
[0173]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)									
[0174]	<220>									
[0175]	<221>									
[0176]	<222>									
[0177]	<223> 实验室制备-重链CDR2									
[0178]	<400> 13									
[0179]	Arg Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys									
[0180]	1			5				10		15
[0181]	Gly									
[0182]	<210> 14									
[0183]	<211> 12									
[0184]	<212> PRT									
[0185]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)									
[0186]	<220>									
[0187]	<221>									
[0188]	<222>									
[0189]	<223> 实验室制备-重链CDR6									
[0190]	<400> 14									
[0191]	Trp Val Tyr Ser Gly Asn Asn Tyr Ala Val Asp Tyr									
[0192]	1			5				10		
[0193]	<210> 15									
[0194]	<211> 113									
[0195]	<212> PRT									
[0196]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)									
[0197]	<220>									
[0198]	<221>									
[0199]	<222>									
[0200]	<223> 实验室制备-可变轻链									
[0201]	<400> 15									
[0202]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly									
[0203]	1			5				10		15
[0204]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser									
[0205]			20				25			30
[0206]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser									
[0207]		35				40			45	
[0208]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro									
[0209]		50				55			60	

[0210]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0211]	65 70 75 80
[0212]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0213]	85 90 95
[0214]	Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0215]	100 105 110
[0216]	Lys
[0217]	<210> 16
[0218]	<211> 121
[0219]	<212> PRT
[0220]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0221]	<220>
[0222]	<221>
[0223]	<222>
[0224]	<223> 实验室制备-可变重链
[0225]	<400> 16
[0226]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0227]	1 5 10 15
[0228]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Phe Ser
[0229]	20 25 30
[0230]	Trp Met Asn Trp Val Lys Trp Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0231]	35 40 45
[0232]	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
[0233]	50 55 60
[0234]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0235]	65 70 75 80
[0236]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0237]	85 90 95
[0238]	Ala Arg Trp Val Tyr Ser Gly Asn Asn Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
[0239]	100 105 110
[0240]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0241]	115 120
[0242]	<210> 17
[0243]	<211> 14
[0244]	<212> PRT
[0245]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0246]	<220>
[0247]	<221>
[0248]	<222>
[0249]	<223> 实验室制备-轻链CDR1
[0250]	<400> 17
[0251]	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Phe Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

[0252]	1	5	10
[0253]	<210> 18		
[0254]	<211> 7		
[0255]	<212> PRT		
[0256]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0257]	<220>		
[0258]	<221>		
[0259]	<222>		
[0260]	<223> 实验室制备-轻链CDR2		
[0261]	<400> 18		
[0262]	Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser		
[0263]	1	5	
[0264]	<210> 19		
[0265]	<211> 10		
[0266]	<212> PRT		
[0267]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0268]	<220>		
[0269]	<221>		
[0270]	<222>		
[0271]	<223> 实验室制备-轻链CDR3		
[0272]	<400> 19		
[0273]	Cys Ser Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Trp Val		
[0274]	1	5	10
[0275]	<210> 20		
[0276]	<211> 10		
[0277]	<212> PRT		
[0278]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0279]	<220>		
[0280]	<221>		
[0281]	<222>		
[0282]	<223> 实验室制备-重链CDR1		
[0283]	<400> 20		
[0284]	Gly Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met Asn		
[0285]	1	5	10
[0286]	<210> 21		
[0287]	<211> 17		
[0288]	<212> PRT		
[0289]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[0290]	<220>		
[0291]	<221>		
[0292]	<222>		
[0293]	<223> 实验室制备-重链CDR2		

[0294]	<400> 21
[0295]	Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0296]	1 5 10 15
[0297]	Gly
[0298]	<210> 22
[0299]	<211> 7
[0300]	<212> PRT
[0301]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0302]	<220>
[0303]	<221>
[0304]	<222>
[0305]	<223> 实验室制备-重链CDR6
[0306]	<400> 22
[0307]	Leu Gly Gly Trp Ser Asp Tyr
[0308]	1 5
[0309]	<210> 23
[0310]	<211> 110
[0311]	<212> PRT
[0312]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0313]	<220>
[0314]	<221>
[0315]	<222>
[0316]	<223> 实验室制备-可变轻链
[0317]	<400> 23
[0318]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0319]	1 5 10 15
[0320]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Phe Gly Ser Tyr
[0321]	20 25 30
[0322]	Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0323]	35 40 45
[0324]	Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0325]	50 55 60
[0326]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0327]	65 70 75 80
[0328]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Gly
[0329]	85 90 95
[0330]	Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0331]	100 105 110
[0332]	<210> 24
[0333]	<211> 116
[0334]	<212> PRT
[0335]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0336]	<220>
[0337]	<221>
[0338]	<222>
[0339]	<223> 实验室制备-可变重链
[0340]	<400> 24
[0341]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0342]	1 5 10 15
[0343]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Ser Tyr
[0344]	20 25 30
[0345]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0346]	35 40 45
[0347]	Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0348]	50 55 60
[0349]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0350]	65 70 75 80
[0351]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0352]	85 90 95
[0353]	Ala Lys Leu Gly Gly Trp Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0354]	100 105 110
[0355]	Thr Val Ser Ser
[0356]	115
[0357]	<210> 25
[0358]	<211> 492
[0359]	<212> PRT
[0360]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0361]	<220>
[0362]	<221>
[0363]	<222>
[0364]	<223> 实验室制备-抗CD79A-01_HL CAR构建体
[0365]	<400> 25
[0366]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0367]	1 5 10 15
[0368]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
[0369]	20 25 30
[0370]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0371]	35 40 45
[0372]	Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
[0373]	50 55 60
[0374]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn
[0375]	65 70 75 80
[0376]	Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
[0377]	85 90 95

[0378]	Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser		
[0379]	100	105	110
[0380]	Ala Val Tyr Phe Cys Glu Arg Phe Tyr Tyr Gly Asn Thr Phe Ala Met		
[0381]	115	120	125
[0382]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
[0383]	130	135	140
[0384]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Leu Met		
[0385]	145	150	155
[0386]	Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser		
[0387]	165	170	175
[0388]	Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr		
[0389]	180	185	190
[0390]	Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu		
[0391]	195	200	205
[0392]	Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[0393]	210	215	220
[0394]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu		
[0395]	225	230	235
[0396]	Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro		
[0397]	245	250	255
[0398]	Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr		
[0399]	260	265	270
[0400]	Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro		
[0401]	275	280	285
[0402]	Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val		
[0403]	290	295	300
[0404]	His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro		
[0405]	305	310	315
[0406]	Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu		
[0407]	325	330	335
[0408]	Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
[0409]	340	345	350
[0410]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[0411]	355	360	365
[0412]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[0413]	370	375	380
[0414]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[0415]	385	390	395
[0416]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[0417]	405	410	415
[0418]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[0419]	420	425	430

[0420]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
[0421]	435 440 445
[0422]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
[0423]	450 455 460
[0424]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
[0425]	465 470 475 480
[0426]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0427]	485 490
[0428]	<210> 26
[0429]	<211> 492
[0430]	<212> PRT
[0431]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0432]	<220>
[0433]	<221>
[0434]	<222>
[0435]	<223> 实验室制备-抗CD79A-01_LH CAR构建体
[0436]	<400> 26
[0437]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0438]	1 5 10 15
[0439]	His Ala Ala Arg Pro Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu
[0440]	20 25 30
[0441]	Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
[0442]	35 40 45
[0443]	Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln
[0444]	50 55 60
[0445]	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
[0446]	65 70 75 80
[0447]	Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
[0448]	85 90 95
[0449]	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
[0450]	100 105 110
[0451]	Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
[0452]	115 120 125
[0453]	Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0454]	130 135 140
[0455]	Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
[0456]	145 150 155 160
[0457]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0458]	165 170 175
[0459]	Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
[0460]	180 185 190
[0461]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn

[0462]	195	200	205
[0463]	Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
[0464]	210	215	220
[0465]	Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser		
[0466]	225	230	235
[0467]	Ala Val Tyr Phe Cys Glu Arg Phe Tyr Tyr Gly Asn Thr Phe Ala Met		
[0468]	245	250	255
[0469]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr		
[0470]	260	265	270
[0471]	Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro		
[0472]	275	280	285
[0473]	Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val		
[0474]	290	295	300
[0475]	His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro		
[0476]	305	310	315
[0477]	Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu		
[0478]	325	330	335
[0479]	Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
[0480]	340	345	350
[0481]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[0482]	355	360	365
[0483]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[0484]	370	375	380
[0485]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[0486]	385	390	395
[0487]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[0488]	405	410	415
[0489]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[0490]	420	425	430
[0491]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
[0492]	435	440	445
[0493]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
[0494]	450	455	460
[0495]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
[0496]	465	470	475
[0497]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0498]	485	490	
[0499]	<210> 27		
[0500]	<211> 493		
[0501]	<212> PRT		
[0502]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0503]	<220>		

[0504]	<221>
[0505]	<222>
[0506]	<223> 实验室制备-抗CD79A-10_HL CAR构建体
[0507]	<400> 27
[0508]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0509]	1 5 10 15
[0510]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
[0511]	20 25 30
[0512]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr
[0513]	35 40 45
[0514]	Ala Phe Ser Phe Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Trp Gly Pro Gly Gln
[0515]	50 55 60
[0516]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Asn
[0517]	65 70 75 80
[0518]	Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
[0519]	85 90 95
[0520]	Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser
[0521]	100 105 110
[0522]	Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Val Tyr Ser Gly Asn Asn Tyr Ala
[0523]	115 120 125
[0524]	Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
[0525]	130 135 140
[0526]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val
[0527]	145 150 155 160
[0528]	Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala
[0529]	165 170 175
[0530]	Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn
[0531]	180 185 190
[0532]	Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
[0533]	195 200 205
[0534]	Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
[0535]	210 215 220
[0536]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
[0537]	225 230 235 240
[0538]	Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val
[0539]	245 250 255
[0540]	Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr
[0541]	260 265 270
[0542]	Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
[0543]	275 280 285
[0544]	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
[0545]	290 295 300

[0546]	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
[0547]	305 310 315 320
[0548]	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
[0549]	325 330 335
[0550]	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
[0551]	340 345 350
[0552]	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
[0553]	355 360 365
[0554]	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
[0555]	370 375 380
[0556]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
[0557]	385 390 395 400
[0558]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
[0559]	405 410 415
[0560]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
[0561]	420 425 430
[0562]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
[0563]	435 440 445
[0564]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
[0565]	450 455 460
[0566]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
[0567]	465 470 475 480
[0568]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0569]	485 490
[0570]	<210> 28
[0571]	<211> 493
[0572]	<212> PRT
[0573]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0574]	<220>
[0575]	<221>
[0576]	<222>
[0577]	<223> 实验室制备-抗CD79A-10_LH CAR构建体
[0578]	<400> 28
[0579]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0580]	1 5 10 15
[0581]	His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
[0582]	20 25 30
[0583]	Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
[0584]	35 40 45
[0585]	Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
[0586]	50 55 60
[0587]	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

[0588]	65	70	75	80
[0589]	Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[0590]		85	90	95
[0591]	Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr			
[0592]		100	105	110
[0593]	Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly			
[0594]		115	120	125
[0595]	Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
[0596]		130	135	140
[0597]	Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu			
[0598]		145	150	155
[0599]	Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr			
[0600]		165	170	175
[0601]	Ala Phe Ser Phe Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Trp Gly Pro Gly Gln			
[0602]		180	185	190
[0603]	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Asn			
[0604]		195	200	205
[0605]	Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser			
[0606]		210	215	220
[0607]	Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser			
[0608]		225	230	235
[0609]	Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Val Tyr Ser Gly Asn Asn Tyr Ala			
[0610]		245	250	255
[0611]	Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr			
[0612]		260	265	270
[0613]	Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln			
[0614]		275	280	285
[0615]	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala			
[0616]		290	295	300
[0617]	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala			
[0618]		305	310	315
[0619]	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr			
[0620]		325	330	335
[0621]	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln			
[0622]		340	345	350
[0623]	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser			
[0624]		355	360	365
[0625]	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys			
[0626]		370	375	380
[0627]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln			
[0628]		385	390	395
[0629]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu			

[0630]	405	410	415
[0631]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
[0632]	420	425	430
[0633]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
[0634]	435	440	445
[0635]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
[0636]	450	455	460
[0637]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
[0638]	465	470	475
[0639]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		480
[0640]	485	490	
[0641]	<210> 29		
[0642]	<211> 485		
[0643]	<212> PRT		
[0644]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0645]	<220>		
[0646]	<221>		
[0647]	<222>		
[0648]	<223> 实验室制备-抗CD79A-02_HL CAR构建体		
[0649]	<400> 29		
[0650]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[0651]	1	5	10
[0652]	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu		15
[0653]	20	25	30
[0654]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu		
[0655]	35	40	45
[0656]	Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0657]	50	55	60
[0658]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr		
[0659]	65	70	75
[0660]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		80
[0661]	85	90	95
[0662]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0663]	100	105	110
[0664]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu Gly Gly Trp Ser Asp Tyr Trp Gly		
[0665]	115	120	125
[0666]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0667]	130	135	140
[0668]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala		
[0669]	145	150	155
[0670]	Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly		160
[0671]	165	170	175

[0672]	Thr Ser Ser Asp Phe Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln		
[0673]		180	185
[0674]	His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg		190
[0675]		195	200
[0676]	Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr		205
[0677]		210	215
[0678]	Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		220
[0679]		225	230
[0680]	Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly		235
[0681]		245	250
[0682]	Thr Lys Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr		255
[0683]		260	265
[0684]	Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala		270
[0685]		275	280
[0686]	Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe		285
[0687]		290	295
[0688]	Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		300
[0689]		305	310
[0690]	Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		315
[0691]		325	330
[0692]	Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		335
[0693]		340	345
[0694]	Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		350
[0695]		355	360
[0696]	Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		365
[0697]		370	375
[0698]	Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		380
[0699]		385	390
[0700]	Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		395
[0701]		405	410
[0702]	Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		415
[0703]		420	425
[0704]	Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		430
[0705]		435	440
[0706]	Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		445
[0707]		450	455
[0708]	Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		460
[0709]		465	470
[0710]	Ala Leu Pro Pro Arg		475
[0711]		485	480
[0712]	<210> 30		
[0713]	<211> 485		

[0714]	<212>	PRT
[0715]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0716]	<220>	
[0717]	<221>	
[0718]	<222>	
[0719]	<223>	实验室制备-抗CD79A-02_LH CAR构建体
[0720]	<400>	30
[0721]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[0722]	1 5 10 15	
[0723]	His Ala Ala Arg Pro Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser	
[0724]	20 25 30	
[0725]	Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser	
[0726]	35 40 45	
[0727]	Asp Phe Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly	
[0728]	50 55 60	
[0729]	Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly	
[0730]	65 70 75 80	
[0731]	Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu	
[0732]	85 90 95	
[0733]	Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys	
[0734]	100 105 110	
[0735]	Ser Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
[0736]	115 120 125	
[0737]	Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
[0738]	130 135 140	
[0739]	Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro	
[0740]	145 150 155 160	
[0741]	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr	
[0742]	165 170 175	
[0743]	Ser Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
[0744]	180 185 190	
[0745]	Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp	
[0746]	195 200 205	
[0747]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr	
[0748]	210 215 220	
[0749]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[0750]	225 230 235 240	
[0751]	Tyr Cys Ala Lys Leu Gly Gly Trp Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
[0752]	245 250 255	
[0753]	Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr	
[0754]	260 265 270	
[0755]	Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala	

[0756]	275	280	285
[0757]	Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe		
[0758]	290	295	300
[0759]	Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
[0760]	305	310	315
[0761]	Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		
[0762]	325	330	335
[0763]	Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		
[0764]	340	345	350
[0765]	Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		
[0766]	355	360	365
[0767]	Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
[0768]	370	375	380
[0769]	Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
[0770]	385	390	395
[0771]	Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
[0772]	405	410	415
[0773]	Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
[0774]	420	425	430
[0775]	Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
[0776]	435	440	445
[0777]	Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		
[0778]	450	455	460
[0779]	Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
[0780]	465	470	475
[0781]	Ala Leu Pro Pro Arg		
[0782]	485		
[0783]	<210> 31		
[0784]	<211> 1479		
[0785]	<212> DNA		
[0786]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0787]	<220>		
[0788]	<221>		
[0789]	<222>		
[0790]	<223> 实验室制备-抗CD79A-01_HL CAR聚核苷酸构建体		
[0791]	<400> 31		
[0792]	atggcacttc cagtgcactgc attgttgttg cccctggccc tgctgcttca cgccgcaagg 60		
[0793]	ccccaggtcc agcttcagca gtccggacca gagttggtga aacctggggc atcagtcaag 120		
[0794]	attagctgca aggcatacagg gtacaccttc agcactagtt ggatgaattg ggtgaagcag 180		
[0795]	cggcctggcc aggggttga gtggatcgga cgcacttacc caggggatgg cgatacaaac 240		
[0796]	tacaacggaa agtttaaagg taaggctact ttgaccgctg acaaatacgc aaacacggca 300		
[0797]	tatatgcaac tgtctagcct cacatctgtc gactctgccg tctacttttg cgagcgattc 360		

[0798]	tactatggca acacttttgc catggactac tgggggcagg ggacatcagt aacagttagt	420
[0799]	tctggagggg gcggttccgg gggcggggga tccggagggg gaggcagtga tgtgtgatg	480
[0800]	accagatac cgttgtcact cccggtctca ctgggtgacc aggcaagcat cagctgcagg	540
[0801]	agcagccagt ccatcgtgca ctctaacgga aatacctacc tggagtggta tctgcagaaa	600
[0802]	cctggccagt cccctaagtt gttgatttac aaagtttcaa accgatttag tggagttccc	660
[0803]	gataggtttt ccggttccgg gagcgggtaca gacttcaccc tgaagataag tcgggttag	720
[0804]	gctgaagacc tgggagtata ttattgcttt cagggcagcc acgtaccatt cacatttggg	780
[0805]	agtgaacca aactggagat caaaagaacc acaacacctg ctccaaggcc cccacaccc	840
[0806]	gctccaacta tagccagcca accattgagc ctcagacctg aagcttgag gcccgagca	900
[0807]	ggagcgccg tccatacgcg aggcctggac ttgcggtgtg atatttatat ttgggcccct	960
[0808]	ttggccggaa catgtgggt gttgcttctc tcccttgtga tcaactctga ttgtaagcg	1020
[0809]	gggagaaaga agctcctgta catcttcaag cagcctttta tgcgacctgt gcaaaccact	1080
[0810]	caggaagaag atgggtgttc atgccgttc cccgaggagg aagaaggagg gtgtgaactg	1140
[0811]	agggtgaaat tttctagaag cgccgatgct cccgcatac agcagggtca gaatcagctc	1200
[0812]	tacaatgaat tgaatctcgg caggcgagaa gactacgatg ttctggacaa gagacggggc	1260
[0813]	agggatcccg agatgggggg aaagccccgg agaaaaaatc ctcaggaggg gttgtacaat	1320
[0814]	gagctgcaga aggacaagat ggctgaagcc tatagcgaga tcggaatgaa aggcgaaaga	1380
[0815]	cgcagaggca aggggcatga cggctctgtac cagggtctct ctacagccac caaggacact	1440
[0816]	tatgatgcgt tgcatatgca agccttgcca cccgctaa	1479
[0817]	<210>	32
[0818]	<211>	1479
[0819]	<212>	DNA
[0820]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0821]	<220>	
[0822]	<221>	
[0823]	<222>	
[0824]	<223>	实验室制备-抗CD79A-01_LH CAR聚核苷酸构建体
[0825]	<400>	32
[0826]	atggetctgc ctgtgacgce cctgcttttg cccctcgccc tgetttctgca tgccgcgaga	60
[0827]	cccgacgtgt tgatgacce aataccgett agtctgcctg tatctcttgg ggaccaggct	120
[0828]	agcatctcat gccgcagcag tcaatccatt gtgcactcaa atgggaacac ctatttggag	180
[0829]	tggtatctgc aaaaaccggg acagtctccg aaactgctga tatacaaagt aagcaacagg	240
[0830]	ttcagcgag ttctgacag attcagcgga agcggttctg gaactgactt tacacttaag	300
[0831]	atctctcgcg ttgaggcgga ggacctgggc gtgtattact gttttcaagg atcccacgtc	360
[0832]	ccgtttacat tcggatcagg caccaagctg gagatcaagc gcggtggcgg gggttctggc	420
[0833]	gggggcggat ccggaggcgg cggatcccag gtgcagctgc agcagtctgg accagaactg	480
[0834]	gttaagcccg gagcttcagt taagatttcc tgtaaggctt caggctatac attttccact	540
[0835]	tcttgatga actgggtgaa acagcgccct ggccaggggc tggaatggat cggacggatc	600
[0836]	tatcccgcg atggagacac taattataac ggtaagtcca aagggaagc caccctcacg	660
[0837]	gccgacaagt cctccaatac agcgtacatg caactcagtt ccctgaccag cgttgatagc	720
[0838]	gcagtttact tctgtgagcg cttctattac ggaaacacct tcgctatgga ttactgggtg	780
[0839]	caggggacct ccgtgaccgt gtctctacc acaacacctg ctccaaggcc cccacaccc	840

[0840]	gctccaacta tagccagcca accattgagc ctcagacctg aagcttgagc gcccgagca	900
[0841]	ggagcgccg tccatacgcg aggcctggac ttgcgtgtg atatttatat ttgggccct	960
[0842]	ttggccgaa catgtgggt gttgcttctc tcccttgta tcaactctga ttgtaagcg	1020
[0843]	gggagaaaga agctcctgta catcttcaag cagccttita tgcgacctgt gcaaaccact	1080
[0844]	caggaagaag atgggtgttc atgccgttc cccgaggagg aagaaggagg gtgtgaactg	1140
[0845]	agggtgaaat tttctagaag cgccgatgct cccgcatac agcagggtca gaatcagctc	1200
[0846]	tacaatgaat tgaatctcg caggcgagaa gactacgatg ttctggacaa gagacggggc	1260
[0847]	agggatcccg agatggggg aaagccccg agaaaaaatc ctcaggagg gttgtacaat	1320
[0848]	gagctgcaga aggacaagat ggctgaagcc tatagcgaga tcggaatgaa aggcgaaaga	1380
[0849]	cgcagaggca aggggcatga cggctgttac cagggtctct ctacagccac caaggacact	1440
[0850]	tatgatcgt tgcatacgca agccttgcca ccccgctaa	1479
[0851]	<210>	33
[0852]	<211>	1482
[0853]	<212>	DNA
[0854]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0855]	<220>	
[0856]	<221>	
[0857]	<222>	
[0858]	<223>	实验室制备-抗CD79A-10_HL CAR聚核苷酸构建体
[0859]	<400>	33
[0860]	atggctctgc cagtactgc gctgctgctg cccctcgctc ttctgctgca cgccgctcgg	60
[0861]	ccacaggctc aactgcaaca gagcgcccc gagctggtaa aaccggggc ctccgtaaaa	120
[0862]	atatcctgca agaccagcg ctatgccttt tcattctcct ggatgaactg ggtgaagtgg	180
[0863]	ggacccggtc agggacttga gtggatcggc cgaatctatc ccgaaacgg ggacacgaat	240
[0864]	tacaacggca aatttaaagg caaggctact ctgactgctg acaaaagtag caacaccgcc	300
[0865]	tacatgcagt tgctctcttt gacatcagta gactctgcag tgtatttttg cgcccggtgg	360
[0866]	gtttactccg gaaataacta cgcggtgac tattggggac agggcacctc cgtgacagt	420
[0867]	tcttctggcg gcgggggac aggtggcggc gggctgagg gtggaggag cgacgtggt	480
[0868]	atgaccaga ccccttgag cctgccgtg agccttgcg accaagctc catctcttgc	540
[0869]	cggctctctc aatcactggt gcacagtaac gggaatactt atctccactg gtatttgcaa	600
[0870]	aagcccggtc agtctcctaa gcttctgac tataaggtgt ccaaccgctt ttctggagt	660
[0871]	cccgatagat tttccggtc tggatccgga acagacttca cattgaagat tagtagagtc	720
[0872]	gaagcgagg acttggtgt ttattttgt tccagagta cccacgtgc tccatacac	780
[0873]	tttgagggtg gaacaaaact tgaattaag accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
[0874]	cccgctcaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccga	900
[0875]	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggc	960
[0876]	ccttggccg gaacatgtgg ggtgttgcct ctctccctg tgatcactct gtattgtaag	1020
[0877]	cgcgggagaa agaagctct gtacatctc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
[0878]	actcaggaag aagatgggtg ttcatgccg tccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
[0879]	ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcagg tcagaatcag	1200
[0880]	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtac atgttctgga caagagacgg	1260
[0881]	ggcagggtac ccgagatgg gggaaagccc cggagaaaa atcctcagga ggggtgtac	1320

[0882]	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
[0883]	agacgcagag gcaaggggca tgacggctcg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
[0884]	acttatgatg cggtgcatat gcaagccttg ccaccccgt aa	1482
[0885]	<210>	34
[0886]	<211>	1482
[0887]	<212>	DNA
[0888]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0889]	<220>	
[0890]	<221>	
[0891]	<222>	
[0892]	<223>	实验室制备-抗CD79A-10_LH CAR聚核苷酸构建体
[0893]	<400>	34
[0894]	atggccctgc cagtaacagc actgctcctt cctctcgac tcctcctgca cgcagcaaga	60
[0895]	ccagatgtcg tgatgactca gacacctctt agcttgcccg tctccttggg tgatcaggct	120
[0896]	agcatttcat gtagatcaag ccagagcttg gtacattcaa atggcaatac ctacctgcac	180
[0897]	tggtatctcc agaaacctgg ccagagccca aaattgctta tctataaagt tagtaacaga	240
[0898]	ttctccgggg tcccagatcg attttccggc tcaggctcag gcacggattt taccctgaag	300
[0899]	atctcacgag tcgaggcaga agatcttggc gtgtactttt gttcccagag taccacgta	360
[0900]	cccccttaca cattcggagg agggaccaag ttggagatca aaggaggggg gggcagtggg	420
[0901]	gggggcggtt ccggaggggg aggaagccaa gtacaactgc aacaaagcgg acccgagtc	480
[0902]	gtcaaacctg gtgctagcgt caaaatttcc tgtaagacca gcggctacgc ttttagcttt	540
[0903]	tcttgatga actgggtgaa atgggggccc gggcagggcc tggagtggat aggacgaatt	600
[0904]	tatcccgga atggggatac aaattacaat ggtaaattca aggggaaagc cacactgact	660
[0905]	gcagataaaa gctccaacac ggcatacatg cagctcagct ccctcacttc tgtggattct	720
[0906]	gctgtttact tttgtgccag gtgggtttac tctggttaata actatgccgt ggattactgg	780
[0907]	gggcaaggca cctctgttac agtgagttcc accacaacac ctgctccaag gccccccaca	840
[0908]	cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccga	900
[0909]	gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggc	960
[0910]	cctttggcgg gaacatgtgg ggtgttgcct ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag	1020
[0911]	cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc	1080
[0912]	actcaggaag aagatgggtg ttcatgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa	1140
[0913]	ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag	1200
[0914]	ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg	1260
[0915]	ggcagggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggtgtgac	1320
[0916]	aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa	1380
[0917]	agacgcagag gcaaggggca tgacggctcg taccagggtc tctctacagc caccaaggac	1440
[0918]	acttatgatg cggtgcatat gcaagccttg ccaccccgt aa	1482
[0919]	<210>	35
[0920]	<211>	1458
[0921]	<212>	DNA
[0922]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0923]	<220>	

[0924]	<221>
[0925]	<222>
[0926]	<223> 实验室制备-抗CD79A-02_HL CAR聚核苷酸构建体
[0927]	<400> 35
[0928]	atggcgcttc ctgtcactgc cctgcttctg cccctcgctc ttctgctgca cgccgctcgc 60
[0929]	cccgaagtgc agctgttga aagcggaggc ggcctgggtc aaccgggtgg cagtctgagg 120
[0930]	ctgtcctgcg ccgctccgg tcttacattc acatcttacg ctatgaattg ggtgcgcca 180
[0931]	gccccggca agggcctgga gtgggttagt ggtatcagcg ggtccggagg agggacttac 240
[0932]	tacgccgact ctgtaaaggg acggttcact atctccggg acaactccaa aaacacactt 300
[0933]	tacctgcaga tgaactcctt gcgagccgaa gacacagcgg tgtactactg tgctaagctt 360
[0934]	ggaggtgga gtgattattg gggtcagggg accttggtga cagtgtcttc cgggggtggg 420
[0935]	ggatccggtg gcggtggatc aggaggggt ggctcccaga gcgctctcac acagccggcc 480
[0936]	agtgtgtcag gatcacctgg acagtccatt acgatctctt gcaactggaac aagctctgac 540
[0937]	tttggtcct ataatctcgt gtcctggtat cagcagcacc ccgggaaggc tccaagctt 600
[0938]	atgatttacg agggctcaaa acgcccctca ggtgtatcca accgattcag cggaagcaaa 660
[0939]	tccgcaata ccgcaagtct caccataagt ggctgcagg cagaagacga agccgactac 720
[0940]	tattgttgtt cttatgccgg cggctcaaca tgggtgttcg gcgggggcac caagctgact 780
[0941]	gtattgacca caacacctgc tccaaggccc ccacacccg ctccaactat agccagccaa 840
[0942]	ccattgagcc tcagacctga agcttgagg cccgcagcag gagcgccgt ccatacgca 900
[0943]	ggcctggact tcgcgtgtga tatttatatt tggccccctt tggccggaac atgtggggtg 960
[0944]	ttgctctctt cccttgatg cactctgtat tgtaagcgcg ggagaaagaa gctcctgtac 1020
[0945]	atcttcaagc agccttttat gcgacctgtg caaaccactc aggaagaaga tgggtgttca 1080
[0946]	tgccgcttcc ccgaggagga agaaggagg tgtgaactga gggtgaaatt ttctagaagc 1140
[0947]	gccgatgctc ccgcatatca gcagggtcag aatcagctct acaatgaatt gaatctcggc 1200
[0948]	aggcgagaag agtacgatgt tctggacaag agacggggca gggatcccga gatgggggga 1260
[0949]	aagccccgga gaaaaaatcc tcaggagggg ttgtacaatg agctgcagaa ggacaagatg 1320
[0950]	gctgaagcct atagcgagat cggaatgaaa ggcgaaagac gcagaggcaa ggggcatgac 1380
[0951]	ggtctgtacc aggtctctc tacagccacc aaggacactt atgatgcgtt gcatatgcaa 1440
[0952]	gccttgccac cccgctaa 1458
[0953]	<210> 36
[0954]	<211> 1458
[0955]	<212> DNA
[0956]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0957]	<220>
[0958]	<221>
[0959]	<222>
[0960]	<223> 实验室制备-抗CD79A-02_LH CAR聚核苷酸构建体
[0961]	<400> 36
[0962]	atggctctgc ctgtaactgc tctgtgctt ccccttgctc tgctcctgca tgccgcccgg 60
[0963]	ccgcaaagcg ccctgactca gccagcttcc gtgtctggct ctccggggca gtccatcacc 120
[0964]	atctcatgca caggaaacctc cagcgacttc ggatcatata acctggtttc atggtatcag 180
[0965]	cagcatcctg ggaaggctcc gaagttgatg atctacgagg gaagcaagag gccagtgagg 240

[0966]	gtcagtaacc gcttctctgg aagtaagtca ggcaataccg ctagtctgac catctccgga	300
[0967]	ttgcaagctg aggacgaagc tgattactac tgctgttcat atgcaggggg ttctacttgg	360
[0968]	gtgttcggcg gtggaaccaa gcttaccgtt ctgggaggcg gaggtccgg gggaggcgga	420
[0969]	tcaggcggag gtggatccga agtgcagctg cttgagtcag gagggggatt ggtccagccg	480
[0970]	gggggatcat tgaggctgtc ttgtgccga agtggactca cttttaccag ttatgcaatg	540
[0971]	aactgggtgc ggcaggcacc cgggaaggga ctggaatggg tgagtggcat atctggcagc	600
[0972]	ggggcgga cttactacgc tgattctgtc aagggaaggt ttactatctc acgagacaac	660
[0973]	agcaaaaaca ccctctacct gcagatgaac tctctcagag cagaggatac tgcagtctac	720
[0974]	tattgtgcta agctgggtgg ttggagcgac tactggggac aaggacgtt ggtgaccgtg	780
[0975]	tcttcaacca caacacctgc tccaaggccc cccacaccg ctccaactat agccagccaa	840
[0976]	ccattgagcc tcagacctga agcttgcagg cccgcagcag gaggcgccgt ccatacgca	900
[0977]	ggcctggact tcgcgtgtga tttttatatt tgggccctt tggccggaac atgtggggtg	960
[0978]	ttgcttctct cccttgtgat cactctgtat tgtaagcgcg ggagaaagaa gctcctgtac	1020
[0979]	atcttcaagc agccttttat gcgacctgtg caaaccactc aggaagaaga tgggtgttca	1080
[0980]	tgccgttcc ccgaggagga agaaggaggg tgtgaactga gggtgaaatt ttctagaagc	1140
[0981]	gccgatgtc ccgcatatca gcagggtcag aatcagctct acaatgaatt gaatctcggc	1200
[0982]	aggcgagaag agtacgatgt tctggacaag agacggggca gggatcccga gatgggggga	1260
[0983]	aagccccgga gaaaaaatcc tcaggagggg ttgtacaatg agctgcagaa ggacaagatg	1320
[0984]	gctgaagcct atagcgagat cggaatgaaa ggcgaaagac gcagaggcaa ggggcatgac	1380
[0985]	ggtctgtacc aggtctctc tacagccacc aaggacactt atgatgcgtt gcatatgcaa	1440
[0986]	gccttgccac cccgctaa	1458
[0987]	<210>	37
[0988]	<211>	226
[0989]	<212>	PRT
[0990]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0991]	<400>	37
[0992]	Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe	
[0993]	1 5 10 15	
[0994]	Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala	
[0995]	20 25 30	
[0996]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu	
[0997]	35 40 45	
[0998]	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val	
[0999]	50 55 60	
[1000]	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe	
[1001]	65 70 75 80	
[1002]	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val	
[1003]	85 90 95	
[1004]	Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn	
[1005]	100 105 110	
[1006]	Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro	
[1007]	115 120 125	

[1008]	Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
[1009]	130 135 140
[1010]	Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
[1011]	145 150 155 160
[1012]	Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
[1013]	165 170 175
[1014]	Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
[1015]	180 185 190
[1016]	Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
[1017]	195 200 205
[1018]	Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
[1019]	210 215 220
[1020]	Lys Pro
[1021]	225
[1022]	<210> 38
[1023]	<211> 188
[1024]	<212> PRT
[1025]	<213> 智人(Homo sapiens)
[1026]	<400> 38
[1027]	Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
[1028]	1 5 10 15
[1029]	Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
[1030]	20 25 30
[1031]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
[1032]	35 40 45
[1033]	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
[1034]	50 55 60
[1035]	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
[1036]	65 70 75 80
[1037]	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Glu Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu
[1038]	85 90 95
[1039]	Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile
[1040]	100 105 110
[1041]	Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg
[1042]	115 120 125
[1043]	Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr
[1044]	130 135 140
[1045]	Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
[1046]	145 150 155 160
[1047]	Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly
[1048]	165 170 175
[1049]	Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro

[1050]	180	185
[1051]	<210> 39	
[1052]	<211> 5	
[1053]	<212> PRT	
[1054]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[1055]	<220>	
[1056]	<221>	
[1057]	<222>	
[1058]	<223> 例示性连接子序列	
[1059]	<400> 39	
[1060]	Asp Gly Gly Gly Ser	
[1061]	1 5	
[1062]	<210> 40	
[1063]	<211> 5	
[1064]	<212> PRT	
[1065]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[1066]	<220>	
[1067]	<221>	
[1068]	<222>	
[1069]	<223> 例示性连接子序列	
[1070]	<400> 40	
[1071]	Thr Gly Glu Lys Pro	
[1072]	1 5	
[1073]	<210> 41	
[1074]	<211> 4	
[1075]	<212> PRT	
[1076]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[1077]	<220>	
[1078]	<221>	
[1079]	<222>	
[1080]	<223> 例示性连接子序列	
[1081]	<400> 41	
[1082]	Gly Gly Arg Arg	
[1083]	1	
[1084]	<210> 42	
[1085]	<211> 5	
[1086]	<212> PRT	
[1087]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[1088]	<220>	
[1089]	<221>	
[1090]	<222>	
[1091]	<223> 例示性连接子序列	

[1092]	<400> 42
[1093]	Gly Gly Gly Gly Ser
[1094]	1 5
[1095]	<210> 43
[1096]	<211> 14
[1097]	<212> PRT
[1098]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1099]	<220>
[1100]	<221>
[1101]	<222>
[1102]	<223> 例示性连接子序列
[1103]	<400> 43
[1104]	Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
[1105]	1 5 10
[1106]	<210> 44
[1107]	<211> 18
[1108]	<212> PRT
[1109]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1110]	<220>
[1111]	<221>
[1112]	<222>
[1113]	<223> 例示性连接子序列
[1114]	<400> 44
[1115]	Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
[1116]	1 5 10 15
[1117]	Leu Asp
[1118]	<210> 45
[1119]	<211> 8
[1120]	<212> PRT
[1121]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1122]	<220>
[1123]	<221>
[1124]	<222>
[1125]	<223> 例示性连接子序列
[1126]	<400> 45
[1127]	Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
[1128]	1 5
[1129]	<210> 46
[1130]	<211> 9
[1131]	<212> PRT
[1132]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1133]	<220>

[1134]	<221>
[1135]	<222>
[1136]	<223> 例示性连接子序列
[1137]	<400> 46
[1138]	Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
[1139]	1 5
[1140]	<210> 47
[1141]	<211> 12
[1142]	<212> PRT
[1143]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1144]	<220>
[1145]	<221>
[1146]	<222>
[1147]	<223> 例示性连接子序列
[1148]	<400> 47
[1149]	Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
[1150]	1 5 10
[1151]	<210> 48
[1152]	<211> 16
[1153]	<212> PRT
[1154]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1155]	<220>
[1156]	<221>
[1157]	<222>
[1158]	<223> 例示性连接子序列
[1159]	<400> 48
[1160]	Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
[1161]	1 5 10 15
[1162]	<210> 49
[1163]	<211> 18
[1164]	<212> PRT
[1165]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1166]	<220>
[1167]	<221>
[1168]	<222>
[1169]	<223> 例示性连接子序列
[1170]	<400> 49
[1171]	Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
[1172]	1 5 10 15
[1173]	Lys Gly
[1174]	<210> 50
[1175]	<211> 7

[1176]	<212> PRT
[1177]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1178]	<220>
[1179]	<221>
[1180]	<222>
[1181]	<223> 由TEV蛋白酶裂解序列
[1182]	<220>
[1183]	<221> SITE
[1184]	<222> (2) .. (3)
[1185]	<223> Xaa为任何氨基酸
[1186]	<220>
[1187]	<221> SITE
[1188]	<222> (5) .. (5)
[1189]	<223> Xaa为任何氨基酸
[1190]	<220>
[1191]	<221> SITE
[1192]	<222> (7) .. (7)
[1193]	<223> Xaa = Gly或Ser
[1194]	<400> 50
[1195]	Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa
[1196]	1 5
[1197]	<210> 51
[1198]	<211> 7
[1199]	<212> PRT
[1200]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1201]	<220>
[1202]	<221>
[1203]	<222>
[1204]	<223> 由TEV蛋白酶裂解序列
[1205]	<400> 51
[1206]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
[1207]	1 5
[1208]	<210> 52
[1209]	<211> 7
[1210]	<212> PRT
[1211]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1212]	<220>
[1213]	<221>
[1214]	<222>
[1215]	<223> 由TEV蛋白酶裂解序列
[1216]	<400> 52
[1217]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

[1218]	1	5	
[1219]	<210>	53	
[1220]	<211>	22	
[1221]	<212>	PRT	
[1222]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1223]	<220>		
[1224]	<221>		
[1225]	<222>		
[1226]	<223>	包含2A位点的自裂解多肽	
[1227]	<400>	53	
[1228]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val		
[1229]	1	5	10 15
[1230]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro		
[1231]		20	
[1232]	<210>	54	
[1233]	<211>	19	
[1234]	<212>	PRT	
[1235]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1236]	<220>		
[1237]	<221>		
[1238]	<222>		
[1239]	<223>	包含2A位点的自裂解多肽	
[1240]	<400>	54	
[1241]	Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn		
[1242]	1	5	10 15
[1243]	Pro Gly Pro		
[1244]	<210>	55	
[1245]	<211>	14	
[1246]	<212>	PRT	
[1247]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1248]	<220>		
[1249]	<221>		
[1250]	<222>		
[1251]	<223>	包含2A位点的自裂解多肽	
[1252]	<400>	55	
[1253]	Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro		
[1254]	1	5	10
[1255]	<210>	56	
[1256]	<211>	21	
[1257]	<212>	PRT	
[1258]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
[1259]	<220>		

[1260]	<221>
[1261]	<222>
[1262]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1263]	<400> 56
[1264]	Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
[1265]	1 5 10 15
[1266]	Glu Asn Pro Gly Pro
[1267]	20
[1268]	<210> 57
[1269]	<211> 18
[1270]	<212> PRT
[1271]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1272]	<220>
[1273]	<221>
[1274]	<222>
[1275]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1276]	<400> 57
[1277]	Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
[1278]	1 5 10 15
[1279]	Gly Pro
[1280]	<210> 58
[1281]	<211> 13
[1282]	<212> PRT
[1283]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1284]	<220>
[1285]	<221>
[1286]	<222>
[1287]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1288]	<400> 58
[1289]	Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[1290]	1 5 10
[1291]	<210> 59
[1292]	<211> 23
[1293]	<212> PRT
[1294]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1295]	<220>
[1296]	<221>
[1297]	<222>
[1298]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1299]	<400> 59
[1300]	Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
[1301]	1 5 10 15

[1302]	Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1303]	20
[1304]	<210> 60
[1305]	<211> 20
[1306]	<212> PRT
[1307]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1308]	<220>
[1309]	<221>
[1310]	<222>
[1311]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1312]	<400> 60
[1313]	Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
[1314]	1 5 10 15
[1315]	Asn Pro Gly Pro
[1316]	20
[1317]	<210> 61
[1318]	<211> 14
[1319]	<212> PRT
[1320]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1321]	<220>
[1322]	<221>
[1323]	<222>
[1324]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1325]	<400> 61
[1326]	Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1327]	1 5 10
[1328]	<210> 62
[1329]	<211> 25
[1330]	<212> PRT
[1331]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1332]	<220>
[1333]	<221>
[1334]	<222>
[1335]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1336]	<400> 62
[1337]	Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
[1338]	1 5 10 15
[1339]	Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1340]	20 25
[1341]	<210> 63
[1342]	<211> 22
[1343]	<212> PRT

- [1344] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1345] <220>
[1346] <221>
[1347] <222>
[1348] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1349] <400> 63
[1350] Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
[1351] 1 5 10 15
[1352] Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1353] 20
[1354] <210> 64
[1355] <211> 14
[1356] <212> PRT
[1357] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1358] <220>
[1359] <221>
[1360] <222>
[1361] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1362] <400> 64
[1363] Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1364] 1 5 10
[1365] <210> 65
[1366] <211> 19
[1367] <212> PRT
[1368] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1369] <220>
[1370] <221>
[1371] <222>
[1372] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1373] <400> 65
[1374] Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
[1375] 1 5 10 15
[1376] Pro Gly Pro
[1377] <210> 66
[1378] <211> 19
[1379] <212> PRT
[1380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1381] <220>
[1382] <221>
[1383] <222>
[1384] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1385] <400> 66

[1386]	Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
[1387]	1 5 10 15
[1388]	Pro Gly Pro
[1389]	<210> 67
[1390]	<211> 14
[1391]	<212> PRT
[1392]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1393]	<220>
[1394]	<221>
[1395]	<222>
[1396]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1397]	<400> 67
[1398]	Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1399]	1 5 10
[1400]	<210> 68
[1401]	<211> 17
[1402]	<212> PRT
[1403]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1404]	<220>
[1405]	<221>
[1406]	<222>
[1407]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1408]	<400> 68
[1409]	Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
[1410]	1 5 10 15
[1411]	Pro
[1412]	<210> 69
[1413]	<211> 20
[1414]	<212> PRT
[1415]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1416]	<220>
[1417]	<221>
[1418]	<222>
[1419]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1420]	<400> 69
[1421]	Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
[1422]	1 5 10 15
[1423]	Asn Pro Gly Pro
[1424]	20
[1425]	<210> 70
[1426]	<211> 24
[1427]	<212> PRT

- [1428] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1429] <220>
[1430] <221>
[1431] <222>
[1432] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1433] <400> 70
[1434] Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
[1435] 1 5 10 15
[1436] Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1437] 20
[1438] <210> 71
[1439] <211> 40
[1440] <212> PRT
[1441] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1442] <220>
[1443] <221>
[1444] <222>
[1445] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1446] <400> 71
[1447] Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro
[1448] 1 5 10 15
[1449] Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys
[1450] 20 25 30
[1451] Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr
[1452] 35 40
[1453] <210> 72
[1454] <211> 18
[1455] <212> PRT
[1456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1457] <220>
[1458] <221>
[1459] <222>
[1460] <223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1461] <400> 72
[1462] Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
[1463] 1 5 10 15
[1464] Gly Pro
[1465] <210> 73
[1466] <211> 40
[1467] <212> PRT
[1468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1469] <220>

[1470]	<221>
[1471]	<222>
[1472]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1473]	<400> 73
[1474]	Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val
[1475]	1 5 10 15
[1476]	Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
[1477]	20 25 30
[1478]	Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[1479]	35 40
[1480]	<210> 74
[1481]	<211> 33
[1482]	<212> PRT
[1483]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1484]	<220>
[1485]	<221>
[1486]	<222>
[1487]	<223> 包含2A位点的自裂解多肽
[1488]	<400> 74
[1489]	Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu
[1490]	1 5 10 15
[1491]	Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
[1492]	20 25 30
[1493]	Pro
[1494]	<210> 75
[1495]	<211> 10
[1496]	<212> DNA
[1497]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1498]	<220>
[1499]	<221>
[1500]	<222>
[1501]	<223> 共同Kozak序列
[1502]	<400> 75
[1503]	gccrccatgg 10
[1504]	<210> 76
[1505]	<211> 4
[1506]	<212> PRT
[1507]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1508]	<220>
[1509]	<221>
[1510]	<222>
[1511]	<223> 确定轻链CDR-L3基元的例示性规则

[1512]	<220>
[1513]	<221> SITE
[1514]	<222> (3) .. (3)
[1515]	<223> Xaa为任何氨基酸
[1516]	<400> 76
[1517]	Phe Gly Xaa Gly
[1518]	1
[1519]	<210> 77
[1520]	<211> 4
[1521]	<212> PRT
[1522]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1523]	<220>
[1524]	<221>
[1525]	<222>
[1526]	<223> 确定重链CDR-H1基元的例示性规则
[1527]	<220>
[1528]	<221> SITE
[1529]	<222> (2) .. (4)
[1530]	<223> Xaa为任何氨基酸
[1531]	<400> 77
[1532]	Cys Xaa Xaa Xaa
[1533]	1
[1534]	<210> 78
[1535]	<211> 5
[1536]	<212> PRT
[1537]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1538]	<220>
[1539]	<221>
[1540]	<222>
[1541]	<223> 确定重链CDR-H2基元的例示性规则
[1542]	<400> 78
[1543]	Leu Glu Trp Ile Gly
[1544]	1 5
[1545]	<210> 79
[1546]	<211> 4
[1547]	<212> PRT
[1548]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1549]	<220>
[1550]	<221>
[1551]	<222>
[1552]	<223> 确定重链CDR-H3基元的例示性规则
[1553]	<220>

-
- [1554] <221> SITE
[1555] <222> (3) .. (3)
[1556] <223> Xaa为任何氨基酸
[1557] <400> 79
[1558] Trp Gly Xaa Gly
[1559] 1

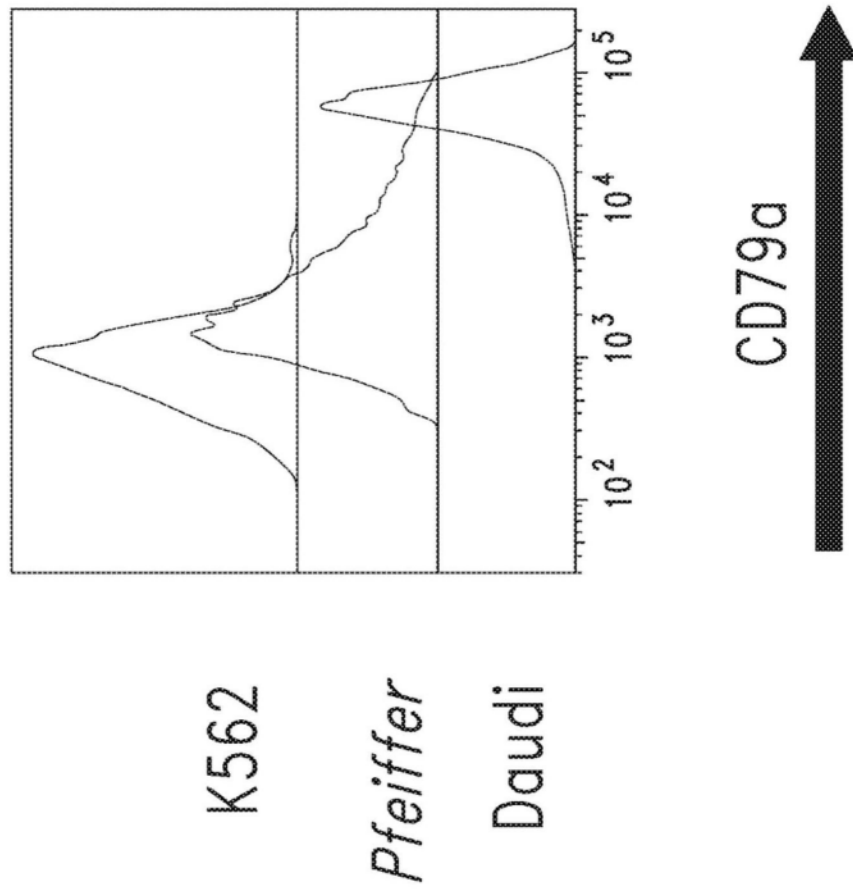


图1A

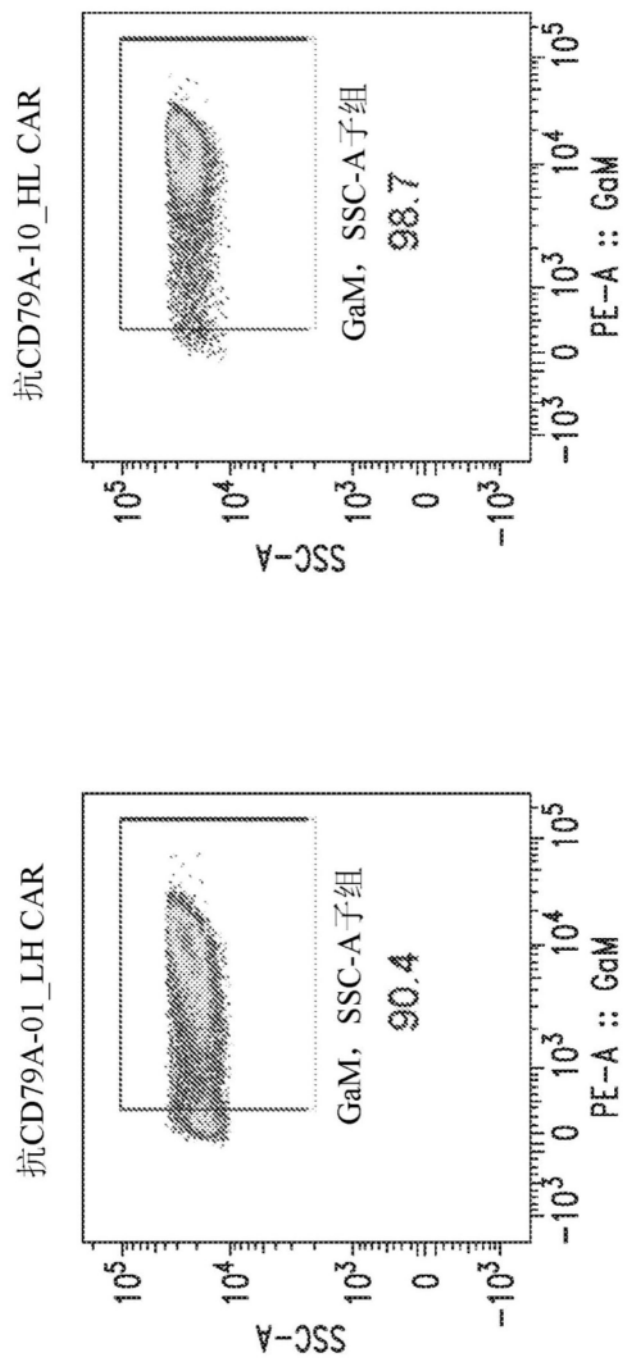


图1B

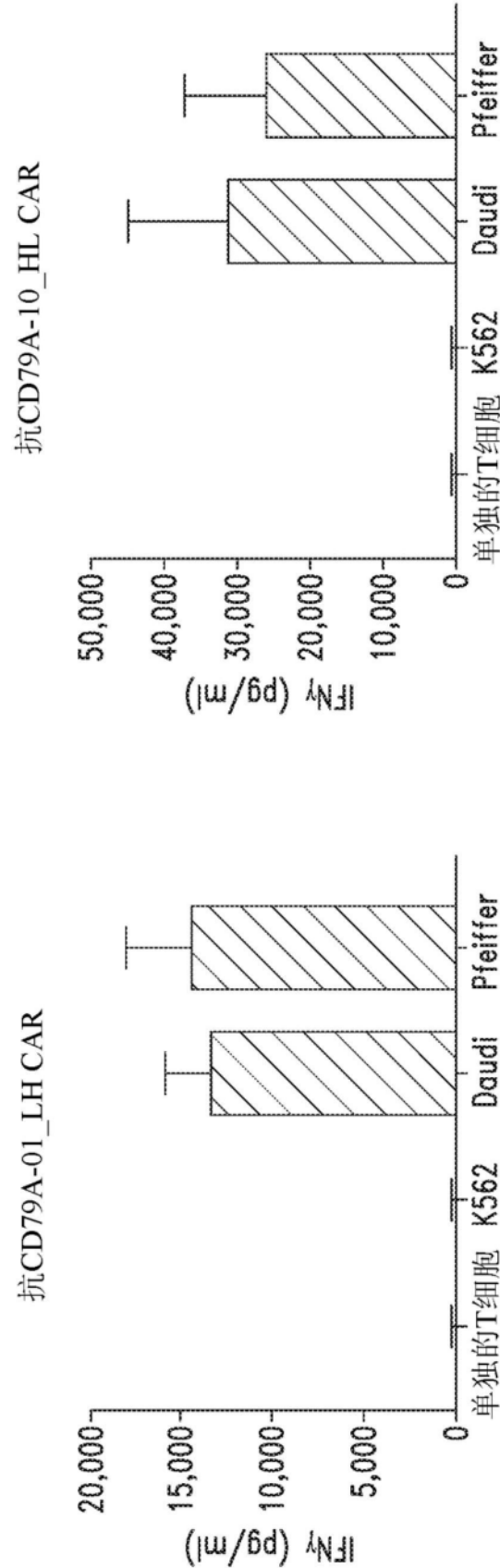


图1C

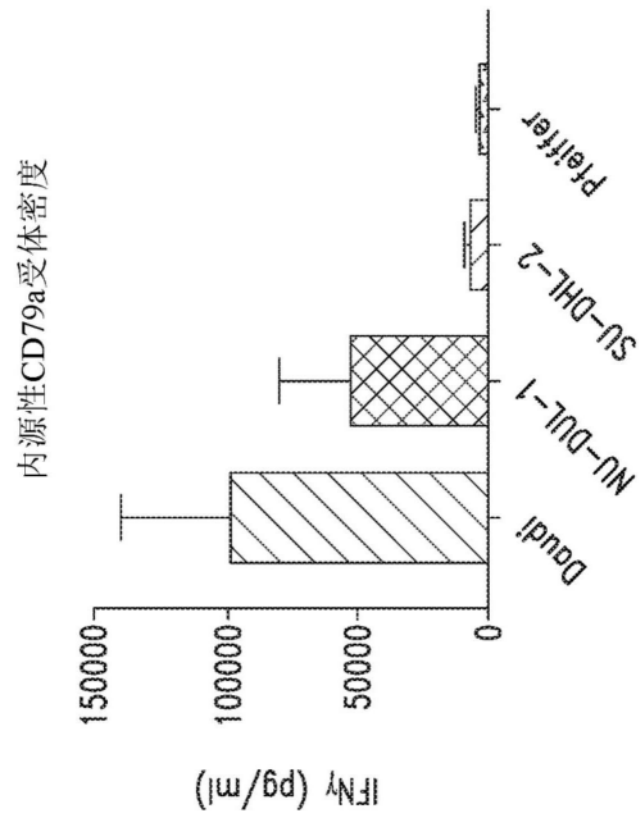
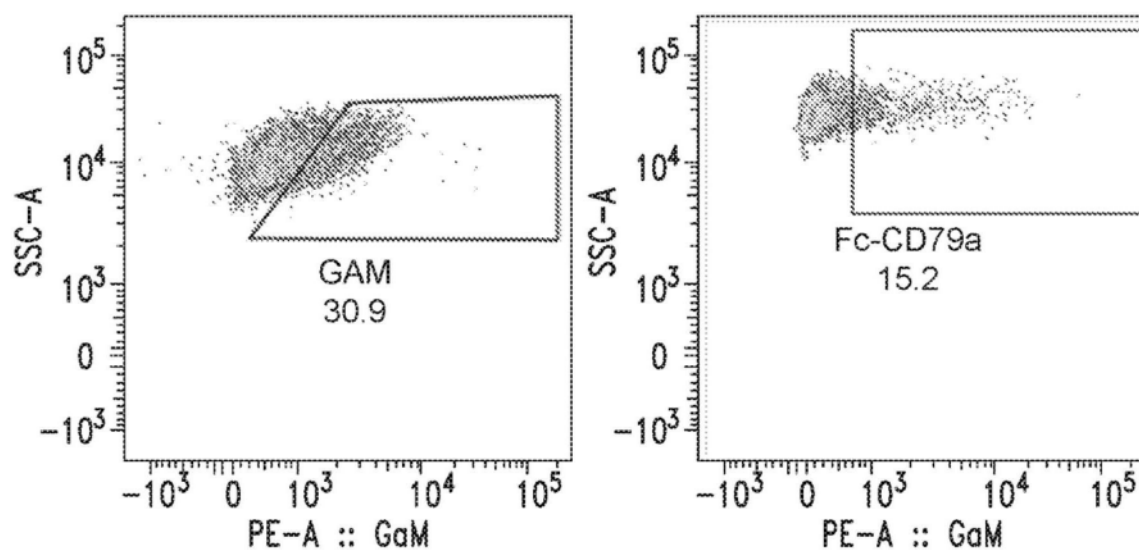


图2A

抗CD79A-02_HL CAR



抗CD79A-20_LH CAR

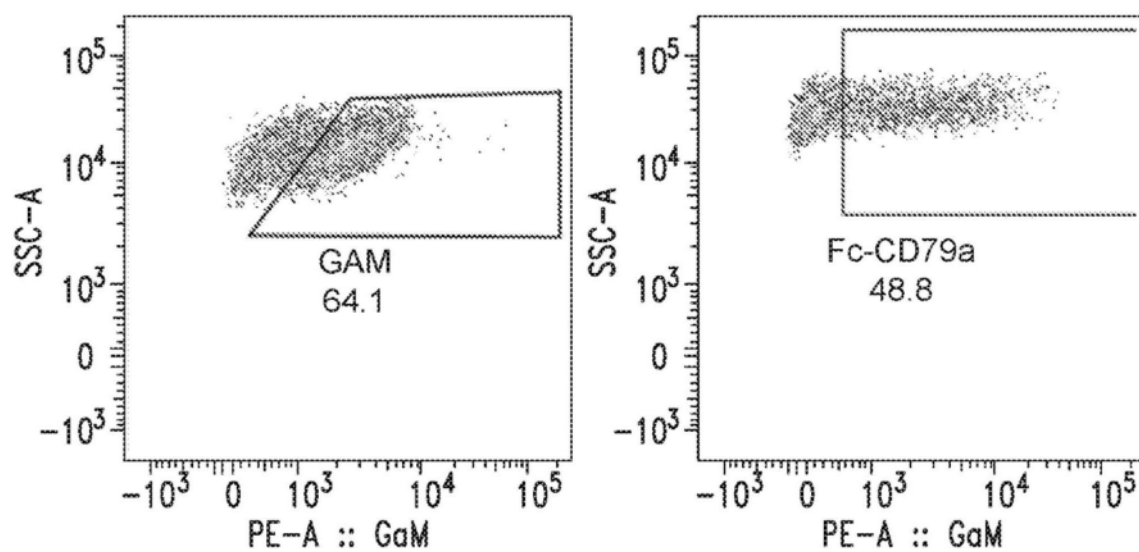


图2B

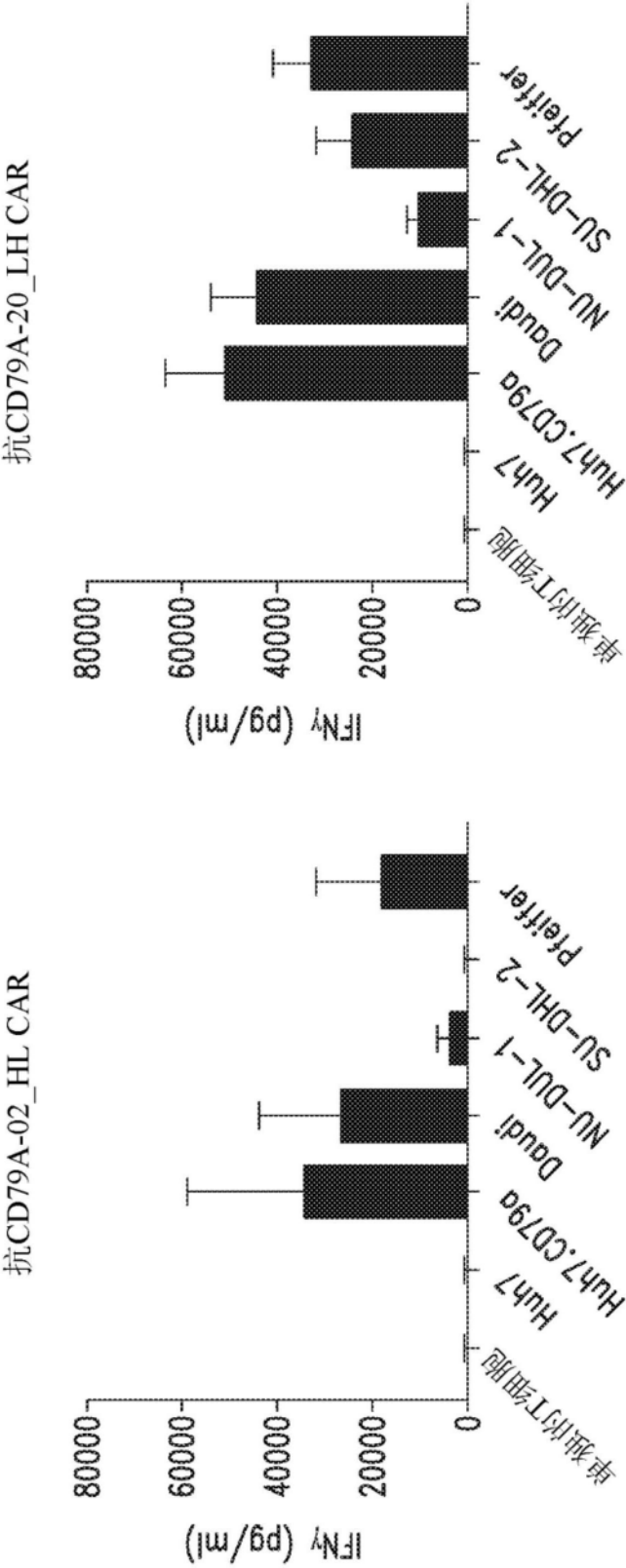


图2C