



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137703 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680059341.3

(22)申请日 2016.10.10

(30)优先权数据

62/241,896 2015.10.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/056262 2016.10.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/066122 EN 2017.04.20

(71)申请人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

(72)发明人 詹姆斯·N·科亨德费尔

(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

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页
序列表14页 附图7页

(54)发明名称

抗CD30嵌合抗原受体

(57)摘要

公开了能特异性结合并免疫识别CD30的嵌合抗原受体(CAR)。还公开了与所述CAR相关的相关核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群以及药物组合物。还公开了治疗或预防哺乳动物中的病况的方法,其中所述病况为癌症。

1. 具有针对CD30的抗原特异性的嵌合抗原受体 (CAR), 所述CAR包含:
 - (a) 抗CD30抗原结合结构域, 其包含人重链互补决定区 (CDR) 1、人重链CDR2、人重链CDR3、人轻链CDR1、人轻链CDR2和人轻链CDR3;
 - (b) 人铰链结构域;
 - (c) 人跨膜结构域; 以及
 - (d) (i) 人胞内T细胞信号转导结构域和(ii) 人T细胞共刺激结构域之一或两者。
2. 如权利要求1所述的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含SEQ ID NO:1-6中每一个的氨基酸序列。
3. 如权利要求1或2所述的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述铰链结构域和所述跨膜结构域包含人CD8 α 的铰链结构域和跨膜结构域。
5. 如权利要求4所述的CAR, 其中所述人CD8 α 的铰链结构域和跨膜结构域包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的CAR, 其中所述胞内T细胞信号转导结构域包含人CD28、人4-1BB和人CD3 ζ 中的一种或多种的胞内T细胞信号转导结构域。
7. 如权利要求6所述的CAR, 其中所述人CD28的胞内T细胞信号转导结构域包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列, 所述人4-1BB的胞内T细胞信号转导结构域包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列, 以及所述人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的CAR, 其包含SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列。
9. 如权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述铰链结构域、所述跨膜结构域和所述胞内T细胞信号转导结构域包含(i) 人CD28的铰链结构域、跨膜结构域和胞内T细胞信号转导结构域以及(ii) 人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域。
10. 如权利要求9所述的CAR, 其中所述人CD28的铰链结构域、跨膜结构域和胞内T细胞信号转导结构域包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
11. 如权利要求9或10所述的CAR, 其中所述人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。
12. 如权利要求9-11中任一项所述的CAR, 其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
13. 核酸, 其包含编码权利要求1-12中任一项所述的CAR的核苷酸序列。
14. 重组表达载体, 其包含权利要求13所述的核酸。
15. 宿主细胞, 其包含权利要求14所述的重组表达载体。
16. 宿主细胞群, 其包含至少两种权利要求15所述的宿主细胞。
17. 药物组合物, 其包含权利要求1-12中任一项所述的CAR、权利要求13所述的核酸、权利要求14所述的重组表达载体、权利要求15所述的宿主细胞或权利要求16所述的宿主细胞群以及药学可接受的载体。
18. 权利要求1-12中任一项所述的CAR、权利要求13所述的核酸、权利要求14所述的重组表达载体、权利要求15所述的宿主细胞、权利要求16所述的宿主细胞群或权利要求17所述的药物组合物, 其用于治疗或预防哺乳动物中的病况的用途, 其中所述病况为癌症。
19. 如用于权利要求18所述用途的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、宿主细胞群或

药物组合物,其中所述癌症为淋巴瘤。

20. 如用于权利要求18或19所述用途的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述宿主细胞或宿主细胞群是所述哺乳动物自体的。

21. 如用于权利要求18或19所述用途的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述宿主细胞或宿主细胞群是所述哺乳动物同种异体的。

抗CD30嵌合抗原受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2015年10月15日提交的美国临时专利申请第62/241,896号的权益,将其通过引用整体并入本文。

[0003] 通过引用并入电子提交的材料

[0004] 通过引用整体并入本文的是同时提交并通过如下识别的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名为“726313_ST25.txt”的一个27,962个字节的ASCII(Text)文件,日期为2016年8月22日。

[0005] 发明背景

[0006] 癌症是公共健康问题。尽管在诸如化疗的治疗中取得进步,但包括淋巴瘤在内的许多癌症的预后可能较差。因此,对癌症,特别是淋巴瘤的另外的治疗存在未满足的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的实施方案提供具有针对CD30的抗原特异性的嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含:(a)抗CD30抗原结合结构域,其包含人重链互补决定区(CDR)1、人重链CDR2、人重链CDR3、人轻链CDR1、人轻链CDR2和人轻链CDR3;(b)人铰链结构域;(c)人跨膜结构域;以及(d) (i)人胞内T细胞信号转导结构域和(ii)人T细胞共刺激结构域之一或两者。

[0009] 本发明的其它实施方案提供与本发明的CAR相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群以及药物组合物。

[0010] 本发明的另外的实施方案提供治疗或预防哺乳动物中病况的方法,其中所述病况为癌症。

[0011] 附图中几个视图的简述

[0012] 图1A和1B为显示在CD30+HH淋巴瘤细胞系(阳性对照)或在指示的正常组织中通过qPCR测量的CD30cDNA拷贝数/ 10^5 个拷贝的 β -肌动蛋白cDNA的图。

[0013] 图2A-2C为分别说明5F11-28Z(A)、5F11-CD828Z(B)和5F11-CD8BBZ(C)CAR的结构示意图。

[0014] 图3为显示当表达5F11-28Z的CFSE-标记的T细胞与CD30-bv173细胞(CD30+,实心黑色柱状图)或阴性对照NGFR-bv173细胞(CD30-阴性,空心柱状图)一起培养时荧光染料CFSE的稀释程度的柱状图。

[0015] 图4A为显示在培养的不同时间点(天数)来自第一供体的总的活细胞数目的图,其中T细胞为未转导的(空心正方形)或转导有5F11-28Z(圆圈)、AC10-28Z(▲)或XmAb2513-28Z(空心三角形)。

[0016] 图4B为显示在培养的不同时间点(天数)来自第二供体的总的活细胞数目的图,其中T细胞为未转导的(菱形)或转导有5F11-28Z(圆圈)、AC10-28Z(▲)或XmAb2513-28Z(空心三角形)。

[0017] 图5A和5B为显示在培养的不同时间点(天数)来自第一(A)和第二(B)供体的总的活细胞数目的图,其中T细胞为未转导的(空心正方形)或转导有5F11-28Z(▼)、5F11-CD8BBZ(▲)或5F11-CD8-28Z(圆圈)。

[0018] 图6为显示在将转导有5F11-28Z CAR的T细胞(效应物)(圆圈)与HH淋巴瘤细胞(靶标)以不同的效应物:靶标比例共培养之后测量的HH-特异性细胞毒性百分比的图。数据呈现为相对于CD30-阴性靶细胞CCRF-CEM的细胞毒性百分比的HH细胞的细胞毒性百分比。将表达SP6-CD828Z CAR的T细胞(正方形)用作阴性对照(效应物)。

[0019] 图7A为显示未处理的小鼠(空心三角形)或用静脉内输注8百万个转导有5F11-28Z(空心圆圈)、5F11-CD828Z(实心圆圈)或SP6-CD828Z(正方形)的T细胞处理的小鼠在T细胞输注之后的不同时间点(天数)的肿瘤大小(面积)(mm^2)的图。显示的结果为2个实验的组合结果。结果记录为以平均值的标准误差表示的肿瘤大小。

[0020] 图7B为显示未处理的荷瘤小鼠(空心三角形)或用静脉内输注8百万个转导有5F11-28Z(空心圆圈)、5F11-CD828Z(实心圆圈)或SP6-CD828Z(正方形)的T细胞处理的荷瘤小鼠在T细胞输注之后的不同时间点(天数)的存活百分比的图。

[0021] 图8A为显示未处理的小鼠(实心圆圈)或用单次输注 0.67×10^6 个(正方形)、 2×10^6 个(三角形)或 6×10^6 个(圆圈)转导有5F11-CD28Z的T细胞处理的小鼠在T细胞输注之后的不同时间点(天数)的肿瘤体积(mm^3)的图。

[0022] 图8B为显示未处理的荷瘤小鼠(实心圆圈)或用单次输注 0.67×10^6 个(正方形)、 2×10^6 个(三角形)或 6×10^6 个(圆圈)转导有5F11-CD28Z的T细胞处理的荷瘤小鼠在T细胞输注之后的不同时间点(天数)的存活百分比的图。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明的实施方案提供具有针对CD30的抗原特异性的CAR,所述CAR包含:(a)抗CD30抗原结合结构域,其包含人重链互补决定区(CDR)1、人重链CDR2、人重链CDR3、人轻链CDR1、人轻链CDR2和人轻链CDR3;(b)人铰链结构域;(c)人跨膜(TM)结构域;以及(d)(i)人胞内T细胞信号转导结构域和(ii)人T细胞共刺激结构域之一或两者。

[0025] CAR为人工构建的杂合蛋白或多肽,所述杂合蛋白或多肽含有连接至T细胞信号转导结构域的抗体的抗原结合结构域(如,单链可变片段(scFv))。CAR的特性包括它们能够利用单克隆抗体的抗原结合性质,以非-MHC-限制的方式重定向T细胞对选定的靶标的特异性和反应性。非-MHC限制的抗原识别使表达CAR的细胞能够不依赖抗原加工而识别抗原,从而绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源T细胞受体(TCR) α 和 β 链二聚化。

[0026] 本发明的CAR可以提供许多优势。例如,本发明的CAR的全部或几乎全部组分可以是人序列。因此,与含有非人序列,例如,小鼠序列的CAR相比,向人类患者施用本发明的CAR不太可能在人类患者中引起针对CAR的不期望的免疫应答。

[0027] 本发明的CAR具有针对人CD30(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员8(TNFRSF8))的抗原特异性。CD30被多种人类癌细胞,包括淋巴瘤表达或过表达。表达或过表达CD30的癌症的实例包括但不限于B细胞淋巴瘤(如例如,弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤、纵隔灰区淋巴瘤和结节硬化型HL)和T细胞淋巴瘤(如例如,间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、外周T细胞淋巴瘤-非特指型(PTCL-NOS)和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL))。不受特定理论或机制的束缚,认为通过引发针对CD30的抗原特异性应答,本发明的CAR提供下述中的一种或多种:靶向并破坏表达CD30的癌细胞,减少或清除癌细胞,促进免疫细胞至肿瘤部位的浸润,以及增强/扩展抗癌

应答。

[0028] 本文使用的短语“具有抗原特异性”和“引发抗原特异性应答”意为CAR能够特异性结合并免疫识别抗原 (CD30), 以使CAR与抗原的结合引发免疫应答。

[0029] 本发明的实施方案提供了CAR, 其包含5F11人抗体 (“5F11”) 的抗原结合结构域。5F11的抗原结合结构域能特异性结合CD30。5F11抗体描述于美国专利7,387,776中, 将其通过引用并入本文。

[0030] 抗原结合结构域可以包含5F11抗体的任何抗原结合部分。例如, 抗原结合结构域可以是Fab片段 (Fab)、F(ab')₂片段、双链抗体、三链抗体、四链抗体、单链可变区片段 (scFv) 或二硫化物稳定的可变区片段 (dsFv)。在优选的实施方案中, 抗原结合结构域为scFv。scFv为截短的Fab片段, 其包含经由合成肽与抗体轻链的可变 (V) 结构域连接的抗体重链的V结构域, 其可以使用常规的重组DNA技术生成。然而, 用于本发明CAR的抗CD30抗原结合结构域不限于这些示例性类型的抗体片段。

[0031] 抗原结合结构域可以包含轻链可变区和/或重链可变区。在本发明的实施方案中, 重链可变区包含互补决定区 (CDR) 1、CDR2和CDR3。在优选的实施方案中, 抗原结合结构域包含人重链CDR1、人重链CDR2和人重链CDR3。就这点而言, 抗原结合结构域可以包含以下的一种或多种: 重链CDR1, 其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成; 重链CDR2, 其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成; 和重链CDR3, 其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成。优选地, 重链包含SEQ ID NO:1-3的所有氨基酸序列。

[0032] 在本发明的实施方案中, 轻链可变区可以包含轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。在优选的实施方案中, 抗原结合结构域包含人轻链CDR1、人轻链CDR2和人轻链CDR3。就这点而言, 抗原结合结构域可以包含以下的一种或多种: 轻链CDR1, 其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成; 轻链CDR2, 其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成; 和轻链CDR3, 其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成。优选地, 轻链包含SEQ ID NO:4-6的所有氨基酸序列。在特别优选的实施方案中, 抗原结合结构域包含SEQ ID NO:1-6的所有氨基酸序列。

[0033] 在本发明的实施方案中, 抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区。在优选的实施方案中, 抗原结合结构域包含人重链可变区和人轻链可变区。抗原结合结构域的重链可变区可以包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成。抗原结合结构域的轻链可变区可以包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列, 由其组成或基本上由其组成。因此, 在本发明的实施方案中, 抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。优选地, 抗原结合结构域包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。

[0034] 在本发明的实施方案中, 轻链可变区和重链可变区可以通过接头连接。接头可以包含任何合适的氨基酸序列。在本发明的实施方案中, 接头可以包含SEQ ID NO:10, 由其组成或基本上由其组成。在本发明的实施方案中, 抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的scFv。

[0035] 在本发明的实施方案中, 抗原结合结构域包含前导序列。前导序列可以位于轻链可变区或重链可变区的氨基末端。优选地, 前导序列位于轻链可变区的氨基末端。前导序列

可以包含任何合适的前导序列。例如,抗原结合结构域可以包含这样的前导序列,其含有 SEQ ID NO:9,由其组成或基本上由其组成。在本发明的实施方案中,虽然前导序列可以促进CAR在细胞表面上的表达,但是在表达的CAR中存在前导序列可以不是CAR发挥功能所必需的。在本发明的实施方案中,CAR在细胞表面上表达后,前导序列的全部或部分可以从CAR上切除。因此,在本发明的实施方案中,CAR没有前导序列。

[0036] 在本发明的实施方案中,CAR包含铰链结构域和跨膜(TM)结构域。优选地,铰链结构域为人铰链结构域,并且TM结构域为人TM结构域。铰链结构域和TM结构域可以包含人CD8 α 的铰链结构域和TM结构域。就这点而言,人CD8 α 的铰链结构域和TM结构域可以包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。

[0037] 在本发明的实施方案中,CAR包含胞内T细胞信号转导结构域。优选地,胞内T细胞信号转导结构域为人胞内T细胞信号转导结构域。胞内T细胞信号转导结构域可以包含人CD28、人4-1BB和人CD3 ζ 中的一种或多种的胞内T细胞信号转导结构域。CD28为在T细胞共刺激中重要的T细胞标志物。人CD28的胞内T细胞信号转导结构域可以包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。4-1BB,也称为CD137,向T细胞传送有效的共刺激信号,从而促进T淋巴细胞的分化并增强其长期存活。人4-1BB的胞内T细胞信号转导结构域可以包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。CD3 ζ 与TCR联合以产生信号,并且其含有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域可以包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。

[0038] 在本发明的实施方案中,CAR包含(i)人CD8 α 的铰链结构域和TM结构域;(ii)人CD28的胞内T细胞信号转导结构域;和(iii)人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域。就这点而言,CAR可以包含全部SEQ ID NO:11-12和15的氨基酸序列。包含全部SEQ ID NO:11-12和15的氨基酸序列的CAR还可以包含本文就本发明其它方面所述的抗原结合结构域。就这点而言,CAR可以包含(i)SEQ ID NO:1-6、11-12和15;(ii)SEQ ID NO:7-8、11-12和15;或(iii)SEQ ID NO:23、11-12和15的氨基酸序列。

[0039] 在本发明的实施方案中,CAR包含(i)人CD8 α 的铰链结构域和TM结构域;(ii)人4-1BB的胞内T细胞信号转导结构域;和(iii)人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域。就这点而言,CAR可以包含全部SEQ ID NO:11和14-15的氨基酸序列。包含全部SEQ ID NO:11和14-15的氨基酸序列的CAR还可以包含本文就本发明的其它方面所述的抗原结合结构域。就这点而言,CAR可以包含(i)SEQ ID NO:1-6、11和14-15;(ii)SEQ ID NO:7-8、11和14-15;或(iii)SEQ ID NO:23、11和14-15的氨基酸序列。

[0040] 在本发明的实施方案中,CAR包含(i)人CD28的铰链结构域、TM结构域和胞内T细胞信号转导结构域和(ii)人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域。人CD28的铰链结构域、TM结构域和胞内T细胞信号转导结构域可以包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。人CD3 ζ 的胞内T细胞信号转导结构域可以包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。就这点而言,CAR可以包含SEQ ID NO:13和15的氨基酸序列。包含SEQ ID NO:13和15的氨基酸序列的CAR还可以包含本文就本发明的其它方面所述的抗原结合结构域。就这点而言,CAR可以包含(i)SEQ ID NO:1-6、13和15;(ii)SEQ ID NO:7-8、13和15;或(iii)SEQ ID NO:23、13和15的氨基酸序列。

[0041] 本发明的实施方案提供包含SEQ ID NO:16-18中任一项所示的氨基酸序列的CAR。

包含SEQ ID NO:16-18中任一项所示的氨基酸序列的CAR的组分示于表1中。

[0042] 表1

[0043]

SEQ ID NO:	抗原结合结构域	其它组分
SEQ ID NO: 16	5F11 scFv (SEQ ID NO: 23)	(i) 人 CD28 的铰链结构域、TM 结构域和胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 13); 和 (ii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 15)
SEQ ID NO: 17	5F11 scFv	(i) 人 CD8 α 的铰链结构域和 TM 结构域(SEQ

[0044]

SEQ ID NO:	抗原结合结构域	其它组分
	(SEQ ID NO: 23)	ID NO: 11); (ii) 人 CD28 的胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 12); 和 (iii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 15)
SEQ ID NO: 18	5F11 scFv (SEQ ID NO: 23)	(i) 人 CD8 α 的铰链结构域和 TM 结构域(SEQ ID NO: 11); (ii) 人 4-1BB 的胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 14); 和 (iii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域(SEQ ID NO: 15)

[0045] 本发明的范围包括本文所述的本发明的CAR的功能变体。本文使用的术语“功能变体”指与亲本CAR具有大量的或显著的序列同一性或相似性的CAR,所述功能变体保留了该变体所来源的CAR的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述CAR(亲本CAR)的保留与亲本CAR相似程度、相同程度或比亲本CAR更高程度地识别靶细胞的能力的那些变体。提及亲本CAR,功能变体的氨基酸序列与亲本CAR的氨基酸序列可,例如,具有至少约30%、约50%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的同一性。

[0046] 功能变体可以,例如包含具有至少一个保守氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。

可选地或另外,功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸置换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下,非保守氨基酸置换优选不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸置换可以增强功能变体的生物活性,以使与亲本CAR相比,功能变体的生物活性增加。

[0047] 本发明的CAR的氨基酸置换优选保守氨基酸置换。保守氨基酸置换为本领域已知的,并且包含这样的氨基酸置换,其中具有某些物理和/或化学特性的一个氨基酸被换成具有相同或相似化学或物理特性的另一氨基酸。例如,保守氨基酸置换可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸被另一酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如Asp或Glu)置换,具有非极性侧链的氨基酸被另一具有非极性侧链的氨基酸(例如Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)置换,碱性/带正电荷的极性氨基酸被另一碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如Lys、His、Arg等)置换,具有极性侧链的不带电荷的氨基酸被另一具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)置换,具有 β 分支侧链的氨基酸被另一具有 β 分支侧链的氨基酸(例如Ile、Thr和Val)置换,具有芳香族侧链的氨基酸被另一具有芳香族侧链的氨基酸(例如His、Phe、Trp和Tyr)置换等。

[0048] CAR可以基本上由本文所述的一条或多条指定的氨基酸序列组成,以使其它组分(例如其它氨基酸)不实质性改变CAR的生物活性。

[0049] 本发明的实施方案的CAR可以是任何长度,即可以包含任何数目的氨基酸,条件是所述CAR保留它们的生物活性,例如特异性结合抗原或者治疗或预防哺乳动物中的病况等的的能力。例如,CAR的长度可以是约50至约5000个氨基酸,如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。

[0050] 本发明的实施方案的CAR可以包含合成的氨基酸代替一个或多个天然存在的氨基酸。此类合成的氨基酸为本领域已知的,并且包括例如,氨基环己羧酸、正亮氨酸、 α -氨基n-癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、吡啶啉-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苯甲基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸以及 α -叔-丁基甘氨酸。

[0051] 本发明的实施方案的CAR可以被糖基化、酰胺化、羧酸化、磷酸化、酯化、N-酰化、经由例如二硫桥环化、或者转变为酸加成盐和/或任选地二聚化或多聚化。

[0052] 本发明的实施方案的CAR可以通过本领域已知的方法获得。可以通过制备多肽或蛋白质的任何合适的方法制得CAR。从头合成多肽和蛋白质的合适方法为本领域已知的。另外,可以使用例如Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第4版), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012) 中所述的标准重组方法,使用本文所述的核酸重组产生CAR。可选地,本文所述的CAR可以通过公司商业合成,如例如, Synpep (Dublin, CA) 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA)。在这方面,本发明的CAR可以是合成的和/或重组的。

[0053] 本发明的实施方案还提供了包含编码本文所述的任何CAR的核苷酸序列的核酸。本发明的核酸可以包含编码本文所述的前导序列、接头、抗原结合结构域、TM结构域和胞内

T细胞信号转导结构域中的人一种或多种的核苷酸序列。在本发明的实施方案中,核酸包含表2中所示的核苷酸序列中的任一种。

[0054] 表2

[0055]

核苷酸 SEQ ID NO:	氨基酸 SEQ ID NO:	抗原结合结构域	其它组分
SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 16	5F11 scFv (SEQ ID NO: 23)	(i) 人 CD28 的铰链结构域, TM 结构域和胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 13); 和 (ii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 15)
SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	5F11 scFv (SEQ ID NO: 23)	(i) 人 CD8 α 的铰链结构域和 TM 结构域 (SEQ ID NO: 11); (ii) 人 CD28 的胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 12); 和 (iii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 15)
SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	5F11 scFv	(i) 人 CD8 α 的铰链结构域和 TM 结

[0056]

核苷酸 SEQ ID NO:	氨基酸 SEQ ID NO:	抗原结合结构域	其它组分
20	18	(SEQ ID NO: 23)	构域 (SEQ ID NO: 11); (ii) 人 4-1BB 的胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 14); 和 (iii) 人 CD3 ζ 的胞内 T 细胞信号转导结构域 (SEQ ID NO: 15)

[0057] 本文使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意为DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链,合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的),其可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸,并且其可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间连键,如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键,替代存在于未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或置换。然而,在一些情况下核酸包含一个或多个插入、缺失、倒位和/或置换可能是合适的。

[0058] 本发明的实施方案的核酸可以是重组体。本文使用的术语“重组体”指(i)通过将天然的或合成的核酸区段与可在活细胞中复制的核酸分子连接而在活细胞外构建的分子,或者(ii)由以上(i)中所述的那些分子的复制而产生的分子。出于本文的目的,复制可以是体外复制或体内复制。

[0059] 核酸可以基本上由本文所述的一条或多条指定的核苷酸序列组成,以使其它组分(例如其它核苷酸)不实质性改变编码的CAR的生物活性。

[0060] 重组核酸可以是具有非天然存在的序列或者具有通过序列的两个原本分离的区段的人工组合而制备的序列的核酸。该人工组合通常通过化学合成来完成,或者更通常通过人工操纵分离的核酸区段来完成,例如通过基因工程技术来完成,诸如以上的Green等人中所述的那些技术。可以利用本领域已知的程序,基于化学合成和/或酶连接反应构建核酸。参见,例如以上的Green等人。例如,可以利用天然存在的核苷酸或者设计以增加分子的生物稳定性或者增加杂交时所形成的双链体的物理稳定性的不同修饰的核苷酸(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)来化学合成核酸。可用于产生核酸的修饰的核苷酸的实例包括但不限于:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫脲苷、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D半乳糖基Q核苷(beta-D-galactosylqueosine)、肌酐、N⁶-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N⁶-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷(beta-D-mannosylqueosine)、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N⁶-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、怀丁苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、2-巯基胞嘧啶、5-甲基-2-硫脲嘧啶、2-硫脲嘧啶、4-硫脲嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶以及2,6-二氨基嘌呤。可选地,本发明的核酸中的一种或多种可购自诸如例如Macromolecular Resources(Fort Collins,CO)和Synthegen(Houston,TX)的公司。

[0061] 核酸可以包含编码本文所述的任何CAR的任何分离或纯化的核苷酸序列。可选地,核苷酸序列可包含任何序列简并的核苷酸序列或简并序列的组合。

[0062] 本发明的实施方案还提供分离或纯化的核酸,其包含与本文所述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或者包含在严紧条件下与本文所述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0063] 在严紧条件下杂交的核苷酸序列可以在高度严紧条件下杂交。“高度严紧条件”意为核苷酸序列以可检测地比非特异性杂交更强的量与靶序列(本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高度严紧条件包括将含有准确互补序列的多核苷酸或者仅含有一些分散的错配的多核苷酸与恰巧具有匹配核苷酸序列的一些小的区域(例如3-10个碱基)的随机序列区分开的条件。此类小的互补区域比14-17个或者更多个碱基的全长互补体更易解链,并且高度严紧杂交使其易于区分。相对高度严紧的条件将包括,例如低盐和/或高温条件,如由约0.02-0.1M NaCl或等同物,在约50-70°C的温度下所提供的条件。此类高度严紧条件容忍极少(如果存在)核苷酸序列与模板或靶标链之间的错配,并且特别适合于检测本文所述的任何本发明的CAR的表达。普遍认为通过添加增加量的甲酰胺可以导致更严紧的条件。

[0064] 在本发明的实施方案中,核酸包含编码CAR的密码子优化的核苷酸序列。不受特定理论或机制的束缚,认为核苷酸序列的密码子优化增加mRNA转录本的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以涉及将天然密码子置换为编码相同氨基酸,但可以由细胞内更容易获得的tRNA翻译的另一密码子,从而提高翻译效率。核苷酸序列的优化还可以降低会干扰翻译的二级mRNA结构,从而提高翻译效率。就这点而言,编码CAR的核酸可以包含SEQ ID NO: 20-22中任一项的密码子优化的核苷酸序列。

[0065] 本发明还提供这样的核酸,其包含与本文所述的任何核酸的核苷酸序列具有至少约70%或者更多,例如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同一性的核苷酸序列。

[0066] 在实施方案中,可以将本发明的核酸并入重组表达载体中。就这点而言,本发明的实施方案提供包含本发明的任何核酸的重组表达载体。出于本文的目的,术语“重组表达载体”意为遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列,并且在足以使mRNA、蛋白、多肽或肽在宿主细胞内表达的条件下将载体与细胞接触时,其允许细胞表达mRNA、蛋白、多肽或肽。本发明的载体作为整体不是天然存在的。然而,载体的部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链的或双链的,合成的或者部分由天然来源获得的,并且其可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间连键或者这两种类型的连键。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不妨碍载体的转录或复制。

[0067] 在实施方案中,本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以被用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括设计以用于增殖和扩增或者用于表达或者用于这两种的那些载体,如质粒和病毒。载体可以选自:pUC系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)以及pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。也可使用诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149的噬菌体载体。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体。在本发明的实施方案中,载体为 γ 逆转录病毒载体、慢病毒载体或转座子。

[0068] 在实施方案中,可以使用例如以上Green等人中所述的标准重组DNA技术来制备本发明的重组表达载体。可以将环状或线性表达载体的构建体制备为含有在原核或真核宿主细胞中发挥功能的复制系统。复制系统可以来源于,例如Co1E1、2 μ 质粒、 λ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0069] 重组表达载体可以包含调控序列,如转录和翻译起始和终止密码子,视情况而定并且考虑载体是基于DNA的还是基于RNA的,其对于待引入载体的宿主细胞的类型(例如细菌、真菌、植物或动物)是特异的。重组表达载体可以包含限制位点以促进克隆。

[0070] 重组表达载体可以包含允许对转化或转染的宿主细胞进行选择的一种或多种标志物基因。标志物基因包括抗微生物剂抗性(例如对抗生素、重金属等的抗性),在营养缺陷型宿主中互补以提供原营养等。用于本发明的表达载体的合适的标志物基因包括,例如新

霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因以及氨苄西林抗性基因。

[0071] 重组表达载体可以包含与以下序列可操作地连接的天然或非天然的启动子:编码本发明的CAR的核苷酸序列或者与编码本发明的CAR的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,例如强、弱、可诱导的、组织特异性的和发育特异性的,在本领域普通技术人员的能力内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在本领域普通技术人员的能力内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子或鼠干细胞病毒的长末端重复中存在的启动子。

[0072] 可以将本发明的重组表达载体设计为瞬时表达、稳定表达或者设计为这两种。另外,可以将重组表达载体制备为组成型表达或诱导型表达。

[0073] 此外,可以将重组表达载体制备为包含自杀基因。本文使用的术语“自杀基因”指引起表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是这样的基因,其赋予基因在其中表达的细胞针对试剂(例如药物)的敏感性,并且当细胞与所述试剂接触或者暴露于所述试剂时引起细胞死亡。自杀基因为本领域已知的,并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0074] 本发明的实施方案还提供包含本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。本文使用的术语“宿主细胞”指可以含有本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类;或者可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即直接由生物体如人分离到的细胞。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域已知的,并且包括,例如DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞可以是原核细胞,例如DH5 α 细胞。出于产生CAR的目的,宿主细胞可以是哺乳动物细胞。宿主细胞可以是人细胞。尽管宿主细胞可以是任何类型的细胞、可以来源于任何类型的组织,并且可以处于任何发育阶段,但是宿主细胞可以是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。宿主细胞可以是B细胞、自然杀伤(NK)细胞或T细胞。

[0075] 出于本文的目的,T细胞可以是任何T细胞,如培养的T细胞,例如原代T细胞;或者是来自培养的T细胞系的T细胞,例如Jurkat、SupT1等;或者是获自哺乳动物的T细胞。如果获自哺乳动物,T细胞可以获自多种来源,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或者其它组织或液体。T细胞也可以是富集的或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是分离自人的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞,并且可以处于任何发育阶段,包括但不限于CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助T细胞(例如Th₁和Th₂细胞)、CD8⁺T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、初始T细胞等。T细胞可以是CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。

[0076] 本发明的实施方案还提供包含至少两种本文所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是除了至少一种其它细胞外还包含含有任何所述重组表达载体的宿主细胞的异质群,所述其它细胞例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或者除了T细胞之外的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。可选地,细胞群可以是基本同质的群体,其中所述群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本上由含有重组表达载体的宿主细胞组成)。群体也可以是克隆

细胞群,其中群体的所有细胞均为含有重组表达载体的单个宿主细胞的克隆,以使群体的所有细胞均包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群为包含含有本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0077] 在本发明的实施方案中,群体中细胞的数目可以快速扩增。表达CAR的细胞的数目的扩增可以通过如以下中所述的本领域已知的多种方法中的任一种来完成,例如美国专利8,034,334;美国专利8,383,099;美国专利申请公开号2012/0244133;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);以及Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)。在实施方案中,通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2和饲养PBMC(例如受辐射的同种异体PBMC)一起培养来进行细胞数目的扩增。

[0078] CAR、功能变体、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体)在下文中统称为“本发明的抗CD30材料”,其可以是分离的和/或纯化的。本文使用的术语“分离的”意为已从其天然环境中移出。术语“纯化的”或“分离的”不要求绝对的纯度或分离;而是其意图作为相对术语。因此,例如纯化的(或分离的)宿主细胞制备物是一种这样的制备物,其中宿主细胞比其体内天然环境中的细胞更纯。此类宿主细胞可以,例如通过标准纯化技术产生。在一些实施方案中,将宿主细胞制备物进行纯化,以使宿主细胞代表制备物总细胞含量的至少约50%,例如至少约70%。例如,纯度可以是至少约50%,可以高于约60%、约70%或约80%,或者可以是约100%。

[0079] 可以将本发明的抗CD30材料配制为组合物,如药物组合物。就这点而言,本发明的实施方案提供包含本文所述的任何本发明的抗CD30材料以及药学可接受的载体的药物组合物。含有任何本发明的抗CD30材料的本发明的药物组合物可以包含多于一种本发明的抗CD30材料,例如CAR和核酸。可选地,药物组合物可以包含与其它药学活性剂或药物组合的本发明的CAR材料,所述其它药学活性剂或药物如化疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉酚、利妥昔单抗、长春花碱、长春新碱等。在优选的实施方案中,药物组合物包含本发明的宿主细胞或其群体。

[0080] 优选地,载体是药学可接受的载体。就药物组合物而言,载体可以是常规用于所考虑的具体的本发明的CAR材料的那些载体中的任何载体。制备可施用组合物的方法为本领域技术人员已知的或显而易见的,并且更详细地描述于,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press(2012)。优选地,药学可接受的载体是在使用条件下,无有害副作用或毒性的载体。

[0081] 载体的选择将部分由具体的本发明的CAR材料以及由用于施用本发明的CAR材料的具体方法决定。因此,存在多种合适的本发明的药物组合物的制剂。合适的制剂可以包括用于肠胃外、皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、瘤内或腹膜内施用的那些制剂中的任何制剂。可以使用多于一种途径来施用本发明的CAR材料,并且在某些情况下,特定途径可以比另一途径提供更直接以及更有效的应答。

[0082] 优选地,通过注射,例如静脉内施用本发明的CAR材料。当本发明的CAR材料为表达本发明的CAR的宿主细胞(或其群体)时,用于注射的细胞的药学可接受的载体可以包括任何等张载体,如例如生理盐水(含约0.90%w/v NaCl的水,含约300mOsm/L NaCl的水,或者每升水约9.0gNaCl)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、含约5%葡萄糖的水或者乳酸林格氏液。在实施方案中,用人血清

白蛋白补充药学可接受的载体。

[0083] “有效量”或“治疗有效量”指足以预防或治疗个体癌症的剂量。用于治疗或预防用途的有效量将取决于，例如被治疗的病况的阶段和严重程度，患者的年龄、体重和整体健康状况，以及处方医师的判断。剂量的大小也将通过选定的抗CD30材料、施用方法、施用的时间和频率、可能伴随施用具体的抗CD30材料的任何不良副作用的存在、性质和程度，以及期望的生理效果来确定。本领域技术人员将理解的是，不同的病况（例如，癌症）可能需要涉及多次施用的延长治疗，可能在每次施用或多轮施用中使用本发明的抗CD30物质。

[0084] 本发明的CAR材料的剂量也将由可能伴随施用具体的本发明的CAR材料的任何不良副作用的存在、性质和程度决定。通常，主治医师将考虑多种因素，如年龄、体重、整体健康、饮食、性别、待施用的本发明的CAR材料、施用途径以及被治疗的病况的严重程度，来决定用于治疗各个体患者的本发明的CAR材料的剂量。在本发明的CAR材料是细胞群的实施方案中，每次输注施用的细胞的数目可以不同，例如从约 1×10^6 至约 1×10^{12} 个细胞或更多。

[0085] 出于本发明的目的，施用的本发明的抗CD30材料的量或剂量应当足以在合理的时间框内在对象或动物中产生治疗应答或预防应答。例如，本发明的抗CD30材料的剂量应当足以在离施用时间约2小时或更长，例如约12至约24或者更多个小时的时间段内结合CD30，或者治疗或预防病况。在某些实施方案中，时间段甚至可能更长。剂量将由具体的本发明的抗CD30材料的效力和哺乳动物（例如人）的情况以及待治疗的哺乳动物（例如人）的体重决定。

[0086] 出于本发明的目的，可以使用下述分析来确定向哺乳动物施用的起始剂量：其包括例如比较各给予不同剂量的表达本发明的CAR的T细胞的一组哺乳动物中，在向哺乳动物施用给定剂量的此类T细胞时，靶细胞裂解的程度和/或此类T细胞分泌IFN- γ 的程度。可以通过本领域已知的方法来分析施用某一剂量时，靶细胞裂解和/或IFN- γ 分泌的程度。

[0087] 当将本发明的抗CD30材料与一种或多种另外的治疗剂一起施用，一种或多种另外的治疗剂可以共施用至哺乳动物。“共施用”意为在时间上足够接近地施用一种或多种另外的治疗剂和本发明的CAR材料，以使本发明的抗CD30材料可以增强一种或多种另外的治疗剂的作用，反之亦然。就这点而言，可以首先施用本发明的抗CD30材料，之后施用一种或多种另外的治疗剂，反之亦然。可选地，可以同时施用本发明的抗CD30材料和一种或多种另外的治疗剂。可以增强表达CAR的细胞功能的另外的治疗剂可以包括，例如，一种或多种细胞因子或者一种或多种抗体（例如，抑制PD-1功能的抗体）。可以与抗CD30材料共施用的示例性治疗剂为IL-2。不受特定理论或机制的束缚，认为IL-2可以增强本发明的抗CD30材料的治疗效果。

[0088] 考虑可以将本发明的抗CD30材料和药物组合物用于治疗或预防哺乳动物中的病况的方法中。不受特定理论或机制的束缚，本发明的抗CD30CAR具有生物活性，例如识别CD30的能力，以使当由细胞表达时，抗CD30CAR能够介导针对表达CD30（抗CD30CAR对其具有特异性）的细胞的免疫应答。就这点而言，本发明的实施方案提供治疗或预防哺乳动物中的病况的方法，其包括向哺乳动物施用有效治疗或预防哺乳动物中的病况的量的本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和/或药物组合物中的任一种。病况可以为以CD30的表达或过表达为特征的任何病况。在优选的实施方案中，病况为癌症。

[0089] 本发明的实施方案还包括在施用本发明的抗CD30材料前，对哺乳动物进行淋巴细

胞清除。淋巴细胞清除的实例包括但不限于：非骨髓根除性淋巴细胞清除化疗、骨髓根除性淋巴细胞清除化疗、全身辐射等。

[0090] 出于其中施用宿主细胞或细胞群的本发明的方法的目的，细胞可以是与哺乳动物同种异体的细胞或是其自体的细胞。优选地，细胞是哺乳动物自体的。

[0091] 本文提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。本文使用的术语“哺乳动物”指任何哺乳动物，包括但不限于啮齿目的哺乳动物，如小鼠和仓鼠；以及兔形目的哺乳动物，如兔。哺乳动物可以来自食肉目，包括猫科(猫)和犬科(狗)。哺乳动物可以来自偶蹄目，包括牛科(牛)和猪科(猪)；或者来自奇蹄目，包括马科(马)。哺乳动物可以来自灵长目、猿(Ceboids)目或猴(Simoids)目(猴)，或者来自类人猿目(人和类人猿)。优选地，哺乳动物为人。

[0092] 就本发明的方法而言，癌症可以为任何癌症。优选地，癌症为淋巴瘤。在特别优选的实施方案中，癌症为B细胞淋巴瘤(如例如，弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤、纵隔灰区淋巴瘤和结节硬化型HL)或T细胞淋巴瘤(如例如，间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、外周T细胞淋巴瘤-非特指型(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)和其它T细胞淋巴瘤)。优选地，癌症的特征在于CD30的表达或过表达。

[0093] 本文使用的术语“治疗”和“预防”以及由其衍生的词语不一定意指100%或完全的治疗或预防。而是，存在本领域普通技术人员认为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这方面，本发明的方法可以提供任何量任何水平的哺乳动物中病况的治疗或预防。此外，本发明的方法提供的治疗或预防可以包括被治疗或预防的疾病(例如癌症)的一种或多种病况或症状的治疗或预防。另外，出于本文的目的，“预防”可以涵盖延迟疾病，例如癌症或其症状或病况的发作。可选地或另外，“预防”可以涵盖延迟疾病，例如癌症或其症状或病况的复发。

[0094] 在本发明的实施方案中，将编码本发明的CAR的核酸引入本文所述的任何载体中。然后，通过任何合适的技术，如例如，基因编辑、转染、转化或转导，可以将载体继而引入到本文所述的任何宿主细胞(例如，NK细胞或T细胞)中。许多转染技术为本领域已知的，并且包括，例如，磷酸钙DNA共沉淀；DEAE-葡聚糖；电穿孔；阳离子脂质体介导的转染；钨颗粒促进的微粒轰击；和磷酸锆DNA共沉淀。在感染性颗粒在合适的包装细胞(它们中的许多为可商购获得的)中生长之后，可以将噬菌体或病毒载体引入宿主细胞中。

[0095] 其中已经引入了编码本发明的CAR的载体的一种或多种分离的宿主细胞(例如，NK细胞或T细胞)可以在表达本发明的抗CD30CAR的条件下离体培养，然后将其直接转移到表达CD30的癌症影响的哺乳动物(优选人)中。此类细胞转移方法在本领域中被称作“过继性细胞转移(ACT)”。

[0096] 当向哺乳动物施用宿主细胞(例如，T细胞或NK细胞)时，细胞可以是哺乳动物同种异体的或自体的。在“自体的”施用方法中，将细胞从哺乳动物中取出，储存(并任选地进行修饰)，并返回至同一哺乳动物中。在“同种异体的”施用方法中，哺乳动物接受来自基因相似但不同供体的细胞。优选地，细胞为哺乳动物自体的。在本发明的实施方案中，向哺乳动物施用的细胞已经经历了基因编辑。

[0097] 本发明的另一实施方案提供本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或药物组合物的任何一种，其用于治疗或预防哺乳动物中的病况的用途，其中所述病况为

癌症。癌症可以为本文结合本发明的其它方面所述的任何癌症。

[0098] 下述实施例进一步阐明本发明,但是当然不应当被解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0099] 下述材料和方法用于实施例1-11所述的实验中。

[0100] 细胞系和原代细胞

[0101] 在这些实验中使用的CD30⁺靶细胞为CD30⁺淋巴瘤细胞系SU-DHL-1(淋巴瘤,美国典型培养物保藏中心(ATCC))、HH(T细胞淋巴瘤,ATCC)和HDLM-2(霍奇金淋巴瘤,DSMZ)。通过使用 γ 逆转录病毒载体MSGV(Hughes等人,Human Gene Ther.,16(4):457-472(2005))用CD30的基因转导被称为bv173的白血病细胞系(来自NHLBI的Adrian Wiestner的友好赠送)以提供另一CD30⁺靶标(CD30-bv173)。使用下述CD30阴性细胞系:白血病细胞系ngfr-bv173(通过使用MSGV γ 逆转录病毒载体,用低亲和力的神经生长因子基因转导的bv173)、T细胞白血病细胞系CCRF-CEM(ATCC)、Saos-2(骨髓肉瘤细胞系,ATCC);A549(肺癌细胞系,ATCC);MDA-MB231(乳腺癌细胞系,ATCC)、293GP(人胚胎肾细胞系,来自国家癌症研究所(NCI)的Steven Rosenberg的友好赠送)、TC71(尤文氏肉瘤细胞系,来自NCI的S.A.Rosenberg的友好赠送)、COL0205(结肠癌细胞系,NCI肿瘤库)、U251(胶质母细胞瘤细胞系,NCI肿瘤库)和Panc10.05(胰腺癌细胞系,ATCC)。来自患者的原代人CD34⁺造血干细胞也被用作靶标。使用来自登记在NCI IRB批准的临床试验中的患者的组织样品或外周血单核细胞(PBMC)来起始T细胞培养。

[0102] 定量CD30转录本拷贝的实时qPCR

[0103] 通过用CD30特异性引物和探针组(Invitrogen,Waltham,MA)进行qPCR来定量来自人正常定量聚合酶链式反应(qPCR)阵列(Origene,Rockville,MD)中包含的48个人组织的cDNA样品中的CD30cDNA拷贝。作为阳性对照,定量CD30⁺淋巴瘤细胞系HH的cDNA中的CD30cDNA拷贝。用RNeasy微型试剂盒(Qiagen,Venlo,Netherlands)从浆细胞瘤细胞中提取RNA,并用标准方法合成cDNA。通过扩增编码CD30的全长cDNA的质粒(Origene)的稀释物产生CD30qPCR的标准曲线。qPCR准确检测各反应中10至10⁹个拷贝CD30的拷贝数。还使用TAQMAN β -肌动蛋白引物和探针试剂盒(Applied Biosystems,Grand Island,NY)定量相同组织中 β -肌动蛋白cDNA拷贝的数目。通过扩增 β -肌动蛋白质粒的系列稀释物产生 β -肌动蛋白标准曲线。所有的qPCR反应均在Roche LightCycler480机器上进行。数据表示为CD30cDNA拷贝/100,000个肌动蛋白cDNA拷贝。

[0104] 抗CD30嵌合抗原受体(CAR)的构建

[0105] 4种抗人CD30抗体的序列获自多个专利。使用的特定抗体序列来自全人5F11和17G1抗体(美国专利7,387,776)、AC10鼠抗体(美国专利申请公开号2005/0123536)和人源化XmAb2513抗体(美国专利申请公开号2012/0014943)。通过接种对人免疫球蛋白基因是转基因的HuMab小鼠来获得5F11和17G1抗体。小鼠为针对人免疫球蛋白基因而转基因的,因此小鼠产生全人抗体。通过用人CD30接种小鼠获得cAC10鼠抗体,并且XmAb2513为人源化形式的cAC10。使用这些抗体的重链和轻链可变区序列来设计具有下述模式的单链可变片段(scFv):轻链可变区-接头-重链可变区。接头具有下述氨基酸序列:GSTSGSGKPGSGEGSTKG

(SEQ ID NO:10) (Kochenderfer等人, *J. Immunother.*, 32 (7) :689-702 (2009))。

[0106] 设计的第一抗CD30CAR DNA被命名为5F11-CD8BBZ (SEQ ID NO:18)。该CAR的序列从5'端到3'端遵循该模式:CD8 α 前导序列 (SEQ ID NO:9)、5F11scFv (SEQ ID NO:23)、人CD8 α 分子的铰链和TM区 (SEQ ID NO:11)、4-1BB (CD137) 分子的胞质部分 (SEQ ID NO:14) 和CD3 ζ 分子的胞质部分 (SEQ ID NO:15)。合成了两种形式的5F11-CD8BBZ。一种形式包括含有N-末端RFVSS氨基酸序列 (SEQ ID NO:19) 的4-1BB序列;而另一种形式缺乏RFVSS序列 (SEQ ID NO:19)。设计的下一CAR与5F11-CD8BBZ相同,除了scFv具有来自17G1抗体的可变区。接下来设计了一系列含CD28的CAR。通过用CD28分子的胞质结构域 (SEQ ID NO:12) 替代5F11-CD8BBZ的4-1BB部分来设计5F11-CD828Z (SEQ ID NO:17)。然后设计5F11-28Z (SEQ ID NO:16)。该CAR从5'至3'端具有下述模式:CD8 α 前导序列 (SEQ ID NO:9)、5F11scFv (SEQ ID NO:23)、人CD28分子的铰链和TM及胞质区 (SEQ ID NO:13) 以及CD3 ζ 分子的胞质部分 (SEQ ID NO:15)。通过用AC10或XmAb2513scFv替代5F11-28Z的5F11scFv来分别构建AC10-28Z和XmAb2513-28Z。

[0107] 还构建了含有识别半抗原2,4,6-三硝基苯基的SP6scFv的阴性对照CAR (Eshhar等人, *PNAS*, 90 (2) :720-724 (1993))。该CAR被称为SP6-CD828Z。先前已经报道了SP6CAR,并且其含有CD8 α 铰链和TM区、CD28的胞质部分和CD3 ζ 分子的信号转导结构域 (Carpenter等人, *Clin. Cancer Res.*, 19 (8) :2048-2060 (2013))。SP6-CD828Z CAR不识别鼠或人类蛋白质,并被用作阴性对照。

[0108] 编码所有CAR序列的DNA为密码子优化的 (co), 并通过Invitrogen (GeneArt) 合成为具有合适的限制性位点。将CAR序列连接到命名为pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE (Yang等人, *J. Immunother.*, 33 (6) :648-658 (2010)) 的慢病毒载体质粒。通过使用标准限制酶和连接方法用CAR序列替代该载体的coDMF5部分。

[0109] 慢病毒上清液的产生

[0110] 通过遵循先前公开的方案的稍微修改形式产生含有编码各CAR的慢病毒的上清液 (Yang等人, *J. Immunother.*, 33 (6) :648-658 (2010))。为产生上清液,如先前详述用下述质粒转染293T-17细胞 (ATCC):pMD2.G (编码水疱性口炎病毒包膜)、pMDLg/pRRE (编码gag和pol)、pRSV-Rev (编码Rev) 和适当的编码CAR的质粒 (Yang等人, *J. Immunother.*, 33 (6) :648-658 (2010))。在转染之后,将转染的293T-17细胞培养大约40小时。然后收集培养物上清液,并离心以去除细胞碎片。然后通过使用来自Merk Millipore Ltd. (Billerica, MA) 的AmiCON Ultra-15超滤器装置对上清液进行超滤。

[0111] T细胞转导

[0112] 以与先前所述类似的方式培养T细胞 (Kochenderfer等人, *J. Immunother.*, 32 (7) :689-702 (2009))。简言之,在含有5%人AB血清 (Valley Biomedical, Winchester, VA) 和300个国际单位 (IU) /ml的白细胞介素-2 (IL-2, Chiron (Emeryville, CA)) 的AIM V培养基 (Invitrogen) 中用抗CD3单克隆抗体OKT3 (Ortho, Rochester, NY) 刺激PBMC。在开始培养之后22-26小时,计数活化的PBMC并对其进行离心。在将细胞离心之后,将培养基从沉淀的细胞中取出并保存。将细胞重新悬浮 (以 1×10^6 个细胞/ml) 在起始培养物的相同培养基中,并将慢病毒载体与硫酸鱼精蛋白一起添加至培养基中。将细胞以 4×10^6 个T细胞/孔在6孔组织培养板 (Corning, Corning, NY) 中培养。然后将细胞在37°C培养大约48小时。然后,将细胞离

心、倾析,并以 0.5×10^6 /mL重新悬浮于新鲜的AIM V培养基+5%人AB血清+300IU/mL IL-2中进行培养。每2至3天将细胞浓度调节至 $.5 \times 10^6$ 个T细胞/mL。

[0113] 通过蛋白L染色在转导的T细胞上进行CAR检测

[0114] 将细胞洗涤,并悬浮于荧光激活细胞分选(FAC)缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)+0.1%叠氮化钠和0.4%牛血清白蛋白(BSA))中。添加生物素标记的蛋白L(GenScript, Piscataway, NJ)以检测细胞表面CAR scFv。将细胞在4℃孵育30分钟并洗涤两次。将细胞悬浮在FAC缓冲液中并用正常小鼠IgG(Invitrogen)封闭。然后用藻红蛋白(PE)标记的链霉亲和素(BD Pharmingen, San Jose, CA)、抗CD4(eBioscience, San Diego, CA)、抗CD8(eBioscience)、抗CD30(BD Pharmingen)和抗CD3(eBioscience)对细胞进行染色。用LSRII流式细胞仪(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)进行流式细胞术采集,并用FLOWJO软件(Treestar, Inc. Ashland, OR)进行分析。表达CAR(CAR⁺)的T细胞的百分比被计算为,在各实验中用蛋白L染色的CAR转导的培养物中的T细胞的百分比减去来自相同供体的用蛋白L染色的同样培养的未转导的T细胞的百分比。通过使用标准方法用来自BD Biosciences的抗CD30抗体对T细胞的CD30进行染色。

[0115] 干扰素 γ ELISA

[0116] 将CD30⁺或CD30阴性靶细胞与CAR转导的T细胞组合于96孔圆底板的孔的AIM-V培养基+5%人血清中,一式两份。将板在37℃孵育18-20小时。在孵育之后,通过使用标准方法(Pierce, Waltham, MA)进行针对IFN γ 的ELISA。

[0117] CD107a分析

[0118] 对于所测试的各T细胞培养物,制备两管。一管含有CD30⁺靶细胞,另一管含有CD30阴性靶细胞。两个管均含有CAR转导的T细胞,1mL AIM-V培养基+5%人AB血清,滴定浓度的抗CD107a抗体(eBioscience, clone eBioH4A3)和1 μ L GOLGISTOP蛋白转运抑制剂(莫能菌素, BD Biosciences)。将所有管在37℃孵育4小时,然后针对CD3、CD4和CD8染色。

[0119] 增殖分析

[0120] 在24孔板中建立培养物。包含在培养物中的靶细胞为 0.5×10^6 个辐射的CD30⁺细胞或 0.5×10^6 个辐射的CD30阴性细胞。培养物还包括来自表达抗CD30CAR的培养物的 0.75×10^6 个T细胞。如先前所述(Mannering等人, J. Immunol. Methods, 283(1-2):173-183(2003)),用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE, Invitrogen)标记T细胞。培养物中使用的培养基为AIM V+5%人AB血清。IL-2未添加到培养基中。在起始之后四天,采用用于排除死细胞的台盼蓝,计数各培养物中的活细胞,并且如“在通过蛋白L染色在转导的T细胞上进行CAR检测”中所述进行流式细胞术。

[0121] 细胞毒性分析

[0122] 如先前所述(Kochenderfer等人, J. Immunother., 32(7):689-702(2009)),进行细胞毒性分析。通过比较CD30⁺HH淋巴瘤细胞的存活相对于阴性对照CCRF-CEM细胞的存活来测量细胞毒性。将这两种细胞类型与CAR转导的T细胞组合于同一管中。用荧光染料5-(和-6)-(((4-氯甲基)苯甲酰基)氨基)四甲基若丹明(CMTMR)(Invitrogen)标记CCRF-CEM阴性对照细胞,并用CFSE标记CD30⁺HH淋巴瘤靶细胞。在无菌的5mL试管(BD)中一式两份建立在多种T细胞与靶细胞比率下的T细胞+靶细胞培养物。包含在管中的靶细胞为50,000个CD30⁺HH细胞以及50,000个CCRF-CEM阴性对照细胞。将培养物在37℃孵育4小时。在孵育之后立即

添加7AAD (7-氨基-放线菌素D) (BD), 并进行流式细胞术采集。对于每种T细胞+靶细胞培养物, 通过将活HH细胞的百分比除以活CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比来确定CD30⁺HH靶细胞的存活百分比。通过将各T细胞+靶细胞培养物中的HH靶细胞的存活百分比除以在仅含有HH靶细胞和CCRF-CEM细胞而无效应T细胞的管中活HH靶细胞的百分比与活CCRF-CEM阴性对照细胞的百分比之比来计算校正的HH靶细胞的存活百分比。这种校正对于解释起始细胞数目的变化和自发靶细胞死亡是必要的。如下计算细胞毒性: CD30⁺HH靶细胞的细胞毒性百分比 = 100 - 校正的CD30⁺HH靶细胞的存活百分比。

[0123] 实施例1

[0124] 本实施例证明CD30RNA在正常人组织中不存在或以非常低的水平表达。

[0125] 通过qPCR对从48个正常人组织的RNA制备的一组cDNA样品进行CD30表达分析(图1A和1B)。结果显示CD30在正常人组织中不存在或以非常低的水平表达。这些qPCR结果与其它研究者进行的广泛的先前免疫组织化学工作(Schwartz等人, Blood, 74(5):1678-1689(1989); Ito等人, American J. Pathol., 145(2):276-280(1994); Falini等人, Blood, 85(1):1-14(1995))一致。值得注意的是, 通过qPCR检测到的具有低水平CD30RNA表达的少数器官在由其它研究者进行的实验中通过免疫组织化学为CD30阴性的(Schwartz等人, Blood, 74(5):1678-1689(1989); Ito等人, American J. Pathol., 145(2):276-280(1994); Falini等人, Blood, 85(1):1-14(1995))。该先前的免疫组织化学工作显示除了妊娠子宫的蜕膜细胞外, 主要人体器官的细胞上不表达CD30(Ito等人, American J. Pathol., 145(2):276-280(1994))。

[0126] 实施例2

[0127] 本实施例证明细胞系、原代人CDD34⁺细胞和原代人外周血单核细胞的表面上是否存在CD30表达。

[0128] 其它研究者已经在几种不同类型的淋巴瘤, 包括霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、一些B细胞淋巴瘤和几种类型的T细胞淋巴瘤的表面上检测到CD30(Stein等人, Blood, 66(4):848-858(1985); Schwartz等人, Blood, 74(5):1678-1689(1989); Falini等人, Blood, 85(1):1-14(1995))。通过流式细胞术在一系列细胞系的表面上分析CD30表达。发现一些细胞系, 如HH淋巴瘤细胞系, 表达高水平的CD30。一些其它细胞系, 如COL0205细胞系, 不表达CD30。ngfr-bv173细胞系不表达CD30。CD30-bv173细胞系(其被转导以表达CD30)不表达CD30。还在原代人CDD34⁺细胞和原代人外周血单核细胞上评估了CD30表达; CD34⁺细胞和PBMC均不表达CD30。

[0129] 实施例3

[0130] 本实施例证明CAR的T细胞表面表达, 每种CAR掺入来源于5F11、AC10和XmAb2513抗体的scFv之一。

[0131] 产生了掺入4种不同的抗CD30单链可变片段(scFv)中的每一种之一的CAR。这些scFv来源于4种不同的单克隆抗体: 17G1、5F11、AC10和XmAb2513。掺入17G1来源的scFv的CAR在T细胞上未以高水平表达, 并且没有进行广泛研究。在体外广泛研究了掺入来源于5F11、AC10和XmAb2513抗体中的每一种之一的scFv的CAR。为了评价不同的scFv, 使用在C-末端具有来自CD28共刺激分子和CD3 ζ T细胞活化分子的铰链、TM和胞质区的CAR设计。

[0132] 首先, 通过流式细胞术比较掺入来自5F11、AC10和XmAb2513抗体中的每一种之一

的scFv的CAR的T细胞表面表达。在第0天用抗CD3抗体OKT3刺激人T细胞。在第1天用编码5F11-28Z、AC10-28Z或XmAb2513-28Z的慢病毒转导T细胞。作为对照,将一些T细胞保持不转导。使T细胞在含有IL-2的培养基中增殖。在第7天,用蛋白L、CD3、CD4、CD8和CD30对细胞进行染色,并通过流式细胞术分析。所有三种CAR均在T细胞上高水平表达,并且3种不同CAR的表面表达水平几乎相同。表A中显示了表达CD8和CAR的细胞的百分比。图针对活的CD3⁺淋巴细胞设门。用来自2名不同患者的细胞获得了类似结果。

[0133] 表A

[0134]

		CD8 ⁺ CAR ⁺	CD8 ⁻ CAR ⁻	CD8 ⁺ CAR ⁻	CD8 ⁻ CAR ⁺
转导有 CAR的 细胞	5F11-28Z	80.70	1.04	2.42	15.80
	AC10-28Z	61.90	1.02	3.60	33.50
	XmAb2513-28Z	64.70	1.16	3.50	30.60
对照	未转导的	1.44	30.70	66.30	1.48

[0135] 实施例4

[0136] 本实施例证明表达5F11-28Z CAR的T细胞在功能上优于表达AC10-28Z CAR或XmAb2513CAR的T细胞。

[0137] 评价了表达CD30的总T细胞的百分比,因为活化的T细胞表达CD30 (Horie等人, Seminars in immunology, 10 (6):457-470 (1998)),所以在表达抗CD30-CAR的T细胞的培养物中可能发生CD30⁺T细胞的清除。用实施例3中用于评价CAR表达的相同的T细胞培养物评价表达CD30的总T细胞的百分比。

[0138] 发现与AC10-28Z转导的T细胞、XmAb2513-28Z转导的T细胞和未转导的T细胞的培养物相比,在5F11-28Z转导的T细胞的培养物中CD30⁺T细胞大大减少。表B中显示了表达CD8和CD30的细胞的百分比。图针对活的CD3⁺淋巴细胞设门。表B显示与未转导的T细胞或转导有编码AC10-28Z或XmAb-28Z的基因的T细胞相比,转导有5F11-28Z的基因的T细胞中表达CD30的细胞的百分比低得多。在6个实验中获得了类似结果。这些结果表明,在从培养物中清除CD30⁺T细胞时,5F11-28Z转导的T细胞比AC10-28Z转导的T细胞或XmAb2513-28Z转导的T细胞更有效。

[0139] 表B

[0140]

		CD8 ⁺ CD30 ⁺	CD8 ⁻ CD30 ⁻	CD8 ⁺ CD30 ⁻	CD8 ⁻ CD30 ⁺
转导有 CAR的 细胞	5F11-28Z	2.65	15.30	81.40	0.63
	AC10-28Z	27.70	16.90	39.00	16.40
	XmAb2513-28Z	30.80	13.70	38.90	16.60
对照	未转导的	10.50	19.60	57.50	12.40

[0141] 对来自实施例2和表A的实验中评估的相同培养物的细胞的脱粒进行评估。将T细

胞与CD30⁺靶细胞SUDHL-1一起培养4小时。CD107a分子是T细胞脱粒的标志物。在培养物中包含针对CD107a的抗体以检测脱粒。还针对细胞的CD3和CD8进行染色。图针对活的CD3⁺淋巴细胞设门。

[0142] 表C显示表达CD8和CD107a的细胞的百分比。如表C中所示,与AC10-28Z或XmAb2513-28Z转导的细胞相比,5F11-28Z转导的T细胞显示更大的CD30特异性脱粒。用来自2名不同供体的细胞获得了类似结果。

[0143] 表C

[0144]

		CD8 ⁺ CD107a ⁺	CD8 ⁻ CD107a ⁻	CD8 ⁺ CD107a ⁻	CD8 ⁻ CD107a ⁺
转 有 的 细 胞	5F11-28Z	47.40	11.50	36.70	4.32
	AC10-28Z	6.18	35.00	57.40	1.34
	XmAb2513-28Z	7.72	29.80	60.60	1.86
对照	未转导的	0.62	29.80	68.30	1.32

[0145] 在酶联免疫吸附测定(ELISA)中测量与靶细胞共培养时CD30特异性干扰素 γ (IFN γ)的释放。与AC10-28Z或XmAb2513-28Z转导的细胞相比,5F11-28Z转导的T细胞显示更大的CD30特异性IFN γ 释放(表D-1)。表D-1中的SUDHL-1、HH和CD30-bv173为CD30⁺细胞系。表D-1中的NGFR-bv173和CCRF-CEM为CD30阴性细胞系。表D-1中的值是在培养期结束时释放的pg/mL的IFN γ 。通过用蛋白L对CAR转导的T细胞和未转导的T细胞进行染色,并从各CAR转导的T细胞群的蛋白L染色%减去未转导的T细胞的蛋白L染色%,确定表达各CAR的T细胞百分比(表D-2)。

[0146] 这些结果确认表达5F11-28Z的T细胞在功能上优于表达AC10-28Z或XmAb2513的T细胞。

[0147] 表D-1

[0148]

T 细胞表达的 CAR	靶标					
	SUDHL-1	HH	CD30-bv173	NGFR-bv173	CEM	单独的 T 细胞 (对照)
5F11-28Z	25468	78624	3781	33	31	13
AC10-28Z	4849	8136	538	14	12	<12
XmAb2513-28Z	2444	4699	388	13	12	<12
未转导的	17	29	39	26	16	<12

[0149] 表D-2

[0150]

T细胞表达的CAR	表达CAR的T细胞的%
5F11-28Z	93.6
AC10-28Z	92.5
XmAb2513-28Z	92.3
未转导的	0

[0151] 实施例5

[0152] 本实施例证明5F11-28Z和5F11-CD828Z CAR的CD30特异性功能。

[0153] 由于含有5F11scFv的T细胞的功能优势,用该CAR进行进一步的实验。设计含有5F11scFv的三种CAR (2A-2C)。5F11-28Z和5F11-CD828Z的CD30特异性功能在IFN γ ELISA分析中确认(表E-1)。将表E-1中的表达CAR的T细胞与靶细胞一起培养过夜,然后进行IFN γ ELISA。表E-1中的SUDHL-1和HDLM-2为CD30⁺细胞系。表E-1中的NGFR-bv173、CCRF-CEM和293GP为CD30阴性细胞系。表E-1中的值为在培养期结束时释放的pg/mL的IFN γ 。通过用蛋白L对CAR转导的T细胞和未转导的T细胞进行染色,并从各CAR转导的T细胞群的蛋白L染色%减去未转导的T细胞的蛋白L染色%,来确定表达各CAR的T细胞的百分比(表E-2)。

[0154] 表E-1

[0155]

T 细胞表达的 CAR	靶标					
	SUDHL-1	HDLM-2	NGFR-bv173	CCRF-CEM	293GP	单独的 T 细胞(对 照)
5F11-28Z	3489	3534	14	23	176	<12
5F11-CD828Z	2296	3009	<12	<12	100	<12
未转导的	13	20	30	<12	137	<12

[0156] 表E-2

[0157]

T细胞表达的CAR	表达CAR的T细胞的%
5F11-28Z	95.8
5F11-CD828Z	97.1
未转导的	0

[0158] 实施例6

[0159] 本实施例证明与5F11-CD8BBZ CAR相比,5F11-28Z和5F11-CD828Z CAR提供优良的CD30特异性活性。

[0160] 用三种不同的CAR (5F11-28Z、5F11-CD828Z或5F11-CD8BBZ) 中的一种转导T细胞。将CAR转导的T细胞与CD30⁺靶细胞CD30-bv173或CD30阴性细胞系ngfr-bv173一起培养4小时。在培养物中包含针对CD107a的抗体以检测脱粒。还针对细胞的CD3和CD8进行染色。图针对活的CD3⁺淋巴细胞设门。

[0161] 与含有4-1BB的CAR 5F11-CD8BBZ相比,含有CD28的CAR5F11-28Z和5F11-CD828Z针对CD30⁺靶细胞以更大的程度脱粒;此外,与5F11-CD8BBZ相比,含有CD28的CAR针对CD30阴性靶标具有较少的背景脱粒(表F-1和F-2)。表F-1显示与CD30⁺靶细胞CD30-bv173共培养时表达CD8和CD107a的细胞的百分比。表F-2显示与CD30阴性细胞系ngfr-bv173共培养时表达CD8和CD107a的细胞的百分比。在2名不同的供体中见到了类似结果。本实验中使用的T细胞的细胞表面CAR表达为:5F11-28Z,95.8%;5F11-CD828Z,96.0%;5F11-CD8BBZ,93.2%。

[0162] 表F-1

[0163] CD30-bv173靶标

		CD8 ⁺ CD107a ⁺	CD8 ⁺ CD107a ⁻	CD8 ⁻ CD107a ⁺	CD8 ⁻ CD107a ⁻
CAR	5F11-28Z	39.50	13.60	40.10	6.82
	5F11-CD828Z	30.00	23.30	35.20	11.60

	5F11-CD8BBZ	25.90	21.60	40.40	12.10
对照	未转导的	1.40	27.10	70.20	1.29

[0166] 表F-2

[0167] Ngfr-bv173靶标

[0168]

		CD8 ⁺ CD107a ⁺	CD8 ⁺ CD107a ⁻	CD8 ⁺ CD107a ⁻	CD8 ⁺ CD107a ⁺
CAR	5F11-28Z	3.54	16.80	78.60	1.01
	5F11-CD828Z	3.90	31.10	62.50	2.49
	5F11-CD8BBZ	6.66	27.00	61.30	5.05
对照	未转导的	1.53	26.40	70.70	1.35

[0169] 类似地,当评价抗原特异性IFN γ 产生时,在与CD30⁺靶细胞一起培养时,表达5F11-28Z CAR的T细胞产生最多的IFN γ 。当与表达含有4-1BB部分的CAR的T细胞相比时,表达5F11-28Z或5F11-CD828Z的T细胞表现出较少的针对CD30阴性靶标的背景IFN γ 产生(表G)。表G中的HH为CD30⁺淋巴瘤细胞系。表G中的A549、TC71、So18、Panc10.05和MDA231为CD30阴性细胞系。还包括原代CD34⁺造血干细胞(表G)。如通过流式细胞术测量的,表G中95.8%的5F11-28Z T细胞表达CAR。

[0170] 表G

[0171]

	5F11-28Z	5F11-CD828Z	5F11-CD8BBZ	未转导的
HH	126692	34289	47746	508
A549	107	66	2491	20
TC71	773	97	1724	28
So18	92	89	2357	33
Panc10.05	48	63	2526	12
MDA231	354	107	1498	163
原代CD34 ⁺	153	70	1389	71
单独的T细胞	26	68	1405	<12

[0172] 因为含有CD28的CAR的CD30特异性活性优于含有4-1BB的CAR的CD30特异性活性,所以推断5F11-28Z和5F11-CD828Z为用于进一步开发的最有希望的CAR。在分析所有实验时(表D-1、D-2、E-1、E-2和G),与表达5F11-CD828Z或5F11-CD8BBZ的T细胞相比,表达5F11-28Z CAR的T细胞表现出最强的对CD30⁺靶细胞的识别。

[0173] 实施例7

[0174] 本实施例证明表达5F11-28Z CAR的T细胞在体外以CD30特异性方式增殖。

[0175] 用荧光染料CFSE标记表达5F11-28Z的T细胞,所述荧光染料CFSE随着细胞增殖而稀释。如图3中所示,将5F11-28Z T细胞与CD30-bv173细胞(CD30⁺,实心黑色柱状图)一起培养时比将5F11-28Z转导的T细胞与阴性对照NGFR-bv173细胞(CD30阴性,空心柱状图)一起培养时,CFSE稀释的程度更大。因此,表达5F11-28Z CAR的T细胞在体外以CD30特异性方式增殖(图3)。图针对活的、CD3⁺、表达CAR的淋巴细胞设门。在4个不同的实验中获得了类似结果。

[0176] 实施例8

[0177] 本实施例证明培养物中抗CD30-CAR转导的T细胞的数目充分扩增以产生足够用于临床过继性细胞转移的细胞。

[0178] 活化的T细胞表达CD30,并且与未转导的T细胞培养物相比,含有表达抗CD30CAR的T细胞的T细胞培养物具有降低数目的CD30⁺T细胞。抗CD30-CAR转导的T细胞培养物中CD30⁺T细胞数目的降低可能是由于表达CAR的T细胞清除了CD30⁺T细胞。试图确定抗CD30-CAR转导的T细胞是否可以充分地增殖并存活以产生在CAR T细胞疗法的临床试验中通常施用的 10^8 - 10^9 个T细胞。

[0179] 在第0天用OKT3刺激起始T细胞培养。T细胞保持未转导或者在培养的第1天用5F11-28Z、AC10-28Z或XmAb2513-28z转导,并允许其在含IL-2的培养基中体外增殖。利用台盼蓝通过光学显微镜计数总的活细胞。对于全部3种CAR,如通过蛋白L染色所检测到的,超过90%的转导有各CAR的T细胞在T-细胞表面上表达CAR。来自两名不同供体的细胞的结果分别显示在图4A和4B中。在培养的第9天有意地停止AC10-28Z和XmAb2513-28Z CAR T细胞培养物,并且在第11天有意地停止5F11-28Z转导的培养物和未转导的培养物。

[0180] 在单独的实验中,在第0天用OKT3刺激起始T细胞培养。T细胞保持未转导或者用5F11-CD8-28Z、5F11-CD8-BBZ或5F11-28Z转导,并允许其在含IL-2的培养基中体外增殖。利用台盼蓝通过光学显微镜计数总的活细胞。对于全部3种CAR,如通过蛋白L染色所检测到的,超过90%的转导有各CAR的T细胞在T-细胞表面上表达CAR。来自两名不同供体的结果分别显示在图5A和5B中。

[0181] 在重复实验中,显示培养物中抗CD30-CAR转导的T细胞的数目确实充分扩增以产生足够用于临床过继性细胞转移的细胞(图4A-4B和5A-5B)。

[0182] 实施例9

[0183] 本实施例证明5F11-28Z转导的T细胞可以体外杀伤CD30⁺HH淋巴瘤细胞。

[0184] 进行体外流式细胞术细胞毒性分析,其显示表达5F11-28Z的T细胞可以特异性杀伤CD30⁺HH淋巴瘤细胞系细胞。该分析具有4小时的孵育期。如图6中所示,确定5F11-28Z转导的T细胞可以体外杀伤CD30⁺HH淋巴瘤细胞。

[0185] 实施例10

[0186] 本实施例证明表达5F11-28Z和5F11-CD828Z的T细胞在体内根除肿瘤的能力。该实施例还证明,用表达5F11-28Z和5F11-CD828Z的T细胞处理的荷瘤小鼠长期存活而没有肿瘤复发。

[0187] 评估表达5F11-28Z和5F11-CD828Z的T细胞在体内根除肿瘤的能力。在免疫功能不全的nod scid共同- γ -链缺陷(NSG)小鼠中建立CD30⁺HH淋巴瘤细胞的皮下肿瘤。四天后,用单次静脉内输注来自相同供体的转导有5F11-28Z或5F11-CD828Z或SP6-CD828Z的 8×10^6 个T细胞来处理小鼠。第四组小鼠未经处理。SP6-CD828Z为一种不识别人或鼠蛋白的CAR。将SP6-CD828Z用作阴性对照。除了含有9只小鼠的未处理组以外,各组含有10只小鼠。各实验使用来自不同正常供体的T细胞。

[0188] 结果显示在图7A和7B中。在接受表达5F11-28Z或5F11-CD828Z的T细胞的小鼠中完全根除肿瘤;相比之下,在接受SP6-CD828Z转导的T细胞的小鼠和未处理的小鼠中发生进行性肿瘤生长(图7A)。类似地,接受转导有5F11-28Z或5F11-CD828Z的T细胞的小鼠均长期存活而没有肿瘤复发;相比之下,未经处理的小鼠和接受SP6-CD828Z转导的T细胞的小鼠全部

死于进行性肿瘤(图7B)。通过Kaplan-Meier方法计算存活分数。

[0189] 实施例11

[0190] 本实施例证明尽管存在可溶性CD30,但抗CD30CAR在根除肿瘤方面是有效的。

[0191] 在一些患有CD30⁺淋巴瘤的患者中,CD30由CD30⁺恶性细胞脱落(Visco等人, European J.Haematol., 77 (5) :387-394 (2006); Pizzolo等人, British J.Haematol., 75 (2) :282-284 (1990))。因此,评估了可溶性CD30对抗CD30CAR识别靶细胞的能力的影响。将未转导或转导表达5F11-28Z CAR的T细胞与表H中所示的靶细胞一起培养过夜,然后进行标准的IFN γ ELISA。表H中的HH细胞为CD30⁺细胞系。表H中后跟 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的数字(表H的最左列)指在T细胞和靶细胞一起培养的整个时间过程中添加到培养基中的人CD30蛋白的浓度。表H中的U251和Colo-205为CD30阴性细胞系。表H最右边两列的数字是在培养期结束时释放的IFN γ (pg/mL)。如通过流式细胞术测量的,表H中94.8%的5F11-28Z T细胞表达CAR。

[0192] 表H

[0193]

靶标	5F11-28Z 转导的	未转导的
HH 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD30	23021	未测定

[0194]

HH 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD30	18690	未测定
HH 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD30	19920	未测定
HH 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD30	18403	未测定
U251	15	未测定
Colo-205	<12	未测定
在没有靶标情况下的 T 细胞	<12	143
在具有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CD30 和没有靶标情况下的 T 细胞	278	123

[0195] 表H显示向含有靶细胞和表达5F11-28Z的T细胞的培养物中添加高浓度的可溶性CD30蛋白不会阻断CAR T细胞识别CD30⁺靶细胞的能力。先前对血清和淋巴瘤团块中CD30蛋白浓度的估计指导向表H的培养物中添加CD30蛋白浓度的选择(Nagata等人, PNAS, 102 (22) :7946-7951 (2005))。尽管存在可溶性CD30,但抗CD30CAR可以有效根除肿瘤的其它证据由实施例10的鼠实验提供。在4只荷HH肿瘤小鼠的血清中通过ELISA检测到的CD30处于77单位/mL的平均浓度,其对应于大约11ng/mL。如图7A中所示,尽管HH细胞存在这种CD30的脱落,但HH肿瘤在小鼠中被根除。

[0196] 实施例12

[0197] 本实施例证明转导有5F11-CD28Z的细胞的剂量滴定。

[0198] 免疫功能不全的NSG小鼠以形成实体肿块的方式移植有 4×10^6 个HH细胞。然后用单次输注 6×10^6 个未转导的T细胞或单次输注转导有5F11-CD28Z的 0.67×10^6 个、 2×10^6 个或 6×10^6 个T细胞来处理小鼠。表达5F11-CD28Z的T细胞能够清除接受输注 2×10^6 或 6×10^6 个抗CD30CAR T细胞的小鼠中的肿瘤；然而，未转导的T细胞或输注 0.67×10^6 个抗CD30CAR T细胞不能清除肿瘤。接受表达5F11-CD28Z的T细胞的小鼠没有表现出CAR T细胞介导的毒性的任何迹象。小鼠没有表现出皮毛竖起或活动降低，并且只有在实验结束时被处死或在形成大肿瘤之后被处死时，小鼠才死亡。

[0199] 在此将本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利通过引用并入，其程度如同将各参考文献单独且明确指明通过引用并入，并且在本文整体示出一样。

[0200] 术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”和“所述(the)”以及类似的指代物在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)的使用被解释为既涵盖单数又涵盖复数，除非本文另外指明或者上下文明显矛盾。术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”以及“含有(containing)”被解释为开放式术语(即，意为“包括但不限于”)除非另外标注。本文数值范围的叙述仅意图作为单独指落入范围内的各独立数值的速记法，除非本文另外指明，并且各独立的数值并入说明书如同本文单独对其进行叙述一样。可以以任何合适的顺序实施本文所述的所有方法，除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。本文提供的任何或所有实施例或者示例性语言(例如“如”)的使用仅意图更好地阐明本发明，并且不对本发明的范围构成限制，除非另外声明。说明书中的语言均不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必要的。

[0201] 本文描述了本发明的优选实施方案，包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。经阅读前述描述，那些优选实施方案的改变对于本领域普通技术人员而言可以变得显而易见。发明人期望本领域技术人员视情况应用此类改变，并且发明人意图以与本文具体所述的不同方式实践本发明。因此，如适用的法律所允许的，本发明包括在此所附的权利要求中所述的主题的所有修饰和等同物。此外，本发明涵盖以上所述元素的所有可能的改变的任何组合，除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE

SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)

<120> 抗CD30嵌合抗原受体

<130> 726313

<150> US 62/241,896

<151> 2015-10-15

<160> 23

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ala Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Leu Thr Ala Tyr

1

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 5
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 6
 Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Leu Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 合成的

<400> 10

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 11
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 11

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 35 40 45
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 50 55 60
 Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
 65 70 75 80
 His Arg Asn
 <210> 12
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 12
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 13
 Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30
 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 65 70 75 80
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
100 105

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 14

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 16
<211> 456
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> () .. ()

290	295	300
Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro		
305	310	315
Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro		
	325	330
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
	340	345
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
	355	360
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
	370	375
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
385	390	395
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
	405	410
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
	420	425
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
	435	440
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		445
	450	455
<210> 17		
<211> 473		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<221> PEPTIDE		
<222> ()..()		
<223> 合成的		
<400> 17		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp		
	20	25
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
	35	40
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		60

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly			
	100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln			
	115	120	125
Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser			
	130	135	140
Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr Trp Ser			
145	150	155	160
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile			
	165	170	175
Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val			
	180	185	190
Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn			
	195	200	205
Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Thr			
	210	215	220
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro			
225	230	235	240
Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro			
	245	250	255
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu			
	260	265	270
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp			
	275	280	285
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly			
	290	295	300
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn			
305	310	315	320
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr			
	325	330	335
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro			
	340	345	350
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser			
	355	360	365
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu			
	370	375	380

Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr Trp Ser
 145 150 155 160
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile
 165 170 175
 Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 180 185 190
 Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn
 195 200 205
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Thr
 210 215 220
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 245 250 255
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 260 265 270
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 290 295 300
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
 305 310 315 320
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 325 330 335
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 340 345 350
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 355 360 365
 Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 370 375 380
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 385 390 395 400
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 405 410 415
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 420 425 430
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 435 440 445
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

cctctggccg gcacatgtgg cgtgctgctg ctgagcctcg tgatcacctt gtactgcaac 1020
 caccggaaca agcggggcag aaagaagctg ctgtacatct tcaagcagcc cttcatgcgg 1080
 cccgtgcaga ccaccagga agaggacggc tgctcctgca gattccccga ggaagaagaa 1140
 ggcggctgcg agctgagagt gaagttcagc agatccgccc acgcccctgc ctaccagcag 1200
 ggacagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgacgtgctg 1260
 gacaagcgga gaggccggga ccccagatg ggcggaagc ccagacggaa gaacccccag 1320
 gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccc aggcctacag cgagatcggc 1380
 atgaagggcg agcggaggcg cggcaaggcg cacgatggcc tgtaccaggg cctgagcacc 1440
 gccaccaagg acacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag a 1491

<210> 21

<211> 1437

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> 合成的

<400> 21

gccacatgg ccctgcctgt gacagctctg ctgctgcctc tggccctgct gctgcatgcc 60
 gccagaccgg atatccagat gaccagagc cccaccagcc tgtctgccag cgtgggcgac 120
 agagtgacca tcacctgtag agccagccag ggcatcagca gctggctgac ctggtatcag 180
 cagaagcccc agaaggcccc caagagcctg atctacgccg ccagctctct gcagtctggc 240
 gtgcccagca gattttccgg cagcggtctt ggcaccgact tcaccctgac aatcagcagc 300
 ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgccagcagt acgacagcta ccccatcacc 360
 ttcggccagg gcacccggct ggaaatcaag ggcagcatat ctggcagcgg caagcctgga 420
 tctggcgagg gctctacaaa gggccagggtg cagctgcagc agtggggagc cggactgctg 480
 aagcctagcg agacactgag cctgacctgc gccgtgtacg gcggcagctt cagcgcctac 540
 tattggagct ggatccggca gcctcctggc aagggcctgg aatggatcgg cgacatcaat 600
 cacggcggag gcaccaacta caaccccagc ctgaagtcca gagtgacat cagcgtggac 660
 accagcaaga accagttctc cctgaagctg aacagcgtga cagccgccga caccgccgtg 720
 tactactgtg ccagcctgac agcctattgg ggccagggtc ctctcgtgac cgtgtccagc 780
 atcgaagtga tgtaccccc tcctacctg gacaacgaga agtccaacgg caccatcatt 840
 cacgtgaagg gcaagcacct gtgccccagc cctctgtttc ctggccctag caagcccttc 900
 tgggtgctgg tggctgtggg cggagtgtgt gctgtttaca gctgtctgtg gacagtggcc 960
 ttcatcatct tttgggtgcg cagcaagcgg agccggctgc tgcacagcga ctacatgaac 1020
 atgaccccc gacggccagg ccccaccaga aagcactacc agccttacgc ccctcccaga 1080
 gacttcgccg cctaccgcag cagagtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctat 1140
 cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagacggga agagtacgac 1200
 gtgctggaca agcggagagg cagggaccct gagatgggcg gcaagcccag aagaaagaac 1260

ccccaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag 1320
 atcggcatga agggcgagcg gagaagaggc aaggacacg acggcctgta ccagggactg 1380
 agcaccgcca ccaaggacac ctacgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc ccccaga 1437

<210> 22

<211> 1488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> 合成的

<400> 22

gccacatgg ccctgcctgt gacagctctg ctgctgecte tggccctgct gctgcatgcc 60
 gccagaccgg atatccagat gaccagagc cccaccagcc tgtctgccag cgtggggcag 120
 agagtgacca tcacctgtag agccagccag ggcacagca gctggctgac ctggtatcag 180
 cagaagcccc agaaggcccc caagagcctg atctacgcc ccagctctct gcagtctggc 240
 gtgccagca gattttccgg cagcggctct ggcaccgact tcacctgac aatcagcagc 300
 ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgccagcagt acgacagcta ccccatcacc 360
 ttggccagg gcacccggct ggaaatcaag ggcagacat ctggcagcgg caagcctgga 420
 tctggcgagg gctctacaaa gggccaggct cagctgcagc agtggggagc cggactgctg 480
 aagcctagcg agacactgag cctgacctgc gccgtgtac gcggcagctt cagcgcctac 540
 tattggagct ggatccggca gcctcctggc aaggcctgg aatggatcgg cgacatcaat 600
 cacggcggag gcaccaacta caaccccagc ctgaagtccc gcgtgacct ctccgtggac 660
 accagcaaga accagttctc cctgaagctg aacagcgtga cagccgccga cacagccgtg 720
 tactactgtg ccagcctgac cgcctattgg ggccagggat ctctcgtgac cgtgtccagc 780
 ttcgtgcccc tgttctgccc tgccaagcct accacaacc ctgcccctag acctcctacc 840
 ccagccccta caatcgccag ccagcctctg tctctgaggc ccgaggcttg tagacctgct 900
 gcaggcggag ccgtgcacac cagaggactg gatttcgct gcgacatcta catctgggcc 960
 cctctggccc gcacatgtgg cgtgctgctg ctgagcctcg tgatcacct gtactgcaac 1020
 caccggaaca gaagcaagcg gagccggtg ctgcacagcg actacatgaa catgacccca 1080
 agacggcctg gccccaccg gaagcactac cagccttac ccctcccag agacttcgcc 1140
 gcctaccggt ccagagtgaa gttcagcaga tccgccagc ccctgcta ccagcaggga 1200
 cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggcagacggg aagagtacga cgtgctggac 1260
 aagcggagag gccgggaccc cgagatgggc ggaaagccca gacggaagaa cccccaggaa 1320
 ggccctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcgcatg 1380
 aagggcgagc ggaggcgcgg caagggccac gatggcctgt accaggcct gagcaccgcc 1440
 accaaggaca cctacgacgc cctgcacatg caggccctgc ccccaga 1488

<210> 23

<211> 237

<212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> ()..()
 <223> 合成的
 <400> 23
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln
 115 120 125
 Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr Tyr Trp Ser
 145 150 155 160
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile
 165 170 175
 Asn His Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 180 185 190
 Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn
 195 200 205
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Thr
 210 215 220
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235

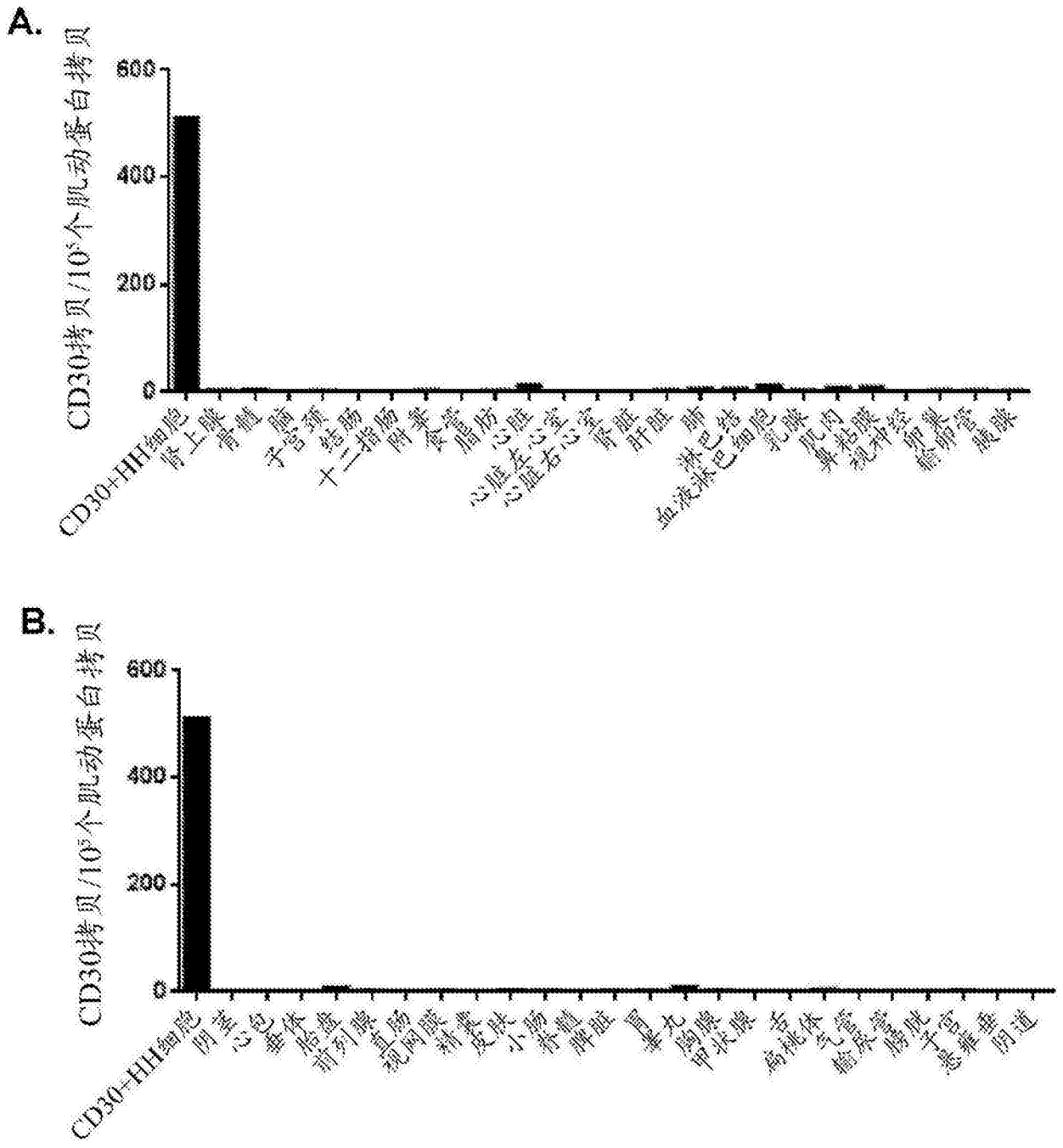


图1

A. 5F11-28Z



B.

5F11-CD828Z



C.

5F11-CD8BBZ



图2

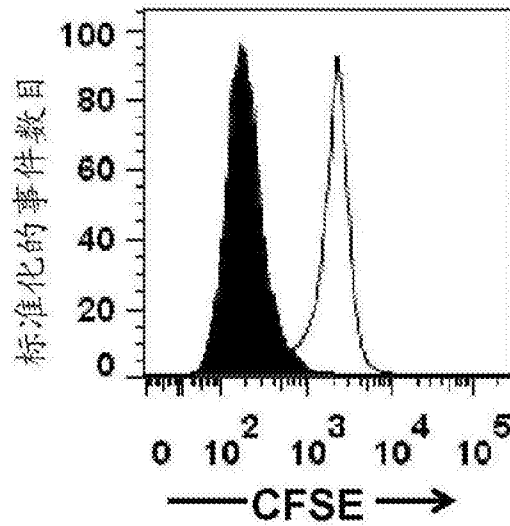


图3

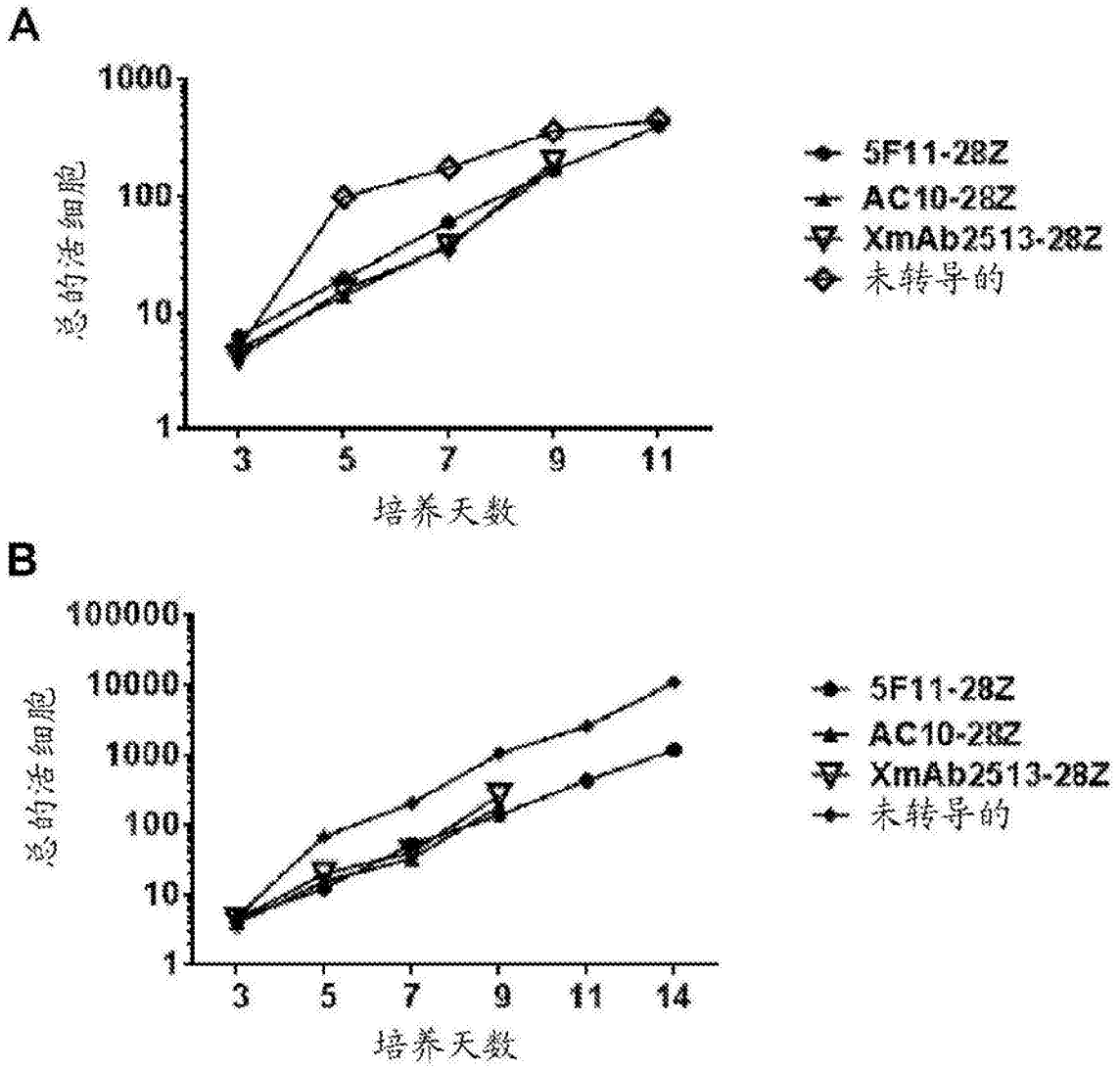


图4

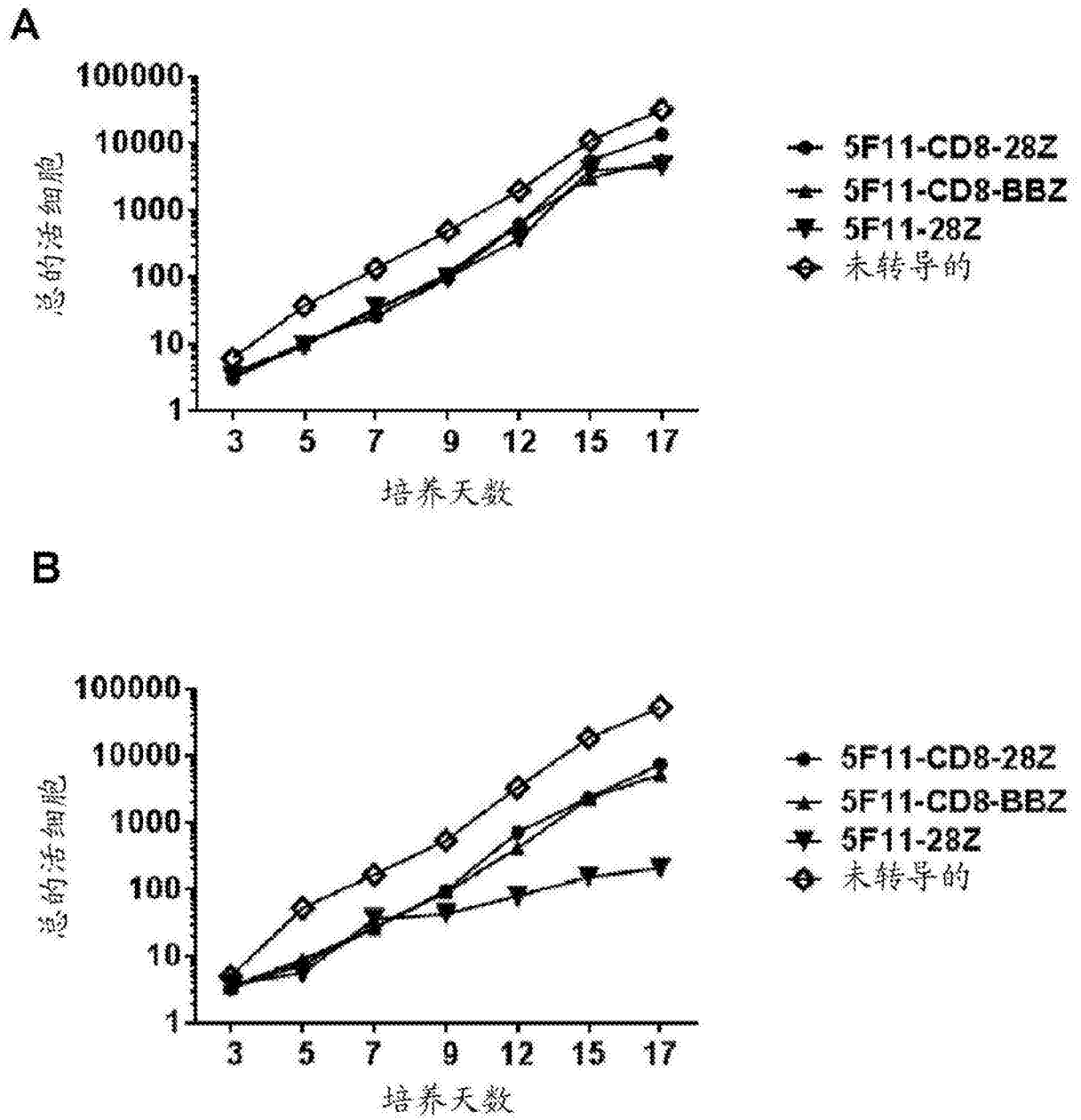


图5

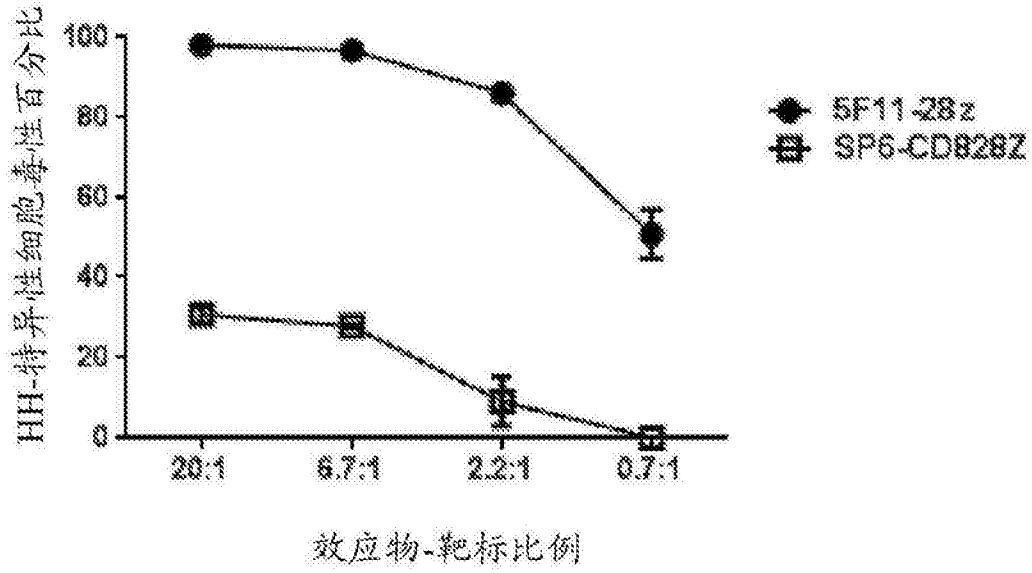
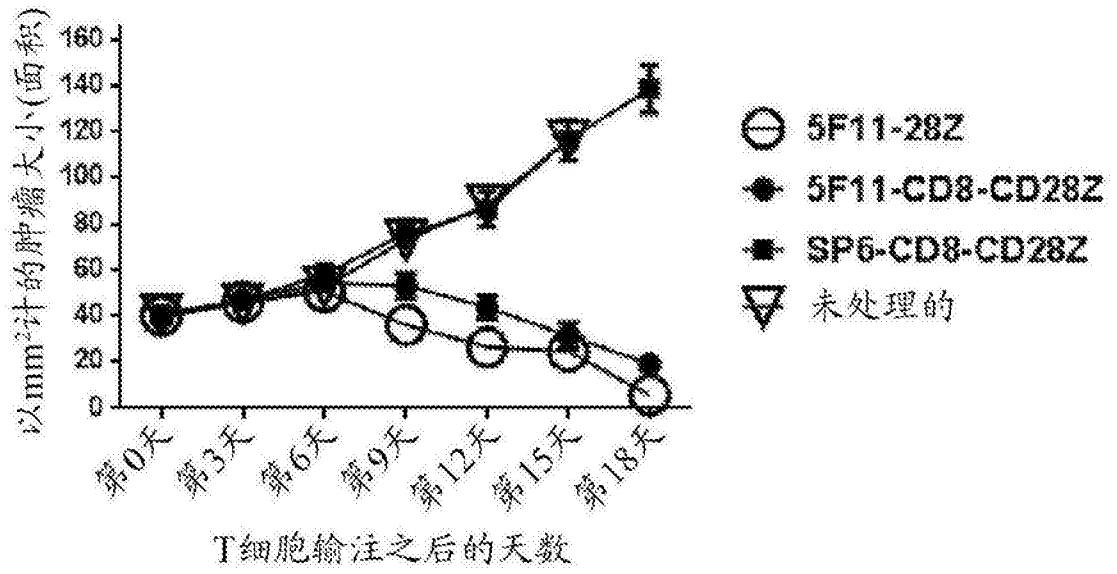


图6

A



B

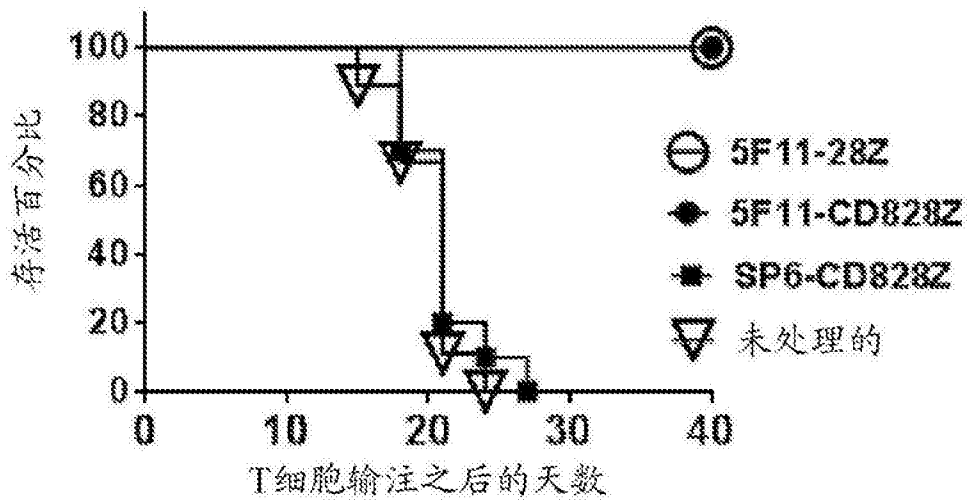
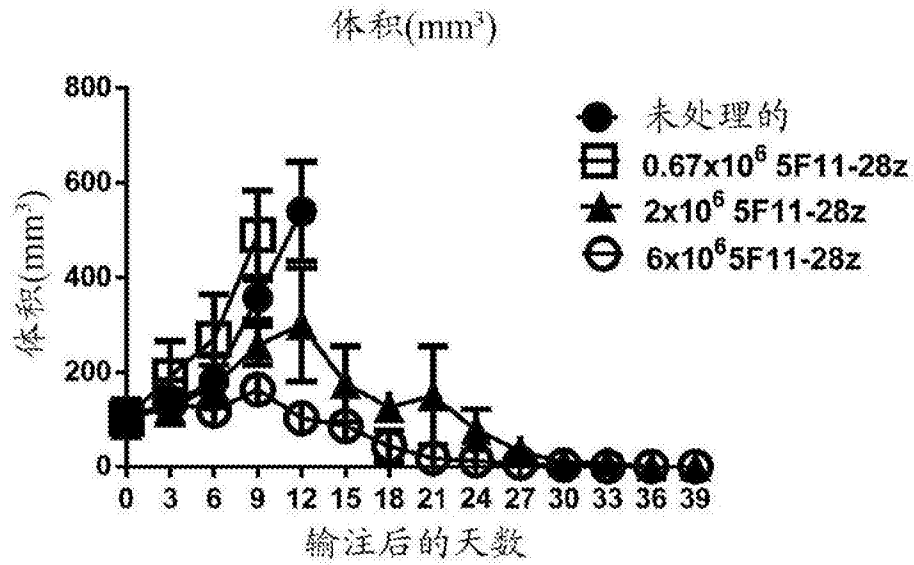


图7

A



B

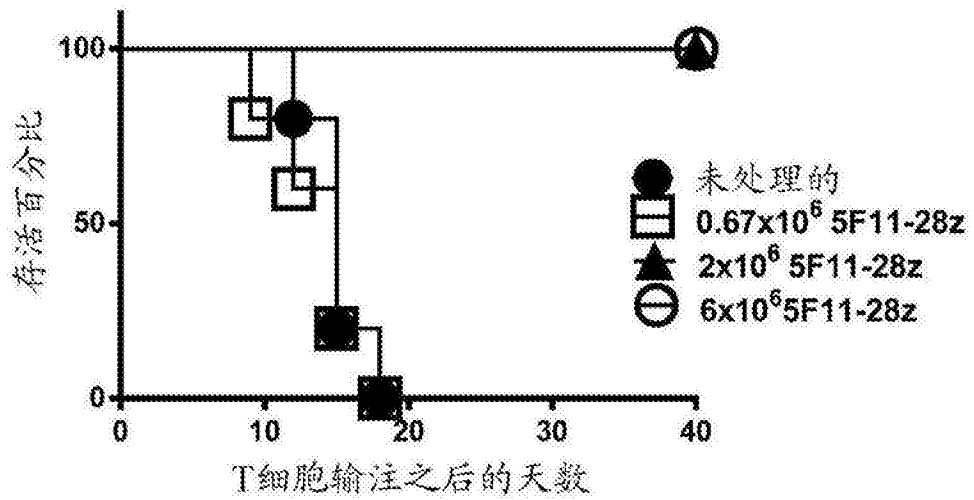


图8