



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118829652 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202380023342.2

(22) 申请日 2023.01.10

(30) 优先权数据

63/298,141 2022.01.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/010518 2023.01.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/133358 EN 2023.07.13

(71) 申请人 再生元制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 杰弗里·布莱克本·帕森斯

大卫·德里罗 蒂娜·阿尔伯沙特

(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 洪欣 伊硕

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

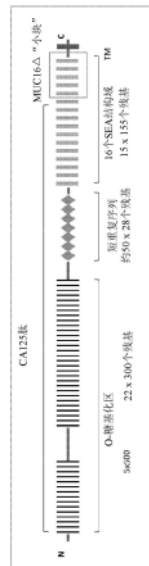
权利要求书7页 说明书107页 附图24页

(54) 发明名称

MUC16嵌合抗原受体

(57) 摘要

本公开提供了靶向MUC16的嵌合抗原受体(CAR)、经基因修饰的免疫效应细胞以及这些组合物用于治疗癌症的用途。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包括: 细胞外结构域, 所述细胞外结构域包括与人MUC16多肽的一个或多个表位结合的抗MUC16抗体或其抗原结合片段; 跨膜结构域; 一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域; 以及初级信号传导结构域。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述MUC16抗体或其抗原结合片段在全长MUC16多肽的蛋白水解切割之后与保留在细胞表面上的MUC16的膜近侧片段结合。

3. 根据权利要求2所述的CAR, 其中在蛋白水解切割之后保留在所述细胞表面上的所述MUC16的片段包括SEQ ID NO:151。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的CAR, 其中所述全长MUC16多肽包括从N末端至C末端编号为1-16的16个海胆精子、肠激酶和聚集蛋白 (SEA) 结构域, 并且其中所述MUC16的片段包括SEA结构域12-16。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的CAR, 其中与所述人MUC16多肽结合的所述抗MUC16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、骆驼Ig、VHH、Ig NAR、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") 和单结构域抗体 (sdAb, 纳米抗体) 或其片段。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的CAR, 其中与所述人MUC16多肽结合的所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段是scFv。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:47、59、71、83、95、107、119、133或145中的任一者中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:8中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:48、60、72、84、96、108、120、134或146中的任一者中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:1-3中的任一者中所示的一个或多个CDR。

12. 根据权利要求1至10中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如以下中的任一者中所示的一个或多个CDR: (a) SEQ ID NO:41-43; (b) SEQ ID NO:53-55; (c) SEQ ID NO:65-67; (d) SEQ ID NO:77-79; (e) SEQ ID NO:89-91; (f) SEQ ID NO:101-103; (g) SEQ ID NO:113-115; (h) SEQ ID NO:127-129; 或 (i) SEQ ID NO:139-141。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:4-6中的任一者中所示的一个或多个CDR。

14. 根据权利要求1至12中任一项所述的CAR, 其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如以下中的任一者中所示的一个或多个CDR: (a) SEQ ID NO:44-46; (b) SEQ ID NO:56-58; (c) SEQ ID NO:68-70; (d) SEQ ID NO:80-82; (e) SEQ ID NO:92-94; (f) SEQ ID NO:104-106; (g) SEQ ID NO:116-118; (h) SEQ ID NO:130-132; 或 (i) SEQ ID NO:142-144。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括与SEQ ID NO:7具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的可变轻链氨基酸序列或包括SEQ ID NO:7。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括与SEQ ID NO:47、59、71、83、95、107、119、133或145中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的可变轻链氨基酸序列或包括SEQ ID NO:47、59、71、83、95、107、119、133或145中的任一者。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括与SEQ ID NO:8具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的可变重链氨基酸序列或包括SEQ ID NO:8。

18. 根据权利要求1至16中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括与SEQ ID NO:48、60、72、84、96、108、120、134或146中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的可变重链氨基酸序列或包括SEQ ID NO:48、60、72、84、96、108、120、134或146中的任一者。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域来自多肽,所述多肽选自由以下组成的组:T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1。

20. 根据权利要求1至18中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域来自多肽,所述多肽选自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD45、PD1和CD154。

21. 根据权利要求1至18中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域来自CD8 α 。

22. 根据权利要求21所述的CAR,其中所述跨膜结构域包括SEQ ID NO:154的序列。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的CAR,其中所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD28、CD134和CD137(4-1BB)、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。

24. 根据权利要求1至22中任一项所述的CAR,其中所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD28、CD134和CD137(4-1BB)。

25. 根据权利要求1至22中任一项所述的CAR,其中所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自CD137(4-1BB)。

26. 根据权利要求25所述的CAR,其中所述共刺激信号传导结构域包括SEQ ID NO:155的序列。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的CAR,其中所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。

28. 根据权利要求27所述的CAR,其中所述初级信号传导结构域包括SEQ ID NO:156的序列。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的CAR,其进一步包括铰链区多肽。

30. 根据权利要求29所述的CAR,其中所述铰链区多肽包括CD8 α 的铰链区。

31. 根据权利要求30所述的CAR,其中所述铰链区多肽包括SEQ ID NO:153的序列。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的CAR,其进一步包括信号多肽。

33. 根据权利要求32所述的CAR,其中所述信号多肽包括IgG1重链信号多肽、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体2 (GM-CSFR2) 信号多肽、Ig κ 信号多肽或CD8 α 信号多肽。

34. 根据权利要求33所述的CAR,其中所述信号多肽包括CD8 α 信号多肽。

35. 根据权利要求34所述的CAR,其中所述信号多肽包括SEQ ID NO:152的序列。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的CAR,其进一步包括位于可变重链结构域与可变轻链结构域之间的多肽接头。

37. 根据权利要求36所述的CAR,其中位于所述可变重链结构域与所述可变轻链结构域之间的所述多肽接头包括SEQ ID NO:14-25中的任一者的氨基酸序列。

38. 根据权利要求37所述的CAR,其中位于所述可变重链结构域与所述可变轻链结构域之间的所述多肽接头包括如SEQ ID NO:24中所示的3xG4S氨基酸接头。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的CAR,其进一步包括位于所述跨膜结构域与所述一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域之间的多肽接头。

40. 根据权利要求39所述的CAR,其中位于所述跨膜结构域与所述一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域之间的所述多肽接头包括LYC的序列。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区以及如SEQ ID NO:8中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区;所述跨膜结构域来自多肽,所述多肽选自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD45、PD1和CD154;所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD28、CD134和CD137 (4-1BB);并且所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。

42. 根据权利要求1至40中任一项所述的CAR,其中所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区以及如SEQ ID NO:8中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区;所述跨膜结构域来自CD8 α ;所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自CD137 (4-1BB);并且所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的CAR,其包括与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或包括SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11。

44. 根据权利要求1至42中任一项所述的CAR,其包括与SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或包括SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者。

45. 一种CAR,其与根据权利要求1至44中任一项所述的CAR竞争与人MUC16多肽的一个或多个表位结合。

46. 一种编码根据权利要求1至45中任一项所述的CAR的多核苷酸。

47. 一种编码CAR的多核苷酸,其中多核苷酸序列编码与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的多肽或包括

SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12。

48.一种编码CAR的多核苷酸,其中多核苷酸序列编码与SEQ ID NO:9、11、49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或包括SEQ ID NO:9、11、49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者的多肽。

49.一种载体,其包括根据权利要求46至48中任一项所述的多核苷酸。

50.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是表达载体。

51.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是游离型载体。

52.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

53.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是逆转录病毒载体。

54.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是慢病毒载体。

55.根据权利要求49所述的载体,其中所述载体是腺相关病毒载体。

56.根据权利要求54所述的载体,其中所述慢病毒载体选自由以下组成的组: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(visna-maedi virus, VMV)病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。

57.根据权利要求49至56中任一项所述的载体,其包括:左(5')逆转录病毒LTR、Psi(Ψ)包装信号、中心多嘌呤段/DNA瓣(cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件;与根据权利要求26或权利要求27所述的多核苷酸可操作地连接的启动子;以及右(3')逆转录病毒LTR。

58.根据权利要求57所述的载体,其进一步包括异源聚腺苷酸化序列。

59.根据权利要求58中任一项所述的载体,其中所述5'LTR的启动子用异源启动子替换。

60.根据权利要求59所述的载体,其中所述异源启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus, RSV)启动子或猿猴病毒40(SV40)启动子。

61.根据权利要求57至60中任一项所述的载体,其中所述5'LTR或所述3'LTR是慢病毒LTR。

62.根据权利要求57至61中任一项所述的载体,其中所述3'LTR包括一个或多个修饰。

63.根据权利要求57至62中任一项所述的载体,其中所述3'LTR包括一个或多个缺失。

64.根据权利要求57至63中任一项所述的载体,其中所述3'LTR是自失活(SIN)LTR。

65.根据权利要求57至64中任一项所述的载体,其中所述与根据权利要求47至48中任一项所述的多核苷酸可操作地连接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)、延长因子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)和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子、阴性对照区缺失的、d1587rev引物结合位点取代的(MND)启动子。

66.根据权利要求65所述的载体,其中所述与根据权利要求46至48中任一项所述的多核苷酸可操作地连接的启动子是MND启动子。

67. 一种细胞,其包括根据权利要求49至66中任一项所述的载体。
68. 一种细胞,其包括根据权利要求1至45中任一项所述的CAR。
69. 根据权利要求67或68所述的细胞,其中所述细胞是免疫效应细胞。
70. 根据权利要求69所述的细胞,其中所述免疫效应细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或辅助T细胞。
71. 根据权利要求67或68所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。
72. 根据权利要求67或68所述的细胞,其中所述细胞是 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞。
73. 一种组合物,其包括根据权利要求67至72中任一项所述的细胞。
74. 一种药物组合物,其包括根据权利要求67至72中任一项所述的细胞以及生理学上可接受的赋形剂。
75. 一种产生包括根据权利要求1至45中任一项所述的CAR的免疫效应细胞的方法,所述方法包括将根据权利要求46至48中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求49至66中任一项所述的载体引入到免疫效应细胞中。
76. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求73所述的组合物或根据权利要求74所述的药物组合物。
77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述癌症是实体癌,任选地其中所述实体癌表达MUC16。
78. 根据权利要求77所述的方法,其中所述实体癌选自由以下组成的组:肉瘤、前列腺癌、子宫癌、甲状腺癌、睾丸癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈、间皮瘤、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、黑色素瘤、肝细胞癌、头颈癌、胃癌、子宫内膜癌、输卵管癌、结直肠癌、胆管癌、乳腺癌和膀胱癌。
79. 根据权利要求77所述的方法,其中所述实体癌选自由以下组成的组:卵巢、子宫内膜癌、宫颈癌、间皮瘤、NSCLC和SCLC。
80. 根据权利要求77所述的方法,其中所述实体癌是卵巢癌。
81. 根据权利要求76至80中任一项所述的方法,其中所述组合物与另外的治疗剂组合施用。
82. 一种治疗已经接受或正在接受治疗剂的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求73所述的组合物或根据权利要求74所述的药物组合物。
83. 根据权利要求81或82所述的方法,其中所述组合物和所述治疗剂依序或同时施用。
84. 根据权利要求81至83中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是免疫检查点抑制剂、溶瘤病毒或共刺激抗体。
85. 根据权利要求84所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂与选自由以下组成的组的检查点蛋白或对应配体结合:程序性细胞死亡蛋白1(PD-1;PDCD1)、淋巴细胞激活基因3蛋白(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域蛋白3(TIM-3)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、带T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)、T细胞免疫球蛋白和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序结构域(TIGIT)、T细胞激活的V结构域Ig抑制因子(VISTA)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、ICOS、ICOSL、OX40、B7-H3、

B7-H4、CD47、4-1BB、CD27和CD70。

86. 根据权利要求84或85所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。

87. 根据权利要求86所述的方法,其中所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述PD-1抑制剂选自由以下组成的组:纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)和西米普利单抗(cemiplimab)。

89. 根据权利要求84所述的方法,其中所述共刺激抗体是双特异性抗体。

90. 根据权利要求89所述的方法,其中所述双特异性抗体与肿瘤相关抗原(TAA)和CD3结合。

91. 根据权利要求89所述的方法,其中所述双特异性抗体与TAA和CD28结合。

92. 根据权利要求90或权利要求91所述的方法,其中所述TAA选自由以下组成的组: AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-8、CCR5、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、周期蛋白-B1、CYP1B1、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1、GAGE-2)、GD2、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MART-1、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PRLR、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活蛋白、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、尿溶蛋白-3(uroplakin-3)、 α 叶酸受体(FR α)、 α v β 6整合蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、Claudin-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2的EGFR家族(HER2)、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y(Lewis-Y, LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(Wilms tumor 1, WT-1)。

93. 根据权利要求90或权利要求91所述的方法,其中所述TAA是MSLN。

94. 根据权利要求90或权利要求91所述的方法,其中所述TAA是 α 叶酸受体 (FR α)。
95. 根据权利要求90或权利要求91所述的方法,其中所述TAA是MUC16。
96. 根据权利要求81至83中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂。
97. 根据权利要求96所述的方法,其中所述VEGF抑制剂是贝伐单抗 (bevacizumab)。
98. 根据权利要求81至83中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是细胞因子。
99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2或掩蔽的IL-2。
100. 根据权利要求81至83中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是溶瘤病毒。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述溶瘤病毒选自由以下组成的组: VSV (Voyager V1)、HSV、腺病毒、马拉巴病毒 (maraba virus)、麻疹病毒、NDV、小核糖核酸病毒、呼肠孤病毒或牛痘病毒。
102. 根据权利要求100所述的方法,其中所述溶瘤病毒是Voyager V1。

MUC16嵌合抗原受体

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年1月10日提交的美国临时申请第63/298,141号的优先权。前述申请的全部内容明确地通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及包括抗MUC16(粘蛋白16,细胞表面相关)抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体(CAR)、经基因修饰以表达这些CAR的免疫效应细胞以及这些组合物用于有效治疗实体瘤的用途。

背景技术

[0004] 粘蛋白16(MUC16),也被称为癌症抗原125(CA-125),是在如卵巢癌等实体瘤中过表达的单个跨膜结构域。已经示出MUC16在癌细胞上的表达保护肿瘤细胞免受免疫系统的影响(Felder,M.等人2014,《分子癌症(Molecular Cancer)》,13:129)。尽管已经研究了靶向MUC16的抗体(例如,奥戈伏单抗(oregovomab)和阿巴伏单抗(abgovomab)),但其临床成功有限。因此,需要靶向此抗原的另外的疗法。

发明内容

[0005] 本公开至少部分地基于对MUC16多肽具有特异性的嵌合抗原受体(CAR)的发现。具体地,本文所描述的CAR对全长MUC16多肽的蛋白水解切割后存在于细胞的表面上的MUC16的片段或部分具有特异性。如本文所展示的,所公开的抗MUC16 CAR包括令人惊讶和出乎意料的性质。如在实例中更详细地讨论的,本公开的CAR表现出强抗原依赖性活性,如通过IFN- γ 释放、高转导效率和高表达所评估的(参见例如,实例2)。另外,本文所公开的抗MUC16 CAR以剂量依赖性方式表现出抗原依赖性细胞毒性,例如,至少60%、至少65%或至少70%细胞毒性(实例3)。此外,本文所公开的某些抗MUC16 CAR表现出标志物(如CD62L和CD45RA)的表达增加(实例4),所述标志物指向具有更大体内持久性潜力的更大原初样表型。最后,本文所测试的某些抗MUC16 CAR令人惊讶地显示出优异的体内抗肿瘤活性(实例6和7),包含减少体内表达MUC16的癌细胞的数量。

[0006] 因此,在一些方面,本公开提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包括:细胞外结构域,所述细胞外结构域包括与人MUC16多肽的一个或多个表位结合的抗MUC16抗体或其抗原结合片段;跨膜结构域;一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域;以及初级信号传导结构域。在一些方面,所述MUC16抗体或其抗原结合片段在全长MUC16多肽的蛋白水解切割之后与保留在细胞表面上的MUC16的膜近侧片段结合。一方面,在蛋白水解切割之后保留在所述细胞表面上的所述MUC16的片段包括SEQ ID NO:151。在一些方面,所述全长MUC16多肽包括从N末端至C末端编号为1-16的16个海胆精子、肠激酶和聚集蛋白(SEA)结构域,并且其中所述MUC16的片段包括SEA结构域12-16。

[0007] 在前述或相关方面中的任一个中,与所述人MUC16多肽结合的所述抗MUC16抗体或

抗原结合片段选自以下组成的组: 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、骆驼 Ig、VHH、IgNAR、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") 和单结构域抗体 (sdAb, 纳米抗体) 或其片段。在一些方面, 与所述人 MUC16 多肽结合的所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段是 scFv。

[0008] 在前述或相关方面中的任一个中, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 7 中所示的可变轻链氨基酸序列内的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 区。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 47、59、71、83、95、107、119、133 或 145 中的任一者中所示的可变轻链氨基酸序列内的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 区。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 8 中所示的可变重链氨基酸序列内的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 区。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 48、60、72、84、96、108、120、134 或 146 中的任一者中所示的可变重链氨基酸序列内的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 区。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 1-3 中的任一者中所示的一个或多个 CDR。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如以下中的任一者中所示的一个或多个 CDR: (a) SEQ ID NO: 41-43; (b) SEQ ID NO: 53-55; (c) SEQ ID NO: 65-67; (d) SEQ ID NO: 77-79; (e) SEQ ID NO: 89-91; (f) SEQ ID NO: 101-103; (g) SEQ ID NO: 113-115; (h) SEQ ID NO: 127-129; 或 (i) SEQ ID NO: 139-141。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 4-6 中的任一者中所示的一个或多个 CDR。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 7 中所示的可变轻链氨基酸序列。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如 SEQ ID NO: 8 中所示的可变重链氨基酸序列。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括如以下中的任一者中所示的一个或多个 CDR: (a) SEQ ID NO: 44-46; (b) SEQ ID NO: 56-58; (c) SEQ ID NO: 68-70; (d) SEQ ID NO: 80-82; (e) SEQ ID NO: 92-94; (f) SEQ ID NO: 104-106; (g) SEQ ID NO: 116-118; (h) SEQ ID NO: 130-132; 或 (i) SEQ ID NO: 142-144。

[0009] 在前述或相关方面中的任一个中, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的可变轻链氨基酸序列或包括 SEQ ID NO: 7。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括与 SEQ ID NO: 47、59、71、83、95、107、119、133 或 145 中的任一者具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的可变轻链氨基酸序列或包括 SEQ ID NO: 47、59、71、83、95、107、119、133 或 145 中的任一者。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括与 SEQ ID NO: 8 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的可变重链氨基酸序列或包括 SEQ ID NO: 8。在一些方面, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包括与 SEQ ID NO: 48、60、72、84、96、108、120、134 或 146 中的任一者具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一性的可变重链氨基酸序列或包括 SEQ ID NO: 48、60、72、84、96、108、120、134 或 146 中的任一者。

[0010] 在前述或相关方面中的任一个中, 所述跨膜结构域来自多肽, 所述多肽选自以下组成的组: T 细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154 和 PD1。在一些方面, 所述跨膜结构域来自多肽, 所述多肽选自以下组成的组: CD8 α 、CD4、CD45、PD1 和 CD154。在一

些方面,所述跨膜结构域来自CD8 α 。在一些方面,所述跨膜结构域包括与SEQ ID NO:154的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:154的序列。在一个实施例中,所述跨膜结构域包括与SEQ ID NO:154具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述跨膜结构域包括SEQ ID NO:154。

[0011] 在前述或相关方面中的任一个中,所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。在一些方面,所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD28、CD134和CD137 (4-1BB)。在一些方面,所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自CD137 (4-1BB)。在一些方面,所述共刺激信号传导结构域包括与SEQ ID NO:155的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:155的序列。在一个实施例中,所述共刺激信号传导结构域包括与SEQ ID NO:155具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述共刺激信号传导结构域包括SEQ ID NO:155。

[0012] 在前述或相关方面中的任一个中,所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。在一些方面,所述初级信号传导结构域包括与SEQ ID NO:156的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:156的序列。在一个实施例中,所述初级信号传导结构域包括与SEQ ID NO:156具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述初级信号传导结构域包括SEQ ID NO:156。

[0013] 在前述或相关方面中的任一个中,所述CAR包括铰链区多肽。在一些方面,所述铰链区多肽包括CD8 α 的铰链区。在一些方面,所述铰链区多肽包括与SEQ ID NO:153的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:153的序列。在一个实施例中,所述铰链区多肽包括与SEQ ID NO:153具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述铰链区多肽包括SEQ ID NO:153。

[0014] 在前述或相关方面中的任一个中,所述CAR包括信号肽。在一些方面,所述信号肽包括IgG1重链信号多肽、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体2 (GM-CSFR2) 信号多肽、Ig κ 信号多肽或CD8 α 信号多肽。在一些方面,信号多肽包括CD8 α 信号多肽。在一些方面,信号多肽包括与SEQ ID NO:152的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:152的序列。在一个实施例中,信号多肽包括与SEQ ID NO:152具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,信号多肽包括SEQ ID NO:152。

[0015] 在前述或相关方面中的任一个中,所述CAR进一步包括位于可变重链结构域与可变轻链结构域之间的第一多肽接头。在一些方面,位于所述可变重链结构域与所述可变轻链结构域之间的所述多肽接头包括如SEQ ID NO:14-25中的任一者中所示的氨基酸序列。在特定实施例中,位于所述可变重链结构域与所述可变轻链结构域之间的所述多肽接头包括如SEQ ID NO:24中所示的3xG4S氨基酸接头。

[0016] 在前述或相关方面中的任一个中,所述CAR进一步包括位于所述跨膜结构域与所述一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域之间的第二多肽接头。在一些方面,位于所述跨膜结构域与所述一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域之间的所述多肽接头包括LYC

的序列。

[0017] 在前述或相关方面中的任一个中,所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区以及如SEQ ID NO:8中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区;所述跨膜结构域来自多肽,所述多肽选自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD45、PD1和CD154;所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自共刺激分子,所述共刺激分子选自由以下组成的组:CD28、CD134和CD137 (4-1BB);并且所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。

[0018] 在前述或相关方面中的任一个中,所述抗MUC16抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链氨基酸序列内的CDRL1、CDRL2和CDRL3区以及如SEQ ID NO:8中所示的可变重链氨基酸序列内的CDRH1、CDRH2和CDRH3区;所述跨膜结构域来自CD8 α ;所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自CD137 (4-1BB);并且所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。

[0019] 在前述或相关方面中的任一个中,所述CAR包括与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或包括SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些方面,所述CAR包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些方面,所述CAR包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些方面,所述CAR包括与SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或包括SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者的氨基酸序列。

[0020] 在一些方面,本公开提供了一种CAR,其与本文所公开的CAR竞争与人MUC16多肽的一个或多个表位结合。

[0021] 在一些方面,本公开提供了一种编码本文所述的CAR的多核苷酸。在一些方面,编码所述CAR的多核苷酸序列在SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中示出。在一些方面,本公开提供了包括SEQ ID NO:10的多核苷酸。在一些方面,本公开提供了包括SEQ ID NO:12的多核苷酸。在一些方面,所述多核苷酸序列编码与SEQ ID NO:9、11、49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或包括SEQ ID NO:9、11、49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者的多肽。

[0022] 在一些方面,本公开提供了一种载体,其包括本文所描述的多核苷酸。在一些方面,所述载体是表达载体。在一些方面,所述载体是游离型载体。在一些方面,所述载体是病毒载体。在一些方面,所述载体是逆转录病毒载体。在一些方面,所述载体是慢病毒载体。在一些方面,所述慢病毒载体选自由以下组成的组: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 (visna-maedi virus, VMV) 病毒;山羊关节炎-脑炎病毒 (CAEV);马传染性贫血病毒 (EIAV);猫免疫缺陷病毒 (FIV);牛免疫缺陷病毒 (BIV);以及猿

猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一些方面,所述载体是腺相关病毒载体。

[0023] 在前述或相关方面中的任一个中,所述载体包括:左(5')逆转录病毒LTR、Psi(Ψ)包装信号、中心多嘌呤段/DNA瓣(cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件;与本文所描述的多核苷酸可操作地连接的启动子;以及右(3')逆转录病毒LTR。在一些方面,所述载体包括异源聚腺苷酸化序列。在一些方面,所述5'LTR的启动子用异源启动子替换。在一些方面,所述异源启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus, RSV)启动子或猿猴病毒40(SV40)启动子。在一些方面,所述5'LTR或所述3'LTR是慢病毒LTR。在一些方面,所述3'LTR包括一个或多个修饰。在一些方面,所述3'LTR包括一个或多个缺失。在一些方面,所述3'LTR是自失活(SIN)LTR。在一些方面,所述与本文所描述的多核苷酸可操作地连接的启动子选自以下组成的组:巨细胞病毒立即早期基因启动子(CMV)、延长因子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)和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子、阴性对照区缺失的、dl587rev引物结合位点取代的(MND)启动子。在一些方面,所述与本文所描述的多核苷酸可操作地连接的启动子是MND启动子。

[0024] 在一些方面,本公开提供了一种包括本文所描述的载体的细胞。在一些方面,本公开提供了一种包括本文所描述的CAR的细胞。在一些方面,所述细胞是免疫效应细胞。在一些方面,所述免疫效应细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或辅助T细胞。在一些方面,所述细胞是T细胞。在一些方面,所述细胞是 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞。

[0025] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包括本文所描述的细胞。在一些方面,本公开提供了一种药物组合物,其包括本文所描述的细胞和生理学上可接受的赋形剂。

[0026] 在一些方面,本公开提供了一种生成包括本文所描述CAR的免疫效应细胞的方法,所述方法包括将本文所描述的多核苷酸或载体引入到免疫效应细胞中。

[0027] 在一些方面,本公开提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所描述的组合物。在一些方面,所述癌症是实体癌,任选地其中所述实体癌表达MUC16。在一些方面,所述实体癌选自以下组成的组:肉瘤、前列腺癌、子宫癌、甲状腺癌、睾丸癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈、间皮瘤、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、黑色素瘤、肝细胞癌、头颈癌、胃癌、子宫内膜癌、输卵管癌、结直肠癌、胆管癌、乳腺癌和膀胱癌。在一些方面,所述实体癌选自以下组成的组:卵巢、子宫内膜癌、宫颈癌、间皮瘤、NSCLC和SCLC。在一些方面,所述实体癌是卵巢癌。

[0028] 在前述或相关方面中的任一个中,所述组合物与另外的治疗剂组合施用。

[0029] 在一些方面,本公开提供了一种治疗已经接受或正在接受治疗剂的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所描述的组合物。

[0030] 在前述或相关方面中的任一个中,所述组合物和所述治疗剂依序或同时施用。

[0031] 在前述或相关方面中的任一个中,所述治疗剂是免疫检查点抑制剂、溶瘤病毒或共刺激抗体。在一些方面,所述免疫检查点抑制剂与选自由以下组成的组的检查点蛋白或对应配体结合:程序性细胞死亡蛋白1(PD-1;PDCD1)、淋巴细胞激活基因3蛋白(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域蛋白3(TIM-3)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、

带T淋巴细胞弱化因子(BTLA)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)、T细胞免疫球蛋白和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序结构域(TIGIT)、T细胞激活的V结构域Ig抑制因子(VISTA)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、ICOS、ICOSL、OX40、B7-H3、B7-H4、CD47、4-1BB、CD27和CD70。在一些方面,所述免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂。在一些方面,所述PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在一些方面,所述PD-1抑制剂选自由以下组成的组:纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)和西米普利单抗(cemiplimab)。

[0032] 在前述或相关方面中的任一个中,所述共刺激抗体是双特异性抗体。在一些方面,所述双特异性抗体与肿瘤相关抗原(TAA)和CD3结合。在一些方面,所述双特异性抗体与TAA和CD28结合。在一些方面,所述TAA选自由以下组成的组:AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-8、CCR5、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、周期蛋白-B1、CYP1B1、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1、GAGE-2)、GD2、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MART-1、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PRLR、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活蛋白、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、尿溶蛋白-3(uroplakin-3)、 α 叶酸受体(FR α)、 α v β 6整合蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、Claudin-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2的EGFR家族(HER2)、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y(Lewis-Y,LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(Wilms tumor 1,WT-1)。在一些方面,所述TAA是MSLN。在一些方面,所述TAA是 α 叶酸受体(FR α)。在一些方面,所述TAA是MUC16。

[0033] 在前述或相关方面中的任一个中,所述治疗剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一个实施例中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗(bevacizumab)。在一个实施例中,所述治疗剂是细胞因子。在一个实施例中,所述细胞因子是IL-2或掩蔽的IL-2。在一个实施例中,所述治疗剂是溶瘤病毒。在一些实施例中,所述溶瘤病毒选自由以下组成的组:VSV

(Voyager V1)、HSV、腺病毒、马拉巴病毒(maraba virus)、麻疹病毒、NDV、小核糖核酸病毒、呼肠孤病毒或牛痘病毒。在一个实施例中,所述溶瘤病毒是Voyager V1。

附图说明

[0034] 图1是MUC16多肽的示意图。

[0035] 图2是示出来自用所示的MUC16 CAR载体中的每一种转导的健康供体T细胞的载体拷贝数(VCN)的图。

[0036] 图3是示出用所示的MUC16 CAR载体中的每一种转导的健康供体T细胞上的CAR表达的图。

[0037] 图4A是示出来自MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放的图。

[0038] 图4B是示出来自在存在表达MUC16的OVCAR3细胞的情况下共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放的图。

[0039] 图4C是示出来自在存在不表达MUC16的Jurkat细胞的情况下共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放的图。

[0040] 图4D是示出来自在存在不表达MUC16的PANC-1细胞的情况下共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放的图。

[0041] 图5示出了来自在存在抗原阴性肿瘤细胞系(Jurkat、PANC-1、HUH7、K562、A549和RD)的情况下共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放。

[0042] 图6A示出了稳定表达高、中等或低水平的MUC16胞外结构域的RD细胞中的MUC16胞外结构域表达。

[0043] 图6B示出了来自与稳定表达高、中等或低水平的MUC16胞外结构域的RD细胞共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放。

[0044] 图7A示出了用滴定量的MUC16小块mRNA电穿孔的K562肿瘤细胞中的MUC16小块mRNA拷贝数。

[0045] 图7B示出了来自与表达滴定量的电穿孔的MUC16小块mRNA的K562肿瘤细胞共培养的MUC16 CAR T细胞的IFN γ 释放。

[0046] 图8A示出了与稳定表达高、中等或低水平的MUC16胞外结构域的RD细胞以10:1、5:1和2.5:1效应子与T细胞(E:T)比率共培养的MUC16 CAR T细胞的细胞毒性。

[0047] 图8B示出了与稳定表达高、中等或低水平的MUC16胞外结构域的RD细胞以2.5:1的效应子与T细胞(E:T)比率共培养的MUC16 CAR T细胞的细胞毒性。

[0048] 图9示出了通过MUC16 CAR T细胞的流式细胞术对表型标志物的分析。

[0049] 图10A和10B提供了示出在存在MUC16-小块胞外结构域(图10A)或CA125(图10B)的情况下培养的表达抗MUC16 CAR的细胞产生IFN γ 的图。

[0050] 图11是示出MUC16和表达荧光素酶的OVCAR3.FP肿瘤细胞的减少的图,如荧光素酶表达的减少所示。在小鼠接种OVCAR3.FP细胞后14天,用抗MUC16 CAR T细胞处理的小鼠显示出荧光素酶的减少。在施用抗MUC16 CAR T细胞后28天,用OVCAR3.FP肿瘤细胞再次激发小鼠,并且肿瘤细胞减少指示抗MUC16 CAR T细胞的持久性。对照是未经转导的细胞(UTD)、未经处理的小鼠(OVCAR3.FP)和仅用媒介剂转导的细胞(媒介剂)。

[0051] 图12A、12B和12C示出了用所指示的抗MUC16 CAR构建体转导的MUC16 CAR T细胞

在用OVCAR3肿瘤细胞接种的NGS小鼠体内的抗肿瘤活性。

[0052] 图13A、13B和13C示出了用所指示的抗MUC16 CAR构建体转导的MUC16 CAR T细胞在OVCAR3.FP IP肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

[0053] 序列标识符简要说明

[0054] SEQ ID NO:1-3示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:4-6示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:7示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:8示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:9示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:10示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的核苷酸序列。

[0060] SEQ ID NO:11示出了本文所设想的示例性抗MUC16 CAR的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID NO:12示出了本文所设想的示例性抗MUC16 CAR的核苷酸序列。

[0062] SEQ ID NO:13示出了人MUC16的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID NO:14-25示出了适用于本文所设想的抗MUC16 CAR的示例性接头的氨基酸序列。

[0064] SEQ ID NO:26-35示出了示例性2A切割位点的氨基酸序列。

[0065] SEQ ID NO:36-38示出了示例性切割位点的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:39示出了在包括myc-myc-his标签的蛋白水解切割之后的人MUC16片段的氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO:40示出了缺乏小块胞外结构域抗原 (CA125) 的人MUC16的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:41-43示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:44-46示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:47示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:48示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:49示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:50示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:51示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序

列。

[0075] SEQ ID NO:52示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:53-55示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:56-58示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:59示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:60示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:61示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:62示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO:63示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:64示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO:65-67示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:68-70示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO:71示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:72示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0088] SEQ ID NO:73示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:74示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0090] SEQ ID NO:75示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO:76示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0092] SEQ ID NO:77-79示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0093] SEQ ID NO:80-82示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0094] SEQ ID N0:83示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0095] SEQ ID N0:84示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0096] SEQ ID N0:85示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0097] SEQ ID N0:86示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0098] SEQ ID N0:87示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0099] SEQ ID N0:88示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0100] SEQ ID N0:89-91示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0101] SEQ ID N0:92-94示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0102] SEQ ID N0:95示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0103] SEQ ID N0:96示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0104] SEQ ID N0:97示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0105] SEQ ID N0:98示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0106] SEQ ID N0:99示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0107] SEQ ID N0:100示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0108] SEQ ID N0:101-103示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0109] SEQ ID N0:104-106示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0110] SEQ ID N0:107示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0111] SEQ ID N0:108示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0112] SEQ ID N0:109示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0113] SEQ ID N0:110示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序

列。

[0114] SEQ ID NO:111示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0115] SEQ ID NO:112示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0116] SEQ ID NO:113-115示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0117] SEQ ID NO:116-118示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0118] SEQ ID NO:119示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0119] SEQ ID NO:120示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0120] SEQ ID NO:121示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0121] SEQ ID NO:122示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0122] SEQ ID NO:123示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0123] SEQ ID NO:124示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0124] SEQ ID NO:125示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0125] SEQ ID NO:126示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO:127-129示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID NO:130-132示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。

[0128] SEQ ID NO:133示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。

[0129] SEQ ID NO:134示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。

[0130] SEQ ID NO:135示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0131] SEQ ID NO:136示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

[0132] SEQ ID NO:137示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。

- [0133] SEQ ID NO:138示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:139-141示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性轻链CDR的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:142-144示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16scFv的示例性重链CDR的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:145示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性轻链可变区的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:146示出了本文所设想的抗MUC16 CAR的抗MUC16 scFv的示例性重链可变区的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:147示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。
- [0139] SEQ ID NO:148示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。
- [0140] SEQ ID NO:149示出了本文所设想的缺乏信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。
- [0141] SEQ ID NO:150示出了本文所设想的包含信号肽的示例性抗MUC16CAR的氨基酸序列。
- [0142] SEQ ID NO:151示出了在缺乏myc-myc-his标签的蛋白水解切割之后的人MUC16片段的氨基酸序列。
- [0143] SEQ ID NO:152示出本文所设想的示例性信号肽的氨基酸序列。
- [0144] SEQ ID NO:153示出了本文所设想的示例性铰链区肽的氨基酸序列。
- [0145] SEQ ID NO:154示出了本文所设想的示例性跨膜区肽的氨基酸序列。
- [0146] SEQ ID NO:155示出本文所设想的示例性共刺激肽的氨基酸序列。
- [0147] SEQ ID NO:156示出了本文所设想的示例性信号传导区肽的氨基酸序列。

具体实施方式

[0148] A. 概述

[0149] 在一些实施例中,本公开提供了包括MUC16的结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)。MUC16,也被称为癌抗原(cancer antigen)125、癌抗原(carcinoma antigen)125、碳水化合物抗原125或CA-125,是高度糖基化的整合膜糖蛋白。MUC16在癌症(包含卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、肝内胆管癌-肿块形成类型、子宫颈腺癌和胃肠道腺癌)以及包含炎性肠病、肝硬化、心力衰竭、腹膜感染和腹部手术的疾病和病状中过度表达。(Haridas,D.等人,2014,《美国实验生物学会联合会期刊(FASEB J.)》,28:4183-4199),并且已经示出MUC16在癌细胞上的表达保护癌细胞免受免疫系统影响(Felder,M.等人,2014,《分子癌症(Molecular Cancer)》,13:129)。在一些实施例中,当与癌细胞共培养时,与未经转导的效应细胞相比,表达包括MUC16的结合结构域的CAR的免疫效应细胞令人惊讶地显示出免疫应答和细胞毒性增加。

[0150] MUC16包括由三个主要结构域组成的单个跨膜结构域:细胞外N末端结构域;散布

有海胆精子、肠激酶和聚集蛋白 (SEA) 结构域的大串联重复结构域;以及包括跨膜区的区段和短细胞质尾部的羧基末端结构域。图1提供了示出MUC16的结构域的示意图。在MUC16的蛋白水解切割后,大部分细胞外部分脱落到血流中。MUC16的片段保留在细胞的表面上。在一些实施例中,MUC16在多肽的C末端处包括16个SEA结构域,从N末端到C末端编号为1至16。在一些实施例中,细胞的表面上剩余的MUC16片段包括SEA结构域12-16。在一些实施例中,本文所描述的CAR选择性地与MUC16的SEA结构域12-16结合。在一些实施例中,本文所描述的CAR不与MUC16的SEA结构域1-11结合。

[0151] 用于重组(即,经工程化的)DNA、肽和寡核苷酸合成、免疫测定、组织培养、转化(例如,电穿孔、脂质转染)、酶促反应、纯化的技术以及相关技术和程序总体上可以如本说明书通篇引用和讨论的微生物学、分子生物学、生物化学、分子遗传学、细胞生物学、病毒学和免疫学中的各种通用且更具体的参考文献中所描述的来执行。参见例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约;《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》(约翰威利父子出版公司(Wiley and Sons),2008年7月更新);《精编分子生物学实验指南:当代分子生物学实验指南的方法概要(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会与威利国际科学(Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience);Glover,《DNA克隆:实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》,第I卷和第II卷(IRL出版社(IRL Press),美国牛津大学出版社(Oxford Univ.Press USA),1985);《当代免疫学方案(Current Protocols in Immunology)》,(编辑:John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober 2001约翰威立父子公司(John Wiley&Sons),纽约市,纽约州);《实时PCR:当前技术和应用(Real-Time PCR:Current Technology and Applications)》,编辑:Julie Logan、Kirstin Edwards和Nick Saunders,2009,凯斯特学术出版社(Caister Academic Press),诺福克(Norfolk),英国;Anand,《复杂基因组分析技术(Techniques for the Analysis of Complex Genomes)》,(学术出版社公司(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)》,(学术出版社公司,纽约,1991);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(N.Gait编辑,1984);《核酸:杂交(Nucleic Acid The Hybridization)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1985);《转录和转译(Transcription and Translation)》(B.Hames和S.Higgins编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.Freshney编辑,1986);Perbal,《分子克隆实用指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984);《下一代基因组测序(Next-Generation Genome Sequencing)》(Janitz,2008Wiley-VCH出版社(Wiley-VCH));《PCR方案(分子生物学方法)(PCR Protocols(Methods in Molecular Biology))》(Park编辑,第3版,2010,胡马纳出版社(Humana Press));《固定化细胞和酶(Immobilized Cells And Enzymes)》(IRL出版社,1986);论文《酶学方法(Methods In Enzymology)》(学术出版社公司,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编辑,1987,冷泉港实验室出版社);Harlow和Lane,《抗体(Antibodies)》,(冷泉

港实验室出版社,冷泉港,纽约,1998);《细胞和分子生物学中的免疫化学方法(Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology)》(Mayer和Walker编辑,学术出版社公司(Academic Press),伦敦,1987);《实验免疫学手册(Handbook Of Experimental Immunology)》,第I-IV卷(D.M.Weir和CC Blackwell编辑,1986);Roitt,《基础免疫学(Essential Immunology)》,第6版,(布莱克韦尔科学出版社(Blackwell Scientific Publications),牛津,1988);《当代免疫学方案》(Q.E.Coligan、A.M.Kruisbeek、D.H.Margulies、E.M.Shevach和W.Strober编辑,1991);《免疫学年度评论(Annual Review of Immunology)》;以及如《免疫学进展(Advances in Immunology)》等期刊上的专著。

[0152] B. 定义

[0153] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所了解相同的含义。尽管类似于或等效于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料可以用于实践或测试特定实施例,但本文描述了组合物、方法和材料的优选的实施例。出于本公开的目的,以下术语定义如下。

[0154] 冠词“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”在本文中用于指代所述冠词的语法宾语中的一个或多个(即,至少一个,或一个或多个)。举例来说,“要素”意指一个要素或一个或多个要素。

[0155] 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。

[0156] 术语“和/或”应理解为意指替代方案中的一者或两者。

[0157] 如本文所使用的,术语“约”或“大约”是指相对于参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度变化高达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。在一个实施例中,术语“约”或“大约”是指相对于参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围。

[0158] 在一些实施例中,范围,例如,1至5、约1至5或约1至约5指代所述范围所涵盖的每个数值。例如,在一个非限制性且仅仅是说明性的实施例中,范围“1到5”相当于表达1、2、3、4、5;或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0;或1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。

[0159] 如本文所使用的,术语“基本上”是指数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度是参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高百分比。在一个实施例中,“基本上相同”是指数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度产生的作用,例如,生理作用与参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度大致相同。

[0160] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”和“包括(comprising)”将被理解为暗示包含所陈述的步骤或元件或步骤或

元件组,但不排除任何其它步骤或元件或步骤或元件组。“由…组成”意指包含且限于短语“由…组成”之后的事物。因此,短语“由…组成”指示所列要素是必不可少或必需的,并且不能存在其它要素。“基本上由…组成”意指包含短语后所列的任何要素,并且限于不干扰或影响关于所列要素的公开内容中所说明的活性或作用的其它要素。因此,短语“基本上由…组成”指示所列要素是必不可少的或必需的,而且不存在实质上影响所列要素的活性或作用的其它要素。

[0161] 贯穿本说明书中对“一个实施例”、“实施例”、“特定实施例”、“相关实施例”、“某个实施例”、“另外的实施例”或“另一个实施例”或其组合的引用意味着结合所述实施例所描述的特定特征、结构或特性包含在至少一个实施例中。因此,上述短语在贯穿本说明书的各个地方的出现不一定全部指代同一个实施例。此外,特定特征、结构或特性可以在一个或多个实施例中以任何合适方式组合。还应理解的是,在一个实施例中对特征的肯定叙述充当在特定实施例中排除所述特征的基础。

[0162] C. 嵌合抗原受体

[0163] 在一些实施例中,提供了将免疫效应细胞的细胞毒性重定向至表达MUC16的细胞的改进的经基因工程化的受体。这些经基因工程化的受体在本文中被称为嵌合抗原受体(CAR)。CAR是将针对期望的抗原(例如,MUC16)的基于抗体的特异性与T细胞受体激活细胞内结构域组合以产生展现出特异性抗MUC16细胞免疫活性的嵌合蛋白的分子。如本文所使用的,术语“嵌合”描述由来自不同来源的不同蛋白质或DNA部分构成。

[0164] 在一些实施例中,本文所设想的CAR包括与MUC16结合的细胞外结构域(也被称为结合结构域或抗原特异性结合结构域)、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。CAR的抗MUC16抗原结合结构域与靶细胞表面上的MUC16的接合导致CAR的聚集并向含CAR的细胞递送激活刺激。CAR的主要特性是其能够利用单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性共同受体的细胞特异性靶向能力来重新定向免疫效应细胞特异性,从而触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或可以以主要组织相容性(MHC)非依赖性方式介导靶抗原表达细胞的细胞死亡的分子的产生。

[0165] 在一些实施例中,CAR包括:细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域包括抗MUC16特异性结合结构域;跨膜结构域;一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域;以及初级信号传导结构域。

[0166] 在一些实施例中,CAR包括:细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域包括人抗MUC16抗体或其抗原结合片段;一个或多个铰链结构域或间隔子结构域;跨膜结构域;一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域;以及初级信号传导结构域。

[0167] 1. 结合结构域

[0168] 在一些实施例中,本文所设想的CAR包括细胞外结合结构域,所述细胞外结合结构域包括与靶细胞(例如,癌细胞)上表达的人MUC16多肽特异性结合的抗MUC16抗体或其抗原结合片段。如本文所使用的,除非指定为来自非人物种(例如,“小鼠MUC16”、“猴MUC16”等),否则术语“MUC16”是指人MUC16蛋白。MUC16包括三个主要结构域:细胞外N末端结构域;散布有海胆精子、肠激酶和聚集蛋白(SEA)结构域的大串联重复结构域;以及包括跨膜区的区段和短细胞质尾部的羧基末端结构域。人MUC16蛋白具有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列,和/或具有NCBI登录号NP_078966中所示的氨基酸序列。如SEQ ID NO:39中示出了具有myc-

myc-his标签的人MUC16膜近侧结构域(P13810-P14451)(MUC16“小块”)。如SEQ ID NO:151中示出了缺乏myc-myc-his标签的人MUC16膜近侧结构域(P13810-P14451)(MUC16“小块”)。如本文所使用的,术语“CA125”是指缺乏如SEQ ID NO:40所示的MUC16膜近侧结构域(MUC16“小块”)的人MUC16多肽。

[0169] 如本文所使用的,术语“MUC16-小块”、“小块”、“MUC16胞外结构域”、“MUC16-小块胞外结构域”和“胞外结构域”是可互换的,并且是指切割后保留在细胞表面上的膜近侧MUC16多肽结构域或片段。在一些实施例中,MUC16-小块胞外结构域包括SEA结构域12-16。

[0170] 如本文所使用的,术语“结合结构域”、“细胞外结构域”、“细胞外结合结构域”、“抗原特异性结合结构域”和“细胞外抗原特异性结合结构域”可互换使用并且为CAR提供与所关注的靶抗原(例如,MUC16)特异性结合的能力。结合结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。

[0171] 如本文所使用的,术语“特异性结合亲和力”或“特异性结合(specifically binds)”或“特异性结合的”或“特异性结合(specific binding)”或“特异性靶向”描述了抗MUC16抗体或其抗原结合片段(或包括所述抗体或其抗原结合片段的CAR)以相比于背景结合更大的结合亲和力与MUC16的结合。如果结合结构域(或包括结合结构域的CAR或含有结合结构域的融合蛋白)与MUC16以例如大于或等于约 10^5M^{-1} 的亲和力或 K_a (即,特定结合相互作用的平衡缔合常数,其中单位为 $1/\text{M}$)结合或缔合,则其与MUC16“特异性结合”。在某些实施例中,结合结构域(或其融合蛋白)与靶标以大于或等于约 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 或 10^{13}M^{-1} 的 K_a 结合。“高亲和力”结合结构域(或其单链融合蛋白)是指 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 10^{13}M^{-1} 或更大的那些结合结构域。

[0172] 可替代地,亲和力可以被定义为以M为单位的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M 或更低)。根据本公开的结合结构域多肽以及CAR蛋白质的亲和力可以使用常规技术容易地确定,例如,通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定);或通过结合缔合;或使用所标记的配体的置换测定;或使用如可从新泽西州皮斯卡塔韦Biacore公司(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)获得的Biacore T100等表面等离子体共振装置、或如分别从康宁公司(Corning)和珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)获得的EPIC系统或EnSpire等光学生物传感器技术(还参见例如,Scatchard等人(1949)《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》51:660;以及美国专利第5,283,173号;第5,468,614号或等效物)。

[0173] 在一些实施例中,特异性结合的亲和力是背景结合的约2倍、背景结合的约5倍、背景结合的约10倍、背景结合的约20倍、背景结合的约50倍、背景结合的约100倍、或者背景结合的约1000倍或更多倍。

[0174] 在一些实施例中,CAR的细胞外结合结构域包括抗体或其抗原结合片段。“抗体”是指包括至少轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽的结合剂,所述轻链或重链免疫球蛋白可变区特异性地识别并结合抗原的表位,诸如肽、脂质、多糖或含有抗原决定簇的核酸,诸如通过免疫细胞识别的那些。

[0175] “抗原(Ag)”是指可以在动物中刺激抗体产生或T细胞应答的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收到动物内的组合物(诸如包含癌症特异性蛋白的组合物)。抗原与具有特定体液或细胞免疫的产物反应,包含由诸如公开的抗原的异源抗原诱导的那些产物。在

一些实施例中,靶抗原是MUC16多肽的表位。

[0176] “表位”或“抗原决定簇”是指结合剂与其结合的抗原的区域。表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位在独特的空间构象中通常包含至少3个并且更常见地至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。

[0177] 抗体包含其抗原结合片段,如骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、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”)和单结构域抗体(sdAb、纳米抗体)以及全长抗体的负责抗原结合的部分。所述术语还包含基因工程改造的形式如嵌合抗体(例如人源化鼠类抗体)、异偶联物抗体(诸如双特异性抗体)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(皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.),罗克福德,伊利诺伊州);Kuby,《免疫学期刊(J., Immunology)》,第3版,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman&Co.),纽约,1997。

[0178] 如本文所使用的,表达“双特异性抗体”意指包括至少第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的抗体。双特异性抗体内的每个抗原结合结构域包括至少一个CDR,所述CDR单独或与一个或多个另外的CDR和/或FR组合与特定抗原特异性结合。

[0179] 如本领域的技术人员所理解的并且如本文中其它地方所描述的,完全抗体包括两条重链和两条轻链。每条重链由可变区以及第一、第二和第三恒定区组成,而每条轻链由可变区和恒定区组成。哺乳动物重链被分类为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。哺乳动物轻链被分类为 λ 或 κ 。包括 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链的免疫球蛋白被分类为免疫球蛋白(Ig)A、IgD、IgE、IgG和IgM。完全抗体形成“Y”形状。Y的主干(stem)由结合在一起的两条重链的第二恒定区和第三恒定区(和对于IgE和IgM,第四恒定区)组成,并且(链间)二硫键在铰链中形成。重链 γ 、 α 和 δ 具有由三个串联的(在一条线上)Ig结构域构成的恒定区和用于增加柔性的铰链区;重链 μ 和 ϵ 具有由四个免疫球蛋白结构域构成的恒定区。第二恒定区和第三恒定区分别被称为“CH2结构域”和“CH3结构域”。Y的每个臂包含单条重链的与单个轻链的可变区和恒定区结合的可变区和第一恒定区。轻链和重链的可变区负责抗原结合。

[0180] 轻链可变区和重链可变区含有被三个也被称为“互补决定区”或“CDR”的高变区中断的“框架”区(FR)。CDR可以通过常规方法定义或鉴定,如通过根据Kabat等人(Wu, TT和Kabat, E.A.,《实验医学期刊(J Exp Med)》,132(2):211-50, (1970);Borden, P.和Kabat E.A.,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,84:2440-2443(1987);(参见Kabat等人,《免疫学关注的蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国卫生与公共事业部(U.S.Department of Health and Human Services),1991,所述文献通过引用并入本文)的序列或通过根据Chothia等人(Chothia, C.和Lesk, A.M.,《分子生物学杂志(J Mol. Biol.)》,196(4):901-917(1987);Chothia, C.等人,《自然(Nature)》,342:877-883(1989))的结构来定义或鉴定。

[0181] 不同轻链或重链的框架区的序列在物种如人内是相对保守的。抗体的属于构成性轻链和重链的组合框架区的框架区用于在三维空间中定位和排列CDR。CDR主要负责与抗原的表位结合。每个链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N末端开始按顺序编号,并且通常还由特定CDR所在的链鉴别。因此,位于抗体的重链的可变结构域中的CDR被称为CDRH1、

CDRH2和CDRH3,而位于抗体的轻链的可变结构域中的CDR被称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。具有不同特异性的抗体(即,针对不同抗原具有不同组合位点)具有不同的CDR。尽管正是CDR因抗体的不同而有所不同,但是CDR内仅有限数量的氨基酸位置直接涉及抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。适于构建本文所设想的抗MUC16CAR的轻链CDR的说明性实例包含但不限于SEQ ID NO:1-3中所示的CDR序列。适于构建本文所设想的抗MUC16CAR的重链CDR的说明性实例包含但不限于SEQ ID NO:4-6中所示的CDR序列。

[0182] 用于预测轻链CDR的规则说明性实例包含:CDR-L1开始于约残基24,之前是Cys,为约10-17个残基并且之后是Trp(通常是Trp-Tyr-Gln,但还是Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、Trp-Tyr-Leu);CDR-L2开始于CDR-L1结束后的约16个残基,通常之前是Ile-Tyr还有Val-Tyr、Ile-Lys、Ile-Phe并且为7个残基;并且CDR-L3开始于CDR-L2结束后的约33个残基,之前是Cys,为7-11个残基并且之后是Phe-Gly-XXX-Gly(XXX是任何氨基酸)。

[0183] 用于预测重链CDR的规则说明性实例包含:CDR-H1开始于约残基26,在Cys-XXX-XXX-XXX之后,为10-12个残基并且之后是Trp(通常是Trp-Val,也可以是Trp-Ile、Trp-Ala);CDR-H2开始于CDR-H1结束后约15个残基,通常之前是Leu-Glu-Trp-Ile-Gly或多个变异,为16-19个残基并且之后是Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala;并且CDR-H3开始于CDR-H2结束后的约33个残基,之前是Cys-XXX-XXX(通常是Cys-Ala-Arg),为3至25个残基并且之后是Trp-Gly-XXX-Gly。

[0184] 在一些实施例中,轻链CDR和重链CDR根据Kabat方法确定。在一些实施例中,轻链CDR以及重链CDR2和CDR3根据Kabat方法确定,并且重链CDR1根据AbM方法确定,所述AbM方法是Kabat方法与Clothia方法之间的折衷,参见例如,Whitelegg N.和Rees AR,《蛋白质工程(Protein Eng)》.2000年12月;13(12):819-24以及《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》.2004;248:51-91。用于预测CDR的程序可公开获得,例如,AbYsis(www.bioinf.org.uk/abysis/)。

[0185] 如本文所公开的,提及“VH”或“VH”是指免疫球蛋白重链的可变区,包含抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或其它抗体片段的可变区。如本文所公开的,提及“VL”或“VL”是指免疫球蛋白轻链的可变区,包含抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或其它抗体片段的可变区。

[0186] “单克隆抗体”是由B淋巴细胞的单个克隆或通过单个抗体的轻链和重链基因已经转染到的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过根据骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合制备杂合抗体形成细胞。单克隆抗体包含人源化单克隆抗体。

[0187] “嵌合抗体”具有来自一个物种如人的框架残基和来自另一个物种如小鼠的CDR(其通常赋予了抗原结合)。在特定优选实施例中,本文所设想的CAR包括作为嵌合抗体或其抗原结合片段的抗原特异性结合结构域。

[0188] “人源化”抗体是包含人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的一个或多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白被称为“供体”,并且提供框架的人免疫球蛋白被称为“受体”。

[0189] 在特定实施例中,抗MUC16抗体或其抗原结合片段包含但不限于:骆驼Ig(骆驼科动物抗体(VHH))、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、F(ab)'3片段、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”)和单结构域抗体(sdAb,纳米抗体)。

[0190] 如本文所使用的,“骆驼Ig”或“骆驼科动物VHH”是指重链抗体的最小已知抗原结合单位(Koch-Nolte等人,《美国实验生物学会联合会期刊》,21:3490-3498(2007))。“重链抗体”或“骆驼科动物抗体”是指含有两个VH结构域并且无轻链的抗体(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)。

[0191] “免疫球蛋白新抗原受体”的“IgNAR”是指来自鲨鱼免疫库的抗体类别,所述抗体由一个可变新抗原受体(VNAR)结构域和五个恒定新抗原受体(CNAR)结构域的同源二聚体组成。IgNAR表示已知的最小的基于免疫球蛋白的蛋白质支架中的一些并且高度稳定并且具有高效结合特性。固有稳定性可以归因于以下两者:(i)基础Ig支架,其与存在于鼠抗体中的常规抗体VH和VL结构域相比呈现出相当数量的带电和亲水表面暴露残基;以及(ii)互补决定区(CDR)回路中包含环间二硫键的稳定结构特征和环内氢键模式。

[0192] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生了两个相同的抗原结合片段,即各自具有单个抗原结合位点的所说的“Fab”片段和其名称反映了其易于结晶的能力残留“Fc”片段。胃蛋白酶处理得到具有两个抗原组合位点并且仍然能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0193] “Fv”是包含完全抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施例中,双链Fv物种由呈紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物种中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,从而使得轻链和重链可以缔合成与双链Fv(scFv)₂物种中二聚体结构类似的“二聚体”结构。正是在这种构造中,每个可变结构域的三个高变区(HVR)相互作用以限定VH-VL二聚体的表面上的抗原结合位点。六个HVR共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单可变结构域(或仅包括对抗原具有特异性的三个HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管以比完整结合位点更低的亲和力进行。

[0194] Fab片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域并且还包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在包含来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸的重链CH1结构域的羧基末端加入几个残基。Fab'-SH是本文中对Fab'的命名,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初是作为其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0195] 术语“双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述片段包括与同一条多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双功能抗体可以是二价的或双特异性的。双功能抗体更全面地描述于例如以下中:EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,《自然医学(Nat.Med.)》9:129-134(2003);以及Hollinger等人,《美国国家科学院院刊》90:6444-6448(1993)。三功能抗体和四功能抗体也描述于Hudson等人,《自然医学》9:129-134(2003)中。

[0196] “单结构域抗体”或“sdAb”或“纳米抗体”是指由抗体重链的可变区(VH结构域)或抗体轻链的可变区(VL结构域)组成的抗体片段(Holt,L.等人,《生物技术趋势(Trends in Biotechnology)》,21(11):484-490)。

[0197] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的VH结构域和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中并且处于任何朝向(例如,VL-VH或VH-VL)。通常,scFv多肽进一步包括使scFv能够形成用于抗原结合的期望结构的在VH结构域与VL结构域之间的多肽接头。关于scFv的综述,参见例如,Pluckthün,《单克隆抗体药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(施普林格出版社(Springer Verlag),纽约,1994),第269-315页。

[0198] 在一些实施例中,抗原特异性结合结构域是scFv。单链抗体可以克隆自针对期望靶标具有特异性的杂交瘤的V区基因。这种杂交瘤的产生已经变得常规。可以用于克隆可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的技术已经描述于例如Orlandi等人,《美国国家科学院院刊》,1989;86:3833-3837中。

[0199] 在一些实施例中,抗原特异性结合结构域是与人MUC16多肽结合的scFv。适于构建本文所设想的抗MUC16 CAR的可变重链的说明性实例是SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。适于构建本文所设想的抗MUC16 CAR的可变轻链的说明性实例是SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

[0200] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列的可变轻链。

[0201] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变轻链。

[0202] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合

结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:59的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:59的氨基酸序列的可变轻链。

[0204] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:72的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:72的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:71的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列的可变轻链。

[0205] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:84的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:83的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:83的氨基酸序列的可变轻链。

[0207] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:96的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:96的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:95的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO:95的氨基酸序列的可变轻链。

[0208] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:108的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例

中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO: 107的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:107的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO: 107的氨基酸序列的可变轻链。

[0209] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:120的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:120的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO: 119的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:119的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO: 119的氨基酸序列的可变轻链。

[0210] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:134的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:134的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO: 133的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:133的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO: 133的氨基酸序列的可变轻链。

[0211] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括SEQ ID NO:146的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变重链,所述可变重链包括与SEQ ID NO:146的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括SEQ ID NO: 145的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括可变轻链,所述可变轻链包括与SEQ ID NO:145的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括包含SEQ ID NO:146的氨基酸序列的可变重链和包括SEQ ID NO: 145的氨基酸序列的可变轻链。

[0212] 本文所提供的MUC16特异性结合结构域还包括一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR。此类CDR可以是选自轻链的CDRL1、CDRL2和CDRL3以及重链的CDRH1、CDRH2和CDRH3的非人CDR或改变的非人CDR。在一些实施例中,MUC16特异性结合结构域包括:(a)轻链可变区,

其包括轻链CDRL1、轻链CDRL2和轻链CDRL3;以及(b)重链可变区,其包括重链CDRH1、重链CDRH2和重链CDRH3。

[0213] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:1-3的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:4-6的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:1-3的轻链CDR和SEQ ID NO:4-6的重链CDR。

[0214] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:41-43的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:44-46的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:41-43的轻链CDR和SEQ ID NO:44-46的重链CDR。

[0215] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:53-55的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:56-58的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:53-55的轻链CDR和SEQ ID NO:56-58的重链CDR。

[0216] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:65-67的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:68-70的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:65-67的轻链CDR和SEQ ID NO:68-70的重链CDR。

[0217] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:77-79的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:80-82的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:77-79的轻链CDR和SEQ ID NO:80-82的重链CDR。

[0218] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:89-91的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:92-94的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:89-91的轻链CDR和SEQ ID NO:92-94的重链CDR。

[0219] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:101-103的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:104-106的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:101-103的轻链CDR和SEQ ID NO:104-106的重链CDR。

[0220] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:113-115的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:116-118的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:113-115的轻链CDR和SEQ ID NO:116-118的重链CDR。

[0221] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:127-129的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:130-132的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:127-129的轻链CDR和SEQ ID NO:130-132的重链CDR。

[0222] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:139-141

的轻链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:142-144的重链CDR。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域包括SEQ ID NO:139-141的轻链CDR和SEQ ID NO:142-144的重链CDR。

[0223] 另外的抗MUC16抗体和其抗原结合片段是本领域已知的。参见例如2018年3月29日公布的W02018/058003,其各自的全部内容通过引用整体明确并入本文。

[0224] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16在人MUC16的一个或多个五个膜近侧SEA结构域内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16的从N末端到C末端编号的SEA结构域12-16结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域与人MUC16的SEA结构域结合,如SEQ ID NO:13的残基13791-14451中所示。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域在SEQ ID NO:13的残基13810-14451内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域不与人MUC16的从N末端到C末端编号的SEA结构域1-11结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域不在SEQ ID NO:13的残基1-13790内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域不在SEQ ID NO:13的残基1-13809内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域在SEQ ID NO:39内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域在SEQ ID NO:151内结合。在一些实施例中,抗MUC16 CAR的抗原特异性结合结构域不在SEQ ID NO:40内结合。

[0225] 2. 接头

[0226] 在一些实施例中,本文所设想的CAR可以包括各个结构域之间的接头残基,例如,为了分子的适当间隔和构象而添加的残基。在一些实施例中,接头是可变区连接序列。“可变区连接序列”是氨基酸序列,所述氨基酸序列连接 V_H 结构域和 V_L 结构域并且提供与两个子结合结构域的相互作用兼容的间隔子功能,使得所得多肽保留对与包括相同轻链可变区和重链可变区的抗体相同的靶分子的特异性结合亲和力。在其它实施例中,接头是跨膜结构域与一个或多个细胞内结构域之间的连接序列。

[0227] 本文所设想的CAR可以包括一个、两个、三个、四个或五个或更多个接头。在一些实施例中,接头的长度为约1个至约25个氨基酸、约5个至约20个氨基酸、或约10个至约20个氨基酸或任何中间长度的氨基酸。在一些实施例中,接头为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个氨基酸长。

[0228] 接头的说明性实例包含:甘氨酸聚合物(G_n);甘氨酸-丝氨酸聚合物($G_{1-5}S_{1-5}$) $_n$,其中n为至少为一、二、三、四或五的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此能够充当融合蛋白如本文所述CAR的结构域之间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基的限制要少得多(参见Scheraga,《计算化学综述(Rev.Computational Chem.)》11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,CAR的设计可以包含完全或部分柔性的接头,使得接头可以包含柔性接头以及赋予较少的柔性结构的一个或多个部分以提供期望的CAR结构。

[0229] 其它示例性接头包含但不限于以下氨基酸序列:GGG;DGGGS(SEQ ID NO:14);TGEKP(SEQ ID NO:15)(参见例如,Liu等人,《美国国家科学院院刊》5525-5530(1997));

GGRR (SEQ ID NO:16) (Pomerantz等人1995,同上); (GGGS)_n, 其中n=1、2、3、4或5 (SEQ ID NO:17) (Kim等人,《美国国家科学院院刊》93,1156-1160(1996.); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO:18) (Chaudhary等人,1990,《美国国家科学院院刊》87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:19) (Bird等人,1988,《科学(Science)》242:423-426); GGRRGGGS (SEQ ID NO:20); LRQRDGERP (SEQ ID NO:21); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO:22); LRQKd (GGGS)₂ERP (SEQ ID NO:23)。在一些实施例中,接头是GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:24)。可替代地,柔性接头可以使用能够对DNA结合位点和肽两者自身进行建模的计算机程序(Desjarlais和Berg,《美国国家科学院院刊》90:2256-2260(1993);《美国国家科学院院刊》91:11099-11103(1994))或通过噬菌体展示方法合理地设计。在一些实施例中,接头包括以下氨基酸序列:GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:25) (Cooper等人,《血液(Blood)》,101(4):1637-1644(2003))。在一个实施例中,接头包括LYC序列。

[0230] 3. 间隔子结构域

[0231] 在一些实施例中,CAR的结合结构域后接一个或多个“间隔子结构域”,所述一个或多个间隔子结构域是指使抗原结合结构域移动远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活的区(Patel等人,《基因疗法(Gene Therapy)》,1999;6:412-419)。间隔子结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。在某些实施例中,间隔子结构域是免疫球蛋白的一部分,包含但不限于一个或多个重链恒定区,例如,CH2和CH3。间隔子结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或更改的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施例中,间隔子结构域包括IgG1或IgG4的CH2和CH3结构域。

[0233] 4. 铰链结构域

[0234] 在一些实施例中,CAR的结合结构域通常后接一个或多个“铰链结构域”或“铰链区”,所述铰链结构域或铰链区在将抗原结合结构域定位成远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活中起作用。在一些实施例中,CAR包括在结合结构域与跨膜结构域(TM)之间的一个或多个铰链结构域。铰链结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。铰链结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或经更改免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0235] “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)天然存在的铰链区的长度为至少10个氨基酸(例如,至少12个、13个、14个或15个氨基酸)的具有至多30%氨基酸变化(例如,至多25%、20%、15%、10%或5%氨基酸取代或缺失)的一部分;或(c)天然存在的铰链区的包括核心铰链区(所述核心铰链区的长度可以为4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14或15个或至少4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸)的一部分。在一些实施例中,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以被一个或多个其它氨基酸残基(例如,一个或多个丝氨酸残基)取代。改变的免疫球蛋白铰链区可以可替代地或另外地具有野生型免疫球蛋白铰链区的被另一个氨基酸残基(例如,丝氨酸残基)取代的脯氨酸残基。

[0236] 适于在本文所描述的CAR中使用的其它说明性铰链结构域包含原子如CD8 α 、CD4、CD28和CD7等1型膜蛋白的细胞外区的铰链区,所述铰链区可以是来自这些分子的野生型铰

链区或可以被改变。在一个实施例中,铰链结构域包括CD28铰链区。在另一个实施例中,铰链结构域包括CD4铰链区。在另一个实施例中,铰链结构域包括CD8 α 铰链区。

[0237] 在各个实施例中,经修饰的铰链区包括与如本文所设想的和/或本领域已知的合适的铰链结构域/区具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,包括如本文所设想的铰链序列的经修饰的铰链区具有4个或更少、3个或更少、或2个或更少氨基酸取代和/或缺失。

[0238] 在某些实施例中,天然存在的铰链区/结构域中的一个或多个半胱氨酸残基可以被一个或多个其它氨基酸残基取代以产生经修饰的铰链结构域。在一些实施例中,经修饰的铰链结构域包括被丝氨酸或丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的铰链结构域包括被丝氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。在另一实施例中,经修饰的铰链结构域包括被丙氨酸取代的一个或多个半胱氨酸残基。

[0239] 在特定实施例中,改变的铰链区包括由另一种氨基酸残基(例如,丝氨酸残基)对脯氨酸残基进行的取代。

[0240] 在一些方面,所述铰链区包括与SEQ ID NO:153的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:153的序列。在一个实施例中,所述铰链区多肽包括与SEQ ID NO:153具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述铰链区多肽包括SEQ ID NO:153。

[0241] 5.跨膜(TM)结构域

[0242] 在一些实施例中,本文所设想的CAR包括跨膜结构域。“跨膜结构域”或“TM结构域”是CAR的一部分,所述部分融合细胞外结合部分和细胞内信号传导结构域并且将CAR锚定到免疫效应细胞的质膜上。TM结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组的来源。TM结构域可以源自(即,至少包括以下的跨膜区):T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD 154和PD1。在一特定实施例中,TM结构域是合成的并且主要包括如亮氨酸和缬氨酸等疏水残基。

[0243] 在一些方面,本文所设想的CAR包括源自CD8 α 的TM结构域。在一些实施例中,跨膜结构域包括与SEQ ID NO:154的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:154的序列。在一个实施例中,所述跨膜结构域包括与SEQ ID NO:154具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中,所述跨膜结构域包括SEQ ID NO:154。

[0244] 在一些实施例中,本文所设想的CAR包括源自CD8 α 的TM结构域和优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的连接TM结构域和CAR的细胞内信号传导结构域的短寡肽或多肽接头。在一些实施例中,接头是基于甘氨酸-丝氨酸的接头。在其它实施例中,接头是LYC接头。

[0245] 另一方面,本文所设想的CAR包括源自CD28的TM结构域。另一方面,本文所设想的CAR包括源自CD4的TM结构域。

[0246] 6.细胞内信号传导结构域

[0247] 在一些实施例中,本文所设想的CAR包括细胞内信号传导结构域。“细胞内信号传

导结构域”是指CAR的参与将与人MUC16多肽的有效MUC16CAR结合的消息转导到免疫效应细胞的内部以引发效应细胞功能,例如,激活、细胞因子产生、增殖和细胞毒性,包含细胞毒性因子释放到CAR结合的靶细胞或用与细胞外CAR结构域的抗原结合引发的其它细胞应答的部分。

[0248] 术语“效应子功能”是指免疫效应细胞的专门功能。T细胞的效应子功能例如可以是溶细胞活性或辅助或活性,包含细胞因子的分泌。因此,术语“细胞内信号传导结构域”指代蛋白质的一部分,所述部分转导效应子功能信号并引导细胞执行专门功能。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个结构域。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分来说,可使用这类截短部分代替整个结构域,只要其转导效应子功能信号即可。术语细胞内信号传导结构域意图包含足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0249] 已知的是,单独通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次级信号或共刺激信号。因此,可以说T细胞激活由两种不同类别的细胞内信号传导结构域介导:初级信号传导结构域,其通过TCR(例如,TCR/CD3复合物)启动抗原依赖性初级激活;以及共刺激信号传导结构域,其是以抗原非依赖性方式起作用以提供次级信号或共刺激信号。在优选实施例中,本文所设想的CAR包括细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包括一个或多个“共刺激信号传导结构域”和“初级信号传导结构域”。

[0250] 初级信号传导结构域以刺激性方式或以抑制性方式调控TCR复合物的初级激活。以刺激性方式起作用的初级信号传导结构域可含有信号传导基元,所述信号传导基元称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0251] 在本发明中特别有用的含有ITAM的初级信号传导结构域的说明性实例包含源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一些实施例中,CAR包括CD3 ζ 初级信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域。细胞内初级信号传导和共刺激信号传导结构域可以与跨膜结构域的羧基末端按任何顺序串联连接。

[0252] 本文所设想的CAR包括用于增强表达CAR受体的T细胞的疗效和扩增的一个或多个共刺激信号传导结构域。如本文所使用的,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指共刺激分子的细胞内信号传导结构域。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子,所述细胞表面分子提供在与抗原结合后使T淋巴细胞有效激活和起作用所需的第二信号。此类共刺激分子的说明性实例包含:CD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。在一些实施例中,CAR包括选自CD28、CD137和CD134组成的组的一个或多个共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0253] 在一些实施例中,CAR包括CD28和CD137共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0254] 在一些实施例中,CAR包括CD28和CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0255] 在一些实施例中,CAR包括CD137和CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0256] 在一些实施例中, CAR包括CD134共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0257] 在一些实施例中, CAR包括CD28共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0258] 在一些实施例中, CAR包括CD137共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0259] 在一些方面, 所述一个或多个共刺激信号传导结构域来自CD137 (4-1BB)。在一些方面, 所述共刺激信号传导结构域包括与SEQ ID NO:155的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:155的序列。在一个实施例中, 所述共刺激信号传导结构域包括与SEQ ID NO:155具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中, 所述共刺激信号传导结构域包括SEQ ID NO:155。

[0260] 在前述或相关方面中的任一个中, 所述初级信号传导结构域来自CD3 ζ 。在一些方面, 所述初级信号传导结构域包括与SEQ ID NO:156的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列或包括SEQ ID NO:156的序列。在一个实施例中, 所述初级信号传导结构域包括与SEQ ID NO:156具有至少95%同一性的序列。在一个实施例中, 所述初级信号传导结构域包括SEQ ID NO:156。

[0261] D. 示例性嵌合抗原受体

[0262] 在一些实施例中, CAR包括: 与MUC16多肽结合的抗MUC16 scFv; 源自多肽的跨膜结构域, 所述多肽选自由以下组成的组: T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1; 以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域, 所述共刺激分子选自由以下组成的组: CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70; 以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0263] 在一些实施例中, CAR包括: 与MUC16多肽结合的抗MUC16 scFv; 选自由以下组成的组的铰链结构域: IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3和CD8 α 铰链; 源自多肽的跨膜结构域, 所述多肽选自由以下组成的组: T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1; 以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域, 所述共刺激分子选自由以下组成的组: CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70; 以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0264] 在一些实施例中, CAR包括: 与MUC16多肽结合的抗MUC16 scFv; 选自由以下组成的组的铰链结构域: IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3和CD8 α 铰链; 源自多肽的跨膜结构域, 所述多肽选自由以下组成的组: T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、

CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1；优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的将TM结构域与CAR的细胞内信号传导结构域连接的短寡肽或多肽接头；以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域，所述共刺激分子选自由以下组成的组：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70；以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0265] 在一些实施例中，CAR包括：与MUC16多肽结合的抗MUC16 scFv；包括CD8 α 多肽的铰链结构域；任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头的CD8 α 跨膜结构域；CD137细胞内共刺激信号传导结构域；以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0266] 在一些实施例中，CAR包括：在SEQ ID NO:39或151内结合的抗MUC16 scFv；源自多肽的跨膜结构域，所述多肽选自由以下组成的组：T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1；以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域，所述共刺激分子选自由以下组成的组：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70；以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0267] 在一些实施例中，CAR包括：在SEQ ID NO:39或151内结合的抗MUC16 scFv；选自由以下组成的组的铰链结构域：IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3和CD8 α 铰链；源自多肽的跨膜结构域，所述多肽选自由以下组成的组：T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1；以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域，所述共刺激分子选自由以下组成的组：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70；以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0268] 在一些实施例中，CAR包括：在SEQ ID NO:39或151内结合的抗MUC16 scFv；选自由以下组成的组的铰链结构域：IgG1铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH2/CH3和CD8 α 铰链；源自多肽的跨膜结构域，所述多肽选自由以下组成的组：T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD152、CD 154和PD1；优选地长度在1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸之间的将TM结构域与CAR的细胞内信号传导结构域连接的任选地短寡肽或多肽接头；以及来自共刺激分子的一个或多个细胞内共刺激信号传导结构域，所述共刺激分子选自由以下组成的组：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273

(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70;以及来自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的初级信号传导结构域。

[0269] 在一些实施例中,CAR包括:在SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:151内结合的抗MUC16 scFv;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0270] 在一些实施例中,CAR包括:包括如SEQ ID NO:1-3中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:4-6中所示的重链CDR的抗MUC16 scFv;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0271] 在一些实施例中,CAR包括:包括以下的抗MUC16 scFv:(a)如SEQ ID NO:41-43中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:44-46中所示的重链CDR;(b)如SEQ ID NO:53-55中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:56-58中所示的重链CDR;(c)如SEQ ID NO:65-67中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:68-70中所示的重链CDR;(d)如SEQ ID NO:77-79中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:80-82中所示的重链CDR;(e)如SEQ ID NO:89-91中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:92-94中所示的重链CDR;(f)如SEQ ID NO:101-103中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:104-106中所示的重链CDR;(g)如SEQ ID NO:113-115中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:116-118中所示的重链CDR;(h)如SEQ ID NO:127-129中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:130-132中所示的重链CDR;或(i)如SEQ ID NO:139-141中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:142-144中所示的重链CDR;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0272] 在一些实施例中,CD8 α 信号多肽,CAR包括:包括如SEQ ID NO:1-3中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:4-6中所示的重链CDR的抗MUC16scFv;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0273] 在一些实施例中,CD8 α 信号多肽,CAR包括:包括以下的抗MUC16scFv:(a)如SEQ ID NO:41-43中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:44-46中所示的重链CDR;(b)如SEQ ID NO:53-55中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:56-58中所示的重链CDR;(c)如SEQ ID NO:65-67中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:68-70中所示的重链CDR;(d)如SEQ ID NO:77-79中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:80-82中所示的重链CDR;(e)如SEQ ID NO:89-91中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:92-94中所示的重链CDR;(f)如SEQ ID NO:101-103中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:104-106中所示的重链CDR;(g)如SEQ ID NO:113-115中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:116-118中所示的重链CDR;(h)如SEQ ID NO:127-129中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:130-132中所示的重链CDR;或(i)如SEQ ID NO:139-141中所示的轻链CDR和如SEQ ID NO:142-144中所示的重链CDR;以及包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0274] 在一些实施例中,CAR包括:包括如SEQ ID NO:7中所示的可变轻链和如SEQ ID

N0:8中所示的可变重链的抗MUC16 scFv;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0275] 在一些实施例中,CAR包括:包括以下的抗MUC16 scFv:(a)如SEQ ID N0:47中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:48中所示的可变重链;(b)如SEQ ID N0:59中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:60中所示的可变重链;(c)如SEQ ID N0:71中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:72中所示的可变重链;(d)如SEQ ID N0:83中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:84中所示的可变重链;(e)如SEQ ID N0:95中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:96中所示的可变重链;(f)如SEQ ID N0:107中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:108中所示的可变重链;(g)如SEQ ID N0:119中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:120中所示的可变重链;(h)如SEQ ID N0:133中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:134中所示的可变重链;或(i)如SEQ ID N0:145中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:146中所示的可变重链;以及包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0276] 在一些实施例中,CD8 α 信号多肽,CAR包括:包括如SEQ ID N0:7中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:8中所示的可变重链的抗MUC16 scFv;包括CD8 α 多肽的铰链结构域;任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0277] 在一些实施例中,CD8 α 信号多肽,CAR包括:包括以下的抗MUC16scFv:(a)如SEQ ID N0:47中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:48中所示的可变重链;(b)如SEQ ID N0:59中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:60中所示的可变重链;(c)如SEQ ID N0:71中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:72中所示的可变重链;(d)如SEQ ID N0:83中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:84中所示的可变重链;(e)如SEQ ID N0:95中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:96中所示的可变重链;(f)如SEQ ID N0:107中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:108中所示的可变重链;(g)如SEQ ID N0:119中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:120中所示的可变重链;(h)如SEQ ID N0:133中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:134中所示的可变重链;或(i)如SEQ ID N0:145中所示的可变轻链和如SEQ ID N0:146中所示的可变重链;以及任选地包括约3至约10个氨基酸的多肽接头(如LYC)的CD8 α 跨膜结构域;CD137细胞内共刺激信号传导结构域;以及CD3 ζ 初级信号传导结构域。

[0278] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID N0:9中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:9具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:9具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:9具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0279] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID N0:49中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:49具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:49具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID N0:49具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

N0:137具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0296] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:147中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:147具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:147具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:147具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0297] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:149中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:149具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:149具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:149具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0298] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:11具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:11具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0299] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:50具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:50具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:50具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0300] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:52具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:52具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:52具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0301] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:62具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:62具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:62具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0302] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:64具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:64具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:64具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0303] 在一些实施例中, CAR包括SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列。在一些实施例中, CAR包括与SEQ ID NO:74具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中, CAR包括与

CAR包括与SEQ ID NO:122具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:122具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:122具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0312] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:124中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:124具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:124具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:124具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0313] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:126中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:126具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:126具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:126具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0314] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:136中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:136具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:136具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:136具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0315] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:138中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:138具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:138具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:138具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0316] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:148中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:148具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:148具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:148具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0317] 在一些实施例中,CAR包括SEQ ID NO:150中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:150具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:150具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CAR包括与SEQ ID NO:150具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0318] 此外,与未经修饰的T细胞或被修饰成表达其它CAR的T细胞相比,本文所设想的CAR的设计在表达CAR的T细胞中实现了改进的扩增、长期持续性和可耐受细胞毒性性质。

[0319] E. 多肽

[0320] 本公开部分设想了CAR多肽和其片段、包括所述CAR多肽和其片段的细胞和组合物以及表达多肽的载体。在一些实施例中,提供了包括如SEQ ID NO:9中所示的一种或多种

CAR的多肽。在一些实施例中,提供了包括如SEQ ID NO:11中所示的一种或多种CAR的多肽。

[0321] 除非相反地规定,否则“多肽”、“多肽片段”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且根据常规含义使用,即,作为氨基酸序列。多肽不限于具体长度,例如,多肽可以包括全长蛋白序列或全长蛋白质的片段,并且可以包含多肽的转译后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等以及本领域已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。在各个实施例中,本文所设想的CAR多肽包括蛋白质的N末端处的信号(或前导)多肽序列,其共翻译或翻译后引导蛋白质的转移。可用于本文所公开的CAR中的合适的信号多肽序列的说明性实例包含但不限于IgG1重链信号多肽序列、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体2(GM-CSFR2)信号多肽序列、Ig κ 信号多肽序列或CD8 α 信号多肽序列。多肽可以使用各种公知的重组和/或合成技术中的任何一种进行制备。本文所设想的多肽具体地包含本公开的CAR或与如本文所公开的CAR的一个或多个氨基酸有缺失、添加和/或取代的序列。

[0322] 如本文所使用的,“分离的肽”或“分离的多肽”等是指从细胞环境中以及从与细胞的其它组分的缔合中体外分离和/或纯化的肽或多肽分子,即,所述肽或多肽分子未与体内物质显著缔合。类似地,“分离的细胞”是指从体内组织或器官获得并且基本上不含细胞外基质的细胞。

[0323] 多肽包含“多肽变体”。多肽变体与天然存在的多肽的不同之处可以在于一个或多个取代、缺失、添加和/或插入。此类变体可以是天然存在的或可以通过合成生成,例如通过修饰上述多肽序列中的一个或多个。例如,在特定实施例中,可以期望通过将一个或多个取代、缺失、添加和/或插入引入到CAR多肽的结合结构域、铰链、TM结构域、共刺激信号传导结构域或初级信号传导结构域中来改善CAR的结合亲和力和/或其它生物性质。优选地,本发明的多肽包含与之具有至少约65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%或99%的氨基酸同一性的多肽。

[0324] 多肽包含“多肽片段”。多肽片段是指可以是单体的或多体的具有天然存在的或重组产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失或取代的多肽。在某些实施例中,多肽片段可以包括至少5个至约500个氨基酸长的氨基酸链。应当理解的是,在某些实施例中,片段长至少5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、150个、200个、250个、300个、350个、400个或450个氨基酸。特别有用的多肽片段包含功能性结构域,所述功能性结构域包含抗原结合结构域或抗体片段。在鼠抗BCMA抗体的情况下,有用的片段包含但不限于:重链或轻链的CDR区、CDR3区;重链或轻链的可变区;抗体链的一部分或包含两个CDR的可变区;等等。

[0325] 多肽也可以使用相同读框融合或与接头或其它序列缀合,以便合成、纯化或鉴定多肽(例如,聚-His)或增强多肽与固相载体的结合。

[0326] 如上文中指出的,可以以各种方式来改变本发明的多肽,包含氨基酸取代、缺失、截短和插入。用于此类操纵的方法是本领域公知的。例如,可以通过DNA的突变来制备参考多肽的氨基酸序列变体。用于诱变和核苷酸序列改变的方法是本领域熟知的。参见例如,Kunkel(1985,《美国国家科学院院刊》82:488-492);Kunkel等人,(1987,《酶学方法

(Methods in Enzymol)》,154:367-382);美国专利第4,873,192号;Watson,J.D.等人,《基因的分子生物学(Molecular Biology of the Gene)》,第四版,本杰明/卡明斯公司(Benjamin/Cummings),门洛帕克(Menlo Park),加利福尼亚州,1987)以及本文引用的参考文献。关于不影响所关注的蛋白质的生物活性的适当氨基酸取代的指导可以在Dayhoff等人,(1978),《蛋白质序列和结构图集(Atlas of Protein Sequence and Structure)》(美国国家生物医学研究基金会(Natl.Biomed.Res.Found.),华盛顿特区(Washington,D.C.))的模型中找到。

[0327] 在一些实施例中,变体将含有保守取代。“保守取代”是其中氨基酸被具有类似性质的另一个氨基酸取代从而使得肽化学领域的技术人员预期多肽的二级结构和亲水性基本上未改变的取代。修饰可以在本发明的多核苷酸和多肽的结构进行,并且仍然获得编码具有期望特性的变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的或甚至本发明的经改进的变体多肽时,本领域技术人员例如可以例如根据表1改变编码DNA序列的密码子中的一个或多个密码子。

[0328] 表1-氨基酸密码子

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

[0329]

[0330] 使用本领域中公知的计算机程序如DNASTAR™软件,可以发现在确定可以不消除生物活性的情况下取代、插入或缺失哪些氨基酸残基方面的指导。优选地,本文所公开的蛋白质变体的氨基酸改变是保守氨基酸改变,即,带类似电荷或不带电荷的氨基酸的取代。保守氨基酸改变涉及在侧链方面相关的氨基酸的家族中的一个氨基酸的取代。天然存在的氨基酸通常分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和极性不带电氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被共同分类为芳香族氨基酸。在肽或蛋白质中,适当的氨基酸保守取代对于本领域的技术人员来说是已知的,并且通常可以在不改变所得分子的生物活性的情况下进行。本领域的技术人员认识到,通常,多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不会改变生物活性(参见,例如,Watson等人《基因的分子生物学》,第4版,1987,本杰明/卡明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页)。美国临时专利申请第61/241,647号中描述了示例性保守取代,所述美国临时专利申请的公开内容通过引用并入本文。

[0331] 在进行此类改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质交互性生物功能方面的重要性在本领域中普遍理解的(Kyte和Doolittle,1982,通过引用并入本文)。已经基于氨基酸的亲水性和电荷特性为每个氨基酸分配了亲水指数(Kyte和Doolittle,1982)。这些值是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0332] 本领域中已知某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或评分的其它氨基酸取代并且仍产生具有类似生物活性的蛋白质,即,仍获得生物功能等同蛋白质。在进行此类改变时,优选亲水指数在 ± 2 内的氨基酸取代,特别优选在 ± 1 内的氨基酸取代,并且甚至更加特别优选在 ± 0.5 内的氨基酸取代。在本领域中还应理解,可以基于亲水性来有效地进行相似氨基酸的取代。

[0333] 如美国专利第4,554,101号中所详述的,已经为氨基酸残基分配了以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。应当理解的是,氨基酸可以取代具有相似亲水性质的另一种氨基酸,并且仍然获得生物学上等同的,特别是免疫学上等同的蛋白质。在此类改变中,优选亲水性值在 ± 2 以内的氨基酸的取代,特别优选亲水性值在 ± 1 以内的氨基酸的取代并且甚至更特别优选亲水性值在 ± 0.5 以内的氨基酸的取代。

[0334] 如上文所概述的,氨基酸取代可以基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。

[0335] 多肽变体进一步包含糖基化形式、与其它分子的聚集缀合物和与不相关化学部分(例如,聚乙二醇化分子)的共价缀合物。如本领域中已知的,可以通过将功能与在氨基酸链

中或在N末端或C末端残基处发现的基团连接来制备共价变体。变体还包含等位基因变体、物种变体和突变蛋白。不影响蛋白质的功能活性的区截短或缺失也是变体。

[0336] 在一些实施例中,在期望表达两个或更多个多肽的情况下,如本文其它地方所讨论的,对其进行编码的多核苷酸序列可以通过IRES序列分开。在另一个实施例中,可以将两个或更多个多肽表达为包括一个或多个自切割多肽序列的融合蛋白。

[0337] 本发明的多肽包含融合多肽。在一些实施例中,提供了融合多肽和编码融合多肽的多核苷酸,例如,CAR。融合多肽和融合蛋白指代具有至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个多肽区段的多肽。融合多肽通常是C末端连接到N末端,但其也可以是C末端连接到C末端、N末端连接到N末端或N末端连接到C末端。融合蛋白的多肽可以采取任何顺序或指定的顺序。融合多肽或融合蛋白还可以包含保守修饰的变体、多态变体、等位基因、突变体、子序列和种间同系物,只要保持融合多肽的期望的转录活性即可。融合多肽可以通过化学合成法或通过两个部分之间的化学连接产生或者通常可以使用其它标准技术制备。包括融合多肽的连接的DNA序列可操作地连接到如本文其它地方所讨论的适合的转录或转译控制元件。

[0338] 在一个实施例中,融合多肽包括有助于以比天然重组蛋白更高的产率表达蛋白质(表达增强子)的序列。可以选择其它融合配偶体,以增加蛋白质的溶解度或使蛋白质能够靶向期望的细胞内隔区或促进融合蛋白通过细胞膜的转运。

[0339] 融合多肽可以进一步包括本文所描述的多肽结构域中的每个多肽结构域之间的多肽切割信号。另外,可以将多肽位点置于任何接头肽序列中。示例性多肽切割信号包含多肽切割识别位点,如蛋白酶切割位点、核酸酶切割位点(例如,稀有限制酶识别位点、自切割核酶识别位点)和自切割病毒寡肽(参见deFelipe和Ryan,2004.《转运(Traffic)》,5(8),616-26)。

[0340] 合适的蛋白酶切割位点和自切割肽是技术人员已知的(参见例如,Ryan等人,1997.《普通病毒学杂志(J.Gener.Virol.)》78,699-722;Scymczak等人(2004)《自然生物科技(Nature Biotech)》.5,589-594)。示例性蛋白酶切割位点包含但不限于以下的切割位点:马铃薯Y病毒NIa蛋白酶(例如,烟草蚀斑病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒HC蛋白酶、马铃薯Y病毒P1(P35)蛋白酶、byo病毒NIa蛋白酶、byo病毒RNA-2编码蛋白酶、口蹄疫病毒属L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、小rna 3C蛋白酶、豇豆花叶病毒24K蛋白酶、线虫传多面体病毒24K蛋白酶、RTSV(水稻东格鲁球状病毒)3C样蛋白酶、PYVF(欧防风黄点病毒)3C样蛋白酶、肝素、凝血酶、因子Xa和肠激酶。在一个实施例中,由于TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶切割位点的切割严格度高,所以优选TEV蛋白酶切割位点,例如,EXXYXQ(G/S)(SEQ ID NO:36),例如ENLYFQG(SEQ ID NO:37)和ENLYFQS(SEQ ID NO:38),其中X表示任何氨基酸(由TEV进行的切割发生在Q与G或Q与S之间)。

[0341] 在特定实施例中,多肽切割信号是病毒自切割肽。

[0342] 在一些实施例中,自切割肽包含从口疮病毒、马铃薯Y病毒(potyvirus)和心脏病毒2A肽、FMDV(口蹄疫病毒)、马A型鼻炎病毒、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thosea asigna virus)和猪捷申病毒(porcine teschovirus)获得的那些多肽序列。

[0343] 在一些实施例中,自切割多肽位点包括2A或2A样位点、序列或结构域(Donnelly等人,2001.《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》82:1027-1041)。表2中提供了2A位点的说明性

实例。

[0344] 表2

[0345]

SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 29	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 34	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0346] 在优选的实施例中,本文所设想的多肽包括CAR多肽。

[0347] F. 多核苷酸

[0348] 在一些实施例中,提供了编码一种或多种CAR多肽的多核苷酸,例如,SEQ ID NO: 10和12。如本文所使用的,术语“多核苷酸”或“核酸”是指前信使RNA (前体mRNA)、信使RNA (mRNA)、RNA、基因组RNA (gRNA)、正链RNA (RNA (+))、负链RNA (RNA (-))、基因组DNA (gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA (cDNA)、合成DNA或重组DNA。多核苷酸包含单链和双链多核苷酸。多核苷酸是指长度为至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少100个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少1000个、至少5000个、至少10000个或至少15000个或更多个核苷酸以及所有中间长度的核苷酸的聚合形式,或者是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者是任一类型核苷酸的修饰形式。容易理解的是,在此上下文中,“中间长度”意指所引用值之间的任何长度,如6、7、8、9等,101、102、103等;151、152、153等;201、202、203等。优选地,本发明的多核苷酸包含与本文所描述的参考序列 (参见例如,序列表) 中的任一个具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸或变体,典型地其中变体保持参考序列的至少一种生物活性。在各个说明性实施例中,本公开部分地设想了包括表达载体、病毒载体和转移质粒的多核苷酸以及包括所述多核苷酸的组合物和细胞。

[0349] 在一些实施例中,本公开提供了对本发明的多肽的至少约5个、10个、25个、50个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、500个、1000个、1250个、1500个、1750个或2000个或更多个以及所有中间长度的连续氨基酸残基进行编码的多核苷酸。容易理解的是,在此上下文中,“中间长度”意指所引用值之间的任何长度,如6、7、8、9等,101、102、103等;151、152、153等;201、202、203等。

[0350] 如本文所使用的,术语“多核苷酸变体”和“变体”等是指展现出与参考多核苷酸序列或在下文中定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸具有实质性序列同一性的多核苷酸。这些术语包含与参考多核苷酸相比其中已添加或缺失、或用不同核苷酸替代一个或多个核苷酸的多核苷酸。在此方面,本领域中充分理解的是,可以对参考多核苷酸作出包含突变、添加、缺失以及取代在内的某些改变或修饰,由此所改变的或经修饰的多核苷酸保

留所述参考多核苷酸的生物功能或活性。术语“多核苷酸片段”可以指长度为至少5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个、1000个、1100个、1200个、1300个、1400个、1500个、1600个、1700个或更多个核苷酸的多核苷酸，其编码保留至少100%、至少90%、至少80%、至少70%、至少60%、至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少10%或至少5%的天然存在的多肽活性的多肽变体。

[0351] 如本文所使用的，陈述“序列同一性”或例如包括“与...50%相同的序列”是指序列在一个比较窗口内在逐核苷酸的基础上或在逐氨基酸的基础上相同的程度。因此，“序列同一性百分比”可以通过以下方式计算：在比较窗内比较两个最佳地比对的序列，测定的一致核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或一致氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys以及Met）在两个序列中出现的位置的数目以得到相配位置的数目，用相配位置的数目除以比较窗中的位置总数（即，窗大小）并将结果乘以100，得到序列同一性百分比。包含与本文所描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%、99%或100%序列同一性的核苷酸和多肽，通常其中多肽变体维持参考多肽的至少一种生物活性。

[0352] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包含“参考序列”、“比较窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“基本同一性”。“参考序列”的长度为至少12个、但通常为15个到18个，并且通常为至少25个单体单元，包含核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸可以各自包括（1）在两个多核苷酸之间类似的序列（即，仅完整多核苷酸序列的一部分）；和（2）在两个多核苷酸之间相异的序列，两个（或更多个）多核苷酸之间的序列比较通常通过在“比较窗”内比较两个多核苷酸的序列以鉴别并比较序列局部区域的相似性来进行。“比较窗”是指具有至少6个、通常约50个至约100个、更通常约100个至约150个连续位置的概念性区段，其中在最佳地比对一个序列与具有相同数目连续位置的参考序列之后，比较所述两个序列。为了对两条序列进行最佳比对，比较窗可以包括相较于参考序列（不包括添加或缺失的序列），约20%或更低百分比的添加或缺失（即，空位）。用于比对比较窗口的序列的最佳比对可以通过算法的计算机化实施例（美国威斯康星州麦迪逊的科学大道575号的遗传学计算机集团（Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA）的威斯康星遗传学软件包7.0版本（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0）的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA）或者通过检查和由所选择的各种方法中的任何一种方法生成的最佳比对（即，产生了比较窗口内的最高同源性百分比）来进行。还可以参考BLAST系列程序，如例如通过Altschul等人，1997，《核酸研究（Nucl. Acids Res.）》25:3389所公开的BLAST程序家族。序列分析的详细讨论可以见于Ausubel等人，《当代分子生物学实验指南》，约翰威立父子公司（John Wiley & Sons, Inc.），1994-1998，第15章，第19.3单元。

[0353] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR由SEQ ID NO:10中所示的核苷酸序列编码。在一些实施例中,抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列编码。在一些实施例中,抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:10具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码。在一些实施例中,包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列的抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列编码。

[0354] 在一些实施例中,抗MUC16 CAR由SEQ ID NO:12中所示的核苷酸序列编码。在一些实施例中,抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的核苷酸序列编码。在一些实施例中,抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:12具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码。在一些实施例中,包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列的抗MUC16 CAR由与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的核苷酸序列编码。

[0355] 在一些实施例中,本文公开了编码抗MUC16 CAR的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者。在一些实施例中,本文公开了编码抗MUC16 CAR的核苷酸序列,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:49、50、51、52、61、62、63、64、73、74、75、76、85、86、87、88、97、98、99、100、109、110、111、112、121、122、123、124、125、126、135、136、137、138、147、148、149或150中的任一者具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0356] 如本文所使用的,“分离的多核苷酸”是指已经从其两侧的处于天然存在状态的序列纯化的多核苷酸,例如,已经从通常与其相邻的序列移除的DNA片段。“分离的多核苷酸”还指互补DNA(cDNA)、重组DNA或自然中不存在且已经通过人手制造的其它多核苷酸。在特定实施例中,分离的多核苷酸是合成多核苷酸、半合成多核苷酸或从重组来源获得或衍生的多核苷酸。

[0357] 在各个实施例中,多核苷酸包括编码本文所设想的多肽的mRNA。在某些实施例中,mRNA包括帽、一个或多个核苷酸和poly(A)尾部。

[0358] 在特定实施例中,多核苷酸可以是密码子优化的。如本文所使用的,术语“密码子优化的”指代取代编码多肽的多核苷酸中的密码子以增加多肽的表达、稳定性和/或活性。影响密码子优化的因素包含但不限于以下中的一种或多种:(i)两个或更多个生物体或基因之间的密码子偏倚或者合成地构成的偏倚表格的变化;(ii)生物体、基因或基因组内的密码子偏倚度的变化;(iii)包含背景在内的密码子的系统变化;(iv)密码子根据其解码tRNA的变化;(v)密码子根据GC%在总体上或在三联体中的一个位置处的变化;(vi)与参考序列例如天然存在的序列的相似度的变化;(vii)密码子频率截止的变化;(viii)从DNA序列转录的mRNA的结构性质;(ix)关于设计密码子取代组所基于的DNA序列的功能的先验知识;(x)每个氨基酸的密码子组的系统变化;和/或(xi)假性转译起始位点的经过分离的移除。

[0359] 描述多核苷酸的朝向的术语包含:5' (通常是具有游离磷酸基的多核苷酸的端部)和3' (通常是具有游离羟基(OH)的多核苷酸的端部)。多核苷酸序列可以按5'-3'朝向或3'-5'朝向注释。对于DNA和mRNA,5'-3'链被指定为“有义”链、“正”链或“编码”链,因为其序列

与前信使(前体mRNA)的序列是一致的[RNA中的尿嘧啶(U)而非DNA中的胸腺嘧啶(T)除外]。对于DNA和mRNA,作为通过RNA聚合酶转录的链的3'-5'互补链被命名为“模板”、“反义”、“负”或“非编码”链。如本文所使用的,术语“相反朝向”是指以3'-5'朝向书写的5'-3'序列或以5'-3'朝向书写的3'-5'序列。

[0360] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对规则相关的多核苷酸(即,核苷酸序列)。例如,DNA序列5'AG T C A T G 3'的互补链是3'T C A G T A C 5'。后一个序列常常写成左边为5'端且右边为3'端的反向补体5'C A T G A C T 3'。与其反向补体相等的序列被称为回文序列。互补性可以是“部分的”,其中核酸的碱基中仅一些碱基根据碱基配对规则是匹配的。或者,在核酸之间可以存在“完全”或“全部”的互补性。

[0361] 此外,本领域的普通技术人员应理解,由于遗传密码的简并性,存在许多对多肽或其变体片段进行编码的核苷酸序列,如本文所描述的。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。尽管如此,由本发明具体地设想了由于密码子使用情况的差异而变化的多核苷酸,例如针对人类和/或灵长类动物密码子选择而优化的多核苷酸。此外,还可以使用包括本文所提供的多核苷酸序列的基因的等位基因。等位基因是由于如核苷酸的缺失、添加和/或取代等一个或多个突变而改变的内源基因。

[0362] 如本文所使用的,术语“核酸盒”或“表达盒”是指在载体内可以表达RNA和随后蛋白质的基因序列。核酸盒含有所关注的基因,例如,所关注的多核苷酸。核酸盒含有一个或多个表达控制序列,例如,启动子、增强子、poly(A)序列和所关注的基因,例如,所关注的多核苷酸。核酸盒在载体内定位且顺序地朝向,使得可以将盒中的核酸转录成RNA并在必要时转译成蛋白质或多肽、经历在转化细胞中具有活性所需的适当的转译后修饰并且通过将适合的细胞内隔区靶向细胞外隔区或分泌到细胞外隔区而易位到适合的隔区以具有生物活性。在一些实施例中,盒使其3'端和5'端适于准备插入到载体中,例如,其在每一端处均具有限制性核酸内切酶位点。在一些实施例中,核酸盒含有嵌合抗原受体的序列。盒可以作为单个单元移除并插入到质粒或病毒载体中。

[0363] 在一些实施例中,多核苷酸包含至少一种所关注的多核苷酸。如本文所使用的,术语“所关注的多核苷酸”是指插入到期望表达的表达载体中的编码多肽(即,所关注的多肽)的多核苷酸。载体可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个所关注的多核苷酸。在一些实施例中,所关注的多核苷酸编码在治疗或预防疾病或病症中提供治疗效果的多肽。所关注的多核苷酸和从其编码的多肽包含编码野生型多肽的多核苷酸以及其功能变体和片段。在特定实施例中,功能变体与对应的野生型参考多核苷酸或多肽序列具有至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的同一性。在一些实施例中,功能变体或片段具有对应的野生型多肽的生物活性的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0364] 如本文其它地方所公开的或如本领域已知的,无论编码序列本身的长度如何,本公开的多核苷酸可以与其它DNA序列组合,如启动子和/或增强子、非转译区(UTR)、信号序列、Kozak序列、聚腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、内部核糖体进入位点(IRES)、重组酶识别位点(例如,LoxP位点、FRT位点和Att位点)、终止密码子、转录终止信号以及对自切割多肽、表位标记进行编码的多核苷酸,使得所述多核苷酸的总长度可以显著变化。因此,设想可以采用几乎任何长度的多核苷酸片段,其总长度优选地受制备的容易性和在预期的重组DNA方案中的使用的限制。

[0365] 在一些实施例中,多核苷酸或含有多核苷酸的细胞利用自杀基因,包含用于减小直接毒性和/或不受控制的增殖的风险的诱导型自杀基因。在一些实施例中,自杀基因对含有多核苷酸或细胞的宿主不产生免疫性。可以使用的自杀基因的某个实例是胱天蛋白酶-9或胱天蛋白酶-8或胞嘧啶脱氨酶。可以使用特定的二聚化学诱导剂(CID)来激活胱天蛋白酶-9。

[0366] 在一些实施例中,载体包括使本发明的免疫效应细胞(例如,T细胞)易于在体内进行阴性选择的基因区段。“阴性选择”意指由于个体的体内病状的改变而可以消除的输注细胞。阴性可选择表型可以由对所施用药剂,例如化合物,赋予敏感性的基因的插入而产生。阴性可选择基因在本领域是已知的,并且包含但不限于以下:赋予更昔洛韦(ganciclovir)敏感性的单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人,《细胞(Cell)》11:223,1977);细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因、细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因和细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等人,《美国国家科学院院刊》89:33(1992))。

[0367] 在一些实施例中,如T细胞等基因修饰的免疫效应细胞包括多核苷酸,所述多核苷酸进一步包括能够在体外选择阴性可选择表型的细胞的阳性标志物。阳性可选择标志物可以是基因,其在被引入宿主细胞后表达允许阳性选择携带基因的细胞的显性表型。这种类型的基因是本领域已知的,并且包含但不限于:赋予潮霉素B抗性的潮霉素-B磷酸转移酶基因(hph)、来自编码对抗生素G418的抗性的Tn5的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph)、二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、腺苷脱氨酶基因(ADA)以及多抗药性(MDR)基因。

[0368] 在一些实施例中,阳性可选择标志物与阴性可选择元件相连接使得阴性可选择元件的损失必然还伴随着阳性可选择标志物的损失。在一些实施例中,阳性可选择标志物和阴性可选择标志物融合,使得一者的丧失必然导致另一者的丧失。产生作为表达产物的多肽的所融合多核苷酸的实例是潮霉素磷酸转移酶胸苷激酶融合基因(HyTK),所述多肽赋予所期望的上文所描述的阳性和阴性选择特征。这种基因的表达所产生的多肽赋予潮霉素B抗性以用于体外阳性选择和更昔洛韦敏感性以用于体内阴性选择。参见Lupton S.D.等人,《分子和细胞生物学(Mol.and Cell.Biology)》11:3374-3378,1991。在一些实施例中,编码CAR的多核苷酸存在于含有融合基因的逆转录病毒载体中,尤其赋予潮霉素B抗性以用于体外阳性选择和更昔洛韦敏感性以用于体内阴性选择的逆转录病毒载体(例如Lupton, S.D.等人(1991),同上中所描述的HyTK逆转录病毒载体)。还参见S.D.Lupton的公开案PCT/US91/08442和PCT/US94/05601,其描述了使用通过将显性阳性可选择标志物与阴性可选择标志物融合产生的双功能可选择融合基因。

[0369] 在一些实施例中,阳性可选择标志物源自选自hph、nco和lgpt组成的组的基因,并且阴性可选择标志物源自选自胞嘧啶脱氨酶、HSV-I TK、VZV TK、HPRT、APRT和gpt组成的组的基因。在一些实施例中,标志物是双功能可选择融合基因,其中阳性可选择标志物源自hph或neo,并且阴性可选择标志物源自胞嘧啶脱氨酶或TK基因或可选择标志物。诱导型自杀基因

[0370] G.载体

[0371] 多核苷酸可以使用本领域中已知并且可用的多种公认技术中的任一种制备、操作和/或表达。为了表达所期望的多肽,可以将对多肽进行编码的核苷酸序列插入到适当的载体中。

[0372] 术语“载体”在本文中用于是指能够转移或转运另一个核酸分子的核酸分子。所转移的核酸通常连接到, (例如, 插入) 载体核酸分子。载体可以包含在细胞中引导自主复制的序列, 或可以包含足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。

[0373] 示例性载体包含但不限于: 自主复制序列、mRNA、质粒 (例如, DNA质粒或RNA质粒)、转座子、噬菌粒、粘粒、人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或P1来源的人工染色体 (PAC)、如 λ 噬菌体或M13噬菌体等噬菌体以及动物病毒。可用作载体的动物病毒的类别的实例包含但不限于: 逆转录病毒 (包含慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒以及乳多空病毒 (例如, SV40)。表达载体的实例是用于在哺乳动物细胞中表达的pCIneo载体 (普洛麦格公司 (Promega)); 用于在哺乳动物细胞中进行慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM和pLenti6.2/V5-GW/lacZ (英杰公司 (Invitrogen))。在一些实施例中, 可以将本文所公开的嵌合蛋白的编码序列连接到此类表达载体中, 以在哺乳动物细胞中表达嵌合蛋白。

[0374] 在一些实施例中, 载体是游离型载体或在染色体外维持的载体。如本文所使用的, 术语“游离型”是指能够复制而不整合到宿主的染色体DNA中且不会从分裂的宿主细胞中逐渐丧失的载体, 这还意味着所述载体在染色体外或游离地复制。载体被设计成含有对来自嗜淋巴细胞疱疹病毒或 γ 疱疹病毒、腺病毒、SV40、牛乳头瘤病毒或酵母的DNA复制起点或“ori”进行编码的序列, 尤其是与EBV的oriP相对应的嗜淋巴细胞疱疹病毒或 γ 疱疹病毒的复制起点。在一特定方面, 嗜淋巴细胞疱疹病毒可以是爱泼斯坦巴尔病毒 (Epstein Barr virus) (EBV)、卡波西氏肉瘤疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma herpes virus) (KSHV)、松鼠猴疱疹病毒 (Herpes virus saimiri) (HS) 或马立克氏病病毒 (Marek's disease virus) (MDV)。爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 和卡波西氏肉瘤疱疹病毒 (KSHV) 也是 γ 疱疹病毒的实例。通常, 宿主细胞包括激活复制的病毒复制反式激活因子蛋白。

[0375] 表达载体中存在的“控制元件”或“调节序列”是载体的非翻译区—复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号 (Shine Dalgarno序列或Kozak序列)、内含子、聚腺苷酸化序列、5'和3'非翻译区—其与宿主细胞蛋白相互作用以实施转录和翻译。此类元件的强度和特异性可以有所不同。取决于所利用的载体系统和宿主, 可以使用任何数量的适合的转录和翻译元件, 包含普遍存在的启动子和诱导型启动子。

[0376] 在一些实施例中, 载体包含但不限于表达载体和病毒载体, 将包含外源、内源或异源控制序列, 如启动子和/或增强子。“内源”控制序列是与基因组中的给定基因天然连接的序列。“外源”控制序列是通过基因操纵 (即, 分子生物技术) 被放置成与基因并置, 使得所述基因的转录由所连接的增强子/启动子引导的控制序列。“异源”控制序列是来自与被基因操纵的细胞不同的物种的外源序列。

[0377] 如本文所使用的, 术语“启动子”指代RNA聚合酶所结合的多核苷酸 (DNA或RNA) 的识别位点。RNA聚合酶引发并转录可操作地连接到启动子的多核苷酸。在一些实施例中, 在哺乳动物细胞中可操作的启动子包括位于转录起始位点上游大约25至30个碱基处的富AT区域和/或在转录起点上游70至80个碱基处所发现的另一序列: CNCAAT区域, 其中N可以是任何核苷酸。

[0378] 术语“增强子”指代含有能够提供增强的转录并且在一些情况下可以不依赖于其

相对于另一个控制序列的朝向而起作用的序列的DNA区段。增强子可以与启动子和/或另一个增强子元件协作地或加性地起作用。术语“启动子/增强子”指代含有能够提供启动子功能和增强子功能两者的序列的DNA区段。

[0379] 术语“可操作地连接”指代并置,其中所描述的组分处于允许所述组分按其预期方式起作用的关系。在一个实施例中,所述术语是指核酸表达控制序列(如启动子和/或增强子)与第二多核苷酸序列,例如,所关注的多核苷酸之间的功能性连接,其中表达控制序列引导对应于第二序列的核酸的转录。

[0380] 如本文所使用的,术语“组成型表达控制序列”是指连续地或连续不断地允许可操作地连接的序列的转录的启动子、增强子或启动子/增强子。组成型表达控制序列可以是允许在各种各样的细胞和组织类型中表达的“普遍存在的”启动子、增强子或启动子/增强子或分别允许在受限种类的细胞和组织类型中表达的“细胞特异性”、“细胞类型特异性”、“细胞谱系特异性”或“组织特异性”启动子、增强子或启动子/增强子。

[0381] 适于在本发明的特定实施例中使用的示例性普遍存在的表达控制序列包括但不限于:巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、病毒性猿猴病毒40(SV40)(例如,早期或晚期)、莫洛尼鼠白血病病毒(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、H5、来自牛痘病毒的P7.5启动子和P11启动子、延长因子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(Nature Biotechnology)》,25,1477-1482(2007))、泛素C启动子(UBC)、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子、 β -肌动蛋白启动子和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子、阴性对照区缺失的、d1587rev引物结合位点取代的(MND)启动子(Challita等人,《病毒学杂志(J Virol)》.69(2):748-55(1995))。

[0382] 在一些实施例中,载体包括MND启动子。在一些实施例中,载体包括包含人EF1a基因的第一内含子的EF1a启动子。在一些实施例中,载体包括缺少人EF1a基因的第一内含子的EF1a启动子。

[0383] 在特定实施例中,可能需要表达包括来自T细胞特异性启动子的CAR的多核苷酸。

[0384] 如本文所使用的,“条件表达”可以是指任何类型的条件表达,包括但不限于:诱导型表达;可阻遏型表达;在具有特定生理、生物或疾病状态等的细胞或组织中的表达。此定义不旨在排除细胞类型或组织特异性表达。在一些实施例中,所关注的多核苷酸的条件表达,例如,通过使细胞、组织、生物体等经受导致多核苷酸表达或导致由所关注的多核苷酸编码的多核苷酸的表达增加或减少的治疗或病状来控制表达。

[0385] 诱导型启动子/系统的说明性实例包括但不限于类固醇诱导型启动子,如对糖皮质激素或雌性激素受体进行编码的基因的启动子(可通过用相应激素处理来诱导)、巯基金属结合蛋白启动子(可通过用各种重金属处理来诱导)、MX-1启动子(可通过干扰素来诱导)、“基因开关(GeneSwitch)”米非司酮可调系统(Sirin等人,2003,《基因(Gene)》,323:67)、cumate诱导型基因开关(WO 2002/088346)、四环素依赖性调控系统等。

[0386] 还可以通过使用位点特异性DNA重组酶实现条件表达。根据本发明的某些实施例,

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

[0387] 载体可以包括各种各样的位点特异性重组酶中的任何位点特异性重组酶的一个或多个重组位点。应理解,位点特异性重组酶的靶位点是整合载体(例如,逆转录病毒载体或慢病毒载体)所需的任何位点的补充。如本文所使用的,术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点”指代重组酶识别和结合的特定核酸序列。

[0388] 例如,Cre重组酶的一个重组位点是loxP,其是34碱基对序列,所述碱基对序列包括侧接8碱基对核心序列的两个13碱基对反向重复序列(充当重组酶结合位点)(参见图1中Sauer, B.,《生物技术当前述评》,5:521-527(1994))。其它示例性loxP位点包含但不限于:lox511(Hoess等人,1996;Bethke和Sauer,1997);lox5171(Lee和Saito,1998);lox2272(Lee和Saito,1998);m2(Langer等人,2002);lox71(Albert等人,1995);以及lox66(Albert等人,1995)。

[0389] FLP重组酶的合适识别位点包含但不限于:FRT(McLeod等人,1996); F_1, F_2, F_3 (Schlake和Bode,1994); F_4, F_5 (Schlake和Bode,1994);FRT(LE)(Senecoff等人,1988);FRT(RE)(Senecoff等人,1988)。

[0390] 识别序列的其它实例为通过重组酶 λ 整合酶,例如,phi-c31,识别的attB、attP、attL和attR序列。 ϕ C31 SSR仅介导异型位点attB(长度为34bp)与attP(长度为39bp)之间的重组(Groth等人,2000)。分别以细菌和噬菌体基因组上用于噬菌体整合酶的附接位点命名的attB和attP均含有可能由 ϕ C31同源二聚体结合的不完全的反向重复序列(Groth等人,2000)。产物位点attL和attR对另外的 ϕ C31介导的重组具有有效惰性(Belteki等人,2003),从而使反应不可逆。对于催化插入,已经发现,相比于attP位点插入到基因组attB位点中,attB携带的DNA更容易插入到基因组attP位点中(Thyagarajan等人,2001;Belteki等人,2003)。因此,典型的策略通过同源重组将携带attP的“对接位点”定位到限定的基因座中,然后所述基因座与携带attB的进入序列配合以便插入。

[0391] 如本文所使用的,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入顺反子(蛋白编码区)的如ATG等起始密码子由此导致基因的帽非依赖性翻译的元件。参见例如,Jackson等人,1990.《生物化学科学趋势(Trends Biochem Sci)》15(12):477-83)以及Jackson和Kaminski.1995.《RNA》1(10):985-1000。在一些实施例中,载体包含编码一个或多个多肽的一个或多个所关注的多核苷酸。在一些实施例中,为了实现多个多肽中的每一个多肽的有效转译,可以通过一个或多个IRES序列或编码自切割多肽的多核苷酸序列来分离多核苷酸序列。

[0392] 如本文所使用的,术语“Kozak序列”是指大大促进mRNA与核糖体的小亚单元的初始结合并增加转译的短核苷酸序列。共同Kozak序列是(GCC)RCCATGG,其中R是嘌呤(A或G)

(Kozak, 1986.《细胞》.44 (2):283-92以及Kozak, 1987.《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》.15 (20):8125-48)。在一些实施例中,载体包括具有共有Kozak序列并编码期望多肽(例如,CAR)的多核苷酸。

[0393] 1.病毒载体

[0394] 在一些实施例中,用编码CAR的病毒载体(例如,慢病毒载体)转导细胞(例如,免疫效应细胞)。例如,用编码CAR的载体、用CD3 ζ 、CD28、4-1BB、Ox40的细胞内信号传导结构域或其任何组合转导免疫效应细胞,所述CAR包括与MUC16多肽结合的抗MUC16抗体或其抗原结合片段。因此,这些经转导的细胞可以引发CAR介导的细胞毒性应答。

[0395] 适合于在本文所设想的特定实施例中使用的病毒载体系统的说明性实例包括但不限于腺病毒伴随病毒(AAV)、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒以及痘苗病毒载体。

[0396] 基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高转导效率并且并不需要细胞分裂。使用这种载体,已经获得了高滴度和高表达水平。此载体可以在相对简单的系统中大量制备。将大多数腺病毒载体工程化,使得转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后,使复制缺陷型载体在以反式提供缺失的基因功能的人293细胞中繁殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包含如在肝、肾和肌肉中发现的非分裂的分化细胞。常规Ad载体具有很大的承载能力。

[0397] 复制缺陷的当前腺病毒载体的产生和繁殖可以利用命名为293的独特辅助细胞系,所述辅助细胞系通过Ad5 DNA片段从人胚胎肾细胞转化并组成性地表达E1蛋白(Graham等人,1977)。由于E3区可从腺病毒基因组中分配出来(Jones和Shenk,1978),所以目前的腺病毒载体在293细胞的帮助下在E1、D3区或两个区中携带外源DNA(Graham和Prevec,1991)。腺病毒载体已经用于真核基因表达(Levrero等人,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗开发(Grunhaus和Horwitz,1992;Graham和Prevec,1992)。向不同的组织施用重组腺病毒方面的研究包含气管滴注(Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射(Ragot等人,1993)、外周静脉注射(Herz和Gerard,1993)以及立体定向脑内接种(Le Gal La Salle等人,1993)。在临床试验中使用Ad载体的实例涉及用于伴随肌内注射的抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等人,《人基因疗法 (Hum. Gene Ther.)》7:1083-9(1998))。

[0398] 在一些实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)转导细胞,将编码多顺反子信息的一种或多种多核苷酸引入到免疫效应细胞(例如,T细胞)中,所述多顺反子信息编码抗MUC16 CAR。

[0399] AAV是一种小型(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,并且可以将其基因组并入到宿主细胞的基因组中。重组AAV(rAAV)通常至少由转基因和其调节序列以及5'和3' AAV反向末端重复序列(ITR)构成。ITR序列的长度约为145bp。在一些实施例中,rAAV包括从AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10分离的ITR和衣壳序列。

[0400] 在一些实施例中,使用嵌合rAAV,从一种AAV血清型分离ITR序列,并从不同的AAV血清型分离衣壳序列。例如,具有源自AAV2的ITR序列和源自AAV6的衣壳序列的rAAV被称为AAV2/AAV6。在特定实施例中,rAAV载体可以包括来自AAV2的ITR以及来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中任一种的衣壳蛋白。在一些实施例中,rAAV包括源自AAV2的ITR序列和源自AAV6的衣壳序列。在一些实施例中,rAAV包括源自AAV2的ITR

序列和源自AAV2的衣壳序列。

[0401] 在一些实施例中,工程化和选择方法可以应用于AAV衣壳,以使其更有可能转导所关注的细胞。

[0402] rAAV载体的构建、产生和其纯化已经在以下公开:例如,在美国专利第9,169,494号;第9,169,492号;第9,012,224号;第8,889,641号;第8,809,058号;和第8,784,799号中,所述美国专利中的每一个通过引用以其整体并入本文中。

[0403] 在各个实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的单纯疱疹病毒,例如,HSV-1、HSV-2转导细胞,将编码CAR的所述一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞中。在一些实施例中,通过用包括一个或多个多核苷酸的单纯疱疹病毒,例如,HSV-1、HSV-2转导细胞,将编码多顺反子信息的所述一个或多个多核苷酸引入到免疫效应细胞中,所述多顺反子信息编码CAR。

[0404] 成熟HSV病毒粒子由包膜的二十面体衣壳组成,其中病毒基因组由152kb的线性双链DNA分子组成。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体缺乏一个或多个必需或非必需的HSV基因。在一个实施例中,基于HSV的病毒载体为复制缺陷型。大多数复制缺陷型HSV载体含有缺失以去除一个或多个中早期、早期或晚期HSV基因从而防止复制。例如,HSV载体可能缺乏立即早期基因,所述立即早期基因选自以下组成的组:ICP4、ICP22、ICP27、ICP47及其组合。HSV载体的优点是其进入可以导致长期DNA表达的潜伏期的能力,以及其可以容纳高达25kb的外源DNA插入物的大型病毒DNA基因组。基于HSV的载体在例如以下专利中有描述:美国专利第5,837,532号、第5,846,782号和第5,804,413号及国际专利申请W0 91/02788、W0 96/04394、W0 98/15637和W0 99/06583,所述专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0405] 逆转录病毒是用于基因递送的常见工具(Miller,2000,《自然(Nature)》.357:455-460)。在特定实施例中,逆转录病毒用于将编码嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸递送至细胞。如本文所使用的,术语“逆转录病毒”是指RNA病毒,所述RNA病毒将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并且随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中。一旦病毒整合到宿主基因组中,其就被称为“前病毒”。前病毒充当RNA聚合酶II的模板并且引导对产生新的病毒颗粒所需的结构蛋白质和酶进行编码的RNA分子的表达。

[0406] 适于在特定实施例中使用的说明性逆转录病毒包含但不限于:莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。

[0407] 如本文所使用的,术语“慢病毒”是指复杂逆转录病毒的组(或属)。说明性慢病毒包含但不限于:HIV(人类免疫缺陷病毒;包含HIV 1型和HIV 2型);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);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施例中,优选基于HIV的载体主链(即,HIV顺式作用序列元件)。在一些实施例中,慢病毒用于将包括CAR的多核苷酸递送至细胞。

[0408] 逆转录病毒载体和更具体地慢病毒载体可以用于实践本公开的特定实施例。因此,如本文所使用的,术语“逆转录病毒”或“逆转录病毒载体”意在分别包含“慢病毒”和“慢病毒载体”。

[0409] 如对于本领域技术人员显而易见的是,术语“病毒载体”广泛用于指代包含通常促进核酸分子的转移或整合到细胞的基因组中的病毒源性核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒)或指代介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒通常将包含各种病毒组分并且有时还包含除了核酸之外的宿主细胞组分。

[0410] 术语病毒载体可以指代能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒或指代被转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要源自病毒的结构和/或功能遗传元件。术语“逆转录病毒载体”指代含有主要源自逆转录病毒的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语“慢病毒载体”指代含有主要源自慢病毒的包含LTR的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语“杂交载体”指代含有逆转录病毒例如慢病毒序列和非慢病毒病毒序列两者的载体、LTR或其它核酸。在一个实施例中,杂交载体指代包括用于逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒例如慢病毒序列的载体或转移质粒。

[0411] 在一些实施例中,可以使用术语“慢病毒载体”、“慢病毒表达载体”来指代慢病毒转移质粒和/或传染性慢病毒颗粒。当本文中引用如克隆位点、启动子、调节元件、异源核酸等元件时,应理解,这些元件的序列以RNA形式存在于慢病毒颗粒中并且以DNA形式存在于DNA质粒中。

[0412] 在前病毒的每一端处的是被称为“长末端重复序列”或“LTR”的结构。术语“长末端重复序列(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对的结构域,其在其天然序列环境中是直接重复序列并含有U3、R和U5区。LTR通常提供对逆转录病毒基因的表达(例如,基因转录物的促进、启动和聚腺苷酸化)以及对病毒复制至关重要的功能。LTR含有包含转录控制元件的多个调节信号、聚腺苷酸化信号以及复制和整合病毒基因组所需的序列。病毒LTR被分成称为U3、R和U5的三个区。U3区含有增强子和启动子元件。U5区是引物结合位点与R区之间的序列并且含有聚腺苷酸化序列。R(重复序列)区与U3和U5区侧接。LTR由U3、R和U5区组成并且出现在病毒基因组的5'和3'端两者处。与5'LTR相邻的是将基因组逆转录(tRNA引物结合位点)以及将病毒RNA高效包装成颗粒(Psi位点)所需的序列。

[0413] 如本文所使用的,术语“包装信号”或“包装序列”是指位于逆转录病毒基因组内的序列,所述序列是将病毒RNA插入到病毒衣壳或颗粒中所需要的,参见例如,Clever等人,1995.《病毒学杂志(J. of Virology)》,第69卷,第4期;第2101-2109页。若干逆转录病毒载体使用病毒基因组的衣壳化所需的最小包装信号(也被称为psi[Ψ]序列)。因此,如本文所使用的,术语“包装序列”、“包装信号”、“psi”和符号“Ψ”用于指在病毒颗粒形成期间包封逆转录病毒RNA链所需的非编码序列。

[0414] 在各个实施例中,载体包括经修饰的5'LTR和/或3'LTR。LTR中的任一种或两种可以包括一个或多个修饰,包括但不限于一个或多个缺失、插入或取代。通常对3'LTR进行修饰以通过使病毒复制有缺陷来提高慢病毒或逆转录病毒系统的安全性。如本文所使用的,术语“复制缺陷型”是指不能够完全有效复制使得不产生感染性病毒粒子的病毒(例如,复制缺陷型慢病毒子代)。术语“有复制能力的”是指能够进行复制使得病毒的病毒复制能够产生感染性病毒粒子的野生型病毒或突变型病毒(例如,有复制能力的慢病毒子代)。

[0415] “自失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如,逆转录病毒或慢病毒载体,其中被称为U3区的右(3')LTR增强子-启动子区已经被修饰(例如,通过缺失或取代)成防止第一轮病毒复制之外的病毒转录。这是因为右(3')LTR U3区被用作左(5')LTR U3区在病毒复制

期间的模板并且因此,在不具有U3增强子-启动子的情况下无法进行病毒转录。在本发明的一进一步实施例中,修饰3'LTR,使得U5区例如被理想的poly(A)序列替换。应注意,本发明还包含对LTR的修饰,如对3'LTR、5'LTR或3'LTR和5'LTR两者的修饰。

[0416] 通过用异源启动子替换5'LTR的U3区来提供另外的安全性增强以在病毒颗粒的产生过程中驱动病毒基因组的转录。可以使用的异源启动子的实例包含例如病毒猿猴病毒40(SV40)(例如,早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如,即刻早期)、莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)以及单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。典型的启动子能够以非Tat依赖性方式驱动高水平转录。这种替换减小用于产生有复制能力的病毒的重组的可能性,因为病毒产生系统中不存在完整的U3序列。在某些实施例中,异源启动子在控制病毒基因组转录方式方面具有额外优势。例如,异源启动子可以是诱导型的,使得全部或部分病毒基因组的转录仅在诱导因子存在时发生。诱导因子包含但不限于一种或多种化学化合物或培养宿主细胞的生理条件,如温度或pH。

[0417] 在一些实施例中,病毒载体包括TAR元件。术语“TAR”是指位于慢病毒(例如,HIV)LTR的R区中的“反式激活应答”遗传元件。这种元件与慢病毒反式活化因子(tat)基因元件相互作用以增强病毒复制。然而,这种元件在其中5'LTR的U3区域被异源启动子替换的实施例中并非必需的。

[0418] “R区”是指逆转录病毒LTR内的区,所述区在封端基团的起点(即,转录起点)开始并且在poly A段的起点前即刻终止。R区还被定义为侧接U3和U5区。R区在逆转录期间在允许新生DNA从基因组的一端转移到另一端方面起作用。

[0419] 如本文所使用的,术语“FLAP元件”或“cPPT/FLAP”指代序列包含逆转录病毒,例如,HIV-1或HIV-2,的中心多嘌呤段和中心终止序列(cPPT和CTS)的核酸。合适的FLAP元件描述于美国专利第6,682,907号和Zennou等人,2000,《细胞》,101:173中。在HIV-1逆转录期间,中心多嘌呤段(cPPT)处的正链DNA的中心起始和中心终止序列(CTS)处的中心终止引起形成三链DNA结构:HIV-1中心DNA瓣。尽管不希望受到任何理论的约束,但是DNA瓣可以充当慢病毒基因组核输入的顺式活性决定子和/或可以增加病毒的滴度。在特定实施例中,逆转录病毒或慢病毒载体主链包括载体中的所关注的异源基因上游或下游的一个或多个FLAP元件。例如,在特定实施例中,转移质粒包含FLAP元件。在一个实施例中,本发明的载体包括从HIV-1中分离的FLAP元件。在另一个实施例中,慢病毒载体含有在cPPT和/或CTS元件中具有一种或多种突变的FLAP元件。在又一个实施例中,慢病毒载体包括cPPT或CTS元件。在又一个实施例中,慢病毒载体不包括cPPT或CTS元件。

[0420] 在一些实施例中,逆转录病毒或慢病毒转移载体包括一种或多种输出元件。术语“输出元件”是指调节RNA转录物从细胞的细胞核向细胞质转运的顺式作用转录后调节元件。RNA输出元件的实例包含但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV) rev应答元件(RRE)(参见例如,Culle等人,1991.《病毒学杂志(J.Virol)》.65:1053;以及Cullen等人,1991.《细胞》58:423)以及乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。通常,RNA输出元件定位于基因的3'UTR内,并且可以作为一个或多个拷贝插入。

[0421] 在一些实施例中,通过将转录后调节元件、高效的聚腺苷酸化位点和任选地转录终止信号结合到载体中来增加异源序列在病毒载体中的表达。各种转录后调节元件可以增加异源核酸在蛋白质处的表达,例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE;Zufferey等

人,1999,《病毒学杂志》,73:2886);存在于乙型肝炎病毒中的转录后调节元件(HPRE)(Huang等人,《分子与细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,5:3864);等等(Liu等人,1995,《基因与发育(Genes Dev.)》,9:1766)。在一些实施例中,载体包括转录后调节元件,如WPRE或HPRE。

[0422] 在一些实施例中,载体缺乏或不包括转录后调节元件(PTE),如WPRE或HPRE,因为在一些情况下,这些元件增加了细胞转化的风险和/或基本上不增加或不显著增加mRNA转录物的量或增加mRNA稳定性。因此,在一些实施例中,载体缺乏或不包括PTE。在一些实施例中,载体缺乏或不包括WPRE或HPRE作为添加的安全措施。

[0423] 引导异源核酸转录物的高效终止和聚腺苷酸化的元件将增加异源基因表达。转录终止信号通常存在于聚腺苷酸化信号的下游。在特定实施例中,载体包括对待表达的多肽进行编码的多核苷酸的3'处的聚腺苷酸化序列。如本文所使用的,术语“polyA位点”或“polyA序列”表示通过RNA聚合酶II引导新生RNA转录物的终止和聚腺苷酸化二者的DNA序列。聚腺苷酸化序列可以通过向编码序列的3'端添加polyA尾来促进mRNA稳定性,并且因此有助于提高转译效率。重组转录物的高效聚腺苷酸化是期望的,因为缺乏poly A尾的转录物不稳定并且被快速降解。切割和聚腺苷酸化由RNA中的poly(A)序列引导。哺乳动物前体mRNA的核心poly(A)序列具有侧接切割-聚腺苷酸化位点的两个识别元件。通常,几乎不变的AAUAAA六聚体位于富含U或GU残基的更加可变元件的上游20-50个核苷酸处。新生转录物的切割发生在这两种元件之间,并且与向5'切割产物添加的多达250个腺苷偶联。可以在本发明的载体中使用的polyA信号的说明性实例包含理想的polyA序列(例如, AATAAA、ATTAAA、AGTAAA)、牛生长激素polyA序列(BGHpA)、兔 β -珠蛋白polyA序列(r β gpA)或本领域已知的另一种适合的异源或同源polyA序列。

[0424] 在一些实施例中,逆转录病毒或慢病毒载体进一步包括一个或多个绝缘子元件。绝缘子元件可以有助于保护慢病毒表达的序列(例如,治疗性多肽)免受整合位点效应的影响,所述整合位点效应可以由基因组DNA中存在的顺式作用元件介导并且导致转移序列的表达失调(即,位置效应;参见例如,Burgess-Beusse等人,2002,《美国国家科学院院刊》,99:16433;以及Zhan等人,2001,《人类遗传学(Hum.Genet.)》,109:471)。在一些实施例中,转移载体包括一个或多个绝缘子元件3'LTR,并且在将前病毒整合到宿主基因组中时,前病毒通过复制3'LTR的方式在5'LTR或3'LTR两者处包括一个或多个绝缘子。适用于本发明的绝缘子包含但不限于鸡 β -珠蛋白绝缘子(参见Chung等人,1993.《细胞》74:505;Chung等人,1997.《美国国家科学院院刊》94:575;以及Bell等人,1999.《细胞》98:387,所述文献通过引用并入本文。绝缘子元件的实例包含但不限于来自 β -珠蛋白基因座的绝缘子,如鸡HS4。

[0425] 在一些实施例中,大多数或全部病毒载体主链序列来源于慢病毒,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,或某些慢病毒序列可以容纳大量取代和变化的组合而不损害转移载体执行本文所描述功能的能力。此外,各种慢病毒载体是本领域已知的,参见Naldini等人,(1996a、1996b和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利第6,013,516号;和美国专利第5,994,136号,所述文献中的许多文献可以适合于产生病毒载体或转移质粒。

[0426] 在一些实施例中,载体包括与编码CAR多肽的多核苷酸可操作地连接的启动子。载体可以具有一个或多个LTR,其中任一个LTR包括一个或多个修饰,如一个或多个核苷酸取

代、添加或缺失。载体可以进一步包括增加转导效率(例如,cPPT/FLAP)、病毒封装(例如,Psi (Ψ) 封装信号,RRE)的更多辅助元件之一,和/或增加治疗性基因表达的其它元件(例如,poly(A)序列),并且可以任选地包括WPRE或HPRE。

[0427] 在各个实施例中,载体是整合病毒载体。

[0428] 在各个其它实施例中,载体是游离型载体。

[0429] 在各个实施例中,本文所设想的载体包括非整合或整合缺陷逆转录病毒。在一个实施例中,“整合缺陷型”逆转录病毒或慢病毒是指具有缺乏将病毒基因组整合到宿主细胞的基因组中的能力的整合酶的逆转录病毒或慢病毒。在各个实施例中,整合酶蛋白被突变以特异性地降低其整合酶活性。通过修饰编码整合酶蛋白的pol基因获得无整合能力的慢病毒载体,从而产生编码整合缺陷型整合酶的突变的pol基因。专利申请WO 2006/010834中已经描述了此类无整合能力的病毒载体,所述专利申请通过引用以其整体并入本文。

[0430] 适于降低整合酶活性的HIV-1pol基因的说明性突变包括但不限于:H12N、H12C、H16C、H16V、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。

[0431] 适于降低整合酶活性的HIV-1pol基因的说明性突变包括但不限于:D64E、D64V、E92K、D116N、D116I、D116A、N120G、N120I、N120E、E152G、E152A、D35E、K156E、K156A、E157A、K159E、K159A、W235F和W235E。

[0432] 在一特定实施例中,整合酶包括氨基酸D64、D116或E152中的一者或多者中的突变。在一个实施例中,整合酶包括氨基酸D64、D116和E152中的突变。在一特定实施例中,缺陷型HIV-1整合酶包括D64V突变。

[0433] “宿主细胞”包含用重组载体或本发明的多核苷酸在体内、离体地或在体外电穿孔、转染、感染或转导的细胞。宿主细胞可以包含包装细胞、生产细胞和用病毒载体感染的细胞。在特定实施例中,将用本发明的病毒载体感染的宿主细胞施用于需要治疗的受试者。在某些实施例中,术语“靶细胞”与宿主细胞可互换使用并且指代期望细胞类型的经过转染、感染或转导的细胞。在优选实施例中,靶细胞是T细胞。

[0434] 如下文所描述的,包括在特定实施例中所设想的多核苷酸的病毒载体可以通过向个体患者施用进行体内递送,通常通过全身施用(例如,静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或颅内输注)或局部应用。可替代地,载体可以离体递送到细胞,如从个体患者移植的细胞(例如,动员的外周血、淋巴细胞、骨髓抽吸物、组织活检等)或通用供体造血干细胞,然后将细胞再植入患者体内。

[0435] 在一个实施例中,将包括编码CAR的多核苷酸的病毒载体直接施用于生物体,用于在体内转导细胞。通过通常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径施用,包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用这种核酸的合适的方法是本领域技术人员可获得的并且是公知的,并且尽管可以使用多于一种途径来施用特定组合物,但是特定途径通常可以提供比另一条途径更直接且更有效的反应。

[0436] 对于实现合理的病毒滴度来说,大规模病毒颗粒产生通常是必需的。病毒颗粒通

过将转移载体转染到包括病毒结构和/或附属基因(例如,gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx或nef基因或其它逆转录病毒基因)中的包装细胞系来产生。

[0437] 如本文所使用的,术语“包装载体”指代缺乏包装信号并且包括编码一个、两个、三个、四个或更多个病毒结构和/或附属基因的多核苷酸的表达载体或病毒载体。典型地,包装载体包含在包装细胞中并且通过转染、转导或感染引入到细胞中。用于转染、转导或感染的方法对于本领域的技术人员来说是熟知的。可以通过转染、转导或感染将本发明的逆转录病毒/慢病毒转移载体引入到包装细胞系中以产生生产细胞或细胞系。本发明的包装载体可以通过标准方法引入人类细胞或细胞系中,所述标准方法包含例如磷酸钙转染、脂质体转染或电穿孔。在一些实施例中,封装载体连同显性可选择标志物(如新霉素(neomycin)、潮霉素(hygromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、杀稻瘟菌素(blastocidin)、博来霉素(zeocin)、胸苷激酶(thymidine kinase)、DHFR、Gln合成酶或ADA)一起引入到细胞中,随后在存在适当药物的情况下选择并且分离克隆。可以将可选择标志物物理地连接到由包装载体,例如由IRES或自切割病毒肽,编码的基因。

[0438] 病毒包膜蛋白(env)确定可以通过最终由细胞系产生的重组逆转录病毒感染和转化的宿主细胞的范围。在如HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIV等慢病毒的情况下,env蛋白包含gp41和gp120。优选地,由本发明的包装细胞表达的病毒env蛋白编码在来自病毒gag和pol基因的单独载体上,如之前已经描述的。

[0439] 可以在本发明中采用的源自逆转录病毒的env基因的说明性实例包括但不限于: MLV包膜、10A1包膜、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、埃博拉病毒(Ebola)、仙台病毒(Sendai)、FPV(鸡瘟病毒)和流感病毒包膜。类似地,可以利用编码来自RNA病毒(例如,以下RNA病毒家族:小RNA病毒科、杯状病毒科、星状病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、冠状病毒科、副黏液病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正黏液病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、呼肠孤病毒科、双RNA病毒科、逆转录病毒科)以及来自DNA病毒(以下家族:圆环病毒科乳、小DNA病毒科、肝DNA病毒科、多空病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科和虹彩病毒科)的包膜的基因。代表性实例包含FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病毒、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10和EIAV。

[0440] 在其它实施例中,本发明的用于假型包装病毒的包膜蛋白包含但不限于以下病毒中的任何病毒:甲型流感,如H1N1、H1N2、H3N2和H5N1(禽流感);乙型流感;丙型流感病毒;甲型肝炎病毒;乙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒;丁型肝炎病毒;戊型肝炎病毒;轮状病毒;诺瓦克病毒群组(Norwalk virus group)中的任何病毒;肠道腺病毒;细小病毒;登革热病毒(Dengue fever virus);猴痘;单股负链病毒;狂犬病毒属,如狂犬病毒、拉各斯蝙蝠病毒(Lagos bat virus)、莫科拉病毒(Mokola virus)、杜温哈格病毒(Duvenhage virus)、欧洲蝙蝠病毒1和2以及澳大利亚蝙蝠病毒;暂时热病毒;水疱性病毒;水疱性口炎病毒(VSV);疱疹病毒,如单纯性疱疹病毒1型和2型、水痘带状疱疹、巨细胞病毒、艾巴氏病毒(Epstein-Bar virus,EBV)、人类疱疹病毒(HHV)、人类疱疹病毒6型和8型;人类免疫缺陷病毒(HIV);乳头瘤病毒;鼠 γ 疱疹病毒;沙粒病毒,如阿根廷出血热病毒、玻利维亚出血热病毒、萨比亚相关出血热病毒、委内瑞拉出血热病毒、拉沙热病毒、马秋波病毒(Machupo virus)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV);布尼亚病毒科(Bunyaviridae),如克里米亚-刚果出血热病毒、汉坦病毒(Hantavirus)、肾综合征出血热引起的病毒、裂谷热病毒;丝状病毒科(线状

病毒),包含埃博拉出血热和马尔堡出血热;黄病毒科,包含科萨努尔森林病病毒、鄂木斯克出血热病毒、蜱媒脑炎引起的病毒;以及副黏液病毒科,如亨德拉病毒(Hendra virus)和尼帕病毒(Nipah virus);大天花和小天花(天花); α 病毒,如委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒、西部马脑炎病毒、SARS相关冠状病毒(SARS-CoV)、西尼罗河病毒(West Nile virus)、任何脑炎引起的病毒。

[0441] 在一个实施例中,本发明提供了产生用VSV-G糖蛋白假型包装的重组逆转录病毒(例如,慢病毒)的包装细胞。

[0442] 如本文所使用的,术语“假型”或“假型包装”是指其病毒包膜蛋白已经被具有优选特性的另一病毒的病毒包膜蛋白取代的病毒。例如,HIV可以用水疱性口炎病毒G蛋白(VSV-G)包膜蛋白进行假型包装,这允许HIV感染更广泛的细胞,因为HIV包膜蛋白(由env基因编码)通常将病毒靶向CD4+呈递细胞。在本发明的一优选实施例中,慢病毒包膜蛋白用VSV-G进行假型包装。在一个实施例中,本发明提供了产生用VSV-G包膜糖蛋白进行假型包装的重组逆转录病毒(例如慢病毒)的包装细胞。

[0443] 如本文所使用的,术语“包装细胞系”关于不含包装信号但稳定或瞬时表达正确包装病毒颗粒所需的病毒结构蛋白和复制酶(例如,gag、pol和env)的细胞系使用。可以采用任何适合的细胞系来制备本发明的包装细胞。通常,细胞是哺乳动物细胞。在一特定实施例中,用于产生包装细胞系的细胞是人细胞。可以使用的适合的细胞系包含例如CHO细胞、BHK细胞、MDCK细胞、C3H 10T1/2细胞、FLY细胞、Psi-2细胞、BOSC 23细胞、PA317细胞、WEHI细胞、COS细胞、BSC 1细胞、BSC 40细胞、BMT 10细胞、VERO细胞、W138细胞、MRC5细胞、A549细胞、HT1080细胞、293细胞、293T细胞、B-50细胞、3T3细胞、NIH3T3细胞、HepG2细胞、Saos-2细胞、Huh7细胞、HeLa细胞、W163细胞、211细胞和211A细胞。在优选实施例中,包装细胞是293细胞、293T细胞或A549细胞。在另一个优选实施例中,细胞是A549细胞。

[0444] 如本文所使用的,术语“生产细胞系”指代能够产生重组逆转录病毒颗粒的细胞系,包括包含包装信号的包装细胞系和转移载体构建体。感染性病毒颗粒和病毒原液的生产可以使用常规技术进行。制备病毒储备溶液的方法在本领域中是熟知的并且由例如以下说明:Y.Soneoka等人(1995)《核酸研究》.23:628-633和N.R.Landau等人(1992)《病毒学杂志》66:5110-5113。可以使用常规技术从包装细胞中收集传染性病毒颗粒。例如,感染性颗粒可通过细胞裂解或细胞培养物上清液的收集来收集,如本领域已知的。任选地,如果需要,可以纯化收集的病毒颗粒。合适的纯化技术是本领域技术人员公知的。

[0445] 通过病毒感染而非转染的方式使用逆转录病毒或慢病毒载体递送基因或其它多核苷酸序列被称为“转导”。在一个实施例中,逆转录病毒载体通过感染和前病毒整合转导到细胞中。在某些实施例中,如果靶细胞(例如,T细胞)包括使用病毒或逆转录病毒载体通过感染递送至细胞的基因或其它多核苷酸序列,则所述靶细胞是“经转导的”。在特定实施例中,经转导的细胞包括由逆转录病毒或慢病毒载体在其细胞基因组中递送的一个或多个基因或其它多核苷酸序列。

[0446] 在特定实施例中,向受试者施用用表达一种或多种多肽的本发明的病毒载体转导的宿主细胞以治疗和/或预防疾病。根据本发明的某些实施例可以利用的、关于病毒载体在基因疗法中的使用的其它方法可以在例如以下中找到:Kay,M.A.(1997)《胸(Chest)》111(6增刊):138S-142S;Ferry,N.和Heard,J.M.(1998)《人类基因疗法(Hum.Gene Ther.)》9:

1975-81; Shiratory, Y. 等人 (1999) 《肝脏 (Liver)》19:265-74; Oka, K. 等人 (2000) 《脂质学的当前观点 (Curr. Opin. Lipidol.)》11:179-86; Thule, P.M. 和 Liu, J.M. (2000) 《基因疗法》.7:1744-52; Yang, N.S. (1992) 《生物技术关键评论 (Crit. Rev. Biotechnol.)》12:335-56; Alt, M. (1995) 《肝脏病学杂志 (J. Hepatol.)》23:746-58; Brody, S.L. 和 Crystal, R.G. (1994) 《纽约科学院年鉴》716:90-101; Strayer, D.S. (1999) 《研究用药物专家意见 (Expert Opin. Investig. Drugs)》8:2159-2172; Smith-Arica, J.R. 和 Bartlett, J.S. (2001) 《当前心脏病学报告 (Curr. Cardiol. Rep.)》3:43-49; 以及 Lee, H.C. 等人 (2000) 《自然》408:483-8。

[0447] H. 经基因修饰的细胞

[0448] 在一些实施例中, 本公开提供了经基因修饰以表达本文所设想的CAR的细胞。在一些实施例中, 经基因修饰的细胞用于治疗癌症 (例如, 表达MUC16的癌症)。如本文所使用的, 术语“经基因工程化的”或“经基因修饰的”是指将额外的遗传物质以DNA或RNA的形式添加到细胞中的总遗传物质中。术语“经基因修饰的细胞”、“经修饰细胞”和“重定向细胞”可互换使用。如本文所使用的, 术语“基因治疗”指代将额外的遗传物质以DNA或RNA的形式引入到细胞中的总遗传物质中, 所述额外的遗传物质恢复、校正或修饰基因的表达或实现表达治疗多肽, 例如CAR, 的目的。

[0449] 在一些实施例中, 将本文所设想的CAR引入到免疫效应细胞中并进行表达, 从而将其特异性重定向至所关注的靶抗原, 例如, MUC16多肽。“免疫效应细胞”是免疫系统的任何细胞, 其具有一种或多种效应子功能 (例如, 细胞毒性细胞杀伤活性、细胞因子分泌、ADCC和/或CDC的诱导)。

[0450] 本发明的免疫效应细胞可以是自体的 (autologous/autogeneic) (“自身的”) 或非自体的 (“非自身的”, 例如同种异体的、同基因的或异种的)。如本文所使用的, “自体”指代来自同一受试者的细胞。如本文所使用的, “同种异体”指代同一物种的与相比之下的细胞在基因上有所不同的细胞。如本文所使用的, “同基因”指代不同受试者的与相比之下的细胞在基因上相同的细胞。如本文所使用的, “异种”指代与相比之下的细胞属于不同物种的细胞。在优选实施例中, 本发明的细胞是同种异体的。

[0451] 与本文中所设想的CAR一起使用的说明性免疫效应细胞包含T淋巴细胞。术语“T细胞”或“T淋巴细胞”是本领域公认的并且旨在包含胸腺细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或激活T淋巴细胞。T细胞可以是T辅助 (Th) 细胞, 例如T辅助1 (Th1) 细胞或T辅助2 (Th2) 细胞。T细胞可以是辅助T细胞 (HTL; CD4⁺T细胞) CD4⁺T细胞、细胞毒性T细胞 (CTL, CD8⁺T细胞)、CD4⁺CD8⁺T细胞、CD4-CD8-T细胞或任何其它T细胞亚群。适于在特定实施例中使用的其它说明性T细胞群体包含原初T细胞 (TN)、记忆T细胞、T记忆干细胞 (TSCM)、中心记忆T细胞 (TCM)、效应记忆T细胞 (TEM) 和效应T细胞 (TEFF)。

[0452] 如本领域的技术人员所理解的, 其它细胞还可以用作具有如本文所描述的CAR的免疫效应细胞。具体地, 免疫效应细胞还包含NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞。免疫效应细胞还包含效应细胞的祖细胞, 其中可以在体内或体外诱导这种祖细胞分化成免疫效应细胞。因此, 在一些实施例中, 免疫效应细胞包含免疫效应细胞的祖细胞, 如源自脐带血、骨髓或动员外周血的CD34⁺细胞群体内含有的造血干细胞 (HSC), 所述HSC在施用于受试者时分化为成熟免疫效应细胞或者可以在体外诱导以分化为成熟免疫效应细胞。

[0453] 如本文所使用的, 经基因工程化以含有MUC16特异性CAR的免疫效应细胞可以被称

为“MUC16特异性重新定向的免疫效应细胞”。

[0454] 如本文所使用的,术语“CD34+细胞”是指在其细胞表面上表达CD34蛋白的细胞。如本文所使用的,“CD34”是指通常充当细胞-细胞粘附因子并且参与T细胞进入淋巴结的细胞表面糖蛋白(例如,唾液黏蛋白)。CD34+细胞群体含有造血干细胞(HSC),其在施用于患者时分化并促成所有造血谱系,包含T细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

[0455] 在一些实施例中,本公开提供了用于制备表达本文所设想的CAR的免疫效应细胞的方法。在一些实施例中,所述方法包括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如本文所描述的一种或多种CAR。在一些实施例中,免疫效应细胞从个体分离并经基因修饰而无需在体外进一步操纵。然后,可以将这种细胞直接再次施用到个体。在另外的实施例中,免疫效应细胞在基因修饰以表达CAR之前首先在体外被激活和刺激以增殖。在这方面,免疫效应细胞可以在被基因修饰(即,被转导或转染成表达本文所设想的CAR)之前和/或之后培养。

[0456] 在一些实施例中,在本文所描述的免疫效应细胞的体外操纵或基因修饰之前,从受试者获得细胞来源。在一些实施例中,经CAR修饰的免疫效应细胞包括T细胞。T细胞可以从多种来源获得,包含但不限于周边血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、肋膜积液、脾组织以及肿瘤。在一些实施例中,可以使用技术人员已知的任何数目的技术如沉降(例如,FICOLL™分离)从采集自受试者的单位血液中获得T细胞。在一些实施例中,通过单采血液成分术获得来自个体的循环血液的细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包含T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施例中,可以洗涤通过单采血液成分术采集的细胞以移除血浆级分并且将细胞置于适合的缓冲液或培养基中以供后续处理。可以用PBS或用缺乏钙、镁和大多数(如果不是全部的话)二价阳离子的另一种合适的溶液洗涤细胞。如本领域的普通技术人员将理解的,洗涤步骤可以通过本领域的技术人员已知的方法,诸如通过使用半自动流通离心机来实现。例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate等。洗涤后,可以使细胞重新悬浮在各种生物相容性缓冲液或有或无缓冲液的其它盐水溶液中。在一些实施例中,可以在细胞直接重悬的培养基中除去不期望的单采血液成分样品的组分。

[0457] 在一些实施例中,通过裂解红细胞并消耗单核细胞(例如,通过用PERCOLL™梯度离心)从外周血单核细胞(PBMC)中分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离表达以下标志物中的一个或多个的特定T细胞亚群:CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和CD45RO。在一个实施例中,通过正或负选择技术进一步分离表达CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和CD45RO的T细胞的特定亚群。例如,可以通过针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体的组合来完成通过阴性选择富集T细胞群。供本文使用的一种方法是通过使用单克隆抗体的混合物的负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或细胞选择,所述单克隆抗体针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物。例如,为了通过阴性选择针对CD4⁺细胞富集,单克隆抗体混合物通常包含针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可以用于分离所关注的细胞群以供本发明中使用。

[0458] 可以使用本文所设想的方法直接基因修饰PBMC以表达CAR。在一些实施例中,在PBMC分离之后,将T淋巴细胞进一步分离,并且在某些实施例中,可以在基因修饰和/或扩增

之前或之后将细胞毒性和辅助T淋巴细胞分选到原初、记忆和效应T细胞亚群中。

[0459] CD8⁺细胞可以通过使用标准方法获得。在一些实施例中,通过鉴定与那些类型的CD8⁺细胞中的每一种相关的细胞表面抗原,CD8⁺细胞进一步分选为原初中枢记忆细胞和效应细胞。

[0460] 在一些实施例中,原初CD8⁺T淋巴细胞的特征在于包含CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的原初T细胞表型标志物的表达。

[0461] 在一些实施例中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚组中。PBMC在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后分选为CD62L⁻CD8⁺和CD62L⁺CD8⁺部分。在一些实施例中,中枢记忆T细胞的表型标志物的表达包含CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对颗粒酶B呈阴性。在一些实施例中,中枢记忆T细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T细胞。

[0462] 在一些实施例中,效应T细胞对于CD62L、CCR7、CD28和CD127呈阴性,并且对于颗粒酶B和穿孔素呈阳性。

[0463] 在一些实施例中,CD4⁺T细胞进一步分选成亚群。例如,CD4⁺T辅助细胞可以通过鉴别具有细胞表面抗原的细胞群体而分选为原初、中央记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可以通过标准方法获得。在一些实施例中,原初CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺CD4⁺T细胞。在一些实施例中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L阳性和CD45RO阳性的。在一些实施例中,效应CD4⁺细胞是CD62L和CD45RO阴性的。

[0464] 如T细胞等免疫效应细胞可以在分离之后使用已知方法进行基因修饰,或者免疫效应细胞可以在进行基因修饰之前进行体外激活和扩增(或在祖细胞的情况下分化)。在一些实施例中,如T细胞等免疫效应细胞用本文所设想的嵌合抗原受体进行基因修饰(例如,用包括编码CAR的核酸的病毒载体进行转导),并且然后在体外进行激活和扩增。在各个实施例中,可以在基因修饰之前或之后使用如例如以下所描述的方法对T细胞进行激活和扩增以表达CAR:美国专利第6,352,694号;第6,534,055号;第6,905,680号;第6,692,964号;第5,858,358号;第6,887,466号;第6,905,681号;第7,144,575号;第7,067,318号;第7,172,869号;第7,232,566号;第7,175,843号;第5,883,223号;第6,905,874号;第6,797,514号;第6,867,041号;以及美国专利申请公开第20060121005号。

[0465] 通常,T细胞通过与和刺激CD3 TCR复合物相关信号的药剂以及刺激T细胞的表面上的共刺激分子的配体附接的表面接触来扩增。T细胞群体可以通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触或通过与和钙离子载体结合的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)接触被刺激。还设想了辅助分子在T细胞的表面上的共刺激。

[0466] 在一些实施例中,在具有适当细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)的培养基中使PBMC或经分离的T细胞与通常连接到珠粒或其它表面的刺激剂和共刺激剂(如抗CD3和抗CD28抗体)接触。为了刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包含可以用作本领域通常已知的其它方法的9.3、B-T3、XR-CD28(法国贝桑松市的Diacione公司(Diacione, Besancon, France) (Berg等人,《移植程序(Transplant Proc)》.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,《实验医学杂志(J. Exp. Med.)》190(9):13191328,1999;Garland等人,《免疫学方法杂志(J. Immunol Meth.)》227(1-2):53-63,1999)。连接到同一珠粒的抗CD3和抗CD28抗体充当“替代(surrogate)”抗原呈递细胞(APC)。在其它实施例中,可以使用如以下中描述的那些等方法来激活和刺激T细胞以与饲

养细胞和适当的抗体和细胞因子一起增殖:US6040177;US5827642;和WO2012129514。

[0467] 在一些实施例中,通过工程化K562、U937、721.221、T2和C1R细胞制备人工APC(aAPC)以引导各种共刺激分子和细胞因子的稳定表达和分泌。在一特定实施例中,K32或U32 aAPC用于引导一个或多个基于抗体的刺激分子在AAPC细胞表面上显示。aAPC上的基因的各种组合的表达使得能够精确地确定人T细胞激活要求,使得aAPC可以针对具有特定生长要求和不同功能的T细胞亚组的最佳传播进行定制。与天然APC的使用相比,aAPC支持离体生长和功能人CD8⁺T细胞的长期扩增,而不需要添加外源性细胞因子。T细胞群可以通过表达各种共刺激分子的aAPC扩增,包括但不限于CD137L(4-1BBL)、CD134L(OX40L)和/或CD80或CD86。最后,aAPC提供用于扩增经基因修饰的T细胞并且保持CD8⁺T细胞上的CD28表达的高效平台。WO 03/057171和US2003/0147869中提供的aAPC特此通过引用整体并入。

[0468] 在一些实施例中,CD34⁺细胞用本文所设想的核酸构建体转导。在一些实施例中,经转导的CD34⁺细胞在施用到受试者,通常是细胞最初从其分离的受试者体内之后在体内分化成成熟免疫效应细胞。在一些实施例中,CD34⁺细胞可以在暴露于以下细胞因子中的一种或多种细胞因子之前或在用如本文所描述的CAR进行基因修饰之后根据前述方法在体外进行刺激:Flt-3配体(FLT3)、干细胞因子(SCF)、巨核细胞生长和分化因子(TPO)、IL-3和IL-6(Asheuer等人,2004;Imren,等人,2004)。

[0469] 在一些实施例中,本公开提供了用于治疗癌症的经修饰的免疫效应细胞群体,所述经修饰的免疫效应细胞包括如本文所公开的CAR。例如,经修饰的免疫效应细胞群体由从被诊断患有本文所描述的癌症的患者(自体供体)获得的外周血单核细胞(PBMC)制备。PBMC形成可以是CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺的T淋巴细胞的异质群体。

[0470] PBMC还可以包含其它细胞毒性淋巴细胞,如NK细胞或NKT细胞。将携带本文中所设想的CAR的编码序列的表达载体引入到人供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。携带表达载体的成功转导的T细胞可以使用流式细胞术分选,以分离CD3阳性T细胞,并且接着除了使用抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和IL-2或如本文其它地方所述本领域已知的任何其它方法进行细胞激活之外,进一步增殖以增加这些表达CAR蛋白的T细胞的数目。标准程序可以用于表达CAR蛋白T细胞的T细胞的冷冻保存,所述冷冻保存用于储存和/或制备以用于人类受试者。在一个实施例中,在不存在非人动物衍生产物如胎牛血清(fetal calf serum/fetal bovine serum)的情况下进行T细胞的体外转导、培养和/或扩增。由于PBMC的异质群体是经基因修饰的,因此所得的经转导的细胞是包括MUC16靶向CAR的经修饰的细胞的异质群体,如本文所设想的。

[0471] 在一些实施例中,例如,一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同表达载体的混合物可以用于经基因修饰的免疫效应细胞的供体群体,其中每个载体编码如本文所设想的的不同嵌合抗原受体蛋白。所得的经修饰的免疫效应细胞形成经修饰的细胞的混合群体,其中所述经修饰的细胞的一部分表达多于一种不同的CAR蛋白。

[0472] I. 细胞制备方法

[0473] 在一些实施例中,本公开提供了用于制备经基因工程化以表达本文所描述的抗MUC16 CAR的细胞的方法。通过本文所设想的方法制备的细胞提供了经改进的过继性免疫疗法组合物。不希望受任何特定理论的束缚,据信通过本文所设想的方法制备的细胞组合物具有优异的性质,包含增加的存活率、在相对无分化的情况下的扩增以及体内持久性。

[0474] 在一些实施例中,本公开提供了用于制备经基因工程化以表达本文所描述的抗MUC16 CAR的T细胞的方法。在一些实施例中,制备T细胞的方法包括使细胞与一种或多种调节PI3K细胞信号传导途径的药剂接触。在一些实施例中,制备T细胞的方法包括使细胞与一种或多种调节PI3K/Akt/mTOR细胞信号传导途径的药剂接触。在一些实施例中,T细胞可以从任何来源获得,并且在制备过程的激活和/或扩增阶段期间与药剂接触。所得T细胞组合物富含具有增殖和表达以下生物标志物中的一种或多种的能力的发育强力的T细胞:CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197和CD38。在一些实施例中,已经用一种或多种PI3K抑制剂处理的包括T细胞的细胞群体富集共表达以下生物标志物中的一种或多种或全部的CD8+T细胞群体:CD62L、CD127、CD197和CD38。

[0475] 在一些实施例中,制备包括维持的增殖水平和减少的分化的经修饰的T细胞。在一些实施例中,通过在存在一种或多种刺激信号和作为PI3K细胞信号传导途径的抑制剂的药剂的情况下刺激T细胞激活和增殖来制备T细胞。

[0476] 为了实现足够治疗剂量的T细胞组合物,通常对T细胞进行一轮或多轮刺激、激活和/或扩增。通常可以使用例如以下中所述的方法对T细胞进行激活和扩增:美国专利第6,352,694号;第6,534,055号;第6,905,680号;第6,692,964号;第5,858,358号;第6,887,466号;第6,905,681号;第7,144,575号;第7,067,318号;第7,172,869号;第7,232,566号;第7,175,843号;第5,883,223号;第6,905,874号;第6,797,514号;和第6,867,041号,所述美国专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0477] 然后可以修饰T细胞以表达抗MUC16 CAR。在一些实施例中,通过用包括本文所设想的抗MUC16 CAR的病毒载体转导T细胞来修饰T细胞。在一些实施例中,在存在PI3K细胞信号传导途径的抑制剂的情况下,在刺激和激活之前修饰T细胞。在一些实施例中,在存在PI3K细胞信号传导途径的抑制剂的情况下,在刺激和激活之后修饰T细胞。在一些实施例中,在存在PI3K细胞信号传导途径的抑制剂的情况下,在刺激和激活的12小时、24小时、36小时或48小时内修饰T细胞。

[0478] 在T细胞激活之后,对细胞进行培养以增殖。T细胞可培养至少1、2、3、4、5、6或7天,至少2周、至少1、2、3、4、5或6个月或更长时间,伴随1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多轮扩增。

[0479] 在一些实施例中,T细胞组合物是在存在PI3K途径的一种或多种抑制剂的情况下制备的。抑制剂可以靶向此途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约束,考虑在制造工艺的刺激、激活和/或扩增期期间,治疗或使T细胞与PI3K途径的一种或多种抑制剂接触优先增加年轻T细胞,从而产生优异的治疗性T细胞组合物。

[0480] 在一些实施例中,提供了一种用于增加表达经工程化的T细胞受体的T细胞的增殖的方法。此类方法可以包括例如从受试者采集T细胞的来源,在存在PI3K途径的一种或多种抑制剂的情况下刺激和激活T细胞,修饰T细胞以表达抗MUC16 CAR,以及在培养物中扩增T细胞。

[0481] 在一些实施例中,通过与刺激CD3 TCR复合物相关联的信号的药剂和刺激T细胞的表面上的共刺激分子的配体接触来扩增经基因修饰的T细胞。

[0482] 在一些实施例中,使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂,如可溶性抗CD3和抗CD28抗体或附接到珠粒或其它表面的抗体在具有适当细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)的培养基中接触。

[0483] 在一些实施例中,使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂,如可溶性抗CD3和抗CD28抗体或附接到珠粒或其它表面的抗体在具有适当细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)和/或PI3K抑制剂的培养基中接触。

[0484] 在一些实施例中,一种用于产生富集以下生物标志物中的一种或多种的表达的T细胞群的方法:CD62L、CCR7、CD28、CD27、CD122、CD127、CD197和CD38。在一些实施例中,幼小T细胞包括以下生物标志物中的一种或多种或全部:CD62L、CD127、CD197和CD38。在一个实施例中,提供了CD57、CD244、CD160、PD-1、CTLA4、TIM3和LAG3的幼小T细胞缺乏表达。

[0485] 在一些实施例中,外周血单核细胞(PBMC)在本文所设想的T细胞制备方法中用作T细胞的来源。PBMC形成可为CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺的T淋巴细胞异源群并且可以包含其它单核细胞,诸如单核细胞、B细胞、NK细胞和NKT细胞。可以将包括编码本文所设想的经工程化的TCR或CAR的多核苷酸的表达载体引入到人供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。携带表达载体的成功转导的T细胞可以使用流式细胞术分选,以分离CD3阳性T细胞,并且接着除了使用抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和IL-2、IL-7和/或IL-15或如本文其它地方所述本领域已知的任何其它方法进行细胞激活之外,进一步增殖以增加经修饰的T细胞的数目。

[0486] 如本文所使用的,术语“PI3K抑制剂”是指结合到PI3K并抑制其至少一种活性的核酸、肽、化合物或小型有机分子。PI3K蛋白可以分为三类:1类PI3K、2类PI3K和3类PI3K。1类PI3K作为由四个p110催化亚基(p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ)之一和两个调控亚基家族之一组成的异二聚体存在。PI3K抑制剂优选靶向1类PI3K抑制剂。在一个实施例中,PI3K抑制剂对1类PI3K抑制剂的一种或多种同种型将显示出选择性(即,对p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 以及p110 α 、p110 β 、p110 δ 和p110 γ 中的一种或多种的选择性)。另一方面,PI3K抑制剂将不显示出同种型选择性并被认为是“泛PI3K抑制剂”。在一个实施例中,PI3K抑制剂将与ATP竞争结合到PI3K催化结构域。

[0487] 在一些实施例中,PI3K抑制剂可以例如靶向PI3K以及PI3K-AKT-mTOR途径中的另外的蛋白质。在一些实施例中,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。在一些实施例中,选择性PI3K抑制剂可以理解为指相对于PI3K表现出50%抑制浓度的药剂,所述抑制浓度为抑制剂相对于mTOR和/或途径中的其它蛋白质的IC₅₀的至多1/10、至多1/20、至多1/30、至多1/50、至多1/100、至多1/1000或甚至更低。

[0488] 在一些实施例中,示例性PI3K抑制剂以约200nM或更低,优选地约100nM或更低、甚至更优选地约60nM或更低、约25nM、约10nM、约5nM、约1nM、100 μ M、50 μ M、25 μ M、10 μ M、1 μ M或更低的IC₅₀(抑制50%活性的浓度)抑制PI3K。在一个实施例中,PI3K抑制剂以约2nM至约100nM、更优选地约2nM至约50nM、甚至更优选地约2nM至约15nM的IC₅₀抑制PI3K。

[0489] 适用于特定实施例中所涵盖的T细胞制备方法中的PI3K抑制剂的说明性实例包含但不限于BKM120(1类PI3K抑制剂,诺华公司(Novartis))、XL147(1类PI3K抑制剂,Exelixis公司(Exelixis))、(pan-PI3K抑制剂,葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline))和PX-866(1类PI3K抑制剂;p110 α 、p110 β 和p110 γ 同种型,Oncothyreon公司(Oncothyreon))。

[0490] 选择性PI3K抑制剂的其它说明性实例包含但不限于:BYL719、GSK2636771、TGX-221、AS25242、CAL-101、ZSTK474和IPI-145。泛PI3K抑制剂的另外的说明性实例包含但不限于:BEZ235、LY294002、GSK1059615、TG100713和GDC-0941。一些实施例,PI3K抑制剂是

ZSTK474。

[0491] 在一些实施例中,提供了一种用于增加表达经工程化的T细胞受体的T细胞的增殖的方法。此类方法可以包括例如从受试者中采集T细胞的来源,刺激和激活T细胞,修饰T细胞以表达CAR,以及使T细胞在培养物中扩增,其中T细胞是在存在一种或多种PI3K抑制剂的情况下在制备过程中的多个步骤中的任一个步骤中制备。

[0492] 本文所设想的制造方法可以进一步包括冷冻保存经修饰的T细胞以进行储存和/或制备以供在人类受试者中使用。将T细胞冷冻保存,使得细胞在解冻后保持活力。当需要时,可使冷冻保存的转化的免疫效应细胞解冻、生长和扩增更多此类细胞。如本文所使用的,“冷冻保存”是指通过冷却到零下温度来保存细胞,如(典型地)77K或-196°C(液氮的沸点)。冷冻保护剂通常在零下温度下用于防止细胞因在低温下冷冻或升温到室温而受损。冷冻保护剂和最佳冷却速率可以防止细胞损伤。可以使用的低温保护剂包含但不限于二甲亚砜(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,《纽约科学院年鉴》,1960;85:576)和聚乙二醇(Sloviter和Ravdin,《自然》,1962;196:48)。优选的冷却速率为1°C到3°C/分钟。在至少两小时之后,T细胞已经达到-80°C的温度并且可以直接置于液氮(-196°C)中以永久储存如在长期冷冻储存容器中。

[0493] J. 组合物和调配物

[0494] 在一些实施例中,本公开提供了包括一种或多种多肽、多核苷酸、包括所述多核苷酸的载体、基因修饰的免疫效应细胞等的组合物,如本文所设想的。组合物包含但不限于药物组合物。“药物组合物”是指用于单独地或与一种或多种其它治疗方式组合地施用于细胞或动物的在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中调配的组合物。还应理解,如果期望的话,本公开的组合物也可以与其它药剂,例如,细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药学活性剂组合施用。对还可以包含在组合物中的其它组分没有实际限制,条件是另外的药剂不会不利地影响组合物递送预期疗法的能力。

[0495] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在正确医学判断的范围内适合于与人和动物的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0496] 如本文所使用的,“药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂”包含但不限于任何已经被美国食品和药品管理局(United States Food and Drug Administration)批准为可用于人类或家畜的佐剂、载剂、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性药学上可接受的载剂包含但不限于:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸钠;黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡类、动植物油脂、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油以及大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇以及聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及在药物调配物中采用的任何其它相容性物质。

[0497] 在一些实施例中,组合物包括一定量的本文所设想的表达CAR的免疫效应细胞。如

本文所使用的,术语“量”是指实现有益或期望的预防或治疗结果(包含临床结果)的基因修饰的治疗细胞,例如,T细胞的“有效的量”或“有效量”。

[0498] “预防有效量”是指有效实现所需预防结果的经基因修饰的治疗细胞的量。通常,但不一定,因为预防剂量是在疾病之前或疾病早期用于受试者的,所以预防有效量小于治疗有效量。

[0499] 基因修饰的治疗细胞的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及干细胞和祖细胞在个体中引发期望的应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是其中治疗有益效果超过病毒或转导的治疗细胞的任何毒性或有害作用的量。术语“治疗有效量”包含有效地“治疗”受试者(例如,患者)的量。当指示治疗量时,待施用的本发明的组合物的精确量可以由内科医生考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染程度或转移程度以及患者(受试者)的病状的个体差异来确定。

[0500] 通常可以说,包括本文所描述的T细胞的药物组合物可以以 10^2 至 10^{10} 个细胞/kg体重,优选地 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重施用,包含那些范围内的所有整数值的剂量。细胞的数目将取决于组合物期望的最终用途,其中包含的细胞的类型也是如此。对于本文提供的用途,细胞的体积通常为一升或更少,可以为500mL或更少,甚至250mL或100mL或更少。因此,所期望细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/mL,并且通常大于 10^7 个细胞/mL,通常 10^8 个细胞/mL或更大。临床相关数目的免疫细胞可以分配到累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} 个细胞的多次输注中。在本发明的一些方面,特别是由于所有输注的细胞将被重新定向至特定靶抗原(例如, κ 或 λ 轻链),所以可以施用 10^6 /千克(每患者 10^6 - 10^{11})范围内的较低数目的细胞。表达CAR的细胞组合物可以以在这些范围内的剂量多次施用。对于进行治疗的患者,细胞可以是同种异体的、同基因的、异种的或自体的。如果期望,治疗还可以包含施用如本文所描述的有丝分裂原(例如,PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如,IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)以增强对免疫应答的诱导。

[0501] 通常,包括如本文所描述的激活和扩增的细胞的组合物可以用于治疗和预防免疫受损的个体出现的疾病。具体地,包括本文所设想的经CAR修饰的T细胞的组合物用于治疗表达MUC16的癌症。本发明的经CAR修饰的T细胞可以单独施用,或作为药物组合物与载剂、稀释剂、赋形剂和/或其它组分如IL-2或其它细胞因子或细胞群体组合施用。在一些实施例中,本文所设想的药物组合物包括与一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合的一定量的经基因修饰的T细胞。

[0502] 包括表达CAR的免疫效应细胞群体(如T细胞)的本发明的药物组合物可以包括:缓冲剂,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);以及防腐剂。在一些实施例中,组合物被调配成用于肠胃外施用,例如,血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用。

[0503] 液体药物组合物,无论是溶液、悬浮液还是其它类似形式,均可以包含以下中的一种或多种:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、如可以用作溶剂或悬浮培养基的合成甘油单酯或甘油二酯等固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;如抗坏血酸或亚硫酸氢钠等抗氧化

剂;如乙二胺四乙酸等螯合剂;如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐等缓冲剂,以及如氯化钠或右旋糖等用于调节张力的药剂。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0504] 在一些实施例中,在药学上可接受的细胞培养基中调配本文所设想的T细胞组合物。这类组合物适合于向人类受试者施用。在一些实施例中,药学上可接受的细胞培养基是无血清培养基。

[0505] 无血清培养基相比于含有血清的培养基具有若干优点,包含组合物得到简化且得到更好定义、污染物程度得到减小、可能的传染剂来源得到消除以及成本降低。在一些实施例中,无血清培养基是无动物的并且可以任选地是无蛋白质的。任选地,培养基可以含有生物药学上可接受的重组蛋白。“无动物”培养基是指其中组合物源自非动物来源的培养基。重组蛋白替代无动物培养基中的天然动物蛋白质,并且营养物从合成的、植物或微生物来源获得。相比之下,“无蛋白质”培养基被定义为基本上不含蛋白质。

[0506] 特定组合物中使用的无血清培养基的说明性实例包含但不限于QBSF-60(质量生物有限公司(Quality Biological, Inc.))、StemPro-34(生命技术公司(Life Technologies))和X-VIVO 10。

[0507] 在一些实施例中,包括本文所设想的免疫效应细胞的组合物在包括PlasmaLyte A的溶液中调配。

[0508] 在一些实施例中,包括本文所设想的免疫效应细胞的组合物在包括低温保存培养基的溶液中调配。例如,可以使用具有低温保存药剂的低温保存培养基以在解冻后保持高细胞存活率结果。特定组合物中使用的低温保存培养基的说明性实例包含但不限于CryoStor CS10、CryoStor CS5和CryoStor CS2。

[0509] 在一些实施例中,包括本文所设想的免疫效应细胞的组合物在包括50:50PlasmaLyte A:CryoStor CS10的溶液中调配。

[0510] K. 试剂盒

[0511] 在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括表达抗MUC16 CAR或其药学组合物的免疫效应细胞群体。在一些实施例中,试剂盒包括用于向有需要的受试者施用免疫效应细胞群体或其药物组合物的说明书。在一些实施例中,有需要的受试者具有表达MUC16的癌细胞。

[0512] 在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括表达抗MUC16 CAR或其药学组合物的免疫效应细胞群体,以及用于向有需要的受试者施用所述细胞或组合物的说明书,所述受试者已接受或正在接受免疫检查点抑制剂。在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括表达抗MUC16 CAR或其药学组合物的免疫效应细胞群体,以及用于向有需要的受试者施用所述细胞或组合物的说明书,所述受试者已接受或正在接受纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗或西米普利单抗。

[0513] 在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括表达抗MUC16 CAR或其药学组合物的免疫效应细胞群体,以及用于向有需要的受试者施用所述细胞或组合物的说明书,所述受试者已接受或正在接受包括对肿瘤相关抗原具有特异性的第一结合结构域和对CD3具有特异性的第二结合结构域的双特异性抗体。在一些实施例中,本公开提供了一种试剂盒,其包括表达抗MUC16 CAR或其药学组合物的免疫效应细胞群体,以及用于向有需要的受

试者施用所述细胞或组合物的说明书,所述受试者已接受或正在接受包括对肿瘤相关抗原具有特异性的第一结合结构域和对CD28具有特异性的第二结合结构域的双特异性抗体。

[0514] L. 治疗方法

[0515] 表达本文所设想的CAR的经基因修饰的免疫效应细胞提供了用于在预防、治疗和改善癌症中使用或用于预防、治疗或改善与癌症相关的至少一种症状的过继性免疫疗法的经改进的方法。

[0516] 在一些实施例中,本文所设想的经基因修饰的免疫效应细胞提供了用于在增加受试者的癌细胞中的细胞毒性中使用,或用于在减少受试者的癌细胞的数量中使用的过继性免疫疗法的经改进的方法。

[0517] 在一些实施例中,通过用本文所设想的抗MUC16 CAR对初级免疫效应细胞进行基因修饰,将初级免疫效应细胞的特异性重定向至表达特定抗原(例如,MUC16)的细胞。在一些实施例中,使用病毒载体以对具有编码抗MUC16 CAR的特定多核苷酸的免疫效应细胞进行基因修饰。

[0518] 在一些实施例中,提供了一种类型的细胞疗法,其中T细胞被基因修饰以表达靶向表达MUC16的癌细胞的抗MUC16 CAR,并且将T细胞输注到有需要的受体。输注的细胞能够杀死在受体中引起疾病的细胞。与抗体疗法不同,T细胞疗法能够在体内复制,导致可以导致持续癌症治疗的长期持久性。

[0519] 在一些实施例中,表达抗MUC16 CAR的T细胞经历强大的体内T细胞扩增,并且可以持续延长的时间量。在一些实施例中,表达抗MUC16 CAR的T细胞演变成特异性记忆T细胞或干细胞记忆T细胞,所述细胞可以被再激活以抑制任何另外的肿瘤形成或生长。

[0520] 在特定实施例中设想了可以使用表达抗MUC16 CAR的免疫效应细胞治疗、预防或改善的病状的说明性实例。在一些实施例中,本公开提供了用于治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用表达抗MUC16CAR的免疫效应细胞或包括所述免疫效应细胞的组合物。在一些实施例中,所述癌症选自:卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌、输卵管癌、乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、间皮瘤、肝内胆管癌-质量形成类型、子宫颈腺癌和胃肠道腺癌。

[0521] 在一些实施例中,提供了包括以下的方法:向有需要的患者单独或与一种或多种治疗剂组合施用治疗有效量的表达抗MUC16 CAR的免疫效应细胞或包括所述免疫效应细胞的组合物。在一些实施例中,所述细胞用于治疗有风险患上与癌细胞相关的病状的患者。因此,在特定实施例中,用于治疗或预防或改善癌症的至少一种症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的表达抗MUC16 CAR的经修饰的T细胞。

[0522] 如本文所使用的,术语“个体”和“受试者”通常可互换使用并且指代表现出可以用本文其它地方设想的基因疗法载体、基于细胞的治疗和方法治疗的疾病、病症或病状的症状的任何动物。在一些实施例中,受试者包含表现出与可以用基因疗法载体、基于细胞的治疗剂和本文其它地方涵盖的方法治疗的癌症相关的疾病、病症或病状的症状的任何动物。适合的受试者(例如,患者)包含实验用动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(如猫或狗)。包含非人灵长类和优选地人类患者。典型的受试者包含患有、已经被诊断为患有或有风险患有癌症的人类患者。

[0523] 如本文所使用的,术语“患者”是指已经诊断为患有可以用基因治疗载体、基于细

胞的治疗剂和本文其它地方公开的方法治疗的特定疾病、病症或症状的受试者。

[0524] 如本文所使用的,“治疗(treatment或treating)”包含对疾病或病理状况的症状或病理的任何有益的或期望的效果并且甚至可以包含正在治疗的疾病或病状的一个或多个可测量标志物的最低限度的减少。治疗可以涉及任选地减少疾病或病状或者延迟疾病或病状的进展。“治疗”不一定指示完全根除或治愈疾病或病状或其相关症状。

[0525] 如本文所使用的,“预防(prevent)”和如“预防(prevented/preventing)”等类似词语指示用于预防、抑制或减少疾病或病状发生或复发的可能性。预防还是指延迟疾病或病状的发作或复发或者延迟疾病或病状的症状的发生或复发。如本文所使用的,“预防(prevention)”和类似词语还包含在疾病或病状发作或复发之前减少疾病或病状的强度、效果、症状和/或负担。

[0526] 如本文所使用的,短语“减轻...的至少一种症状”是指减少正在治疗的受试者的疾病或病状的一种或多种症状。一些实施例,被治疗的疾病或病状是癌症,其中所减轻的所述一种或多种症状包含但不限于虚弱、疲劳、呼吸短促、容易挫伤和出血、频繁感染、淋巴结肿大、腹部肿胀或疼痛(由于腹部器官肿大)、骨骼或关节疼痛、骨折、意外体重减轻、食欲不振、盗汗、持续性轻度发烧以及排尿减少(由于肾功能受损)。

[0527] “增强”或“促进”或者“增加”或“扩增”通常是指相比于由媒剂或对照分子/组合物引起的响应,本文所设想的组合物,例如,表达抗MUC16CAR的经基因修饰的T细胞能够产生、引发或引起更大的生理响应(即,下游效应)。可测量的生理应答可以包含T细胞扩增、激活、持续性的增加和/或癌细胞杀伤能力的增加以及从本领域的理解和本文中的描述中显而易见的其它方面。“增加的”或“增强的”量通常是“统计上显著”的量,并且可以包含1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含所有整数以及其之间且超过1的小数点,例如,1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)于由媒剂或对照组合物产生的响应的增加。

[0528] “减小”或“减弱”或“变少”或“减少”或“减轻”通常是指与由媒剂或对照分子/组合物引起的应答相比,本文所设想的组合物能够产生、引发或引起更少的生理应答(即,下游效应)。“减小的”或“减少的”量通常是“统计上显著”的量,并且可以包含1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含所有整数以及其之间且超过1的小数点,例如,1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍等)于由媒剂、对照组合物产生的响应(参考响应)或特定细胞谱系中的应答的减少。

[0529] “维持(maintain或maintenance)”或“保持”或“无变化”或“无实质变化”或“无实质减小”通常是指与由媒剂、对照分子/组合物引起的应答或特定细胞谱系中的应答相比,本文所设想的组合物能够在细胞中产生、引发或引起类似的生理应答(即,下游效应)。相当的应答是与参考应答没有显著差异或可测量的差异的应答。

[0530] 在一些实施例中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括施用有效量,例如治疗有效量的包括本文所设想的经基因修饰的免疫效应细胞的组合物。施用的数量和频率将由如患者的病状以及患者疾病的类型和严重性等因素确定,尽管适当的剂量可以通过临床试验确定。

[0531] 在一些实施例中,向受试者施用的组合物中的免疫效应细胞(例如,表达抗MUC16 CAR的T细胞)的量为至少 0.1×10^5 个细胞、至少 0.5×10^5 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 $5 \times$

10⁵个细胞、至少1x 10⁶个细胞、至少0.5x 10⁷个细胞、至少1x 10⁷个细胞、至少0.5x 10⁸个细胞、至少1x 10⁸个细胞、至少0.5x 10⁹个细胞、至少1x 10⁹个细胞、至少2x 10⁹个细胞、至少3x 10⁹个细胞、至少4x 10⁹个细胞、至少5x 10⁹个细胞或至少1x 10¹⁰个细胞。

[0532] 在一些实施例中,向受试者施用约1x 10⁷个T细胞至约1x 10⁹个T细胞、约2x 10⁷个T细胞至约0.9x 10⁹个T细胞、约3x 10⁷个T细胞至约0.8x 10⁹个T细胞、约4x 10⁷个T细胞至约0.7x 10⁹个T细胞、约5x 10⁷个T细胞至约0.6x 10⁹个T细胞或约5x 10⁷个T细胞至约0.5x 10⁹个T细胞。

[0533] 在一些实施例中,向受试者施用的组合物中的免疫效应细胞(例如,表达抗MUC16 CAR的T细胞)的量为至少0.1x 10⁴个细胞/kg体重、至少0.5x 10⁴个细胞/kg体重、至少1x 10⁴个细胞/kg体重、至少5x 10⁴个细胞/kg体重、至少1x 10⁵个细胞/kg体重、至少0.5x 10⁶个细胞/kg体重、至少1x 10⁶个细胞/kg体重、至少0.5x 10⁷个细胞/kg体重、至少1x 10⁷个细胞/kg体重、至少0.5x 10⁸个细胞/kg体重、至少1x 10⁸个细胞/kg体重、至少2x 10⁸个细胞/kg体重、至少3x 10⁸个细胞/kg体重、至少4x 10⁸个细胞/kg体重、至少5x 10⁸个细胞/kg体重或至少1x 10⁹个细胞/kg体重。

[0534] 在一些实施例中,向受试者施用约1x 10⁶个T细胞/kg体重至约1x 10⁸个T细胞/kg体重、约2x 10⁶个T细胞/kg体重至约0.9x 10⁸个T细胞/kg体重、约3x 10⁶个T细胞/kg体重至约0.8x 10⁸个T细胞/kg体重、约4x 10⁶个T细胞/kg体重至约0.7x 10⁸个T细胞/kg体重、约5x 10⁶个T细胞/kg体重至约0.6x 10⁸个T细胞/kg体重或约5x 10⁶个T细胞/kg体重至约0.5x 10⁸个T细胞/kg体重。

[0535] 本领域的普通技术人员将认识到,可能需要多次施用本文所设想的组合物以实现期望疗法。例如,组合物可以在1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长的跨度内施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或更多次。

[0536] 在一些实施例中,可能希望向受试者施用激活的免疫效应细胞,并且随后重新抽血(或进行单采血液成分术)、从中激活免疫效应细胞并且向患者重新输注这些激活的和扩增的免疫效应细胞。可以每隔几周进行多次此过程。在一些实施例中,可以抽取10cc到400cc的血来激活免疫效应细胞。在一些实施例中,抽取20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc或400cc或更多量的血来激活免疫效应细胞。不受理论束缚,使用该多次抽血/多次重新输注方案可以用于选出某些免疫效应细胞群体。

[0537] 本文所设想的组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包含通过气溶胶吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。在一些实施例中,肠胃外施用组合物。如本文所使用的短语“肠胃外施用(parenteral administration和administered parenterally)”意指除了肠内施用和局部施用以外的通常通过注射进行的施用方式,并且包含但不限于:血管内、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、瘤内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内以及胸骨内注射和输注。在一些实施例中,本文所设想的组合物通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位向受试者施用。

[0538] 在一些实施例中,向有需要的受试者施用有效量的组合物以增加对受试者体内表达MUC16的细胞或肿瘤的细胞免疫应答。免疫应答可以包含由能够杀死感染细胞、调节性T

细胞和辅助T细胞应答的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫应答。还可以诱导主要由能够激活B细胞从而导致抗体产生的辅助T细胞介导的体液免疫应答。多种技术可以用于分析由组合物诱导的免疫应答的类型,所述技术在本领域中得到充分描述;例如,《当代免疫学方案》,编辑:John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober (2001) 约翰威立父子公司,纽约市,纽约州。

[0539] 在一些实施例中,提供了一种治疗被诊断为患有癌症的受试者的方法,所述方法包括从所述受试者体内取出免疫效应细胞,用包括编码抗MUC16CAR的核酸的载体对所述免疫效应细胞进行基因修饰,由此产生经修饰的免疫效应细胞群体,以及将所述经修饰的免疫效应细胞群体施用于所述同一受试者。在一些实施例中,免疫效应细胞包括T细胞。

[0540] 在一些实施例中,提供了用于刺激对受试者的靶细胞群体的免疫效应细胞介导的免疫调节剂应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用表达编码抗MUC16 CAR的核酸构建体的免疫效应细胞群体的步骤。

[0541] 在特定实施例中,用于施用所设想的细胞组合物的方法包含有效引起在受试者体内重新引入直接表达抗MUC16 CAR的离体经基因修饰的免疫效应细胞或对重新引入免疫效应细胞的经基因修饰的祖细胞有效的方法,所述免疫效应细胞在引入到受试者体内时分化为表达CAR的成熟免疫效应细胞。一种方法包括用本文所设想的核酸构建体离体转导外周血T细胞,并且将转导的细胞返回到受试者中。

[0542] 1. 组合治疗

[0543] 在一些实施例中,本文所设想的组合物包括例如与一种或多种治疗剂的组合疗法中的有效量的表达CAR的免疫效应细胞。如本文所使用的,“组合疗法”涵盖在方案中以将提供组合的有益效果的顺序方式施用每种药剂或疗法,以及以基本上同时的方式共施用这些药剂或疗法,如以具有固定比率的这些活性剂的单个胶囊或以每种药剂的多个单独的胶囊的形式。组合疗法还包含组合,其中可以在不同时间和/或通过不同途径施用单独的元素,但其组合作用以通过组合疗法的每种药剂或肿瘤治疗方法共同作用或药代动力学和药效学作用提供有益效果。

[0544] 因此,表达CAR的免疫效应细胞组合物可以与其它已知的癌症治疗,如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力疗法等组合施用。组合物还可以与抗生素组合施用。本领域可接受这种治疗剂作为如本文所描述的如特定癌症等特定疾病状态的标准治疗。所设想的示例性治疗剂包含细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化学治疗剂、放射治疗剂、治疗性抗体、溶瘤病毒或其它活性剂和辅助剂。

[0545] 在一些实施例中,包括本文所公开的表达CAR的免疫效应细胞的组合物可以与任何数量的化学治疗剂联合施用。化学治疗剂的说明性实例包含:烷基化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) (CYTOXANTM); 烷基磺酸盐,如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类,如苯佐多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)和脲多巴(uredopa); 亚乙基亚胺和甲基胺类(methylamelamines), 包含六甲蜜胺、三亚乙基密胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲密胺(trimethylolomelamine); 氮芥(nitrogen mustard), 如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸

甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosurea),如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、菌酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,如氨甲蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin)、氨甲蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨(ancitabine)、氮杂胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷、5-FU;雄激素类,如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,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(amsacrine);百垂布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**;丙亚胺(razoxane);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);瓜西托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如,紫杉醇(**TAXOL®**,新泽西州普林斯顿的百时美施贵宝肿瘤学公司(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.))和多西紫杉醇(**TAXOTERE®**,法国安东尼市的罗纳普朗克公司(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France));瘤可宁(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine);6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;丝

裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺维本(navelbine);诺安托(novantrone);替尼泊苷(teniposide);道诺霉素(daunomycin);氨蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);视黄酸衍生物,如TargretinTM(贝沙罗汀(bexarotene))、PanretinTM(阿利维A酸(alitretinoin));ONTAKTM(地尼白细胞介素-毒素连接物(denileukin diftitox));埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨(capecitabine);以及上述任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义还包含用于调控或抑制对癌症的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素包含例如它莫西芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基三苯氧胺、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛西芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(法乐通(Fareston));和抗雄激素类,如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);以及上述任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0546] 多种其它治疗剂可以与本文所述的组合物结合使用。在一些实施例中,包括表达CAR的免疫效应细胞的组合物与抗炎剂一起施用。抗炎剂或药物包含但不限于类固醇和糖皮质激素(包含倍他米松(betamethasone)、布地奈德(budesonide)、地塞米松(dexamethasone)、乙酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、氢化可的松(hydrocortisone)、氢化可的松、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、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)。

[0547] 其它示例性NSAID选自由以下组成的组:布洛芬、萘普生、萘普生钠(naproxen sodium)、如VIOXX®(罗非昔布(rofecoxib)) and CELEBREX®(塞来昔布(celecoxib))等Cox-2抑制剂以及唾液酸盐。示例性镇痛药选自由以下组成的组:对乙酰氨基酚(acetaminophen)、羟考酮(oxycodone)、盐酸丙氧芬的曲马多(tramadol of propoxyphene hydrochloride)。示例性糖皮质激素选自由以下组成的组:可的松(cortisone)、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙或泼尼松。示例性生物应答调节剂包含针对细胞表面标志物(例如,CD4、CD5等)的分子,细胞因子抑制剂如TNF拮抗剂(例如,依那西普(etanercept)(ENBREL®)、阿达木单抗(adalimumab)(HUMIRA®)和英夫利昔单抗(infliximab)(REMICADE®)、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答调节剂包含单克隆抗体以及重组形式的分子。示例性DMARD包含硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺(penicillamine)、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹(hydroxychloroquine)、金(口服(金诺芬(auranofin)) and 肌内)和米诺环素(minocycline)。

[0548] 适于与本文所设想的经CAR修饰的T细胞组合的治疗性抗体的说明性实例包含但不限于巴维昔单抗(bavituximab)、贝伐单抗(阿瓦斯汀(avastin))、莫比伐珠单抗(bivatuzumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、可那木单抗(conatumumab)、达雷木单抗(daratumumab)、杜利他单抗(duligotumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达洛珠单抗

(dalotuzumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab) (HuLuc63)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、因达单抗(indatuximab)、奥妥珠单抗(inotuzumab)、罗沃单抗(lorvotuzumab)、卢卡珠单抗(lucatumumab)、米拉珠单抗(milatumumab)、莫西姆单抗(moxetumomab)、奥卡鲁单抗(ocaratuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、西妥昔单抗(Siltuximab)、四丙珠单抗(teprotumumab)和乌布妥昔单抗(ublrituximab)。

[0549] 在一些实施例中,本文所描述的组合物与细胞因子结合施用。如本文所使用的“细胞因子”是指由一种细胞群释放的蛋白质的通用术语,所述蛋白质作为细胞间介质作用于另一种细胞。这种细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子以及传统的多肽激素。细胞因子中包含生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状旁腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和黄体产生素(LH);肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子 α 和肿瘤坏死因子 β ;副中肾管抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子I和胰岛素样生长因子II;促红细胞产生素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素 α 、干扰素 β 和干扰素 γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);以及粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL),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、IL-21,一种肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;以及其它包含LIF和试剂盒配体(KL)的多肽因子。在一个实施例中,术语细胞因子包含“掩蔽的”细胞因子,包含但不限于掩蔽的IL-2。如本文所使用的,术语细胞因子包含来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质以及天然序列细胞因子的生物活性等同物。

[0550] 在一些实施例中,本文所描述的组合物与免疫检查点抑制剂组合施用。

[0551] 如本文所使用的,“免疫检查点”是指调节抗原的T细胞受体识别的幅度和质量的共刺激和抑制信号。在一些实施例中,免疫检查点是抑制信号。在一些实施例中,抑制信号是PD-1与PD-L1之间的相互作用。在一些实施例中,抑制信号是CTLA-4与CD80或CD86之间取代CD28结合的相互作用。在一些实施例中,抑制信号是LAG3与MHC II类分子之间的相互作用。在一些实施例中,抑制信号是TIM3与半乳糖凝集素9之间的相互作用。在一些实施例中,抑制信号是OX40与OX40L之间的相互作用。

[0552] T细胞激活和效应功能通过被称为“免疫检查点”的共刺激和抑制信号平衡。调节T细胞效应功能的抑制性配体和受体在肿瘤细胞上过表达。随后,共刺激受体的激动剂或抑制信号的拮抗剂导致抗原特异性T细胞应答的扩增。与直接靶向肿瘤细胞的治疗性抗体相比,免疫检查点抑制剂增强内源性抗肿瘤活性。在某些实施例中,适用于本文所公开的方法的免疫检查点抑制剂是抑制信号的拮抗剂,例如,靶向例如PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3、B7-H3、B7-H4或TIM3的抗体。这些配体和受体综述于Pardoll, D.,《自然》.12:252-264,2012中。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂靶向选自以下组成的组的分子:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、GITR、ICOS、ICOSL、B7H3、B7H4、TIM3、LAG3、OX40、CD27、CD70、CD47和CD137。

[0553] 如本文所使用的,“免疫检查点抑制剂”是指完全或部分地减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂防止与免疫检查点相

关联的抑制信号。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是破坏与免疫检查点相关的抑制性信号传导的抗体或其片段。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是破坏抑制性信号传导的小分子。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是防止检查点阻断剂蛋白之间的相互作用的抗体、其片段或抗体模拟物,例如,防止PD-1与PD-L1之间的相互作用的抗体或其片段。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是防止CTLA-4与CD80或CD86之间的相互作用的抗体或其片段。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是防止LAG3与其配体或TIM-3与其配体之间的相互作用的抗体或其片段。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是防止OX40与其配体之间的相互作用的抗体或其片段。检查点阻断剂也可以呈分子(或其变体)本身的可溶性形式,例如,可溶性PD-L1或PD-L1融合体的形式。

[0554] 本文公开了用于治疗患有如癌症等疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用经基因修饰以表达抗MUC16 CAR的免疫效应细胞群体和免疫检查点抑制剂。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是破坏或抑制来自抑制性免疫调节剂的信号传导的抗体或其抗原结合部分。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是破坏或抑制来自抑制性免疫调节剂的信号传导的小分子。

[0555] 在一些实施例中,抑制性免疫调节剂(免疫检查点抑制剂)是PD-1/PD-L1信号传导途径的组分。因此,本公开的某些实施例提供了用于患有癌症的受试者的免疫疗法的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分破坏PD-1受体与其配体PD-L1之间的相互作用。与PD-1结合并破坏PD-1与其配体PD-L1之间的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的本领域已知的抗体适用于本文所公开的方法。在某些实施例中,抗体或其抗原结合部分与PD-1特异性结合。例如,靶向PD-1的抗体包含例如纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))、派姆单抗(拉姆单抗(lambrolizumab),MK03475,默克公司(Merck))和西米普利单抗(REGN-2810,再生元公司(Regeneron))。用于本文所公开的方法的其它合适的抗体是美国专利第8,008,449中公开的抗PD-1抗体,所述美国专利通过引用并入本文。在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分与PD-L1特异性结合并抑制其与PD-1的相互作用,由此增加免疫活性。与PD-L1结合并破坏PD-1与PD-L1之间的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的本领域已知的抗体适用于本文所公开的方法。例如,靶向PD-L1的抗体包含BMS-936559(百时美施贵宝公司)和MPDL3280A(基因泰克公司(Genentech))。靶向PD-L1的其它合适的抗体公开于美国专利第7,943,743号中。普通技术人员将理解,任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文所公开的方法。

[0556] 应当理解,靶向适用于本文所公开的方法中的免疫检查点的抗体不限于上文所描述的抗体。此外,本领域的普通技术人员将理解,其它免疫检查点靶标也可以由本文所描述的方法中的拮抗剂或抗体靶向,条件是所述靶向导致抗肿瘤免疫应答的刺激,如例如T细胞增殖的增加、T细胞激活的增强和/或细胞因子产生(例如,IFN- γ 、IL-2)的增加所反映的。

[0557] 在一些实施例中,本文所描述的组合物与对肿瘤相关抗原(TAA)和刺激分子有特异性的双特异性抗体组合施用。在一些实施例中,双特异性抗体对TAA和CD3具有特异性。在一些实施例中,双特异性抗体对TAA和CD28具有特异性。

[0558] 如本文所使用的,“肿瘤相关抗原”和“TAA”是指肿瘤特异性抗原(即,仅在癌细胞上发现的抗原)和相对于健康细胞在癌症或肿瘤细胞上升高时表达的抗原。肿瘤相关抗原

的非限制性实例包含AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、胱天蛋白酶-8、CCR5、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、周期蛋白-B1、CYP1B1、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1、GAGE-2)、GD2、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MART-1、ML-IAP、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PRLR、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活蛋白、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、尿溶蛋白-3、 α 叶酸受体(FR α)、 α v β 6整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3(CD276)、B7-H6、碳酸酐酶IX(CAIX)、CCR1、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD135(也被称为fmc样酪氨酸激酶3;FLT3)、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、Claudin-6(CLDN6)、C型凝集素样分子-1(CLL-1)、CD2子集1(CS-1)、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、皮肤T细胞淋巴瘤相关抗原1(CTAGE1)、表皮生长因子受体(EGFR)、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、上皮糖蛋白2(EGP2)、上皮糖蛋白40(EGP40)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、肝配蛋白A型受体2(EPHA2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、Fc受体样5(FCRL5)、胎儿乙酰胆碱酯酶受体(AchR)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、包含ErbB2的EGFR家族(HER2)、IL-11R α 、IL-13R α 2、 κ 、癌/睾丸抗原2(LAGE-1A)、 λ 、路易斯-Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2);黑色素瘤抗原基因(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGEA10、被T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1)、间皮素(MSLN)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1)、聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1)、黑色素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、滑膜肉瘤、X断点2(SSX2)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域的3(TIM-3)、肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248)、肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R)、滋养层糖蛋白(TPBG)、NKG2D配体、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和威尔姆斯瘤1(WT-1)。

[0559] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请和授权专利都通过引用并入本文中,其引用的程度如同特定且个别地指示每一个别出版物、专利申请或授权专利通过引用并入一般。

[0560] 虽然为了清楚理解的目的已经通过说明和举例的方式相当详细地描述了前述发明,但是根据本发明的教导,本领域普通技术人员将显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下可以对其进行一些变化和修改。提供以下实施例仅作为说明并且不具有限制性。本领域技术人员将容易认识到可以被改变或修改以产生本质上类似的结果的各种非关键参数。

[0561] 实例

[0562] 实例1

[0563] 抗MUC16嵌合抗原受体(CAR)的初始设计

[0564] 产生靶向MUC16的嵌合抗原受体(CAR),其具有scFv结合物,所述scFv结合物靶向在蛋白水解切割之后保留在细胞的表面上的MUC16的片段(参见MUC16片段SEQ ID NO:39)。图1是MUC16多肽的示意图,并且示出了切割后保留在细胞表面上的片段(“小块”)。具体地,CAR被设计为具有VH-VL(H-L)和VL-VH(L-H)取向两者的抗MUC16 scFv结合物、CD8 α 铰链、

CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域 (SEQ ID NO:1-12和41-150)。还设计了CAR BB4020和BB4021,其分别包括已知的MUC16结合物、41BB或CD28共刺激结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域。

[0565] 表3:

[0566]

抗MUC16 CAR	描述	滴度	粘合物Kd	表位箱
pBB4000	7135H-L;BBz	8.57×10^7	1.05×10^{-8}	1
pBB4001	7135L-H;BBz	1.03×10^7	1.05×10^{-8}	1
pBB4002	7138H-L;BBz	6.55×10^7	3.21×10^{-10}	2
pBB4003	7138L-H;BBz	4.54×10^7	3.21×10^{-10}	2
pBB4004	8755H-L;BBz	1.10×10^8	1.24×10^{-10}	3
pBB4005	8755L-H;BBz	2.38×10^8	1.24×10^{-10}	3
pBB4006	8767H-L;BBz	2.74×10^8	1.01×10^{-9}	1
pBB4007	8767L-H;BBz	7.17×10^7	1.01×10^{-9}	1
pBB4008	8794H-L;BBz	2.98×10^8	5.54×10^{-10}	3
pBB4009	8794L-H;BBz	4.62×10^5	5.54×10^{-10}	3
pBB4010	8799H-L;BBz	2.24×10^8	8.26×10^{-10}	2
pBB4011	8799L-H;BBz	1.06×10^8	8.26×10^{-10}	2
pBB4012	8804H-L;BBz	7.86×10^7	1.86×10^{-9}	1
pBB4013	8804L-H;BBz	1.32×10^7	1.86×10^{-9}	1
pBB4014	8808H-L;BBz	9.67×10^5	2.77×10^{-10}	4
pBB4015	8808L-H;BBz	4.23×10^7	2.77×10^{-10}	4
pBB4016	8810H-L;BBz	1.68×10^7	1.12×10^{-9}	2
pBB4017	8810L-H;BBz	2.55×10^7	1.12×10^{-9}	2
pBB4018	8813H-L;BBz	5.35×10^7	3.2×10^{-10}	5
pBB4019	8813L-H;BBz	3.46×10^7	3.2×10^{-10}	5
pBB4020	aMUC16 CAR;BBz	7.42×10^7		
pBB4021	aMUC16 CAR;CD28z	6.14×10^7		

[0567] 实例2

[0568] 抗MUC16 CAR体外特性的评估

[0569] 将十种抗体scFv以轻-重、重-轻取向转化为CAR,以得到20个抗MUC16CAR构建体(表4)。将每个构建体通过慢病毒载体(LVV)转导到源自健康供体的T细胞中,并且筛选载体拷贝数(VCN)(图2)、CAR表达(图3)和抗原依赖性和独立活性(图4A-4D)。通过CAR-T细胞与抗原阳性(OVCAR3)或阴性(Jurkat,PANC-1)肿瘤细胞的共培养物中释放的IFN γ 评估抗原依赖性活性,而通过仅T细胞培养物中释放的IFN γ 评估抗原非依赖性活性。评估载体拷贝数(VCN)以评估LVV的转导效率。在筛选的20个CAR中,将6个构建体降低优先级:3个构建体最小转导的T细胞(图2:BB4009、BB4013、BB4014);并且在转导良好(即,VCN>1)的构建体中,3种CAR-T产物表现出低(<30%)的CAR表达(图3:BB4002、BB4003、BB4016)。在剩余的14个CAR中,BB4010由于相对较高的抗原非依赖性IFN γ 释放而被降低优先级(图4A)。在剩余的13个CAR中,8个表现出抗原依赖性活性,因为这些CAR在与OVCAR3(图4B)细胞而非Jurkat

(图4C)或PANC-1细胞(图4D)共培养时释放IFN γ 。从这8个CAR中,基于其mAb亲和力、结合表位和抗原依赖性反应性的范围、>30% CAR表达、很少或没有抗原依赖性反应性以及>1VCN,选择BB4000、BB4011和BB4015用于另外的体外和体内表征。

[0570] 实例3

[0571] 抗MUC16 CAR对MUC16表达的敏感性

[0572] 评估BB4000、BB4011和BB4015对六种抗原阴性肿瘤细胞的药理学敏感性(图5: Jurkat、PANC-1、HUH7、K562、A549和RD),以证明抗原特异性。根据从CAR T或对照未经转导的T细胞(UTD)与每个抗原阴性肿瘤细胞系的共培养物(比率为1:1)收集的上清液测量IFN γ 释放,持续24小时。BB4015在所评估的CAR的所有供体中表现出最低的紧张性活性。

[0573] 接下来,通过释放到共培养物中的IFN γ ,针对稳定表达高、中等或低水平的MUC16胞外结构域(图6A)的经工程化的RD肿瘤细胞评估BB4000、BB4011和BB4015的抗原依赖性活性。将CAR T细胞或UTD T细胞(来自三个供体)与表达MUC16的RD肿瘤细胞以1:1的比率共培养24小时。BB4000实现最高的IFN γ 释放,随后是BB4015和BB4011。在所有抗原阳性条件下均观察到可滴定的抗原依赖性应答(图6B)。

[0574] 通过释放到CAR T细胞或对照UTD T细胞与表达滴定量的MUC16抗原的K562肿瘤细胞的共培养物中的IFN γ 进一步评估抗原依赖性活性。将编码MUC16的胞外结构域的mRNA (SEQ ID NO:39)电穿孔到0.156 μ g至2.5 μ g mRNA范围内的K562肿瘤细胞中(图7A)。将来自三个健康供体的CAR T细胞和UTD T细胞以1:1的比例与经转染的K562共培养24小时。K562显示出针对经电穿孔的肿瘤细胞条件的可滴定的IFN γ 释放(图7B)。BB4000、BB4011和BB4015均以剂量依赖性方式表现出抗原依赖性IFN γ 释放。

[0575] 最后,通过肿瘤细胞杀伤的百分比(%)评估BB4000、BB4011和BB4015的抗原依赖性细胞毒性。将来自三个健康供体的CAR T细胞或UTD T细胞和上述经工程化的RD肿瘤细胞在阻抗分析仪上以10:1、5:1和2.5:1的效应子与T细胞(E:T)比率共培养72小时。当与RD培养基或高抗原阳性肿瘤细胞一起培养时,BB4015、BB4000和BB4011 CAR跨所有E:T比率表现出>70%的细胞毒性(图8A)。当与RD低抗原阳性肿瘤细胞一起以2.5:1的E:T比率培养时,BB4011和BB4015表现出<60%的细胞毒性,而BB4000表现出>60%的细胞毒性(图8B)。BB4000、BB4011和BB4015均以剂量依赖性方式表现出抗原依赖性细胞毒性。

[0576] 实例4

[0577] 抗MUC16 CAR T细胞分化的评估

[0578] 通过流式细胞术表征BB4000、BB4011和BB4015 CAR T细胞的表型标志物。标志物包含CD3、CD4、CD8、CD62L和CD45RA。BB4000产生平均45% CD4⁺T细胞和平均36.4% CD8⁺T细胞;BB4011,47.1% CD4⁺T细胞和38% CD8⁺T细胞;BB4015,60.9% CD4⁺T细胞和29% CD8⁺T细胞。当与UTD对照相比时,BB4015表现出CD62L和CD45RA的表达增加,这指向具有更大体内持久性潜力的更大原初样表型,而BB4000和BB4011两者都具有减少的CD62L表达(图9)。

[0579] 实例5

[0580] 抗MUC16 CAR与MUC16胞外结构域的结合

[0581] 使用抗CD3和抗CD28抗体激活从人血液中提取的外周血单核细胞(PBMC)。然后用慢病毒载体转导来自PBMC的激活的细胞,所述慢病毒载体包括编码抗MUC16 CAR构建体

BB4015的多核苷酸(参见SEQ ID NO:11和12)。UTD细胞用作对照条件。在存在IL2的情况下,将经转导的细胞和UTD细胞在T细胞生长培养基中扩增10天。

[0582] 在扩增后,将经抗MUC16 CAR转导的细胞在96孔板中培养,所述板涂覆有浓度范围为1.54ng/ml至1125ng/ml的MUC16-小块胞外结构域抗原(SEQ ID NO:39)或浓度范围为1.37U/ml至10,000U/ml的CA125(缺乏小块胞外结构域抗原的人MUC16多肽;SEQ ID NO:40)蛋白。抗MUC16 CAR T细胞释放与MUC16小块胞外结构域浓度成比例的增加水平的IFN γ (图10A),而CA125蛋白未引起抗MUC16 CAR T细胞的任何功能应答(图10B)。UTD对照未表现出对MUC16小块或CA125的任何功能应答。这说明了抗MUC16 CAR对MUC16胞外结构域在脱落的CA125部分之上的特异性。

[0583] 实例6

[0584] 抗MUC16 CAR T细胞的抗肿瘤活性

[0585] 采集健康人PBMC,并使用抗CD3和抗CD28抗体进行激活。然后用慢病毒载体转导细胞,所述慢病毒载体包括编码抗MUC16 CAR BB4015构建体的多核苷酸(参见SEQ ID NO:11和12)。UTD细胞用作对照条件。在存在IL2的情况下,将经转导的细胞和UTD细胞在T细胞生长培养基中扩增10天。

[0586] 将UTD或抗MUC16 CAR T细胞与表达MUC16抗原的OVCAR3肿瘤细胞以1:1的比率共培养。在共培养后24小时,采集上清液,并使用Luminex分析IFN γ 浓度。与UTD对照条件相比,抗MUC16 CAR T证实了MUC16抗原特异性IFN γ 释放(数据未示出)。

[0587] 向体内雌性NSG小鼠腹膜内接种 20×10^6 个表达荧光素酶的OVCAR3.FP细胞。大约14天后,当肿瘤平均肿瘤负荷为 1.5×10^8 光子/秒时,向小鼠注射媒剂、 20×10^6 个UTD或 20×10^6 个抗MUC16 CAR T细胞。在CAR T细胞注射后约第5天,在注射了抗MUC16 CAR T细胞的动物中观察到OVCAR3.FP肿瘤对照(图11)。n=5的抗MUC16 CAR T组表示为每组中每只动物的单个数据点。在抗MUC16 CAR T注射后28天,将n=5组的小鼠通过OVCAR3.FP肿瘤注射再激发,并且用OVCAR3.FP肿瘤细胞对NSG小鼠的对照原初组再次注射。在再激发后观察到肿瘤排斥。图11显示了用于n=5只小鼠的媒剂、UTD和OVCAR3.FP组,表示为每组的平均发光通量。

[0588] 实例7

[0589] OVCAR3模型中抗MUC16 CAR T细胞的抗肿瘤活性

[0590] 在接种有标记有萤火虫荧光素酶的OVCAR3肿瘤细胞的雌性NSG小鼠中进行体内研究,从而允许通过体内成像系统(IVIS[®]; PerkinElmer[®])监测肿瘤负荷。将 20×10^6 个肿瘤细胞注射到雌性小鼠的腹膜内空间中,并进行监测直到达到用于进行CAR T注射的适当肿瘤体积。通过尾静脉IV注射总体积为0.4mL的BB4000、BB4011、BB4017和BB4015 T细胞。在整个研究过程中监测小鼠的T细胞功效。当在体内进行头对头(head-to-head)测试时,BB4015显示出比BB4011(图12A)、BB4000(图12B)和BB4017(图12C)更快且更持久的响应。

[0591] 接下来,如上文所描述的采用OVCAR3.FP IP肿瘤模型。在第0天,用 20×10^6 、 10×10^6 或 3×10^6 个CAR+细胞/小鼠的BB4015和BB4000、UTD细胞或RPMI媒剂(对照)的单次IV注射对动物进行处理。单独的媒剂和UTD对照细胞对肿瘤负荷没有影响。当在大约第6天时,在所有剂量下,BB4015与BB4000相比显示出优越的剂量依赖性抗肿瘤效力,其中最高剂量为 20×10^6 个CAR+细胞/小鼠消除的肿瘤(图13A-13C)。总之,这些结果表明,BB4015以比其它构建

体更大的剂量依赖性抗肿瘤效力控制OVCAR3.FP肿瘤生长。

[0592] 表4:序列表

[0593]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	抗 MUC16 8808 CDRL1	QSLSSNY
2	抗 MUC16 8808 CDRL2	GIS
3	抗 MUC16 8808 CDRL3	QQYGSSPWT
4	抗 MUC16 8808 CDRH1	GFTFSNYG
5	抗 MUC16 8808 CDRH2	ISDDGSFK
6	抗 MUC16 8808 CDRH3	AKWQHNWNDGGFDY
7	抗 MUC16 8808 可变轻链	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAP RLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIK
8	抗 MUC16 8808 可变重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGL EWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVED SAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGTLLTVSS
9	pBB4015 CAR 氨基酸序列, 无	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAP RLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ

[0594]

	信号肽	QYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSF KFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHN WNDGGFDYWGQGT LVTVSSTTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
10	pBB4015 CAR 核酸序列, 无信 号肽	GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGATACCCTTTCCCTTTCCCCA GGCGAGCGCGCCACACTGTCTTG CAGGGCGTCACAGAGCCTGAGC AGCAACTATCTCGCGTGGTATAGACAGAAACCAGGGCAAGCCCCA CGGCTGCTGATCTATGGAATTAGCTCACGGGCAACAGGAATCCCC GACAGATT CAGTGGGTCTGGGAGCGGAACGGATTTTACCCTGACA ATTAGTAGATTGGAACCGGAAGACTTCGCTGTGTACTATTGCCAG CAGTACGGCTCATCCCCGTGGACCTTCGGACAAGGCACTAAGGTA GAGATCAAAGGTGGAGGGGGCTCAGGGGGAGGCGGAAGCGGAGGC GGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTTGAGTCTGGAGGCGGAGTCGTT CAGCCAGGTAGGAGCCTCCGACTCTCCTGCGTCGCAAGTGGGTTT ACGTTTTCCAATTACGGGATTCACTGGGTCCGACAGGCCCCCGGG AAGGGGCTCGAGTGGGTGGCCGTTATTAGCGATGACGGGTCTTTC AAGTTCTATGCCGATTCAGTCAAAGGTAGATT CACAATTTCAAGG GATAATAGTAAAAATACACTGTACTTGCAAA TGA ACTCTCTGCGC GTCGAGGATTCAGCCGTGTACCATTGCGCGAAATGGCAGCACAAAT TGGAATGACGGCGGATTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTTGTA ACTGTGTCAAGCACCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCACACCC GCTCCA ACTATAGCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGACCTGAAGCT TGCAGGCCCCGAGCAGGAGGCGCCGTCCATACGCGAGGCCTGGAC TTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCCCCCTTTGGCCGGAACATGT GGGGTGTGCTTCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGTAAGCGC GGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGA CCTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATGGGTGTT CATGCCGCTTC CCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGTGAAATTTTCT AGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTC TACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTG GACAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGATGGGGGGAAGCCCCGG AGAAAAATCCTCAGGAGGGGTGTACAATGAGCTGCAGAAGGAC AAGATGGCTGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAAGGCGAAAGA CGCAGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTACA GCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGCCA CCCCGC
11	pBB4015 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCR ASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPWTFGQGTKVEIKGGGSG GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHW VRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGT LVTVSSTTTTPA PRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR

[0595]

		EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGEERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
12	pBB4015 CAR 核酸序列, 具有 信号肽	ATGGCCCTGCCGGTTACCGCTCTCTTGCTGCCCCTGGCGCTGCTT CTGCACGCGGCAAGACCCGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGAT ACCCTTTCCCTTTCCCCAGGCGAGCGGCCACACTGTCTTGACAGG GCGTCACAGAGCCTGAGCAGCAACTATCTCGCGTGGTATAGACAG AAACCAGGGCAAGCCCCACGGCTGCTGATCTATGGAATTAGCTCA CGGGCAACAGGAATCCCCGACAGATTCACTGGGTCTGGGAGCGGA ACGGATTTTACCCTGACAATTAGTAGATTGGAACCGGAAGACTTC GCTGTGTACTATTGCCAGCAGTACGGCTCATCCCCGTGGACCTTC GGACAAGGCACTAAGGTAGAGATCAAAGGTGGAGGGGGCTCAGGG GGAGGCGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTTGAG TCTGGAGGCGGAGTCGTTTACGTTTCCAATTACGGGATTCACTGG GTCCGACAGGCCCCCGGAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCCGTTATT AGCGATGACGGGTCTTTCAAGTTCTATGCCGATTCAGTCAAAGGT AGATTCACAATTTCAAGGATAATAGTAAAAATACACTGTACTTG CAAAATGAACTCTCTGCGCGTCGAGGATTCAGCCGTGTACCATTGC GCGAAATGGCAGCACAATTGGAATGACGGCGGATTGATTATTGG GGCCAGGGCACACTTGTAAGTGTGTCAAGCACCACAACACCTGCT CCAAGGCCCCCACACCCGCTCCAATAAGCCAGCCAACCATTTG AGCCTCAGACCTGAAGCTTGCAGGCGCCGAGCAGGAGGCGCCGTC CATACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCC CCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGTGCTTCTCTCCCTTGTGATC ACTCTGTATTGTAAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTC AAGCAGCCTTTTATGCGACCTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGAT GGGTGTTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAA CTGAGGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAG CAGGGTCAGAATCAGCTCTACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCGA GAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGGGCAGGGATCCCCGAG ATGGGGGGAAAGCCCCGAGAAAAAATCCTCAGGAGGGGTGTAC AATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCCTATAGCGAGATC GGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTG TACCAGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGACACTTATGATGCGTTG CATATGCAAGCCTTGCCACCCCGC
13	人 MUC16 氨基 酸序列	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTST GAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRRTQSLGVMSSALPEST SRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSPPRTRTSS TEGNFTKEASTYTLTVETTS GPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPW DTRYIPVKITSPMKT FADSTASKENAPVSMTPAETTVTDSHTPGR TNPSFGTLYSSFLDLSPKGT PNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEP GSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSIFSGQSLTSPLSPGV EARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQT AETILTFHAF AETMDIPSTHIAKTLASEWL GSPGTLGGTST SALT TTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESE MTATLVPTLGF TTTLD SKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQSS STAAHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQWVETS PSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVS GFTTLKTSSTKGIWLEET SADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSSTRGSQGTTHLLTRA TASSETSADLT LATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMV

[0596]

SSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKI
 STSIPLLSSASVLEDKVSATSTFSHHKATSSITTGTPEISTKTKP
 SSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLS
 TSAETTDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSTP
 STHLFTSGEETEETSNPVSQPETSVSRVRTLASTSVPTPVFPT
 MDTWPTRSAQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSA LPKISHLTGT
 ATMSQTNRDTFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSAT
 SLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTINGPGSMAV
 ASTNIPIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSM
 SVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGT
 SSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSST
 FSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKS
 TLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSE
 SPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSP
 EMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTT
 ENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTSPATKAWTITDTEHSTQ
 LHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSSTLELTSDVPG
 EPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISSPSSPMST
 FAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLGRTG
 DLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPTHVTQSLKDQT
 SIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTDTLSREIET
 GPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMA
 LERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTE
 GVTDDSSKGSSPRLNTQGNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSP
 TTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSSATLMSTAL
 GSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSL
 DLSHGVHTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGN
 STHTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLT
 LPFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTI
 EQSTQPLHAVSSEKVSQQTQSTPYVNSVAVSASPTHENSVS SSS
 TSSPYSSASLES LDSTISRNAITSWLWDLTSLPTTTWPSTSL
 EALSSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGPQN
 TAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLT
 SESTANPSLGTASSAGTKLRTISLPTSESLVSFRMNKDPWTVSI
 PLGSHPTTNTETSI PVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTV
 SFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDW
 MSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFTETST
 VSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDV
 TKTASISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSV
 SSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTF
 STMVSTD TASGENPTSSNSVVT SVPAPGTWTSVGSTTDL PAMGFL
 KTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLLTT
 SESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDTTLT SK
 ILVTDTILFSTVSTPPSKFPSTGTL SGASFPTLLPDTPAIPLTAT
 EPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTTLTMSETSNGDALVLK
 TVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSIT
 VALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSETTALVDSSAGLERASVMPLTT
 GSQGMASGGIRSGSTHSTGKTFFSSLPLTMNPGEVTAMSEITTN
 RL TATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLT TAP
 PTWGIPQSTLT FEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDS DASTA
 SSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSM

[0597]

AGHEPRVPTSGTGDPYASESMSYPDPSKASSAMTSTSLASKLTT
 LFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLGPS
 MARQPNILVHLQTSALTLSPTSTLNMSQEEPPELTSSQTIABEEG
 TTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISV
 PAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGT
 SPGSPERMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMET
 TVEPVTLQSTALGSGSTSIHSLPTGTTSPTKSPTEMLATERVSL
 SPSPPAEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQ
 SSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDVPTS
 PNSVSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD
 EAYSSTSSWSDQTSBGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTSLVSLP
 SGDQGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIA
 PTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPISSTITTMGTNSISTTTP
 NPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEPSTWSSTAASDSWTVTDMTSN
 LKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTP
 SSDASAVKTETSTERTLSPTDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDI
 LSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPNTPLSLFLDLSLST
 LDWDGTGRSLSSATATTSAPQGATTPQELTLETMISPATSQLPFSI
 GHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTSAP
 GQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQGTALTTEARATSDSWN
 EKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRTLNLTDLINLE
 SGTTSPPSWKSSPYERIAPESTTDKEAIHPSTNTVETTGWVTSS
 EHASHSTIPAHSASSKLTSPVVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRA
 RTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRT
 ITSSKRISSSFLAQSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAM
 QTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSK
 GPEDTSQPPSPVEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSS
 TPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALS
 TYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPL
 VTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASS
 ATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNT
 FTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMP
 YLTETPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPPSS
 LTPFLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTS
 MEPVTNSPQNLNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTA
 SSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMPVPASSMGDALASISIPGSETTD
 IEGETSSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATK
 MEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLNSPPMTISTHMTT
 TQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITAMN
 NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWHSTS
 SPVSMSSVLTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTS
 AATTDIETTHPSINTVVTVNGTTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTS
 NVTTSTMEDTTISRSIPKSSKTTTETETTTSSLTPKLRETSISQE
 ITSSSTETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSSTSPFGPDQSTVSL
 DISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSN
 TTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTSPPSVDKTSSP
 SSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSPMTSLLTSGLVKITDILRT
 RLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNVKA
 NNSGHESHSPALADSETPKATTQMVIITTVGDPAPSTSMPVHGSS
 ETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTIT
 EVSSTGVNSSSKIISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSA

[0598]

EMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSQGGTHSTVTQGFPYSEV
 TTLMGMPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPVSSTSP
 QSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDLVLTTSPESTSSPNNLSSITH
 ERPATYKDTAHTEAAMHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSE
 TSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLR
 ESSTSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAIQTASRTEISSRSTSISDL
 RPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGIL
 PWDSTSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV
 EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVLVT
 TTNVLGTTSPPEVTSSPNNLSSPTQERLTTYKDTAHTeamHASM
 TNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSV
 STSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSE
 VPTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSMSPYISTETITRLSTF
 PFVTGSTEMAITNQGTGPIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQ
 RFPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSPVPLPAITSHS
 SLYSAVSGSSPTSALPVTSLLTSGRRKTIIDMLDTHSELVTSLLPS
 ASSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTTNSMKHLHSSVS
 IHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLT
 PELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTTYDPTF
 MPASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTIAQTGPGSVT
 SLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKT
 SPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVP
 TPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLNTLATSEATTDTHMHPsin
 TAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSGDSIVST
 SMPRSSAMKKIESETTFLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDKA
 FTAATTEVSRTELTSSSRTSIQGTKEPTMSPDTSTRSVTMLSTFA
 GLTKSEERTIAQTGPHRATSQGTLTWDTSIITTSQAGTHSAMTHG
 FSQDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSP
 VPTTLPESRPSPVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVASLPPNLGSTS
 HKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSE
 PPKVTSPMVTsfNIRDIVSTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHGLK
 GTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTSIPGPD
 HSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGSTSQGT
 FTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMttVMNKDPEILSWTIPPS
 IEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSSTLPKTIHTTSPMSTLLTPSLV
 MTTDTLGTSPPTTSSPNNLSSTSHIILTTDEDTTAIEAMHPSTS
 TAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVST
 SMSVSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTISIVLSEV
 PTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTMLFASP
 TMTESAEMTIPTQTGPGSGTSQDTLTLDSTTKSQAKTHSTLTQR
 FPHSEMttLMSRGPDMQSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPP
 ISSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMMLHTSPELVTSPPKL
 SHTSDERLTGKDTTNTAETHVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSAL
 ADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETsRIQKESISSLS
 PKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIgATTEISRTVETSSSRTS
 ISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGS
 TSESTFTLDSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPR
 PSSLPVEETSPSSQLSLSAMISPPVSSTLPASSHSSASVTSL
 LTPGQVKTTTEVLDAEAEPETSSPPSLSSTSVAILATSEVTTDTEK
 IHFFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG
 DTSVSTLTPLALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEAN

[0599]

TVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMGPEQSTMSQDISIGTIP
 RISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWVETH
 SIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWPSPFVKETSPSSPLSLPA
 VTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGT
 SSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHTAHPSTNTGGTNVATTSSGYK
 SQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLT
 PGLRESSGSEGTSSGTMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPA
 QSTISPDISTRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGTS
 TLDTSSTTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLMRRGPEDVSWMSPPLL
 EKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPESISSSPLPVTSLLTSGLA
 KTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVEILATSEVTTDTEKTHPSSN
 RTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMVITSTMEDTSVST
 STPGFFETSRIQTEPTSSLTGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGV
 PTGATAEVSRTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSS
 IMTESAEMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQR
 FSHSEMTTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSP
 VSSTLVEDFPSASLPVTSLLNPLVITTDRMGISREPGTSSTSNL
 SSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVL
 SDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLT
 SGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTS
 MSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGAT
 SEGTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSHSEMTTLMSTRPGDVPWP
 SLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLT
 LGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIH
 PSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNT
 SVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLS
 GMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIST
 PLTTTGSAMTITPKTGHSAGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAAT
 HRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSVLVLSAVTSP
 SPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSP
 SMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSS
 YPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTL
 TPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRG
 PSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTITTQTGSPGATS
 RGTLLDSTTTFMGTHSTASQGFHSQMTALMSRTPGDVPWLSH
 PSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLT
 GLVKTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATEVTTDTEKLEM
 TNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTP
 AFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTG
 ATTEVSRTEAISSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRK
 ESTDMAITPKTGPGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPQ
 SVVTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPSSSLVSSSVTSPSPLYS
 TPGSSHSSPVVPTSLFTSMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNIT
 SDESLAASKATTETEAIHV FENTAASHVETTSATEELYSSSPGFS
 EPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPLGL
 RETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPG
 PAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQGTGYSLATSQV
 TLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMNTLMRGPESLSWTSPRF
 VETTRSSSSLTSLPLTTSLSPVSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGL
 VKTTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSVETPATSEIMTDTEKIHPS
 NTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVDDTTVF

[0600]

TSNPAFSETRRIPTPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYG
 VPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIIITEVITRLSSS
 SMMSESTQMTITTTQKSSPGATAQSTLTTLATTTAPLARHSTVPPR
 FLHSEM TTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPPSV
 SSTLPQSIPSSSFVSPTSLLTPGMVKTTDTSTEGTSLSPNLSGTS
 VEILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSE
 PSKATYPVGTTPSSMAETSISTSMANFETTGFEEPFSLTSGFR
 KTNMSLDTSSVTPTNTPTSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWP
 PASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFTMSVTESTH
 HLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPF
 SRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTIPALHE
 ITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSP
 ILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEA
 AHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTTA
 LKTTSRATLTTSVYTPTLGTTLPLNASMQMASTIPTEMMITPYV
 FPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVRS
 GAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHS
 ELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDALTPLVTISGTDST
 TFPRTLKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPRTIPNFSHHESDATP
 SIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDNRMTIPTL
 TLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSAPITSTISPAVSRVTSMTVSL
 AAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTSIFFHS
 KSDTTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEVPVGVTPVLTSSRAVIS
 TTIPILTSLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVVT
 SLVTSSRAVTSTTIPIILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTV
 LPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGA
 EASSTVPTVSPEVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETT
 PSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPI
 LTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSR
 AVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQ
 GLVTSLVTSSGSETSAFSLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVV
 PTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFHSSELDTMPST
 VTSPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPES
 PHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTTPSIATSPGA
 EATSDFTITVSPDVPMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTLSSGEPE
 TTTSFITYSEHTTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTF
 PTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSHKSDTTLPV
 AITSPGPEASSAVSTTTISPDMSDLVTSLVPSSGTDSTTFPTLS
 ETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSP
 GVDTRSGVPTTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGE
 PETTASSATHPGTQTGFTVPVIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTP
 VSRTTSSFSHSPDATPVMATSPRTEASSAVLTISPAGAPEMVTS
 QITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTESTKTFPAST
 VFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSRVDL
 SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLAT
 SSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPS
 VTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTTILRT
 TMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLAS
 ESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTFSPGISTS
 SIPSSAATVPMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERE
 LQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRP

[0601]

DPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRS
 SMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTAGPLLMFPTLNFTITN
 LQYEEEMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLT
 LLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIE
 ELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL
 SSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVL
 QGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHL
 PKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTS
 VPTSSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNL
 KYEEDMHRPGSRKFNTTERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTL
 LRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKE
 LGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPS
 PTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSL
 GPMFKNTSVGPLYSGCRLTLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP
 GVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNT
 STPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEE
 DMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLRPE
 KNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPY
 TLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTT
 AVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPL
 FKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLD
 REQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTP
 WTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTGTPLLVPFTLNFTITNLQYEEENMG
 HPGSRKFNTESVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLRPEKD
 VATRVDAICTHRPDKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTL
 RDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGP
 VLLPFTLNFTITNLQYEEEMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKN
 TSVSSLYSGCRLTLRPEKDGAATRVDAVCTHRPDKSPGLDRER
 LYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTS
 TMHLATSRTPASLSGPMASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPG
 SRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLRPPKDGAA
 KVDAICTYRPDKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDS
 LYVNGFTQRSSVPTTIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLL
 LFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSV
 GPLYSGCRLTLRPEKDGATGVDAICTHHDPKSPRLDREQLYW
 ELSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVY
 LGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKF
 NTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGEATGVDA
 ICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVN
 GFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQPGSLKF
 ITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVLL
 CTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQTHGITRLGPYSLDKDSLYLNG
 YNEPGPDEPPTTPKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISN
 LQYSPDMGKSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYLGCLIS
 LRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQ
 LGFYVLDRLSLFINGYAPQNLIRGEYQINFHIVNWNLSNPDP
 SEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQLDHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVK
 ALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESS
 VYQPTSSSSTQHLYLNFTITNLPSYQDKAQPGTTNYQRNKRNI
 EDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLCNFSPLAR
 RVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLT

[0602]

		GNSDLPFWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTTRRRKKEGEYNVQ QQCPGYYSQSHLDLEDLQ
14	接头	DGGGS
15	接头	TGEKP
16	接头	GGRR
17	接头	(GGGS) _n ; 其中 n = 1、2、3、4 或 5
18	接头	EGKSSSGSGSESKVD
19	接头	KESGSVSSEQLAQFRSLD
20	接头	GGRRGGGS
21	接头	LRQDGERP
22	接头	LRQKGGGGERP
23	接头	LRQK(GGS) ₂ ERP
24	接头	GGGSGGGSGGGGS
25	接头	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
26	2A 切割位点	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
27	2A 切割位点	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
28	2A 切割位点	LLKLAGDVESNPGP
29	2A 切割位点	NFDLLKLAGDVESNPGP
30	2A 切割位点	QLNFDLLKLAGDVESNPGP
31	2A 切割位点	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
32	2A 切割位点	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
33	2A 切割位点	LNFDLLKLAGDVESNPGP
34	2A 切割位点	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
35	2A 切割位点	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
36	切割位点	EXXYXQ(G/S)
37	切割位点	ENLYFQG
38	切割位点	ENLYFQS
39	具有 myc-myc-his 标签的人 MUC16 胞外结 构域	PGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGE ATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDR DSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQP GSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAE TRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQQTGHGITRLGPYSLDKD SLYLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFLLPPLSEATTAMGYHLKTLTL NFTISNLQYSPDMGKSATFNSTEGVLQHLRPLFQKSSMGPFYL GCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSOL THGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLS

[0603]

		NPDPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQQLHDTFRFCLVTNLTMD VLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWHLGSTYQLVDIHV TEMESSVYQPTSSSSSTQHLYNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRN KRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYS PN RNEPLTGNSDLPEQKLI SEEDLGGEQKLI SEEDLHHHHHH
40	缺乏小块的 MUC16 多肽 (CA125)	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTST GAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRRTQSLGVMSSALPEST SRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSSPRTRTSS TEGNFTKEASTYTLTVETTS GPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPW DTRYIPVKITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPAETTVDSTHTPGR TNPSFGTLYSSFLDLSPKGT PNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEP GSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSI FSGQSLTSPLSPGVP EARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQT AETILTFHAFETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTGGTSTSTALT TTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGESE MTATLVPTLGFTTLD SKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQSS STAAHGSSDILRATTSSSTKASSWTSESTAQQFSEPQHTQWVETS PSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVGFTTLKTSSTKGIWLEET SADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSSTRGSQGTTHLLTRA TASSETSADLT LATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMV SSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKI STSIPLLSSASVLEDKVSATSTFHHKATSSITGTPEISTKTKP SSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLS TSAETTDSPNIHPTGTLTSESESESPSTLSLPSVSGVKTTFSSTP STHLFTSGEETEETSNPSVSQPETS VSRVRTLASTSVPTPVFPT MDTWPTRSAQFSSSHLVSEL RATSSSTSVTNSTGSALPKISHLTGT ATMSQTNRDTFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSAT SLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETNGPGSMAV ASTNIPIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSM SVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGT SSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWL GILSSSPSSPTPKVTMSST FSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKS TLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSE SPSTIKLTMAVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSP EMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTT ENHPKTESATPAAYSGSPKISSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQ LHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSP TIGSSTLELTSDVPG EPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDL DISSPSSPMST FAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLGRTG DLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPTHVTQSLKDQT SIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTD TLSREIET GPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMA LERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTE GVTDSKSGSSPRLNTQGNTALSSSLEPSYAEQSMSTSIPLTSSP TTPDVEFIGGSTFWTKVTTVM TSDISKSSARTESSSATLMSTAL GSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSL DLSHGVHTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGN STHTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLT LPFSSIPVEEVISTGITS GPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTI EQSTQPLHAVSSEKVSQQTQSTPYVNSVAVSASP THENSVSSGSS

[0604]

TSSPYSSASLESLDSTISRRAITSWLWDLTTSPLPTTWPSTSLSEALSSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGPQNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLTSESTANPSLGTASSAGTKLRTISLPTSESLVSFRMNKDPWTVSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTVSFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFTETSTVSLDNETTVKTSIDILDARKTNELPSDSSSSSDILNTSIASSTMDVTKTASISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFSTMVSTD TASGENPTSSNSVVTSPVAPGTWTSVGSTTDL PAMGFLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLLTTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDDTTLTSKILVTDITILFSTVSTPPSKFPSTGTLGASFPDLLPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTMSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSSENSETTALVDSSAGLERASVMPLTTGSQGMASGGIRSGSTHSTGKTFSSLPLTMNPGEVTAMSEITTNRLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTAPPTWGIPQSTLTTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTASSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYPDPKASSAMTSTSLASKLTLFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLGPMARQPNILVHLQTSALTLSPTSTLNMSQEEPPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISVPAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSIHSLPTGTTSPTKSP TENMLATERVSLSPSPPEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQOSSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTPNSVSSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD EAYSSSTSSWSDQTSBGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTSLVSLPSGDQGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIAPTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPISTTITTMGTNSISTTTPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEHPSTWSSTAASDSWTVDMTSNLKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTPSSDASAVKTETSTSERTLSPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPNTPLSLFLFDSLSTLDWDTGRSLSSATATTSAPQGATTPOELTLETMISPATSQLPFSIGHITS AVTPAAMARSSGVTF SRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTSAHPGQVPRSAATTL DVI PHTAKTPDATFQRQGQTALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRLNTLDINLESGTTSSPSWKSSPYERIPSESTTDKEAHPSTNTVETTGWVTSS EHASHSTIPAHSASSKLTSPPVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRARTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAMQTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASS

[0605]

ATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSNT
 FTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQTGPTGAATQGPYLLDSTMP
 YLTETPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPPS
 LTPFLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTS
 MEPVTNSPQNLNNSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTA
 SSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTD
 IEGETSSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATK
 MEVPSFDFATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTT
 TQTGSSGATSKIPLALDSTLETSAAGTSPVVTGEGFAHSKITAMN
 NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPPQWHSTS
 SPVSMSSVLTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTS
 AATTDIETHPSINTVVTVNGTTSASFESHSTVSAYPEPSKVTS
 NVTTSTMEDTTISRIPKSSKTRTETETSSSLTPKLRETSISQE
 ITSSSTETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSSTSPFGPDQSTVSL
 DISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDFTMDPSN
 TTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTSPPSVDKTSSP
 SSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSPMTSLLTSGLVKITDILRT
 RLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNVKA
 NNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGDPAPSTSPMPVHGSS
 ETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTIT
 EVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSA
 EMTITTQASPPESASHSTLPLDSTTTLSSQGGTHSTVTQGFYSEV
 TTLMGMPGNVSWMTTPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPVSSTSP
 QSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDLVLTSPESVTSSPPNLSSITH
 ERPATYKDTAHTAAMHSTNTAVTVNGTSGSGHKSQSSVLADSE
 TSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLR
 ESSTSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSRSTSISDL
 RPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTPGATSQGIL
 PWDSTTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV
 EETSSGFSLMSPMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVLVT
 TTNVLGTTSPPEVTTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAHTAAMHSMH
 TNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSV
 STSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSE
 VPTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSMSPYISTETITRLSTF
 PFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQ
 RFPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHS
 SLYSAVSGSSPTSALPVTSLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLP
 ASSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTNSMHKLHSSVS
 IHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSP
 PELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTTYDPTF
 MPASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTATQTGPGSVT
 SLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKT
 SPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVP
 TPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLNTLATSEATDTHTMHPSIN
 TAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSGDSIVST
 SMPRSSAMKKIESETTFLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDKA
 FTAATTEVSRTELTSSTRTSIQGEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFA
 GLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTLTWDTSITTSQAGTHSAMTHG
 FSQDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLSLPAITSPSP
 VPTTLPESRPSPVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVASLPPNLGSTS
 HKIPTTSEDIKDTEKMPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSE

[0606]

PPKVTSPMVTSTFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHGLK
 GTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTTEVASSRRTSIPGPD
 HSTESPDISTEVIPLSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGSTSQGT
 FTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDPEILSWTIPPS
 IEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSSTLPKTIHTTTPSPMTSLLTPSLV
 MTTDTLGTSPPEPTTSSPPNLSSTSHIELTTDEDTTAIEAMHPSTS
 TAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVST
 SMSVSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEV
 PTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTMLFASP
 TMTESAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLTLDSTTKSQAKTHSTLTQR
 FPHSEM TTLMSRGPDMQSSPSPLENPSSLPSSLSPATTSPPP
 ISSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMHTSPELVTSSPPKL
 SHTSDERLTTGKDTTNTAEVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSAL
 ADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISSLS
 PKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSI GATTEISRTEVTSSSRTS
 ISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGS
 TSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPR
 PSSLPVEETSPSSQLSLSAMISPPSVSSTLPASSHSSASVTS
 LTPGQVKTTEVLDAEAPETSSPPSLSSSTSV EILATSEVTTDTEK
 IHPFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG
 DTSVSTLTPLALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEAN
 TVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMGPEQSTMSQDISIGTIP
 RISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWVETH
 SIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWPSPPFVKETSPSSPLSLPA
 VTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGT
 SSSSSSLTTSSHERLTTYKDTAHTAEVHPSTNTGGTNVATTSSGYK
 SQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASST
 PGLRESSGSEGTSSGTMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPA
 QSTISPDISTRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGT
 TLDTSSTTSLTMTHSTISQGFHSQMSTLMRRGPEDVSWMSPPLL
 EKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPESISSSPLPVTSLLTSGLA
 KTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSV EILATSEVTTDTEKTHPSSN
 RTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMVTSTMEDTSVST
 STPGFFETSRIQTEPTSSLTGLRKTSSSEGTS LATEMSTVLSGV
 PTGATAEVSRTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSS
 IMTESAEMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQR
 FSHSEM TTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSP
 VSSTLVEDFPSASLPVTSLLNPLVITTD RMGISREPGTSSTSNL
 SSTSSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVL
 SDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLT
 SGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVP SGATTEVSRTEVISSRGTS
 MSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGAT
 SEGTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSHSEM TTLMSRTPGDVPWP
 SLPSVEEASSVSSSLSPAMTSTSFSTLPESISSSPHPVTALLT
 LGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIH
 PSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNT
 SVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLS
 GMPTGATTKVSRTREALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIST
 PLTTTGAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAAT
 HRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSVLVLSAVTSP
 SPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSP

[0607]

SMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSS
 YPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTL
 TPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRG
 PSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTITTQTGSPGATS
 RGTLTLDSTTTFMSGTHSTASQGFSSQMTALMSRTPGDVPWLSH
 PSVEEASSASFSLSPPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLLTS
 GLVKTTTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSAEILAITEVTTDTEKLEM
 TNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTP
 AFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTG
 ATTEVSRTEAIISSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRK
 ESTDMAITPKTGPSGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPPQ
 SVVTTMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSSPSSSLVSSSSVTSPPSLYS
 TPSGSSHSSPPVPTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNIT
 SDESLAASKATTETEAIHVFFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFS
 EPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPLGL
 RETRTSQDITSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPG
 PAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQV
 TLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMNLMSRGPESLSWTSPRF
 VETTRSSSSSLTSLPLTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGL
 VKTTEVLDTSSSEPKTSSSPNLSSTSVETIPATSEIMTDTEKIHPPSS
 NTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSADVDDTTVF
 TSNPAFSETTRIPTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSADVLYG
 VPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSS
 SMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTTLATTTAPLARTHSTVPPR
 FLHSEMTTLMRSRPENPSWKSSLFVEKTSSSSSSLLSLPVTTSPPSV
 SSTLPQSIPSSSFVSSTLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTS
 VEILAASEVTTDTEKIHPPSSMAVTNVGTTSSSGHELYSSSVSIHSE
 PSKATYPVGTTPSSMAETSISTSMANFETTGFEAEFPFSLTSGFR
 KTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWP
 PASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFTMSVTESTH
 HLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPF
 SRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTIPALHE
 ITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRSTSSP
 ILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEA
 AHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTTA
 LKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQMASTIPTEMMITTPYV
 FPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVRS
 GAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHS
 ELDTVSSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDALTPLVTISGTDST
 TFPRTLKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPRTIPNFSSHESDATP
 SIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDNRNMTIPTL
 TLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSAPITSTISPAVSRVLTSMVTS
 AAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTISFFHS
 KSDTTPSMTTSHGAESSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSSRAVIS
 TTIPILTSLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPPTVSPGVPGVVT
 SLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTV
 LPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGA
 EASSTVPTVSPEVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETT
 PSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIP
 LTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSR
 AVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQ

[0608]

GLVTSLVTSSSGSETSAFNSLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVV
 PTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPST
 VTSPEAESSSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPES
 PHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTTPSIATSPGA
 EATSDFPITITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTLSSGEPE
 TTTSFITYSEHTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTF
 PTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSSHKSDDTLTPV
 AITSPGPEASSAVSTTTISPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTFPTLS
 ETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTS
 GVDTRSGVPPTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTSPGE
 PETTASSATHPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTP
 VSRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTS
 QITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTESTKTFPAST
 VFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSTRVDL
 SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLAT
 SSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPS
 VTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPKTSHGEGVSPTTILRT
 TMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLAS
 ESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTFSPGISTS
 SIPSSAATVPFMPVFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERE
 LQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRP
 DPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRS
 SMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTAGPLLMFTLNFTITN
 LQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLT
 LLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIE
 ELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL
 SSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVL
 QGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHL
 PKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTS
 VPTSSSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNL
 KYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTL
 LRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKE
 LGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPS
 PTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSL
 GPMFKNTSVGPLYSGCRLTLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP
 GVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNT
 STPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEE
 DMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLRPE
 KNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPY
 TLDNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTT
 AVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPL
 FKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLD
 REQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTP
 WTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTGPLLVFTLNFTITNLQYEENMG
 HPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLRPEKD
 VATRVDAICTHRPDKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTL
 RDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGP
 VLLPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKN
 TSVSSLYSGCRLTLRPEKDGAATRVDAVCTHRPDKSPGLDRER
 LYWKLSQLTHGITELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTS
 TMHLATSRTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPG

[0609]

		SRKFNTTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAAT KVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDS LYVNGFTQRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLL LFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTTERVLQGLLRSLFKSTSV GPLYSGCRLTLLRPEKDGATGVDAICTHHDPKSPRLDREQLYW ELSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVY LGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMW
41	抗 MUC16 7135 CDRL1	QSISSY
42	抗 MUC16 7135 CDRL2	AAS
43	抗 MUC16 7135 CDRL3	QQSYSTPPIT
44	抗 MUC16 7135 CDRH1	GFTFSYHE
45	抗 MUC16 7135 CDRH2	IGSRGTTK
46	抗 MUC16 7135 CDRH3	ASEVGSILGYSDMV
47	抗 MUC16 7135 可变轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIK
48	抗 MUC16 7135 可变重链	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGL EWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCASEVGSILGYSDMVWGQGTITVTVSS
49	pBB4000 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGL EWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCASEVGSILGYSDMVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
50	pBB4000 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFT ISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSDMVWGQ TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA FLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFEEEEGGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI

[0610]

		GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
51	pBB4001 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVS YIGSRGTT KHYADPVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGS ILGYSMDVWGQGT TVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
52	pBB4001 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNW VRQAPGKGLEWVS YIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPGEGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
53	抗 MUC16 7138 CDRL1	QSISSY
54	抗 MUC16 7138 CDRL2	AAS
55	抗 MUC16 7138 CDRL3	QQSYSTPPIT
56	抗 MUC16 7138 CDRH1	GYTFTSSD
57	抗 MUC16 7138 CDRH2	MNPNYGYT
58	抗 MUC16 7138 CDRH3	ARVTYCSSVTSCFRPFTY
59	抗 MUC16 7138 可变轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIK
60	抗 MUC16 7138 可变重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQATGQGL EWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSED TAVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGT LVTVSA
61	pBB4002 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQATGQGL EWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSED TAVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGT LVTVSAAGGGSGGGGS GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK

[0611]

		GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
62	pBB4002 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNGYTGSARKFQDRV MTRNTSLSTAYLELHSLRSEDYAVYYCARVTCSSVTSCFRPFTY WGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
63	pBB4003 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCASGYTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNGY TGSARKFQDRVMTMTRNTSLSTAYLELHSLRSEDYAVYYCARVTC SSVTSCFRPFTYWGQGTLVTVSATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
64	pBB4003 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSG GGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSSDINW VRQATGQGLEWVGWMNPNGYTGSARKFQDRVMTMTRNTSLSTAYL ELHSLRSEDYAVYYCARVTCSSVTSCFRPFTYWGQGTLVTVSAT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
65	抗 MUC16 8755 CDRL1	QSINIY
66	抗 MUC16 8755 CDRL2	AAS
67	抗 MUC16 8755 CDRL3	QHSYSTPPIT
68	抗 MUC16	GFTFNDYA

[0612]

	8755 CDRH1	
69	抗 MUC16 8755 CDRH2	IDWNGGSI
70	抗 MUC16 8755 CDRH3	AKDIGHWNYIGGMDV
71	抗 MUC16 8755 可变轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPK FLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQH SYSTPPITFGQGTRLEIK
72	抗 MUC16 8755 可变重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGL EWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVED TALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQGTITVTVSS
73	pBB4004 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGL EWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVED TALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKA PKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYC QHSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGK RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
74	pBB4004 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAA SGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFT ISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDRRGRDPGEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
75	pBB4005 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPK FLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQH SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGS IDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGH WNYIGGMDVWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGK RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
76	pBB4005 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSELPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSGG

[0613]

		GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHW VRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYL QMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQGTTVTVSSTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
77	抗 MUC16 8767 CDRL1	QSISTY
78	抗 MUC16 8767 CDRL2	TAS
79	抗 MUC16 8767 CDRL3	QQSYSTPPIT
80	抗 MUC16 8767 CDRH1	GFTFSNYY
81	抗 MUC16 8767 CDRH2	ISGRGSTI
82	抗 MUC16 8767 CDRH3	VKDRGGYSPY
83	抗 MUC16 8767 可变轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPK LLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIK
84	抗 MUC16 8767 可变重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL EWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNKNSLFLQMNSLRAED TAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTTLTVSS
85	pBB4006 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGL EWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNKNSLFLQMNSLRAED TAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLI YTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR
86	pBB4006 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRIT ISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTTLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD

[0614]

		VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHGDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
87	pBB4007 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPK LLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGST IFYADSVKGRITISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGG YSPYWGQGTLLTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR
88	pBB4007 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCR ASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGSG GGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNAKNSLFL QMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTLLTVSSTTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHGDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
89	抗 MUC16 8794 CDRL1	QSINSY
90	抗 MUC16 8794 CDRL2	AAS
91	抗 MUC16 8794 CDRL3	QQSYSSPPIT
92	抗 MUC16 8794 CDRH1	GFTFRDYS
93	抗 MUC16 8794 CDRH2	VTFFNSAI
94	抗 MUC16 8794 CDRH3	AREREPIVGGFDY
95	抗 MUC16 8794 可变轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQ SYSSPPITFGQGTRLEIK
96	抗 MUC16 8794 可变重链	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGL EWVSIVTFFNSAIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGTLLTVSS
97	pBB4008 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGL EWVSIVTFFNSAIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGS

[0615]

		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITISLQPEDFATFYCQQ SYSSPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR
98	pBB4008 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSIVTFFNSAIYYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGGQT LVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR
99	pBB4009 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITISLQPEDFATFYCQQ SYSSPPITFGQGTRLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSIVTFFNSA IYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPI VGGFDYWGGQTLVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR
100	pBB4009 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPDQMTQSPSSLSASVGDRVITITCR ASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGT DFTLTITISLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKGGGSG GGGSGGGGSGVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSW IRQAPGKGLEWVSIVTFFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGGQTLVTVSSTTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR
101	抗 MUC16 8799 CDRL1	QSITSSY
102	抗 MUC16 8799 CDRL2	GAS
103	抗 MUC16 8799 CDRL3	QQYGSSPWT

[0616]

104	抗 MUC16 8799 CDRH1	GFAFGDHT
105	抗 MUC16 8799 CDRH2	IRSRAYGGTT
106	抗 MUC16 8799 CDRH3	TSGGYDSSLHYYYYYH
107	抗 MUC16 8799 可变轻链	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIK
108	抗 MUC16 8799 可变重链	EVQLVESGGGLEQPGRSRLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGL EWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKT EDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHGMVDVWGRGTTVTVSS
109	pBB4010 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EVQLVESGGGLEQPGRSRLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGL EWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKT EDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHGMVDVWGRGTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITSSYLAW YQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
110	pBB4010 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLEQPGRSRLRLSCTA SGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGR FTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYH GMVDVWGRGTTVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSP GERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
111	pBB4011 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLE QPGRSRLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYG GTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGG YDSSLHYYYYYHGMVDVWGRGTTVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
112	pBB4011 CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCR

[0617]

	氨基酸序列, 具有信号肽	ASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLEQPGRLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIKRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHGMVDVWGRGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
113	抗 MUC16 8804 CDRL1	QTVSSSY
114	抗 MUC16 8804 CDRL2	GAS
115	抗 MUC16 8804 CDRL3	QQYGSSPWT
116	抗 MUC16 8804 CDRH1	GLTFGDYG
117	抗 MUC16 8804 CDRH2	IRSKGYGGTT
118	抗 MUC16 8804 CDRH3	TSGGYDSSVHYYYYYY
119	抗 MUC16 8804 可变轻链	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
120	抗 MUC16 8804 可变重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGTLFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIKRSKYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTITVTVSS
121	pBB4012 CAR 氨基酸序列, 无信号肽	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGTLFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIKRSKYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
122	pBB4012 CAR 氨基酸序列, 具有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGTLFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIKRSKYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKV

[0618]

		EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
123	pBB4013 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSWVRQAPGKGLEWVGFIIRSKGYG GTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGG YDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
124	pBB4013 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCR ASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPWTFGQGTKVEIKGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMS WVRQAPGKGLEWVGFIIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKST AYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTIT VTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
125	pBB4014 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGL EWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVED SAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQA PRLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QYQSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
126	pBB4014 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVA SGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQ GTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSC RASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQSSPWTFGQGTKVEIKTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR

[0619]

		EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
127	抗 MUC16 8810 CDRL1	QSVSNRY
128	抗 MUC16 8810 CDRL2	GAS
129	抗 MUC16 8810 CDRL3	HQYGSSPWT
130	抗 MUC16 8810 CDRH1	GFTFSSYA
131	抗 MUC16 8810 CDRH2	ISYNGGTT
132	抗 MUC16 8810 CDRH3	ARAAAP
133	抗 MUC16 8810 可变轻链	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCH QYGSSPWTFGQGTKVEIK
134	抗 MUC16 8810 可变重链	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL EFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTED MAVYYCARAAAPWGQGTSLTVSS
135	pBB4016 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL EFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTED MAVYYCARAAAPWGQGTSLTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQS PDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPW TFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
136	pBB4016 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLFVSTISYNGGTTYADSVKGRFT VSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTSLTVSSG GGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSN RYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAP TASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
137	pBB4017 CAR 氨基酸序列, 无	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCH

[0620]

	信号肽	QYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGALV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGT TYYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAP WGQGTlVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQLPPR
138	pBB4017 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCR ASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHW VRQAPGKGLEFVSTISYNGGTYYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFL RMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTlVTVSSTTTTPAPRPPTPAP TASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
139	抗 MUC16 8813 CDRL1	QSVSSSY
140	抗 MUC16 8813 CDRL2	GAS
141	抗 MUC16 8813 CDRL3	QQYGSSPWT
142	抗 MUC16 8813 CDRH1	GYTLTGYY
143	抗 MUC16 8813 CDRH2	INPNNGGT
144	抗 MUC16 8813 CDRH3	ARSLELLPDGMDV
145	抗 MUC16 8813 可变轻链	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIK
146	抗 MUC16 8813 可变重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHWRQAPGQGL EWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARLELLPDGMDVWGQGTITVTVSS
147	pBB4018 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHWRQAPGQGL EWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARLELLPDGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR

[0621]

		SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR
148	pBB4018 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA FGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVT MTRDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSLELLPDGMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKEIKTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR
149	pBB4019 CAR 氨基酸序列, 无 信号肽	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPWTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGG TNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARSLEL LPDGMVWGQGT TVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL RVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR
150	pBB4019 CAR 氨基酸序列, 具 有信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKEIKGGGGSG GGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAFGYTLTGYYIHW VRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARSLELLPDGMDVWGQGT TVTVSSTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDITYDALHMQALPPR
151	人 MUC16 胞外 结构域 (“小 块”)	PGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGE ATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDR DSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQP GSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAE TRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQQTGHGITRLGPYSLDKD SLYLNQYNEPGPDEPPTTPKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTL NFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYL GCQLISLRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELS QL THGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVNWNLS NPDPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQ LHDTRFCLVTNLTMDS VLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWHLGSTYQLVDIHV TEMESSVYQPTSSSSTQHLYNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRN KRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CN

[0622]

		FSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPN RNEPLTGNSDLP
152	CD8 信号肽	MALPVTALLLPLALLLHAARP
153	CD8 铰链区	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
154	CD8 跨膜区	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
	尾部/接头	LYC
155	4-1BB 共刺激 区	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
156	CD3 信号传导 区	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

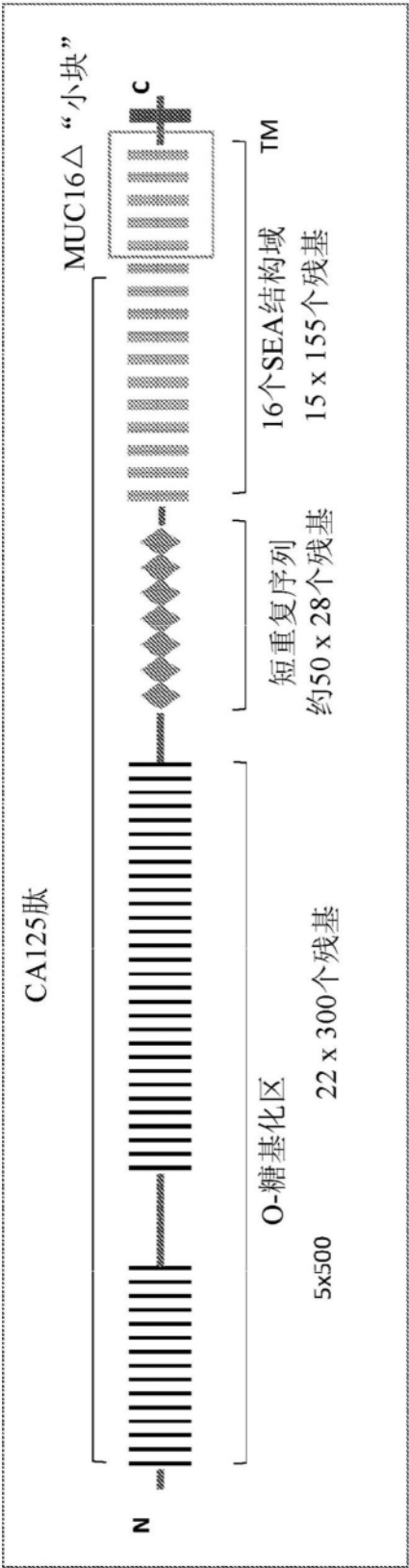


图1

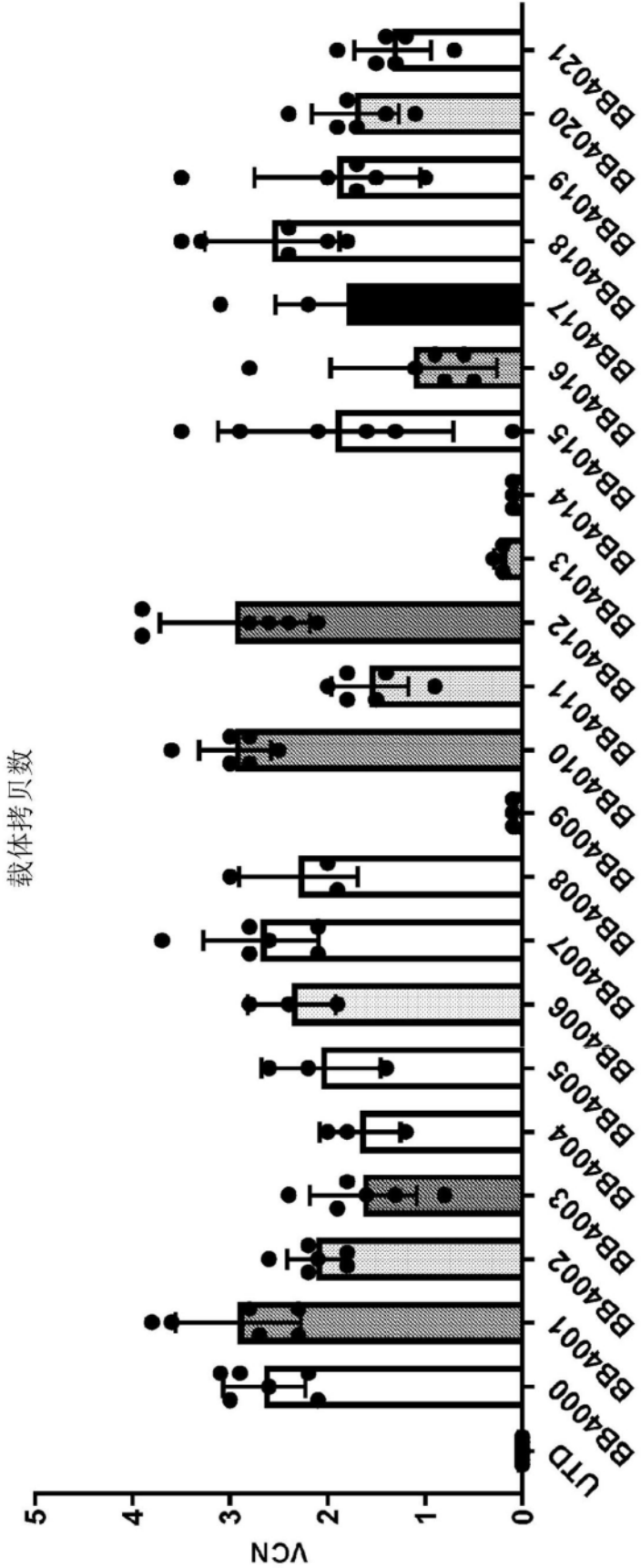


图2

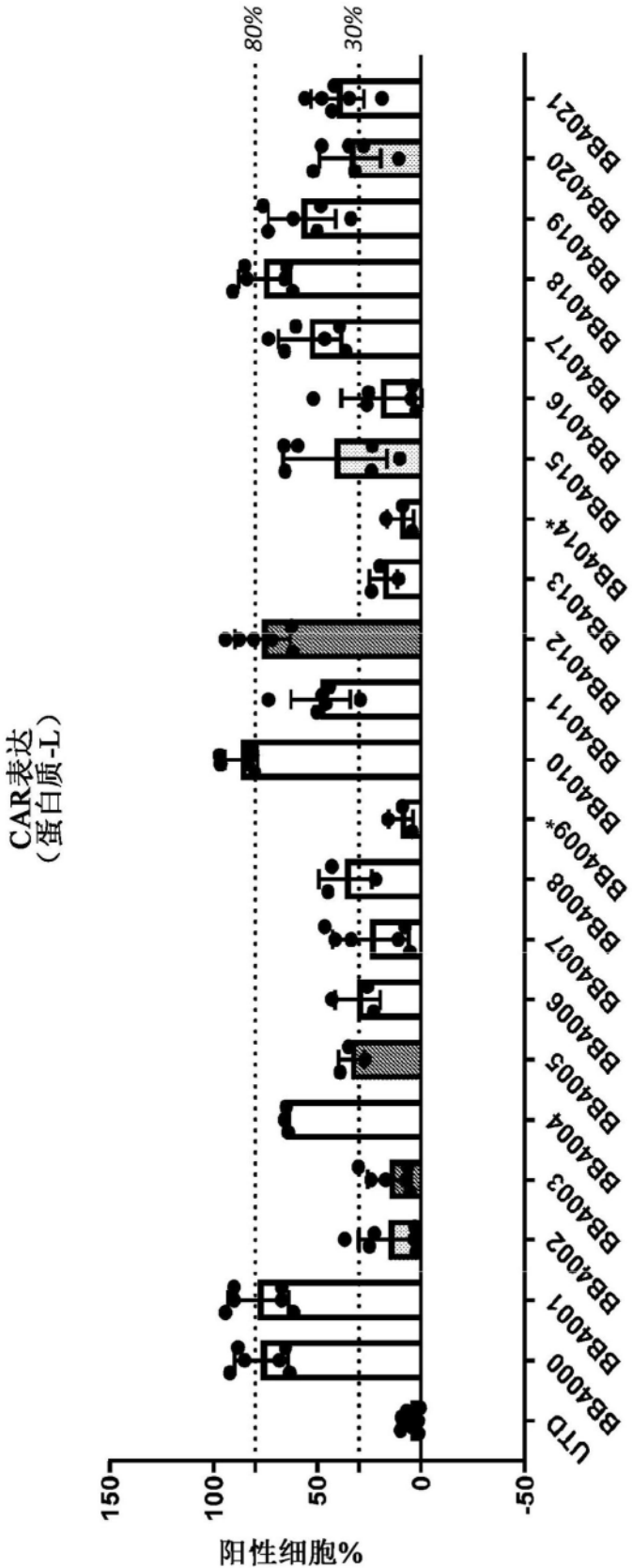


图3

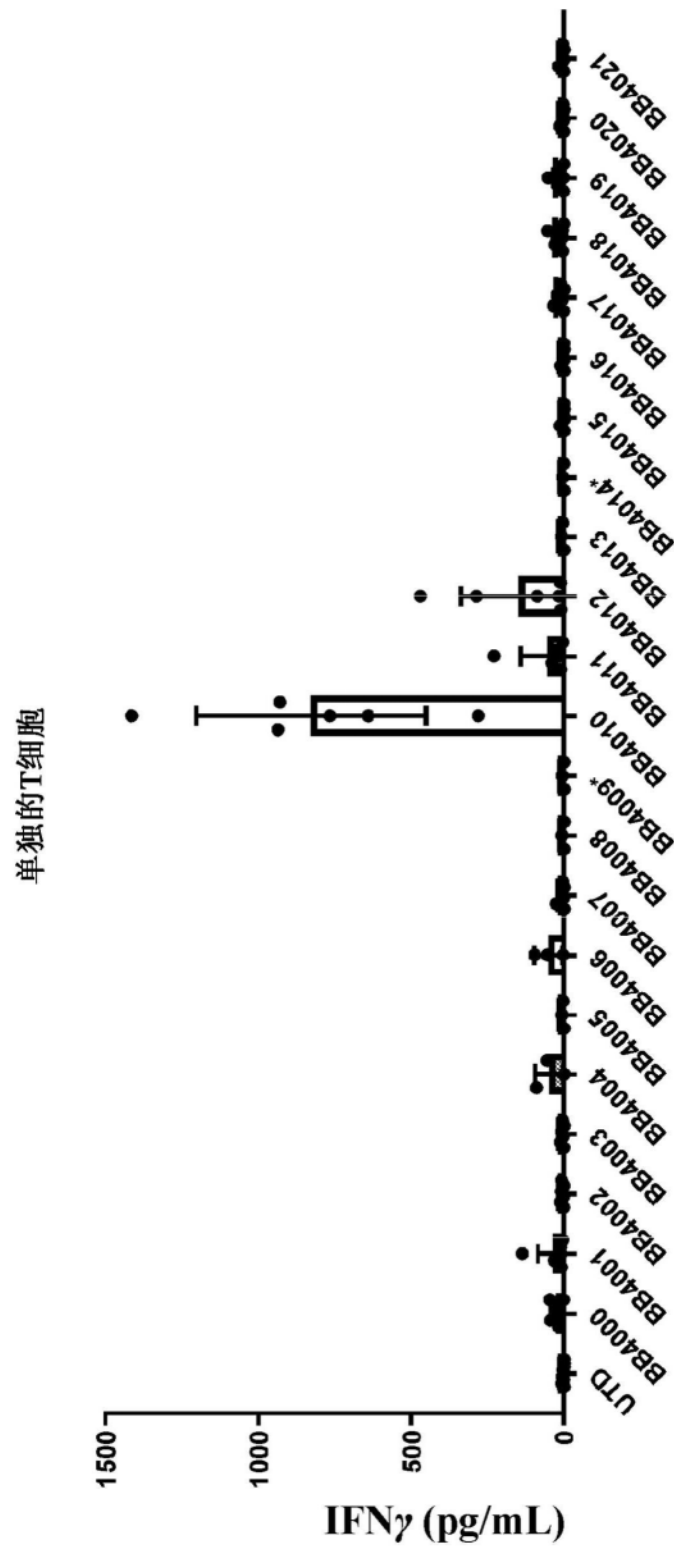


图4A

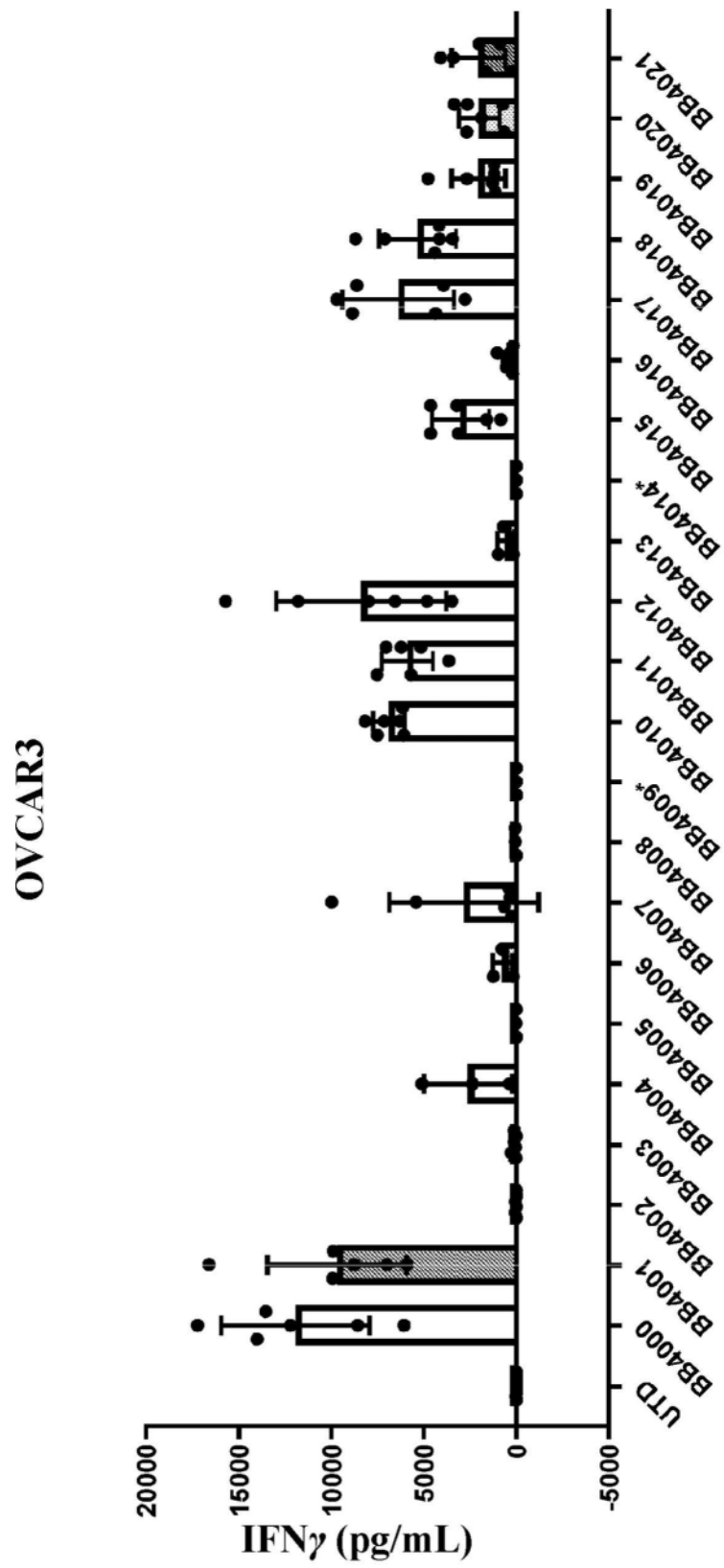


图4B

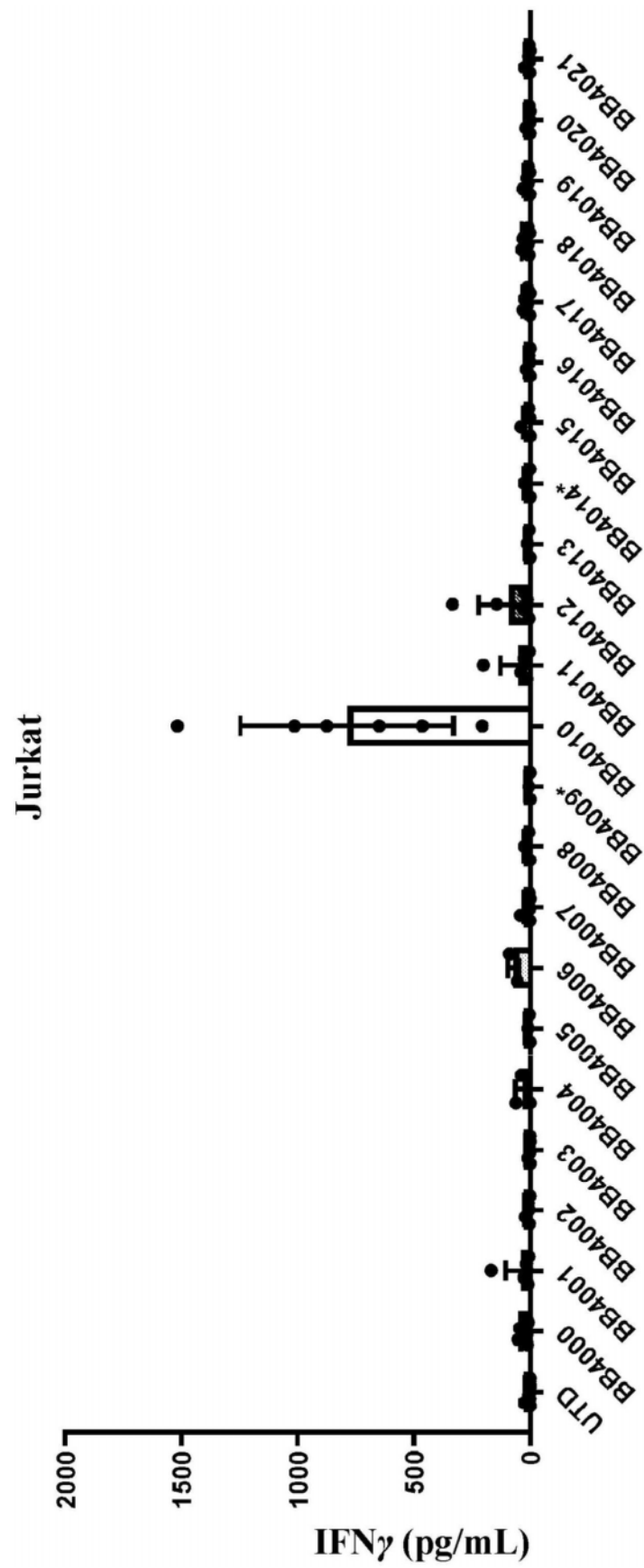


图4C

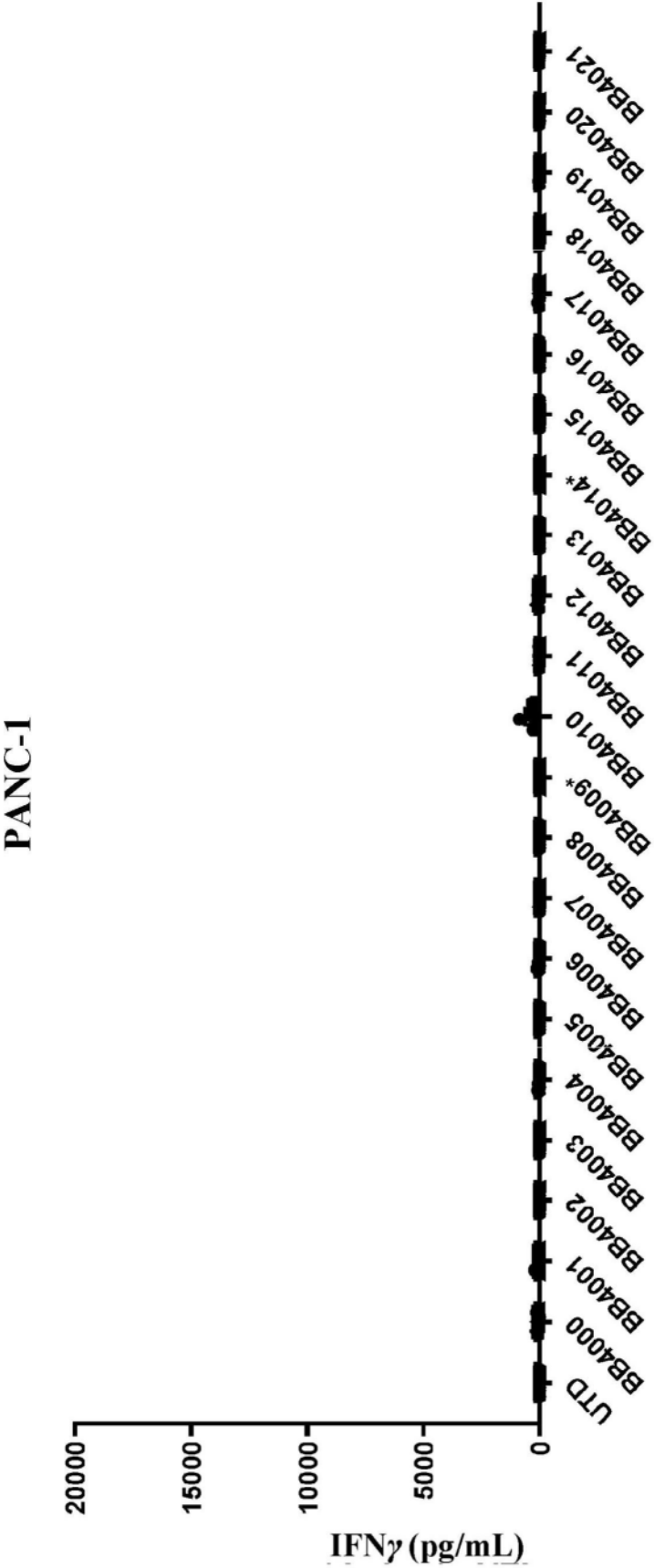


图4D

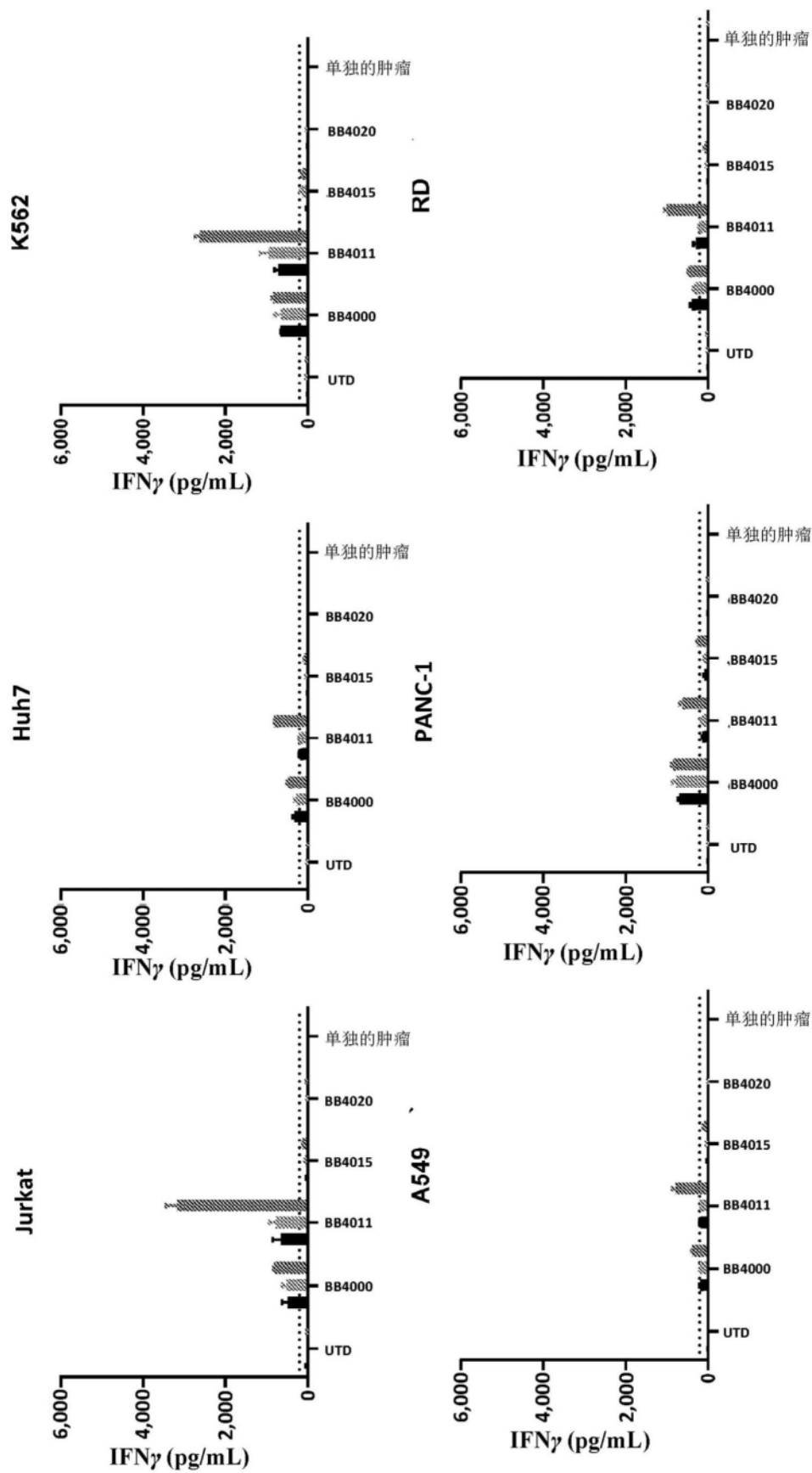


图5

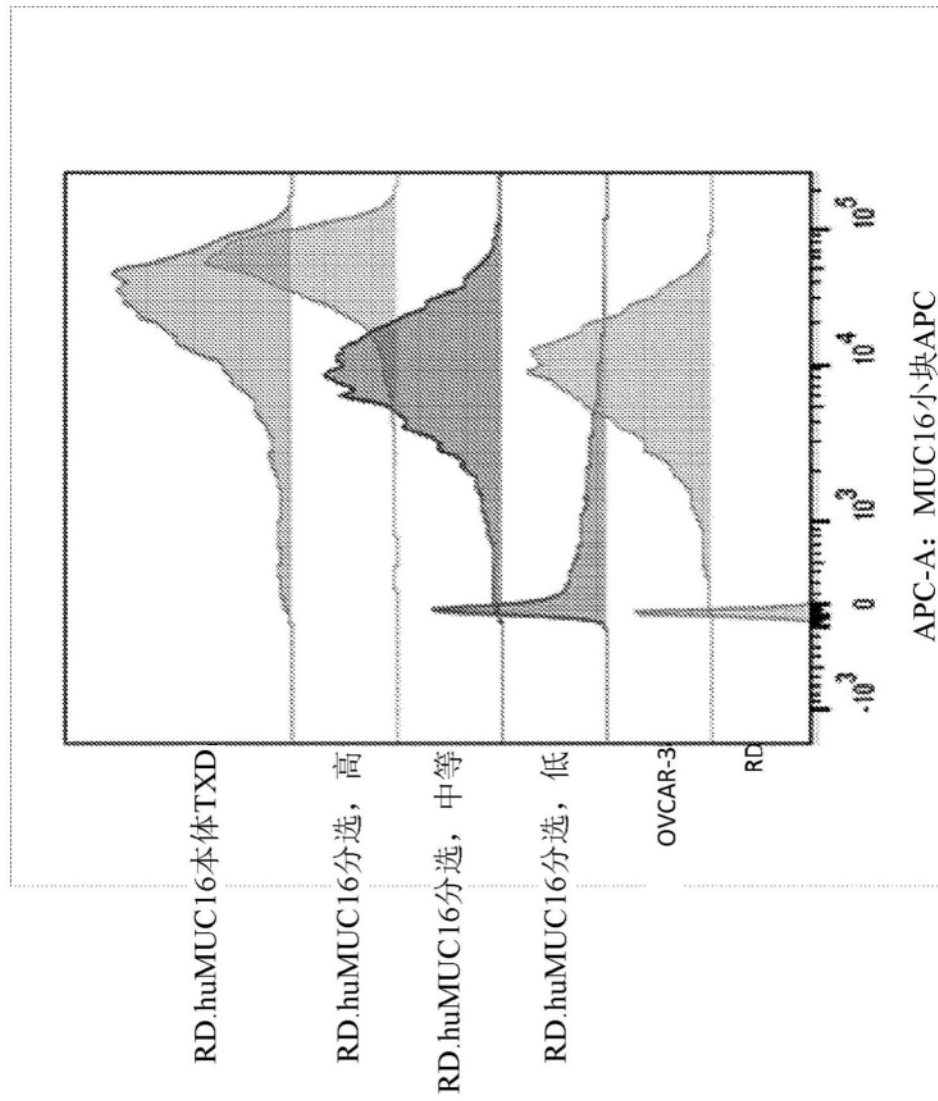


图6A

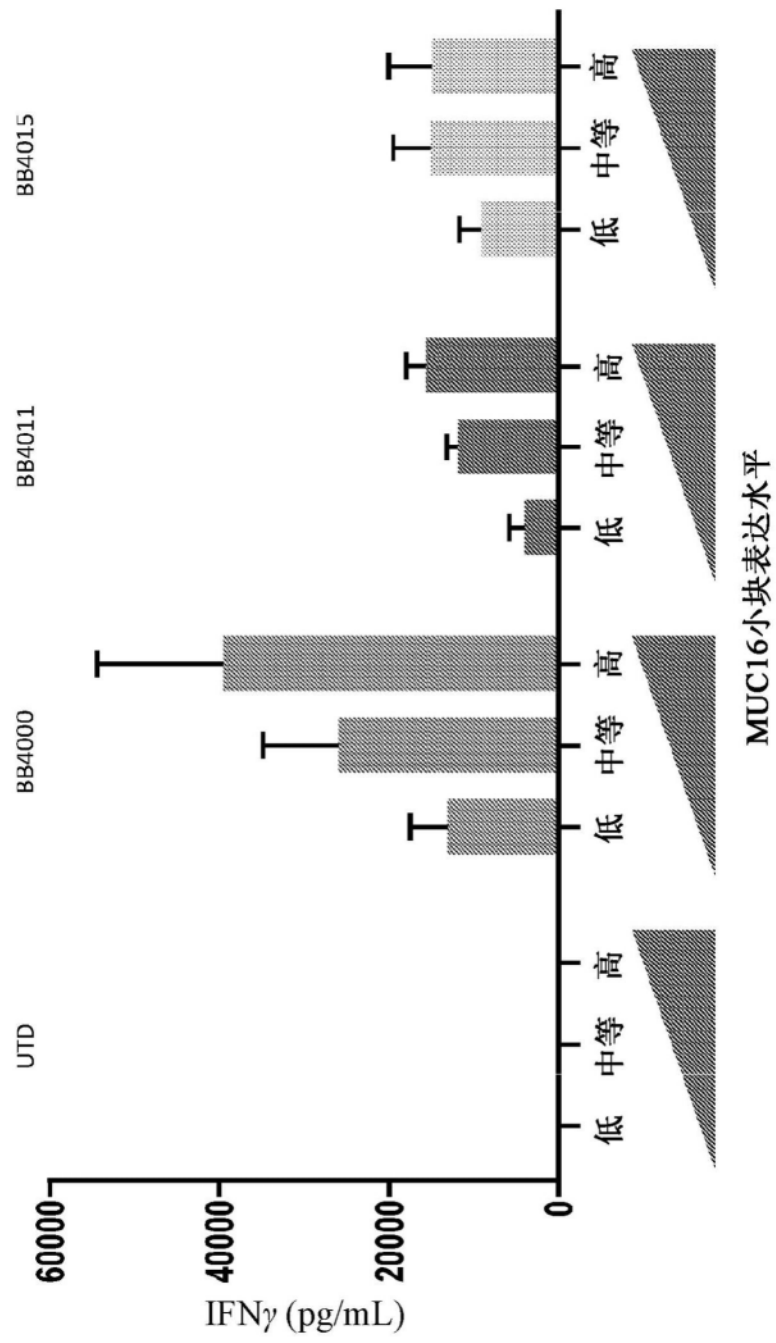


图6B

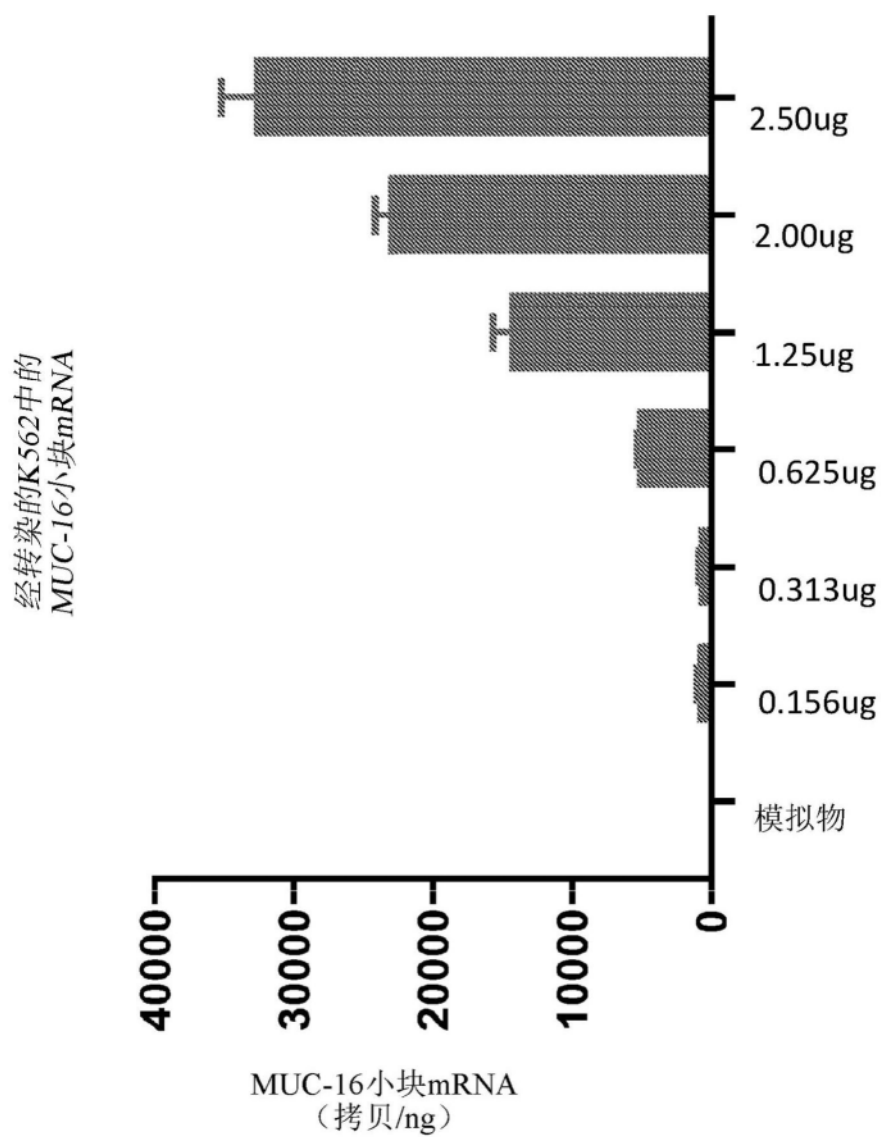


图7A

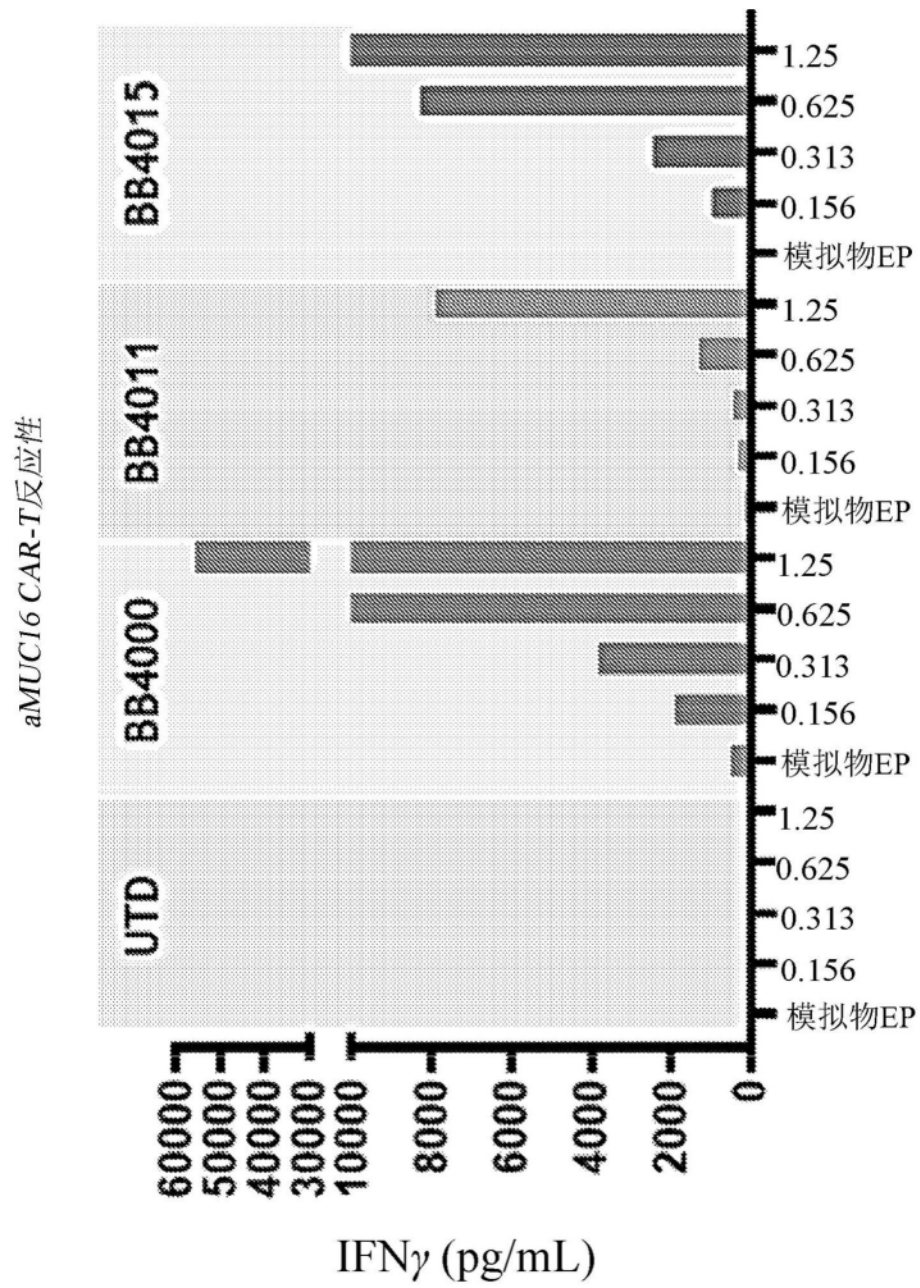


图7B

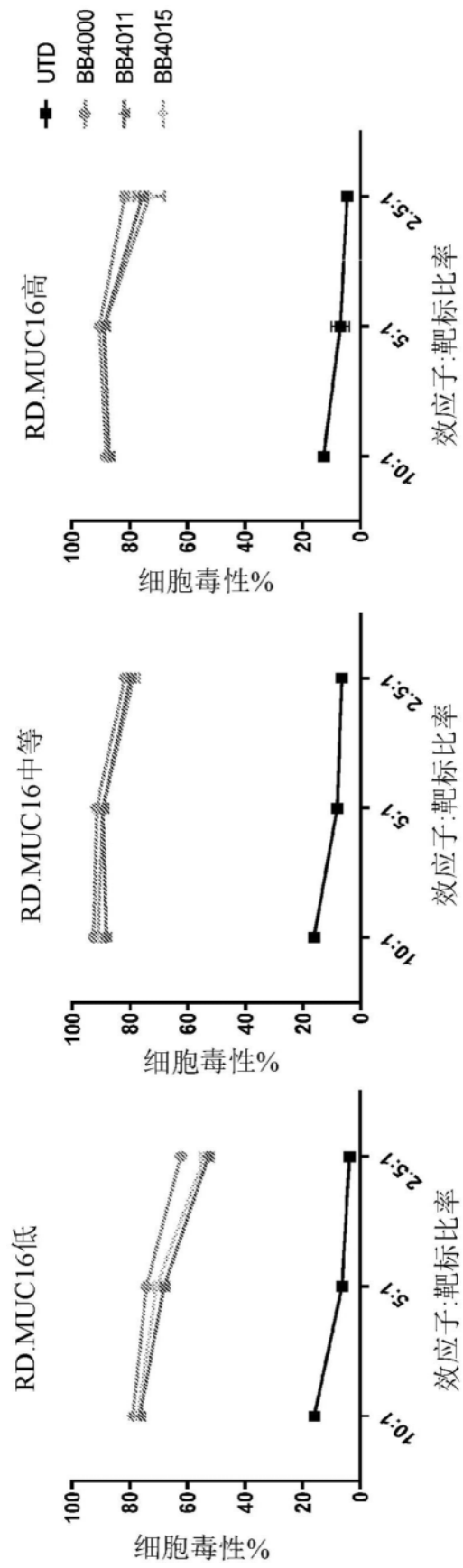


图8A

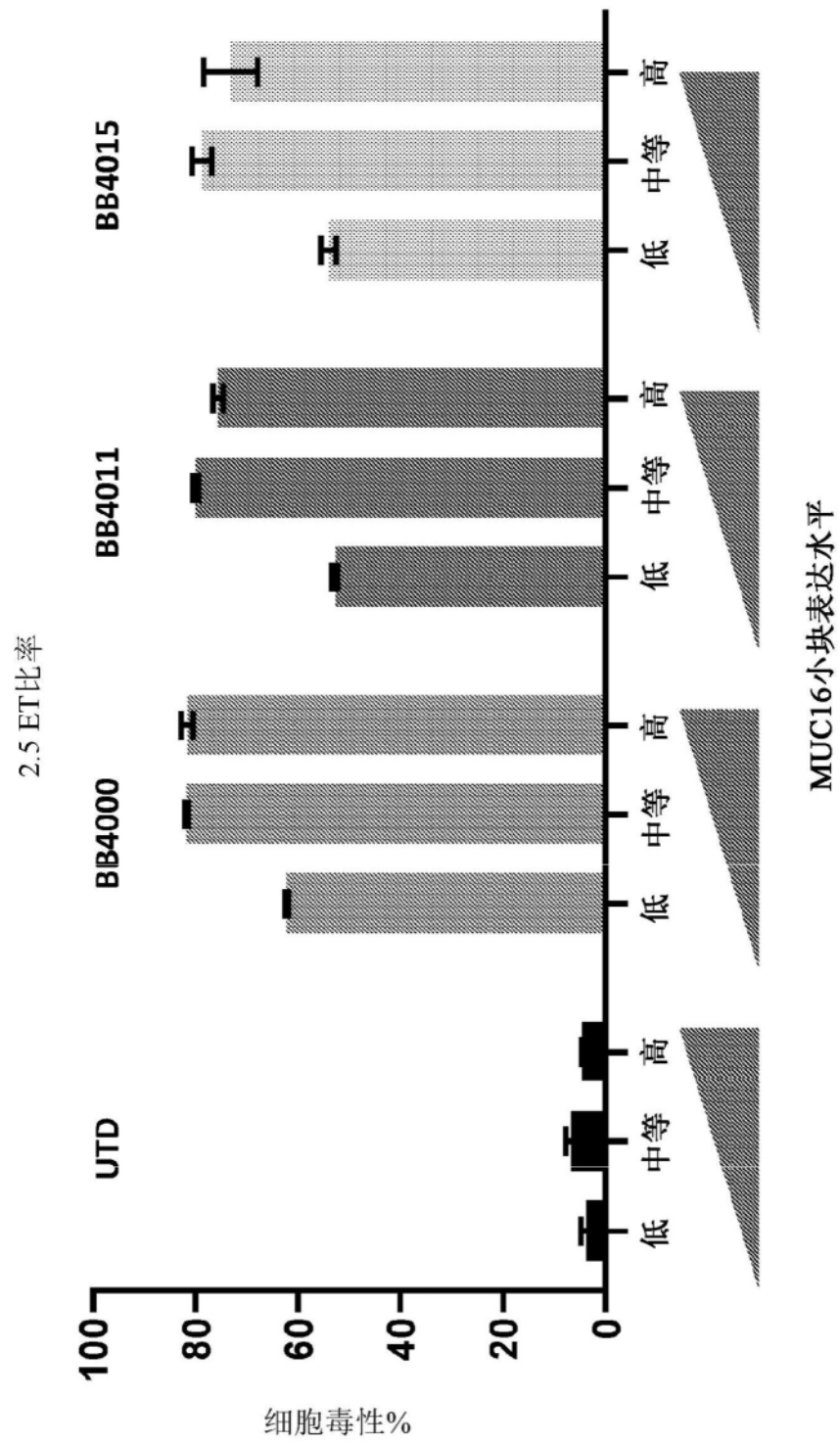


图8B

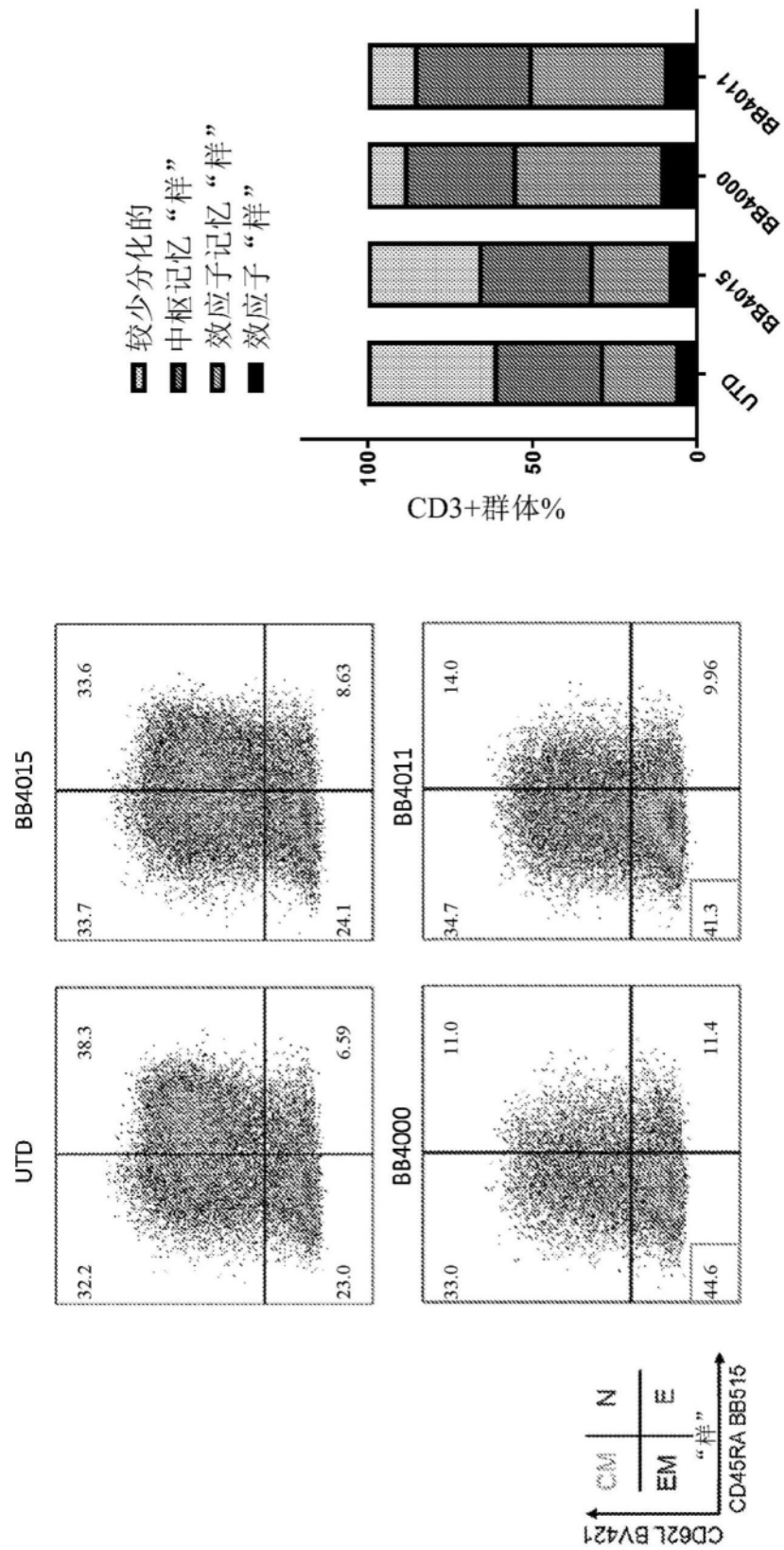


图6

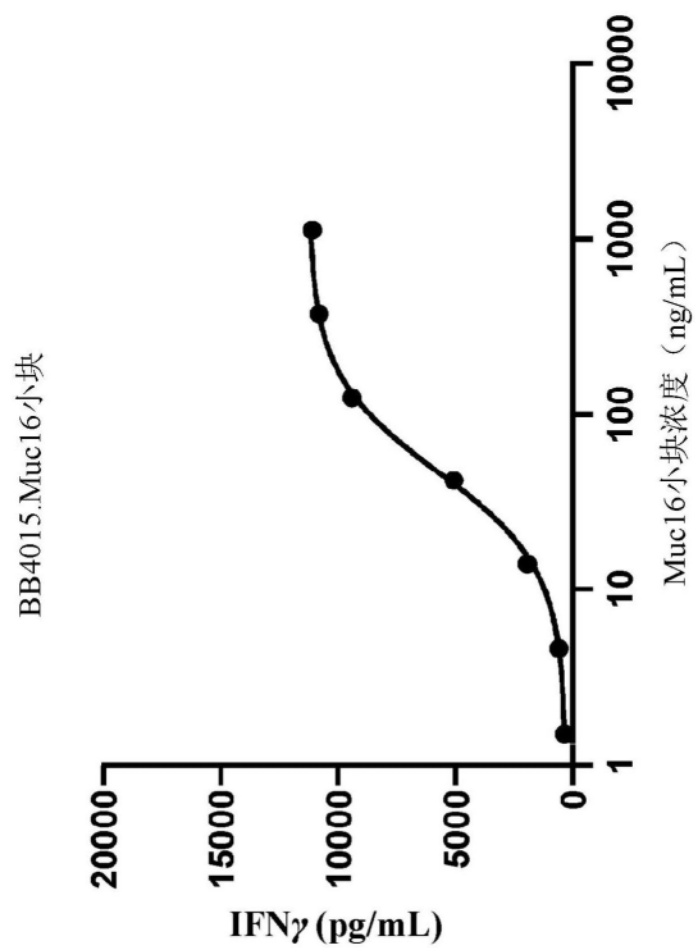


图10A

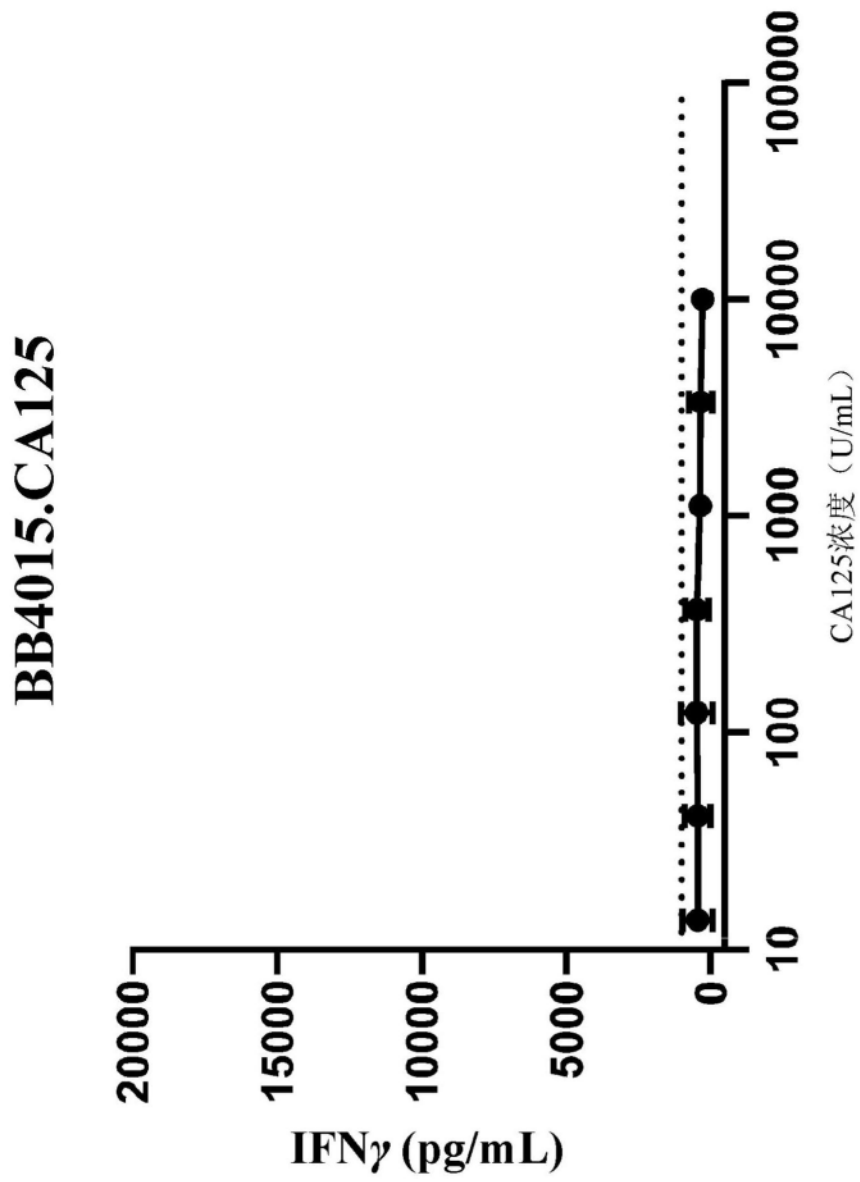


图10B

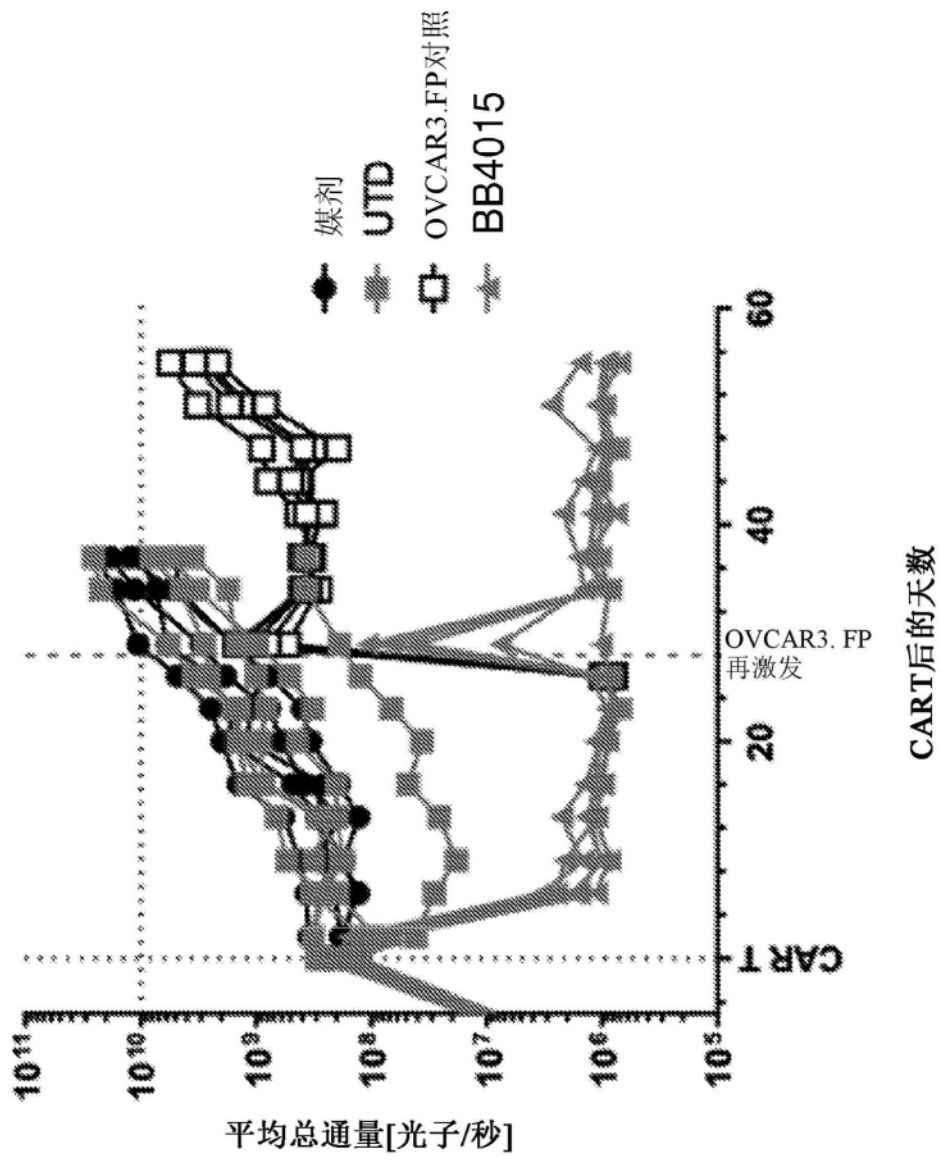


图11

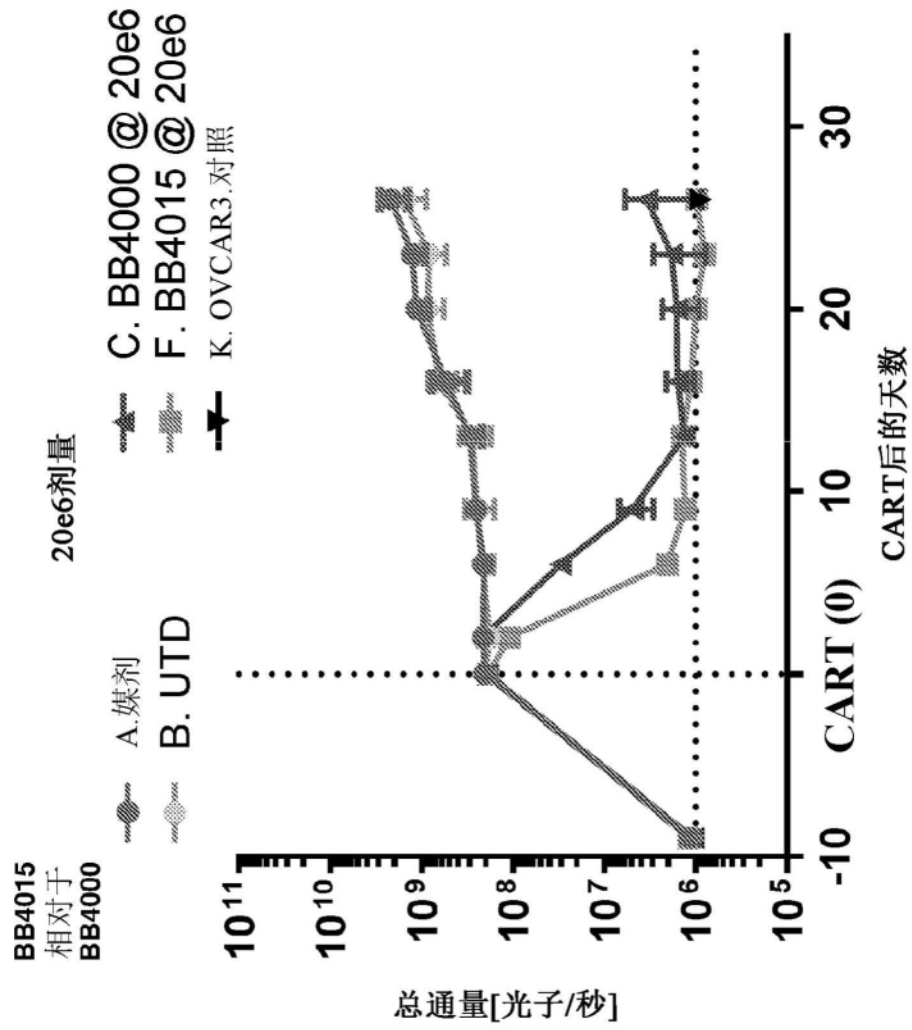


图12A

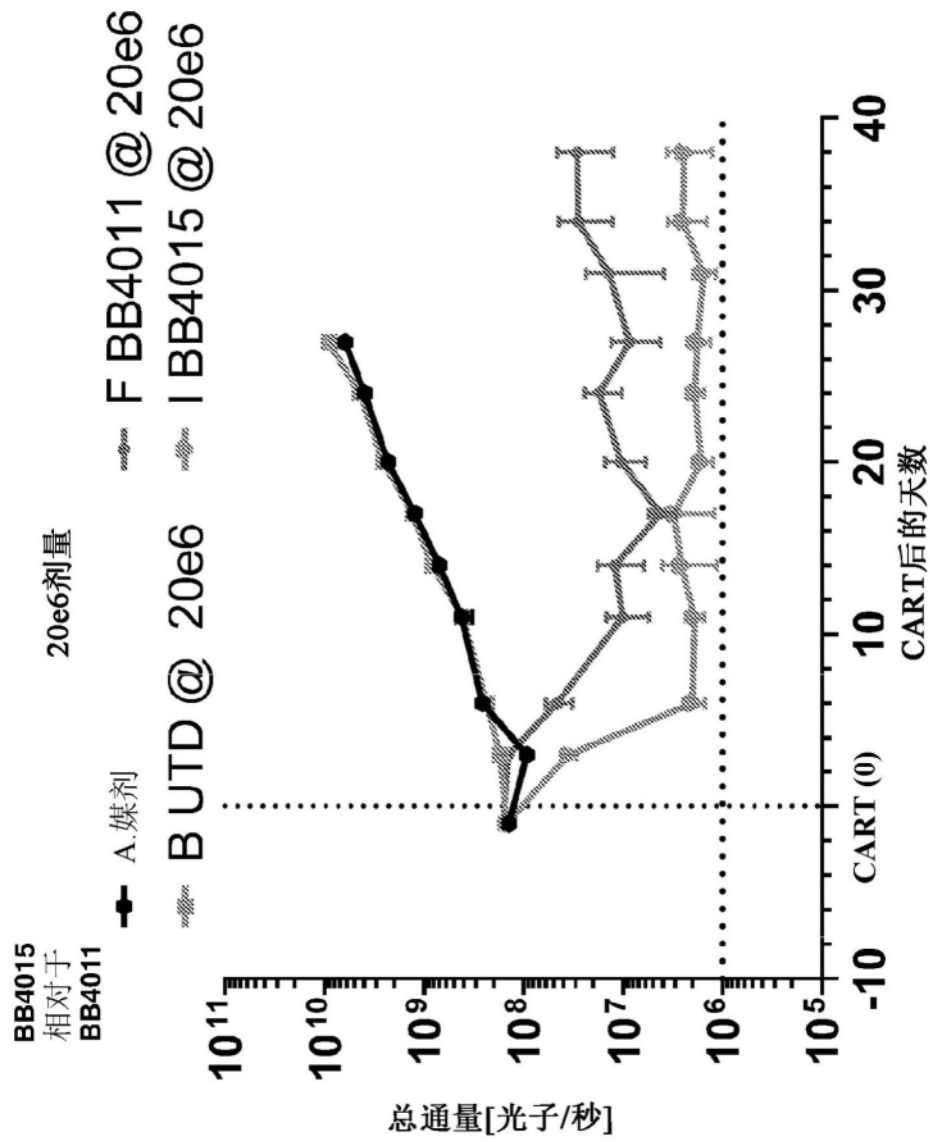


图12B

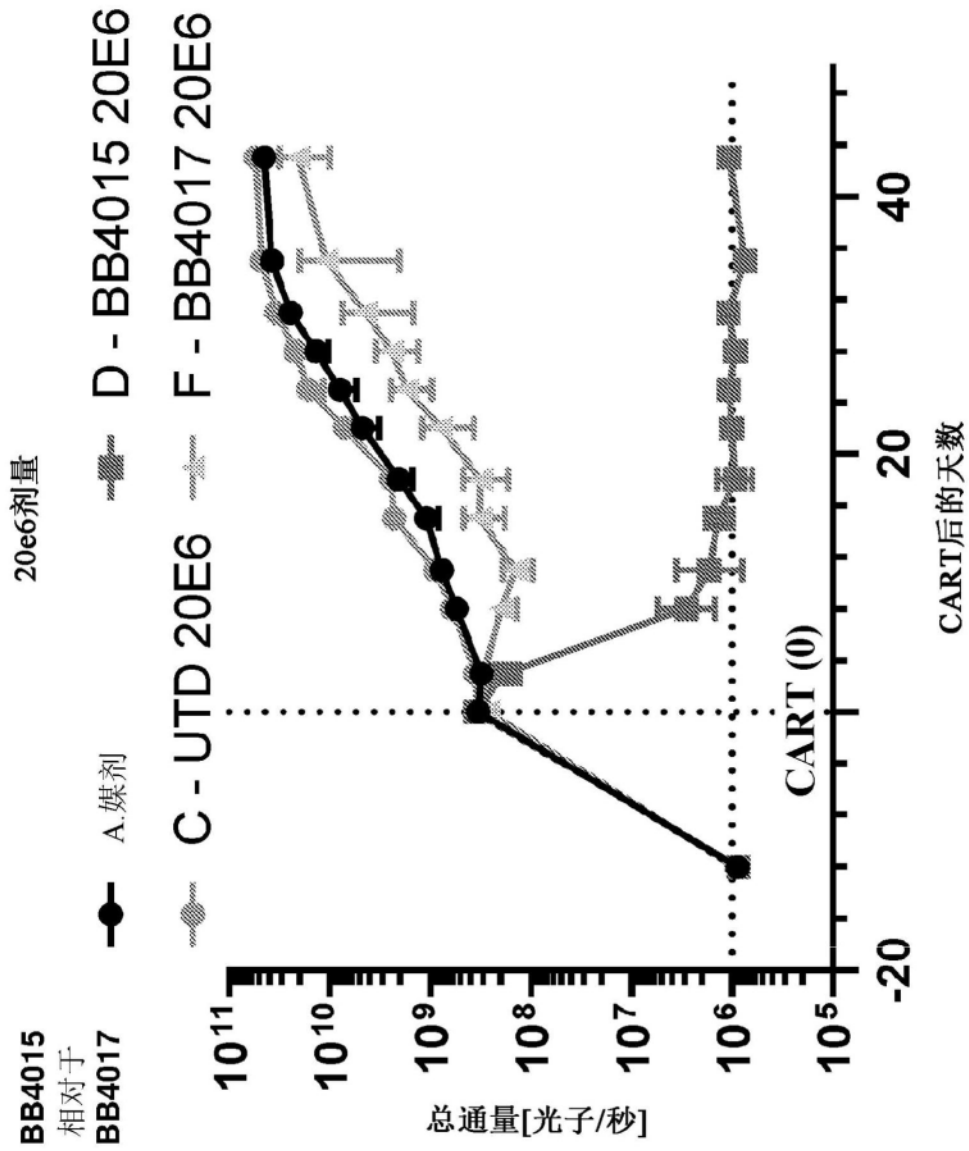


图12C

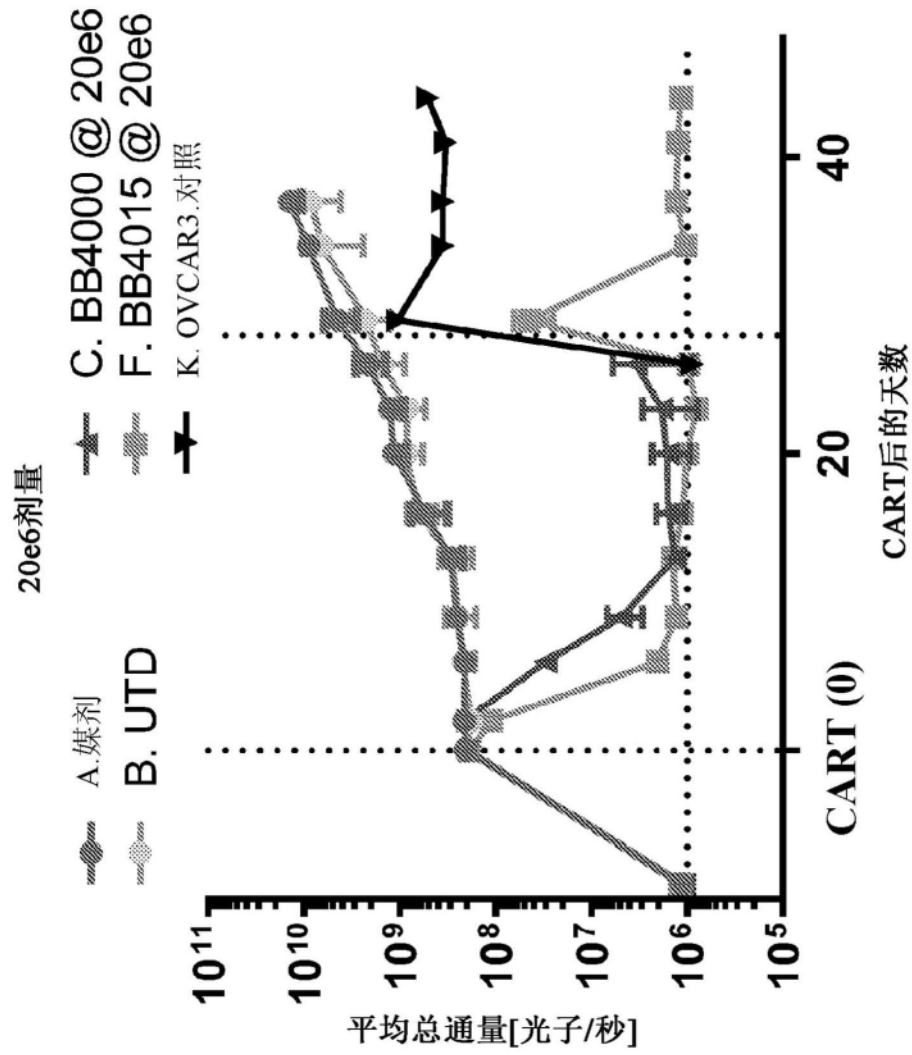


图13A

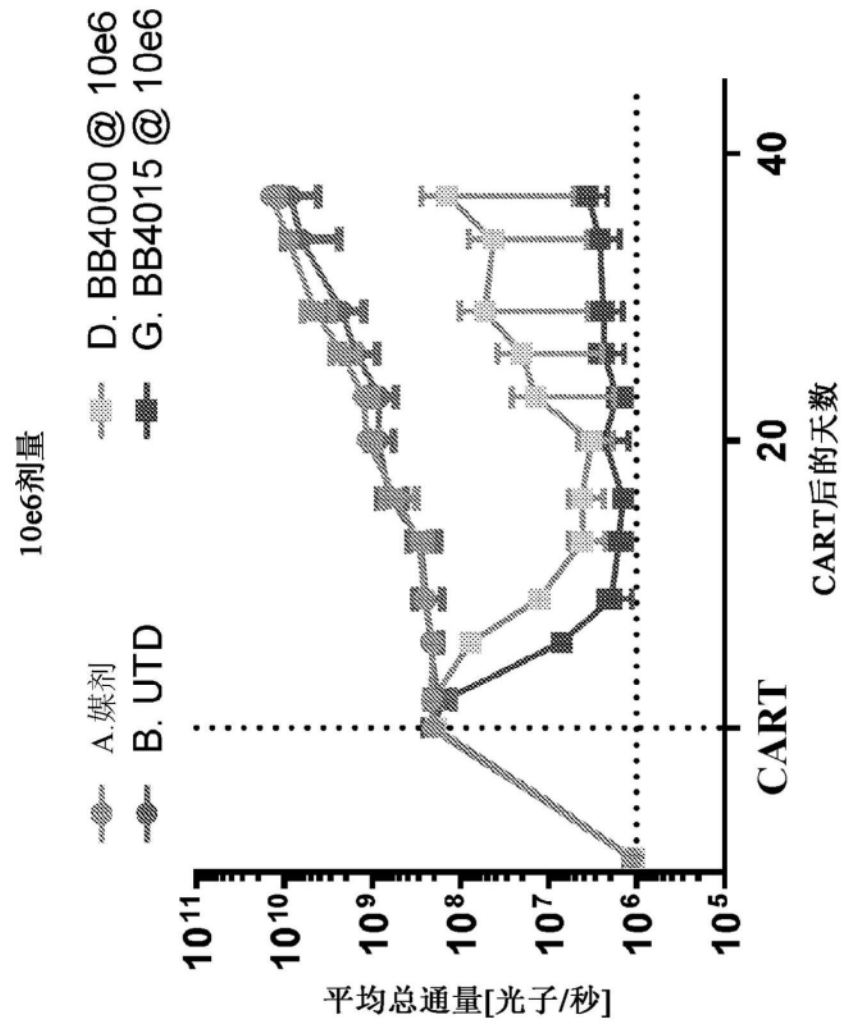


图13B

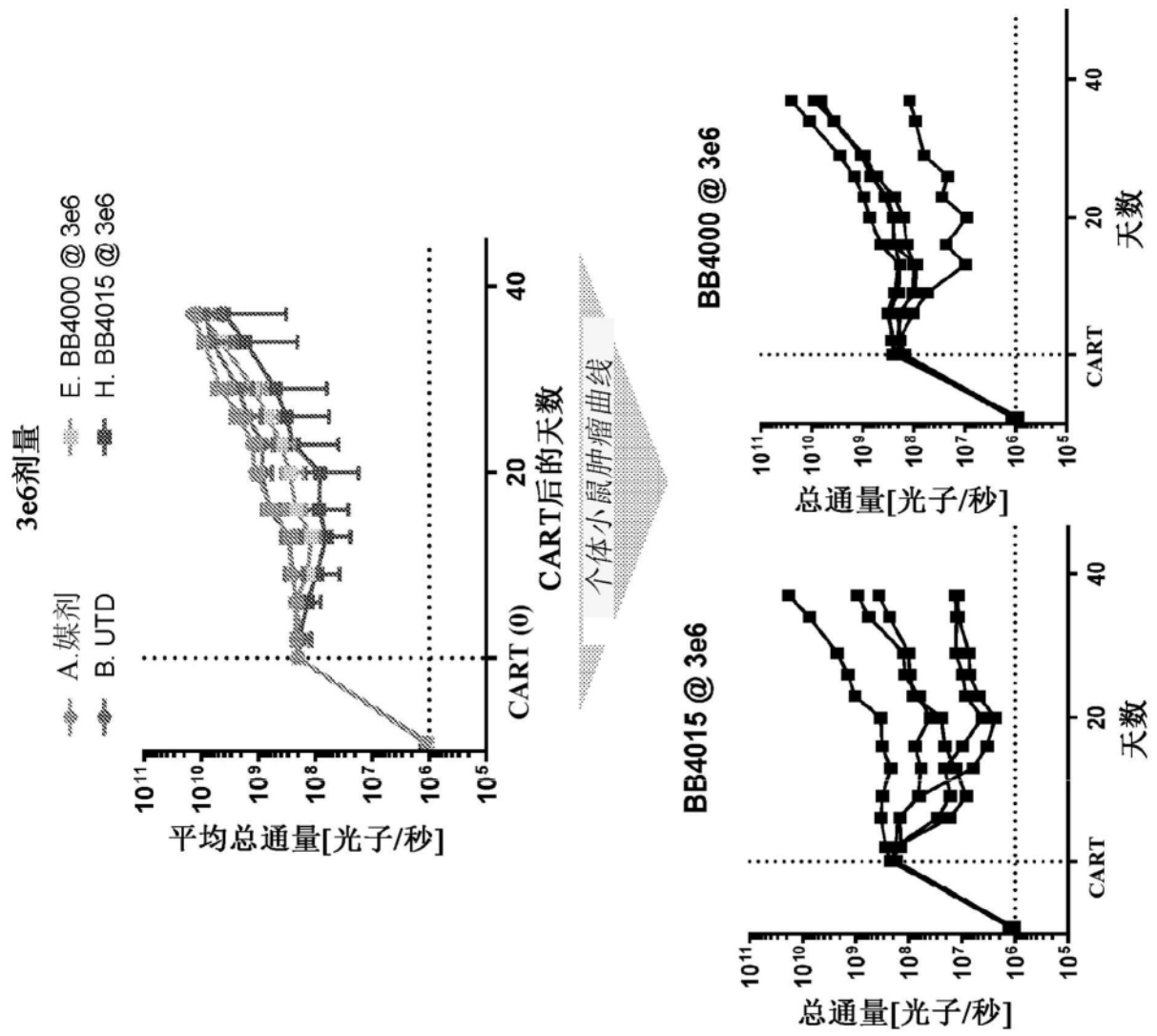


图13C