(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108779162 B
(45)授权公告日 2021.12.07

(21)申请号 201680070221.3
(22)申请日 2016.10.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108779162 A
(43)申请公布日 2018.11.09
(30)优先权数据
62/239,509 2015.10.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/056073 2016.10.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/062820 EN 2017.04.13
(73)专利权人 美天施生物科技有限公司
地址 美国马里兰州
(72)发明人 里马斯·奥伦塔什 迪娜·施奈德 博罗·德罗普利奇
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 关越
(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)

(56)对比文件
US 2015283178 A1,2015.10.08
WO 2015066551 A2,2015.05.07
US 2014286973 A1,2014.09.25
WO 2012079000 A1,2012.06.14
WO 2015090230 A1,2015.06.25
WO 2014130635 A1,2014.08.28
US 2014328812 A1,2014.11.06

审查员 张智贤

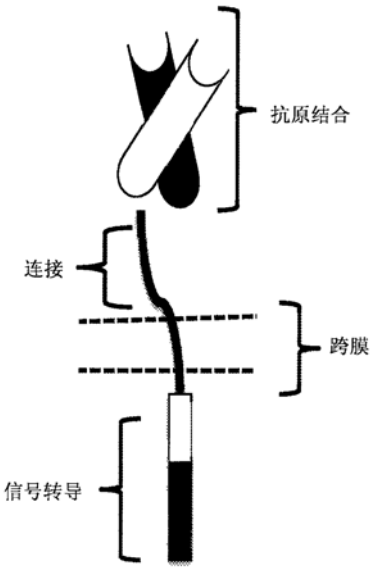
权利要求书1页 说明书47页
序列表16页 附图13页

(54)发明名称

嵌合抗原受体和使用方法

(57)摘要

公开了包含肿瘤坏死因子受体超家族成员跨膜结构域的嵌合抗原受体。还公开了与所述嵌合抗原受体相关的核酸、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和制备嵌合抗原受体T细胞的方法。



CN 108779162 B

1. T细胞在制备用于在有此需要的对象中治疗癌症的药物中的用途，其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸，所述CAR的氨基酸序列由SEQ ID NO: 8组成。

2.权利要求1所述的用途，其中所述癌症是选自白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的血液学癌症。

3.权利要求2所述的用途，其中所述白血病是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(CML)。

4.权利要求2所述的用途，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。

5.权利要求1所述的用途，其中癌症是血液学癌症。

6.权利要求1所述的用途，其中编码所述CAR的核酸序列由SEQ ID NO: 7的核酸序列组成，或具有其85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

7.权利要求1所述的用途，其中编码所述CAR的核酸序列包含SEQ ID NO: 40的核酸序列，或具有其85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。

嵌合抗原受体和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.第119(e)节要求于2015年10月9日提交的美国临时专利申请No.62/239,509的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及癌症领域,特别地涉及包含肿瘤坏死因子受体超家族成员跨膜结构域的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)和使用方法。

背景技术

[0004] 癌症是对人健康最致命的威胁之一。仅在美国,每年癌症影响接近 130万例新患者,并且其是继心血管疾病之后死亡的第二位主要原因,引起约四分之一的死亡。实体瘤是这些死亡中大多数的原因。尽管在某些癌症的医学治疗方面已取得显著进展,但是在过去的20年内所有癌症的总体5年存活率仅提高约10%。癌症或恶性肿瘤转移并且以不受控制的方式迅速生长,使得治疗极其困难。

[0005] 嵌合抗原受体(CAR)是包含以下三个基本单元的杂合分子:(1)细胞外抗原结合基序、(2)连接/跨膜基序、和(3)细胞内T细胞信号转导基序(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参照单链可变片段(single chain Fragment variable,scFv):免疫球蛋白(Ig)分子的最小结合结构域。还已改造了可替选的抗原结合基序,例如受体配体(即已将IL-13改造成与肿瘤表达的IL-13受体结合)、完整免疫受体、文库来源肽和先天免疫系统效应分子(例如NKG2D)。用于CAR表达的可替选细胞靶标(例如NK 或γ-δ T细胞)也在开发之中(Brown CE等Clin Cancer Res. 2012;18(8):2199-209;Lehner M等PLoS One.2012;7(2):e31210)。关于限定最活跃的T细胞群以使用CAR载体进行转导、确定最佳的培养和扩增技术、以及限定CAR蛋白结构本身的分子细节仍然是大量的工作。

[0006] CAR的连接基序可以是相对稳定的结构域,例如IgG的恒定结构域,或被设计成延伸的柔性接头。结构基序(例如来源于IgG恒定结构域的那些)可以用于将scFv结合结构域延伸远离T细胞质膜表面。这对于一些其中结合结构域与肿瘤细胞表面膜特别接近的肿瘤靶标而言可以是重要的(例如对于二唾液酸神经节苷脂GD2而言;Orentas等,未发表的观察结果)。迄今为止,用于CAR的信号转导基序通常包含CD3-ζ链,因为该核心基序是T细胞激活的关键信号。首次报道的第二代CAR以CD28信号转导结构域和CD28跨膜序列为特征。该基序还用于包含CD137 (4-1BB)信号转导基序的第三代CAR(Zhao Y等J Immunol.2009;183(9):5563-74)。随着新技术的出现,使用与抗CD3和抗CD28抗体连接的珠激活T细胞,和来自CD28的典型“信号2”的存在不再需要由CAR自身编码。通过使用珠激活,发现在体外测定中第三代载体并不优于第二代载体,并且在白血病的小鼠模型中其相对于第二代载体并未提供明显的益处 (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等.Blood.2012;119(12):2709-20)。这通过为第二代CD28/CD3-ζ(Lee DW等American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans,LA;2013年12月7日至12月10日)和CD137/CD3-ζ信号转导形式(Porter DL等N Engl J Med.2011;365(8):725-33)的CD19特异性CAR的临床成功得到证实。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续信号(Yvon E等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。

[0007] 用于癌症的CAR治疗的更广泛且有效的适应中的目前挑战与有力靶标的缺乏相关。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CAR表达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,将CD3-ζ和CD28信号单元分离在同一细胞内表达的两种不同CAR构建体中;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且因此需要另一种 CAR首先进行接合以使第二者具有完全活性(Lanitis E等Cancer Immunol Res.2013;1(1):43-53;Kloss CC等Nat Biotechnol.2013;31(1):71-5)。产生基于单scFv的CAR作为免疫治疗剂的第二挑战是肿瘤细胞异质性。至少一个团队已经开发了用于胶质母细胞瘤的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的结果(Hegde M等Mol Ther.2013;21(11):2087-101)。

[0008] 基于T细胞的免疫治疗已经成为合成生物学中的新前沿;预见多种启动子和基因产物将这些高度有效的细胞引导到肿瘤微环境,在此T细胞不但可以避开负调节信号而且还可以介导有效的肿瘤杀伤。通过用AP1903 进行诱导型胱天蛋白酶9构建体的药物诱导二聚化来消除不期望的T细胞表明其中可以在药理学上开启可以控制T细胞群的强大开关的一种方式 (Di Stasi A等N Engl J Med.2011;365(18):1673-83)。通过诱饵受体的表达产生对转化生长因子β的负调节效应具有免疫的效应T细胞群进一步表明可以针对最佳抗肿瘤活性改造效应T细胞的程度(Foster AE等J Immunother.2008;31(5):500-5)。

[0009] 因此,虽然看起来CAR可以以类似于内源性T细胞受体的方式触发 T细胞激活,但是该技术的临床应用的主要障碍迄今为止受限于CAR+T 细胞的体内扩增、输注后细胞的迅速消失和令人失望的临床活性。因此,本领域中迫切且长期需要找到使用可以表现出期望治疗属性而没有前述缺点的CAR的用于癌症治疗的组合物和方法。

[0010] 本发明通过提供可以用于治疗癌症和其他疾病和/或病症的CAR组合物和治疗方法而解决这些需求。特别地,如本文所公开和描述的本发明提供了以下CAR,其在转导T细胞上表现出高表面表达、表现出高度的细胞裂解和转导T细胞体内扩增以及持续性。

[0011] 发明概述

[0012] 本文提供了包含肿瘤坏死因子受体超家族(tumor necrosis factor receptor superfamily,TNFRSF)成员跨膜结构域的新嵌合抗原受体(CAR),以及表达所述受体的宿主细胞(例如T细胞)和编码所述受体的核酸分子。所述CAR在转导T细胞上表现出高表面表达,并且在体内具有高度的细胞裂解以及转导T细胞扩增和持续性。还提供了使用所公开的

CAR、宿主细胞和核酸分子的方法，例如在对象中治疗癌症。

[0013] 在一方面，提供了编码嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子，所述嵌合抗原受体(CAR)从N端到C端包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜TNFRSF结构域和至少一个细胞内信号转导结构域。

[0014] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞外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。

[0015] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞外抗原结合结构域包含与抗原结合的抗体的至少一个重链可变区。

[0016] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的CAR细胞外抗原结合结构域包含至少一个与抗原结合的基于脂质运载蛋白(lipocalin)的抗原结合抗原(anticalin)。

[0017] 在一个实施方案中，提供了分离的核酸分子，其中编码的细胞外抗原结合结构域通过接头结构域与TNFRSF跨膜结构域连接。

[0018] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中在编码的细胞外抗原结合结构域之前是编码前导肽或信号肽的序列。

[0019] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞外抗原结合结构域靶向包括但不限于以下的抗原:CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素(mesothelin)、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR，或其任意组合。

[0020] 在某些实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞外抗原结合结构域包含抗CD19 scFV抗原结合结构域、抗CD20 scFV抗原结合结构域、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c-Met scFV抗原结合结构域、抗PMSA scFV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-2 scFV抗原结合结构域、抗 NY-ESo-1 TCR scFV抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR scFV抗原结合结构域，或其具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的氨基酸序列，或其任意组合。

[0021] 在一方面，本文提供的CAR还包含接头或间隔区结构域。

[0022] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中所述细胞外抗原结合结构域、所述细胞内信号转导结构域或二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

[0023] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的接头结构域来源于CD8的细胞外结构域，并且与跨膜TNFRSF16结构域、跨膜TNFRSF19结构域、或其组合连接。

[0024] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的接头结构域来源于TNFRSF 16或TNFRSF 19的细胞外结构域，并且与跨膜TNFRSF16结构域、跨膜TNFRSF19结构域、或其组合连接。

[0025] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的跨膜TNFRSF结构域包含跨膜TNFRSF16结构域、跨膜TNFRSF19 结构域、或其组合。

[0026] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码TNFRSF16跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:1的序列，或其具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0027] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的TNFRSF16跨膜结构域包含SEQ ID NO:2的序列，或含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的至少1个但不多于10个修饰的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0028] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码TNFRSF19跨膜结构域的核酸序列包含SEQ ID NO:3的序列，或其具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0029] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的TNFRSF19跨膜结构域包含SEQ ID NO:4的序列，或含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的至少1个但不多于10个修饰的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0030] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的CAR还包含以下跨膜结构域，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、CD86、CD134、CD137和CD154，或其组合。

[0031] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞内信号转导结构域还包含CD3ζ细胞内结构域。

[0032] 在一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的细胞内信号转导结构域相对于CD3ζ细胞内结构域布置在C端侧。

[0033] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的至少一个细胞内信号转导结构域包含共刺激结构域、初级信号转导结构域，或其组合。

[0034] 在另一些实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的至少一个共刺激结构域包含以下的功能性信号转导结构域:OX40、 CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、 DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)，或其组合。

[0035] 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，其中前导或信号肽核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0036] 在另一个实施方案中，提供了编码CAR的分离的核酸分子，其中编码的前导序列包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0037] 在一方面，本文提供了嵌合抗原受体(CAR)，其从N端到C端包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜TNFRSF结构域和至少一个细胞内信号转导结构域。

[0038] 在一个实施方案中，提供了CAR，其中所述细胞外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。

[0039] 在另一个实施方案中，提供了CAR，其中所述至少一个跨膜TNFRSF 结构域包含跨膜TNFRSF19结构域、跨膜TNFRSF16结构域，或其组合。

[0040] 在一些实施方案中，提供了CAR，其中所述细胞外抗原结合结构域包含CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂 F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR，或其具有85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的氨基酸序列，或其任意组合。

[0041] 在一个实施方案中，提供了CAR，其中所述细胞外抗原结合结构域包含抗CD19 scFV抗原结合结构域、抗CD20 scFV抗原结合结构域、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c-Met scFV抗原结合结构域、抗PMSA scFV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-2 scFV抗原结合结构域、抗NY-ESo-1 TCR scFV抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR scFV抗原结合结构域，或其具有85％、90％、 95％、96％、97％、98％或99％同一性的氨基酸序列，或其任意组合。

[0042] 在另一个实施方案中，提供了CAR，其中至少一个细胞内信号转导结构域包含共刺激结构域和初级信号转导结构域。

[0043] 在另一个实施方案中，提供了CAR，其中至少一个细胞内信号转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转导结构域：OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)，或其组合。

[0044] 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。在一个实施方案中，该核酸序列编码包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CAR。

[0045] 在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:9的核酸序列。在一个实施方案中，该核酸序列编码包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CAR。

[0046] 在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:21的核酸序列。在一个实施方案中，该核酸序列编码包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CAR。

[0047] 在一方面，本文所公开的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。

[0048] 在一个实施方案中，编码所公开CAR的核酸分子可以包含在载体，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。

[0049] 在某些实施方案中，所述载体还包含启动子，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、自杀型启动子或其任意组合。

[0050] 在另一个实施方案中，表达CAR的载体还可以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消除CAR-T细胞的操纵元件。自杀开关可以包括例如凋亡诱导性信号转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的载体还可以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)。

[0051] 在另一方面，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，

所述宿主细胞是T细胞，例如从对象获得的原代T细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞是CD8+T细胞。

[0052] 在另一方面，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细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列，其中所述 CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜TNFRSF结构域和至少一个细胞内信号转导结构域，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(例如慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia,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(non-Hodgkin′s lymphoma)或霍奇金淋巴瘤(Hodgkin′s lymphoma))或多发性骨髓瘤，或其组合。

[0053] 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 TNFRSF结构域包含跨膜TNFRSF16结构域、跨膜TNFRSF19结构域或其组合。

[0054] 在另一个实施方案中，提供了药物组合物，其中人癌症包括成体癌 (adult carcinoma)，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、软组织癌症、皮肤癌(黑素瘤、基底细胞和鳞状细胞癌)、儿科肿瘤(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、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。

[0055] 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。所述癌症包括造血性癌症，骨髓增生异常综合征胰腺癌，头颈癌，皮肤肿瘤，以下中的微小残留病(minimal residual disease, MRD)：急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(acute myeloid leukemia,AML)、成体B细胞恶性肿瘤(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))、儿科B 细胞恶性肿瘤(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))、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。

[0056] 在另一方面，提供了制备包含CAR的T细胞(下文中“CAR-T细胞”) 的方法。该方法包括用编码与抗原特异性结合的所公开CAR的载体或核酸分子转导T细胞，从而制备CAR-T细胞。

[0057] 在另一方面，提供了产生经RNA改造细胞群的方法，其包括将编码所公开CAR的核酸分子的体外转录RNA或合成RNA引入对象的细胞内，从而产生CAR细胞。

[0058] 在另一个实施方案中，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经编码所公开CAR的载体或核酸分子转导的T细胞。

[0059] 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一种或更多种所公开的CAR。该方法包括在以下条件下向对象施用治疗有效量表达与前述一种或更多种抗原特异性结合的所公开CAR的宿主细胞，所述条件足以在所述对象中形成CAR上抗原结合结构域与

前述一种或更多种抗原的细胞外结构域的免疫复合物。

[0060] 在另一个实施方案中，提供了用于治疗患有与肿瘤抗原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包含至少一个细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TNFRSF结构域、至少一个细胞内信号转导结构域，并且其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

[0061] 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包含至少一个细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TNFRSF结构域、至少一个细胞内信号转导结构域，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TNFRSF结构域包含跨膜TNFRSF16结构域、跨膜 TNFRSF19结构域或其组合。

[0062] 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被遗传改造成表达CAR的T细胞，其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜TNFRSF结构域和至少一个细胞内信号转导结构域，其中在施用后，所述持续性经遗传改造T细胞群或所述T细胞的子代群在人中持续存在至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、 6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、2年或3 年。

[0063] 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。

[0064] 在本文所述的所有方法的方面和实施方案中，与肿瘤抗原表达升高相关的任何前述癌症、疾病、障碍或病症都可以使用本文所公开的一种或更多种CAR来治疗或预防或改善。

[0065] 在另一方面，提供了用于制备如上所述的嵌合抗原受体T细胞或用于如上所述在对象中预防、治疗或改善任何与肿瘤抗原表达升高相关的癌症、疾病、障碍或病症的药盒(kit)，其包含容器和用于使用所述药盒的说明书，所述容器包含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。

[0066] 可以理解，CAR、宿主细胞、核酸和方法在本文详细描述的特定方面和实施方案之外也是可用的。本公开内容的前述特征和优点将从以下详细描述中变得更明显，该详细描述通过参照附图来进行。

[0067] 附图简述

[0068] 图1示出了嵌合抗原受体(CAR)的示意图。CAR包含抗原结合结构域、连接结构域、跨膜结构域和细胞内信号转导结构域。

[0069] 图2示出了TNFRSF16和TNFRSF19中的某些跨膜氨基酸基序。还示出了CD8、CD4、TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜氨基酸序列。九个明显特征在图2的上部突出显示。每个都是由人基因组在跨膜质膜蛋白的情况下编码的氨基酸。本文所用的氨基酸缩写遵循IUPAC-IUB联合生化命名委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature，JCBN)。

[0070] 图3示出了数种嵌合抗原受体(CAR)。CAR的通用方案从N端到C 端包括信号肽、抗CD19 scFv/FMC63、细胞外接头、跨膜、4-1BB、CD3ζ，其中加粗文本表示连接结构域的克隆位

点。图3A示出了表达包含 SP-CD19结合剂-CD8连接-CD8tm-信号转导的CAR(LTG1494)的慢病毒载体。图3B示出了表达包含SP-CD19结合剂-CD8连接-CD8tm-信号的 CAR(重改造的LTI)(LTG1538)的慢病毒载体。图3C示出了表达包含 SP-CD19结合剂-CD8连接-CD4tm-信号的CAR(LTG1562)的慢病毒载体。图3D示出了表达包含SP-CD19结合剂-CD8连接-TNFRSF19tm-信号的CAR(LTG1563)的慢病毒载体。图3E示出了表达包含SP-CD19结合剂-TNFRSF19连接-TNFRSF19tm-信号的CAR(LTG1564)的慢病毒载体。

[0071] 图4示出了具有新跨膜序列的CAR的一般结构域结构的示意图。示出了一系列使用抗CD19抗体FMC63(结合结构域A)的独特CAR。结合结构域与CD8接头和CD8跨膜结构域(CAR形式)(A)、CD4(B)、TNFRSF19(C)跨膜结构域,或与TNFRSF19接头和跨膜结构域(D)连接。

[0072] 图5示出了包含FMC63来源抗CD19结合基序、4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和TNFRSF跨膜结构域的CAR的抗肿瘤活性。未经转导的扩增T细胞(模拟,空心菱形)或经表达对照蛋白的LV转导的T细胞 (LNGFR,LTG,空心三角形)用作对照。以CD8来源接头和CD8跨膜结构域为特征的CAR-T(LTG1494,实心圆圈)在列于x轴的效应物/靶标(E:T)比例下显示出强裂解活性。表达CD8接头和CD4跨膜(LTG1562,空心方形)或TNFRSF19接头和跨膜结构域的CAR-T二者也都显示出可观的裂解活性(LTG1564,星形)。测试了表达CD8接头和TNFRSF19跨膜区的CAR-T(LTG1563,空心圆圈),并且其展现出非常强的裂解活性。

[0073] 图6示出了新接头和跨膜结构域CAR19构建体的图。设计了6种并入新接头和跨膜结构域元件的CAR19构建体以确定改变CAR T接头和跨膜结构域组成是否改变CAR-T功能,所述构建体称为1562、1563、1564 以及1712、1713和1714。构建体1494表示由FMC63 scFv结合结构域、CD8接头、CD8跨膜结构域、CD137/4-1BB和CD3ζ信号转导结构域构成的CAR19结构,并且用作阳性对照。“transM”是指跨膜结构域。“TruncT19”是指与存在于构建体1564中的延长形式相比的截短TNFRSF19接头。

[0074] 图7示出了如通过A)蛋白L或B)CD19 Fc染色确定的人T细胞中的CAR19表面表达。通过LV转导,六种新CAR19构建体和构建体1494 在人原代T细胞中稳定表达。T细胞表面上的CAR百分比使用以下染色通过流式细胞术确定:用与生物素缀合的蛋白L进行染色,随后与链霉亲和素-PE一起孵育(左列),或用CD19 Fc肽进行染色,随后用与AF647 缀合的F(ab)2抗Fc试剂(在APC通道中检测)进行染色。N.T.(未经转导的T细胞)用作阴性对照。

[0075] 图8示出了显示出体外白血病细胞杀伤活性的新跨膜CAR19。CAR T 细胞的体外杀伤活性通过将CAR T细胞与稳定表达萤火虫萤光素酶的 CD19阳性(Raji)和CD19阴性(293T、K562)肿瘤细胞系以所示E:T 比例(x轴)共培养来进行评价。在孵育过夜后,裂解细胞并量化来自存活细胞的活肿瘤发光。条表示平均值+SD。

[0076] 图9示出了显示出体外肿瘤特异性细胞因子响应的新跨膜CAR19构建体。细胞因子分泌分析对来自用Raji肿瘤细胞以E:T比例10:1攻击过夜的CAR T的上清液进行。上清液中的细胞因子通过MACSPlex阵列测量(Miltenyi Biotec)。条表示两个重复的平均值+SD。统计学分析用 GraphPad Prizm软件进行。样品平均值通过单因素ANOVA与Dunnett事后检验进行比较,*p＜0.05,**p＜0.01,***p＜0.001,****p＜0.0001。

[0077] 图10示出了在NSG小鼠中有效地消除已建立的播散性伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)的新跨膜CAR构建体1563。在第0天,向NSG 小鼠接种50万个稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,并在第6天验证肿瘤植入。然后,基于生物发光将小鼠分成组并在第7天经

由尾静脉给予 1000万个CAR T细胞。通过生物发光评价肿瘤负荷直到第32天。在该模型中，构建体1563在Raji肿瘤消除方面比1494更有效。

[0078] 图11A和11B示出了用由不同T细胞供体产生的CAR T细胞重复的体内研究。研究如上图10中进行。图11A:在第0天,向NSG小鼠接种 50万个稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,并在第6天验证肿瘤植入。然后,基于生物发光将小鼠分成组并在第7天经由尾静脉给予1000万个 CAR T细胞。通过生物发光评价肿瘤负荷直到第32天。在该模型中,构建体1563在Raji肿瘤消除方面比1494更有效。图11B:显示经CAR T 细胞处理的小鼠的存活分析的Kaplan Meier图。统计学分析是使用 GraphPad Prism进行的。通过对数秩(Mantel-Cox)检验,存活组与非存活显著不同,*p＜0.05。中值存活:GFP-19天,未处理(N.T.)-20天, 1494-24天。

[0079] 发明详述

[0080] 定义

[0081] 除非上下文明确另外指出,否则本文所用的没有数量词修饰的名词是指一个/种或更多个/种。例如,术语“抗原”包括一种或更多种抗原,并且可以被认为等同于短语“至少一种抗原”。本文所用的术语“包含”意指“包括”。由此,“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”或者“或”。还应理解的是,除非另外指出,否则针对核酸或多肽给出的任何和所有碱基尺寸或氨基酸尺寸,以及所有的分子重量或分子质量值都是近似的,并且是为了描述性目的而提供的。虽然可以使用许多与本文描述的方法和材料类似或等同的方法和材料,但是具体的合适方法和材料在下文进行描述。在冲突的情况下,将以本说明书(包括术语的解释) 为准。另外,材料、方法和实例仅是举例说明性的并非意图进行限制。为便于不同实施方案的综述,提供了以下术语解释:

[0082] 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公开的方法。

[0083] 除非另外指出,否则本文的技术术语是根据常规用法使用的。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等(编辑),The Encyclopedia of Molecular Biology,Blackwell Science Ltd.出版,1994;和Robert A.Meyers (编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995;以及其他类似参考文献。

[0084] 本公开内容提供了具有肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)成员跨膜结构域和/或用于使跨膜结构域与细胞外抗原结合结构域连接的经修饰连接结构域的嵌合抗原受体(CAR)。CAR的功能活性增强与CAR表达T 细胞的功能活性增强直接相关。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CAR表达T细胞的持续性。

[0085] 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以在不同CAR平台之间使用以改造淋巴细胞的功能的必需组分。例如,细胞外结合结构域的选择可以使在其他情况下无效的CAR变得有效。

[0086] 用于建立CAR的细胞外抗原结合结构域的免疫球蛋白来源蛋白质序列的不变构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，细胞内信号转导结构域的选择也可以控制用于免疫治疗的治疗性淋巴细胞群的活性和持久性。这表明，被认为是生物惰性的用于建立CAR的蛋白质结构域的结构和序列组分可以具有完全意想不到的功能效果并且从而影响CAR的治疗潜力。

[0087] 尽管分别通过这些细胞外和细胞内结构域结合靶抗原的能力和向T 细胞传递激活信号的能力是重要的CAR设计方面，但是还变得明显的是， CAR组成中的其他结构域也对CAR的功能和临床效用具有限定作用。

[0088] 令人惊讶且意想不到的是，现在发明人已经发现CAR的跨膜结构域本身以及其与细胞外抗原结合结构域和/或细胞内信号转导结构域连接的方式也决定CAR表达T细胞的功能活性。本文所公开的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，产生大量的细胞因子，并且对表面上具有与CAR结合之抗原的细胞具有高细胞毒活性。

[0089] 以下是对本发明CAR的详细描述，包括对其细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的描述，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的药盒的附加描述。

[0090] A.嵌合抗原受体(CAR)

[0091] 本文所公开的CAR包含至少一个能够与抗原结合的细胞外结构域、至少一个肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)跨膜结构域和至少一个细胞内结构域。

[0092] 嵌合抗原受体(CAR)是包含经由新肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF)成员跨膜结构域与T细胞信号转导结构域连接的抗体之抗原结合结构域(例如单链可变片段(scFv))的人工构建杂合蛋白或多肽。CAR的特征包括其以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性针对选定靶标重定向的能力，和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细胞以独立于抗原加工识别抗原的能力，由此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外，当在T细胞中表达时，CAR有利地不与内源性T细胞受体(TCR)α和β链二聚。

[0093] 如本文所公开的，CAR的细胞内T细胞信号转导结构域可以包含例如T细胞受体信号转导结构域、T细胞共刺激信号转导结构域、或二者。T细胞受体信号转导结构域是指CAR中包含T细胞受体的细胞内结构域的部分，例如如但不限于CD3ζ蛋白的细胞内部分。共刺激信号转导结构域是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分，所述共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。

[0094] 1.细胞外结构域

[0095] 在一个实施方案中，CAR包含靶标特异性结合元件，其另外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的表面的配体的类型和数量。例如，可以选择抗原结合结构域以识别作为靶细胞上与特定疾病状态相关的细胞表面标志物的配体。因此，可以作为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性、细菌性和寄生虫感染、自身免疫病和癌细胞相关的那些。

[0096] 在一个实施方案中，可以通过改造与肿瘤细胞上抗原特异性结合的期望抗原结合结构域来将CAR改造成靶向目的肿瘤抗原。肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的引发免疫应答、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特定

类型。肿瘤抗原在本领域是公知的，并且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-CA IX、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、存活素和端粒酶、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、ephrinB2、CD22、胰岛素生长因子(insulin growth factor，IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。本文所公开的肿瘤抗原仅仅通过示例的方式包括在内。该列表并不意味着是唯一的并且另一些实例对本领域技术人员而言将是明显的。

[0097] 在一个实施方案中，肿瘤抗原包含一个或更多个与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达多种可以作为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GP 100，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组群，例如癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌-胚胎抗原例如癌胚抗原(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特有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)已经用作使用单克隆抗体的被动免疫治疗的靶标，但成功有限。

[0098] 肿瘤抗原的类型还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对肿瘤细胞而言是独特的并且不会出现在体内的其他细胞上。TAA对肿瘤细胞而言不是独特的并且作为替代还在不能诱导针对抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可以在使免疫系统能够对抗原作出响应的条件下发生。TAA可以是在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原，此时免疫系统是未成熟的并且不能作出响应，或者TAA可以是在正常情况下以极低水平存在于正常细胞上但在肿瘤细胞上以高得多水平表达的抗原。

[0099] TSA或TAA的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和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；由染色体易位产生的独特肿瘤抗原，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以及人乳头瘤病毒(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、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、β-联蛋白、CDK4、Mum-1、p15、p 16、 43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、β-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、 CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、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。

[0100] 在一个优选实施方案中，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、间皮素、CD33、c-Met、 PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR 等。

[0101] 根据待靶向的期望抗原,CAR可以被改造成包含对期望抗原靶标具有特异性的合适抗原结合结构域。例如,如果CD19是待靶向的期望抗原,则可以使用针对CD19的抗体作为抗原结合结构域并入CAR中。

[0102] 在一个示例性实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分靶向CD19。优选地,CAR中的抗原结合结构域是抗CD19 scFV,其中抗CD19 scFV 的核酸序列包含SEQ ID NO:27所示的序列。在一个实施方案中,抗CD19 scFV包含编码SEQ ID NO:28的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CAR的抗CD19 scFV部分包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

[0103] 在本发明的一方面,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、呼吸道合胞体病毒、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。

[0104] 在本发明的另一方面,提供了能够与来源于以下细菌菌株的抗原结合的CAR:葡萄球菌属(Staphylococci)、链球菌属(Streptococcus)、大肠杆菌(Escherichia coli)、假单胞菌属(Pseudomonas)或沙门氏菌属 (Salmonella)。特别地,提供了能够与来源于例如以下的感染性细菌的抗原结合的CAR:幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophilia)、分枝杆菌属(Mycobacteria sp.)的细菌菌株(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)、淋病奈瑟氏球菌 (Neisseria gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitides)、单核细胞增生李斯特氏菌(Listeria monocytogenes)、酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)、A类链球菌(Group A Streptococcus)、B类链球菌(Group B Streptococcus)(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。

[0105] 2.跨膜结构域

[0106] 关于跨膜结构域,CAR包含一个或更多个与CAR的细胞外结构域融合的TNFRSF跨膜结构域。

[0107] 在一个实施方案中,TNFRSF跨膜结构域包含至少一个TNFRSF16 跨膜结构域、至少一个TNFRSF19跨膜结构域、或其组合。在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中编码的TNFRSF跨膜结构域包含 TNFRSF16跨膜结构域、TNFRSF19跨膜结构域、或其组合。

[0108] 在一个实施方案中,编码TNFRSF16跨膜结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列,或其具有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,其中编码的TNFRSF16跨膜结构域包含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。

[0109] 在另一个实施方案中，编码TNFRSF19跨膜结构域的分离的核酸分子包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列，或其具有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，其中编码的TNFRSF19跨膜结构域包含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。

[0110] 如本文实施例1所示，TNFRSF16和TNFRSF19中的某些重要跨膜氨基酸基序在示出了CD8、CD4、TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜氨基酸序列的图2中示出。九个明显特征在上部中突出显示。每个都是由人基因组在跨膜质膜蛋白的情况下编码的氨基酸。本文所用的氨基酸缩写遵循 IUPAC-IUB联合生化命名委员会(JCBN)。特征在两个分组中表示。在特征1、2和3中，氨基酸由在前10个跨膜残基中的I、A或L构成。特征 2与特征1相邻或从特征1移动一个氨基酸并且是A或I。特征3是L或 V并且与特征2相隔一个氨基酸。第二特征组开始于与特征3相隔至少5 个但不超过10个氨基酸处。特征4、5和6是由L或V构成的三个氨基酸的连续串。特征7与特征6相隔一个氨基酸并且仅由L构成。特征8与特征7相邻并且由V或L构成。在CD4中缺少该特征。特征9与特征8 相邻并且由I或A构成。这些特征的意义是其在细胞的质膜内形成独特的二级结构，允许通过嵌合抗原受体(CAR)的最佳信号转导和后续T细胞激活。

[0111] 在本文所公开CAR的多个实施方案中，通用方案示于图3中并且从 N端到C端包括信号肽或前导肽、抗CD19 scFv/FMC63、细胞外接头、跨膜、4-1BB、CD3ζ，其中加粗文本表示连接结构域的克隆位点。

[0112] 在一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:29的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的CAR[SP-CD19 结合剂-CD8连接-CD8tm-信号转导(LTG1494)(如图3A所示)]。

[0113] 在一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:31的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的CAR [SP-CD19结合剂-CD8连接-CD8tm-信号(重改造的LTI)(LTG1538)(如图3B所示)]。

[0114] 在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:21的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的 CAR[SP-CD19结合剂-CD8连接-CD4tm-信号(LTG1562)(如图3C所示)]。在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:39的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的CAR[SP-CD19 结合剂-CD8连接-CD4tm-信号(LTG1562)(如图3C所示)]。

[0115] 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，并且编码包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CAR[SP-CD19 结合剂-CD8连接-TNFRSF19tm-信号(LTG1563)(如图3D所示)]。在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:40的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CAR[SP-CD19结合剂-CD8连接-TNFRSF19tm-信号(LTG1563)(如图3D所示)]。

[0116] 在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:9的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的CAR[SP- SP-CD19结合剂-TNFRSF19连接-TNFRSF19tm-信号LTG1564(LTG1564) (如图3E所示)]。在另一个实施方案中，编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:41的核酸序列，并且编码包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的

CAR[SP-SP-CD19结合剂-TNFRSF19连接-TNFRSF19tm-信号LTG1564 (LTG1564)(如图3E所示)]。

[0117] 如实施例2和图5分别所示,当建立表达以下CAR的慢病毒载体 (lentiviral vector,LV)并且测试其抗白血病活性时,显示出包含TNFRSF 的CAR的出乎意料的高细胞裂解活性。每种实验性CAR都包含 4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和FMC63来源抗CD19结合基序。Raji白血病细胞系用作细胞裂解测定中的靶标。以CD8来源接头和CD8-跨膜结构域为特征的CAR-T(参见图5,LTG1494,实心圆圈)在列于x轴的效应物/靶标(E:T)比例下显示出强裂解活性。表达CD8接头和CD4跨膜结构域(参见图5,LTG1562,空心方形)或TNFRSF19接头和跨膜结构域的CAR-T二者也都显示出可观的裂解活性(参见图5,LTG1564,星形)。令人惊讶的是,发现在测试包含表达的CD8接头和TNFRSF19跨膜区的 CAR-T时观察到非常强的裂解活性(参见图5,LTG1563,空心圆圈)。

[0118] 预期由于下图2所示保守区中TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜区之间的高氨基酸保守性,当测试表达CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T 时,包含表达的CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T也将显示出非常强的细胞裂解活性。

[0119] 包含TNFRSF跨膜结构域的CAR的表面表达在实施例2中示出并且在表2中总结。每种CAR结构域的表达水平通过使用生物素化蛋白L和链霉亲和素缀合的藻红蛋白(PE)对经LV转导的T细胞进行流式细胞术分析来确定。与表达对照蛋白(LNGFR-mCherry)并且不具有表面表达或细胞裂解活性的LNGFR-mCherry CAR(LTG1541)相比,包含TNFRSF19 跨膜结构域的CAR(LTG1564)显示出高表面表达(参见实施例1、图5 和表2)。

[0120] 还预期由于下图2中所示保守区中TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜结构域区之间的高氨基酸保守性,与LNGFR-mCherry CAR(LTG1541) 对照相比,当测试表达CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T时,包含表达的CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T也将显示出高表面表达。

[0121] 不期望限于任何特定作用机理,认为与本发明的示例性CAR相关的治疗功能增强的可能原因包括例如但不限于:a)在质膜内的横向运动改善,从而允许更有效的信号转导;b)在质膜微结构域(例如脂筏)内的定位优异,以及与和T细胞激活相关的跨膜信号转导级联反应相互作用的能力更大;c)通过优先移动远离抑制性或下调性相互作用(例如与磷酸酶例如CD45的接近性或相互作用较低)而在质膜内定位优异;以及d) 向T细胞受体信号转导复合物(即免疫突触)的组装优异;或其任意组合。

[0122] 尽管本公开内容已用TNFRSF16和TNFRSF19作为示例性跨膜结构域进行举例说明,但是在肿瘤坏死因子受体超家族内的其他成员也可以用于获得用于本文所述CAR的TNFRSF跨膜结构域和/或接头或间隔区结构域。下表1示出了在肿瘤坏死因子受体超家族内的一些成员。

[0123] 表1.肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)

[0124]

批准符号	批准名称	先前符号	同义词	染色体
EDAR	外异蛋白A受体(ectodysplasin A receptor)	ED3, DL	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R	2q13
TNFRSF1A	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 1A	TNFR1	TNF-R, TNFAR, TNFR60, TNF-R-I, CD120a, TNF-R55	12p13.2
TNFRSF1B	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 1B	TNFR2	TNFBR, TNFR80, TNF-R75, TNF-R-II, p75, CD120b	1p36.22
LTBR	淋巴毒素β受体(TNFR超家族，成员 3)	D12S370	TNF-R-III, TNFCR, TNFRSF3, TNFR2-RP, TNFR-RP	12p13
TNFRSF4	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 4	TXGP1L	ACT35, OX40, CD134	1p36
CD40	CD40分子，TNF受体超家族成员 5	TNFRSF5	p50, Bp50	20q12-q13.2

[0125]

FAS	Fas细胞表面死亡受体	APT1, FAS1,TNFRSF6	CD95. APO-1	10q24.1
TNFRSF6B	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 6b，诱饵		DcR3, DCR3, TR6, M68	20q13.33
CD27	CD27分子	TNFRSF7	S152, Tp55	12p13
TNFRSF8	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 8	CD30, D1S166E	KI-1	1p36
TNFRSF9	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 9	ILA	CD137, 4-1BB	1p36
TNFRSF10A	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 10a		DR4, Apo2, TRAILR-1, CD261	8p21
TNFRSF10B	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 10b		DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB, CD262	8p22-p21
TNFRSF10C	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 10c，没有细胞内结构域的诱饵		DcR1, TRAILR3, LIT. TRID, CD263	8p22-p21

[0126]

TNFRSF10D	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 10d，具有截短的死亡结构域的诱饵		DcR2, TRUNDD, TRAILR4, CD264	8p21
TNFRSF11A	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 11a，NFKB 激活剂	PDB2, LOH18CR1	RANK, CD265, FEO	18q22.1
TNFRSF11B	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 11b	OPG	OCIF, TR1	8q24
TNFRSF12A	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 12A		FN14, TweakR, CD266	16p13.3
TNFRSF13B	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 13B		TACI, CD267, IGAD2	17p11.2
TNFRSF13C	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 13C		BAFFR, CD268	22q13.1-q13.3
TNFRSF14	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 14		HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA, CD270	1p36.32

[0127]

NGFR	神经生长因子受体		TNFRSF16, p75NTR, CD271	17q21-q22
TNFRSF17	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 17	BCMA	BCM, CD269, TNFRSF13A	16p13.1
TNFRSF18	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 18		AITR, GITR, CD357	1p36.3
TNFRSF19	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 19		TAJ-α , TROY, TAJ, TRADE	13q12.11-q12.3
RELT	RELT肿瘤坏死因子受体	TNFRSF19L	FLJ14993	11q13.2
TNFRSF21	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 21		DR6, CD358	6p21.1
TNFRSF25	肿瘤坏死因子受体超家族，成员 25	TNFRSF12	DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3	1p36.2
EDA2R	外异蛋白A2受体		XEDAR, EDAA2R, EDA-A2R, TNFRSF27	Xq11.1
EDAR	外异蛋白A受体	ED3, DL	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R	2q13

[0128] 上表1中所示的数据是在HGNC数据库、HUGO基因命名委员会 (HUGO Gene Nomenclature Committee,HGNC)、EMBL外围站-Hinxton, European Bioinformatics Institute,Wellcome Trust Genome Campus,Hinxton, Cambridgeshire,CB10 1SD, UKwww.genenames.org[Gray KA,Yates B,Seal RL,Wright MW,Bruford EA.genenames.org:the HGNC resources in 2015. Nucleic Acids Res.2015年1月;43

(数据库期号):D1079-85.doi: 10.1093/nar/gku1071.PMID:25361968]的许可下使用的。

[0129] 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CD8的细胞外结构域,并且与跨膜TNFRSF16结构域、跨膜 TNFRSF19结构域、或其组合连接。

[0130] 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TNFRSF 16或TNFRSF 19的细胞外结构域,并且与TNFRSF16跨膜结构域、TNFRSF19跨膜结构域、或其组合连接。

[0131] 在一个实施方案中,除上述新TNFRSF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。

[0132] 在一些情况下,可以对跨膜结构域进行选择或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中其他成员的相互作用最小化。

[0133] 跨膜结构域可以来源于天然或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本发明中具有特定用途的跨膜区可以来源于以下(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、CD33、 CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。可替选地,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一个末端。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)可以在CAR的跨膜结构域和胞质信号转导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0134] 在一个实施方案中,本发明的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:11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:12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:12 的氨基酸序列。

[0135] 在一些情况下,CAR的跨膜结构域包含CD8α铰链结构域。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:13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:14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:14的氨基酸序列。

[0136] 3.间隔区结构域

[0137] 在CAR中,间隔区结构域可以布置在细胞外结构域和TNFRSF跨膜结构域之间,或布置在细胞内结构域和TNFRSF跨膜结构域之间。间隔区结构域意指用于连接TNFRSF跨膜结构域与细胞外结构域和/或TNFRSF 跨膜结构域与细胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔区结构域包含多达 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。

[0138] 在一些实施方案中,接头可以包含间隔区元件,其当存在时增加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加。示例性的间隔区是普通技术人员已知的,并且包括以下中列举的那些:美国专利No.7,964,5667、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,其各自通过引用整体并入本文。

[0139] 间隔区结构域优选地具有促进CAR与抗原结合并增强信号转导到细胞内的序列。预期促进结合的氨基酸的一些实例包括半胱氨酸、带电荷氨基酸以及在潜在糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸，并且这些氨基酸可以被用作构成间隔区结构域的氨基酸。

[0140] 作为间隔区结构域，可以使用为CD8α之铰链区的第118至178号氨基酸(SEQ ID NO:15)(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD8β的第135 至195号氨基酸(GenBank:AAA35664.1)、CD4的第315至396号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)或CD28的第137至152号氨基酸 (NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)的全部或部分。另外，作为间隔区结构域，可以使用抗体H链或L链的恒定区的一部分(CH1区或CL区，例如具有SEQ ID NO.:16所示的氨基酸序列的肽)。另外，间隔区结构域可以是人工合成序列。

[0141] 另外，在CAR中，信号肽序列可以与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。由于上文作为细胞内结构域提及的很多蛋白质分子都具有信号肽序列，因此这些信号肽可以用作CAR的信号肽。在一个实施方案中，信号肽包含SEQ ID NO：6所示的氨基酸序列。

[0142] 4.细胞内结构域

[0143] CAR的胞质结构域或另外的细胞内信号转导结构域负责激活其中已放置CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的特化功能。例如，T细胞的效应功能可以是细胞裂解活性或辅助活性，包括分泌细胞因子。因此，术语“细胞内信号转导结构域”是指转导效应功能信号并指导细胞进行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用整个细胞内信号转导结构域，但是在许多情况下不需要使用整个链。就使用细胞内信号转导结构域的截短部分来说，这样的截短部分可以用于代替完整链，只要其转导效应功能信号即可。术语细胞内信号转导结构域因此意味着包括细胞内信号转导结构域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。

[0144] 用于CAR的细胞内信号转导结构域的一些优选实例包括T细胞受体 (TCR)和协同作用以在抗原受体接合后起始信号转导的共受体的胞质序列，以及具有相同功能能力的这些序列的任何衍生物或变体和任何合成序列。

[0145] 已知通过单独TCR产生的信号不足以完全激活T细胞并且还需要次级或共刺激信号。因此，T细胞激活可以被认为由两种不同种类的胞质信号转导序列介导：通过TCR起始抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号转导序列)和以抗原独立性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些 (次级胞质信号转导序列)。

[0146] 初级胞质信号转导序列以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激性方式起作用的初级胞质信号转导序列可以包含称为免疫受体酪氨酸基激活基序或ITAM的信号转导基序。

[0147] 特别用于本文所公开CAR的包含ITAM的初级胞质信号转导序列的一些实例包括来源于TCRζ(CD3ζ)、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD38、CD3ε、 CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。ITAM的具体非限制性实例包括具有以下序列的肽：CD3ζ的第51至164号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--932170.1)、FcεRIγ的第45至86号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--004097.1)、FcεRIβ的第201至244号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--000130.1)、CD3γ的第139至182号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--000064.1)、CD3δ的第128至171号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--000723.1)、CD3ε的第153至207号氨基酸(NCBI RefSeq：

NP.sub.--000724.1)、CD5的第402至495号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--055022.2)、0022的第707至847号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--001762.2)、CD79a的第166至226号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--001774.1)、CD79b的第182至229号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--000617.1)和CD66d的第177至252号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--001806.2)，以及其与这些肽具有相同功能的变体。本文所述的基于NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编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中的胞质信号转导分子包含来源于CD3ζ的胞质信号转导序列。

[0148] 在一个优选实施方案中，CAR的细胞内结构域可以被设计成包含单独或与任何其他可用于CAR背景的期望胞质结构域组合的CD3-ζ信号转导结构域。例如，CAR的细胞内结构域可以包含CD3ζ链部分和共刺激信号转导区。共刺激信号转导区是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。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(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具体非限制性实例包括具有以下序列的肽：CD2的第236至351号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--001758.2)、CD4的第421至458号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--000607.1)、CD5的第402至495号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--055022.2)、CD8α的第207至235号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--001759.3)、CD83的第196至210号氨基酸(GenBank：AAA35664.1)、CD28的第181至220号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--006130.1)、CD137的第214至255号氨基酸(4-1BB，NCBI RefSeq：NP.sub.--001552.2)、CD134的第241至277号氨基酸(OX40，NCBI RefSeq：NP.sub.--003318.1)和ICOS的第166至199号氨基酸(NCBI RefSeq：NP.sub.--036224.1)，以及其与这些肽具有相同功能的变体。因此，尽管本文的公开内容主要用4-1BB作为共刺激信号转导元件来举例说明，但是其他共刺激元件也在本公开内容的范围内。

[0149] CAR的胞质信号转导部分内的胞质信号转导序列可以以随机或特定顺序彼此连接。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)可以形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0150] 在一个实施方案中，细胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号转导结构域和CD28的信号转导结构域。在另一个实施方案中，细胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号转导结构域和4-1BB的信号转导结构域。在另一个实施方案中，细胞内结构域被设计成包含CD3-ζ的信号转导结构域以及CD28和4-1BB的信号转导结构域。

[0151] 在一个实施方案中，CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域和CD3-ζ的信号转导结构域，其中4-1BB的信号转导结构域包含SEQ ID NO:17所示的核酸序列并且CD3-ζ的信号转导结构域包含SEQ ID NO:19所示的核酸序列。

[0152] 在一个实施方案中，CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域和CD3-ζ的信号转导结构域，其中4-1BB的信号转导结构域包含编码SEQ ID NO:18的氨基酸序列的核酸序列并且CD3-ζ的信号转导结构域包含编码SEQ ID NO:20的氨基酸序列的核酸序列。

[0153] 在一个实施方案中，CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号转导结构域

和CD3-ζ的信号转导结构域，其中4-1BB的信号转导结构域包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列并且CD3-ζ的信号转导结构域包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0154] 5.CAR的附加描述

[0155] 还明确地包括在本发明的范围内的是本文所公开的CAR的功能性部分。当参考CAR使用时，术语“功能性部分”是指本文所公开的一种或更多种CAR的以下任何部分或片段，所述部分或片段保留CAR(所述部分或片段为其一部分)(亲本CAR)的生物活性。功能性部分涵盖例如CAR 的以下那些部分，其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的能力。参考亲本 CAR，功能性部分可以包含例如亲本CAR的约10％、25％、30％、50％、 68％、80％、90％、95％或更多。

[0156] 功能性部分可以在该部分的氨基或羧基末端或在两端包含另外的氨基酸，所述另外的氨基酸在亲本CAR的氨基酸序列中不存在。合乎期望地，另外的氨基酸不干扰功能性部分的生物功能，例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更合乎期望地，与亲本CAR的生物活性相比，另外的氨基酸增强生物活性。

[0157] 包括在本公开内容的范围内的是本文所公开CAR的功能性变体。本文所用的术语“功能性变体”是指与亲本CAR具有明显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CAR(所述功能性变体为其变体)的生物活性。功能性变体涵盖例如本文所述CAR(亲本CAR)的以下那些变体，其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞的能力。参考亲本CAR，功能性变体可以例如与亲本CAR在氨基酸序列方面具有至少约30％、50％、75％、 80％、90％、98％或更高同一性。

[0158] 功能性变体可以例如包含具有至少一个保守性氨基酸替换的亲本 CAR的氨基酸序列。作为替代或补充，功能性变体可以包含具有至少一个非保守性氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下，非保守性氨基酸替换优选地不干扰或抑制功能性变体的生物活性。非保守性氨基酸替换可以增强功能性变体的生物活性，使得与亲本CAR相比，功能性变体的生物活性提高。

[0159] CAR的氨基酸替换优选地是保守性氨基酸替换。保守性氨基酸替换是本领域已知的，并且包括其中将一个具有特定物理和/或化学特性的氨基酸交换为另一个具有相同或相似化学或物理特性的氨基酸的氨基酸替换。例如，保守性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氨基酸替换另一个具有极性侧链的不带电荷氨基酸(例如 Asn、Gin、Ser、Thr、Tyr等)、具有β支化侧链的氨基酸替换另一个具有β支化侧链的氨基酸(例如He、Thr和Val)、具有芳香族侧链的氨基酸替换另一个具有芳香族侧链的氨基酸(例如His、Phe、Trp和Tyr)，等等。

[0160] CAR可以基本上由本文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活性。

[0161] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以具有任意长度，即可以包含任意数目的氨基酸，只要CAR(或其功能性部分或功能性变体)保留其生物活性，例如与抗原特异性结合、在哺乳动物中检测患病细胞或在哺乳动物中治疗或预防疾病等的能力即可。例如，CAR

可以为约50至约5000 个氨基酸长，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。

[0162] CAR(包括本发明的功能性部分和功能性变体)可以包含取代一个或更多个天然存在氨基酸的合成氨基酸。这样的合成氨基酸是本领域已知的，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-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、β-苯基丝氨酸、β-羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、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、氨基丙二酸一酰胺、N′-苄基-N′-甲基-赖氨酸、N′,N′-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、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-降冰片烷)-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。

[0163] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以被糖基化、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/ 或任选地二聚或多聚的，或缀合的。

[0164] CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以通过本领域已知的方法获得。CAR可以通过任何制备多肽或蛋白质的合适方法来制备。从头合成多肽和蛋白质的合适方法在例如以下的参考文献中描述:Chan等，Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis，Oxford University Press，Oxford，United Kingdom，2000;Peptide and Protein Drug Analysis，编辑.Reid，R.，Marcel Dekker，Inc.，2000;Epitope Mapping，编辑.Westwood等，Oxford University Press，Oxford，United Kingdom，2001;以及美国专利5,449,752。另外，可以使用本文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等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第三版，Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，NY 2001;和Ausubel等，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) 可以从例如植物、细菌、昆虫、哺乳动物如大鼠、人等的来源分离和/或纯化。分离和纯化的方法是本领域公知的。作为替代，本文所述的CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以由公司商业化合成。在这方面， CAR可以是合成的、重组的、分离的和/或经纯化的。

[0165] B.抗体和抗原结合片段

[0166] 一个实施方案还提供了与本文所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。本文所用的“表达CAR的T细胞”或“CAR T细胞”意指表达CAR的T细胞，并且具有由例如CAR的抗体来源靶向结构域决定的抗原特异性。

[0167] 本文所用的“抗原结合结构域”可以包括抗体及其抗原结合片段。术语“抗体”在本文以最广义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，只要其展现出所需的抗原结合活性即可。抗体的非限制性实例包括例如完整的免疫球蛋白及其本领域已知的保留对抗原的结合亲和力的变体和片段。

[0168] “单克隆抗体”是从基本上均一的抗体的群体中获得的抗体，即除可能少量存在的可能天然存在突变之外，构成该群体的单独抗体是相同的。单克隆抗体是高特异性的，定向

针对单一抗原表位。修饰语“单克隆的”表示抗体从基本上均一的抗体群获得的特征，并且不被解释为要求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由其中已转染编码单一抗体的抗体轻链可变区和重链可变区(或其抗原结合片段)的核酸的细胞或其子代产生的抗体。在一些实例中，单克隆抗体从对象分离。单克隆抗体可以具有基本上对抗原结合或其他免疫球蛋白功能没有影响的保守性氨基酸替换。产生单克隆抗体的示例性方法是已知的，例如参见Harlow&Lane，Antibodies，A Laboratory Manual，第二版.Cold Spring Harbor Publications，New York(2013)。

[0169] 通常，免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因，以及无数免疫球蛋白可变结构域基因。存在两种轻链类型：lambda(λ)和kappa(κ)。存在五种主要的决定抗体分子的功能活性的重链种类(或同种型)：IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0170] 每条重链和轻链都包含恒定区(或恒定结构域)和可变区(或可变结构域；参见例如Kindt等，Kuby Immunology，第6补充版，W.H.Freeman and Co.，第91页(2007).)在一些实施方案中，重链和轻链可变区组合以与抗原特异性结合。在另一些实施方案中，仅需要重链可变区。例如，由仅重链组成的天然存在骆驼抗体在不存在轻链的情况下具有功能性且稳定(参见例如Hamers-Casterman等，Nature，363：446-448，1993；Sheriff等，Nat.Struct.Biol.，3：733-736，1996)。对“VH”的提及或“VH”是指抗体重链的可变区，包括例如Fv、scFv、dsFv或Fab的抗原结合片段的可变区。对“VL”的提及或“VL”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。

[0171] 轻链和重链可变区包含被三个还称作“互补性决定区”或“CDR”的高变区中断的“框架”区(参见例如Kabat等，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相对保守。抗体的框架区(即组成轻链和重链的组合框架区)用于在三维空间中定位和排列CDR。

[0172] CDR主要负责与抗原表位的结合。给定CDR的氨基酸序列边界可以使用许多公知方案中的任一种来容易地确定，所述方案包括由以下描述的那些：Kabat等(“Sequences of Proteins of Immunological Interest，”第五版. Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991；“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani等(JMB 273，927-948，1997；“Chothia”编号方案)和Lefranc等(“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains，”Dev. Comp.Immunol.，27：55-77，2003；“IMGT”编号方案)。每条链的CDR通常是指CDR1、CDR2和CDR3(从N端到C端)，并且还通常由特定CDR 所在的链鉴定。因此，VH CDR3是来自发现其的抗体的重链可变结构域的CDR3，而VL CDR1是来自发现其的抗体的轻链可变结构域的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。

[0173] “抗原结合片段”是全长抗体中保留特异性识别同源抗原的能力的部分，以及这样的部分的多种组合。抗原结合片段的非限制性实例包括Fv、Fab、Fab′、Fab′-SH、F(ab′)2；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如 scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段包括通过整个抗体的修饰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,第二版,Springer Press,2010)。

[0174] 单链抗体(scFv)是包含通过合适多肽接头连接为遗传融合单链分子的一种或更多种抗体的VH和VL结构域的经遗传改造分子(参见例如Bird 等,Science,242:423426,1988;Huston等,Proc.Natl.Acad.Sci.,85:5879 5883,1988;Ahmad等,Clin.Dev.Immunol.,2012,doi:10.1155/2012/980250; Marbry,IDrugs,13:543-549,2010)。scFv中VH结构域和VL结构域的分子内定向对于scFv通常不是决定性的。因此,可以使用具有两种可能布置的scFv(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)。

[0175] 在dsFv中,重链和轻链可变链已经被突变以引入二硫键从而使链的缔合稳定。还包括双抗体,其是以下二价双特异性抗体,其中VH和VL 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短以致不能允许在同一链上的两个结构域之间进行配对的接头,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等,Proc.Natl.Acad.Sci., 90:64446448,1993;Poljak等,Structure,2:11211123,1994)。

[0176] 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,第三版,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0177] 非天然存在抗体可以使用固相肽合成来构建,可以重组产生,或者可以例如通过筛选由可变重链和可变轻链组成的组合文库来获得,如Huse 等,Science 246:1275-1281(1989)所述,其通过引用并入本文。这些和其他制备例如嵌合抗体、人源化抗体、CDR接枝抗体、单链抗体和双功能性抗体的方法是本领域技术人员公知的(Winter和Harris,Immunol.Today 14:243-246(1993);Ward等,Nature 341:544-546(1989);Harlow和Lane,同上,1988;Hilyard等,Protein Engineering:A practical approach(IRL Press 1992);Borrabeck,Antibody Engineering,第二版.(Oxford University Press 1995);其各自通过引用并入本文)。

[0178] “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%或更多的抗体以及相反,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,并且本文提供了示例性的竞争测定。

[0179] “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、大鼠或合成的)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作“供体”,并且提供框架的人抗体或抗原结合片段被称作“接受者”。在一个实施方案中,在人源化免疫球蛋白中所有CDR都来自供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在,但如果其存在的话,其可以基本上与人免疫球蛋白恒定区相同,例如同一性为至少约85%至 90%,例如约95%或更高。因此,人源化抗体或抗原结合片段的所有部分 (除可能地CDR之外)都基本上与天然人抗体序列的对应部分相同。

[0180] “嵌合抗体”是包含来源于两种不同抗体的序列的抗体,所述两种不同抗体通常是不同物种的。在一些实例中,嵌合抗体包含一个或更多个来自一种人抗体的CDR和/或框架区和来自另一种人抗体的CDR和/或框架区。

[0181] “完全人抗体”或“人抗体”是包含来自(或来源于)人基因组的序列,并且不包含来

自另一物种的序列的抗体。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(如果存在的话)Fc区。人抗体可以使用基于来源于人基因组的序列产生抗体的技术，例如通过噬菌体展示或使用转基因动物来鉴定和分离(参见例如Barbas等Phage display:A Laboratory Manuel.第一版New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2004.印刷;Lonberg,Nat.Biotech.,23:1117-1125,2005; Lonenberg,Curr.Opin.Immunol.,20:450-459,2008)。

[0182] 抗体可以具有一个或更多个结合位点。如果有多于一个结合位点，则结合位点可以彼此相同或可以是不同的。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性抗体具有两个不同的结合位点。

[0183] 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等，同下，美国专利申请出版物No.2002/0197266 A1和美国专利No.7,338,929)。

[0184] 另外，CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可以包含可检测标记，例如如放射性同位素、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(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)。

[0185] C.缀合物

[0186] 对本文所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以使用本领域技术人员已知的任意数量方法与例如效应分子或可检测标志物的试剂缀合。共价和非共价连接方法二者都可以使用。缀合物包括但不限于其中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与本文所公开的一种或更多种抗原特异性结合。本领域技术人员将理解可以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)以及其他标记、靶部分和配体等。

[0187] 特定效应分子或可检测标志物的选择取决于特定靶分子或细胞，以及期望的生物作用。因此，例如效应分子可以是用于致使特定靶细胞(例如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。

[0188] 用于使效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段连接的操作根据效应物的化学结构而改变。多肽通常包含多种可用于与抗体上的合适官能团反应以使效应分子或可检测标志物结合的官能团，例如羧酸基团 (COOH)、游离胺基($-NH_2$)或巯基(-SH)。可替选地，抗体或抗原结合片段是衍生化的以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生化可以涉及连接多种已知接头分子例如可从Pierce Chemical Company,Rockford,IL获得的那些中的任一种。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并且与效应分子或可检测标志物形成共价键。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，接头可以通过其侧基(例如通过与半胱氨酸的二硫键)与组成氨基酸连接或者与末端氨基酸的α碳氨基和羧基基团连接。

[0189] 在一些实施方案中，接头可以包含间隔区元件，其当存在时增加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加。示例性的间隔区是普通

技术人员已知的，并且包括以下中列举的那些：美国专利No.7,964,5667、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，其各自通过引用整体并入本文。

[0190] 在一些实施方案中，接头在细胞内条件下是可切割的，使得在细胞内环境中接头的切割从抗体或抗原结合片段释放效应分子或可检测标志物。在另一些实施方案中，接头是不可切割的并且效应分子或可检测标志物例如通过抗体降解来释放。在一些实施方案中，接头可被存在于细胞内环境 (例如在溶酶体或内体或小窝(caveolea)内)的切割剂切割。接头可以是例如被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽接头。在一些实施方案中，肽接头为至少2个氨基酸长或至少3个氨基酸长。然而，接头可以为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。蛋白酶可以包括组织蛋白酶B和组织蛋白酶 D以及纤溶酶，已知其所有都水解二肽药物衍生物使得活性药物在靶细胞内释放(参见例如Dubowchik和Walker，1999，Pharm.Therapeutics 83:67-123)。例如，可以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。在一个具体实施方案中，可被细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No. 6,214,345，其描述了使用缬氨酸-瓜氨酸接头的多柔比星合成)。

[0191] 在另一些实施方案中，可切割接头是pH敏感性的，即在特定pH值下对水解敏感。通常，pH敏感性接头在酸性条件下是可水解的。例如，可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(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和Walker，1999，Pharm.Therapeutics 83:67-123；Neville等，1989，Biol.Chem.264:14653-14661.)这样的接头在中性pH条件(例如血液中的那些)下是相对稳定的，但在低于pH 5.5或pH 5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施方案中，可水解的接头是硫醚接头(例如如经由酰腙键与治疗剂连接的硫醚)(参见例如美国专利No.5,622,929)。

[0192] 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)。各种二硫化物接头是本领域已知的，其包括例如可以使用以下形成的那些：SATA(N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺-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等，1987，Cancer Res. 47:5924-5931；Wawrzynczak等，In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编辑，Oxford U.Press， 1987)；Phillips等，Cancer Res.68:92809290，2008)。还参见美国专利No. 4,880,935)。

[0193] 在另一些具体实施方案中，接头是丙二酸酯接头(Johnson等，1995， Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等，1995， Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3′-N-酰胺类似物(Lau等，1995， Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0194] 在另一些实施方案中，接头是不可切割的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)。

[0195] 在一些实施方案中，接头在细胞外环境中对切割具有抗性。例如，当缀合物存在于细胞外环境中(例如在血浆中)时，缀合物样品中不超过约 20％、不超过约15％、不超过约10％、不超过约5％、不超过约3％、或不超过约1％的接头被切割。接头在细胞外环境中是否对切割具有抗性可以例如如下确定：将包含目的接头的缀合物与血浆孵育预定时间(例如2小时、4小时、8小时、16小时或24小时)，然后量化存在于血浆中的游离效应分子或可检测标志物的量。可以用于缀合物的不同示例性接头在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。

[0196] 在一些实施方案中，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的缀合物，所述小分子毒素例如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱、多拉司他汀类、奥瑞斯他汀类、单端孢霉烯和CC1065，以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0197] 适合用作美登木素生物碱毒素部分的美登素化合物是本领域公知的，并且可以根据已知方法从天然来源分离，可以使用遗传工程技术产生(参见Yu等(2002)PNAS 99:7968-7973)，或者可以是根据已知方法合成制备的美登醇和美登醇类似物。美登木素生物碱是通过抑制管蛋白聚合来起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)分离(美国专利No.3,896,111)。随后，发现某些微生物也产生美登木素生物碱，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在例如以下中公开：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。包含美登木素生物碱的缀合物、其制备方法以及其治疗用途在例如美国专利No.5,208,020;5,416,064; 6,441,163和欧洲专利EP 0 425 235 B1中公开，其公开内容在此明确地通过引用并入。

[0198] 另外的毒素可以与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(PE)、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素及其亚基、核毒素(ribotoxin)、核糖核酸酶、皂草素和加利车霉素，以及肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素是本领域公知的并且许多可以容易地从商业来源获得(例如Sigma Chemical Company，St.Louis，MO)。预期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)。

[0199] 皂草素是来源于肥皂草(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等，Bio/Technology， 10:405-412,1992)。然而，该毒素不具有特异性进入细胞内的机理，并且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。

[0200] 白喉毒素从白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)分离。通常，用于免疫毒素的白喉毒素是突变的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称为CRM107的突变体自20世纪70 年代以来就为人所知(Laird和Groman，J.Virol.19:220,1976)，并且一直用于人临床试验。参见美国专利No.5,792,458和美国专

利No.5,208,021。

[0201] 蓖麻毒素是来自蓖麻(Ricinus communis)(蓖麻子(Castor bean))的凝集素RCA60。对于蓖麻毒素的一些实例,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链使蓖麻毒素与细胞表面半乳糖残基结合和促进A链转运到细胞溶质内(Olsnes等,Nature 249:627-631,1974和美国专利No.3,060,165)。

[0202] 还曾使核糖核酸酶与靶向分子缀合以用作免疫毒素(参见Suzuki等,Nat.Biotech.17:265-70,1999)。示例性的核毒素例如α-帚曲毒素(α-sarcin) 和局限曲菌素在例如Rathore等,Gene 190:31-5,1997;以及Goyal和Batra, Biochem.345 Pt 2:247-54,2000中讨论。加利车霉素首次从棘孢小单孢菌(Micromonospora echinospora)分离并且是导致凋亡的引起DNA中双链断裂的烯二炔抗肿瘤抗生素家族的成员(参见例如Lee等,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等,Ann.Oncol.11:735-41,2000)。

[0203] 相思豆毒素包括来自相思子(Abrus precatorius)的毒性凝集素。毒性成分相思豆毒素a、b、c和d的分子量为约63kD至67kD并且由两条二硫化物连接的多肽链A和B构成。A链抑制蛋白质合成;B链(相思豆毒素-b)与D-半乳糖残基结合(参见Funatsu等,Agr.Biol.Chem.52:1095, 1988;和Olsnes,Methods Enzymol.50:330-335,1978)。

[0204] 对本文所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、其抗原结合片段还可以与可检测标志物缀合;例如,能够通过以下进行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(例如计算机断层摄影术(CT)、计算机轴向断层摄影术(CAT)扫描、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像NMRI)、磁共振断层摄影术(MTR)、超声、纤维光学检查和腹腔镜检查。可检测标志物的具体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(GFP)、黄色荧光蛋白(YFP)。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与可用于检测的酶缀合,例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶等。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,其可以通过添加被该酶用于产生可辨别的反应产物的另外试剂来检测。例如,当存在试剂辣根过氧化物酶时,过氧化氢和二氨基联苯胺的添加产生在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还可以与生物素缀合,并且通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲和素结合来检测。应注意的是,抗生物素蛋白本身可以与酶或荧光标记缀合。

[0205] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可以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用作标记。抗体还可以与镧系元素(例如铕和镝)和锰缀合。抗体或抗原结合片段还可以用被第二报道子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。

[0206] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与放射性标记的氨基酸缀合。放射性标记可以用于诊断和治疗目的二者，例如，放射性标记可以用于通过x射线、发射谱或其他诊断技术来检测本文所公开的一种或更多种抗原和抗原表达细胞。另外，放射性标记可以在治疗上用作在对象中治疗肿瘤的毒素，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。

[0207] 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，例如放射性标记可以使用胶片或闪烁计数器来检测，荧光标志物可以使用光检测器检测发射的光照进行检测。酶标记通常通过向酶提供底物并检测通过酶在底物上作用产生的反应产物来检测，并且比色标记通过简单地可视化着色标记来检测。

[0208] D.核苷酸、表达、载体和宿主细胞

[0209] 本发明的一个实施方案还提供了包含编码本文所述的任何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。本发明的核酸可以包含编码本文所述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号转导结构域的核苷酸序列。

[0210] 在一些实施方案中，核苷酸序列可以是经密码子修饰的。不受特定理论束缚，认为核苷酸序列的密码子优化提高mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以涉及用另一个密码子替代天然密码子，所述另一个密码子编码相同的氨基酸但可以被更容易在细胞内获得的tRNA翻译，由此提高翻译效率。核苷酸序列的优化还可以减少可能干扰翻译的次级mRNA结构，由此提高翻译效率。

[0211] 在本发明的一个实施方案中，核酸可以包含编码本发明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，核酸可以包含编码本文所述的任何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。

[0212] 本文所用的“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聚合物，其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的)；其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸；并且其可以包含天然的、非天然的或被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，代替在未经修饰寡核苷酸的核苷酸之间发现的磷酸二酯。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。

[0213] 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离的序列片段制备的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成或更常见地通过人工操作分离的核酸片段，例如通过遗传工程技术，例如Sambrook等(同上)中所述的那些来实现。核酸可以使用本领域已知的操作基于化学合成和/或酶促连接反应来构建。参见例如Sambrook等(同上)和Ausubel等(同上)。例如，核酸可以使用天然存在核苷酸或被设计成提高分子的生物稳定性或提高在杂交后形成的二联体的物理稳定性的经不同修饰核苷酸(例如硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸)来化学合成。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-硫代尿苷、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-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5- 甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、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。可替选地,本发明的一种或更多种核酸可以从公司,例如Integrated DNA Technologies(Coralville, IA, USA)购买。

[0214] 核酸可以包含编码任何CAR或其功能性部分或功能性变体的任何分离或经纯化的核苷酸序列。可替选地,核苷酸序列可以包含任何序列的简并核苷酸序列或简并序列的组合。

[0215] 一个实施方案还提供了分离或经纯化的核酸,其包含与本文所述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所述任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0216] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可以在高严格性条件下杂交。“高严格性条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列 (本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格性条件包括可以使具有精确互补序列的多核苷酸或仅包含少数分散错配的多核苷酸与偶然具有几个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。与具有14至17个碱基或更多碱基的全长互补物相比,这样的小互补性区域更容易解链,并且高严格性杂交使其容易可区分。相对高严格性条件可以包括例如低盐和/或高温条件,例如由在约50℃至 70℃的温度下约0.02M至0.1M NaCl或等同物提供的。这样的高严格性条件容许核苷酸序列与模板链或靶标链之间的很少(如果有的话)错配,并且特别地适合于检测任何本发明CAR的表达。通常可以理解的是,通过添加递增量的甲酰胺可以使条件更加严格。

[0217] 还提供了包含以下核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列与本文所述的任何核酸具有至少约70%或更高,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%的同一性。

[0218] 在一个实施方案中,核酸可以并入到重组表达载体中。在这点上,一个实施方案提供了包含任何核酸的重组表达载体。出于本文的目的,术语“重组表达载体”意指以下经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,其当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且使载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时允许宿主细胞表达该mRNA、蛋白质、多肽或肽。载体整体上不是天然存在的。

[0219] 然而,载体的部分可以是天然存在的。重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链的或双链的、合成的或部分从天然来源获得的,并且其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接,或两种类型的连接。优选地,非天然存在或被改变的核苷酸或核苷酸间连接不阻碍载体的转录或复制。

[0220] 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,并且可以用

于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括针对增殖和扩增或针对表达或二者而设计的那些,例如质粒和病毒。载体可以选自 pUC系列(Fermentas Life Sciences,Glen Burnie,MD)、pBluescript系列 (Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX 系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。

[0221] 还可以使用噬菌体载体例如λüTIO、λüTI 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,尤其包括自我失活慢病毒载体,如Milone等, Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)中提供的。可以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。

[0222] 多种转染技术是本领域公知的(参见例如Graham等,Virology,52: 456-467(1973);Sambrook等(同上);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986);以及Chu等,Gene,13:97(1981))。

[0223] 转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见例如Graham等,同上)、直接微注射到培养的细胞内(参见例如Capecchi,Cell,22:479-488(1980))、电穿孔(参见例如Shigekawa等,BioTechniques,6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见例如Mannino等,BioTechniques,6:682-690(1988))、脂质介导的转导(参见例如Feigner等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84: 7413-7417(1987))和使用高速微型射弹的核酸递送(参见例如Klein等, Nature,327:70-73(1987))。

[0224] 在一个实施方案中,重组表达载体可以使用例如Sambrook等(同上) 和Ausubel等(同上)中描述的标准重组DNA技术来制备。环形或线性的表达载体构建体可以制备成包含在原核或真核宿主细胞中具有功能性的复制系统。复制系统可以来源于例如ColEl、2μ质粒、λ、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0225] 重组表达载体可以包含调节序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,所述调节序列对需向其中引入载体的宿主细胞的类型(例如细菌、真菌、植物或动物)具有特异性,这视情况而定并且考虑载体是基于DNA 还是基于RNA。重组表达载体可以包含限制性位点以有利于克隆。

[0226] 重组表达载体可以包含一个或更多个允许选择转化或转染的宿主细胞的标记基因。标记基因包括杀生物剂抗性,例如抗生素、重金属抗性等;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的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西林抗性基因。

[0227] 重组表达载体可以包含与编码CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的核苷酸序列或与与编码CAR之核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作连接的天然或非天然启动子。启动子的选择(例如强的、弱的、诱导型的、组织特异性的和发育特异性的)在技术人员的普通技术之内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技术之内。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。

[0228] 重组表达载体可以被设计用于瞬时表达、用于稳定表达或用于二者。另外，重组表达载体可以被制成用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0229] 此外，重组表达载体可以被制备成包含自杀基因。本文所用的术语“自杀基因”是指引起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，并且当使细胞与试剂接触或暴露于试剂时引起细胞死亡。自杀基因是本领域已知的(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。

[0230] 一个实施方案还提供了包含本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。本文所用的术语“宿主细胞”是指可以包含本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞，例如植物、动物、真菌或藻类，或者可以是原核细胞，例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞，即直接从生物体，例如人分离。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。当宿主细胞可以是任何细胞类型，可以来源于任何类型的组织，并且可以在任何发育阶段时，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。

[0231] 出于本文的目的，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细胞系的T细胞，例如Jurkat、SupT1等，或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得，则T细胞可以从许多来源获得，包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。 T细胞还可以是经富集或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞可以是从人分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以在任何发育阶段，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(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、初始T细胞等。T细胞可以是CD8+T细胞或CD4+T 细胞。

[0232] 在一个实施方案中，本文所述的CAR可以用于合适的非T细胞。这样的细胞是具有免疫效应功能的那些，例如如NK细胞和由多能干细胞产生的T样细胞。

[0233] 一个实施方案还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是异质的群体，其包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞以及至少一种其他细胞，例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如 T细胞)或不同于T细胞的细胞，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。可替选地，细胞群可以是基本上同质的群体，其中该群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本上由其组成)。该群体还可以是克隆细胞群，其中该群体中的所有细胞都是包含重组表达载体的单宿主细胞的克隆，使得该群体中的所有细胞都包含重组表达载体。在本发明

的一个实施方案中，细胞群如本文所述是包含含有重组表达载体的宿主细胞的克隆群。

[0234] CAR(包括其功能性部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞 (包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)可以是分离和/或经纯化的。例如，经纯化的(或分离的)宿主细胞制备物是其中宿主细胞比在其体内天然环境中的细胞纯度更高的宿主细胞制备物。这样的宿主细胞可以例如通过标准纯化技术来产生。在一些实施方案中，宿主细胞的制备物被纯化使得宿主细胞代表制备物的总细胞含量的至少约50％，例如至少约 70％。例如，纯度可以为至少约50％，可以大于约60％、约70％或约80％，或者可以为约100％。

[0235] E.治疗方法

[0236] 预期本文所公开的CAR可以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，其包括以有效地在该哺乳动物中治疗或预防癌症的量向该哺乳动物施用 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。

[0237] 一个实施方案还包括在施用本文所公开的CAR之前对哺乳动物进行淋巴细胞清除(lymphodeplete)。淋巴细胞清除的一些实例包括但可以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、全身照射等。

[0238] 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异体或自体的细胞。优选地，细胞是哺乳动物自体的。如本文所用的，异体的意指以下任何材料，其与该材料被引入的个体来源于相同物种的不同动物。当一个或更多个基因座的基因不相同时，两个或更多个个体被认为彼此是异体的。在一些方面，来自相同物种的个体的异体材料可以在遗传上充分不相似以在抗原性上相互作用。本文所用的“自体的”意指以下任何材料，其来源于与该材料稍后被重新引入到的个体中的同一个体。

[0239] 本文提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。本文所用的术语“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；和兔形目的哺乳动物，例如兔。哺乳动物可以来自食肉目，包括猫科 (猫)和犬科(犬)。哺乳动物可以来自偶蹄目，包括牛科(牛)和猪科 (猪)；或者是奇蹄目，包括马科(马)。哺乳动物可以是灵长目、Ceboid 目或Simoid目(猴)；或者是类人猿目(人和猿)。优选地，哺乳动物是人。

[0240] 关于方法，癌症可以是任何癌症，包括以下中的任一种：急性淋巴细胞癌症、急性髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、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、慢性骨髓癌、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、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。

[0241] 本文所用的术语“治疗”和“预防”以及来源于其的词语并不一定意指 100％或完全的治疗或预防。相反，存在本领域普通技术人员视为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这一方面，所述方法可以在哺乳动物中提供任何量或任何水平的癌症

治疗或预防。

[0242] 此外，由所述方法提供的治疗或预防可以包括治疗或预防被治疗或预防的疾病(例如癌症)的一种或更多种状况或症状。另外，出于本文的目的，“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或状况的发作。

[0243] 另一个实施方案提供了在哺乳动物中检测癌症的存在的方法，其包括：(a)使包含来自哺乳动物的一种或更多种细胞的样品与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)以及检测复合物，其中复合物的检出指示哺乳动物中癌症的存在。

[0244] 样品可以通过任何合适的方法，例如活检或尸体剖检获得。活检是从个体中移出组织和/或细胞。这样的移出可以是为了从个体中收集组织和/ 或细胞以对所移出的组织和/或细胞进行实验。该实验可以包括确定个体是否已患有和/或患有特定病症或疾病状态的实验。该病症或疾病可以是例如癌症。

[0245] 对于在哺乳动物中检测增生性病症例如癌症的存在的方法的一个实施方案，包含哺乳动物的细胞的样品可以是包含全细胞、全细胞裂解物、或全细胞裂解物的级分，例如细胞核或细胞质级分、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。

[0246] 对于哺乳动物，接触可以发生在体外或体内。优选地，接触是在体外。

[0247] 另外，复合物的检测可以通过本领域已知的任意数量的方式进行。例如，本文所述的本文所公开CAR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、或抗体、或其抗原结合部分可以用可检测标记进行标记，所述可检测标记例如如上文所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)。

[0248] 测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法是本领域已知的。例如，Clay等，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(GM-CSF)、肿瘤坏死因子a (TNF-a)或白介素2(IL-2))的释放的方法。此外，CAR功能可以通过测量细胞的细胞毒性来评价，如Zhao等，J.Immunol.174:4415-4423 (2005)中所述。

[0249] 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生性病症例如癌症的用途。癌症可以是本文所述的任何癌症。

[0250] 任何施用方法都可以用于公开的治疗剂，包括局部和系统施用。例如，可以使用局部、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。具体的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、涉及的疾病状态和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，可以使用一种或更多种施用途径；例如化学治疗剂可以经口施用并且抗体或抗原结合片段或缀合物或组合物可以静脉内施用。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、林格溶液、右旋糖溶液、5％人血清白蛋白、固定油、油酸乙酯或脂质体。在一些实施方案中，可以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到已从中除去肿瘤的组织区域或被怀疑

倾向于肿瘤发生的区域。在一些实施方案中，包含治疗有效量抗体或抗原结合片段的药物制剂的持续瘤内(或肿瘤附近) 释放可以是有益的。在另一些实例中，缀合物作为滴眼剂局部施加到角膜，或玻璃体内施加到眼内。

[0251] 所公开的治疗剂可以被配制成适合于精确剂量的单次施用的单位剂量形式。此外，所公开的治疗剂可以以单剂量或以多剂量方案来施用。多剂量方案是以下方案：其中初级治疗过程可以具有多于一个单独剂量，例如1至10个剂量，然后以后续时间间隔根据需要给予其他剂量以维持或加强组合物作用。治疗可以涉及在数天至数月或甚至数年的时期内的化合物的日剂量或多个日剂量。因此，剂量方案还将至少部分地基于待治疗对象的特定需求来确定并且将取决于施用医师的判断。

[0252] 抗体或缀合物的通常剂量可以为约0.01mg/kg至约30mg/kg，例如约 0.1mg/kg至约10mg/kg。

[0253] 在一些具体实例中，基于多次每日给药方案(例如至少连续2天、连续10天等)向对象施用包含一种或更多种缀合物、抗体、组合物、CAR、 CAR T细胞或另外药剂的治疗性组合物例如数周、数月或数年的时间。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。

[0254] 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(例如顺序地、基本上同时或同时)向对象提供外科手术、放射治疗和/或化学治疗。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，并且可以由熟练的临床医师来确定。用于另外药剂的制备和给药方案可以根据制造商的说明来使用或如由技术人员凭经验确定的。用于这样的化学治疗的制剂和给药方案还在Chemotherapy Service，(1992)编辑，M.C.Perry，Williams&Wilkins， Baltimore，Md中描述。

[0255] 在一些实施方案中，组合治疗可以包括向对象施用治疗有效量的另外癌症抑制剂。可以用于组合治疗的另外治疗剂的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)和治疗可以单独或组合使用。例如，任何合适的抗癌剂或抗血管生成剂都可以与本文所公开的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，并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0256] 另外的化学治疗剂包括但不限于烷化剂，例如氮芥(nitrogen mustard) (例如苯丁酸氮芥、氮芥(chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀和链佐星)、铂化合物(例如卡铂、顺铂、奥沙利铂和BBR3464)、白消安、达卡巴嗪、二氯甲二乙胺、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替派和尿嘧啶氮芥；抗代谢物，例如叶酸(例如氨甲蝶呤、培美曲塞和雷替曲塞)、嘌呤(例如克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、巯基嘌呤和兰快舒(tioguanine))、嘧啶(例如卡培他滨)、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和吉西他滨；植物生物碱，例如鬼臼(例如依托泊苷和替尼泊苷)、紫杉烷类(例如多西他赛和紫杉醇)、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、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星)、博来霉

素、利福平、羟基脲(hydroxyurea)和丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑替康和伊立替康;单克隆抗体,例如阿仑单抗、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、吉姆单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗和曲妥珠单抗;光敏剂,例如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠和维替泊芬;以及其他药剂,例如阿利维A酸、六甲蜜胺、安吖啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿西替尼、贝沙罗汀、贝伐珠单抗、硼替佐米、塞来昔布、地尼白介素(denileukin diftitox)、厄洛替尼、雌莫司汀、吉非替尼、羟基脲(hydroxycarbamide)、伊马替尼、拉帕替尼、帕唑帕尼、喷司他丁、马索丙考、米托坦、培门冬酶、他莫昔芬、索拉非尼、舒尼替尼、维罗非尼(vemurafinib)、凡德他尼和维甲酸。这样的药剂的选择和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0257] 组合治疗可以提供协同作用并且证明具有协同性,即当活性成分一起使用时达到的效果大于由单独使用化合物产生的效果的总和。当活性成分:(1)在组合的单位剂量制剂中共配制并同时施用或递送;(2)以单独制剂交替或并行递送;或(3)通过另一些方案进行时,可以获得协同作用。当交替递送时,当化合物顺序施用或递送,例如在单独的注射器中通过不同的注射剂顺序施用或递送时,可以获得协同作用。通常来说,在交替期间,每种活性成分的有效剂量顺序施用,即先后施用,然而在组合治疗中,两种或更多种活性成分的有效剂量一起施用。

[0258] 在一个实施方案中,在抗癌治疗后向患有肿瘤的对象施用有效量与一种或更多种本文所公开抗原特异性结合的抗体或抗原结合片段或其缀合物。在已经过足够时间量以允许施用的抗体或抗原结合片段或缀合物与在对应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,与在治疗前获取的对照相比免疫复合物增加指示该治疗是无效的,然而与在治疗前获取的对照相比免疫复合物减少指示该治疗是有效的。

[0259] F.生物药物组合物

[0260] 本文提供了用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的生物药物组合物或生物制剂组合物(在下文中"组合物"),其包括在载体(例如可药用载体)中的与一种或更多种本文所公开抗原特异性结合的一种或更多种所公开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。组合物可以以单位剂量形式制备用于向对象施用。施用的量和时机由治疗临床医师决定以达到期望结果。组合物可以被配制成用于系统(例如静脉内)或局部(例如瘤内)施用。在一个实例中,所公开的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。包含本文所公开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肿瘤的治疗和检测,所述肿瘤例如但不限于神经母细胞瘤。在一些实例中,组合物可用于癌的治疗或检测。包含如本文所公开的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病理性血管生成的检测。

[0261] 用于施用的组合物可以包括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。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常不含不需要的物质。这些组合物可以通过常规的公知灭菌技术来灭菌。这些组合物可以根据需要包含可药用的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。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以广泛地变化，并且根据所选具体施用模式和对象需求将主要基于流体体积、黏度、体重等来选择。制备这样的剂型用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的实际方法对于本领域技术人员是已知的或将是明显的。

[0262] 用于静脉内施用的典型组合物包含约0.01mg/kg至约30mg/kg的抗体或抗原结合片段或缀合物/对象/天(或对应剂量的包含抗体或抗原结合片段的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物)。用于制备可施用组合物的实际方法对本领域技术人员是已知或明显的并且在例如Remington's Pharmaceutical Science,第19版,Mack Publishing Company,Easton,PA (1995)的出版物中更详细地描述。

[0263] CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、或缀合物可以以冻干形式提供并且在施用前用无菌水再水化,但是其也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溶液添加到含有0.9%氯化钠(USP)的输注袋中,并且在一些情况下以0.5mg/kg至15mg/kg体重的剂量施用。本领域中在抗体或抗原结合片段和缀合物药物的施用方面有相当多的经验可供使用;例如自1997 年Rituxan®获批以来,抗体药物一直在美国销售。CAR、或表达CAR的 T细胞、抗体、抗原结合片段及其缀合物可以通过缓慢输注而不是以静脉内推注或浓注来施用。在一个实例中,施用较高的负荷剂量,随后以较低水平施用维持剂量。例如,可以在大约90分钟的时间内输注4mg/kg抗体或抗原结合片段的初始负荷剂量(或包含抗体或抗原结合片段的缀合物的对应剂量),随后如果在前剂量耐受良好,则在30分钟时间内输注2 mg/kg的每周维持剂量进行4至8周。

[0264] 受控释放肠胃外制剂可以被制备成植入物、油性注射剂或制备成颗粒系统。对于蛋白质递送系统的概述,参见Banga,A.J.,Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing,and Delivery Systems,Technomic Publishing Company,Inc.,Lancaster,PA,(1995)。颗粒系统包括微球体、微粒、微胶囊剂、纳米胶囊剂、纳米球体和纳米粒。微胶囊剂包含治疗性蛋白质例如细胞毒素或药物作为中心核。在微球体中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1μm的颗粒、微球体和微胶囊剂通常分别是指纳米粒、纳米球体和纳米胶囊剂。毛细管的直径为约5μm使得只有纳米粒静脉内施用。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)。

[0265] 聚合物可以用于本文所公开的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控制释放。用于受控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是可活动的液体存在,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等, Pharm.Res.9:425-434,1992;和Pec等,J.Parent.Sci.Tech.44(2):58-65, 1990)。可替选地,羟磷灰石已经作为微载体用于蛋白质的受控释放 (Ijntema等,Int.J.Pharm.112:215-224,1994)。在另一方面,脂质体被用于脂质包封的药物的受控释放以及药物靶向(Betageri等,Liposome Drug Delivery Systems,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。许多

用于治疗性蛋白质的受控递送的另外系统是已知的(参见美国专利No. 5,055,303;美国专利No.5,188,837;美国专利No.4,235,871;美国专利 No.4,501,728;美国专利No.4,837,028;美国专利No.4,957,735;美国专利No.5,019,369;美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,514,670;美国专利No.5,413,797;美国专利No.5,268,164;美国专利No.5,004,697;美国专利No.4,902,505;美国专利No.5,506,206;美国专利No.5,271,961;美国专利No.5,254,342和美国专利No.5,534,496)。

[0266] G.药盒

[0267] 在一方面,还提供了使用本文所公开的CAR的药盒。例如,药盒用于在对象中治疗肿瘤,或用于制备表达本文所公开的一种或更多种CAR 的CAR T细胞。如本文所公开的,药盒将通常包含所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。药盒中可以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。

[0268] 药盒可以包括容器和在容器上或附在容器的标记或包装插入物。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料例如玻璃或塑料形成。容器通常容置包含一种或更多种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的组合物。在一些实施方案中,容器可以具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标记或包装插入物指示该组合物用于治疗特定病症。

[0269] 标记或包装插入物通常将还包括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细胞的说明书。包装插入物通常包括在治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,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、禁忌和/或警告的信息。说明性材料可以以电子形式(例如计算机磁盘或压缩光盘)书写或可以是可视化的(例如视频文件)。药盒还可以包括有利于该药盒被设计用于的特定应用的另外组分。因此,例如,药盒可以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、合适的第二标记例如第二抗体等等)。药盒可以另外地包括通常用于特定方法的实践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。

实施例

[0270] 通过以下实施例对本发明进行进一步举例说明,这些实施例不应以任何方式解释为对本发明范围施加限制。相反,应清楚地理解,可以寻求多个其他实施方案、其修改方案和等同方案,其在本领域技术人员阅读本文的说明之后可以是明显的而不脱离本发明的精神和/或所附权利要求书的范围。

[0271] 实施例1

[0272] 包含TNFRSF跨膜结构域的嵌合抗原受体

[0273] 根据本文所述的操作实现具有新跨膜序列的CAR的产生。

[0274] 通过编码抗原结合结构域、接头结构域、跨膜结构域和T细胞信号转导结构域的整个开放阅读框的体外合成建立CAR的转基因表达盒(载体基因组)。表达CAR的慢病毒表达载体(LV)如下建立:使用用于哺乳动物细胞培养和DNA转染的标准方法将包膜质粒、辅助质粒和载体基因组编码质粒共转染到生产细胞系中,收集含有载体的上清液并在指示细胞系上

滴定。然后，将含有载体的上清液用于转导从外周血分离的原代人淋巴细胞并通过转导T细胞群的流式细胞术分析确定CAR编码转基因的表达。然后，在功能性测定中测试表达CAR的淋巴细胞群。对于细胞因子产生，将CAR-T细胞与表达同源抗原的肿瘤细胞系共培养。在24小时时收集上清液并通过ELISA测定来分析。对于细胞毒性，将肿瘤细胞系与 CAR-T细胞共培养，并通过对靶细胞群中膜完整性损失或细胞死亡途径的生物化学激活进行流式细胞术分析来监测细胞死亡的程度。

[0275] 对于原理验证，每种CAR利用4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和 FMC63来源抗CD19结合基序并且以CD8来源接头和CD8跨膜结构域(参见图2和图4(A))、CD8接头和CD4(参见图2和图4(B))、TNFRSF19 接头和跨膜结构域(参见图2和图4(C))或表达的CD8接头和TNFRSF19 跨膜区(参见图2和图4(D))为特征。

[0276] 与存在于人CD4和CD8a蛋白中的跨膜基序相比限定TNFRSF16和 TNFRSF19之跨膜基序的核心残基揭示本发明人声称与CAR中信号转导活性相关的具有序列同源性的核心模式的存在。

[0277] 图1中已示出了嵌合抗原受体的示意图，其示出了跨膜结构域相对于细胞外抗原结合结构域和细胞内信号转导结构域的相对位置。

[0278] 图2中已示出了CD8、CD4、TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜氨基酸序列以及TNFRSF16和TNFRSF19中的某些重要跨膜氨基酸基序。九个明显特征在图2的上部中突出显示。每个都是由人基因组在跨膜质膜蛋白的情况下编码的氨基酸。本文所用的氨基酸缩写遵循IUPAC-IUB联合生化命名委员会(JCBN)。特征在两个分组中表示。在特征1、2和3中，氨基酸由在前10个跨膜残基中的I、A或L构成。特征2与特征1相邻或从特征1移动一个氨基酸并且是A或1。特征3是L或V并且与特征2 相隔一个氨基酸。第二特征组开始于与特征3相隔至少5个但不超过10 个氨基酸处。特征4、5和6是由L或V构成的三个氨基酸的连续串。特征7与特征6相隔一个氨基酸并且仅由L构成。特征8与特征7相邻并且由V或L构成。在CD4中缺少该特征。特征9与特征8相邻并且由I或 A构成。这些特征的意义是其在细胞的质膜中形成独特的二级结构，允许通过嵌合抗原受体(CAR)的最佳信号转导和后续T细胞激活。

[0279] 实施例2

[0280] 表达嵌合受体的T细胞表现出高表面表达和细胞裂解活性

[0281] 本文所公开的CAR在Raji细胞系中以高水平表达。表达CAR的细胞具有高增殖速率，产生大量的细胞因子，并且对表面具有与CAR结合之抗原的细胞具有高细胞毒活性。

[0282] 为了证明鉴定的跨膜基序的细胞裂解活性，建立了如图3所示包含 TNFRSF19跨膜结构域或跨膜和接头结构域的一部分的嵌合抗原受体。

[0283] 表达CAR的慢病毒表达载体(LV)通过上文实施例1中所述的方法构建，所述CAR利用4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和FMC63来源抗CD19 结合基序，以CD8来源接头和CD8跨膜结构域(参见图2和图4(A)， LTG1494，图5所示的实心圆圈)、CD8接头和CD4跨膜(参见图2和图 4(B)，LTG1562，图5所示的空心方形)、TNFRSF19接头和跨膜结构域 (参见图2和图4(C)，LTG1564，图5所示的星形)或表达的CD8接头和TNFRSF19跨膜区(参见图2和图4(D)，LTG1563，图5所示的空心圆圈)为特征。

[0284] a)CAR的细胞裂解测定

[0285] 然后，在细胞裂解测定中测试CAR，所述测定涉及用编码萤光素酶的 LV转导的

Raji细胞系(来自ATCC的CCL-86)(Raji-luc)。Raji-luc培养和细胞裂解测定本身在标准组织培养条件下在含有10％胎牛血清的 RPMI-1640培养基中进行。萤光素酶底物的添加允许在含有恒定数目靶细胞的96孔组织培养板的每个孔中精确测量活Raji细胞的数目。CAR T细胞通过在无血清条件下在含有IL-2的TexMACS培养基(Miltenyi Biotec) 中用抗CD3/CD28珠(TransACT,Miltenyi Bitoec)刺激来产生。使细胞激活3天,暴露于LV,并再培养多至另外10天。通过将Raji-luc与激活T 细胞(对照)、表达LV编码对照蛋白的激活T细胞(LNGFR对照)或编码对存在于Raji-luc上的细胞表面抗原(在这种情况下CD19)具有特异性的CAR的LV共孵育来确定CAR表达T细胞的细胞裂解活性。递增每孔效应CAR-T细胞的数目以允许测试不同的效应物/靶标比例。通过添加萤光素酶底物并在读板器中测量光发射来确定在24小时共孵育期结束时的活Raji-luc。细胞毒性量化为与经与CAR-T细胞共孵育的Raji-luc相比在没有T细胞下来自每孔活Raji-luc的萤光素酶信号的百分比。

[0286] b)CAR的细胞表面表达测定

[0287] 然后,在基于流式细胞术的细胞表面表达测定中测试CAR-T细胞,所述测定涉及暴露于生物素化蛋白L,其与CAR的细胞外方面的轻链来源结构域结合。与CAR结构域结合的生物素化蛋白L的量通过使用与藻红蛋白(PE)缀合的抗生物素蛋白进行二次染色来确定。使用如在 MACS-Quant流式细胞仪上通过PE信号确定的对蛋白L结合染色呈阳性的单细胞的百分比来计算CAR表达。

[0288] c)CAR的细胞裂解测定

[0289] 当建立表达以下CAR的慢病毒表达载体(LV)并测试其抗白血病活性时,显示出包含TNFRSF的CAR的出乎意料的高裂解活性(参见图5)。

[0290] 每种实验性CAR都包含4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和FMC63来源抗CD19结合基序。以CD8来源接头和CD8-跨膜结构域为特征的CAR-T (参见图4,LTG1494,实心圆圈)在列于x轴的效应物/靶标(E:T)比例下显示出强裂解活性。表达CD8接头和CD4跨膜(参见图4,LTG1562,空心方形)或TNFRSF19接头和跨膜结构域的CAR-T二者也都显示出可观的裂解活性(参见图4,LTG1564,星形)。令人惊讶的是,发现在测试包含表达的CD8接头和TNFRSF19跨膜区的CAR-T时观察到非常强的裂解活性(参见图4,LTG1563,空心圆圈)。

[0291] 在本分析中,尽管对包含TNFRSF19跨膜结构域的CAR观察到高细胞裂解活性,但是在不同形式之间也存在显著差异,其中LTG1563(包含 CD8接头和TNFRSF19跨膜)显示出强裂解活性和LV转导T细胞的高表面表达二者。

[0292] 由于在图2所示保守区中TNFRSF16和TNFRSF19的跨膜区之间存在高氨基酸保守性,因此当测试表达CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T 时,包含表达的CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T也显示出非常强的细胞裂解活性。

[0293] d)CAR的细胞表面表达测定

[0294] 已经证明,CAR在T细胞质膜上的细胞表面表达也是表达CAR的治疗性细胞群的稳健活性所需的重要参数。CAR在T细胞质膜上的细胞表面表达通过流式细胞术分析来检测。

[0295] 细胞表面表达的分析(如通过流式细胞术分析确定的)使用与具有慢病毒表达载体(LV)之转导T细胞的CAR的Ig来源结合结构域结合的蛋白L的间接荧光染色。下表2示出了通过上文实施例1中所述方法构建的CAR的表达的结果,所述CAR利用4-1BB/CD3-ζ链信号转导基序和 FMC63来源抗CD19结合基序,以CD8来源接头和CD8-跨膜结构域(参见图4(A))、

CD8接头和CD4跨膜结构域(参见图4(B))、TNFRSF19 接头和跨膜结构域(参见图2和图4(C))或表达的CD8接头和TNFRSF19 跨膜区(参见图4(D))为特征。

[0296] 包含TNFRSF跨膜结构域之CAR的细胞表面表达的结果示于表2中。每种CAR结构域的细胞表面表达水平通过使用生物素化蛋白L和链霉亲和素缀合的藻红蛋白(PE)对LV转导T细胞进行流式细胞术分析来确定。与表达对照蛋白(LNGFR-mCherry)并且不具有表面表达或细胞裂解活性的LNGFR-mCherry CAR(LTG1541)相比,包含TNFRSF19跨膜结构域的CAR(LTG1564)显示出高表面表达(参见实施例1、图5和表2)。

[0297] 下表2示出了对包含TNFRSF结构域之CAR的细胞裂解和表面表达结果的总结。激活的人T细胞不接受LV(模拟)或用编码以下接头和跨膜(接头_TM)结构域组合的LV转导:CD8-跨膜和接头结构域 (LTG1494)、CD8接头和CD4跨膜结构域(LTG1562)、CD8接头和 TNFRSF19跨膜区(LTG1563)、TNFRSF19接头和TNFRSF19跨膜结构域(LTG1564)。LTG1541表达对照蛋白(LNGFR-mCherry)并且不具有细胞裂解活性。细胞裂解活性的表达是使用Raji细胞系确定的(图4)。每种CAR结构域的表达水平通过使用生物素化蛋白L和链霉亲和素缀合的藻红蛋白(PE)对LV转导T细胞进行流式细胞术分析来确定。

[0298] 表2.对包含TNFRSF结构域的CAR的细胞裂解和表面表达的总结

[0299]

	接头_TM	表达	细胞裂解
模拟	无	n/a	无
LTG1541	LNGFR	高	无
LTG1494	CD8_CD8	高	高
LTG1562	8_4	中	高
LTG1563	8_TNFRSF	高	高
LTG1564	TNFRSF_TNFRSF	低	高

[0300] 与LNGFR-mCherry CAR(LTG1541)对照相比,包含表达的CD8接头和TNFRSF16跨膜区的CAR-T展现出高细胞表面表达。

[0301] 实施例3

[0302] 使用来源于TNFRSF成员的接头和/或跨膜结构域能够实现CAR T抗肿瘤功能的精细调节

[0303] 在本实施例中,证明TNFRSF19和TNFRSF9相对于CD8编码的跨膜结构域的出乎意料的优异性。在基于CAR19的肿瘤杀伤测定中和在与肿瘤靶细胞共培养的体外IFNγ、TNFα、IL-2和GM-CSF细胞因子诱导中,二者都证明是优异的。此外,证明在消除人白血病的小鼠模型中建立的 Raji伯基特淋巴瘤方面,TNFRSF19来源CAR19优于CD8跨膜CAR19。重要地,尽管在T细胞中有高表面CAR表达水平,将来源于TNFRSF16 (也被称为LNGFR,低亲和力神经营养蛋白受体)的跨膜结构域并入到 CAR19中阻断所有的体外和体内活性。因此,表明并非所有的跨膜区(即使来自同一超家族例如TNFRSF中的蛋白质)都能用作CAR的组分。

[0304] 新发现证明CAR的跨膜结构域除在细胞外和细胞内结构域之间简单连接之外还在CAR T功能方面起作用。此外,通过使用新跨膜结构域可以增强或抑制CAR T响应的程度。

[0305] 材料和方法

[0306] (a)细胞系(PBMC和靶标)

[0307] 除非另有说明,否则所有细胞系和试剂均购买自美国组织培养物保藏中心

(American Tissue Culture Collection)(ATCC,Manassas,VA)。在补充有10％热灭活胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI-1640培养基中培养Raji和K562细胞系。在补充有10％热灭活FBS的Dulbecco改良Eagle 培养基(DMEM)中增殖人胚肾细胞系293T。

[0308] 通过用编码萤火虫萤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,随后克隆并选择萤光素酶阳性克隆来产生萤光素酶表达细胞系的单细胞克隆。小鼠适应性 Raji-luc系如下产生:将稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji克隆植入到NSG 小鼠中(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tmIWjl}/SzJ),The Jackson Laboratory Sacramento,CA),通过阳性选择(CD19微珠,人,Miltenyi Biotec)或阴性选择(小鼠细胞清除试剂盒,Miltenyi Biotec)从小鼠脾中分离植入的Raji-luc肿瘤细胞,培养扩增,并再克隆以促进具有高萤火虫萤光素酶表达的克隆的选择。

[0309] 全血在捐赠者的书面同意下从Oklahoma Blood Institute(OBI)的健康志愿者收集。CD4阳性和CD8阳性人T细胞根据制造商的方案使用CD4- 微珠和CD8-微珠的1:1混合物(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,FRG) 通过阳性选择从血沉棕黄层纯化。

[0310] (b)嵌合抗原受体(CAR)-表达载体的建立

[0311] CAR抗原结合结构域scFv序列来源于针对CD19的鼠杂交瘤FMC-63 (FMC-63:aa1-267,GenBank ID:HM852952.1)。CAR T构建体是通过将 FMC63 scFv与指定的连接和跨膜结构域,然后与4-1BB(CD137, aa214-255,UniProt序列ID Q07011)信号转导结构域和CD3ζ信号转导结构域(CD247,aa52-163,参考序列ID:NP_000725.1)框内连接产生的。构建体1494被设计成近似已公布的CD19 CAR构型(Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia,2004,C Imai,K Mihara,M Andreansky,IC Nicholson,C-H Pui,TL Geiger,D Campana.Leukemia,18:676-84)(在本说明书中称为“1494”)。1494构建体并入来源于人CD8α蛋白的接头和跨膜结构域(UniProt序列ID P01732,aa 138-206)。将CAR构建体序列克隆到第三代慢病毒质粒骨架(Lentigen Technology Inc.,Gaithersburg,MD)中。通过HEK 293T细胞的瞬时转染产生包含慢病毒载体(LV)的上清液,通过离心包含慢病毒载体的上清液使载体沉淀,并储存在-80℃。

[0312] (c)原代T细胞转导

[0313] 来自正常供体的人原代T细胞在对CD4+和CD8+细胞进行免疫磁珠选择之后从血沉棕黄层中纯化,在补充有40IU/ml IL-2的TexMACS培养基中以0.3x10^{6}个细胞/ml和2x10^{6}个细胞/ml的密度进行培养,用 CD3/CD28MACS®GMP TransAct试剂(Miltenyi Biotec)活化并在第3 天在存在10μg/ml硫酸精蛋白(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的情况下用编码CAR构建体的慢病毒载体转导过夜,并在第4天更换培养基。在第5天,将培养物转移到补充有200IU/ml IL-2的TexMACS培养基中,并增殖直到在第10至13天收获。

[0314] (d)免疫效应测定(CTL和细胞因子)

[0315] 为了确定细胞介导的细胞毒性(CTL测定),将用萤火虫萤光素酶稳定转导的5,000个靶细胞与CAR T细胞以多种效应物/靶标比例组合并孵育过夜。向每个孔中添加SteadyGlo试剂(Promega,Madison WI)并将得到的发光量化为每秒的计数(样品CPS)。仅靶标的孔(最大CPS)和仅靶标的孔加1％Tween-20(最小CPS)用于确定测定范围。特异性裂解百分比计算为(1-(样品CPS-最小CPS)/(最大CPS-最小CPS))。对于细胞因子释放测定,将效

应物和靶细胞以10:1的比例合并,并孵育过夜。使用MACSplex人细胞因子珠阵列试剂盒(Miltenyi Biotec)对收获的上清液的分泌的细胞因子进行分析。

[0316] (e)Western印迹

[0317] 将200万个CAR T细胞在冷PBS(Lonza,Walkersville,MD)中清洗两次,在包含蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的冷RIPA缓冲液中裂解。将裂解物在4℃下孵育20分钟,在台式离心机中在4℃下以13000RPM沉淀10分钟,收集上清液并在-20℃下冷冻。根据制造商的方案,在MOPS 溶液中的4%至12%梯度SDS-PAGE凝胶上对样品进行解析 (Thermo-Fisher Scientific,Grand Island,NY)。将蛋白质转移到0.45微米硝化纤维素转移膜上并用针对CD3ζ的抗体(克隆ab40804,Abcam, Cambridge,MA)进行探测。使用Vectastain ABC-AMP试剂盒(Vector Laboratories,Burlingame,CA)使条带可视化并在Odyssey成像系统 (LI-COR,Lincoln,Nebraska)上捕获图像。

[0318] (f)流式细胞术分析

[0319] 对于细胞染色,从培养物中收获100万个CAR T转导细胞,在冷染色缓冲液中清洗两次并如下检测CAR表面表达:在4℃下用蛋白L-生物素缀合物(贮存液1mg/ml,1:1000稀释度,GenScript,Piscataway,NJ) 染色30分钟,随后清洗两次并在4℃下用链霉亲和素-PE缀合物染色30 分钟(贮存液1.0ml,1:200稀释度,Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,PA)。未经转导的细胞用作阴性对照。通过7AAD染色(BD Biosciences,San Jose,CA)来排除所有研究中的死细胞。将细胞清洗两次并重悬于200μl染色缓冲液中,然后通过流式细胞术进行定量分析。

[0320] 通过将细胞与1μg/ml带Fc标签的CD19肽在4℃下孵育15分钟,然后与抗Fc-AF647 F(ab')$_2$片段孵育来进行特异性CAR T染色。在MACSQuant®10分析仪(Miltenyi Biotec)上进行流式细胞术分析并使用 FlowJo软件(Ashland,OR)生成高分辨率图。

[0321] (g)CAR-T活性的体内分析

[0322] 所有的动物研究均经Jackson实验动物管理和使用委员会(Jackson Laboratory Animal Care and Use Committee)(Sacramento,CA)批准。将50万个小鼠适应性Raji-luc细胞注射到NSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tmIWjl}/SzJ)小鼠的尾静脉中。在Raji-luc注射后第6天,通过腹膜内(i.p.) 注射150mg/kg荧光素并在10分钟后在Xenogen IVIS-200仪器(Caliper Biosciences)上成像40秒来测量肿瘤植入。使用4.1版Living Image软件(Perkin Elmer)分析图像并且将每只小鼠的生物发光信号通量表示为平均辐射率(光子/秒/cm^2/球面度)。在第7天通过尾静脉注射向小鼠施用 CAR T细胞。在注射后的指定日进行成像以建立通过CAR T细胞的肿瘤生长和根除的动力学。

[0323] (h)统计学分析

[0324] 如图例中所示,使用GraphPad Prism 7.01统计学软件(La Jolla,CA) 进行统计学分析。

[0325] 结果

[0326] 为了研究跨膜和接头结构域在CAR T细胞的功能中的作用,将来源于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)蛋白质成员的跨膜和接头元件并入CAR 19设计中(图6和表3)。

[0327] 表3-CAR构建体的组成

[0328]

构建体编号	CD19 scFv结构域	接头结构域	跨膜结构域	信号传导结构域
1562	FMC63	CD8	CD4	4-1BB/CD3z
1563	FMC63	CD8	TNFRSF19	4-1BB/CD3z
1564	FMC63	TNFRSF19	TNFRSF19	4-1BB/CD3z
1712	FMC63	TNFRSF16	TNFRSF16	4-1BB/CD3z
1713	FMC63	截短TNFRSF19	TNFRSF19	4-1BB/CD3z
1714	FMC63	*TNFRSF9	*TNFRSF9	4-1BB/CD3z
1494（阳性对照）	FMC63	CD8	CD8	4-1BB/CD3z
GFP（阴性对照）	N/A	N/A	N/A	N/A

[0329] *请注意,TNFRSF9是CD137(4-1BB)的另一名称

[0330] 构建体1494基于已公开的序列并且用作阳性对照和比较物。如在材料和方法中,构建体1494由来源于FMC63抗体的小鼠抗CD19 scFv序列构成,所述序列与人CD8-α(CD8-a)的接头和跨膜结构域以及细胞内 CD137(4-1BB)激活结构域框内连接,随后是CD247(CD3-ζ)信号转导结构域。对于每种受试构建体,将CD8接头、CD8跨膜结构域或二者用可替选序列来替换,如表3中所述。为了产生具有替换的跨膜结构域的构建体,用在CD4、TNFRSF19、TNFRSF16或TNFRSF9中形成跨膜螺旋的序列替代构建体1494的CD8跨膜结构域。二硫键形成在CAR T功能中的作用有待充分地阐明。对于每种新的接头设计,通过并入天然胞外结构域的短片段来降低结构复杂性。该方法产生构建体1564、1712、1714,其接头分别包含4、0和1个半胱氨酸残基。为了进一步使构建体1564中二硫键形成的可能性最小化,构建体1713被设计成具有截短的TNFRSF19 接头以包含仅一个半胱氨酸残基。

[0331] 为了评价CAR19构建体的表达,如在材料和方法中所述,每种构建体作为慢病毒载体(LV)产生,并用LV转导人原代T细胞。在转导后第10天,通过流式细胞术对CAR T细胞的表面CAR19表达进行分析(图 6)。为了确定用于CAR19表面检测的最灵敏且特异性的方法,对两种不同的染色方法进行平行评价。蛋白L染色利用细菌蛋白L对所有含免疫球蛋白κ轻链scFv的亲和力。蛋白L由此不能区分CAR靶抗原特异性,并且经常对不同的CAR T展现出不同的亲和力。另一方面,CD19 Fc肽结合基于CAR抗CD19 scFv结构域与T细胞表面的靶CD19蛋白的结合。因此,用该试剂染色是靶标特异性的并且需要scFv的合适构象以进行结合。蛋白L染色表明在此给出的构建体中CAR T表达的不同程度,从构建体1494的90.4%到构建体1713的0.3%(图6)。相比之下,用CD19Fc 肽染色产生更好的灵敏性,并且CAR T表达为94.2%至6.86%。因此, CD19 Fc染色比蛋白L染色更加灵敏,更一致,并且避免构建体特异性偏差。流式细胞术分析表明,所有的CAR19构建体都在用CAR编码LV转导的人T细胞的表面上表达。

[0332] 通过可替选方法Western印迹验证流式细胞术CAR表达数据以还表明表达的构建体对应于预测的分子量。当用抗CD3ζ抗体探测时,Western 印迹分析显示每种受试构建体的强条带,这还揭示较低分子量天然CD3-ζ链的第二强条带(未示出)。将来自CAR转导T细胞的裂解物在变性4%至12%SDS-PAGE凝胶上解析并用针对CD3ζ的抗体进行探测。GFP转导T

细胞和未经转导的T细胞(N.T.)用作阴性对照。在所有样品中均检测到天然CD3ζ并且其大致分子量为16kDa,如预测的那样。所有的CAR T构建体均产生预测分子量58kDa的免疫反应性条带。见于一些泳道的另外条带可能表示CAR T蛋白的翻译后修饰,或天然CD3ζ的残余未变性二聚体(在构建体1712、1714中显著)。重要地,所有的CAR T构建体均产生预测尺寸58kDa的条带,由此证实所有CAR均在人原代T细胞中表达的发现。

[0333] 为了确定CAR T构建体的裂解潜力,在体外杀伤测定中使用稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji CD19阳性淋巴瘤(图8)。将CAR T细胞与 Raji-Luc细胞以5:1、10:1和20:1的效应物/靶标比例组合,并在96孔中孵育过夜,然后收获培养物并对指示存活的活Raji肿瘤细胞的残留萤光素酶活性进行分析。稳定表达萤光素酶的两种CD19阴性系:K562和293T 用作阴性对照。结果显示出在所测试CAR19 LV中裂解效力的明确排名。构建体1713是最有效的,随后是1562和1564。构建体1563、1714和阳性对照1494表现出类似的杀伤能力。出乎意料的是,构建体1712尽管有高表达水平(通过蛋白L和CD19 Fc染色分别为86.4%和86.9%),但不具有针对Raji细胞的特异性裂解活性。类似地,阴性对照GFP未表现出对肿瘤系的特异性裂解。

[0334] 然后,测量了与CD19阳性Raji淋巴瘤共孵育的CAR19细胞中I型细胞因子IFNγ、IL-2、TNFα和GM-CSF的诱导程度。将CAR T细胞和Raji细胞以10:1的效应物/靶标比例组合过夜,并通过人MACSPlex珠阵列分析培养物上清液(图9)。与体外杀伤测定一样,细胞因子诱导遵循明确的排名次序,其中构建体1713产生最高浓度的诱导细胞因子,并且新跨膜结构域构建体比对照1494构建体、非裂解性构建体1712和阴性对照GFP产生更多的细胞因子。

[0335] 然后测量了新跨膜结构域CAR19构建体的体内抗肿瘤活性(图10)。在第0天向NSG小鼠植入Raji-luc肿瘤细胞。然后,在研究的第6天通过生物发光成像来验证肿瘤植入。将小鼠随机化以获得具有类似肿瘤负荷的组,并在研究的第7天将携带新跨膜结构域的CAR T细胞(CAR 1563或 CAR 1712)或阳性对照CAR1494或阴性对照GFP转导T细胞注射到小鼠中。仅肿瘤的组(无T细胞)用作另外的阴性对照。每周进行肿瘤负荷的动力学测量直到研究的第32天。作为平均辐射率,图10中的结果表明,在体外测定中未表现出肿瘤裂解或细胞因子诱导的CAR构建体1712也未能减轻NSG小鼠中的Raji肿瘤负荷,并且在测量时间过程内产生与阴性对照组GFP和无T细胞类似的肿瘤平均辐射率。此外,在该侵袭性淋巴瘤模型中,阳性对照CAR19构建体1494能够降低但不能完全减轻肿瘤生长。重要且出乎意料的是,只有新跨膜结构域构建体1563能够从研究的第18天开始并且之后完全控制Raji肿瘤生长。

[0336] 为了确定图10中的体内发现并且为了排除可能的供体间可变性,使用相同的实验方案用由不同人供体产生的CAR T细胞重复NSG模型实验 (图11A)。再次,用构建体1494、1563、GFP和无T细胞处理携带生物发光Raji肿瘤的小鼠。如前所述,仅构建体1563能够控制Raji肿瘤进展。值得注意的是,与其他报道中常用的NALM-6细胞系相对,这些实验是用更具抗性的Raji细胞系进行的。因此,使用的测定远远更加严格并且可以对复发性或治疗抗性人疾病具有更好的预测力。出乎意料的是,在该实验中,阳性对照构建体1494不能够将Raji肿瘤负荷降低到低于阴性对照GFP或“无T细胞”处理的水平(图11A)。此外,如对数秩Mantel-Cox 检验确定的,对该实验中小鼠的Kaplan-Meier存活分析表明构建体1563 与1494或两种阴性对照中任一者之间在存活方面的显著差异(图11B)。从研究的第0天开始,中值存活为:对于构建体1563-未确定(即在研究的持续时间内,该组中的所有小鼠均存

活)，对于GFP阴性对照——19 天，对于“未处理”组——20天，并且对于构建体1494——24天。

[0337] 总之，这些结果在此表明，新跨膜结构域CAR19构建体可以在人原代T细胞中成功表达，如通过流式细胞术和Western印迹证明的。此外，携带新跨膜结构域CAR19的T细胞在体外具有功能性并且与对照构建体 1494相比展现出优异的功能谱。因此，新跨膜构建体1563在使用来源于两个单独人供体的CAR T细胞的两个独立体内研究中在控制NSG小鼠模型中建立的播散性Raji淋巴瘤肿瘤方面一致地表现得比阳性对照(构建体 1494)更佳。这些发现表明多种并入来源于TNFRSF(尤其是TNFRSF19 和TNFRSF9)之跨膜和/或接头结构域的CAR19构建体相对于基于CD8-a 跨膜和接头结构域的先前所述CAR19构建体(即，CAR构建体1494)的优越性。出乎意料的是，其中使用来自TNFRSF16的跨膜和接头结构域代替CD8a序列的构建体1712显示尽管在T细胞上高表达但是在体外既没有细胞裂解活性也没有细胞因子诱导，并且在体内控制肿瘤方面是无效的。因此，通过接头或跨膜结构域替换的CAR19功能改善是一项出乎意料的发现，这表明在所有的I型和II型跨膜糖蛋白中，并非所有跨膜区都一致地表现出产生展现出体外和体内活性的功能性CAR，即使在单超家族子类型例如TNFRSF中也如此。

[0338] 在本文中引用的每一篇申请和专利，以及在每一篇所述申请和专利中引用的每一篇文献或参考文献(包括在每一篇授权专利的审查期间；“申请引用文献”)，以及与这些申请和专利中任一个相对应和/或要求其优先权的每一篇PCT和外国申请或专利，以及每一篇申请引用文献中引用或参考的每一篇文献均在此通过引用明确地并入本文，并且可以用于实施本发明。更通常地，本文中引用了数篇文献或参考文献，不管是在权利要求书之前的参考文献列表中还是在正文本身；并且，这些文献或参考文献 (“本文引用参考文献”)中的每一篇以及在每一篇本文引用参考文献中引用的每一篇文献或参考文献(包括任何制造商说明书、指南等)均在此通过引用明确地并入本文。

[0339] 对一些具体实施方案的前述描述提供了充分的信息使得其他人员可以通过应用目前知识针对不同应用容易地对这样的具体实施方案进行修改或调整而不脱离一般概念，并且因此这样的调整和修改应当且旨在包含在所公开实施方案的等同方案的含义和范围内。应理解的是，本文所使用的短语或术语是出于描述而非限制的目的。在附图和说明书中已经公开了示例性实施方案，并且尽管可能已经使用特定的术语，但是除非另作声明，否则其仅以一般性的描述性含义使用，而非出于限制目的，权利要求书的范围因此并不局限于此。此外，本领域技术人员将理解，本文所讨论方法的某些步骤可以以可替选顺序来排序或步骤可以进行组合。因此，这意味着所附权利要求书并不限于本文所公开的具体实施方案。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就可确定本文所述的本发明实施方案的许多等同方案。这样的等同方案涵盖在以下权利要求书中。

序列表的引用

本申请包含通过题为“Sequence Listing”的 PDF 文件向美国专利及商标局（United States Patent and Trademark Office）电子提交的序列表。该序列表通过引用并入。

本公开内容的序列

如 37 C.F.R. 1.822 中所限定的，使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码来显示下文所列的核酸和氨基酸序列。仅显示每个核酸序列的一条链，但互补链被理解为通过对所示链的任何参考而被包括在内。在所附序列表中：

SEQ ID NO: 1 是 TNSRFS 16 跨膜的核苷酸序列

accgataacctgattccggtgtattgcagcattctggcggcggtggtggtgggcctggtg
gcgtatattgcgtttaaacgctgg

[0001]

SEQ ID NO: 2 是 TNFRSF 16 跨膜的氨基酸序列：

TDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRW

SEQ ID NO: 3 是 TNSRFS 19 跨膜的核苷酸序列

gataccgcgctggcggcggtgatttgcagcgcgctggcgaccgtgctgctggcgctgctg
attctgtgcgtgatttattgcaaacgccag

SEQ ID NO: 4 是 TNSRFS 19 跨膜的氨基酸序列

DTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQ

SEQ ID NO: 5 是前导肽/信号肽序列的核苷酸序列

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctgattccg

SEQ ID NO: 6 是前导肽/信号肽序列的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

SEQ ID NO: 7 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-TNFRSF19tm-信号

LTG1563 的核苷酸序列（图 3D）

[0002]

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtataccttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcgccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccgaccattgcg
agccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggcgcggtgcat
acccgcggcctggattttgataccgcgctggcggcggtgatttgcagcgcgctggcgacc
gtgctgctggcgctgctgattctgtgcgtgatttattgcaaacgccagccgcgccgcaaa
aaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa
gatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
tttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
ctgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg
gaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc
aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg
ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

SEQ ID NO: 8 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-TNFRSF19tm-信号 LTG1563 的氨基酸序列（图 3D）

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP*DIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS*AAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
EL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 9 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF19 连接-TNFRSF19tm-信号 LTG1564 的核苷酸序列（图 3E）

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtataccttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcggcggcggtgggctttcaggatatggaatgcgtgccgtgcggcgat
ccgccgccgccgtatgaaccgcattgcgcgagcaaagtgaacctggtgaaaattgcgagc
accgcgagcagcccgcgcgataccgcgctggcggcggtgatttgcagcgcgctggcgacc
gtgctgctggcgctgctgattctgtgcgtgatttattgcaaacgccagccgcgccgcaaa
aaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa
gatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
tttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
ctgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg
gaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc
aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg
ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

[0003] **SEQ ID NO: 10** 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF19 连接-TNFRSF19tm-信号 LTG1564 的氨基酸序列（图 3E）

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS*AAAVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHC
ASKVNLVKIASTASSPRDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
EL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 11 是 DNA CD8 跨膜结构域的核苷酸序列

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc acccttact gc

SEQ ID NO. 12 是 CD8 跨膜结构域的氨基酸序列

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
Val Ile Thr Leu Tyr Cys

SEQ ID NO: 13 是 DNA CD8 铰链结构域的核苷酸序列

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggcg cagtgcacac gagggggctg
gacttcgcct gtgat

SEQ ID NO: 14 是 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

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

SEQ ID NO: 15 是 CD8α 的第 118 至 178 号铰链区氨基酸的氨基酸序列（NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3）

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

SEQ ID NO: 16 是人 IgG CL 序列的氨基酸序列

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
[0004] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

SEQ ID NO: 17 是 4-1BB 的 DNA 信号转导结构域的核苷酸序列

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt
gaactg

SEQ ID NO: 18 是 4-1BB 的信号转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
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

SEQ ID NO: 19 是 CD3-ζ 的 DNA 信号转导结构域的核苷酸序列

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc

SEQ ID NO: 20 是 CD3 ζ 的氨基酸序列

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

SEQ ID NO: 21 是核酸序列（DNA）SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD4tm-信号 LTG1562 的核苷酸序列

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtatacctttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcgccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccgaccattgcg
agccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggcgcggtgcat
acccgcggcctggattttgtgcagccgatggcgctgattgtgctgggcggcgtggcgggc
ctgctgctgtttattggcctgggcatttttttttgcgtgcgctgccgcccgcgccgcaaa aaactgc
tgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa gatggctgcagc
tgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa tttagccgcagcgc
ggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa ctgaacctgggccgcc
gcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg gaaatgggcggcaaacc
gcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag aaagataaaatggcggaa
gcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc aaaggccatgatggcctgtat
cagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg

[0005]

ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

SEQ ID NO: 22 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD4tm-信号 LTG1562 的氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAA*PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
EL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 23 是 TNFRSF 19 接头的核苷酸序列：

ggcgattgcctgccgggcttttatcgcaaaaccaaactggtgggctttcaggatatggaatgcgtgccgtgcggcgat
ccgccgccgccgtatgaaccgcattgcgcgagcaaagtgaac
ctggtgaaaattgcgagcaccgcgagcagcccgcgcgat

SEQ ID NO: 24 是 TNFRSF 19 接头的氨基酸序列：

GDCLPGFYRKTKLVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHCASKVNLVKIASTASS
PRD*

SEQ ID NO: 25 是 TNFRSF 16 接头的核苷酸序列：

gaagaaattccgggccgctggattacccgcagcaccccgccggaaggcagcgatagcacc
gcgccgagcacccaggaaccggaagcgccgccggaacaggatctgattgcgagcaccgtg
gcgggcgtggtgaccaccgtgatgggcagcagccagccggtggtgacccgcggcaccacc gataac

SEQ ID NO: 26 是 TNFRSF 16 接头的氨基酸序列：

EEIPGRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQ
PVVTRGTTDN

SEQ ID NO: 27 是 Scvf cd 19 的核苷酸序列

[0006]

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcaccatcagttgca
gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct
gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat
tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc
ttccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc
gggtggcggc ggatctgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg
tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttacccgact atggtgtaag ctggattcgc cagcctccac
gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac tataattcag ctctcaaatc

cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat
gacacagcca tttactactg tgccaaacat tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc
aaggaacctc agtcaccgtc tcctca

SEQ ID NO: 28 是 Scvf cd 19 的氨基酸序列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser 100 105
110 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly
Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu
Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser
Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

SEQ ID NO: 29 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD8tm-信号转导

LTG1494 的核苷酸序列（图 3A）

[0007]

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggataccgatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggc
gatcgcgtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtat
cagcagaaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagc
ggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagc
aacctggaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtat
acctttggcggcggcaccaaactggaaattaccggcagcaccagcggcagcggcaaaccg
ggcagcggcgaaggcagcaccaaaggcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctg
gtggcgccgagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggat
tatggcgtgagctggattcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatt
tggggcagcgaaaccacctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaa
gataacagcaaaagccaggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcg
atttattattgcgcgaaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggc
cagggcaccagcgtgaccgtgagcagcgcggcggcgaccaccaccccggcgccgcgcccg
ccgaccccggcgccgaccattgcgagccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgc
ccggcggcgggcggcgcggtgcatacccgcggcctggattttgcgtgcgatatttatatt
tgggcgccgctggcgggcacctgcggcgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgtat
tgcaaacgcggccgcaaaaaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtg
cagaccacccaggaagaagatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggc
tgcgaactgcgcgtgaaatttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccag
aaccagctgtataacgaactgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaa
cgccgcggccgcgatccggaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggc
ctgtataacgaactgcagaaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaa
ggcgaacgccgccgcggcaaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgacc
aaagatacctatgatgcgctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

SEQ ID NO: 30 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD8tm-信号转导 LTG1494 的氨基酸序列（图 3A）

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP*DTDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR
KGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAATTT***PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE*
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 31 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD8tm-信号（重改造的 LTI）（LTG1538）的核苷酸序列（图 3B）

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtatacctttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcgaccaccaccccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccg
accattgcgagccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggc
gcggtgcatacccgcggcctggattttgcgtgcgatatttatatttgggcgccgctggcg
ggcacctgcggcgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgtattgcaaacgcggccgc
aaaaaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaa
gaagatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtg
aaatttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataac
gaactgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgat
ccggaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactg
[0008] cagaaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgc
ggcaaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgat
gcgctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

SEQ ID NO: 32 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD8tm-信号（重改造的 LTI）（LTG1538）的氨基酸序列（图 3B）

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP*DIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAATTT**PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDF<u>ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG</u>RKKLLY

IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 33 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF16 连接-TNFRSF16tm-信号转导（LTG1712）的核苷酸序列（图 6）

ATGGGAGCCGGAGCTACTGGACGCGCAATGGACGGACCGAGACTGCT
GCTTCTCCTTCTG
CTGGGCGTGTCCCTTGGCGGTGCCGATATCCAGATGACCCAGACAACC
TCGTCCCTGTCG
GCCAGCCTGGGTGATCGCGTGACCATCTCGTGCCGCGCAAGCCAGGAC
ATCTCAAAGTAT
CTGAACTGGTACCAACAAAAGCCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTGATC
TACCACACCTCC
CGACTCCATAGCGGAGTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCCGGCTCTGGA
ACCGATTACTCC
CTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTTGC
CAGCAGGGGAAC
ACCCTGCCGTACACTTTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACCGGA
GGCGGAGGAAGC
GGAGGAGGCGGTTCCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCAAGA
ATCCGGACCAGGC
TTGGTCGCCCCCTCCCAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTCGGGA
GTGTCGCTGCCC
GACTACGGCGTGTCCTGGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTGGA
GTGGCTGGGTGTC
ATTTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCACGG
CTTACCATCATT
AAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTGTTTCTCAAGATGAACAGCCTCCAG
ACCGACGACACC
GCCATCTACTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTACGCA
ATGGACTACTGG
GGTCAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCCTCCGAAGAGATCCCTGGCAGA
[0009] TGGATTACACGG
TCTACGCCTCCTGAAGGCTCGGACTCCACTGCCCCGAGCACTCAGGAA
CCGGAAGCCCCT
CCAGAACAGGACTTGATCGCGAGCACTGTGGCCGGGGTGGTCACTACT
GTCATGGGATCG
TCCCAACCTGTGGTGACCCGGGGTACCACTGACAACCTGATCCCCGTC
TACTGCTCGATT
CTCGCAGCCGTCGTGGTCGGCCTGGTGGCATATATCGCATTCAAGAGG
GGCCGGAAGAAG
CTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTCATGCGGCCGGTGCAGACTACC
CAGGAGGAGGAC
GGATGTTCGTGCCGCTTCCCGGAAGAGGAAGAGGGCGGATGCGAACT
GAGAGTCAAGTTC
TCGAGATCAGCGGATGCCCCCGCTTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTC
TATAACGAGCTG
AACCTTGGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTGCTGGATAAGAGAAGAGG
ACGCGATCCCGAG

ATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCCGCAGGAAGGCCTGTACAA
CGAGCTTCAGAAG
GACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAAATCGGAATGAAGGGAGAACG
CAGGCGGGGGAAA
GGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAGCACCGCGACCAAGGACACC
TACGACGCCCTG
CATATGCAAGCGCTTCCTCCACGC

SEQ ID NO: 34 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF16 连接-TNFRSF16tm-

信号转导（LTG1712）的氨基酸序列（图 6）

MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGADIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS
CRASQDISKY
LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
ATYFCQQGN
TLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSV
TCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL
KMNSLQTDDT
AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSEEIPGRWITRSTPPEGSDST
APSTQEPEAP
PEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0010] **SEQ ID NO: 35** 是 SP-CD19 结合剂-截短的 TNFRSF19 连接-TNFRSF19tm-信号转导（LTG1713）的核苷酸序列（图 6）

ATGGCTCTGAAAGTGCTGTTGGAACAAGAAAAGACCTTCTTCACCTTG
CTCGTGTTGCTG
GGGTACCTGTCCTGCAAAGTCACCTGTGATATCCAGATGACCCAGACA
ACCTCGTCCCTG
TCGGCCAGCCTGGGTGATCGCGTGACCATCTCGTGCCGCGCAAGCCAG
GACATCTCAAAG
TATCTGAACTGGTACCAACAAAAGCCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACC
TCCCGACTCCATAGCGGAGTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCCGGCTCT
GGAACCGATTAC
TCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTT
GCCAGCAGGGG
AACACCCTGCCGTACACTTTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACC
GGAGGCGGAGGA
AGCGGAGGAGGCGGTTCCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCA
AGAATCCGGACCA
GGCTTGGTCGCCCCCTCCCAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTCG
GGAGTGTCGCTG

CCCGACTACGGCGTGTCCTGGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTG
GAGTGGCTGGGT
GTCATTTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCA
CGGCTTACCATC
ATTAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTGTTTCTCAAGATGAACAGCCTC
CAGACCGACGAC
ACCGCCATCTACTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTAC
GCAATGGACTAC
TGGGGTCAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCCTCCTACGAGCCTCACTGC
GCCAGCAAAGTC
AACTTGGTGAAGATCGCGAGCACTGCCTCGTCCCCTCGGGACACTGCT
CTGGCCGCCGTC
ATTTGCTCGGCGCTCGCAACGGTCCTGCTGGCCCTGCTCATTCTGTGCG
TGATCTACTGC
AAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTCATG
CGGCCGGTGCAG
ACTACCCAGGAGGAGGACGGATGTTCGTGCCGCTTCCCGGAAGAGGA
AGAGGGCGGATGC
GAACTGAGAGTCAAGTTCTCGAGATCAGCGGATGCCCCCGCTTACCAG
CAGGGACAGAAT
CAGCTCTATAACGAGCTGAACCTTGGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTG
CTGGATAAGAGA
AGAGGACGCGATCCCGAGATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCC
GCAGGAAGGCCTG
TACAACGAGCTTCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAAAT
CGGAATGAAGGGA
GAACGCAGGCGGGGGAAAGGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAG
[0011] CACCGCGACCAAG
GACACCTACGACGCCCTGCATATGCAAGCGCTTCCTCCACGC

SEQ ID NO: 36 是 SP-CD19 结合剂-截短的 TNFRSF19 连接-TNFRSF19tm-信号转导（LTG1713）的氨基酸序列（图 6）

MALKVLLEQEKTFFTLLVLLGYLSCKVTCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS
CRASQDISK
YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED
IATYFCQQG
NTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLS
VTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFL
KMNSLQTDD
TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSYEPHCASKVNLVKIASTA
SSPRDTALAAV
ICSALATVLLALLILCVIYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

SEQ ID NO: 37 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF9 连接-TNFRSF9tm-信号

转导（LTG1714）的核苷酸序列（图 6）

[0012]

ATGGGAAATTCCTGCTACAACATCGTCGCCACTCTGCTCCTCGTGCTGA
ACTTCGAGAGA
ACTCGCAGCGATATCCAGATGACCCAGACAACCTCGTCCCTGTCGGCC
AGCCTGGGTGAT
CGCGTGACCATCTCGTGCCGCGCAAGCCAGGACATCTCAAAGTATCTG
AACTGGTACCAA
CAAAAGCCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCCCGA
CTCCATAGCGGA
GTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCCGGCTCTGGAACCGATTACTCCCTG
ACCATCTCCAAC
CTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGGAACACC
CTGCCGTACACT
TTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACCGGAGGCGGAGGAAGCGG
AGGAGGCGGTTCC
GGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCAAGAATCCGGACCAGGCTT
GGTCGCCCCCTCC
CAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTCGGGAGTGTCGCTGCCCGAC
TACGGCGTGTCC
TGGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGTGTCATT
TGGGGCTCCGAA
ACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCACGGCTTACCATCATTAAG
GACAACTCCAAG
AGCCAAGTGTTTCTCAAGATGAACAGCCTCCAGACCGACGACACCGCC
ATCTACTACTGT
GCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTACGCAATGGACTACTGGGGT
CAGGGCACCAGC
GTGACCGTGTCCTCCCTGGATGGCAAATCCGTGCTTGTGAACGGGACG
AAGGAAAGGGAC
GTGGTCTGTGGACCGAGCCCGGCCGACTTGAGCCCAGGCGCCTCATCC
GTCACTCCCCCT
GCTCCTGCACGGGAGCCTGGTCACAGCCCCCAGATCATTTCGTTCTTCC
TCGCATTGACC
TCCACTGCCCTGCTGTTCCTGCTGTTCTTCCTGACCCTGCGGTTCTCGGT
GGTCAAGAGG
GGCCGGAAGAAGCTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTCATGCGGCCG
GTGCAGACTACC
CAGGAGGAGGACGGATGTTCGTGCCGCTTCCCGGAAGAGGAAGAGGG
CGGATGCGAACTG
AGAGTCAAGTTCTCGAGATCAGCGGATGCCCCCGCTTACCAGCAGGGA
CAGAATCAGCTC
TATAACGAGCTGAACCTTGGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTGCTGGAT
AAGAGAAGAGGA
CGCGATCCCGAGATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCCGCAGGA
AGGCCTGTACAAC
GAGCTTCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAAATCGGAAT
GAAGGGAGAACGC

AGGCGGGGGAAAGGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAGCACCGC
GACCAAGGACACC
TACGACGCCCTGCATATGCAAGCGCTTCCTCCACGC

SEQ ID NO: 38 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF9 连接-TNFRSF9tm-信号转导（LTG1714）的氨基酸序列（图 6）

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI
SKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ
QGNTLPYT
FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVS
WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSL
QTDDTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA
DLSPGASSVTPP
APAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR

[0013] **SEQ ID NO: 39** 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-CD4tm-信号转导（LTG1562）的核苷酸序列（图 6）

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATACCAGCCGCCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCCCGCTTCTCCGGATCGGGTTCCGGAACTGACTACTCACTGACTA
TCTCCAACTTG
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTTC
GGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC
GGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCCATCCCAG
TCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTCATGG
ATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC

[0014]

CAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGCCGCGCCCGCCCCTCGGCCCCCGACTCCTGCC
CCGACGATCGCT
TCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCGCCGCCGGT
GGCGCTGTCCAC
ACTCGCGGACTGGACTTTGTGCAGCCTATGGCACTGATCGTCCTGGGA
GGAGTGGCCGGA
CTGCTGCTGTTCATTGGGCTCGGAATCTTCTTCTGCGTGCGGTGCCGGC
CTAGGCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

SEQ ID NO: 40 是 SP-CD19 结合剂-CD8 连接-TNFRSF19tm-信号转导（LTG1563）的核苷酸序列（图 6）

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATACCAGCCGCCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCCCGCTTCTCCGGATCGGGTTCCGGAACTGACTACTCACTGACTA
TCTCCAACTTG
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTTC
GGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC
GGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCCATCCCAG
TCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTCATGG

[0015]

ATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC
CAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGCCGCGCCCGCCCCTCGGCCCCCGACTCCTGCC
CCGACGATCGCT
TCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCGCCGCCGGT
GGCGCTGTCCAC
ACTCGCGGACTGGACTTTGATACCGCACTGGCGGCCGTGATCTGTAGC
GCCCTGGCCACC
GTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAG
CCTAGGCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

SEQ ID NO: 41 是 SP-CD19 结合剂-TNFRSF19 连接-TNFRSF19tm-信号转导（LTG1564）的核苷酸序列（图 6）

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATACCAGCCGCCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCCCGCTTCTCCGGATCGGGTTCCGGAACTGACTACTCACTGACTA
TCTCCAACTTG
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTTC
GGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC

GGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCCATCCCAG
TCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTCATGG
ATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC
CAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGCCGCGGTCGGATTCCAAGACATGGAATGCGTG
CCCTGCGGCGAC
CCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGCGCATCGAAGGTCAACCTCGTG
AAGATCGCGAGC
ACCGCGTCCTCACCCCGGGATACTGCTCTGGCCGCCGTGATTTGTTCCG
[0016] CCTTGGCCACC
GTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGTGTGATCTACTGCAAGCGCCAGC
CTAGGCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

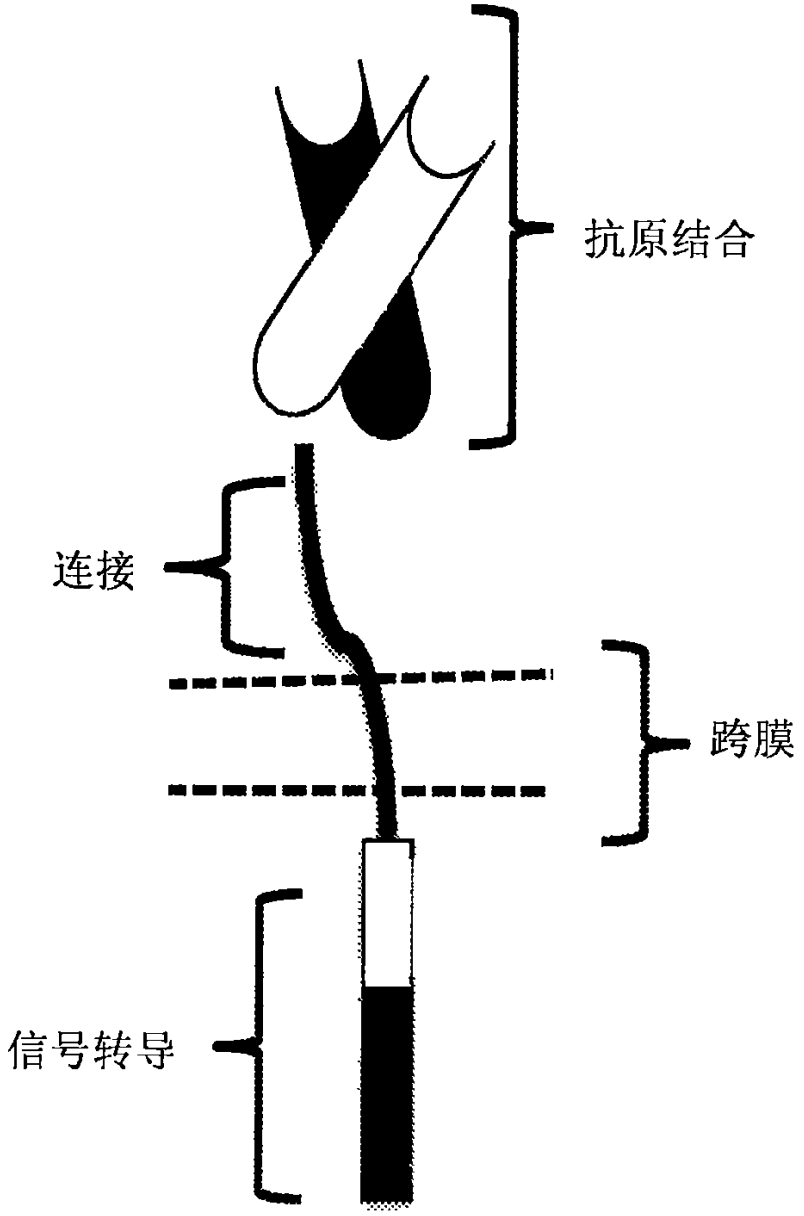


图1

```
特征:                 1 2 3        456 789
CD8:            CDIYIWAPLAGTCGV-LLLSLVILYCKR
CD4:            PM-AL-IVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC
TNFRSF16:       TTDNL-IPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKR
TNFRSF19:       TA--L-AAVICSALATVLLALLILCVIYC
```

图2

I. SP-CD19结合剂-CD8连接-CD8tm-信号转导 (LTG1494)

氨基酸序列

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDTDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR
KGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAATTT***PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE*
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
Y
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
L
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

核酸序列 (DNA)

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggataccgatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggc
gatcgcgtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtat
cagcagaaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagc
ggcgtgccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagc
aacctggaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtat
acctttggcggcggcaccaaactggaaattaccggcagcaccagcggcagcggcaaaccg
ggcagcggcgaaggcagcaccaaaggcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctg
gtggcgccgagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggat
tatggcgtgagctggattcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatt
tggggcagcgaaaccacctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaa
gataacagcaaaagccaggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcg
atttattattgcgcgaaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggc
cagggcaccagcgtgaccgtgagcagcgcggcggcgaccaccaccccggcgccgcgcccg
ccgaccccggcgccgaccattgcgagccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgc
ccggcggcgggcggcgcggtgcatacccgcggcctggattttgcgtgcgatatttatatt
tgggcgccgctggcgggcacctgcggcgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgtat
tgcaaacgcggccgcaaaaaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtg
cagaccacccaggaagaagatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggc
tgcgaactgcgcgtgaaatttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccag
aaccagctgtataacgaactgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaa
cgccgcggccgcgatccggaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggc
ctgtataacgaactgcagaaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaa
ggcgaacgccgccgcggcaaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgacc
aaagatacctatgatgcgctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

图3A

II. SP-CD19结合剂-CD8连接-CD8tm-信号（重改造的LTI）（LTG1538）

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE**
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
Y
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
L
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtataccttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcgaccaccaccccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccg
accattgcgagccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggc
gcggtgcatacccgcggcctggattttgcgtgcgatatttatatttgggcgccgctggcg
ggcacctgcggcgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgtattgcaaacgcggccgc
aaaaaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaa
gaagatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtg
aaatttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataac
gaactgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgat
ccggaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactg
cagaaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgc
ggcaaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgat
gcgctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

图3B

III. SP-CD19结合剂-CD8连接-CD4tm-信号 LTG1562

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP*DIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAA*APAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtatacctttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcgccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccgaccattgcg
agccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggcgcggtgcat
acccgcggcctggattttgtgcagccgatggcgctgattgtgctgggcggcgtggcgggc
ctgctgctgtttattggcctgggcatttttttttgcgtgcgctgccgcccgcgccgcaaa
aaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa
gatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
tttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
ctgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg
gaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc
aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg
ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

图3C

IV. SP-CD19结合剂-CD8连接-TNFRSF19tm-信号 LTG1563

1 *MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGD*
51 RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
101 GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
151 GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
201 EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*251 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE**
301
ACRPAAGGAVHTRGLDFDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
351
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
401
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
451
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtataccttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagc*gcggcggcg*ccggcgccgcgcccgccgaccccggcgccgaccattgcg
agccagccgctgagcctgcgcccggaagcgtgccgcccggcggcgggcggcgcggtgcat
acccgcggcctggattttt*gataccgcgctggcggcggtgatttgcagcgcgctggcgacc*
***gtgctgctggcgctgctgattctgtgcgtgatttattgcaaacgccagccgcgcc*gcaaa**
aaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa
gatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
tttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
ctgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg
gaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc
aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg
ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

图3D

V. SP-CD19结合剂-TNFRSF19连接-TNFRSF19tm-信号
LTG1564

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP*DIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC
*AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS***AAAVGFQDMECVPCGDPPPPYEPHC**
ASKVNLVKIASTASSPRDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgacccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgatttatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatttttgccagcagggcaacaccctgccgtatacctttt
ggcggcggcaccaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
ggcggcggcagcgaagtgaaactgcaggaaagcggcccgggcctggtggcgccgagccag
agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
attcgccagccgccgcgcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggggcagcgaaacc
acctattataacagcgcgctgaaaagccgcctgaccattattaaagataacagcaaaagc
caggtgtttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcgcggcggcggtgggctttcaggatatggaatgcgtgccgtgcggcgat
ccgccgccgccgtatgaaccgcattgcgcgagcaaagtgaacctggtgaaaattgcgagc
accgcgagcagcccgcgcgataccgcgctggcggcggtgatttgcagcgcgctggcgacc
gtgctgctggcgctgctgattctgtgcgtgatttattgcaaacgccagccgcgccgcaaa
aaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcgcccggtgcagaccacccaggaagaa
gatggctgcagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
tttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
ctgaacctgggccgccgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccg
gaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggc
aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgcg
ctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

图3E

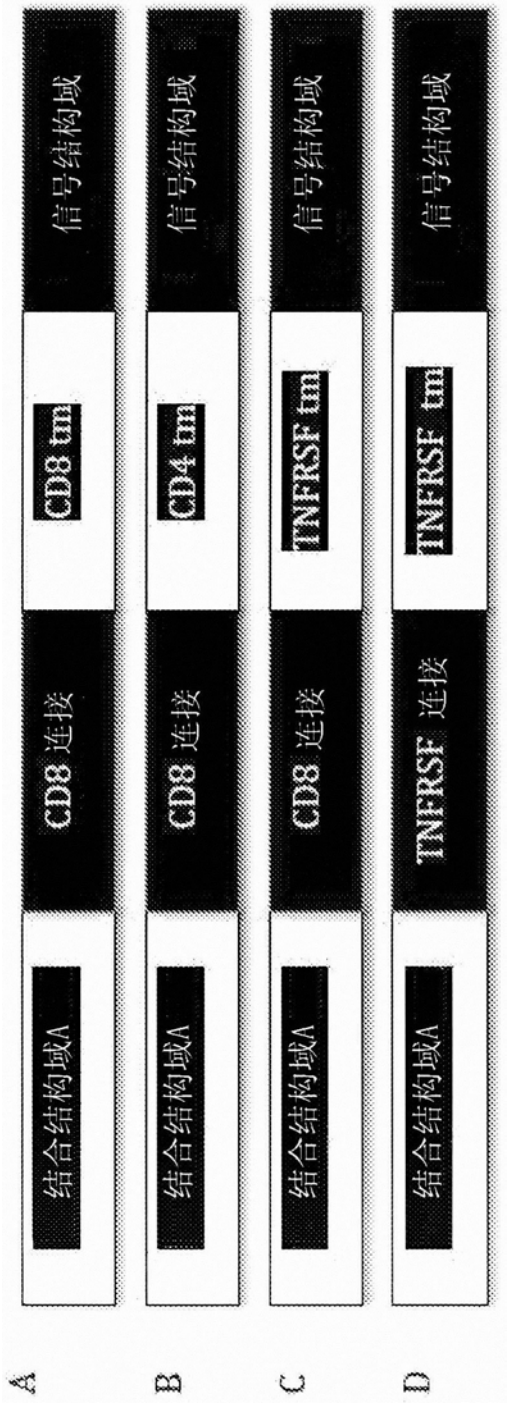

结合结构域A
CD8 连接
CD8 tm
信号结构域
A
结合结构域A
CD8 连接
CD4 tm
信号结构域
B
结合结构域A
CD8 连接
TNFRSF tm
信号结构域
C
结合结构域A
TNFRSF 连接
TNFRSF tm
信号结构域
D

图4

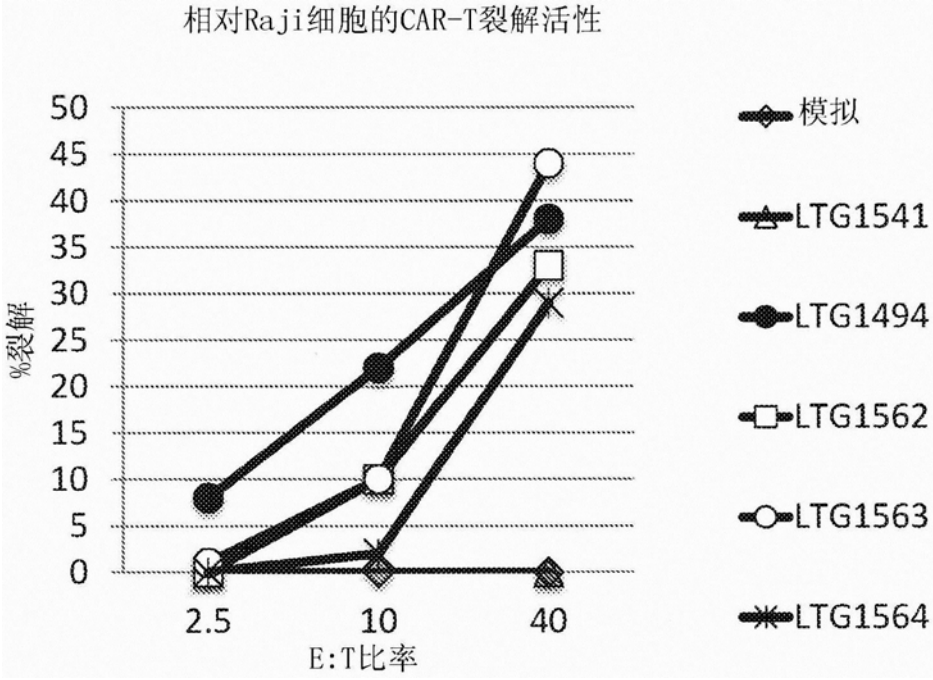

相对Raji细胞的CAR-T裂解活性
%裂解
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
2.5
10
40
E:T比率
模拟
LTG1541
LTG1494
LTG1562
LTG1563
LTG1564

图5

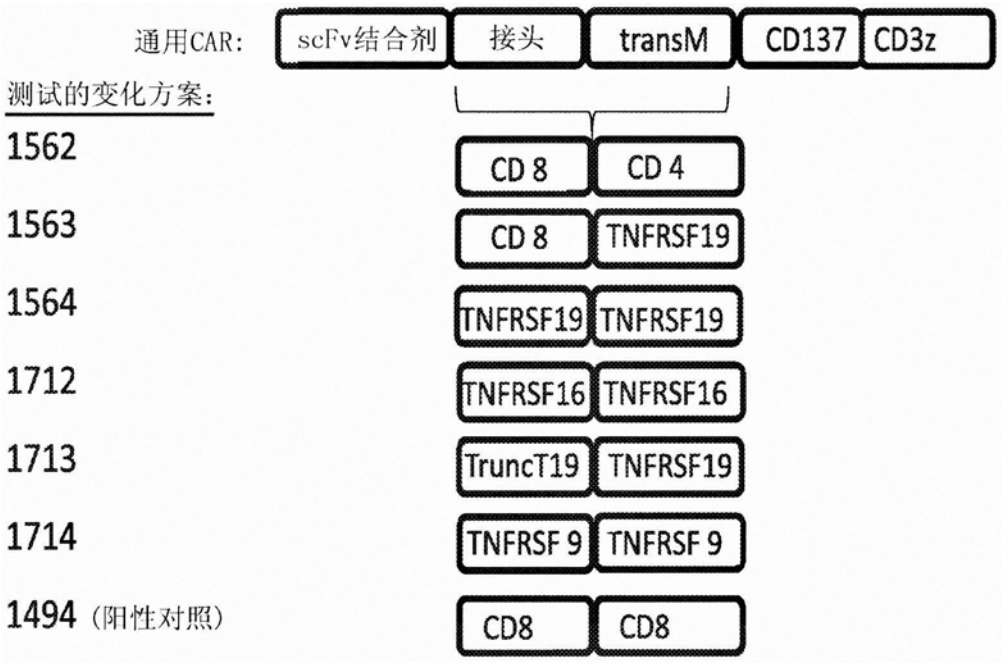

通用CAR:
scFv结合剂
接头
transM
CD137
CD3z
测试的变化方案:
1562
CD 8
CD 4
1563
CD 8
TNFRSF19
1564
TNFRSF19
TNFRSF19
1712
TNFRSF16
TNFRSF16
1713
TruncT19
TNFRSF19
1714
TNFRSF 9
TNFRSF 9
1494 (阳性对照)
CD8
CD8

图6

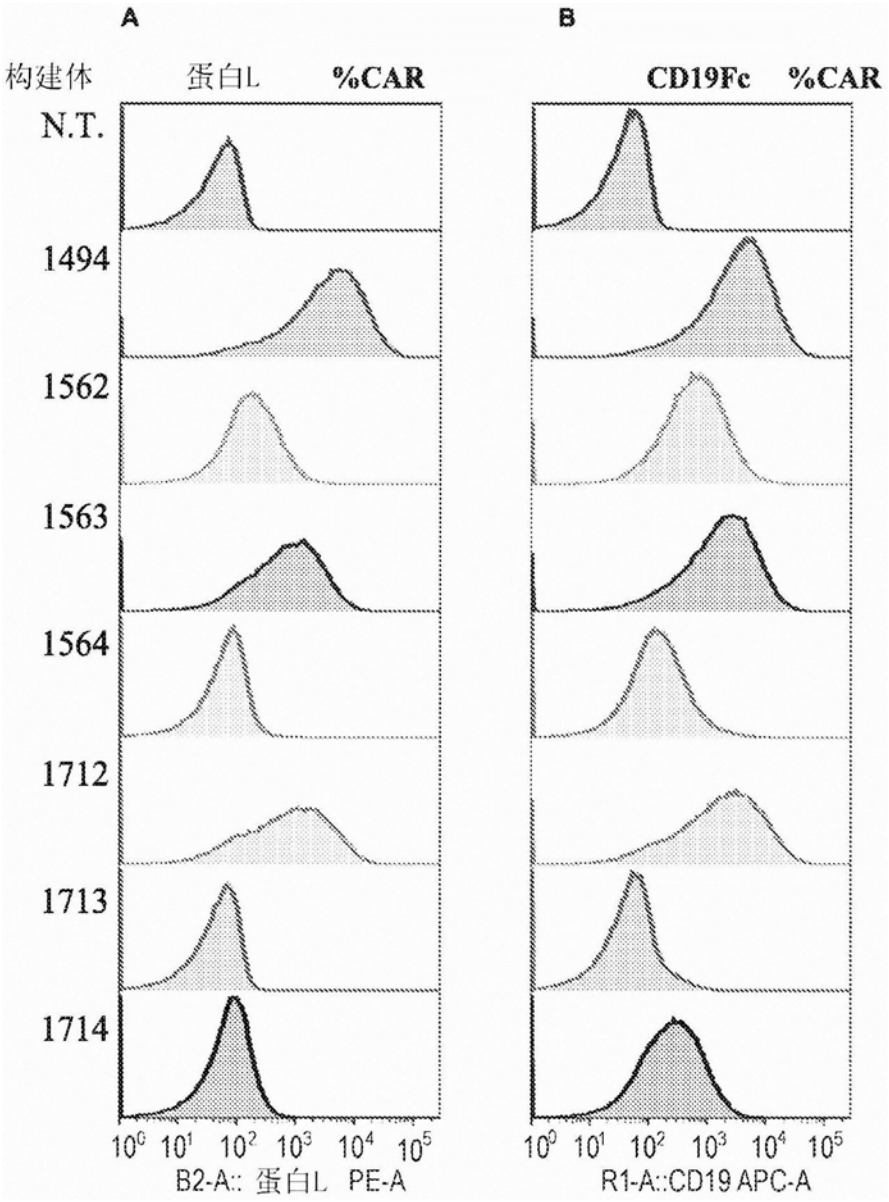

A
B
构建体
蛋白L
%CAR
CD19Fc
%CAR
N.T.
1494
1562
1563
1564
1712
1713
1714
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
B2-A:: 蛋白L PE-A
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
R1-A::CD19 APC-A

图7

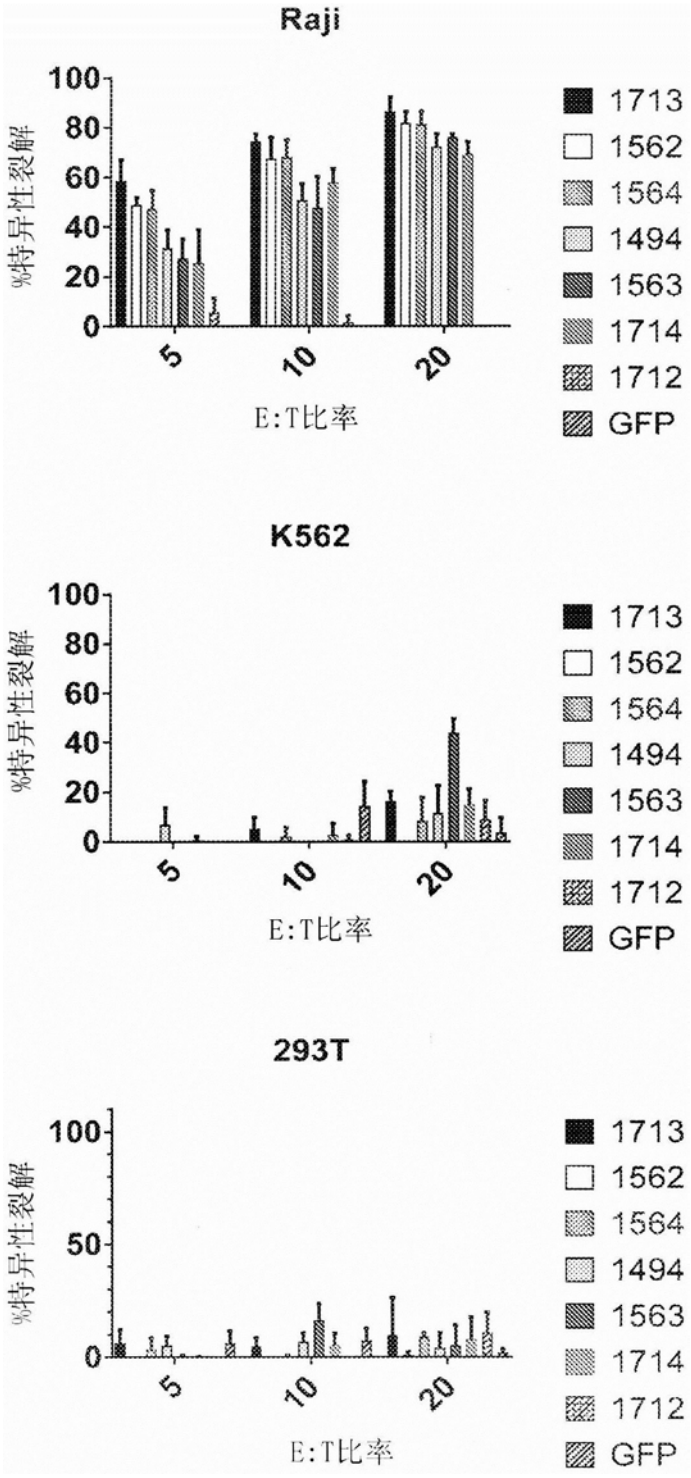

Raji
%特异性裂解
100
80
60
40
20
0
5
10
20
E:T比率
1713
1562
1564
1494
1563
1714
1712
GFP
K562
%特异性裂解
100
80
60
40
20
0
5
10
20
E:T比率
1713
1562
1564
1494
1563
1714
1712
GFP
293T
%特异性裂解
100
50
0
5
10
20
E:T比率
1713
1562
1564
1494
1563
1714
1712
GFP

图8

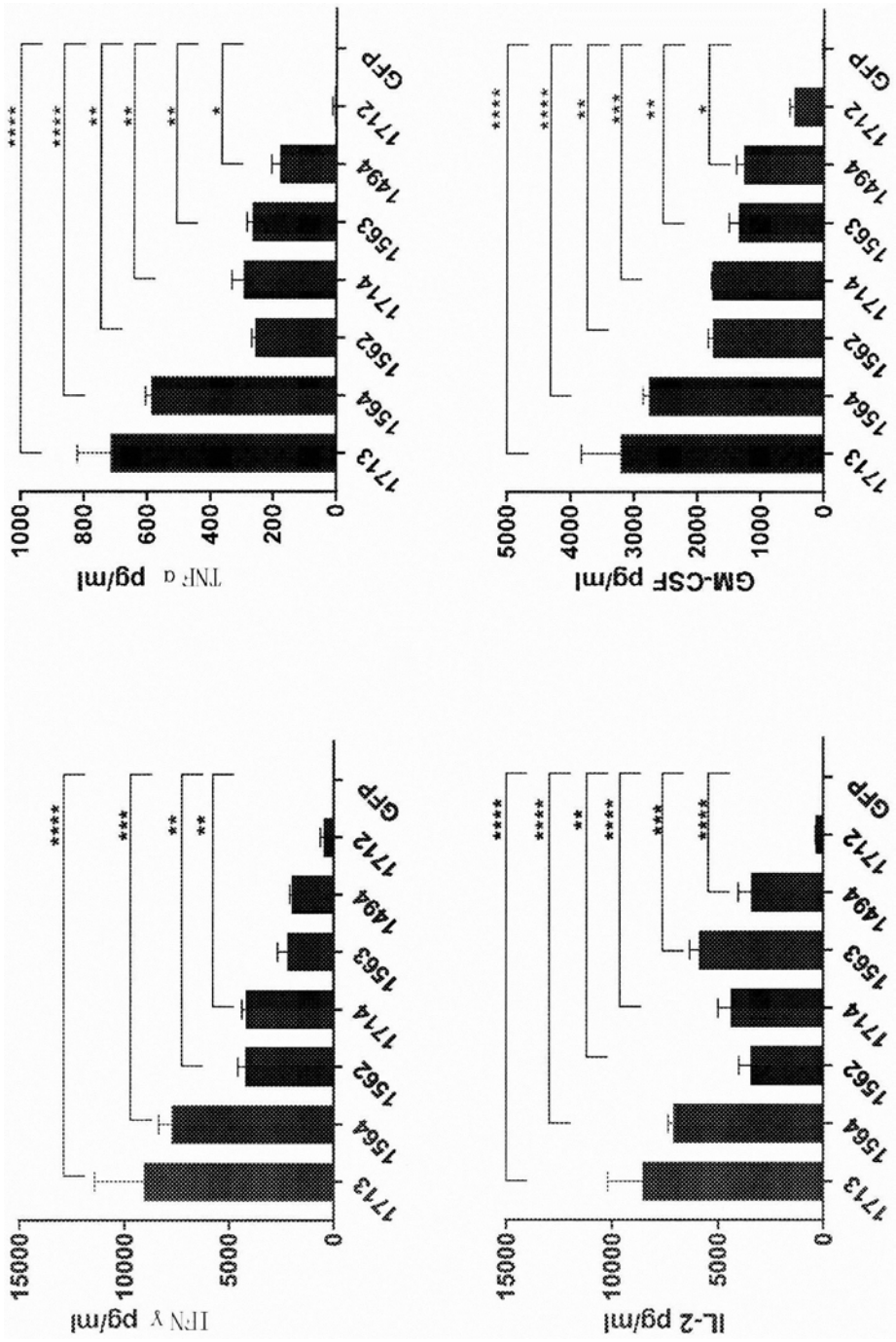

TNF α pg/ml
GM-CSF pg/ml
IFN γ pg/ml
IL-2 pg/ml
1713
1564
1562
1714
1563
1494
1712
GFP

图9

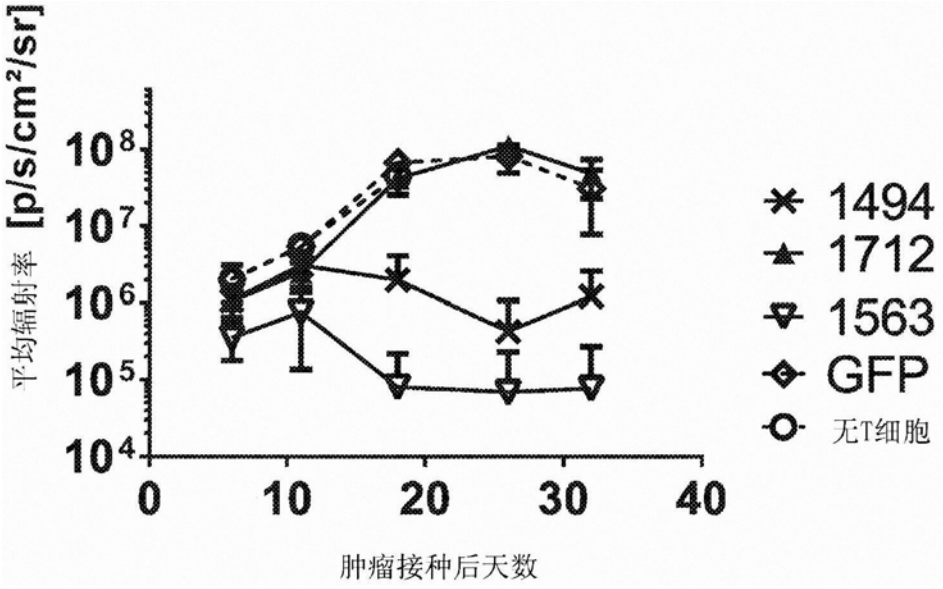

平均辐射率 [p/s/cm²/sr]
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
0
10
20
30
40
肿瘤接种后天数
1494
1712
1563
GFP
无T细胞

图10

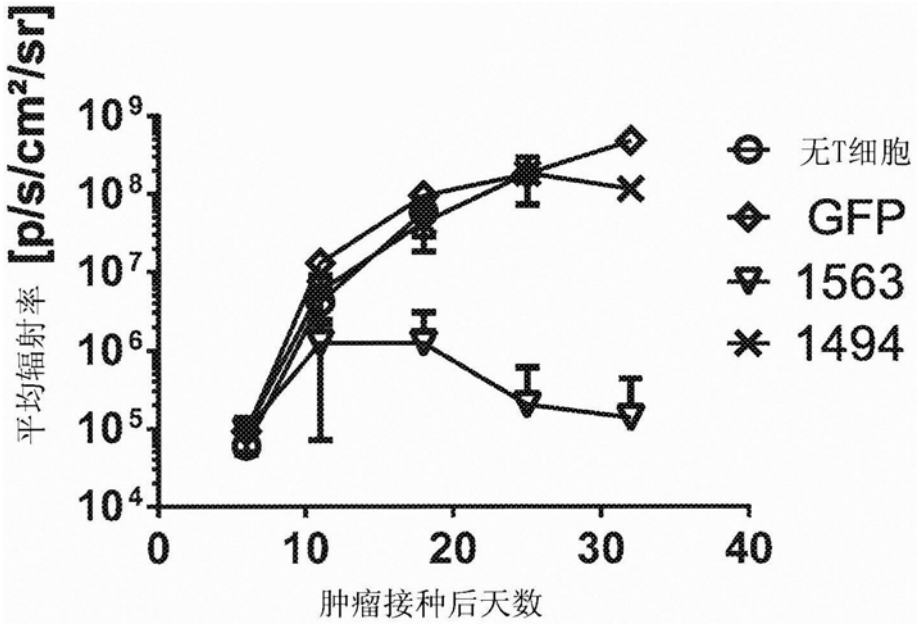

平均辐射率 [p/s/cm²/sr]
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
0
10
20
30
40
肿瘤接种后天数
无T细胞
GFP
1563
1494

图11A

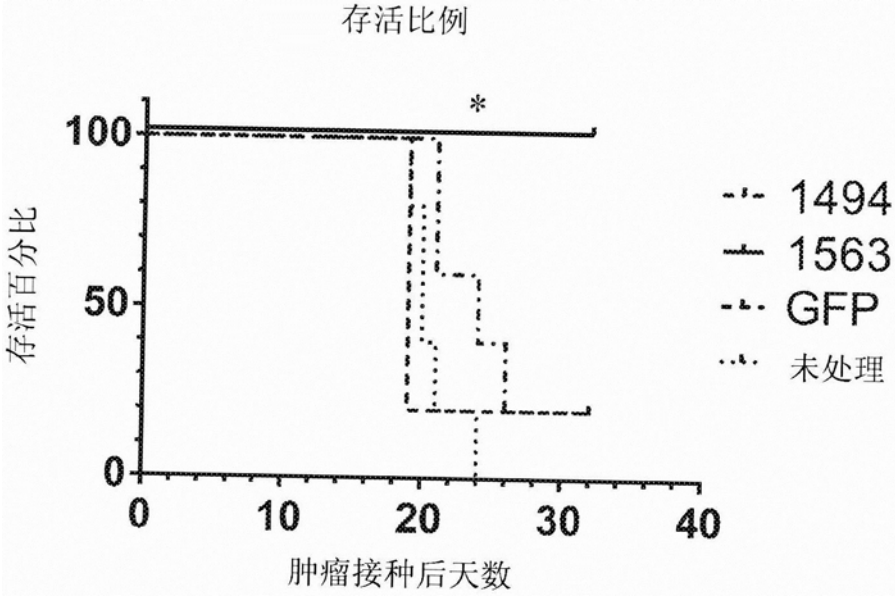


图11B