(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119907810 A
(43)申请公布日 2025.04.29

(21)申请号 202380068058.7

(22)申请日 2023.08.25

(30)优先权数据
63/401,288 2022.08.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/072903 2023.08.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/044743 EN 2024.02.29

(71)申请人 莱蒂恩技术公司
地址 美国

(72)发明人 迪娜·施奈德 胡培荣

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张珊珊 何欣

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

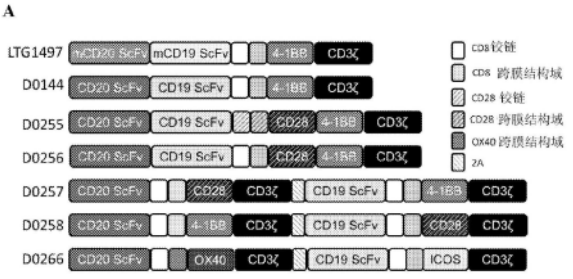
权利要求书4页 说明书65页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于用全人抗CD20/CD19免疫治疗来治疗癌症的组合物和方法

(57)摘要

公开了包含全人CD20/CD19抗原结合结构域的嵌合抗原受体。还公开了涉及所述嵌合抗原受体的核酸、重组表达载体、宿主细胞、抗原结合片段和药物组合物。还公开了在对象中治疗或预防癌症的方法，以及制备嵌合抗原受体T细胞的方法。



CN 119907810 A

1.编码全人CD20/CD19串联嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,所述全人CD20/CD19串联嵌合抗原受体(CAR)包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域含有全人CD20/CD19抗原结合结构域,其中所述全人CD20/CD19串联嵌合抗原受体(CAR)由包含SEQ ID NO.5、7、9、13、15、17或19的核苷酸序列编码。

2.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与CD20或CD19结合的抗体的至少一个单链可变片段。

3.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与CD20或CD19结合的抗体的至少一个重链可变区。

4.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域、所述至少一个胞内信号传导结构域或这二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

5.权利要求4所述的分离的核酸分子,其中所编码的接头或间隔区结构域来源于CD8或CD28的胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

6.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中在所编码的胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域之前是编码前导肽的前导核苷酸序列。

7.权利要求6所述的分离的核酸分子,其中所述前导核苷酸序列包含含有编码SEQ ID NO:12的前导氨基酸序列的SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

8.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD8,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19,IgG铰链,CD2,CH3结构域或其任意组合。

9.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中编码所述全人CD20/CD19串联嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列由包含SEQ ID NO.5、7、9、13、15、17或19的核苷酸序列或者与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列编码。

10.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个胞内信号传导结构域还包含CD3ζ胞内结构域。

11.权利要求10所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个胞内信号传导结构域布置在相对于所述CD3ζ胞内结构域的C端侧。

12.权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域、初级信号传导结构域、或其任意组合。

13.权利要求12所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个共刺激结构域包含以下的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)、或其任意组合。

14.嵌合抗原受体(CAR),其由权利要求1所述的分离的核酸分子编码。

15.权利要求14所述的CAR,其包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域。

16.权利要求15所述的CAR,其中所述全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与CD20或

CD19结合的抗体的至少一个单链可变片段。

17.权利要求15所述的CAR,其中所述全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与CD20或CD19结合的抗体的至少一个重链可变区。

18.权利要求15所述的CAR,其中所述跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD8,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19或其任意组合。

19.权利要求18所述的CAR,其中CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

20.权利要求15所述的CAR,其中所述至少一个胞外抗原结合结构域和所述至少一个胞内信号传导结构域或这二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域。

21.权利要求20所述的CAR,其中所述接头或间隔区结构域来源于CD8或CD28的胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

22.权利要求17所述的CAR,其中所述至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

23.权利要求22所述的CAR,其中所述至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域,所述共刺激结构域含有选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)或其组合。

24.载体,其包含权利要求1所述的核酸分子。

25.权利要求24所述的载体,其中所述载体选自:DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体、或其组合。

26.权利要求24所述的载体,其还包含启动子。

27.权利要求26所述的载体,其中所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子、组织特异性启动子、自杀型启动子、或其任意组合。

28.细胞,其包含权利要求24所述的载体。

29.权利要求28所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

30.权利要求28所述的细胞,其中所述T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

31.权利要求28所述的细胞,其中所述细胞是人细胞。

32.制备细胞的方法,其包括用权利要求24所述的载体转导T细胞。

33.产生经RNA改造的细胞群的方法,其包括将体外转录的RNA或合成RNA引入到细胞中,其中所述RNA包含权利要求1所述的核酸分子。

34.在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求28所述的细胞。

35.在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在所述哺乳动物中有效治疗或预防癌症的量向所述哺乳动物施用权利要求15所述的CAR。

36.药物组合物,其包含抗肿瘤有效量的人T细胞群,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原

受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域,并且其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。

37.权利要求36所述的药物组合物,其中所述至少一个跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD8,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19或其任意组合。

38.权利要求36所述的药物组合物,其中所述T细胞是患有血液学癌症的人的T细胞。

39.权利要求38所述的药物组合物,其中所述血液学癌症是白血病或淋巴瘤。

40.权利要求39所述的药物组合物,其中所述白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、或慢性髓细胞性白血病(CML)。

41.权利要求39所述的药物组合物,其中所述淋巴瘤是套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。

42.权利要求38所述的药物组合物,其中所述血液学癌症是多发性骨髓瘤。

43.权利要求36所述的药物组合物,其中人癌症包括成人上皮癌,其包括口腔和咽癌(舌、口、咽、头和颈)、消化系统癌症(食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝、肝内胆管、胆囊、胰腺)、呼吸系统癌症(喉、肺和支气管)、骨和关节癌、软组织癌、皮肤癌(黑素瘤、基底和鳞状细胞癌)、儿童肿瘤(神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤)、中枢神经系统的肿瘤(脑、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤),以及乳腺、生殖系统(子宫颈、子宫体、卵巢、外阴、阴道、前列腺、睾丸、阴茎、子宫内膜)、泌尿系统(膀胱、肾和肾盂、输尿管)、眼和眶、内分泌系统(甲状腺)以及脑和其他神经系统的癌症、或其任意组合。

44.治疗患有与肿瘤抗原的表达升高相关的疾病、障碍或病症的哺乳动物的方法,所述方法包括向对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

45.在有此需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

46.权利要求44或45所述的方法,其中所述至少一个跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD8,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154,或其任意组合。

47.用于产生表达嵌合抗原受体的细胞的方法,所述方法包括将权利要求1所述的分离的核酸引入到细胞中。

48.根据权利要求47所述的用于产生表达嵌合抗原受体的细胞的方法,其中所述细胞

是T细胞或含有T细胞的细胞群。

49.药物组合物,其包含抗变应性、抗自身免疫、抗同种免疫性或抗自身侵袭性有效量的人T细胞群,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2、4或49的氨基酸序列的全人CD20/CD19抗原结合结构域,并且其中所述T细胞是患有疾病的人的T细胞。

50.权利要求49所述的药物组合物,其中所述疾病包括变应性疾病,所述变应性疾病包括哮喘、特应性湿疹、鼻炎、皮肤变态反应、I型糖尿病、或其任意组合。

51.权利要求49所述的药物组合物,其中所述疾病包括自身免疫病、同种免疫性疾病和自身侵袭性疾病,其包括类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻、舍格伦综合征、多发性硬化、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、1型糖尿病、斑秃、血管炎、颞动脉炎、链球菌后自身免疫障碍、抗神经元抗体介导的神经精神障碍、免疫介导的锥体外运动障碍、西登哈姆舞蹈病、同种免疫性溶血性疾病、肺纤维化、系统性硬皮病或纤维化疾病、或其任意组合。

用于用全人抗CD20/CD19免疫治疗来治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年8月26日提交的美国临时专利申请号63/401,288的优先权,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已作为命名为SL_ST26.xml的XML文件以电子形式提交。该XML文件创建于2023年8月17日,大小为74,928字节。XML文件中的材料在此通过引用整体并入。

技术领域

[0005] 本申请涉及癌症领域,特别地涉及全人CD20和全人CD19抗原结合结构域(下文称为“全人CD20/CD19”)和包含这样的全人CD20和全人CD19抗原结合结构域的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)及其使用方法。

背景技术

[0006] 癌症是对人健康最致命的威胁之一。仅在美国,癌症每年影响近130万新患者,并且是继心血管疾病之后的第二大死亡原因,占死亡的约4分之1。实体瘤是造成这些死亡中的大多数的原因。尽管在某些癌症的医学治疗方面已有显著的进展,但在过去20年中,所有癌症的总体5年存活率仅提高了约10%。癌症或恶性肿瘤以不受控制的方式迅速生长和转移,使得治疗极为困难。

[0007] CD19是85至95kDa的跨膜细胞表面糖蛋白受体。CD19是蛋白质的免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)超家族的成员,并且包含两个胞外Ig样结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域(Tedder TF,Isaacs,CM,1989,J Immunol 143:712-171)。CD19修饰B细胞受体信号传导,降低B细胞受体对抗原的触发阈值(Carter,RH,and Fearon,DT,1992,Science,256:105-107),并与CD81和CD21协调以调节这种必需的B细胞信号传导复合物(Bradbury,LE,Kansas GS,Levy S,Evans RL,Tedder TF,1992,J Immunol,149:2841-50)。在B细胞个体发育期间,CD19能够独立于于抗原受体在祖B(pro-B)细胞、前-前-B细胞(pre-pre-B cell)、前-B(pre-B)、早期B细胞阶段发出信号,并且与Src家族蛋白酪氨酸激酶相关,是酪氨酸磷酸化的,诱导胞内钙动员和肌醇磷脂信号传导二者(Uckun FM,Burkhardt AL,Jarvis L,Jun X,Stealy B,Dibirdik I,Myers DE,Tuel-Ahlgren L Bolen JB,1983,J Biol Chem 268:21172-84)。与B细胞恶性病治疗相关的关键点是:CD19在正常B细胞上以严格受调控的方式表达,受限于处于IgH基因重排阶段的早期B细胞前体、成熟B细胞,但在造血干细胞或成熟浆细胞上不表达(Anderson,KC,Bates,MP,Slaughenhout BL,Pinkus GS,Schlossman SF,Nadler LM,1984,Blood 63:1424-1433)。

[0008] CD20(也称为LEU-16,MS4A1)是跨膜的4A家族蛋白,其在祖B细胞阶段至成熟B细胞阶段于B细胞的表面上表达,并在B细胞发育和分化中发挥作用。CD20抗原也在多种血液学

肿瘤上表达,并且多年来多种单克隆抗CD20抗体已被应用于CD20阳性恶性病的治疗(综述于Lim,Sean H.et al.“Anti-CD20 Monoclonal Antibodies:Historical and Future Perspectives.”Haemalologlca 95.1(2010):135-143.PMC.Web.31 July 2017.)。抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗(Rituximab)(Rituxan®)广泛用于治疗B细胞淋巴瘤,例如滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma,FL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma,DLBCL)和慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)(利妥昔单抗处方信息)。

[0009] B谱系白血病和淋巴瘤的传统治疗方法可包括化学治疗、放射治疗和干细胞移植(参见万维网mayclinic.org)。与这些治疗相关的高毒性以及并发症(例如复发、继发性恶性病或GVHD)的风险促使寻求更好的治疗替代选择。CD19在成人和儿童(前-B-ALL)B细胞恶性病二者上的表达已导致利用该靶标进行基于抗体和嵌合抗原受体(CAR)-T细胞二者的治疗

[0010] (Kochenderfer JN,Wilson WH,Janik JE,Dudley ME,Stetler-Stevenson M,Feldman SA,Maric I,Raffeld M,Nathan DA,Lanier BJ,Morgan RA,Rosenberg SA,2010,BLood 116:4099-102;Lee DW,Kochenderfer JN,Stetler-Stevenson M,Cui YK,Delbrook C,Feldman SA,Orentas R,Sabatino M,Shah NN,Sternberg SM,Stroncek D,Tschemia N,Yuan C,Zhang H,Zhang L,Rosenberg SA,Wayne AS,Mackall CL,2015,Lancet 385:517-28).

[0011] 此外,淋巴瘤(DLBCL,FL)和白血病(CLL)上CD20抗原的存在使它成为有效肿瘤清除和预防肿瘤抗原逃逸的有吸引力的另外的靶标。

[0012] B谱系白血病的当前护理标准可由通过高剂量化学治疗或放射进行的缓解诱导治疗随后是巩固组成,并且可以以干细胞移植和根据需要进行的另外的化学治疗过程为特征(参见万维网cancer.gov)。与这些治疗相关的高毒性以及并发症(例如复发、继发性恶性病或GVHD)的风险促使寻求更好的治疗选择。CD19在成人和儿童(前-B-ALL)B细胞恶性病二者上的表达已导致利用该靶标进行基于抗体和基于嵌合抗原受体(CAR)-T细胞二者的治疗

[0013] (Kochenderfer JN,Wilson WH,Jaik JE,Dudley ME,Stetler-Stevenson M,Feldman SA,Maric I,Raffeld M,Nathan DA,Lanier BJ,Morgan RA,Rosenberg SA,2010,Blood 116:4099-102;Lee DW,Kochenderfer JN,Stetler-Stevenson M,Cui YK,Delbrook C,Feldman SA,Orentas R,Sabatino M,Shah NN,Steinberg SM,Stroncek D,Tschernia N,Yuan C,Zhang H,Zhang L,Rosenberg SA,Wayne AS,Mackall CL,2015,Lancet 385:517-28)。

[0014] 已开发出许多治疗B细胞白血病和淋巴瘤的新方法,包括将抗CD19或抗CD20结合基序与T细胞结合基序连接的双特异性抗体(即,适用于治疗费城染色体阴性复发性或难治性B细胞前体急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL)的博纳吐单抗(Blinatumomab),Blincyto®)。迄今为止,CAR构建体中所使用的许多CD19或CD20的结合部分都利用了来源于鼠抗体的结构域。目前正在考虑批准这些产品中的许多产品,包括Novartis和Kite Pharmaceuticals开发的那些。在2017年4月,Novartis宣布CTL019(tisagenlecleuce1)获得了FDA突破性认定,以用于治疗患有难治性或复发性(r/r)DLBCL(弥漫性大B细胞淋巴瘤)的两次或更多次既往治疗失败的成年患者,将该认定增加至针对

r/r B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)的治疗。这些适应证分别是基于II期JULIET研究(NCT02445248)和ELIANA研究(NCT02435849)。JULIET试验示出总响应率(overall response rate,ORR)为45%,其中在三个月时具有37%完全响应(complete response,CR)和8%部分响应(partial response,PR)。在ELIANA研究中,输注该产品的患者中的82%实现了CR或计数恢复不完全的CR,并且在6个月时无复发存活率为60%。来自Kite Pharmaceuticals的CAR-T产品(KTE-C19,axicabtagene ciloleucel)针对弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBLC)、转化滤泡性淋巴瘤(transformed follicular lymphoma,TFL)和原发性纵隔B细胞淋巴瘤(primary mediastinal B-cell lymphoma,PMBCL)被授予突破性认定。在KTE-C19在r/r ALL中的Kite ZUMA-3II期试验中,报告了73%的CR(在2个月或更长时间时)。无论是否利用了CAR-T治疗的抗体,仍有显著数量的患者无法通过这些治疗获得帮助,并且存在改进治疗方法的相当大的空间。

[0015] 嵌合抗原受体(CAR)是包含三个基本单元的杂合分子:(1)胞外抗原结合基序,(2)连接/跨膜基序,以及(3)胞内T细胞信号传导基序(Long AH,Haso WM,Orentas RJ.Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor.Oncoimmunology.2013;2(4):e23621)。CAR的抗原结合基序通常在免疫球蛋白(Ig)分子的最小结合结构域单链可变片段(single chain Fragment variable,ScFv)之后形成。还已经改造了替代的抗原结合基序,例如受体配体(即,IL-13已被改造为结合肿瘤表达的IL-13受体)、完整的免疫受体、文库来源的肽和固有免疫系统效应分子(例如NKG2D)。用于CAR表达的替代细胞靶标(例如NK或γ-δT细胞)也在开发中(Brown CE et al.Clin Cancer Res.2012;18(8):2199-209;Lehner M et al.PLoS One.2012;7(2):e31210)。关于限定最活跃的T细胞群以用CAR载体进行转导,确定最佳培养和扩增技术,以及限定CAR蛋白质结构本身的分子细节,仍然有大量工作待完成。

[0016] CAR的连接基序可以是相对稳定的结构结构域,例如IgG的恒定结构域,或设计成延伸的柔性接头。可使用结构基序(例如来源于IgG恒定结构域的那些)来使ScFv结合结构域延伸远离T细胞质膜表面。这对于其中结合结构域特别接近肿瘤细胞表面膜的一些肿瘤靶标(例如对于二唾液酸神经节苷脂GD2;Orentas et al.,未发表的观察结果)而言可以是重要的。迄今为止,CAR中使用的信号传导基序总是包含CD3-ζ链,因为该核心基序是T细胞活化的关键信号。首次报道的第二代CAR的特征在于CD28信号传导结构域和CD28跨膜序列。该基序也用于包含CD137(4-1BB)信号传导基序的第三代CAR中(Zhao Y et al.J Immunol.2009;183(9):5563-74)。随着利用与抗CD3和抗CD28抗体连接的珠来活化T细胞的新技术的出现,并且来自CD28的经典“信号2”的存在不再需要由CAR本身编码。使用珠活化,发现第三代载体在体外测定中并不优于第二代载体,并且它们在白血病的小鼠模型中并不提供优于第二代载体的明显益处

[0017] (Haso W,Lee DW,Shah NN,Stetler-Stevenson M,Yuan CM,Pastan IH,Dimitrov DS,Morgan RA,FitzGerald DJ,Barrett DM,Wayne AS,Mackall CL,Orentas RJ.Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia,Blood.2013;121(7):1165-74;Kochenderfer JN et al.Blood.2012;

[0018] 119(12):2709-20).以第二代CD28/CD3-ζ(Lee DW et al.American Society of

Hematology Annual Meeting.New Orleans,LA;December 7-10,2013)和CD137/CD3-ζ信号传导形式(Porter DL et al.N Engl J Med.2011;365(8):725-33)的CD19特异性CAR的临床成功证实了这一点。除CD137之外,其他肿瘤坏死因子受体超家族成员(例如OX40)也能够在CAR转导的T细胞中提供重要的持久信号(Yvon E et al.Clin Cancer Res.2009;15(18):5852-60)。同样重要的是培养CAR T细胞群的培养条件,例如细胞因子IL-2、IL-7和/或IL-15的包含(Kaiser AD et al.Cancer Gene Ther.2015;22(2):72-78)。

[0019] 用于癌症的CAR治疗的更广泛且有效的适应中的目前的挑战与缺乏令人信服的靶标相关。建立细胞表面抗原的结合剂现今是可容易实现的,但是发现对肿瘤具有特异性同时不伤害正常组织的细胞表面抗原仍然是艰巨的挑战。赋予表达CAR的T细胞以更大靶细胞特异性的一种潜在方式是使用组合的CAR方法。在一种系统中,CD3-ζ和CD28信号单元在同一细胞内表达的两种不同CAR构建体中分开;在另一种系统中,在同一T细胞中表达两种CAR,但是一种具有较低的亲和力并因此需要可替选的CAR首先进行接合以使另一者具有完全活性(Lanitis E et al.Cancer Immunol Res.2013;1(1):43-53;Kloss CC et al.Nat Biotechnol.2013;31(1):71-5)。产生单一的基于ScFv的CAR作为免疫治疗剂的第二挑战是肿瘤细胞的异质性。至少一个小组已经开发了胶质母细胞瘤的CAR策略,其中效应细胞群同时靶向多种抗原(HER2、IL-13Ra、EphA2),希望避免靶抗原阴性群体的生长。(Hegde M et al.Mol Ther.2013;21(11):2087-101)。

[0020] 基于T细胞的免疫治疗已成为合成生物学中的新前沿;考虑了多个启动子和基因产物以将这些高度强效的细胞引导至肿瘤微环境,在那里T细胞既可逃避负调节信号,又可介导有效的肿瘤杀伤。通过药物诱导的诱导型胱天蛋白酶9(caspase 9)构建体与基于化学的二聚化剂(例如API 903)的二聚化清除不期望的T细胞示出了这样一种方式,其中可药理学地启动可控制T细胞群的强大开关(Di Stasi A et al.N Engl J Med.2011;365(18):1673-83)。通过诱饵受体的表达来产生对转化生长因子-β的负调控作用免疫的效应T细胞群进一步示出效应T细胞可被改造以达到最佳抗肿瘤活性的程度(Foster AE et al.J Immunother.2008;31(5):500-5)。因此,尽管显示出CAR可以以类似于内源性T细胞受体的方式触发T细胞活化,但迄今为止这种技术的临床应用的主要障碍一直限于CAR+T细胞的体内扩增、输注之后细胞的迅速消失、以及令人失望的临床活性。这可能部分归因于所使用的一些CAR序列的鼠源性。

[0021] 使用博纳吐单抗(Blinotumomab)(双特异性抗CD19和抗CD3抗体)已对于接受该治疗的重症患者显示出令人印象深刻的结果。然而,持久缓解率小于40%,并且造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplant,HSCT)最多仅能挽救50%的响应者(参见Gore et al.,2014,NCT01471782 and Von Stackelberg,et al.,2014,NCT01471782,总结于:Benjamin,JE,Stein AS,2016,Therapeutic Advances in Hematology 7:142-156)。已接受双特异性抗体或CAR-T治疗的患者随后进行HSCT以维持持久应答的要求仍是一个积极争论的领域。尽管报道了CD19 CAR-T试验的高度响应,一些甚至大于90%,但如果将试验重塑为“意图治疗”试验,则该数字可更接近于70%(Davis KL,Mackall CL,2016,Blood Advances 1:265-268)。在宾夕法尼亚大学,报道的CAR19治疗之后12个月的最佳结果显示,能够接受T细胞产品的患者中RFS为55%且OS为79%(Maude SL,Teachey DT,Rheingold SR,Shaw PA,Aplenc R,Barrett DM,Barker CS,Callahan C,Frey NV,Farzana N,Lacey

SF,Zheng A,Levine B,Melenhorst JJ,Motley L,Prter DL,June CH,Grupp SA,2016,J Clin Oncol 34,no15_suppl(May 2016)3011-3011)。

[0022] 因此,在本领域中对于发现用于使用可表现出特异性和有效的抗肿瘤作用而没有上述缺点的方案来治疗B-ALL和其它表达CD19和/或CD20的B细胞恶性病的新组合物和方法存在迫切且长期的需求。

[0023] 本发明通过提供可用于治疗癌症和其他疾病和/或病症的CAR组合物和治疗方法来解决这些需求。特别地,如本文中所公开和描述的,本发明提供了这样的CAR:所述CAR可用于治疗与CD20和/或CD19表达失调相关的疾病、障碍或病症,并且所述CAR包含串联全人CD20/CD19抗原结合结构域,所述结构域表现出以下特性中的一种或更多种:i)在转导的T细胞上的高表面表达;ii)表达CD20和/或CD19的细胞的高度细胞裂解,其中转导的T细胞表现出体内扩增和持续性;iii)多重靶向以克服抗原逃逸;iv)防御(armor)以克服肿瘤微环境中的免疫抑制(tumor microenvironment,TME);v)细胞因子刺激元件,以用于促进借助于细胞因子的自主性T细胞刺激,从而增强抗肿瘤细胞毒性、扩增、记忆形成、细胞因子分泌、持久性;vi)消化酶,以克服肿瘤基质/胞外基质(extracellular matrix,ECM)的物理屏障,并使CAR T肿瘤能够穿透;以及vii)开启开关(on-switch)或关闭开关(off-switch)以控制CAR或共表达的功能性“增强子(booster)”元件的表达,以及使用这样的CAR的治疗方法,所述CAR可用于治疗实体瘤,包括表达靶向抗原的肿瘤,所述靶向抗原例如ROR1、间皮素、HER2/ERBB2、叶酸受体I、PSMA、CD276、紧密连接蛋白6、紧密连接蛋白1.28、MUC1、MUC16、GD2、LRRC15、GPC3、FGFR4、FAP、IL-13Ra、EphA2或其他抗原、或其任意组合,以及表达CAR相关靶标的其他疾病和/或病症,包括例如但不限于自身免疫病、同种免疫性疾病和自身侵袭性疾病,包括类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、多发性硬化、风湿性多肌痛、强直性脊柱炎、1型糖尿病、斑秃、血管炎、颞动脉炎、链球菌后自身免疫病、抗神经元抗体介导的神经精神障碍、免疫介导的锥体外运动障碍、西登哈姆舞蹈病(Sydenham chorea)、同种免疫性溶血性疾病、肺纤维化、系统性硬皮病、或纤维化疾病。

发明内容

[0024] 本文中提供了新的串联全人CD20和CD19靶向抗体或其抗原结合结构域,其中CD19靶向部分位于氨基酸序列中的CD20靶向部分之前或之后(下文称为“全人CD20/CD19”),和含有这样的CD20和/或CD19抗原结合结构域的嵌合抗原受体(串联CAR),以及表达该受体的宿主细胞(例如T细胞),和编码该受体的核酸分子。CAR在转导的T细胞上表现出高表面表达,具有高度的细胞裂解和转导的T细胞体内扩增和持续性。还提供了使用所公开的CAR、宿主细胞和核酸分子例如以在对象中治疗癌症的方法。

[0025] 在一个方面中,提供了编码串联全人CD20/CD19嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,所述嵌合抗原受体从N端至C端包含至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,其中串联全人CD20/CD19 CAR包含选自SEQ ID NO:1、3和48的核酸序列。

[0026] 在一个方面中,提供了编码串联全人CD20/CD19嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,所述嵌合抗原受体从N端至C端包含至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,其中由选自SEQ ID NO:1、3和48的核酸序

列编码的串联全人CD20/CD19 CAR编码包含选自SEQ ID NO.2 4和49的氨基酸序列的串联全人CD20/CD19 CAR。

[0027] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与全人CD20/CD19结合的抗体的至少一个单链可变片段。

[0028] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与全人CD20/CD19结合的抗体的至少一个重链可变区。

[0029] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域还包含至少一个与全人CD20/CD19结合的基于脂质运载蛋白(lipocalin)的抗原结合抗原(anticalin)。

[0030] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域通过接头结构域与跨膜结构域连接。

[0031] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中在所编码的全人CD20/CD19胞外抗原结合结构域之前是编码前导肽或信号肽的序列。

[0032] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,所述CAR包含至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域,所述至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域由包含分别含有在SEQ ID No:1和3中的全人CD20/CD19核苷酸序列的核苷酸序列编码,并且其中所述CAR另外编码靶向抗原的胞外抗原结合结构域,所述抗原包括但不限于CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、TSLPR、NY-ESO-1TCR、MAGE A3 TCR、或其任意组合。

[0033] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,所述CAR包含至少一个由这样的核苷酸序列编码的全人CD20/CD19抗原结合结构域:包含含有在SEQ ID No:48内的全人CD20/CD19核苷酸序列,并且其中所述CAR另外编码靶向抗原的胞外抗原结合结构域,所述抗原包括但不限于CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、TSLPR、NY-ESO-1TCR、MAGE A3 TCR、或其任意组合。

[0034] 在某些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中另外编码的胞外抗原结合结构域包含抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1ScFv抗原结合结构域、抗间皮素ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123(IL3RA)ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA(CD269)ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗TSLPR ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSAScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0035] 在一个方面中,本文中提供的CAR还包含接头或间隔区结构域。

[0036] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所述胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域、所述胞内信号传导结构域或这二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

[0037] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8或CD28的胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

[0038] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR还包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137和CD154,或其组合。

[0039] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的胞内信号传导结构域还包含CD3ζ胞内结构域。

[0040] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的胞内信号传导结构域布置在相对于CD3ζ胞内结构域的C端侧。

[0041] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域、初级信号传导结构域、或其组合。

[0042] 在另一些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个共刺激结构域包含以下的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)、或其组合。

[0043] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其还包含前导序列或信号肽,其中所述前导或信号肽核苷酸序列包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

[0044] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的前导序列包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0045] 在一个方面中,本文中提供了嵌合抗原受体(CAR),其从N端至C端包含至少一个全人CD20/CD19抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域。

[0046] 在一个实施方案中,提供了CAR,其中所述胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域包含与抗原结合的抗体的至少一个单链可变片段,或与抗原结合的抗体的至少一个重链可变区,或其组合。

[0047] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中所述至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF19,或其组合。

[0048] 在一些实施方案中,提供了CAR,其中CAR另外编码包含以下的胞外抗原结合结构域:CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、TSLPR、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、TSLPR、NY-ESO-1TCR、MAGE A3 TCR或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列、或其任意组合。

[0049] 在一个实施方案中,提供了CAR,其中所述胞外抗原结合结构域包含抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1 ScFv抗原结合结构域、抗间皮素ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123(IL3RA)ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA(CD269)ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗TSLPR ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSAScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域,或与其具有

85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0050] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

[0051] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中所述至少一个胞内信号传导结构域包含共刺激结构域,所述共刺激结构域包含选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137),或其组合。

[0052] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:5的核酸序列,CAR D0144(CD20_CD19 CD8 BBz)的核苷酸序列。

[0053] 在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:6CAR D0144(CD20_CD19 CD8 BBz)的氨基酸序列的CAR。

[0054] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:7的核酸序列,CAR D0255(CD20_CD19 CD28)CD28 BBz的核苷酸序列。

[0055] 在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:8CAR D0255(CD20_CD19 CD28)CD28 BBz的氨基酸序列的CAR。

[0056] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15的核酸序列,CAR D0258(CD20 CD8 BBz_CD19 CD8 CD28z)的核苷酸序列。

[0057] 在一个实施方案中,核酸序列编码包含SEQ ID NO:16,CAR D0258(CD20 CD8 BBz_CD19 CD8 CD28z)的氨基酸序列的CAR。

[0058] 在一个方面中,本文中所公开的CAR被修饰以表达或包含可检测标志物以用于诊断、监测和/或预测治疗结局(例如癌症患者的无进展存活)或用于监测这样的治疗的进展。

[0059] 在一个实施方案中,编码所公开CAR的核酸分子可包含在载体,例如病毒载体中。载体是DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、或逆转录病毒载体,或其组合。

[0060] 在某些实施方案中,载体还包含启动子,其中所述启动子是诱导型启动子、组织特异性启动子、组成型启动子、自杀型启动子(suicide promoter)、或其任意组合。

[0061] 在另一个实施方案中,表达CAR的载体还可被修饰以包含一个或更多个控制CAR T细胞表达或借助自杀开关来清除CAR-T细胞的操纵元件。自杀开关可包括例如凋亡诱导性信号传导级联反应或诱导细胞死亡的药物。在一个优选实施方案中,表达CAR的载体还可被修饰以表达酶,例如胸苷激酶(thymidine kinase,TK)或胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase,CD)。

[0062] 在另一个方面中,还提供了包含编码CAR的核酸分子的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是T细胞,例如从对象中获得的原代T细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是$CD8^+$T细胞。

[0063] 在另一个方面中,提供了包含抗肿瘤有效量的人T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码含有SEQ ID NO.2和4的氨基酸序列的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,所述胞外抗原结合结构域包含全人CD20/CD19抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。所述癌症尤其包括血液学癌症

(hematological cancer),例如白血病(例如,慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)或慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia,CML))、淋巴瘤(例如,套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma))、或多发性骨髓瘤、或其组合。

[0064] 在另一个方面中,提供了包含抗肿瘤有效量的人T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码含有SEQ ID NO.49的氨基酸序列的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,所述至少一个胞外抗原结合结构域包含全人CD20/CD19抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。所述癌症尤其包括血液学癌症,例如白血病(例如,慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)或慢性髓细胞性白血病(CML)、淋巴瘤(例如,套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤)或多发性骨髓瘤,或其组合。

[0065] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其中CAR的至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF19,或其组合。

[0066] 在另一个实施方案中,提供了药物组合物,其中人癌症包括成人上皮癌(adult carcinoma),其包括:口腔和咽癌(oral and pharynx cancer)(舌、口、咽、头和颈)、消化系统癌症(食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝、肝内胆管、胆囊、胰腺)、呼吸系统癌症(喉、肺和支气管)、骨和关节癌、软组织癌症、皮肤癌(黑素瘤、基底和鳞状细胞癌)、儿童肿瘤(神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma))、中枢神经系统的肿瘤(脑、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤),以及乳腺、生殖系统(子宫颈、子宫体、卵巢、外阴、阴道、前列腺、睾丸、阴茎、子宫内膜)、泌尿系统(膀胱、肾和肾盂、输尿管)、眼和眼眶(orbit)、内分泌系统(甲状腺)以及脑和其他神经系统的癌症、或其任意组合。

[0067] 在另一个实施方案中,提供了包含抗肿瘤有效量的患有癌症之人的人T细胞群的药物组合物,其中所述癌症是对一种或更多种化学治疗剂不具有响应性的难治性癌症。所述癌症包括造血系统癌症(hematopoietic cancer)、骨髓增生异常综合征、胰腺癌、头颈癌、皮肤肿瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)、成人B细胞恶性病(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓细胞性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma,NHL))、儿童B细胞恶性病(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))中的微小残留病(minimal residual disease,MRD)、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0068] 在另一个方面中,提供了制备包含CAR的T细胞(以下称为"CAR-T细胞")的方法。所述方法包括用编码特异性结合CD19和/或CD20的所公开的CAR的载体或核酸分子转导T细胞,从而制备CAR-T细胞。

[0069] 在另一个方面中,提供了产生经RNA改造的细胞群的方法,其包括将编码所公开的CAR的核酸分子的体外转录RNA或合成RNA引入到对象的细胞中,从而产生CAR细胞。

[0070] 在一个实施方案中,与CD19表达相关的疾病、障碍或病症是癌症,包括造血系统癌症、骨髓增生异常综合征、胰腺癌、头颈癌、皮肤肿瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系

白血病(AML)、成人B细胞恶性病(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓细胞性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、儿童B细胞恶性病(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))中的微小残留病(MRD)、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0071] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中阻断由表达CD19和/或CD20的细胞介导的T细胞抑制并改变肿瘤微环境以抑制肿瘤生长的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的包含含有选自SEQ ID NO:2、4和49的氨基酸序列的CAR的组合物。在一个实施方案中,所述细胞选自表达CD19和/或CD20的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0072] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中抑制、阻抑或阻止抗肿瘤或抗癌免疫应答的免疫抑制的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的包含选自SEQ ID NO:2、4和49的CAR的组合物。在一个实施方案中,所述CAR抑制第一细胞与T细胞之间的相互作用,其中所述第一细胞选自表达CD19和/或CD20的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0073] 在另一个方面中,提供了用于在哺乳动物中诱导抗肿瘤免疫的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的用编码所公开的CAR的载体或核酸分子转导的T细胞。

[0074] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在哺乳动物中有效治疗或预防癌症的量向所述哺乳动物施用一种或更多种所公开的CAR。所述方法包括在以下条件下向对象施用治疗有效量的表达特异性结合CD19和/或CD20和/或者一种或更多种前述抗原的所公开CAR的宿主细胞:所述条件足以在所述对象中形成CAR上的抗原结合结构域与CD19和/或CD20和/或者一种或更多种前述抗原的胞外结构域的免疫复合物。

[0075] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗患有与肿瘤抗原的表达升高相关的疾病、障碍或病症的哺乳动物的方法,所述方法包括向对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个胞外CD19和/或CD20抗原结合结构域或其任意组合、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,并且其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

[0076] 在另一个实施方案中,提供了用于在有此需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含SEQ ID NO:2和4的氨基酸序列或其任意组合、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。在前述方法的一些实施方案中,所述至少一个跨膜结构域包含以下的跨膜:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD19,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF16,TNFRSF19,或其组合。

[0077] 在另一个实施方案中,提供了用于在有此需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含SEQ ID NO.49的氨基酸序列、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个胞内信号传导结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。在前述方法的一些实施方案中,所述至少一个跨膜结构域包含以

下的跨膜:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD19,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF16,TNFRSF19,或其组合。

[0078] 在另一个实施方案中,提供了用于在被诊断患有癌症的人中产生持续性经遗传改造的T细胞群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向人施用经遗传改造以表达CAR的T细胞,其中所述CAR包含SEQ ID NO:2和4的氨基酸序列或其任意组合,至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,其中在施用之后,所述持续性经遗传改造的T细胞群或所述T细胞的子代群在人中持续至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、两年或三年。

[0079] 在另一个实施方案中,提供了用于在被诊断患有癌症的人中产生持续性经遗传改造的T细胞群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向人施用经遗传改造以表达CAR的T细胞,其中所述CAR包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内信号传导结构域,其中在施用之后,所述持续性经遗传改造的T细胞群或所述T细胞的子代群在人中持续至少一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月、两年或三年。

[0080] 在一个实施方案中,人中的子代T细胞包含记忆T细胞。在另一个实施方案中,所述T细胞是自体T细胞。

[0081] 在本文中所述的方法的所有方面和实施方案中,与肿瘤抗原的表达升高相关的任何前述癌症、疾病、障碍或病症均可使用一种或更多种本文中所公开的CAR来治疗或预防或改善。

[0082] 在另一个方面中,提供了用于制备如上文所述的嵌合抗原受体T细胞或用于预防、治疗或改善如上文所述的与对象中肿瘤抗原的表达升高相关的任何癌症、疾病、障碍或病症的药盒,所述药盒包含含有上文所公开的核酸分子、载体、宿主细胞或组合物的任一种或其任意组合的容器,以及使用所述药盒的说明。

[0083] 应理解,CAR、宿主细胞、核酸以及方法在本文中详细描述的具体方面和实施方案之外是可用的。从参照附图进行的以下详细描述中,本公开内容的前述特征和优点将变得更明显。

附图说明

[0084] 图1A至1B示出了CD20和CD19双靶向CAR结构和人原代T细胞的表面表达。图1A)CD20和CD19双靶向CAR被设计为串联或双顺反子构建体。串联CAR构建体包含全人20-19串联scFv靶向结构域、铰链结构域和跨膜结构域、单一4-1BB或串联CD28_4-1BB共刺激结构域和CD3ζ激活结构域。将具有小鼠串联scFv的构建体pLTG1497用作对照。双CAR(Duo CAR)构建体包含单CD20 CAR,随后是2A序列,以及具有不同的共刺激结构域或跨膜结构域的单CD19 CAR。图1B)将来自健康供体的原代T细胞在IL-2的存在下用TransAct活化,并用编码CAR20_19构建体的慢病毒载体转导。用CD19 Fc染色随后通过抗Fc-AF647用流式细胞术来测定经转导T细胞的CAR表面表达。UTD-未经转导的对照。

[0085] 图2A至2D示出了体外CAR20_19构建体的细胞毒性。使用CD19+CD20+肿瘤系进行基于萤光素酶的细胞毒性测定:图2A)Raji,图2B)Nalm-6,图2C)Reh和CD19-CD20-肿瘤系,图

2D)293T。将所有的靶标系用萤火虫荧光素酶稳定地转导。将CAR T细胞与肿瘤细胞以指定的效应物与靶标(E:T)比:2.5:1、5:1或10:1共培养过夜。通过发光分析(luminometry)评估特异性靶标裂解的百分比。数据代表了来自2个不同供体的一个独立实验。三次技术重复的平均值±SD。4个独立供体的一个代表性实验在图中示出。

[0086] 图3A至3C示出了响应于Raji淋巴瘤细胞系的CAR T细胞因子释放。在单独或与CD19+CD20+Raji靶细胞以10的E:T比过夜孵育之后评价CAR T细胞的培养上清液。图3A)IL-2、图3B)IFNγ和图3C)TNFα的细胞因子产生通过ELISA进行分析。三次技术重复的平均值±SD。数据代表了来自两个独立供体的一个独立实验。

[0087] 图4A至4C示出了CAR20_19构建体在长期靶细胞刺激下的细胞毒性。图4A)CD19+CD20+Raji淋巴瘤细胞长期刺激方案。在第1轮,将CAR T细胞与Raji细胞以E:T 0.3:1共培养7天。将剩余的CAR T细胞和Raji细胞用流式细胞术测量,并重新调整至E:T为0.15:1以进行第二轮。图4B)在第4天、第7天和第10天使用GFP通过流式来分析剩余的Raji百分比。图4C)用CountBright™绝对计数珠通过流式细胞术来测量T细胞数目。计算与输入T细胞相比的扩增倍数并作图。箭头表示每轮共培养的起点。数据是来自两个供体之一的代表性结果。

[0088] 图5A至5C示出了小鼠NSG Raji淋巴瘤异种移植物中CAR T细胞的体内攻击和再攻击研究的实验设计和时间线(图5A),研究中小鼠肿瘤进展的代表性生物发光图像(图5B),以及代表初始攻击和再攻击研究过程中肿瘤进展动力学的生物发光测量的概况(图5C)。

具体实施方式

[0089] 定义

[0090] 除非上下文另外明确指出,否则本文中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。例如,术语“抗原”包括单个/种或多个/种抗原,并且可认为与短语“至少一个/种抗原”等同。本文中使用的术语“包含”意指“包括”。因此,“包含抗原”意指“包括抗原”而不排除其他要素。短语“和/或”意指“和”或“或/或者”。应进一步理解,除非另外指出,否则对于核酸或多肽给出的任何和所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值都是近似的,并且是出于描述的目的而提供。虽然可使用与本文中描述的那些类似或等同的许多方法和材料,但是下文描述了特定的合适的方法和材料。在有冲突的情况下,以本说明书(包括对术语的解释)为准。另外,材料、方法和实例仅是举例说明性的,并不旨在是限制性的。为了便于查阅多个实施方案,提供了以下对术语的解释:

[0091] 术语“约”当指可测量值(例如量、持续时间等)时意指涵盖与特定值的.+-.20%、或在一些情况下.+-.10%、或在一些情况下.+-.5%、或在一些情况下.+-.1%、或在一些情况下.+-.0.1%的变化,因为这样的变化适合于进行所公开的方法。

[0092] 除非另外指出,否则根据常规用法使用本文中的技术术语。分子生物学中常用术语的定义可见于Benjamin Lewin,Genes VII,Oxford University Press出版,1999;Kendrew et al.(编辑),The Encyclopedia of Molecular Biology,Blackwell Science Ltd.出版,1994;以及Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995;以及其他类似的参考文献。

[0093] 本公开内容提供了全人CD20/CD19抗体或其片段以及具有这样的全人CD20/CD19

抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)。CAR的功能活性的增强与表达CAR的T细胞的功能活性的增强直接相关。作为这些修饰中一种或更多种的结果,CAR表现出高度的细胞因子诱导的细胞裂解和转导T细胞上的细胞表面表达二者,以及提高的体内T细胞扩增水平和转导的表达CAR的T细胞的持续性。本公开内容的CAR的优点在于一种CART慢病毒产品可用于治疗多种患者群体(即CD19+、CD20+或双重CD19+CD20+癌症患者),这在资源有限的情况下提供了灵活性。

[0094] 将来源于不同蛋白质结构域的功能性部分组合的独特能力是嵌合抗原受体(CAR)的关键创新特征。这些蛋白质结构域中每一个的选择是关键设计特征,其特异性组合的方式也如此。每个设计结构域都是可在不同CAR平台之间使用以改造淋巴细胞的功能的必需组分。例如,胞外结合结构域的选择可使得在其他情况下无效的CAR变得有效。

[0095] 用于建立CAR的胞外抗原结合结构域的免疫球蛋白来源的蛋白质序列的恒定框架组分可以是完全中性的或其可以自缔合并驱使T细胞达到代谢衰竭的状态,由此使表达该CAR的治疗性T细胞的效果远远更低。这独立于该CAR结构域的抗原结合功能而发生。此外,胞内信号传导结构域的选择也可控制用于免疫治疗的治疗性淋巴细胞群的活性和持久性。尽管分别通过这些胞外和胞内结构域结合靶抗原的能力和向T细胞传递活化信号的能力是重要的CAR设计方面,但是还变得明显的是,胞外抗原结合片段来源的选择可对CAR的效力具有显著影响,并且从而对CAR的功能和临床效用具有限定作用。

[0096] 本文中所公开的CAR在细胞中以高水平表达。表达CAR的细胞具有高体内增殖速率,产生大量细胞因子,并且针对在其表面上具有与CAR结合的全人CD20/CD19抗原的细胞具有高细胞毒活性。胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域的使用导致产生在体内更好地起作用的CAR,同时避免了在宿主免疫应答中诱导抗CAR免疫和杀伤CAR T细胞群。表达胞外全人CD20/CD19 ScFv抗原结合结构域的CAR表现出优异的活性/特性,包括i)防止如在小鼠来源结合序列的情况下所见的差的CAR T持久性和功能;ii)缺乏区域性(即胸膜内)递送CAR也能有效;以及iii)能够基于对全人CD20/CD19具有高亲和力和低亲和力的结合剂二者产生CAR T细胞设计。后一种特性允许研究者更好地调节CAR T产品的效力与毒性,和/或组织特异性,因为由于肿瘤上全人CD20/CD19的表达高于正常组织,因此与正常组织相比,较低亲和力的结合剂可对肿瘤具有更高的特异性,这可防止肿瘤非靶向毒性(on-target off tumor toxicity)和旁观者(bystander)细胞杀伤。

[0097] 以下是对本发明CAR的详细描述,包括对其胞外全人CD20/CD19抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域的描述,以及对CAR、抗体及其抗原结合片段、缀合物、核苷酸、表达、载体以及宿主细胞、治疗方法、组合物和使用所公开CAR的药盒的另外的描述。

[0098] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,例如,已经产生了针对间皮素的ScFv结合剂,如在标题为“Compositions and Methods for Treating Cancer with Anti-Mesothelin Immunotherapy”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号LEN_017)的申请人的授权的美国专利No.10,183,993中所公开的,分别为核苷酸序列scFv抗原SEQ ID NO:149和氨基酸序列SEQ ID NO:150,其可并入到功能性CAR(其分别为核苷酸序列SEQ ID NO:39和氨基酸序列SEQ ID NO:40)中并因此可并入到DuoCAR治疗中。

[0099] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,除了scFv序列之外,单链抗原结合剂(与scFv相反)可并入到单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR应用中。例如,如标题为“Compositions

and Methods For Treating Cancer With Anti-CD33 Immunotherapy”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号LEN_018)的申请人的授权的美国专利No.10,426,797中所公开的CD33-特异性仅重链结合剂(分别为核苷酸序列SEQ ID NO:41和氨基酸序列SEQ ID NO:42)可并入到靶向表达CD33的恶性病的功能性CAR,LTG1906(其分别为核苷酸序列SEQ ID NO:43和氨基酸序列SEQ ID NO:44)中。

[0100] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的一个实例是治疗表达CD19、CD20和TSLPR抗原的白血病。在这种情况下,LTG1496或LTGI497(分别为SEQ ID NO:35,26)可与TSLPR特异性CAR(LTG1789)(分别为SEQ ID NO:47和氨基酸序列SEQ ID NO:48)组合,其由TSLPR特异性scFV结构域(核苷酸序列SEQ ID NO:45和氨基酸序列SEQ ID NO:46)产生。

[0101] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的另一个实例是治疗表达CD38抗原的癌症。例如,如2018年11月30日提交的标题为“Compositions and Methods For Treating Cancer With Anti-CD38 Immunotherapy”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号LEN_026)的申请人的授权的美国专利No.11,103,533中所公开的CD38特异性结合剂可并入到一种或更多种靶向表达CD38的恶性病的功能性CAR中,如申请人的授权的美国专利No.11,103,533中所公开的,该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0102] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的另一个实例是治疗表达CD123抗原的癌症。例如,如在2019年9月20日提交的标题为“Compositions and Methods For Treating Cancer With Anti-CD123 Immunotherapy”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号LEN 024)并要求2018年9月20日提交的临时专利申请No.62/734,106的优先权的申请人的授权的美国专利No.10,844,128中所公开的CD123特异性结合剂可并入到一种或更多种靶向表达CD123的恶性病的功能性CAR中,如申请人的授权的美国专利No.10,844,128中所公开的,该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0103] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的另一个实例是治疗表达CD 123抗原的癌症。例如,如在2022年3月2日提交的标题为“Compositions and Methods For Treating Cancer With Anti-CD123 Immunotherapy”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号MBG 99)的申请人的美国共同未决专利申请No.17/685,132中所公开的CD123特异性结合剂可并入到一种或更多种靶向表达CD123的恶性病的功能性CAR中,如申请人的共同未决美国专利申请No.17/685,132中所公开的,该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0104] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的另一个实例是治疗表达BCMA抗原的癌症。例如,如在2019年5月30日提交的标题为“Fully Human BCMACAR T Cells for the Treatment of Multiple Myeloma and Other BCMA-Positive Malignancies”并转让给Lentigen Technology,Inc.(事件编号MBG_13)的申请人的授权的美国专利No.11,052,112中公开的BCMA特异性结合剂可并入到一种或更多种靶向表达BCMA的恶性病的功能性CAR中,如申请人的授权的美国专利No.11,052,112中所公开的,该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0105] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,单一、串联、DuoCAR或多靶向CAR治疗应用的另一个实例是治疗实体瘤癌症。例如,如在2022年7月28日提交的标题为“Chimeric Antigen Receptor Therapies for Treating Solid Tumors”并转让给Lentigen Technology,Inc(事件编号MBG_106)的申请人的共同未决美国临时专利申请No.63/393,088中所公开的特异性结合剂可并入到一种或更多种靶向实体瘤的功能性CAR中,如申请人的共同未决美国临时专利申请No.63/393,088中所公开的,其全部内容通过引用并入本文。

[0106] 在上文所述每个前述方面和实施方案中,该技术所基于的串联CAR(包含2个scFv结构域,如核苷酸序列SEQ ID NO:23和氨基酸序列SEQ ID NO:24中所描述的)的实例包括CD20_CD19 CAR LTG1497,其为核苷酸序列SEQ ID NO:25和氨基酸序列SEQ ID NO:26。在一些情况下,颠倒两种结合剂的顺序可以在靶细胞中提供更好的DuoCAR表达。因此,如在核苷酸序列SEQ ID NO:25和氨基酸序列SEQ ID NO:26中所示的LTG1497(其中CD19 scFv更接近膜)和如在核苷酸序列SEQ ID NO:33和氨基酸序列SEQ ID NO:34中所示的LTG1496(其中CD19 scFV更远离膜)二者都可用作包含DuoCAR的DuoSet的成员之一。

[0107] A.嵌合抗原受体(CAR)

[0108] 本文中所公开的CAR包含至少一个能够与全人CD20/CD19结合的全人CD20/CD19抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个胞内结构域。

[0109] 嵌合抗原受体(CAR)是人工构建的杂合蛋白或多肽,其包含通过跨膜结构域与T细胞信号传导结构域连接的抗体的抗原结合结构域(例如,单链可变片段(ScFv))。CAR的特征包括其能够以非MHC限制性方式朝着所选靶标重定向T细胞特异性和反应性,以及利用单克隆抗体的抗原结合特性。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的T细胞以不依赖于抗原加工而识别抗原的能力,因此绕过了主要的肿瘤逃逸机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源性T细胞受体(TCR)α和β链二聚化。

[0110] 如本文中公开的,CAR的胞内T细胞信号传导结构域可包括例如T细胞受体信号传导结构域、T细胞共刺激信号传导结构域或这二者。T细胞受体信号传导结构域是指包含T细胞受体的胞内结构域(例如如但不限于CD3ζ蛋白的胞内部分)的CAR的一部分。共刺激信号传导结构域是指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR的一部分,所述共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。

[0111] 1.胞外结构域

[0112] 在一个实施方案中,CAR包含靶标特异性结合元件,其也称为抗原结合结构域或部分。结构域的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数目。例如,可选择抗原结合结构域以识别充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。因此,可充当CAR中抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的一些实例包括与病毒、细菌和寄生物感染、自身免疫病和癌细胞相关的那些。

[0113] 在一个实施方案中,可通过改造与肿瘤细胞上的抗原特异性结合的期望抗原结合结构域来改造CAR以靶向目的肿瘤抗原。肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的引起免疫应答(特别是T细胞介导的免疫应答)的蛋白质。抗原结合结构域的选择将取决于待治疗癌症的具体类型。肿瘤抗原包括例如胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(alphafetoprotein,AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CAIX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列

腺酶、前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活蛋白(survivin)和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(prostate-carcinoma tumor antigen-1,PCTA-1)、MAGE、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白(ephrinB2)、CD22、胰岛素生长因子(insulin growth factor,IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和全人CD20/CD19。本文中公开的肿瘤抗原仅以举例的方式包括在内。该列表并不旨在是排他性的,并且另外的实例对于本领域技术人员而言将是明显的。

[0114] 在一个实施方案中,肿瘤抗原包含与恶性肿瘤相关的一种或更多种抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达许多可充当免疫攻击的靶抗原的蛋白质。这些分子包括但不限于组织特异性抗原,例如黑素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP100,以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase,PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。另一些靶分子属于转化相关分子的组,例如癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌-胚胎抗原(onco-fetal antigen),例如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成个体肿瘤独特的真正肿瘤特异性的免疫球蛋白抗原。B细胞分化抗原(例如CD19、CD20、CD22、BCMA、ROR1和CD37)是B细胞淋巴瘤中靶抗原的另一些候选物。这些抗原中的一些(CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型)已被用作单克隆抗体被动免疫治疗的靶标,但成效有限。

[0115] 在一个优选实施方案中,肿瘤抗原是全人CD20/CD19,并且与全人CD20/CD19表达相关的肿瘤包括表达高水平的胞外蛋白全人CD20/CD19的肺间皮瘤、卵巢癌和胰腺癌,或其任意组合。

[0116] 肿瘤抗原的类型也可以是肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen,TSA)或肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)。TSA是肿瘤细胞独有的,并且不在体内的其他细胞上出现。TAA不是肿瘤细胞独有的,并且相反在无法诱导对抗原免疫耐受状态的条件下也在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可在使得免疫系统能够对抗原作出应答的条件下发生。TAA可以是当免疫系统不成熟并且不能应答时在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原,或者其可以是在正常细胞上通常以极低水平存在但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。

[0117] TSA或TAA的一些非限制性实例包括以下:分化抗原,例如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2;以及肿瘤特异性多谱系抗原,例如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,例如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,例如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位造成的独特的肿瘤抗原;例如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,例如EB病毒(Epstein Barr virus)抗原EBVA和人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)抗原E6和E7。其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA19-9、CA72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-联蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、α-甲胎蛋白、β-HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3\CA27.29\BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C-相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0118] 在一个实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向包括但不限于以下的抗原:CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33、CD38、CD123、CD138、BCMA、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、

GD-2、FGFR4、TSLPR、NY-ESO-1TCR、MAGE A3 TCR等。

[0119] 在一个优选实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向胞外CD20/CD19抗原。

[0120] 在一个优选实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向胞外CD20抗原。

[0121] 在一个优选实施方案中,编码胞外CD20 scFv抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的胞外CD20 scFv抗原结合结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0122] 在一个优选实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向胞外CD19抗原。

[0123] 在一个优选实施方案中,编码胞外CD19 scFv抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的胞外CD19 scFv抗原结合结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0124] 在一个优选实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向胞外CD20抗原和CD19抗原。

[0125] 在一个优选实施方案中,编码胞外CD20/CD19 scFv抗原结合结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的胞外CD20/CD19 scFv抗原结合结构域包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0126] 在本文中公开的全人CD20/CD19特异性多靶向、串联和双顺反子CAR的多个实施方案中,一般方案如图1A所示,并且从N端至C端包含CAR靶向结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3ζ激活结构域。在串联CAR中,包括了全人串联CD20和CD19靶向结构域。对于双顺反子CAR,第一CD20靶向CAR包含全人CD20靶向结构域,并且接下来是框内第二CD19靶向CAR,其由CD19靶向结构域组成,并且核糖体跳跃元件插入在CD20 CAR与CD19 CAR序列之间以促进共表达。

[0127] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:5(D0144)(CD20_CD19 CD8 BBz)的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列的CAR。

[0128] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:5的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(D0144)(CD20_CD19 CD8 BBz)。

[0129] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:7(CAR D0255)(CD20_CD19 CD28 CD28 BBz)的核酸序列,并且编码包含如SEQ ID NO:8(CAR D0255)(CD20_CD19 CD28 CD28 BBz)中所示氨基酸序列的CAR。

[0130] 在另一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:7的核酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR

(CAR D0255)(CD20_CD19 CD28 CD28 BBz)。

[0131] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:9(CAR D0256)(CD20_CD19 CD8 CD28 BBz)的核酸序列,并且编码包含如SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列的CAR。

[0132] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:9的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(CAR D0256)(CD20_CD19 CD8 CD28 BBz)。

[0133] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:13(CAR D0257)(CD20 CD8 CD28z_CD19 CD8 BBz)的核酸序列,并且编码包含如SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的CAR。

[0134] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:13的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(CAR D0257)(CD20 CD8 CD28z_CD19 CD8 BBz)。

[0135] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15(CAR D0258)(CD20 CD8 BBz_CD19 CD8 CD28z)的核酸序列,并编码包含如SEQ ID NO:16中所示氨基酸序列的CAR。

[0136] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:15的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:16中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(CAR D0258)(CD20 CD8 BBz_CD19 CD8 CD28z)。

[0137] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:17(CAR D0266)(CD20 CD8 OX40 OX40z_CD19 CD8 ICOSz)的核酸序列,并且编码包含SEQ ID NO:18中所示氨基酸序列的CAR。

[0138] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:17的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:18中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(CAR D0266)(CD20 CD8 OX40 OX40z_CD19 CD8 ICOSz)。

[0139] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:19(CAR LTG1497)(mCD20_CD19 CD8 BBz)的核酸序列,并且编码包含如SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列的CAR。

[0140] 在一个实施方案中,编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:19的核酸序列,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含如SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的CAR(CAR LTG1497)(mCD20_CD19 CD8 BBz)。

[0141] 并入与全人CD20和CD19抗原反应的单链片段可变(ScFv)序列的抗CD20/CD19 CAR的表面表达在下文实施例1图1B中示出。每种含ScFv的CAR的表达水平通过使用CD19 Fc重组蛋白,随后使用抗Fc AF647(APC)对来自健康供体的经LV转导T细胞进行流式细胞术分析来确定。与未经转导的T细胞对照相比,基于ScFv的抗CD20/CD19 CAR构建体D0144、D0255、

D0256、D0257、D0258、D0266和包含鼠CD20/CD19 scFv串联靶向结构域的比较构建体LTG1497在人原代T细胞中(在CD4+T和CD8+T谱系二者中)高度表达(范围为总的T细胞的49.7%至78.6%CAR+)。

[0142] 如实施例1和图2A至2D所示的,表明了全人CD20/CD19 CAR的高的细胞裂解活性。将人原代T细胞用编码CAR构建体(D0144、D0255、D0256、D0257、D0258、D0266和比较构建体LTG1497,参见方法)的LV转导,然后与用萤火虫萤光素酶稳定转导的Raji、NALM-6、REH或293T细胞系一起孵育18小时,用于基于发光的体外杀伤测定。测试的所有白血病系在其表面上均表达CD19,而阴性对照293T则不如此。CD20表达在肿瘤系之间变化。Raji系是CD20阳性的,而REH是CD20阴性的,对照系293T也是如此。NALM-6系具有微弱但可检测的CD20表达。

[0143] 所有表达CD19和/或CD20的肿瘤系都被CAR T细胞裂解,而CD19阴性CD20阴性系293T没有发生裂解。

[0144] Raji细胞的最有效的特异性裂解由CAR构建体D0255和D0266介导,如通过在最低效应物与靶标比为2.5:1时的裂解所观察到的(图2A)。当与靶标系NALM 6和Reh组合时,所有CAR都实现了强效和相当的裂解(图2B,2C)。

[0145] 然后评价抗CD20/CD19 CAR T细胞的细胞因子分泌的能力。将肿瘤细胞与CAR T细胞或对照T细胞以10:1的效应物与靶标比共孵育过夜(+Raji组),并通过ELISA分析培养上清液中的IFNγ、TNFα和IL-2(参见图3A至3C)。在不存在靶标的情况下,包括CAR T细胞作为阴性对照(-Raji组)。还包括未经转导的(UTD)阴性T细胞对照。所有的CAR T组都诱导了对肿瘤细胞应答的细胞因子,而阴性对照-Raji没有产生明显的细胞因子诱导。与阴性对照相比,所有CAR都强烈诱导了IFNγ、TNFα和IL-2。

[0146] TNF-α的最高水平由CAR D0255、D0257、D0258、D0266产生,并且IFN-γ和IL-2的产生遵循相似的模式(图3A至3C)。

[0147] 为了确定全人CD20/CD19 CRA候选物在长期暴露于抗原的过程中的表现,我们进行了与Raji肿瘤细胞的共培养实验。将CAR T细胞与Raji淋巴瘤细胞以低的0.3:1的效应物与靶标比置于培养物中,并且在7天之后,将CAR T细胞再次用Raji细胞以0.15:1的效应物与靶标比再刺激,直到研究第10天(图4A)。这种设置为CAR T细胞功能建立了一个极具挑战性的环境,以便精确定位CAR T候选物构建体之间甚至是最小的功能差异。在第0、7和10天通过流式细胞术获得细胞培养物,以评价在每个共孵育周期结束时剩余的活的靶细胞百分比,以及CAR T细胞扩增(图4B至4C)。在第二共孵育周期结束时介导Raji靶细胞水平最大降低的三种CAR T细胞是D0255、D0257和D0266(图4B)。具有最好的扩增的CAR T细胞是LTG1497、D0255和D0144(图4C)。因此,与该组中的其他构建体和LTG1497比较物相比,我们已经鉴定了许多具有强效细胞毒性和扩增特性的CAR T细胞候选物。

[0148] 为了在体内表征CAR T细胞的功能特性,我们用低剂量的两百万个全人CD20/CD19 CAR T细胞D0255、D0256、D0266、D0257或D0258,或鼠scFv CD20/CD19 CAR比较物LTGI497来处理具有已建立的Raji异种移植肿瘤的NSG小鼠(图5A)。在用所有CAR t构建体处理的小鼠中,肿瘤到第13天被排斥,并且小鼠到第55天仍处于缓解中(图5B)。相比之下,对照组仅肿瘤和UTD中的小鼠发生高肿瘤负荷(图5B)。在第55天,用一百万另外的Raji细胞再攻击所有组中的小鼠,并且不施用另外的CAR T处理。每组LTG1497、D0256、D0258中的一只小鼠和每组D0255和D0266中的两只小鼠不符合再攻击标准,并且未被招募。在此时,将新的、年龄匹

配的小鼠组群也用Raji细胞接种作为对照。随访肿瘤进展直至第96天。在第96天,在CAR组D0255和D0258中,所有招募的小鼠均存活并且没有肿瘤,在各组D0257、D0256、LTG1497中失去一只小鼠,并且在组D0266中失去三只小鼠。因此,对于所有的CAR构建体,表明了体内清除初始异种移植物肿瘤的能力,并且对于构建体D0255、D0258和LTG1497,表明了在肿瘤再攻击后CAR T细胞抗肿瘤功能的持久性(图5C)。因此,就其抗肿瘤效用而言,CAR T候选物的新兴排名必须根据经验确定,并且不能仅基于CAR结构或靶向结构域组合物进行预测。

[0149] 不旨在限于任何特定作用机理,认为与本发明的示例性CAR相关的增强的治疗性功能的可能原因包括,例如但不限于:a)质膜内横向运动的改善从而允许更有效的信号转导,b)在质膜微结构域(例如脂筏)内的优异位置,以及与和T细胞活化相关的跨膜信号传导级联相互作用的更大能力,c)通过优先移动远离抑制性(dampening)或下调性的相互作用(例如与磷酸酶(例如CD45)的接近性或相互作用较低)而在质膜内的优异位置,以及d)优异组装成T细胞受体信号传导复合物(即免疫突触),或其任意组合。

[0150] 尽管已用示例性的胞外全人CD20/CD19仅可变重链和ScFv抗原结合结构域举例说明了本公开内容,但全人CD20/CD19仅可变重链和ScFv抗原结合结构域内的其他核苷酸和/或氨基酸变体可用于得到在本文中所述CAR中使用的全人CD20/CD19抗原结合结构域。

[0151] 根据待靶向的期望抗原,CAR可被另外改造成包含对期望的抗原靶标具有特异性的合适抗原结合结构域。例如,如果全人CD20/CD19是待靶向的期望抗原,则可将针对全人CD20/CD19的抗体用作并入到CAR中的抗原结合结构域。

[0152] 在本发明的一个方面中,提供了能够与非TSA或非TAA结合的CAR,所述非TSA或非TAA包括例如但不限于来源于以下的抗原:逆转录病毒科(例如,人类免疫缺陷病毒,例如HIV-1和HIV-LP)、小核糖核酸病毒科(例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒和艾柯病毒)、风疹病毒、冠状病毒、水疱性口炎病毒、狂犬病病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、细小病毒、腺病毒科、疱疹病毒科[例如1型和2型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus,HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)和疱疹病毒]、痘病毒科(例如,天花病毒、痘苗病毒和痘病毒)或丙型肝炎病毒,或其任意组合。

[0153] 在本发明的另一方面中,提供了能够与来源于以下的细菌菌株的抗原结合的CAR:葡萄球菌(Staphylococci)、链球菌(Streptococcus)、大肠杆菌(Escherichia coli)、假单胞菌(Pseudomonas)或沙门氏菌(Salmonella)。特别地,提供了能够与来源于感染性细菌的抗原结合的CAR,所述感染性细菌例如幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophilia)、分枝杆菌属(Mycobacteria sp.)的菌株(例如,结核分枝杆菌(M.tuberculosis)、鸟分枝杆菌(M.avium)、胞内分枝杆菌(M.intracellulare)、堪萨斯分枝杆菌(M.kansaii)或戈登分枝杆菌(M.gordonea))、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitides)、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)、化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)、A组链球菌(Group AStreptococcus)、B组链球菌(无乳链球菌(Streptococcus agalactiae))、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)或破伤风梭菌(Clostridium tetani)、或其组合。

[0154] 2.跨膜结构域

[0155] 关于跨膜结构域,CAR包含一个或更多个与CAR的胞外CD19/CD20抗原结合结构域融合的跨膜结构域。

[0156] 跨膜结构域可来源于天然或合成来源。当来源是天然的时,该结构域可来源于任何膜结合的或跨膜的蛋白质。

[0157] 特别用于本文中所述的CAR的跨膜区可来源于以下(即,至少包含以下的跨膜区):T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ε,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD28,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF16或TNFRSF19。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将存在于合成跨膜结构域的每个末端。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(优选地长度为2至10个氨基酸)可在CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。

[0158] 在一个实施方案中,除上述跨膜结构域之外,还使用天然与CAR中结构域之一缔合的跨膜结构域。

[0159] 在一些情况下,可选择跨膜结构域或通过氨基酸替换以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合从而使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0160] 在一个实施方案中,本发明CAR中的跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:35的核酸序列。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:36的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0161] 在一个实施方案中,所编码的跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:34、36或48的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,替换)但不超过20、10或5个修饰(例如,替换)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34、36或48的氨基酸序列具有95%至99%同一性的序列。

[0162] 在一些情况下,CAR的跨膜结构域包含CD8.α.铰链结构域。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:37的核酸序列。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含编码SEQ ID NO:38的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,或与其具有95%至99%同一性的序列。

[0163] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8的胞外结构域,并且与跨膜CD8结构域、跨膜CD28结构域,或其组合连接。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的CAR中的跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一个实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:47的核酸序列。在一个实施方案中,CD28跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:48的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列。

[0165] 在一个实施方案中,所编码的跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,替换)但不超过20、10或5个修饰(例如,替换)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有95%至99%同一性的序列

[0166] 3.间隔区结构域

[0167] 在CAR中,可在胞外结构域与跨膜结构域之间,或在胞内结构域与跨膜结构域之间布置间隔区结构域。间隔区结构域意指用于将跨膜结构域与胞外结构域和/或跨膜结构域与胞内结构域连接的任何寡肽或多肽。间隔区结构域包含至多300个氨基酸,优选10至100

个氨基酸,并且最优选25至50个氨基酸。

[0168] 在数个实施方案中,接头可包含间隔区元件,其在存在时增大接头的尺寸,使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增大。示例性间隔区是普通技术人员已知的,并包括在美国专利No7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414以及美国专利公开No.20110212088和20110070248中所列出的那些,其各自通过引用整体并入本文。

[0169] 间隔区结构域优选具有促进CAR与抗原结合并增强信号传导进入到细胞中的序列。预期促进结合的氨基酸的一些实例包括半胱氨酸、带电荷的氨基酸以及潜在的糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可用作构成间隔区结构域的氨基酸。

[0170] 作为间隔区结构域,可使用以下的全部或一部分:CD8.α(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)的第137至206位氨基酸(其为铰链区)(SEQ ID NO:39),CD8.β(GenBank:AAA35664.1)的第135至195位氨基酸,CD4(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)的第315至396位氨基酸,或CD28(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)的第137至152位氨基酸。此外,作为间隔区结构域,可使用抗体H链或L链的恒定区的一部分。此外,间隔区结构域可以是人工合成的序列。

[0171] 在一些情况下,CAR的跨膜结构域包含CD28铰链结构域。在一个实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:31的核酸序列。在一个实施方案中,CD28铰链结构域包含编码SEQ ID NO:.32的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD28铰链结构域包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列或与其具有95%至99%同一性的序列。

[0172] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中编码的接头结构域来源于CD28的胞外结构域,并与跨膜CD28结构域、跨膜CD28结构域或其组合连接。

[0173] 此外,在CAR中,信号肽序列可与N端连接。信号肽序列存在于许多分泌蛋白和膜蛋白的N端,并且长度为15至30个氨基酸。由于上文作为胞内结构域提及的很多蛋白质分子均具有信号肽序列,因此这些信号肽可用作CAR的信号肽。在一个实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0174] 4.胞内结构域

[0175] CAR的胞质结构域或其他胞内信号传导结构域负责活化其中已置入CAR的免疫细胞的至少一种正常效应物功能。术语“效应物功能”是指细胞的专门功能。例如,T细胞的效应物功能可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应物功能信号并指导细胞执行专门功能的蛋白质的部分。尽管通常可使用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要其转导效应物功能信号,就可使用这样的截短部分代替完整链。因此,术语胞内信号传导结构域意在包括足以转导效应物功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0176] 用于CAR的胞内信号传导结构域的一些优选实例包括T细胞受体(TCR)和共同受体的胞质序列,其在抗原受体接合后共同发挥作用以引发信号转导;以及具有相同功能能力的这些序列的任何衍生物或变体以及任何合成序列。

[0177] 已知仅通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞并且还需要次级信号或共刺激信号。因此,可以说T细胞活化是由两种不同种类的胞质信号传导序列介导的:通过TCR引发抗原依赖性初级活化的那些(初级胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式发挥作用以提供次级信号或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。

[0178] 初级胞质信号传导序列以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式发挥作用的初级胞质信号传导序列可包含被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0179] 特别用于本文中公开的CAR中的包含初级胞质信号传导序列的ITAM的一些实例包括来源于以下的那些:TCRζ(CD3ζ)、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。ITAM的一些具体的非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD3.ζ.(NCBI RefSeq:NP.sub.--932170.1)的第51至164位氨基酸,Fc.ε.RI.γ.(NCBI RefSeq:NP.sub.--004097.1)的第45至86位氨基酸,Fc.ε.RI.β.(NCBI RefSeq:NP.sub.--000130.1)的第201至244位氨基酸,CD3.γ.(NCBI RefSeq:NP.sub.--000064.1)的第139至182位氨基酸,CD3.δ.(NCBI RefSeq:NP.sub.--000723.1)的第128至171位氨基酸,CD3.ε.(NCBI RefSeq:NP.sub.--000724.1)的第153至207位氨基酸,CD5(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)的第402至495位氨基酸,0022(NCBI RefSeq:NP.sub.--001762.2)的第707至847位氨基酸,CD79a(NCBI RefSeq:NP.sub.--001774.1)的第166至226位氨基酸,CD79b(NCBI RefSeq:NP.sub.--000617.1)的第182至229位氨基酸,以及CD66d(NCBI RefSeq:NP.sub.--001806.2)的第177至252位氨基酸,及其与这些肽具有相同功能的变体。基于本文中所述的NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸号是基于每种蛋白质的前体(包含信号肽序列等)的全长进行编号的。在一个实施方案中,CAR中的胞质信号传导分子包含来源于CD3ζ的胞质信号传导序列。

[0180] 在一个优选实施方案中,可将CAR的胞内结构域设计成自身包含CD3-ζ信号传导结构域,或者将其与在CAR的情况下可用的任何其他期望的胞质结构域组合。例如,CAR的胞内结构域可包含CD3ζ链部分和共刺激信号传导区域。共刺激信号传导区域是指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。这样的共刺激分子的一些实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1,LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。这样的共刺激分子的一些具体的非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD2(NCBI RefSeq:NP.sub.--001758.2)的236至351位氨基酸,CD4(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)的第421至458位氨基酸,CD5(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)的第402至495位氨基酸,CD8.α.(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)的第207至235位氨基酸,CD83(GenBank:AAA35664.1)的第196至210位氨基酸,CD28(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)的第181至220位氨基酸,CD137(4-1BB,NCBI RefSeq:NP.sub.--001552.2)的第214至255位氨基酸,CD134(OX40,NCBI RefSeq:NP.sub.--003318.1)的第241至277位氨基酸和ICOS(NCBI RefSeq:NP.sub.--036224.1)的第166至199位氨基酸,及其与这些肽具有相同功能的变体。因此,尽管本文中的公开内容主要以4-1BB作为共刺激信号传导元件来举例说明,但其他共刺激元件也在本公开内容的范围内。

[0181] CAR的胞质信号传导部分内的胞质信号传导序列可以以随机或特定的顺序相互连接。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(优选地长度为2至10个氨基酸)可形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。

[0182] 在一个实施方案中,胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在另一个实施方案中,胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。在另一个实施方案中,胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号传导结构域以及CD28和4-1BB的信号传导结构域。

[0183] 在一个实施方案中,CAR中的胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号传导结构域和CD3-ζ的信号传导结构域,其中4-1BB的信号传导结构域包含SEQ ID NO:42、44或45中所示的核酸序列并且CD3-ζ的信号传导结构域包含SEQ ID NO:43中所示的核酸序列。

[0184] 在另一个实施方案中,公开的CAR中的胞内结构域被设计成包含CD28的信号传导结构域和CD3-ζ的信号传导结构域,其中CD28的信号传导结构域包含SEQ ID NO:21中所示的核酸序列,并且CD3-ζ的信号传导结构域包含SEQ ID NO:42、45或46中所示的核酸序列。

[0185] 在另一个实施方案中,CAR中的胞内结构域被设计成包含CD28_4-1BB的连接的信号传导结构域和CD3-ζ的信号传导结构域,其中CD28_4-1BB的信号传导结构域包含SEQ ID NO:25中所示的核酸序列,并且CD3-ζ的信号传导结构域包含SEQ ID NO:42、45或46中所示的核酸序列。

[0186] 5.CAR的另外的描述

[0187] 本发明范围内还明确包括本文中公开的CAR的功能性部分。当在提及CAR使用时,术语“功能性部分”是指本文中所公开的一个或更多个CAR的任何部分或片段,所述部分或片段保留其作为部分的CAR(亲本CAR)的生物学活性。功能性部分涵盖例如保留与亲本CAR在相似程度上或在相同程度上或在更高程度上识别靶细胞或检测、治疗或预防疾病的能力的那些CAR的部分。根据亲本CAR,功能性部分可包含例如亲本CAR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0188] 功能性部分可在该部分的氨基端或羧基端或在两端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸不存在于亲本CAR的氨基酸序列中。期望地,另外的氨基酸不干扰功能性部分的生物学功能,例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更期望地,与亲本CAR的生物学活性相比,另外的氨基酸增强了生物学活性。

[0189] 本公开内容的范围内包括本文中公开的CAR的功能性变体。本文中使用的术语“功能性变体”是指与亲本CAR具有实质或显著序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质,所述功能性变体保留其作为变体的CAR的生物学活性。功能性变体涵盖例如保留与亲本CAR在相似程度、相同程度或更高程度上识别靶细胞的能力的本文中所述的CAR(亲本CAR)的那些变体。根据亲本CAR,功能性变体可例如与亲本CAR在氨基酸序列方面具有至少约30%、50%、75%、80%、90%、98%或更多的同一性。

[0190] 功能性变体可例如包含具有至少一个保守氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。作为替代或补充,功能性变体可包含具有至少一个非保守氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下,优选地非保守氨基酸替换不干扰或抑制功能性变体的生物学活性。非保守氨基酸替换可增强功能性变体的生物学活性,以使得与亲本CAR相比,功能性变体的生物学活性提高。

[0191] CAR的氨基酸替换优选为保守氨基酸替换。保守氨基酸替换是本领域中已知的,并且包括其中具有某些物理和/或化学特性的一个氨基酸被交换为具有相同或相似化学或物理特性的另一个氨基酸的氨基酸替换。例如,保守氨基酸替换可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸替换另一个酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu),具有非极性侧链的氨基酸替换另一个具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等),碱性/带正电荷的极性氨基酸替换另一个碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等),具有极性侧链的不带电荷的氨基酸替换另一个具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gin、Ser、Thr、Tyr等),具有β分支侧链的氨基酸替换另一个具有β分支侧链的氨基酸(例如,He、Thr和Val),具有芳族侧链的氨基酸替换另一个具有芳族侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0192] CAR可基本上由本文中所述的一个或更多个特定氨基酸序列组成,使得其他组分(例如其他氨基酸)不会实质上改变功能性变体的生物学活性。

[0193] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可具有任何长度,即,可包含任何数目的氨基酸,前提是CAR(或其功能性部分或功能性变体)保留其生物学活性,例如,与抗原特异性结合、检测哺乳动物中的患病细胞、或者在哺乳动物中治疗或预防疾病等的能力。例如,CAR的长度可以为约50至约5000个氨基酸,例如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。

[0194] CAR(包括本发明的功能性部分和功能性变体)可包含合成氨基酸以代替一种或更多种天然存在的氨基酸。这样的合成氨基酸是本领域中已知的,并且包括例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、-氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸,反式-3-羟基脯氨酸和反式-4-羟基脯氨酸、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、a-萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吲哚-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'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、-氨基环戊烷羧酸、a-氨基环己烷羧酸、a-氨基环庚烷羧酸、a-(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、γ-二氨基丁酸、β-二氨基丙酸、高苯丙氨酸和a-叔丁基甘氨酸。

[0195] 可将CAR(包括功能性部分和功能性变体)糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化(通过例如二硫桥)或转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或多聚化或缀合。

[0196] 可通过本领域中已知的方法获得CAR(包括其功能性部分和功能性变体)。CAR可通过制备多肽或蛋白质的任何合适的方法制备。从头合成多肽和蛋白质的合适方法描述于参考文献中,例如Chan et al.,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;Peptide and Protein Drug Analysis,ed.Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;Epitope Mapping,ed.Westwood et al.,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001;以及美国专利5,449,752。另外,可使用本文中所述的核酸使用标准重组方法重组产生多肽和蛋白质。参见,例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY 2001;和Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。另外,一些CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可从例如植物、细菌、昆虫、哺乳动物(例如,大鼠、人等)

的来源分离和/或纯化。分离和纯化的方法是本领域中公知的。或者,本文中所述的CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可由公司商业化合成。在这方面中,CAR可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0197] B.抗体和抗原结合片段

[0198] 一个实施方案还提供了与本文中公开的一种或更多种抗原特异性结合的CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合结构域或部分。本文中使用的"表达CAR的T细胞"或"CAR T细胞"意指表达CAR的T细胞,并且具有通过例如CAR的抗体来源的靶向结构域确定的抗原特异性。

[0199] 本文中使用的"抗原结合结构域"可包括抗体及其抗原结合片段。术语"抗体"在本文中以最广泛的含义使用,并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其抗原结合片段,只要它们显示出所期望的抗原结合活性即可。抗体的一些非限制性实例包括例如保留对抗原的结合亲和力的本领域中已知的完整的免疫球蛋白及其变体和片段。

[0200] "单克隆抗体"是从基本上均质的抗体的群获得的抗体,即,除了可能以少量存在的天然存在的突变以外,包含该群的单独抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单个抗原表位。修饰语"单克隆"表示如从基本上均质的抗体群获得的抗体的特征,并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。在一些实例中,单克隆抗体是由B淋巴细胞的单克隆或已经被编码单个抗体(或其抗原结合片段)的抗体轻链和重链可变区的核酸转染的细胞或其子代产生的抗体。在一些实例中,从对象中分离单克隆抗体。单克隆抗体可具有保守氨基酸替换,其对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本无影响。产生单克隆抗体的示例性方法是已知的,例如,参见Harlow&Lane,Antibodies,ALaboratory Manual,第2版.Cold Spring Harbor Publications,New York(2013)。

[0201] 通常来说,免疫球蛋白具有通过二硫键相互连接的重链(H)和轻链(L)。免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因以及众多的免疫球蛋白可变结构域基因。存在两种类型的轻链,lambda(λ)和kappa(κ)。存在决定抗体分子之功能活性的五种主要的重链种类(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0202] 每个重链和轻链包含恒定区(或恒定结构域)和可变区(或可变结构域;参见,例如Kindt et al.Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman和Co.,第91页(2007))。在数个实施方案中,重链和轻链可变区组合以特异性地结合抗原。在另外的一些实施方案中,仅需要重链可变区。例如,仅由重链组成的天然存在的骆驼科(camelid)抗体在不存在轻链的情况下是有功能且稳定的(参见,例如,Hamers-Casterman et al.,Nature,363:446-448,1993;Sheriff et al.,Nat.Struct.Biol.,3:733-736,1996)。对"VH"或"VH"的提及是指抗体重链的可变区,包括抗原结合片段,例如Fv、ScFv、dsFv或Fab的可变区。对"VL"或"VL"的提及是指抗体轻链的可变结构域,包括Fv、ScFv、dsFv或Fab的可变结构域。

[0203] 轻链和重链可变区包含被三个高变区(也称为"互补决定区"或"CDR")中断的"框架"区(参见,例如,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991)。不同轻链或重链的框架区的序列在物种内是相对保守的。抗体的框架区(即成分轻链和重链的组合框架区)用于在三维空间中定位和对齐CDR。

[0204] CDR主要负责与抗原的表位结合。给定CDR的氨基酸序列边界可使用许多公知的方案中的任一种来容易地确定,包括由以下描述的那些:Kabat et al.(“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991;“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani et al.(JMB 273,927-948,1997;“Chothia”编号方案)和Lefranc et al.(“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variabledomains and Ig superfamily V-like domains,”Dev.Comp.Immunol.,27:55-77,2003;“IMGT”编号方案)。每条链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3(从N端至C端),并且通常也由其中特定CDR所定位的链来鉴定。因此,VH CDR3是来自其中存在它的抗体的重链的可变结构域的CDR3,而VLCDR1是来自其中存在它的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。轻链CDR有时被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链CDR有时被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0205] “抗原结合片段”是保留了特异性识别同源抗原之能力的全长抗体的一部分以及这样的部分的多种组合。抗原结合片段的一些非限制性实例包括Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2;双抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子(例如,ScFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段包括通过修饰完整抗体产生的抗原结合片段或使用重组DNA方法从头合成的那些(参见,例如,Kontermann和Dubel(编辑),Antibody Engineering,第1至2卷,第2版,Springer Press,2010)。

[0206] 单链抗体(ScFv)是包含作为遗传融合的单链分子的通过合适的多肽接头连接的一个或更多个抗体的VH和VL结构域的经遗传改造的分子(参见,例如,Bird et al.,Science,242:423 426,1988;Huston et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,85:5879 5883,1988;Ahmad et al.,Clin.Dev.Immunol.,2012,doi:10.1155/2012/980250;Marbry,IDrugs,13:543-549,2010)。ScFv中的VH结构域和VL结构域的分子内取向对于ScFv通常不是决定性的。因此,可使用具有这两种可能的排列(VH结构域-接头结构域-VL结构域;VL结构域-接头结构域-VH结构域)的ScFv。

[0207] 在dsFv中,重链和轻链可变链已突变以引入二硫键从而使链的缔合稳定化。还包括双抗体,其是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但是使用太短而不允许相同链上的两个结构域之间配对的接头,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见,例如,Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,90:6444 6448,1993;Poljak et al.,Structure,2:1121 1123,1994)。

[0208] 抗体还包括经遗传改造形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异源缀合抗体(例如双特异性抗体)。还参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,Immunology,第3版.,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0209] 非天然存在的抗体可使用固相肽合成来构建,可重组产生,或者可例如如Huse et al.,Science 246:1275-1281(1989)(其通过引入并入本文)所述通过筛选由可变重链和可变轻链组成的组合文库而获得。制备例如嵌合的、人源化的、CDR移植的、单链和双功能性抗体的这些和其他方法是本领域技术人员公知的(Winter和Harris,Immunol.Today 14:243-246(1993);Ward et al.,Nature 341:544-546(1989);Harlow和Lane,同上,1988;Hilyard et al.,Protein Engineering:Apractical approach(IRL Press 1992);Borrabeck,

Antibody Engineering,第2版.(Oxford University Press 1995);其各自通过引用并入本文)。

[0210] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中使参考抗体与其抗原的结合阻断50％或更多的抗体,并且反之亦然,参考抗体在竞争测定中使该抗体与其抗原的结合阻断50％或更多。抗体竞争测定是已知的,并且本文中提供了示例性的竞争测定。

[0211] “人源化”抗体或抗原结合片段包含人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成)抗体或抗原结合片段的一个或更多个CDR。提供CDR的非人抗体或抗原结合片段被称为“供体(donor)”,并且提供框架的人抗体或抗原结合片段被称为“接受体(acceptor)”。在一个实施方案中,在人源化的免疫球蛋白中,所有CDR都来自供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在,但是如果存在的话,其可与人免疫球蛋白恒定区基本上相同,例如至少约85％至90％,例如约95％或更高的同一性。因此,除了可能的CDR之外,人源化抗体或抗原结合片段的所有部分都与天然人抗体序列的相应部分基本上相同。

[0212] “嵌合抗体”是包含来源于两种不同抗体(其通常来自不同的物种)的序列的抗体。在一些实例中,嵌合抗体包含来自一种人抗体的一个或更多个CDR和/或框架区和来自另一种人抗体的CDR和/或框架区。

[0213] “全人抗体”或“人抗体”是包含来自(或来源于)人基因组的序列,但不包含来自其他物种的序列的抗体。在一些实施方案中,人抗体包含来自(或来源于)人基因组的CDR、框架区和Fc区(如果存在的话)。人抗体可使用用于基于来源于人基因组的序列产生抗体的技术来鉴定和分离,例如通过噬菌体展示或使用转基因动物(参见例如Barbas et al.Phage display:ALaboratory Manuel.第1版.New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2004.Print.;Lonberg,Nat.Biotech.,23:1117-1125,2005;Lonenberg,Curr.Opin.Immunol.,20:450-459,2008)。

[0214] 抗体可具有一个或更多个结合位点。如果存在多于一个结合位点,则结合位点可彼此相同或者可以不同。例如,天然存在的免疫球蛋白具有两个相同的结合位点,单链抗体或Fab片段具有一个结合位点,而双特异性或双功能抗体具有两个不同的结合位点。

[0215] 测试抗体与CAR的任何功能性部分结合的能力的方法是本领域中已知的并且包括任何抗体-抗原结合测定,例如如放射免疫测定(radioimmunoassay,RIA)、ELISA、Western印迹、免疫沉淀和竞争性抑制测定(参见,例如,Janeway et al.,见下文,美国专利申请公开No.2002/0197266A1和美国专利No.7,338,929)。

[0216] 此外,CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可被修饰以包含可检测标记,例如如放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)、藻红蛋白(phycoerythrin,PE))、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒)。

[0217] C.缀合物

[0218] 对本文中公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞或单克隆抗体或其抗原结合片段可使用任意数目的本领域技术人员已知的方法与试剂例如效应分子或可检测标志物缀合。可使用共价和非共价连接方式二者。缀合物包括但不限于其中存在效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段共价连接的分子,所述抗体或抗原结合片段特异性结合本文中公开的一种或更多种抗原。本领域技术人员将理解,可使用多种效

应分子和可检测标志物,包括(但不限于)化学治疗剂、抗血管生成剂、毒素、放射性试剂(例如^{125}I、^{32}P、^{14}C、^{3}H和^{35}S)和其他标记、靶部分和配体等。

[0219] 特定效应分子或可检测标志物的选择取决于特定的靶分子或细胞以及期望的生物学效应。因此,例如,效应分子可以是用于导致特定靶细胞(例如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。

[0220] 用于将效应分子或可检测标志物附接至抗体或抗原结合片段的方法根据效应物的化学结构而变化。多肽通常包含多种官能团;例如羧酸(COOH)、游离胺(-NH_2)或巯基(-SH)基团,其可用于与抗体上的合适官能团反应以导致效应分子或可检测标志物的结合。或者,将抗体或抗原结合片段衍生化以暴露或附接另外的反应性官能团。衍生化可涉及附接许多已知接头分子(例如,可获自Pierce Chemical Company,Rockford,IL的那些)中的任一种。接头可以是用于将抗体或抗原结合片段与效应分子或可检测标志物连接的任何分子。接头能够与抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标志物这二者形成共价键。合适的接头是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。当抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标志物是多肽时,接头可通过其侧基与组成氨基酸(例如通过二硫键与半胱氨酸连接)连接或与末端氨基酸的α碳氨基和羧基连接。

[0221] 在数个实施方案中,接头可包含间隔区元件,其在存在时增大接头的大小,使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增大。示例性间隔区是本领域普通技术人员已知的,并且包括以下中列出的那些:美国专利No 7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公开No20110212088和20110070248,其各自通过引用整体并入本文。

[0222] 在一些实施方案中,接头在胞内条件下是可切割的,使得在胞内环境中接头的切割从抗体或抗原结合片段中释放效应分子或可检测标志物。在另一些实施方案中,接头不可切割,并且效应分子或可检测标志物例如通过抗体降解而释放。在一些实施方案中,接头可被存在于胞内环境(例如,在溶酶体或内体或陷窝(caveolea)内)中的切割剂切割。接头可以是例如肽接头,其被胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶)切割。在一些实施方案中,肽接头为至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。然而,接头可以是4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸长,例如1至2、1至3、2至5、3至10、3至15、1至5、1至10、1至15个氨基酸长。蛋白酶可包括组织蛋白酶(cathepsin)B和D以及纤溶酶,已知所有这些均水解二肽药物衍生物,导致靶细胞内活性药物的释放(参见例如Dubowchik and Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123)。例如,可使用可被巯基依赖性蛋白酶组织蛋白酶B切割的肽接头(例如,苯丙氨酸-亮氨酸或甘氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸接头)。这样的接头的另一些实例在例如美国专利No 6,214,345中描述,其通过引用并入本文。在一个具体的实施方案中,可被胞内蛋白酶切割的肽接头是缬氨酸-瓜氨酸接头或苯丙氨酸-赖氨酸接头(参见例如美国专利No6,214,345,其描述了具有缬氨酸-瓜氨酸接头的多柔比星的合成)。

[0223] 在另一些实施方案中,可切割接头是pH敏感的,即在某些pH值下对水解敏感。通

常,pH敏感接头在酸性条件下可水解。例如,可使用在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如,腙、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)(参见例如美国专利No 5,122,368、5,824,805、5,622,929;Dubowchik and Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123;Neville et al.,1989,Biol.Chem.264:14653-14661)。这样的接头在中性pH条件(例如在血液中的条件)下相对稳定,但在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施方案中,可水解接头是硫醚接头(例如如,通过酰腙键与治疗剂连接的硫醚(参见例如美国专利No 5,622,929)。

[0224] 在另一些实施方案中,接头在还原条件下是可切割的(例如,二硫化物接头)。多种二硫化物接头是本领域中已知的,包括例如使用以下可形成的那些:SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫代)甲苯)-、SPDB和SMPT。(参见例如Thorpe et al.,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak et al.,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer(C.W.Vogeled.,Oxford U.Press,1987);Phillips et al.,Cancer Res.68:92809290,2008)。还参见美国专利No 4,880,935)。

[0225] 在另一些具体的实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson et al.,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰基接头(Lau et al.,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau et al.,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0226] 在另一些实施方案中,接头不可切割,并且效应分子或可检测标志物通过抗体降解而释放(参见美国公开No 2005/0238649,其通过引用整体并入本文)。

[0227] 在数个实施方案中,接头在胞外环境中对切割具有抗性。例如,当缀合物存在于胞外环境中(例如血浆中)时,缀合物的样品中不多于约20%、不多于约15%、不多于约10%、不多于约5%、不多于约3%、或不多于约1%的接头被切割。可例如通过将包含目标接头的缀合物与血浆一起孵育预定的时间段(例如,2、4、8、16或24小时)并随后对血浆中存在的游离效应分子或可检测标志物的量进行定量来确定接头在胞外环境中是否对切割具有抗性。可用于缀合物中的多种示例性接头在WO 2004-010957、美国公开No 2006/0074008、美国公开No 20050238649和美国公开No 2006/0024317中描述,其各自通过引用整体并入本文。

[0228] 在数个实施方案中,提供了CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与一种或更多种小分子毒素(例如加利车霉素(calicheamicin)、美登素类化合物(maytansinoid)、多拉司他汀(dolastatin)、奥瑞斯他汀(auristatin)、单端孢菌烯(trichothecene)和CC1065)以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物的缀合物。

[0229] 适合用作美登素类化合物毒素部分的美登素化合物是本领域中公知的,并且可根据已知方法从天然来源分离,使用基因工程技术产生(参见Yu et al.(2002)PNAS 99:7968-7973),或根据已知方法合成地制备美登醇和美登醇类似物。美登素类化合物是通过抑制微管蛋白聚合而发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素首次从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)中分离(美国专利No 3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登素类化合物,例如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利No 4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物例如在以下中公开:美国专利No 4,137,230、4,248,870、4,256,746、4,260,

608、4,265,814、4,294,757、4,307,016、4,308,268、4,308,269、4,309,428、4,313,946、4,315,929、4,317,821、4,322,348、4,331,598、4,361,650、4,364,866、4,424,219、4,450,254、4,362,663和4,371,533,其各自通过引用并入本文。包含美登素类化合物的缀合物、其制备方法及其治疗用途在例如美国专利No 5,208,020、5,416,064、6,441,163以及欧洲专利EP 0 425 235B1中公开,其公开内容在此明确地通过引用并入。

[0230] 另外的毒素可与CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分一起使用。示例性毒素包括假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin,PE)、蓖麻毒蛋白(ricin)、相思豆毒蛋白(abrin)、白喉毒素及其亚基、核毒素(ribotoxin)、核糖核酸酶、皂草毒蛋白(saporin)和加利车霉素以及肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素是本领域中公知的,并且许多可从商业来源容易地获得(例如Sigma Chemical Company,St.Louis,MO)。所考虑的毒素还包括毒素的变体(参见,例如,参见美国专利No 5,079,163和4,689,401)。

[0231] 皂草毒蛋白是来源于肥皂草(Saponaria officinalis)的毒素,其通过使核糖体复合物的60S部分失活来破坏蛋白质合成(Stirpe et al.,Bio/Technology,10:405-412,1992)。然而,该毒素不具有特异性进入到细胞中的机制,并因此需要与被内化的识别细胞表面蛋白的抗体或抗原结合片段缀合以被细胞有效地摄取。

[0232] 白喉毒素分离自白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)。通常,用于免疫毒素的白喉毒素被突变以降低或消除非特异性毒性。具有完全酶活性但显著降低的非特异性毒性的被称为CRM107的突变体自二十世纪七十年代就已知(Laird and Groman,J.Virol.19:220,1976),并且已被用于人临床试验。参见美国专利No 5,792,458和美国专利No 5,208,021。

[0233] 蓖麻毒蛋白是来自蓖麻(Ricinus communis)(蓖麻籽)的凝集素RCA60。对于蓖麻毒蛋白的一些实例,参见美国专利No 5,079,163和美国专利No 4,689,401。蓖麻凝集素(Ricinus communis agglutinin,RCA)以两种形式存在,其根据其约65kD和120kD的分子量分别表示为RCA_{60}和RCA_{120}(Nicholson&Blaustein,J.Biochim.Biophys.Acta 266:543,1972)。A链负责使蛋白质合成失活和杀伤细胞。B链使蓖麻毒蛋白与细胞表面半乳糖残基结合,并且有助于A链转运到胞质溶胶中(Olsnes et al.,Nature 249:627-631,1974和美国专利No 3,060,165)。

[0234] 核糖核酸酶也与靶向分子缀合以用作免疫毒素(参见Suzuki et al.,Nat.Biotech.17:265-70,1999)。一些示例性核毒素(ribotoxin)(例如α-帚曲毒蛋白(α-sarcin)和局限曲菌素(restrictocin))在例如Rathore et al.,Gene190:31-5,1997;和Goyal and Batra,Biochem.345Pt 2:247-54,2000中讨论。加利车霉素首次分离自棘孢小单孢(Micromonospora echinospora),并且是烯二炔类抗肿瘤抗生素家族的成员,其造成DNA中的双链断裂,导致凋亡(参见例如Lee et al.,J.Antibiot.42:1070-87,1989)。该药物是临床试验中免疫毒素的毒性部分(参见例如Gillespie et al.,Ann.Oncol.11:735-41,2000)。

[0235] 相思豆毒蛋白包含来自相思子(Abrus precatorius)的毒性凝集素。毒素成分相思豆毒蛋白a、b、c和d的分子量为约63kD至67kD,并且由两条二硫物连接的多肽链A和B构成。A链抑制蛋白质合成;B链(相思豆毒蛋白-b)与D-半乳糖残基结合(参见Funatsu et al.,Agr.Biol.Chem.52:1095,1988;以及Olsnes,Methods Enzymol.50:330-335,1978)。

[0236] 对本文中公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段也可与可检测标志物缀合;例如能够通过以下检测的可检测标志物:ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微术或诊断成像技术(例如计算机断层扫描(computed tomography,CT)、计算机轴向断层扫描(computed axial tomography,CAT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)、核磁共振成像(nuclear magnetic resonance imaging,NMRI)、磁共振断层扫描(magnetic resonance tomography,MTR)、超声、纤维光学检查和腹腔镜检查)。可检测标志物的一些具体的非限制性实例包括荧光团、化学发光剂、酶连接物、放射性同位素和重金属或化合物(例如用于通过MRI检测的超顺磁性铁氧化物纳米晶体)。例如,可用的可检测标志物包括荧光化合物,包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲基胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。还使用生物发光标志物,例如萤光素酶、绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)、黄色荧光蛋白(Yellow fluorescent protein,YFP)。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分也可与可用于检测的酶(例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等)缀合。当CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与可检测酶缀合时,其可通过添加另外的试剂来检测,酶使用该试剂产生可辨别的反应产物。例如,当存在试剂辣根过氧化物酶时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺产生视觉上可检测的有色反应产物。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分也可与生物素缀合,并且通过间接测量亲和素或链霉亲和素结合来检测。应注意的是,亲和素本身可与酶或荧光标记缀合。

[0237] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可与顺磁性试剂(例如钆)缀合。顺磁性试剂(例如超顺磁性铁氧化物)也可用作标记。抗体也可与镧系元素(例如铕和镝)和锰缀合。抗体或抗原结合片段还可用被第二报道物识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)标记。

[0238] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分也可与放射性标记的氨基酸缀合。放射性标记可用于诊断性目的和治疗性目的二者。例如,放射性标记可用于通过x射线、发射光谱或其他诊断技术来检测本文中公开的一种或更多种抗原和表达抗原的细胞。此外,放射性标记可治疗性地用作毒素以用于在对象中治疗肿瘤,例如用于治疗神经母细胞瘤。用于多肽的标记的一些实例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核苷酸:^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I。

[0239] 检测这样的可检测标志物的方法是本领域技术人员公知的。因此,例如,可使用照相胶片或闪烁计数器检测放射性标记,可使用光电检测器检测发射的光照来检测荧光标志物。通常通过向酶提供底物并检测酶对底物之作用产生的反应产物来检测酶标记,并通过简单地使有色标记可视化来检测比色标记。

[0240] D.核苷酸、表达、载体和宿主细胞

[0241] 本发明的一个实施方案还提供了包含编码本文中所述的任何CAR、抗体或其抗原结合部分(包括其功能性部分和功能性变体)的核苷酸序列的核酸。本发明的核酸可包含编码本文中所述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。

[0242] 在一些实施方案中,核苷酸序列可以是经密码子修饰的。不受特定理论的束缚,认为核苷酸序列的密码子优化提高了mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可涉

及将天然密码子替换成编码相同氨基酸但可被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减低干扰翻译的二级mRNA结构,从而提高翻译效率。

[0243] 在本发明的一个实施方案中,核酸可包含编码本发明CAR的抗原结合结构域的经密码子修饰的核苷酸序列。在本发明的另一个实施方案中,核酸可包含编码本文中所述的任何CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的经密码子修饰的核苷酸序列。

[0244] 本文中使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链的,合成的或从天然来源获得(例如,分离和/或纯化)的,其可包含天然、非天然或改变的核苷酸,并且其可包含天然、非天然或改变的核苷酸间连接,例如氨基磷酸酯连接或硫代磷酸酯连接,而不是存在于未经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/或替换。然而,如本文中所讨论的,在一些情况下对核酸而言,包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

[0245] 重组核酸可以是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个在其他情况下分开的序列区段制备的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成,或者更常见地通过分离的核酸区段的人工操作,例如通过遗传改造技术(例如Sambrook et al.(同上)中描述的那些)来完成。可使用本领域中已知的方法基于化学合成和/或酶促连接反应来构建核酸。参见例如Sambrook et al.(同上)和Ausubel et al.(同上)。例如,可使用天然存在的核苷酸或多种经修饰核苷酸来化学合成核酸,所述经修饰核苷酸被设计成提高分子的生物学稳定性或提高杂交后形成的双链体的物理稳定性(例如硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸)。可用于产生核酸的经修饰核苷酸的一些实例包括但不限于: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-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基辫苷(queosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、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-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基辫苷、5’-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、辫苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。或者,本发明的一种或更多种核酸可从公司(例如Integrated DNATechnologies(Coralville,IA,USA))购买。

[0246] 核酸可包含编码任何CAR或其功能性部分或功能性变体的任何分离的或纯化的核苷酸序列。或者,核苷酸序列可包含简并至任何序列或简并序列之组合的核苷酸序列。

[0247] 一个实施方案还提供了分离的或纯化的核酸,所述核酸包含与本文中所述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文中所述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0248] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以比非特异性杂交可检测地更强的量与靶序列(本文中所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括将具有精确互补序列的多核苷酸或仅包含少数分散的错

配的多核苷酸与碰巧具有少数与核苷酸序列匹配的小区域(例如,3至10个碱基)的随机序列区分开的条件。这样的互补小区域比14至17个或更多个碱基的全长互补物更容易解链,并且高度严格杂交使得它们可易于区分。相对高的严格条件包括例如低盐和/或高温条件,例如通过在约50℃至70℃的温度下由约0.02M至0.1M NaCl或等同物来提供。这样的高严格条件容许核苷酸序列与模板或靶链之间小的(如果有的话)错配,并且特别适合于检测任何本发明CAR的表达。通常认识到,通过添加提高量的甲酰胺可使条件变得更加严格。

[0249] 还提供了包含与本文中所述的任何核酸具有至少约70%或更多,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的核酸。

[0250] 在一个实施方案中,可将核酸并入到重组表达载体中。在这一点上,一个实施方案提供了包含任何核酸的重组表达载体。出于本文中的目的,术语"重组表达载体"意指经遗传性修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下使载体与细胞接触时,其允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。载体作为整体不是天然存在的。

[0251] 但是,载体的部分可以是天然存在的。重组表达载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链或双链的,合成的或部分地从天然来源获得的,并且其可包含天然、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接或这两种类型的连接。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连接不阻碍载体的转录或复制。

[0252] 在一个实施方案中,重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可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用于繁殖和扩增或用于表达或用于这二者的载体,例如质粒和病毒。载体可选自pUC系列(Fermentas Life Sciences,Glen Burnie,MD)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。

[0253] 也可使用噬菌体载体,例如λΟTIO、λΟTI 1、λZapII(Stratagene)、EMBL4和λNMI 149。植物表达载体的一些实例包括pBIOl、pBI101.2、pBHOl.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的一些实例包括pEUK-Cl、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或慢病毒载体。慢病毒载体是来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括自我失活性慢病毒载体,如Milone et al.,Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)中提供的。可用于临床的慢病毒载体的另一些实例包括例如但不限于来自Oxford BioMedica plc的LENTIVECTOR.RTM.基因递送技术,来自Lentigen的LENTIMAX.TM.载体系统等。慢病毒载体的非临床类型也是可用的并且是本领域技术人员已知的。

[0254] 许多转染技术通常是本领域中已知的(参见例如Graham et al.,Virology,52:456-467(1973);Sambrook et al.,同上;Davis et al.,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986);以及Chu et al.,Gene,13:97(1981)。

[0255] 转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见例如Graham et al.,同上)、直接微量注射到培养的细胞中(参见例如Capecchi,Cell,22:479-488(1980))、电穿孔(参见例如Shigekawa

et al.,BioTechniques,6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见例如Mannino et al.,BioTechniques,6:682-690(1988))、脂质介导的转导(参见例如Feigner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:7413-7417(1987))和使用高速微弹(microprojectile)的核酸递送(参见例如Klein et al.,Nature,327:70-73(1987))。

[0256] 在一个实施方案中,可使用以下中描述的标准重组DNA技术来制备重组表达载体:例如,Sambrook et al.,同上,以及Ausubel et al.,同上。环状或线性的表达载体构建体可制备成包含在原核或真核宿主细胞中有功能的复制系统。复制系统可来源于例如ColE1、2μ质粒、λ、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0257] 重组表达载体可包含调节序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,其对于将酌情引入载体的宿主细胞(例如,细菌、真菌、植物或动物)的类型是特异性的,并考虑载体是基于DNA还是RNA。重组表达载体可包含限制性位点以有利于克隆。

[0258] 重组表达载体可包括一个或更多个标记基因,其允许选择经转化或转染的宿主细胞。标记基因包含杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中提供原养型的互补等。用于本发明表达载体的合适标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0259] 重组表达载体可包含天然或非天然启动子,所述启动子与编码CAR(包括其功能性部分及其功能性变体)的核苷酸序列或与和编码CAR的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作地连接。启动子(例如,强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性)的选择在技术人员的普通技术范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技术范围内。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启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动子。

[0260] 重组表达载体可设计成用于瞬时表达、用于稳定表达或用于这二者。此外,可使重组表达载体用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0261] 此外,重组表达载体可以被制备成包含自杀基因。本文中使用的术语“自杀基因”是指导致表达该自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是以下基因:其赋予表达该基因的细胞以针对试剂(例如,药物)的敏感性,并且当使该细胞与试剂接触或暴露于试剂时造成细胞死亡。自杀基因是本领域中已知的(参见例如,Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews,Springer,Caroline J.(Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research,Sutton,Surrey,UK),Humana Press,2004),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。

[0262] 一个实施方案还提供了包含本文中所述的任何重组表达载体的宿主细胞。本文中使用的术语“宿主细胞”是指可包含本发明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(即从生物体(例如人)中直接分离的)。宿主细胞可以是黏附细胞或悬浮细胞(即悬浮生长的细胞)。合适的宿主细胞是本领域中已知的,并且包括例如DH5a大肠杆菌(E.coli)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DH5a细胞。出于产生重组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

胞可以是任何细胞类型,可来源于任何类型的组织,并且可处于任何发育阶段,但宿主细胞可以是外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte,PBL)或外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)。宿主细胞可以是T细胞。

[0263] 出于本文中的目的,T细胞可以是任何T细胞,例如培养的T细胞,例如原代T细胞,或来自培养的T细胞系(例如Jurkat、SupT1等)的T细胞,或获自哺乳动物的T细胞。如果获自哺乳动物,则T细胞可获自多种来源,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。T细胞也可以是富集或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是从人中分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞,并且可处于任何发育阶段,包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助性T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如,细胞毒T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、记忆干细胞(即Tscm)、幼稚T细胞等。T细胞可以是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0264] 在一个实施方案中,本文中所述的CAR可用于合适的非T细胞。这样的细胞是具有免疫效应功能的那些,例如NK细胞和由多能干细胞产生的T样细胞。

[0265] 一个实施方案还提供了包含本文中所述的至少一种宿主细胞的细胞群。细胞群可以是异质群,其包含含有所述的任何重组表达载体的宿主细胞,此外还包含至少一种不含任何重组表达载体的其他细胞(例如宿主细胞(例如T细胞)),或者除T细胞以外的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、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。或者,细胞群可以是基本上同质的群,其中该群主要包含(例如,基本上由其组成))含有重组表达载体的宿主细胞。该群也可以是细胞的克隆群,其中该群的所有细胞都是包含重组表达载体的单宿主细胞的克隆,使得该群的所有细胞都包含该重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,该细胞群是包含含有如本文中所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群。

[0266] 可分离和/或纯化CAR(包括其功能性部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群)和抗体(包括其抗原结合部分)。例如,纯化的(或分离的)宿主细胞制备物是其中宿主细胞比体内天然环境中细胞的纯度更高的制备物。这样的宿主细胞可例如通过标准纯化技术来产生。在一些实施方案中,纯化宿主细胞的制备物,使得宿主细胞占制备物的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%,可以是大于约60%、约70%或约80%,或者可以是约100%。

[0267] E.治疗方法

[0268] 预期本文中公开的CAR可用于在哺乳动物中治疗或预防疾病的方法。在这点上,一个实施方案提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在哺乳动物中有效治疗或预防癌症之量向哺乳动物施用CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分和/或药物组合物。

[0269] 一个实施方案还包括在施用本文中公开的CAR之前对哺乳动物进行淋巴细胞清除(lymphodepleting)。淋巴细胞清除的一些实例包括但不限于非清髓性淋巴细胞清除化学治疗、清髓性淋巴细胞清除化学治疗、全身辐照等。

[0270] 出于其中施用宿主细胞或细胞群的方法的目的,细胞可以是哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选地,细胞是哺乳动物自体的。本文中使用的同种异体意指来源于与引入材料的个体相同物种的不同动物的任何材料。当一个或更多个基因座上的基因不同时,两个

或更多个个体被认为彼此是同种异体的。在一些方面中,来自相同物种的个体的同种异体材料可以是在遗传上足够不同以抗原性地相互作用。本文中使用的“自体的”意指来源于随后重新引入材料的个体的同一个体的任何材料。

[0271] 本文中提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。本文中使用的术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,例如小鼠和仓鼠,以及兔形目(Logomorpha)的哺乳动物,例如兔。哺乳动物可来自食肉目(Carnivora),包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。哺乳动物可来自偶蹄目(order Artiodactyla),包括牛科(牛)和猪科(猪),或者奇蹄目(order Perssodactyla),包括马科(马)。哺乳动物可以是灵长目、Ceboid或Simoid(猴),或者类人猿目(order Anthropoids)(人和猿)。优选地,哺乳动物是人。

[0272] 关于方法,癌症可以是任何癌症,包括以下中的任一种:急性淋巴细胞癌、急性髓系白血病、肺泡状横纹肌肉瘤、膀胱癌症(例如膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如髓母细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤(Burkitt’s lymphoma)、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

[0273] 本文中使用的术语“治疗”和“预防”以及从其来源的词语不必需意味着100%或完全治疗或预防。相反,存在不同程度的治疗或预防,本领域普通技术人员认为其具有潜在的益处或治疗效果即可。在这一点上,该方法可提供对哺乳动物中癌症的任何量或任何水平的治疗或预防。

[0274] 此外,由该方法提供的治疗或预防可包括治疗或预防所治疗或预防的疾病(例如,癌症)的一种或更多种病症或症状。而且,出于本文中的目的,“预防”可涵盖延迟疾病或其症状或病症的发作。

[0275] 另一个实施方案提供了在哺乳动物中检测癌症之存在的方法,其包括:(a)使包含来自哺乳动物的一个或更多个细胞的样品与CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分或药物组合物接触,从而形成复合物,(b)以及检测该复合物,其中复合物的检出指示哺乳动物中癌症的存在。

[0276] 样品可通过任何合适的方法(例如活检或尸检)获得。活检是从个体中取出组织和/或细胞。这样的取出可以是从个体收集组织和/或细胞,以便在取出的组织和/或细胞上进行实验。该实验可包括确定个体是否患有和/或正遭受某种病症或疾病状态的实验。病症或疾病可以是例如癌症。

[0277] 关于在哺乳动物中检测增殖性病症(例如癌症)之存在的方法的一个实施方案,包含哺乳动物细胞的样品可以是包含全细胞、其裂解物或全细胞裂解物级分(例如,核或胞质级分、全蛋白质级分或核酸级分)的样品。如果样品包含全细胞,则细胞可以是哺乳动物的任何细胞,例如任何器官或组织的细胞,包括血细胞或内皮细胞。

[0278] 对于哺乳动物,接触可在体外或体内发生。优选地,接触是体外的。

[0279] 此外,复合物的检测可通过本领域中已知的任意数量的方式进行。例如,可用可检测标记(例如如上文公开的放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)))、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒))来标记本文中公开的CAR、本文中所述的多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或者抗体或其抗原结合部分。

[0280] 测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法是本领域中已知的。例如,Clay et al.,J.Immunol,163:507-513(1999)教导了测量细胞因子(例如,干扰素-γ、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(granulocyte/monocyte colony stimulating factor,GM-CSF)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factorα,TNF-α)或白介素2(interleukin 2,IL-2))释放的方法。另外,可通过测量细胞的细胞毒性来评价CAR功能,如Zhao et al.,J.Immunol.174:4415-4423(2005)中所述。

[0281] 另一个实施方案提供了本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体或其抗原结合部分和/或药物组合物用于在哺乳动物中治疗或预防增殖性病症(例如癌症)的用途。癌症可以是本文中所述的任何癌症。

[0282] 任何施用方法都可用于所公开的治疗剂,包括局部施用和全身施用。例如,可使用表面、经口、血管内(例如静脉内)、肌内、腹膜内、鼻内、皮内、鞘内和皮下施用。具体施用模式和剂量方案将由主治临床医师考虑病例的具体情况(例如,对象、疾病、涉及的疾病状态以及治疗是否是预防性的)来选择。在其中施用多于一种药剂或组合物的情况下,可使用一种或更多种施用途径;例如,化学治疗剂可经口施用,并且抗体或抗原结合片段或缀合物或组合物可静脉内施用。施用方法包括注射,在此情况下,在例如以下的无毒可药用载体中提供CAR、CAR T细胞、缀合物、抗体、抗原结合片段或组合物:水、盐水、林格液、右旋糖溶液、5%人血清白蛋白、不挥发油(fixed oil)、油酸乙酯或脂质体。在一些实施方案中,可使用所公开化合物的局部施用,例如通过将抗体或抗原结合片段施加至除去肿瘤的组织区域或怀疑易于发生肿瘤的区域。在一些实施方案中,包含治疗有效量的抗体或抗原结合片段的药物制剂的持续肿瘤内(或肿瘤旁)释放可以是有益的。在另一些实例中,将缀合物作为滴眼剂表面施加至角膜,或玻璃体内施加到眼中。

[0283] 所公开的治疗剂可配制成适合精确剂量的单独施用的单位剂量形式。另外,所公开的治疗剂可以以单剂量或多剂量方案施用。多剂量方案是以下方案:其中初级治疗过程可具有多于一个单独剂量(例如1至10个剂量),然后根据需要以随后的时间间隔给予其他剂量以维持或加强组合物的作用。治疗可涉及在数天至数月甚至数年的时期内的化合物的每日剂量或多个每日剂量。因此,剂量方案还将至少部分地基于待治疗的对象的特定需求来确定,并将取决于施用操作者的判断。

[0284] 抗体或缀合物的典型剂量可以是约0.01至约30mg/kg,例如约0.1至约10mg/kg。

[0285] 在一些具体的实例中,以多个每日给药方案(例如至少两个连续日,10个连续日等,例如持续数周、数月或数年的时间),向对象施用包含缀合物、抗体、组合物、CAR、CAR T细胞或另外的试剂中的一种或更多种的治疗组合物。在一个实例中,向对象施用缀合物、抗体、组合物或另外的药剂至少30天,例如至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少12个月、至少24个月或至少36个月的时间。

[0286] 在一些实施方案中,所公开的方法包括与所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞组合(例如,依次地、基本上同时或同时)向对象提供手术、放射治疗和/或化学治疗剂。这样的药剂和治疗的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可由熟练的临床医师确定。用于另外的药剂的制备和给药方案可根据制造商的说明使用或由熟练的从业人员根据经验确定。用于这样的化学治疗的制剂和给药方案也描述在Chemotherapy Service,(1992)Ed.,M.C.Perry,Williams&Wilkins,Baltimore,Md中。

[0287] 在一些实施方案中,组合治疗可包括向对象施用治疗有效量的另外的癌症抑制剂。可与组合治疗一起使用的另外的治疗剂的一些非限制性实例包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和血管生成抑制剂。这些药剂(其以治疗有效量施用)和治疗可单独或组合使用。例如,可将任何合适的抗癌剂或抗血管生成剂与本文中公开的CAR、CAR-T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物组合施用。这样的药剂的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可由熟练的临床医师确定。

[0288] 另外的化学治疗剂包括但不限于:烷化剂,例如氮芥类(例如,苯丁酸氮芥、二氯乙基甲胺(chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑(melphalan))、亚硝基脲类(例如,卡莫司汀(carmustine)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)和链脲霉素)、铂化合物(例如,卡铂、顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和BBR3464)、白消安(busulfan)、达卡巴嗪(dacarbazine)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、丙卡巴肼(procarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、噻替派(thiotepa)和尿嘧啶氮芥(uramustine);抗代谢物类,例如叶酸类(例如,甲氨喋呤、培美曲塞(pemetrexed)和雷替曲塞(raltitrexed))、嘌呤类(例如,克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、巯嘌呤和硫鸟嘌呤)、嘧啶类(例如,卡培他滨(capecitabine))、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和吉西他滨(gemcitabine);植物生物碱,例如鬼臼类(例如,依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide))、紫杉烷类(例如,多西他赛(docetaxel)和紫杉醇)、长春花类(例如,长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨);细胞毒性/抗肿瘤抗生素,例如蒽环类家族成员(例如,柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、米托蒽醌和戊柔比星(valrubicin))、博来霉素(bleomycin)、利福平(rifampicin)、羟基脲和丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑替康(topotecan)和伊立替康(irinotecan);单克隆抗体,例如阿仑单抗(alemtuzumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、吉姆单抗(gemtuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)和曲妥珠单抗(trastuzumab);光敏剂,例如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠(porfimer sodium)和维替泊芬(verteporfin);以及另一些药剂,例如阿利维A酸(alitretinoin)、六甲蜜胺(altretamine)、安丫啶(amsacrine)、阿那格雷(anagrelide)、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿西替尼(axitinib)、贝沙罗汀(bexarotene)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、硼替佐米(bortezomib)、塞来昔布(celecoxib)、地尼白介素(denileukin diftitox)、厄罗替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、吉非替尼(gefitinib)、羟基脲、伊马替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、喷司他丁(pentostatin)、马索罗酚(masoprocol)、米托坦(mitotane)、培门冬酶(pegaspargase)、他莫昔芬(tamoxifen)、

索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、威罗菲尼(vemurafinib)、凡德他尼(vandetanib)和维甲酸(tretinoin)。这样的药剂的选择和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可由熟练的临床医师确定。

[0289] 组合治疗可提供协同作用并证明具有协同性,即当活性成分一起使用时实现的效果大于单独使用化合物所产生的效果的总和。当活性成分如下时可获得协同作用:(1)在组合的单位剂量制剂中共配制并同时施用或递送;(2)作为独立制剂交替或平行递送;或(3)通过另一些方案。当交替递送时,当化合物依次施用或递送,例如在单独的注射器中通过不同注射依次施用或递送时可获得协同作用。一般而言,在交替期间,依次(即,先后)施用每种活性成分的有效剂量,而在组合治疗中,一起施用两种或更多种活性成分的有效剂量。

[0290] 在一个实施方案中,在抗癌治疗之后向患有肿瘤的对象施用有效量的与本文中公开的一种或更多种抗原特异性结合的抗体或抗原结合片段或其缀合物。在已经流逝了足够量的时间以允许所施用的抗体或抗原结合片段或缀合物与在各癌细胞上表达的抗原形成免疫复合物之后,检测免疫复合物。免疫复合物的存在(或不存在)指示治疗的有效性。例如,与在治疗之前取得的对照相比免疫复合物的提高指示治疗是无效的,而与在治疗之前取得的对照相比免疫复合物的降低指示治疗是有效的。

[0291] F.生物药物组合物

[0292] 本文中提供了用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的生物药物或生物制剂组合物(下文称为"组合物"),所述组合物包含在载体(例如可药用载体)中的与本文中公开的一种或更多种抗原特异性结合的所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞中的一种或更多种。该组合物可以以单位剂量形式制备以用于向对象施用。施用的量和时间由治疗临床医师决定,以实现期望的结局。组合物可配制用于全身(例如静脉内)或局部(例如瘤内)施用。在一个实例中,公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物被配制成用于肠胃外施用,例如静脉内施用。包含本文中所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物用于例如治疗和检测肿瘤,例如但不限于神经母细胞瘤。在一些实例中,组合物可用于治疗或检测癌。包含本文中所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物还用于例如检测病理性血管生成。

[0293] 用于施用的组合物可包含溶解在可药用载体(例如水性载体)中的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的溶液。可使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常不含不期望的物质。这些组合物可通过常规的、公知的灭菌技术灭菌。所述组合物可根据需要包含可药用辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、辅助剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。在这些制剂中,CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物的浓度可广泛地变化,并将根据所选择的具体施用模式和对象的需求主要基于流体体积、黏度、体重等来进行选择。制备这样的剂量形式用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的实际方法对于本领域技术人员来说是已知的或将是明显的。

[0294] 用于静脉内施用的典型组合物包含每个对象每天约0.01mg/kg至约30mg/kg抗体或抗原结合片段或缀合物(或相应剂量的CAR、或表达CAR的T细胞、包含抗体或抗原结合片段的缀合物)。用于制备可施用的组合物的实际方法对于本领域技术人员来说将是已知的

或明显的,并且在出版物例如Remington's Pharmaceutical Science,19th ed.,Mack Publishing Company,Easton,PA(1995)中更详细地描述。

[0295] CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物可以以经冻干的形式提供,并且在施用之前用无菌水再水化,但是其也可以以已知浓度的无菌溶液提供。然后将CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物的溶液添加至输注袋,所述输注袋包含0.9%氯化钠(USP),并且在一些情况下以0.5mg/kg至15mg/kg体重的剂量施用。本领域中在施用抗体或抗原结合片段或缀合物药物方面有相当多的经验可获得;例如,自1997年Rituxan®获批以来,抗体药物已经在美国上市。CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、其抗原结合片段或缀合物可通过缓慢输注而不是通过静脉内推注或快速浓注(bolus)施用。在一个实例中,施用较高负荷剂量,随后将施用剂量维持在较低水平。例如,4mg/kg抗体或抗原结合片段(或相应剂量的包含抗体或抗原结合片段的缀合物)的初始负载剂量可在约90分钟的时间内输注,然后如果先前的剂量良好耐受,则每周2mg/kg的维持剂量在30分钟的时间内输注,持续4至8周。

[0296] 控释肠胃外制剂可制备为植入物、油性注射剂或制备为颗粒体系。对于蛋白质递送系统的广泛概述,参见,Banga,A.J.,Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing,and Delivery Systems,Technomic Publishing Company,Inc.,Lancaster,PA,(1995)。颗粒体系包括微球、微粒、微囊、纳米囊、纳米球和纳米粒。微囊包含治疗性蛋白质(例如细胞毒素或药物)作为核心。在微球中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1μm的颗粒、微球和微囊通常分别被称为纳米粒、纳米球和纳米囊。毛细管的直径为约5μm,使得仅纳米粒是静脉内施用的。微粒的直径通常为约100μm,并且皮下或肌内施用。参见例如Kreuter,J.,Colloidal Drug Delivery Systems,J.Kreuter,编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,NY,第219至342页(1994);和Tice&Tabibi,Treatise on Controlled Drug Delivery,A.Kydonieus,编辑,Marcel Dekker,Inc.New York,NY,第315至339页,(1992)。

[0297] 聚合物可用于本文中公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物组合物的离子受控的释放。用于受控的药物递送的多种可降解和不可降解的聚合物基质是本领域中已知的(Langer,Accounts Chem.Res.26:537-542,1993)。例如,嵌段共聚物泊洛沙姆407在低温下作为黏性但流动的液体存在,但在体温下形成半固体凝胶。已经表明其是用于重组白介素-2和脲酶的配制和持续递送的有效载剂(Johnston et al.,Pharm.Res.9:425-434,1992;和Pec et al.,J.Parent.Sci.Tech.44(2):58-65,1990)。或者,羟基磷灰石已被用作蛋白质受控释放的微载体(Ijntema et al.,Int.J.Pharm.112:215-224,1994)。在另一方面中,脂质体用于脂质包封之药物的受控释放以及药物靶向(Betageri et al.,Liposome Drug Delivery Systems,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。用于治疗性蛋白质的受控递送的许多另外的系统是已知的(参见美国专利No5,055,303、美国专利No 5,188,837、美国专利No 4,235,871、美国专利No4,501,728、美国专利No 4,837,028、美国专利No 4,957,735、美国专利No5,019,369、美国专利No 5,055,303、美国专利No 5,514,670、美国专利No5,413,797、美国专利No 5,268,164、美国专利No 5,004,697、美国专利No4,902,505、美国专利No 5,506,206、美国专利No 5,271,961、美国专利No5,254,342和美国专利No 5,534,496)。

[0298] G.药盒

[0299] 在一个方面中,还提供了使用本文中公开的CAR的药盒。例如,用于在对象中治疗肿瘤或制备表达本文中公开的一种或更多种CAR的CAR T细胞的药盒。药盒通常将包含如本文中公开的公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。药盒中可包含多于一种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。

[0300] 药盒可包含容器和在容器上或与附于容器的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。容器通常容纳包含所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞中的一种或更多种的组合物。在数个实施方案中,容器可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或小瓶,其具有可被皮下注射针头刺穿的塞)。标签或包装插页指示组合物用于治疗特定病症。

[0301] 标签或包装插页通常将还包含例如在治疗或预防肿瘤或制备CAR T细胞的方法中使用所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的说明。包装插页通常包含习惯上包含在治疗性产品的商业包装中的说明书,其包含关于与使用这样的治疗产品相关的适应证、用法、剂量、施用、禁忌证和/或警告的信息。说明性材料可以是以电子形式(例如计算机软盘或光盘)书写的,或者可以是可视的(例如视频文件)。药盒还可包含有利于该药盒被设计用于的特定应用的另外的组分。因此,例如,药盒可另外地包含检测标记的工具(例如用于酶标记的酶底物、检测荧光标记的滤光器装置、合适的次级标记(例如二抗)等)。药盒可另外地包含常规用于实践特定方法的缓冲剂和其他试剂。这样的药盒和合适的内容物是本领域技术人员公知的。

[0302] 实施例

[0303] 通过以下实施例进一步举例说明了本发明,这些实施例不应以任何方式解释为对其范围加以限制。相反,应清楚地理解,在不脱离本发明的精神和/或所附权利要求书的范围的情况下,可采取多种其他实施方案、修改及其等同方案,在阅读了本文中的描述之后,所述其他实施方案、修改及其等同方案本身已经向本领域技术人员提示。

[0304] 实施例1

[0305] CD19和CD20双靶向CAR T构建体的开发

[0306] 目前在许多中心正在评价用经遗传改造的自体人T细胞进行的针对癌症的过继性免疫治疗。建立用于过继性免疫治疗的细胞群的一种常用方法是通过单采术(apheresis)从患者中分离T细胞,并用整合到宿主基因组中并表达嵌合抗原受体(CAR)的逆转录病毒或慢病毒载体离体转导这些细胞,在[1]中综述。嵌合抗原受体通过连接来自免疫活性蛋白不同亚基的功能性序列结构域而产生。例如,可将由抗CD19或抗CD20抗体的VH和VL结构域产生的scFv结构域与来源于CD28或CD8的跨膜序列连接,并然后与来源于CD3-ζ链和CD28或CD137的胞内信号传导结构域连接[2,3],因此,CAR在单个跨膜蛋白中赋予了来源于scFv的结合结构域和所连接的信号传导结构域二者,从而活化经载体转导的T细胞。这种转导的T细胞群(CAR-T)现在可功能性地靶向带有同源抗原的细胞,以用于通过主动细胞裂解以及通过细胞因子(例如干扰素-γ(IFNγ)、白介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子-α(TNFα))的产生而形成(marshal)的间接免疫效应机制来进行破坏。已表明,用特异性靶向CD19的经嵌合抗原受体修饰的T细胞进行的过继性免疫治疗有效对抗儿科前-B ALL[4,5]。在成人血液学恶性病中,经CAR修饰的T细胞的有效性更不均化。

[0307] 虽然在宾夕法尼亚大学对3名CLL患者进行抗CD19 CAR-T治疗的经验似乎表明普遍的阳性响应,但NCI的外科分部(Surgery Branch)报道了在8名患有成人B细胞恶性病的患者的不同集合中的部分响应、疾病稳定和一个完全响应的混合体[6,7]。因此,抗CD19 CAR不是普遍有效的,并且可受益于其抗肿瘤靶向潜力的进一步增强。Thomas-Tikhonenko的实验室已经很好地描述了在抗CD19 CAR-T治疗期间B-ALL采用的逃逸机制,其包括CD19的选择性剪接、移码突变和错义突变[8],既拓宽CAR-T产品的靶标范围又以更大的效果靶向恶性病的一种方法是在单一CAR结构中包含两个结合结构域。串联CD19和CD20表达的恶性病包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(hairy cell leukemia,HCL)、套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma,MCL)、幼淋巴细胞白血病(prolymphocytic leukemia,PLL)和伴绒毛淋巴细胞脾淋巴瘤(splenic lymphoma with villous lymphocyte,SLVL)[9],靶向两种抗原的单一CAR载体将靶向更广泛多种的血液学恶性病,并且可更有效地靶向它们。

[0308] 在本实施例中,我们描述了同时靶向Cd19和CD20肿瘤抗原以防止肿瘤抗原逃逸的全人CAR t细胞的开发。还描述了CAR T最佳结构和最有效的铰链和跨膜CAR结构域的选择。

[0309] 材料和方法

[0310] 细胞系

[0311] 伯基特淋巴瘤细胞系Raji购自美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection,ATCC,Manassas,VA)。REH和NALM-6白血病系购自DSMZ(Leibniz Institute DSMZ,Braunschweig,Germany)。将细胞培养在补充有10％热灭活胎牛血清(FBS,Hyclone,Logan,UT)的RPMI-1640培养基(Corning,NY)中。通过用编码萤火虫萤光素酶和与2A肽连接的GFP的慢病毒载体(Lentigen Technology,Inc.,Gaithersburg,MD)稳定转导野生型肿瘤细胞系,随后选择萤光素酶阳性克隆来产生表达萤光素酶和GFP细胞系的单细胞克隆。人胚肾细胞系293T购自ATCC,并将其培养在补充有4mM L-谷氨酰胺(Lonza,Morristown,NJ)的Dynamis培养基(Gibco/Thermo Fisher Scientific,Grand Island,NY)中。通过用编码萤火虫荧光素酶的慢病毒载体(Lentigen Technology,Inc.,Gaithersburg,MD)稳定转导野生型肿瘤细胞系,随后选择萤光素酶阳性细胞来产生表达萤光素酶的293T细胞系。

[0312] CAR构建体的产生和慢病毒载体产生

[0313] 将人抗CD19和CD20嵌合抗原受体(CAR)构建体设计为串联CAR或双顺反子CAR。靶向人CD19的胞外结构域的多种单链可变片段(ScFv)序列是在内部鉴定的,靶向CD20的ScFv来源于奥法木单抗(Ofatumumab)。对于串联CAR,抗CD20 scFv与抗CD19 scFv通过G4S接头连接,随后是CD8或CD28铰链跨膜结构域、4-1BB或CD28_4-1BB共刺激结构域和CD3-ζ激活结构域序列。双顺反子CAR包含靶向CD20的单CAR和靶向CD19的单CAR,与P2A核糖体跳跃元件连接。单CAR构建体使用CD8铰链区,CD8或OX40跨膜结构域,来源于人4-1BB、CD28、ICOS、OX40蛋白的共刺激结构域和CD3-ζ激活结构域。先前开发的具有小鼠CD19和CD20 scFv的串联CAR20_19(LTG1497)包括在内作为对照构建体。(D.Schneider et al,A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines.Journal for immunotherapy of cancer 5,42,2017)。将CAR序列克隆到处于人EF-1α启动子(Lentigen Technology Inc.,Gaithersburg,MD)控制下的慢

病毒载体(Lentiviral Vector,LV)表达盒中。慢病毒颗粒通过以下来产生:瞬时转染HER 293T细胞,通过离心来沉淀并储存在-80℃下直至转导。

[0314] 原代T细胞制备和转导

[0315] 将健康供体原代T细胞从白细胞分离术收集物(AllCells,Alameda,CA)或经加工的血沉棕黄层(Oklahoma Blood Institute,Tulsa,OK)中分离,在获得供体的书面同意下获得。使用CD4和CD8微珠(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)的1:1混合物,根据制造商方案通过阳性选择来纯化CD4阳性和CD8阳性人T细胞。将纯化的T细胞用CD3/CD28MACS®GMP T Cell TransAct试剂(Miltenyi Biotec)活化,并以1×10^6个细胞/ml的密度培养在补充有30IU/ml IL-2的无血清TexMACS培养基中。此外,在第1天用编码CAR构建体的慢病毒载体颗粒以MOI 80转导活化的T细胞。在第3天,洗涤转导的T细胞并将其重悬至0.5×10^6个/ml以继续扩增。在此之后,每2至3天,用含有30IU/ml IL-2的新鲜TexMACS培养基补充培养物,直到在第8至10天收获。

[0316] CAR表面表达的流式细胞分析

[0317] 将50万个CAR T细胞在补充有0.5%牛血清白蛋白(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)的冷AutoMACS缓冲液中洗涤,并用CD19-Fc肽(R&D System,Minneapolis,MN)染色,随后用抗Fc-AF647缀合物(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)染色。添加7-氨基放线菌素D染色(7-AAD,BD Biosciences,San Jose,CA)以排除死亡细胞。将用紫蓝荧光染料标记的CD4抗体用于分离CD4和CD8群体。将未经转导的细胞(UTD)用作阴性对照。将细胞洗涤两次,重悬于200μl运行缓冲液中,并通过流式细胞术采集。在MACSQuant®10分析仪(Miltenyi Biotec)上进行流式细胞分析,并使用FlowJo软件(Ashland,OR)生成数据图。

[0318] CAR T细胞细胞毒性和细胞因子测定

[0319] 为了评估CAR T细胞介导的细胞毒性,将用萤火虫萤光素酶稳定转导的5×10^3个肿瘤靶细胞与CAR T细胞以指定的效应物与靶标比组合,并在37℃和5% CO_2下孵育过夜。将SteadyGlo试剂(Promega,Madison WI)添加至每个孔,并将所得发光量化为每秒的计数(样品CPS)。将仅靶标的孔(最大CPS)和仅靶标的孔加1%吐温-20(最小CPS)用于确定测定范围。特异性裂解百分比如下计算:(1-(样品CPS-最小CPS)/(最大CPS-最小CPS))。对于细胞因子释放分析,将5×10^4个效应物与5×10^3个靶标共培养过夜,并从共培养物中移出上清液,并通过ELISA(eBioscience,San Diego,CA)分析IFNγ、TNFα和IL-2浓度。对每种条件进行三次技术重复,并且使用由不同健康供体产生的CAR T细胞重复每个实验。

[0320] 长期CAR T和肿瘤细胞共孵育测定

[0321] 将CD19和CD20双靶向CAR T细胞或未经转导的对照T细胞(1×10^6)与1×10^6个Raji淋巴瘤细胞以0.3:1的效应物与靶标比共培养7天,当需要时用新鲜培养基补充。在第4天和第7天的时间点,通过流式细胞术分析细胞混合物。CountBright™绝对计数珠(Thermofisher,Eugene,OR)包含在细胞混合物中,以获得绝对细胞计数。在通过7-AAD染色排除死亡细胞之后,记录每种条件下的活T($CD3^+$)计数和肿瘤细胞的百分比(GFP^+)。在第7天,当Raji细胞%在大多数细胞混合物中小于10%时,将新鲜的Raji细胞添加至共培养混合物,以将E:T比重新调节至0.15:1。在第10天,通过流式重新评价培养产物,以评估每个CAR T细胞的细胞毒性。

[0322] 结果

[0323] 实施例1描述了用于治疗B细胞恶性病的靶向CD20和CD19抗原的CAR T细胞的产生和体外评价。

[0324] 靶向CD19和CD20抗原二者的双特异性CAR构建体的示意图在图1A中示出。内部开发了CAR19的全人结合剂,并且靶向CD20的全人scFv来源于奥法木单抗。串联CAR被设计为CD20 scFv与CD19 scFv通过G4S接头连接,然后在框内与CD8或CD28铰链和跨膜结构域、4-1BB或CD28_4-1BB共刺激结构域和CD3ζ激活结构域连接。双CAR构建体被配置为单CD20 CAR与单CD19 CAR由P2A序列隔开。单CAR包含CD19或CD20 scFv、CD8铰链、来自CD8或OX40的跨膜结构域、来自4-1BB、CD28、OX40或ICOS的共刺激结构域以及CD3ζ激活结构域。将CAR序列进一步并入到第三代慢病毒载体中,并在MOI 80时转导到人原代T细胞中,以在哺乳动物EF-1α启动子的控制下产生CD20_19CAR T细胞。还包括先前评价的具有小鼠结合剂的CAR构建体LTG1497作为阳性对照,而将来源于同一供体的未经转导的T细胞(UTD)用作阴性对照。使用CD19-Fc,随后用抗Fc Alexa Flour 647染色,通过流式细胞术来测量转导的T细胞的CAR19表面表达。由于缺乏检测试剂,没有继续研究(pursue)CAR20的表达。不同的CD20_19CAR构建体表现出比阳性对照LTG1497更高的表面表达(n=4供体)。来自一个代表性供体的流式图(CD4 vs CAR19)在图1B中示出。对于该供体,LTG1497显示最低的表面表达(49.7%),其次是D0144(58.0%),并且其他CAR20_19构建体范围为60%至80%,这表明了稳健的转导效率和CAR表达。

[0325] 为了评价体外CD20_19CAR的靶标特异性细胞毒性,选择$CD19^+CD20^+$白血病或淋巴瘤系(Raji、Nalm-6和Reh)和$CD19^-CD20^-$非白血病系293T作为靶标系。将CAR-T细胞与靶肿瘤细胞系以2.5:1;5:1和10:1的效应物与靶标比共孵育。在过夜共孵育之后,在基于发光的体外杀伤测定中分析CAR的细胞毒性(图2A至C)。在$CD19^+$细胞系中,在所有测试的E:T比下,与CAR LTG1497相比,Raji、Nalm-6和Reh、CAR20_19构建体显示出相似或更高的杀伤能力。在Raji和Reh系中,在UTD组中没有观察到细胞毒性,并且对于与NALM-6共孵育的UTD细胞的较高E:T比,观察到一些杀伤(背景杀伤)。此外,没有观察到CD19和CD20阴性293T细胞系(图2D)的杀伤或有限的背景杀伤,这表明所有设计的CD20_19CAR构建体的稳健靶标特异性细胞毒性功能。

[0326] 通过ELISA检查全人CD20_19CAR和对照构建体LTG1497的T细胞稳态和促炎细胞因子IL-2、IFNγ和TNFα的产生。在CAR T细胞与Raji靶系以10的E:T比共孵育过夜之后(图4A至4C),收获培养物上清液用于测量特定细胞因子释放。当与UTD或仅CAR对照相比时,全人CAR20_19构建体表现出显著的细胞因子应答,这表明了稳健的靶标特异性CAR T细胞细胞因子应答。每个CAR20_19构建体的细胞因子释放的强度相当于或高于对照构建体LTG1497。

[0327] 设计长期共培养测定以进一步表征CAR20_19构建体。将CAR T细胞与Raji细胞以低的E:T比0.3:1共孵育,UTD细胞包括在内作为阴性对照。用流式细胞术测量CAT T与Raji细胞的培养混合物,以检查在共培养期间剩余Raji细胞的百分比和T细胞倍数扩增(图4B,4C)。在第4天,在Raji与CAR T细胞的共培养产物中,Raji细胞百分比降低,并且观察到CAR T细胞扩增。相反,在Raji与UTD细胞的共培养中,Raji细胞的百分比提高,并且T细胞没有显示出增殖。此外,CAR D0256和D0266显示出最高的Raji清除。在第7天,除UTD组外,所有Raji细胞均被T细胞杀伤。CD20_19CAR在第一轮共培养结束时显示出与对照CAR LTG1497相比接

近的倍数扩增。将另外的Raji细胞添加至共培养物,以将ET比重新调整为0.15:1。在第10天,可以区分各组之间的杀伤效力。值得注意的是,CAR D0266在第二轮共培养期间表现出最好的杀伤能力,其次是D0255和D0257>D0258>D0256以及对照LTG1497。D0144 CAR仅有非常低的杀伤能力(图4B)。CAR T细胞在第二轮共孵育期间继续增殖。CAR LTG1497、D0256和D0144比其他CAR 20_19表现出稍多的增殖。在不同的供体中观察到类似的趋势,除CAR D0144之外,大多数CAR 20_19保持比对照CAR 1497更高的杀伤效力(数据未示出)。

[0328] 在所有CAR20_19构建体中,D0144显示出最低的转导效率,并且在长期共培养期间细胞毒性功能较低。与LTG1497相比,所有其他CAR20_19构建体显示出高的CAR转导效率、在过夜或长期杀伤测定中相似或更强的细胞毒性、体外特异性细胞因子诱导。总之,除D0144之外的所有CAR20_19构建体都进行了体内肿瘤清除能力评价。

[0329] 实施例1的参考文献

[0330] 1.Lee,D.W.,et al.The future is now:chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer.Clinical Cancer Research,2012.18(10):p.2780-2790.

[0331] 2.Kochenderfer.J.N.,et al,Construction and pre-clinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor.Journal of immunotherapy(Hagerstown,Md.:1997),2009.32(7):p.689.

[0332] 3.Jensen,M.,et al.,CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected Tcells:implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy.Biology of Blood and Marrow Transplantation,1998.4(2):p.75-83.

[0333] 4.Lee,D.W.,et al.,T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acutelymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase l dose-escalation trial.The Lancet,2015.385(9967):p.517-528.

[0334] 5.Grupp,S.A.,et al.,Chimeric antigen rcceptor-modified T cells for acutc lymphoid leukemia.New England Journal of Medicine,2013.368(16):p.1509-1518.

[0335] 6.Porter,D.L.,et al.,Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.New England Journal of Medicine,2011.365(8):p.725-733.

[0336] 7.Kochenderfer,J.N.,et al.,B-cell depletion and remissions of malignancy along with cvtokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells.Blood,2012.119(12):p.2709-2720.

[0337] 8.Sotillo,E.,et al.,Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy.Cancer discovery,2015.5(12):p.1282-1295.

[0338] 9.Ginaldi,L.,et al.,Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias.Joumal of clinical pathology,1998.51(5):p.364-369.

[0339] 本公开内容的序列

[0340] 使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出下文列出的核酸和氨基酸序列,如37C.F.R.1.822中所限定的。仅示出了每个核酸序列的一条链,但互补链被理解为通过参考所示出的链而包含在内。在所附的序列表中:

[0341] SEQ ID NO:1 CD20-反应性ScFv1结合结构域的核苷酸序列

GAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCCTGGAGAGAGAGCAA
CACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCTGGCCTGGTACCAGCAAAA
GCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACGCAAGTAACAGGGCGACTGGCATC
CCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCACAGACTTTACTTTGACGATCAGTTCTTT
GGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGATTACCT
TCGGCCAAGGTACCAGGCTGGAGATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGTGGTTC

[0342] CGGTGGGGGAGGTAGCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTTCAACCT
GGGCGGTCCTTGAGATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTATGCAAT
GCACTGGGTGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATTAGCTGG
AACTCCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTTCCCGCG
ATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGACACCGC
GCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGGATGGATGTAT
GGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCC

[0343] SEQ ID NO:2 CD20-反应性ScFv1结合结构域的氨基酸序列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI

PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKGGGGSGGG

[0344] GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEW

VSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYG

NYYYGMDVWGQGTTVTVSS

[0345] SEQ ID NO:3 CD19-反应性ScFv2结合结构域的核苷酸序列

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCATTGGGTGCGACA
GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTAATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACA
AGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGC
ACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTATTGTG
CGAGATCGGATCGGGGAATTACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC

[0346] AATGGTCACCGTCTCTTCAGGCGGTGGAGGCTCAGGTGGAGGAGGTAGCGGAGGCGGT
GGTTCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGGATGG
CCAAGATTACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATCAGCA
GAAGCCTGGCCAGGCTCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTCAGGG
ATCCCTGAGCGATTTTCAGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGATCAGCA
CGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACGGTAGTGGTGA
TCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGT

[0347] SEQ ID NO:4 CD19-反应性ScFv2结合结构域的氨基酸序列

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSGGSTS
YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSDRGITATDAFDIWGQGTMV

[0348] TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGRMAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPG
QAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAATLTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWM
FGGGTQLTVLG

[0349] SEQ ID NO:5 CAR D0144(CD20_CD19 CD8 BBz)的核苷酸序列

[0350] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTC
TGTTGATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCC
TGGAGAGAGAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCT
GGCCTGGTACCAGCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACG
CAAGTAACAGGGCGACTGGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCA
CAGACTTTACTTTGACGATCAGTTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTA
CTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGATTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGA
GATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGTGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCG
AAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTTCAACCTGGGCGGTCCTTGA
GATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTATGCAATGCACTGGG
TGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATTAGCTGGAACT
CCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTTCCCGCG

ATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGAC
ACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGG
ATGGATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGGTGGAGGAGG
TTCAGGCGGAGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGA
GGTGGCGGATCAGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTA
CTATATGCATTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATT
AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAG
TCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGC
CTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTATTGTGCGAGATCGGATCGGGGAATT
ACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCAGGCGGTGGAGGCTCAGGTGGAGGAGGTAGCGGAGGCGGTGGTTCCCAGTC
TGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGGATGGCCAAGAT
TACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCCAGGCTCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTCAG

[0351] GGATCCCTGAGCGATTTTCAGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGA
TCAGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACG
GTAGTGGTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAG
GTGCGGCCGCAACGACCACTCCTGCACCCCGCCCTCCGACTCCGGCCCCAACCA
TTGCCAGCCAGCCCCTGTCCCTGCGGCCGGAAGCCTGCAGACCGGCTGCCGGCG
GAGCCGTCCATACCCGGGGACTGGATTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCAC
CACTCGCCGGAACCTGTGGAGTGCTGCTGCTGTCCCTTGTGATCACCCTGTACTG
CAAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGCCC
TGTGCAAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGCCGGTTCCCGGAAGAGG
AAGAGGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAGTTTTCCCGGTCCGCCGACGCTCCGG
CGTACCAGCAGGGGCAAAACCAGCTGTACAACGAACTTAACCTCGGTCGCCGG
GAAGAATATGACGTGCTGGACAAGCGGCGGGGAAGAGATCCCGAGATGGGTGG
AAAGCCGCGGCGGAAGAACCCTCAGGAGGGCTTGTACAACGAGCTGCAAAAGG
ACAAAATGGCCGAAGCCTACTCCGAGATTGGCATGAAGGGAGAGCGCAGACGC
GGGAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGTCAACCGCGACTAAGGACAC
TTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCGCGCTAA

[0352] SEQ ID NO:6 CAR D0144(CD20_CD19 CD8 BBz)的氨基酸序列

[0353] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY
QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
TFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQ
MNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPG
QGLEWMGLINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSDRGITATDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGR
MAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAAT
LTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMFGGGTQLTVLGAAATTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0354] SEQ ID NO:7 CAR D0255(CD20_CD19 CD28)CD28 BBz的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTC
TGTTGATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCC
TGGAGAGAGAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCT
GGCCTGGTACCAGCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACG
CAAGTAACAGGGCGACTGGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCA
CAGACTTTACTTTGACGATCAGTTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTA
CTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGATTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGA
GATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGTGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCG
AAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTTCAACCTGGGCGGTCCTTGA
GATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTATGCAATGCACTGGG
TGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATTAGCTGGAACT
CCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTTCCCGCG
ATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGAC
ACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGG
ATGGATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGGTGGAGGAGG
TTCAGGCGGAGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGA
GGTGGCGGATCAGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC

[0355] TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTA
CTATATGCATTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATT
AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAG
TCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGC
CTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTATTGTGCGAGATCGGATCGGGGAATT
ACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCAGGCGGTGGAGGCTCAGGTGGAGGAGGTAGCGGAGGCGGTGGTTCCCAGTC
TGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGGATGGCCAAGAT
TACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCCAGGCTCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTTTCAGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGA
TCAGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACG
GTAGTGGTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAG
GTGCGGCCGCAATCGAAGTGATGTATCCACCTCCGTACCTCGATAACGAGAAAT
CAAATGGAACGATCATTCATGTGAAAGGGAAACATCTGTGCCCAAGCCCATTGT
TCCCAGGTCCGTCAAAACCATTCTGGGTGCTTGTCGTTGTTGGGGGTGTACTCGC
ATGTTATTCTTTGCTGGTGACTGTGGCGTTTATCATCTTCTGGGTAAGGAGTAAA
CGCAGCCGCCTGCTGCATTCAGACTACATGAACATGACCCCACGGCGGCCCGGC

[0356] CCAACGCGCAAACACTACCAACCTTACGCCCCACCGCGAGACTTTGCCGCCTAC
AGATCCAAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATG
CGCCCTGTGCAAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGCCGGTTCCCGGA
AGAGGAAGAGGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAGTTTTCCCGGTCCGCCGACG
CTCCGGCGTACCAGCAGGGGCAAAACCAGCTGTACAACGAACTTAACCTCGGT
CGCCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAGCGGCGGGGAAGAGATCCCGAGAT
GGGTGGAAAGCCGCGGCGGAAGAACCCTCAGGAGGGCTTGTACAACGAGCTGC
AAAAGGACAAAATGGCCGAAGCCTACTCCGAGATTGGCATGAAGGGAGAGCGC
AGACGCGGGAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGTCAACCGCGACTAA
GGACACTTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCGCGCTAA

[0357] SEQ ID NO:8 CAR D0255(CD20_CD19 CD28)CD28 BBz的氨基酸序列

[0358]
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY
QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
TFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQ
MNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPG
QGLEWMGLINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSDRGITATDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGR
MAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAAT
LTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMFGGGTQLTVLGAAAIEVMYPPPYLDNE
KSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR
SRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0359] SEQ ID NO:9 CAR D0256(CD20_CD19 CD8 CD28 BBz)的核苷酸序列

[0360]
ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTC
TGTTGATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCC
TGGAGAGAGAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCT
GGCCTGGTACCAGCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACG
CAAGTAACAGGGCGACTGGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCA
CAGACTTTACTTTGACGATCAGTTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTA
CTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGATTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGA
GATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGTGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCG
AAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTTCAACCTGGGCGGTCCTTGA
GATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTATGCAATGCACTGGG
TGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATTAGCTGGAACT
CCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTTCCCGCG
ATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGAC
ACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGG

[0361]

ATGGATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGGTGGAGGAGG
TTCAGGCGGAGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGA
GGTGGCGGATCAGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC
TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTA
CTATATGCATTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATT
AATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAG
TCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGC
CTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTACTATTGTGCGAGATCGGATCGGGGAATT
ACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCAGGCGGTGGAGGCTCAGGTGGAGGAGGTAGCGGAGGCGGTGGTTCCCAGTC
TGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGGATGGCCAAGAT
TACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCCAGGCTCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTTTCAGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGA
TCAGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACG
GTAGTGGTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAG
GTGCGGCCGCGACTACCACTCCTGCACCACGGCCACCTACCCCAGCCCCCACCA
TTGCAAGCCAGCCACTTTCACTGCGCCCCGAAGCGTGTAGACCAGCTGCTGGAG
GAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCGCCTGTGACATCTACATCTGGGCCC
CATTGGCTGGAACTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCTCTGGTCATTACCCTGTACTG
CAGGAGTAAACGCAGCCGCCTGCTGCATTCAGACTACATGAACATGACCCCAC
GGCGGCCCGGCCCAACGCGCAAACACTACCAACCTTACGCCCCACCGCGAGAC
TTTGCCGCCTACAGATCCAAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAG
CAGCCGTTCATGCGCCCTGTGCAAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGC
CGGTTCCCGGAAGAGGAAGAGGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAGTTTTCCCG
GTCCGCCGACGCTCCGGCGTACCAGCAGGGGCAAAACCAGCTGTACAACGAAC
TTAACCTCGGTCGCCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAGCGGCGGGGAAGA
GATCCCGAGATGGGTGGAAAGCCGCGGCGGAAGAACCCTCAGGAGGGCTTGTA
CAACGAGCTGCAAAAGGACAAAATGGCCGAAGCCTACTCCGAGATTGGCATGA
AGGGAGAGCGCAGACGCGGGAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGTC
AACCGCGACTAAGGACACTTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCGCG
CTAA

[0362] SEQ ID NO:10 CAR D0256(CD20_CD19 CD8 CD28 BBz)的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY
QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF
TFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQ
MNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPG
QGLEWMGLINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSDRGITATDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGR

[0363]

MAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAAT
LTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMFGGGTQLTVLGAAATTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRS
KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFM
RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0364] SEQ ID NO:11前导/信号肽序列(LP)的核苷酸序列

[0365] atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctgattccg

[0366] SEQ ID NO:12前导/信号肽序列(LP)的氨基酸序列

[0367] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

[0368] SEQ ID NO:13 CAR D0257(CD20 CD8 CD28z_CD19 CD8 BBz)的核苷酸序列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGTT
GATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCCTGGAGAGA
GAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCTGGCCTGGTACCA
GCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACGCAAGTAACAGGGCGACT
GGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCACAGACTTTACTTTGACGATCAG
TTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGA
TTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGAGATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGG
TGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTT
CAACCTGGGCGGTCCTTGAGATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTA

[0369] TGCAATGCACTGGGTGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATT
AGCTGGAACTCCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTT
CCCGCGATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGA
CACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGGATG
GATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGCGGCCGCGACTACCACTC
CTGCACCACGGCCACCTACCCCAGCCCCCACCATTGCAAGCCAGCCACTTTCACTGCGC
CCCGAAGCGTGTAGACCAGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCG
CCTGTGACATCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCT
CTGGTCATTACCCTGTACTGCCGGTCGAAGAGGTCCAGACTCTTGCACTCCGACTACAT
GAACATGACTCCTAGAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACCAGCCGTACGCCCCT

[0370]
CCTCGGGATTTCGCCGCATACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGCTCAGCCGATGCAC
CGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGGCGGG
AAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGC
CGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGG
CGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATG
ACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATAT
GCAAGCTTTGCCCCCGCGGCGCGCGAAACGCGGCAGCGGCGCGACCAACTTTAGCCTG
CTGAAACAGGCGGGCGATGTGGAAGAAAACCCGGGCCCGCGAGCAAAGAGGAATATT
ATGGCTCTGCCTGTTACGGCACTGCTCCTTCCGCTTGCATTGTTGTTGCACGCAGCGCG
GCCCGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCG
ACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTAATCAACCCTAGTGGTGGTAGC
ACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACG
AGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACT
GTGCGAGATCGGATCGGGGAATTACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG
GACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGCGGAGGAGGCTCCGGGGGAGGAGGTTCCGGGGG
CGGGGGTTCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGG
ATGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATC
AGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGATC
AGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACGGTAGTG
GTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCTAGCGCA
ACCACTACGCCTGCTCCGCGGCCTCCAACGCCCGCGCCCACGATAGCTAGTCAGCCGT
TGTCTCTCCGACCAGAGGCGTGTAGACCGGCCGCTGGCGGAGCCGTACATACTCGCGG
ACTCGACTTCGCTTGCGACATCTACATTTGGGCACCCTTGGCTGGGACCTGTGGGGTGC
TGTTGCTGTCCTTGGTTATTACGTTGTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTAC
ATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCT
CGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGAGAGTCAAATTTTCCA
GGTCCGCAGATGCCCCCGCGTACCAGCAAGGCCAGAACCAACTTTACAACGAACTGAA
CCTGGGTCGCCGGGAGGAATATGATGTGCTGGATAAACGAAGGGGGAGGGACCCTGA
GATGGGAGGGAAACCTCGCAGGAAAAACCCGCAGGAAGGTTTGTACAACGAGTTGCA
GAAGGATAAGATGGCTGAGGCTTACTCTGAAATAGGGATGAAGGGAGAGAGACGGAG
AGGAAAAGGCCATGATGGCCTTTACCAGGGCTTGAGCACAGCAACAAAGGATACTTAC
GACGCTCTTCACATGCAAGCTCTGCCACCACGGTAG

[0371] SEQ ID NO:14 CAR D0257(CD20 CD8 CD28z_CD19 CD8 BBz)的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG
QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRL
EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP
GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQ
YGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ
PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL

[0372] HMQALPPRRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKRNIMALPVTALLLPLALLLHAAR
PEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSGGST
SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSDRGITATDAFDIWGQGTMV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGRMAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPG
QAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAATLTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMF
GGGTQLTVLGASATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0373] SEQ ID NO:15 CAR D0258(CD20 CD8 BBz_CD1 9 CD8 CD28z)的核苷酸序列
ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGTT
GATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCCTGGAGAGA
GAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCTGGCCTGGTACCA
GCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACGCAAGTAACAGGGCGACT
GGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCACAGACTTTACTTTGACGATCAG
TTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGA

[0374] TTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGAGATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGG
TGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTT
CAACCTGGGCGGTCCTTGAGATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTA
TGCAATGCACTGGGTGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATT
AGCTGGAACTCCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTT
CCCGCGATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGA
CACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGGATG

[0375]

GATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGCGGCCGCAACGACCACTC
CTGCACCACGGCCACCTACCCCAGCCCCCACCATTGCAAGCCAGCCACTTTCACTGCGC
CCCGAAGCGTGTAGACCAGCTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCG
CCTGTGACATCTACATCTGGGCCCCATTGGCTGGAACTTGCGGCGTGCTGCTCTTGTCT
CTGGTCATTACCCTGTACTGCAAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAGC
AGCCGTTCATGCGCCCTGTGCAAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGCCGGTT
CCCGGAAGAGGAAGAGGGCGGCTGCGAACTGAGAGTGAAGTTTAGCCGCTCAGCCGA
TGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGG
CGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGA
AAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAG
ATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGT
CATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCC
ATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGGCGCGCGAAACGCGGCAGCGGCGCGACCAACTTTAG
CCTGCTGAAACAGGCGGGCGATGTGGAAGAAAACCCGGGCCCGCGAGCAAAGAGGAA
TATTATGGCTCTGCCTGTTACGGCACTGCTCCTTCCGCTTGCATTGTTGTTGCACGCAGC
GCGGCCCGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGT
GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTAATCAACCCTAGTGGTGGT
AGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCC
ACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATT
ACTGTGCGAGATCGGATCGGGGAATTACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCA
AGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGCGGAGGAGGCTCCGGGGGAGGAGGTTCCGG
GGGCGGGGGTTCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGG
CGGATGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGT
ATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCC
CTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACG
ATCAGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACGGTA
GTGGTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCTAGC
GCAACCACTACGCCTGCTCCGCGGCCTCCAACGCCCGCGCCCACGATAGCTAGTCAGC
CGTTGTCTCTCCGACCAGAGGCGTGTAGACCGGCCGCTGGCGGAGCCGTACATACTCG
CGGACTCGACTTCGCTTGCGACATCTACATTTGGGCACCCTTGGCTGGGACCTGTGGGG
TGCTGTTGCTGTCCTTGGTTATTACGTTGTACTGCCGGTCGAAGAGGTCCAGACTCTTG
CACTCCGACTACATGAACATGACTCCTAGAAGGCCCGGACCCACTAGAAAGCACTACC
AGCCGTACGCCCCTCCTCGGGATTTCGCCGCATACCGGTCCAGAGTCAAATTTTCCAGG

[0376] TCCGCAGATGCCCCCGCGTACCAGCAAGGCCAGAACCAACTTTACAACGAACTGAACC
TGGGTCGCCGGGAGGAATATGATGTGCTGGATAAACGAAGGGGGAGGGACCCTGAGA
TGGGAGGGAAACCTCGCAGGAAAAACCCGCAGGAAGGTTTGTACAACGAGTTGCAGA
AGGATAAGATGGCTGAGGCTTACTCTGAAATAGGGATGAAGGGAGAGAGACGGAGAG
GAAAAGGCCATGATGGCCTTTACCAGGGCTTAAGCACAGCAACAAAGGATACTTACGA
CGCTCTTCACATGCAAGCTCTGCCACCACGGTAG

[0377] SEQ ID NO:16CAR D0258(CD20 CD8 BBz_CD19 CD8 CD28z)的氨基酸序列

[0378] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG
QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRL
EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP
GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQ
YGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPRRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKRNIMALPVTALLLPLALLLHAAR
PEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSGGST
SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSDRGITATDAFDIWGQGTMV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGRMAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPG
QAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAATLTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMF
GGGTQLTVLGASATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0379] SEQ ID NO:17CAR D0266(CD20 CD8 OX40 OX40z_CD19 CD8 ICOSz)的核苷酸序列

[0380] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGTT
GATTCCGGAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCCTGGAGAGA
GAGCAACACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCTGGCCTGGTACCA
GCAAAAGCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACGCAAGTAACAGGGCGACT
GGCATCCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCACAGACTTTACTTTGACGATCAG
TTCTTTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGA

[0381]

TTACCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGAGATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGG
TGGTTCCGGTGGGGGAGGTAGCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTT
CAACCTGGGCGGTCCTTGAGATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTA
TGCAATGCACTGGGTGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTATT
AGCTGGAACTCCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATTT
CCCGCGATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAAGA
CACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGGATG
GATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGCGGCCGCAACGACCACTC
CAGCACCGAGACCGCCAACCCCCGCGCCTACCATCGCAAGTCAACCACTTTCTCTCAG
GCCTGAAGCGTGCCGACCTGCAGCTGGTGGGGCAGTACATACCAGGGGTTTGGACTTC
GCATGTGACGTGGCGGCAATTCTCGGCCTGGGACTTGTCCTTGGTCTGCTTGGTCCGCT
CGCAATACTTCTGGCCTTGTACCTGCTCCGCAGAGACCAAAGACTTCCGCCCGACGCCC
ACAAGCCCCCAGGAGGAGGTTCCTTCAGAACGCCTATACAAGAAGAACAAGCAGATG
CCCACTCTACCCTGGCTAAAATCAGGGTGAAGTTTAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGC
CTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGGCGGGAAGA
ATATGACGTGCTGGACAAACGGCGCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
GAGGAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGA
AGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGG
ACTGTACCAGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAA
GCTTTGCCCCCGCGGCGCGCGAAACGCGGCAGCGGCGCGACCAACTTTAGCCTGCTGA
AACAGGCGGGCGATGTGGAAGAAAACCCGGGCCCGCGAGCAAAGAGGAATATTATGG
CTCTGCCTGTTACGGCACTGCTCCTTCCGCTTGCATTGTTGTTGCACGCAGCGCGGCCC
GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACA
GGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTAATCAACCCTAGTGGTGGTAGCACA
AGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGC
ACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGATCGGATCGGGGAATTACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCAGGCGGAGGAGGCTCCGGGGGAGGAGGTTCCGGGGGCGG
GGGTTCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGGCGGATG
GCCAAGATTACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTGGTATCAGC
AGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGGCCCTCAGG
GATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGACGATCAGC
ACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACGGTAGTGGTG

ATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGTGCTAGCGCAACC
ACTACGCCTGCTCCGCGGCCTCCAACGCCCGCGCCCACGATAGCTAGTCAGCCGTTGTC
TCTCCGACCAGAGGCGTGTAGACCGGCCGCTGGCGGAGCCGTACATACTCGCGGACTC
GACTTCGCTTGCGACATCTACATTTGGGCACCCTTGGCTGGGACCTGTGGGGTGCTGTT
GCTGTCCTTGGTTATTACGTTGTACTGCTGGCTGACAAAAAAGAAGTATTCATCTAGTG
TACATGATCCGAACGGTGAATACATGTTCATGCGCGCGGTGAACACGGCCAAGAAGAG

[0382] CAGACTGACCGACGTAACCCTTAGAGTCAAATTTTCCAGGTCCGCAGATGCCCCCGCG
TACCAGCAAGGCCAGAACCAACTTTACAACGAACTGAACCTGGGTCGCCGGGAGGAA
TATGATGTGCTGGATAAACGAAGGGGGAGGGACCCTGAGATGGGAGGGAAACCTCGC
AGGAAAAACCCGCAGGAAGGTTTGTACAACGAGTTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAG
GCTTACTCTGAAATAGGGATGAAGGGAGAGAGACGGAGAGGAAAAGGCCATGATGGC
CTTTACCAGGGCTTGAGCACAGCAACAAAGGATACTTACGACGCTCTTCACATGCAAG
CTCTGCCACCACGGTAG

[0383] SEQ ID NO:18 CAR DO266(CD20 CD8 OX40 OX40z_CD19 CD8 ICOSz)的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG
QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRL
EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP
GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQ
YGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQ
ADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

[0384] ALPPRRAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKRNIMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQ
LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSGGSTSYAQ
KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSDRGITATDAFDIWGQGTMVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSVAPGRMAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPGQAPV
LVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSGDAATLTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMFGGGT
QLTVLGASATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTLRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0385] SEQ ID NO:19 CAR LTG1497(mCD20_CD19 CD8 BBz)的核苷酸序列

ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCTTCCTGCTG
ATTCCCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCG
TGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGT
GAAACAGACCCCGGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGG
CGATACTTCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAG
CTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACT
ACTGCGCACGGTCCAACTACTATGGAAGCTCGTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCC
GGCACCACTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGG
GGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGTCGGCCTCACCGG
GCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACTACATGGATTGGTA
CCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCC
TCCGGCGTGCCAGCGCGGTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCA
TCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAA
CCCGCCGACTTTTGGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGGAGGCGGCGGCAGCGG
CGGGGGAGGGTCCGGAGGGGGTGGTTCTGGTGGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAG
CGACATTCAGATGACTCAGACCACCTCCTCCCTGTCCGCCTCCCTGGGCGACCGCGTGA

[0386] CCATCTCATGCCGCGCCAGCCAGGACATCTCGAAGTACCTCAACTGGTACCAGCAGAA
GCCCGACGGAACCGTGAAGCTCCTGATCTACCACACCTCCCGGCTGCACAGCGGAGTG
CCGTCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTCGGGAACTGACTACTCCCTTACTATTTCCAACCT
GGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTCTGCCAACAAGGAAACACCCTGCCGTACACT
TTTGGCGGGGGAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTTCCGGGAAGCCCG
GCTCCGGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCTGGCC
TGGTGGCCCCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCCGGAGTGTCGCTCCCG
GATTACGGAGTGTCCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTGGAATGGCTCGGAG
TCATCTGGGGTTCCGAAACCACCTATTACAACTCGGCACTGAAATCCAGGCTCACCATT
ATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTTCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACG
ACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGATCCTACGCTATGGA
CTACTGGGGCCAGGGGACCAGCGTGACCGTGTCATCCGCGGCCGCAACTACCACCCCT
GCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCC
CGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCC
TGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCT
GGTCATCACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAG
CCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCC

CTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACG
CCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGA
GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGA

[0387] AACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGA
TGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTC
ACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCA
TATGCAAGCACTCCCACCCCGGTAG

[0388] SEQ ID NO:20 CAR LTG1497(mCD20_CD19 CD8 BBz)的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK
QTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR
SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTM
TCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA
ATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSL
SASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL

[0389] TISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG
LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKD
NSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAATTTPAPRP
PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0390] SEQ ID NO:21 CD28共刺激结构域的核苷酸序列

[0391] AGGAGTAAACGCAGCCGCCTGCTGCATTCAGACTACATGAACATGACCCCACGGCGGC
CCGGCCCAACGCGCAAACACTACCAACCTTACGCCCCACCGCGAGACTTTGCCGCCTA
CAGATCC

[0392] SEQ ID NO:22 CD28共刺激结构域的氨基酸序列

[0393] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0394] SEQ ID NO:23 4-1BB共刺激结构域的核苷酸序列

[0395] AAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGCCCTGTGC
AAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGCCGGTTCCCGGAAGAGGAAGAGGGCG
GCTGCGAACTG

[0396] SEQ ID NO:24 4-1BB共刺激结构域的氨基酸序列

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0397] SEQ ID NO:25串联CD28_4-1BB共刺激结构域的核苷酸序列

[0398] AGGAGTAAACGCAGCCGCCTGCTGCATTCAGACTACATGAACATGACCCCACGGCGGC
CCGGCCCAACGCGCAAACACTACCAACCTTACGCCCCACCGCGAGACTTTGCCGCCTA
CAGATCCAAGCGCGGACGGAAGAAACTCTTGTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGC
CCTGTGCAAACCACCCAAGAAGAGGACGGGTGCTCCTGCCGGTTCCCGGAAGAGGAA
GAGGGCGGCTGCGAACTG

[0399] SEQ ID NO:26串联CD28_4-1BB共刺激结构域的氨基酸序列

[0400] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0401] SEQ ID NO:27 OX40共刺激结构域的核苷酸序列

[0402] GTGGCGGCAATTCTCGGCCTGGGACTTGTCCTTGGTCTGCTTGGTCCGCTCGCAATACTTCTGGCCTTGTACCTGCTCCGCAGAGACCAAAGACTTCCGCCCGACGCCCACAAGCCCCCAGGAGGAGGTTCCTTCAGAACGCCTATACAAGAAGAACAAGCAGATGCCCACTCTACCCTGGCTAAAATC

[0403] SEQ ID NO:28 OX40共刺激结构域的氨基酸序列

[0404] VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

[0405] SEQ ID NO:29 ICOS共刺激结构域的核苷酸序列

[0406] TGGCTGACAAAAAAGAAGTATTCATCTAGTGTACATGATCCGAACGGTGAATACATGTTCATGCGCGCGGTGAACACGGCCAAGAAGAGCAGACTGACCGACGTAACCCTT

[0407] SEQ ID NO:30 ICOS共刺激结构域的氨基酸序列

[0408] WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL

[0409] SEQ ID NO:31 CD28铰链结构域的核苷酸序列

[0410] ATCGAAGTGATGTATCCACCTCCGTACCTCGATAACGAGAAATCAAATGGAACGATCATTCATGTGAAAGGGAAACATCTGTGCCCAAGCCCATTGTTCCCAGGTCCGTCAAAACCA

[0411] SEQ ID NO:32 CD28铰链结构域的氨基酸序列

[0412] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

[0413] SEQ ID NO:33 OX40跨膜结构域的核苷酸序列

[0414] GTGGCGGCAATTCTCGGCCTGGGACTTGTCCTTGGTCTGCTTGGTCCGCTCGCAATACTTCTG

[0415] SEQ ID NO:34 OX40跨膜结构域的氨基酸序列

[0416] VAAILGLGLVLGLLGPLAILL

[0417] SEQ ID NO:35 DNA CD8跨膜结构域的核苷酸序列

[0418] atttgggccccgctggccggcacttgcggcgtgctcctgctgtcgctggtcatcaccctttactgc

[0419] SEQ ID NO:36 CD8跨膜结构域的氨基酸序列

[0420] Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

[0421] SEQ ID NO:37 DNA CD8铰链结构域的核苷酸序列

[0422] actaccacccctgcccctcggccgccgactccggccccaaccatcgcaagccaacccctctccttgcgccccgaagcttgccgcccggccgcgggtggagccgtgcatacccgggggctggactttgcctgcgatatctac

[0423] SEQ ID NO:38 CD8铰链结构域的氨基酸序列

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

[0424] Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

[0425] SEQ ID NO:39 CD8.α的跨膜区和氨基酸编号137至206铰链的氨基酸序列(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)

[0426] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

[0427] SEQ ID NO:40 4-IBB的DNA信号传导结构域的核苷酸序列

[0428] aagaggggccggaagaagctgctttacatcttcaagcagccgttcatgcggcccgtgcag acgactcaggaagaggacggatgctcgtgcagattccctgaggaggaagaggggggatgc gaactg

[0429] SEQ ID NO:41 4-IBB的信号传导结构域的氨基酸序列

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

[0430] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0431] SEQ ID NO:42 CD3-ζ的DNA信号传导结构域的核苷酸序列

[0432] CGCGTGAAGTTTTCCCGGTCCGCCGACGCTCCGGCGTACCAGCAGGGGCAAAACCAGC TGTACAACGAACTTAACCTCGGTCGCCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAGCGGCG GGGAAGAGATCCCGAGATGGGTGGAAAGCCGCGGCGGAAGAACCCTCAGGAGGGCTT GTACAACGAGCTGCAAAAGGACAAAATGGCCGAAGCCTACTCCGAGATTGGCATGAA GGGAGAGCGCAGACGCGGGAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGTCAACCGC GACTAAGGACACTTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCGCGC

[0433] SEQ ID NO:43 CD3ζ的氨基酸序列

[0434] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0435] SEQ ID NO:44CD3ζ_1的替代核苷酸序列

[0436] AGGGTGAAGTTTAGCCGCTCAGCCGATGCACCGGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAG CTCTACAACGAGCTCAACCTGGGTCGGCGGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGC GCGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCCTCAAGAGGGC CTGTACAACGAACTGCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAGATCGGCATG AAGGGAGAACGCCGGAGAGGGAAGGGTCATGACGGACTGTACCAGGGCCTGTCAACT GCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCTTTGCCCCCGCGG

[0437] SEQ ID NO:45CD3ζ_2的替代核苷酸序列

[0438] AGAGTCAAATTTTCCAGGTCCGCAGATGCCCCCGCGTACCAGCAAGGCCAGAACCAAC
TTTACAACGAACTGAACCTGGGTCGCCGGGAGGAATATGATGTGCTGGATAAACGAAG
GGGGAGGGACCCTGAGATGGGAGGGAAACCTCGCAGGAAAAACCCGCAGGAAGGTTT
GTACAACGAGTTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAGGCTTACTCTGAAATAGGGATGAA
GGGAGAGAGACGGAGAGGAAAAGGCCATGATGGCCTTTACCAGGGCTTGAGCACAGC
AACAAAGGATACTTACGACGCTCTTCACATGCAAGCTCTGCCACCACGG

[0439] SEQ ID NO:46CD28跨膜结构域的核苷酸序列

[0440] TTCTGGGTGCTTGTCGTTGTTGGGGGTGTACTCGCATGTTATTCTTTGCTGGTGACTGTGGCGTTT
ATCATCTTCTGGGTA

[0441] SEQ ID NO:47CD28跨膜结构域的氨基酸序列

[0442] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0443] SEQ ID NO:48CD20/CD19-反应性ScFv结合结构域的核苷酸序列

[0444] GAAATTGTGTTGACTCAGTCACCGGCAACTCTTAGTCTCTCCCCTGGAGAGAGAGCAA
CACTGAGCTGCAGAGCATCTCAAAGTGTTTCCAGCTATCTGGCCTGGTACCAGCAAAA
GCCAGGCCAGGCACCACGACTTCTGATTTACGACGCAAGTAACAGGGCGACTGGCAT
CCCCGCCCGCTTTTCCGGATCAGGCAGTGGCACAGACTTTACTTTGACGATCAGTTCT
TTGGAGCCAGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGAGATCCAATTGGCCGATTA
CCTTCGGCCAAGGTACCAGGCTGGAGATAAAGGGTGGCGGCGGCTCTGGTGGAGGTG
GTTCCGGTGGGGGAGGTAGCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCTTGGTTC
AACCTGGGCGGTCCTTGAGATTGTCATGCGCCGCATCCGGCTTCACCTTCAACGACTA
TGCAATGCACTGGGTGCGGCAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCAGCACTAT
TAGCTGGAACTCCGGGAGTATCGGATACGCTGATTCAGTCAAAGGTCGATTTACCATT
TCCCGCGATAATGCCAAAAAAAGCTTGTATCTCCAAATGAACTCACTCAGGGCTGAA
GACACCGCGCTGTATTACTGTGCTAAAGACATCCAATATGGCAATTACTATTACGGGA
TGGATGTATGGGGGCAAGGGACAACGGTCACTGTCTCATCCGGTGGAGGAGGTTCAG
GCGGAGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGAGGTGGCGG
ATCAGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCATTGGGTG
CGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATTAATCAACCCTAGTGGTGGT
AGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCC
ACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTAC
TATTGTGCGAGATCGGATCGGGGAATTACCGCCACGGACGCTTTTGATATCTGGGGCC
AAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGCGGTGGAGGCTCAGGTGGAGGAGGTAGCG
GAGGCGGTGGTTCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGG
GCGGATGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAAGTGACATTGGAAATAAAAATGTCCACTG
GTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCTGTCCTGGTTGTCTATGATGATTACGACCGG
CCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTTTCAGGCTCCAACTCTGGGGACGCGGCCACCCTGA
CGATCAGCACGGTCGAAGTCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTCAGGTGTGGGACG
GTAGTGGTGATCCTTATTGGATGTTCGGCGGAGGGACCCAGCTCACCGTTTTAGGT

[0445] SEQ ID NO:49CD20/CD19-反应性ScFv结合结构域的氨基酸序列

[0446] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSE
VQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGY
ADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTT
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL
RSEDTAVYYCARSDRGITATDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPP
SVSVAPGRMAKITCGGSDIGNKNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDYDRPSGIPERFSGSNSG
DAATLTISTVEVGDEADYFCQVWDGSGDPYWMFGGGTQLTVLG

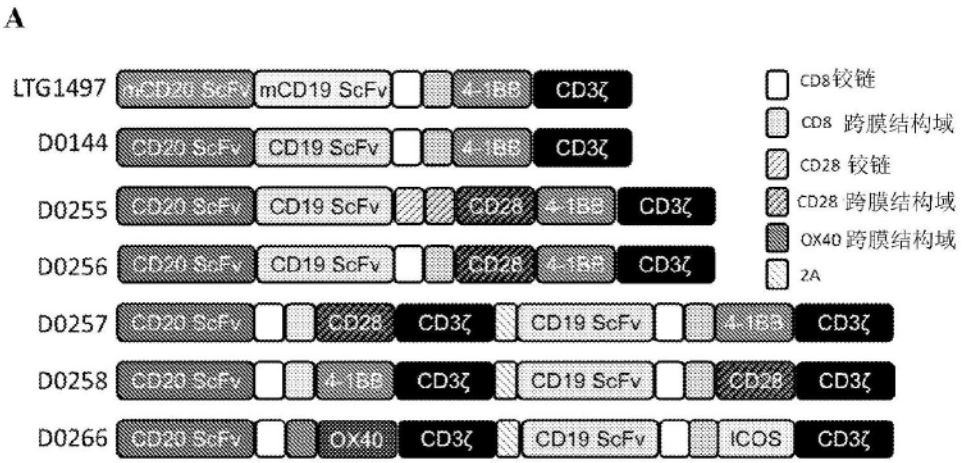

A
LTG1497
D0144
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
mCD20 ScFv
mCD19 ScFv
CD20 ScFv
CD19 ScFv
4-1BB
CD28
CD3ζ
OX40
ICOS
CD8铰链
CD8 跨膜结构域
CD28 铰链
CD28 跨膜结构域
OX40 跨膜结构域
2A

图1A

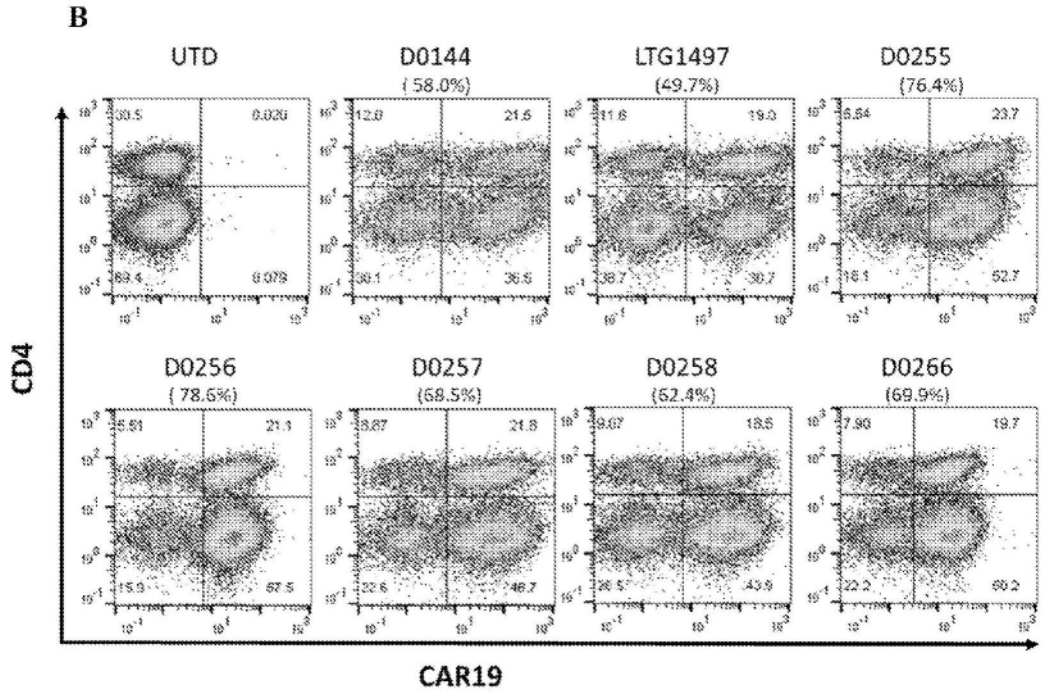

B
UTD
D0144
(58.0%)
LTG1497
(49.7%)
D0255
(76.4%)
D0256
(78.6%)
D0257
(68.5%)
D0258
(62.4%)
D0266
(69.9%)
CD4
CAR19

图1B

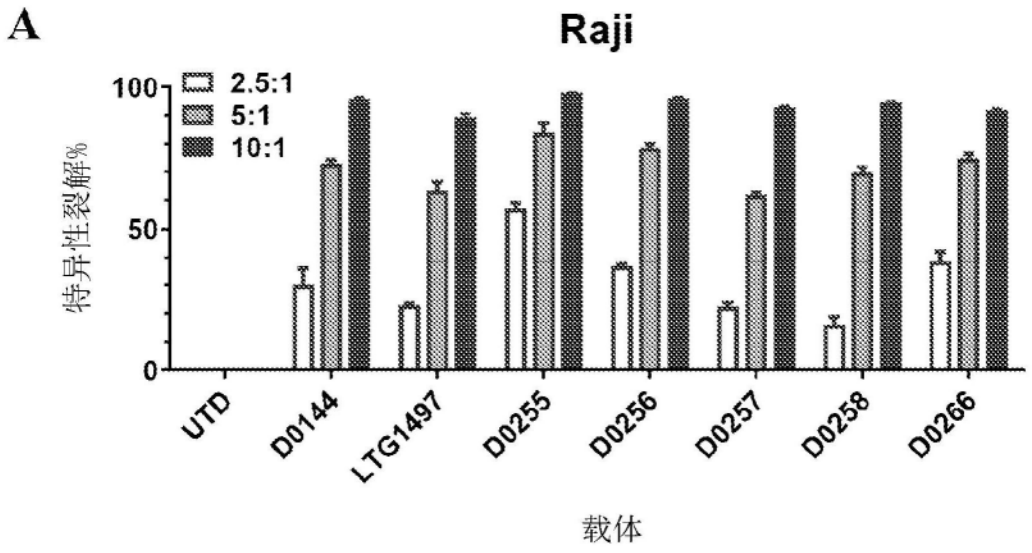

A
Raji
2.5:1
5:1
10:1
特异性裂解%
100
50
0
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图2A

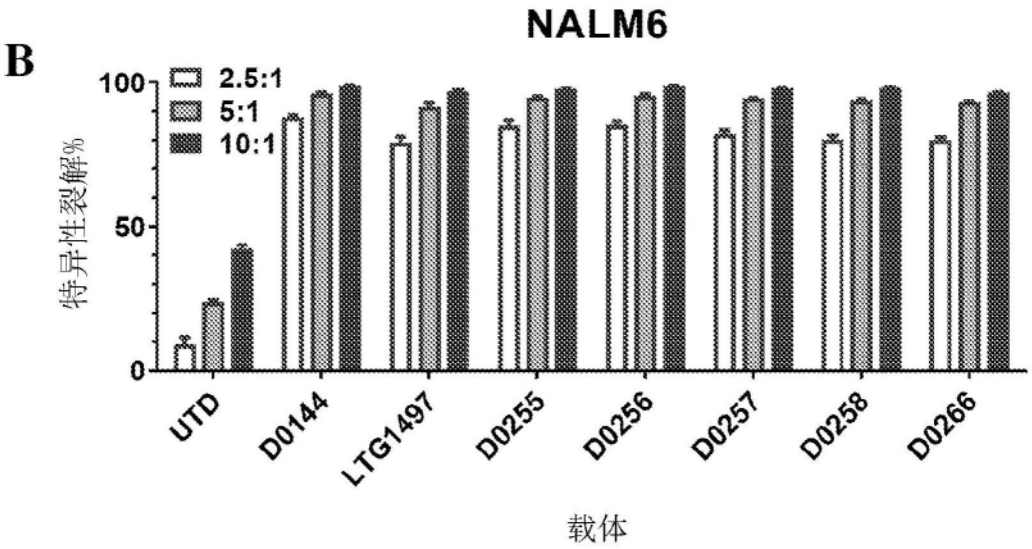

B
NALM6
2.5:1
5:1
10:1
特异性裂解%
100
50
0
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图2B

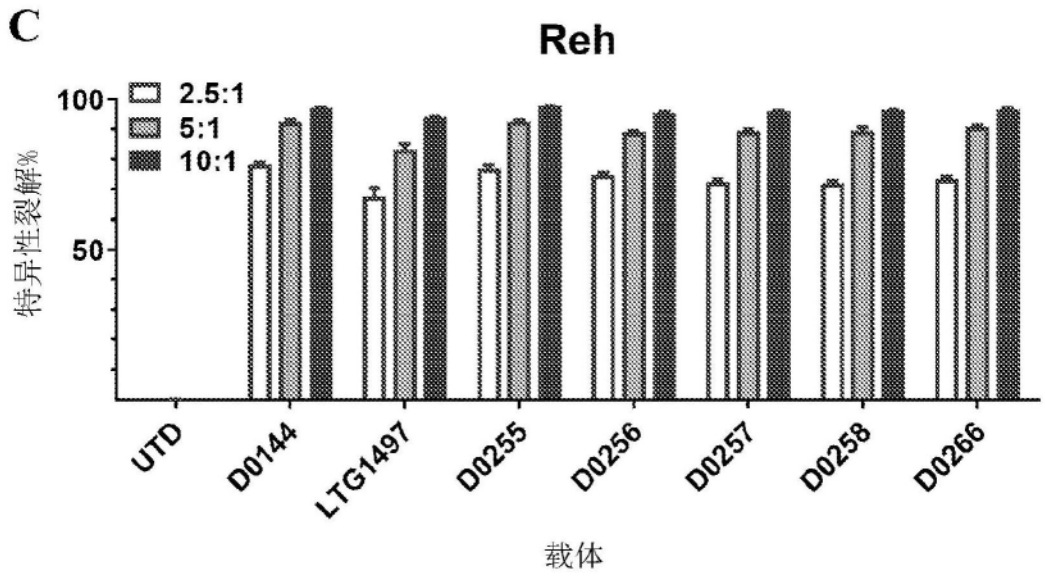

C
Reh
2.5:1
5:1
10:1
100
50
特异性裂解%
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图2C

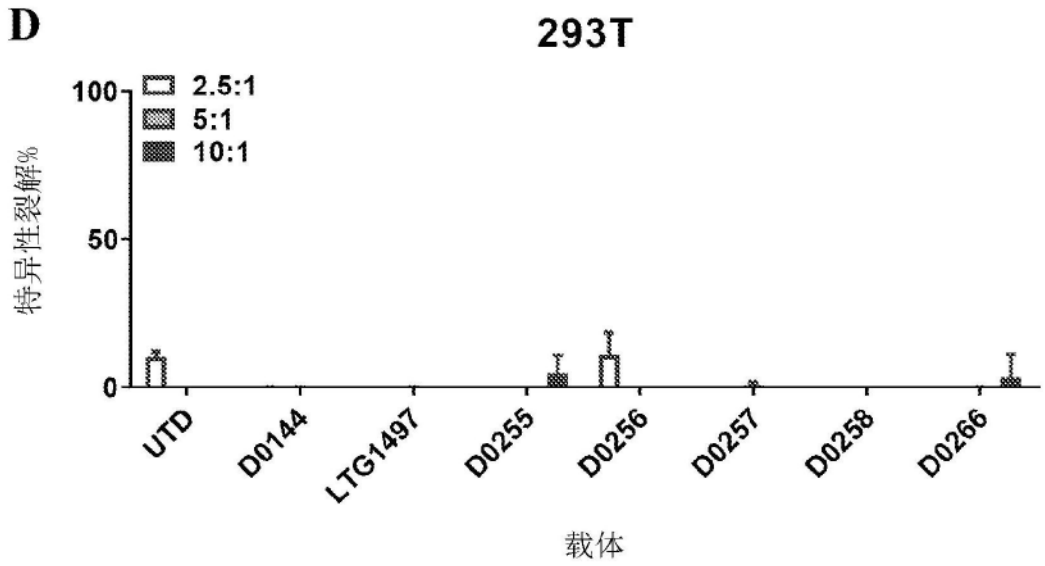

D
293T
2.5:1
5:1
10:1
100
50
0
特异性裂解%
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图2D

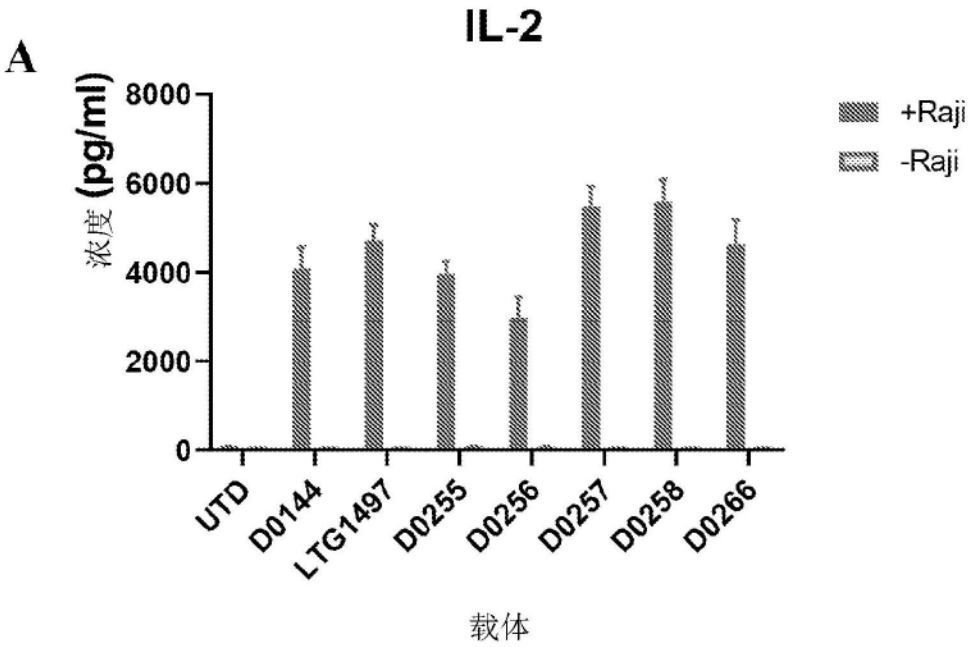

A
IL-2
浓度 (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
+Raji
-Raji
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图3A

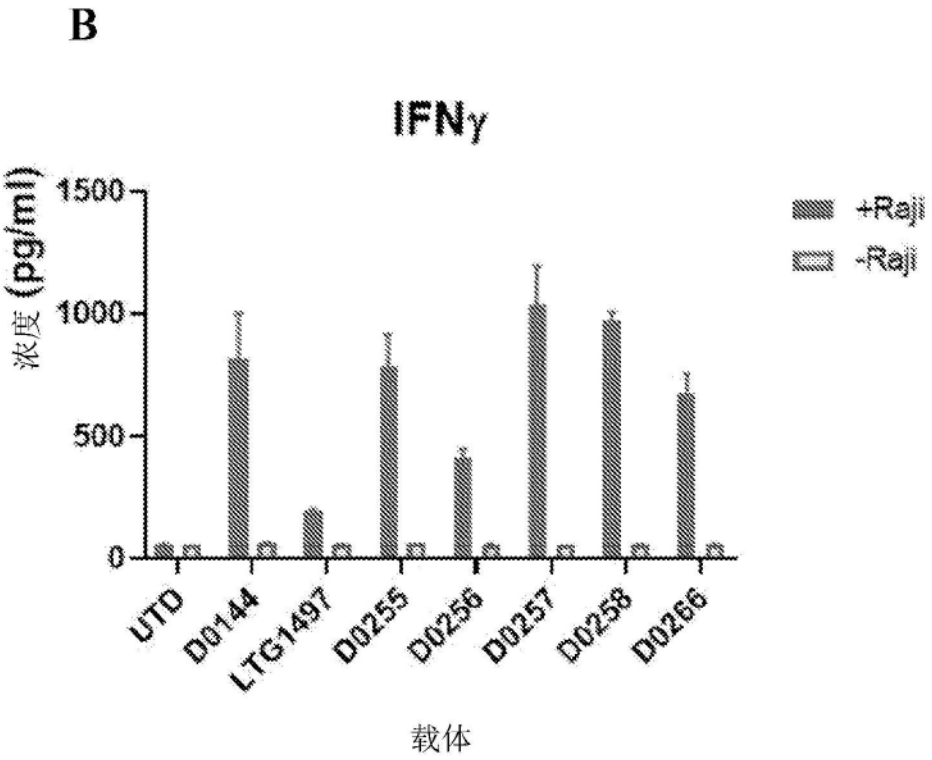

B
IFNγ
浓度 (pg/ml)
1500
1000
500
0
+Raji
-Raji
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图3B

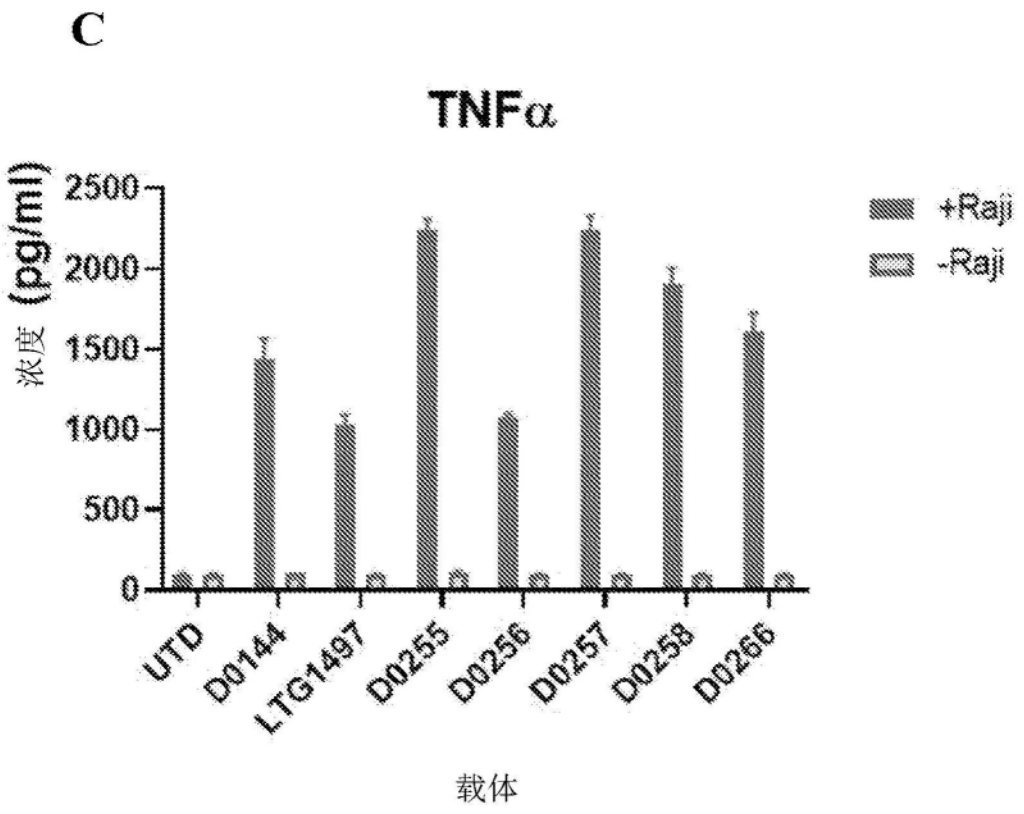

C
TNFα
浓度 (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
+Raji
-Raji
UTD
D0144
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
载体

图3C

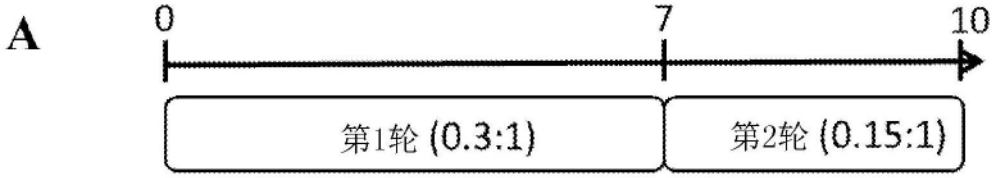

A
0
7
10
第1轮 (0.3:1)
第2轮 (0.15:1)

图4A

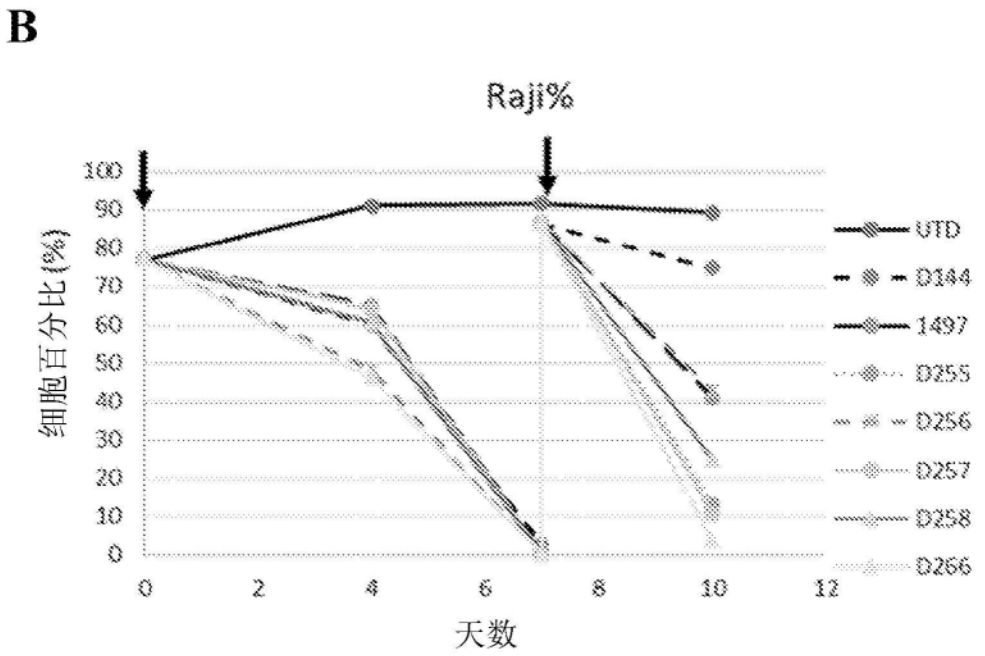

B
Raji%
细胞百分比(%)
天数
UTD
D144
1497
D255
D256
D257
D258
D266

图4B

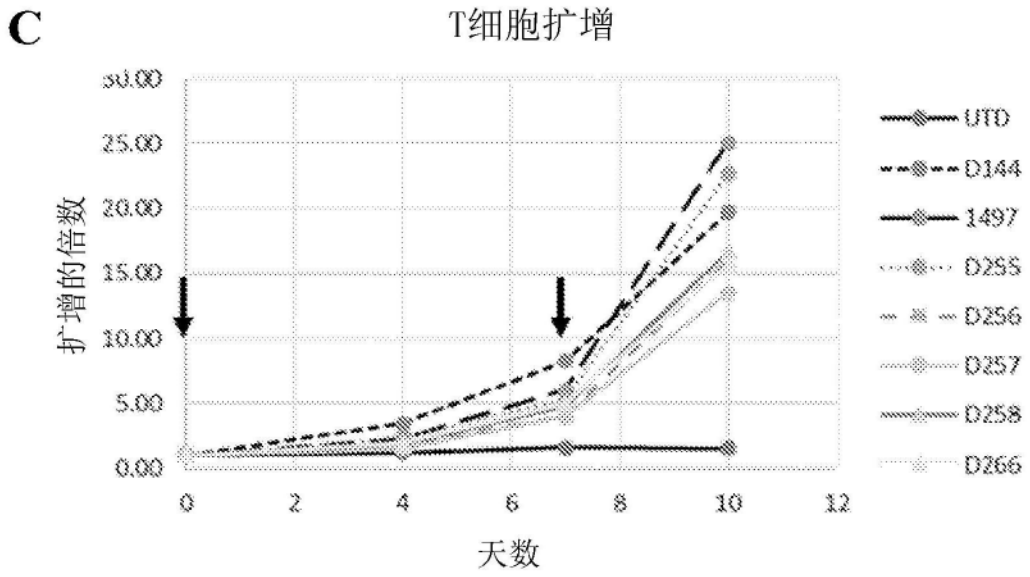

C
T细胞扩增
扩增的倍数
天数
UTD
D144
1497
D255
D256
D257
D258
D266

图4C

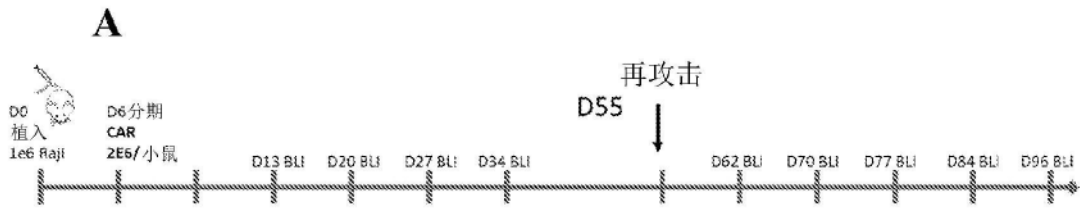

A
D0
植入
1e6 Raji
D6分期
CAR
2E6/小鼠
再攻击
D55
D13 BLI
D20 BLI
D27 BLI
D34 BLI
D62 BLI
D70 BLI
D77 BLI
D84 BLI
D96 BLI

图5A

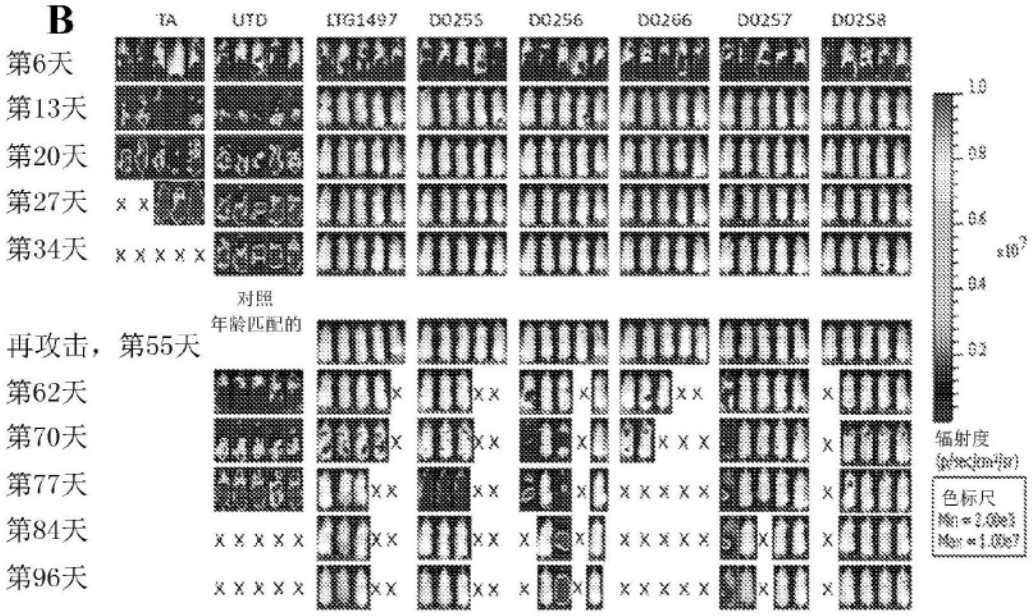

B
TA
UTD
LTG1497
D0255
D0256
D0266
D0257
D0258
第6天
第13天
第20天
第27天
第34天
对照
年龄匹配的
再攻击，第55天
第62天
第70天
第77天
第84天
第96天
辐射度
色标尺

图5B

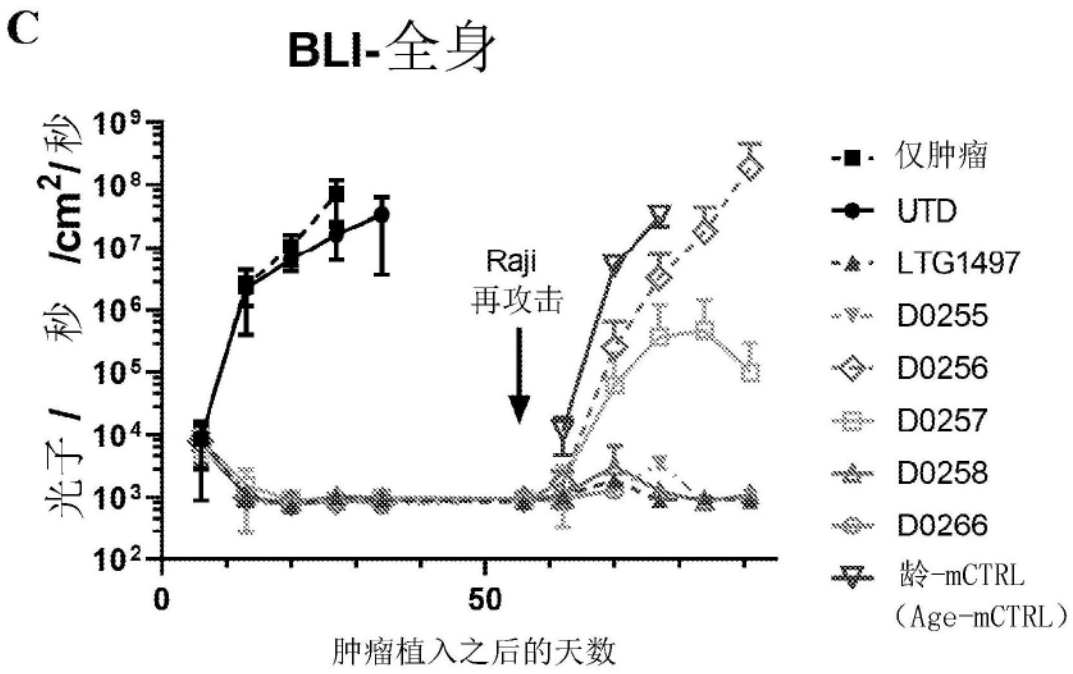

C
BLI-全身
光子 / 秒 /cm²/秒
Raji
再攻击
肿瘤植入之后的天数
仅肿瘤
UTD
LTG1497
D0255
D0256
D0257
D0258
D0266
龄-mCTRL
(Age-mCTRL)

图5C