



(43) 申请公布日 2023.02.03

序列表23页 附图12页

特异的T细胞

T细胞表面上的CD3

抗CD3抗体

抗CD19抗体

B细胞表面上的CD19

B细胞

B细胞与T细胞的直接接触导致T细胞激活

激活的T细胞易于进行体内转移和外部遗传修饰

1. 一种在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括:
  - a) 施用多特异性抗体以使所述受试者中的免疫细胞更易转导;以及
  - b) 施用载体,任选地病毒载体;其中所述方法转导所述免疫细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19。
8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2或MCSP。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。
10. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第二抗原是髓样细胞或树突细胞抗原。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述第二抗原是CD33、DC-SIGN、CD11b、CD11c或CD18。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。
18. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。
19. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中与单独施用所述病毒载体相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。
20. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度( $EC_{50}$ )。
22. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。
23. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤a) 和/或步骤b) 包括皮下施用。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤a) 和/或步骤b) 包括淋巴管内施用。
25. 根据权利要求2所述的方法,其中所述载体是包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸的病毒载体。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。
27. 根据权利要求2所述的方法,其中所述载体是包含编码细胞因子受体的多核苷酸的病毒载体。
28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。
29. 根据权利要求25所述的方法,其中所述载体进一步包含一种或多种转基因。
30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述病毒载体包含编码TGF $\beta$ 显性负性受体的转基因。
31. 根据权利要求3所述的方法,其中所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。
32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。
33. 根据权利要求31所述的方法,其中将所述慢病毒载体用科卡尔病毒包膜蛋白假型化。
34. 根据权利要求31所述的方法,其中将所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。
35. 根据权利要求34所述的方法,其中将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。
36. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤a) 或步骤b) 包括静脉内施用。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中步骤a) 和步骤b) 两者都包括静脉内施用。
38. 根据权利要求36或37所述的方法,其中将所述多特异性抗体以约0.001mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。
39. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGF $\beta$ 显性负性受体的转基因。
40. 一种在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括:
- a) 施用编码多特异性抗体的多核苷酸以激活所述受试者中的免疫细胞;以及
  - b) 施用载体,任选地病毒载体;
- 其中所述方法转导所述免疫细胞。
41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述编码多特异性抗体的多核苷酸是RNA。
42. 根据权利要求40所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。
43. 根据权利要求40所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体。
44. 根据权利要求42所述的方法,其中所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。
45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。

46. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述第二抗原是CD19。

48. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2、MCSP、CD22、CD79a、CD79b或sIgM。

49. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。

50. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述第二抗原是淋巴结抗原。

51. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述多特异性抗体是三特异性抗体。

52. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。

56. 根据权利要求40-55中任一项所述的方法, 其中所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。

57. 根据权利要求40-55中任一项所述的方法, 其中与施用媒介物对照相比, 所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。

58. 根据权利要求40-55中任一项所述的方法, 其中所述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。

59. 根据权利要求40-55中任一项所述的方法, 其中与单独施用所述病毒载体相比, 所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。

60. 根据权利要求40-55中任一项所述的方法, 其中所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。

61. 根据权利要求60所述的方法, 其中所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度( $EC_{50}$ )。

62. 根据权利要求60所述的方法, 其中所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。

63. 根据权利要求40所述的方法, 其中步骤a) 和/或步骤b) 包括皮下施用。

64. 根据权利要求40所述的方法, 其中步骤a) 和/或步骤b) 包括淋巴管内施用。

65. 根据权利要求40所述的方法, 其中步骤a) 和/或步骤b) 包括静脉内施用。

66. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述病毒载体包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。

68. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述病毒载体包含编码细胞因子受体的多核苷酸。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。

70. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激

分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白，所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。

71. 根据权利要求70所述的方法，其中一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。

72. 根据权利要求40所述的方法，其中所述载体进一步包含一种或多种转基因。

73. 根据权利要求72所述的方法，其中所述病毒载体包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。

74. 根据权利要求43所述的方法，其中将所述慢病毒载体用科卡尔病毒包膜蛋白假型化。

75. 根据权利要求43所述的方法，其中将所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。

76. 根据权利要求75所述的方法，其中将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。

77. 根据权利要求43所述的方法，其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合，其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体，并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

78. 一种用于体内转导免疫细胞的组合法，其包含多特异性抗体和载体，任选地病毒载体。

79. 一种药物组合物，其包含多特异性抗体和载体，任选地病毒载体。

80. 一种试剂盒，其包含1) 多特异性抗体和2) 载体，任选地病毒载体。

81. 一种试剂盒，其包含1) 编码多特异性抗体的多核苷酸和2) 载体，任选地病毒载体。

82. 根据权利要求80或81所述的试剂盒，其用于：

a) 在有需要的受试者中转导免疫细胞；和/或

b) 治疗有需要的受试者的疾病或障碍。

83. 一种治疗有需要的受试者的疾病或障碍的方法，其包括：

a) 施用多特异性抗体以激活所述受试者中的免疫细胞；以及

b) 在步骤a) 之前、之后和并行地施用载体，任选地病毒载体。

84. 根据权利要求83所述的方法，其中所述方法转导所述免疫细胞。

85. 根据权利要求83或84所述的方法，其中所述疾病或障碍是癌症。

86. 根据权利要求83或84所述的方法，其中所述疾病或障碍是血液恶性肿瘤。

87. 根据权利要求86所述的方法，其中所述血液恶性肿瘤是B细胞淋巴瘤。

88. 根据权利要求85所述的方法，其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比，所述方法更快地治疗所述疾病或障碍。

89. 根据权利要求85所述的方法，其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比，所述方法导致对所述疾病或障碍的更好的治疗结果。

90. 根据权利要求85所述的方法，其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合，其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体，并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

91. 根据权利要求87所述的方法，其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所

述载体相比,所述方法导致所述受试者中的恶性B细胞的更快耗尽。

92. 根据权利要求87所述的方法,其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致所述受试者中较低数量的残留恶性B细胞和/或较低的B细胞淋巴瘤复发率。

## 双特异性转导增强子

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月30日提交的美国临时专利申请序列号62/968,028的权益,将其内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 电子提交的文本文件的说明

[0004] 将与此一起以电子方式提交的文本文件的内容通过引用以其整体并入本文:序列表的计算机可读格式拷贝(文件名:UM0J-004\_01W0\_SeqList\_ST25.txt,创建日期:2021年1月27日,文件大小:39.7千字节)。

### 技术领域

[0005] 本公开文本总体上涉及体内转导免疫细胞以治疗癌症和/或血液恶性肿瘤。

### 背景技术

[0006] 细胞疗法通常采用离体转导免疫细胞以产生待引入患者的治疗性细胞群。例如,可以用编码嵌合抗原受体的载体离体转导来自自体或同种异体来源的T细胞。然后将所得CAR T细胞输注到患者中。

[0007] 希望改为通过将载体递送至患者体内产生治疗性细胞。目前体内转导免疫细胞的方法效率低。本公开文本提供了与体内转导免疫细胞以治疗癌症和/或血液恶性肿瘤相关的组合物和方法。

### 发明内容

[0008] 本公开文本提供了在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括a)施用多特异性抗体以使所述受试者中的免疫细胞更易转导;以及b)施用载体,任选地病毒载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,所述方法转导所述免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。

[0009] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。在一些实施方案中,所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2或MCSP。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。在一些实施方案中,所述第二抗原是髓样细胞或树突细胞抗原。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD33、DC-SIGN、CD11b、CD11c或CD18。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。在一些实施方案中,所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。在一些实施方案中,所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。

[0010] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。在一些实施方案中,与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。在一些实施方案中,所

述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。在一些实施方案中,与单独施用所述病毒载体相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。在一些实施方案中,所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。在一些实施方案中,所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度(EC50)。在一些实施方案中,所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。

[0011] 在一些实施方案中,所述载体是包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸的病毒载体。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。在一些实施方案中,所述载体是包含编码细胞因子受体的多核苷酸的病毒载体。在一些实施方案中,所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。在一些实施方案中,所述载体进一步包含一种或多种转基因。在一些实施方案中,所述病毒载体包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。在一些实施方案中,所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。在一些实施方案中,将所述慢病毒载体用科卡尔(Cocal)病毒包膜蛋白假型化。在一些实施方案中,将所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。在一些实施方案中,将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。

[0012] 在一些实施方案中,所述转导免疫细胞的方法的步骤a)和/或步骤b)包括皮下施用。在一些实施方案中,步骤a)和/或步骤b)包括淋巴管内施用。在一些实施方案中,步骤a)或步骤b)包括静脉内施用。在一些实施方案中,步骤a)和步骤b)两者都包括静脉内施用。在一些实施方案中,将所述多特异性抗体以约0.001mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。

[0013] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0014] 本公开文本提供了在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括:a)施用编码多特异性抗体的多核苷酸以激活所述受试者中的免疫细胞;以及b)施用载体,任选地病毒载体。在一些实施方案中,所述方法转导所述免疫细胞。在一些实施方案中,所述编码多特异性抗体的多核苷酸是RNA。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。在一些实施方案中,所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2、MCSP、CD22、CD79a、CD79b或sIgM。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。在一些实施方案中,所述第二抗原是淋巴结抗原。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是三特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。在一些实施方案中,所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。在一些实施方案中,所述CD19 x

CD3 BiTE是博纳吐单抗。在一些实施方案中,所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。在一些实施方案中,与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。在一些实施方案中,所述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。在一些实施方案中,与单独施用所述病毒载体相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。在一些实施方案中,所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。在一些实施方案中,所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度(EC50)。在一些实施方案中,所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。在一些实施方案中,步骤a)和/或步骤b)包括皮下施用。在一些实施方案中,步骤a)和/或步骤b)包括淋巴管内施用。在一些实施方案中,其中步骤a)和/或步骤b)包括静脉内施用。在一些实施方案中,所述病毒载体包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。在一些实施方案中,所述病毒载体包含编码细胞因子受体的多核苷酸。在一些实施方案中,所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。在一些实施方案中,所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。在一些实施方案中,所述载体进一步包含一种或多种转基因。在一些实施方案中,所述病毒载体包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。在一些实施方案中,将所述慢病毒载体用科卡尔(Cocal)病毒包膜蛋白假型化。在一些实施方案中,将所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。在一些实施方案中,将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。在一些实施方案中,所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0015] 本公开文本提供了用于体内转导免疫细胞的组合疗法,其包含多特异性抗体和载体,任选地病毒载体。

[0016] 本公开文本提供了药物组合物,其包含多特异性抗体和载体,任选地病毒载体。

[0017] 本公开文本提供了试剂盒,其包含1)多特异性抗体和2)载体,任选地病毒载体。本公开文本还提供了试剂盒,其包含1)编码多特异性抗体的多核苷酸和2)载体,任选地病毒载体。在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒用于:a)在有需要的受试者中转导免疫细胞;和/或b)治疗有需要的受试者的疾病或障碍。

[0018] 本公开文本提供了治疗有需要的受试者的疾病或障碍的方法,其包括:a)施用多特异性抗体以激活所述受试者中的免疫细胞;以及b)在步骤a)之前、之后和并行地施用载体,任选地病毒载体。在一些实施方案中,所述方法转导所述免疫细胞。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是癌症。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法更快地治疗所述疾病或障碍。在一些实施方案中,与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致对所述疾病

或障碍的更好的治疗结果。在一些实施方案中,多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。在一些实施方案中,与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致所述受试者中的恶性B细胞的更快耗尽。在一些实施方案中,与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致所述受试者中较低数量的残留恶性B细胞和/或较低的B细胞淋巴瘤复发率。

## 附图说明

[0019] 图1描绘了博纳吐单抗与病毒载体共施用的实施方案。

[0020] 图2A示出了在对与B细胞以50:50比率培养的原代T细胞进行的实验中测量CD25+T细胞的流式细胞术。

[0021] 图2B示出了在对培养的原代T细胞进行的实验中测量CD25+T细胞的流式细胞术。

[0022] 图3A示出了在对与B细胞以50:50比率培养的原代T细胞进行的实验中测量表达抗CD19嵌合抗原受体的T细胞的流式细胞术。

[0023] 图3B示出了在对培养的原代T细胞进行的实验中测量表达抗CD19嵌合抗原受体的T细胞的流式细胞术。

[0024] 图4示出了在博纳吐单抗的存在下培养细胞后B细胞与T细胞的比率的图。

[0025] 图5A示出了对于在培养物中产生并维持的抗CD19CAR-TGFβT细胞的流动检测组套(flow panel)验证和门控策略。

[0026] 图5B示出了对于在CD34人源化小鼠中产生的抗CD19CAR-TGFβT细胞的流动检测组套验证和门控策略。

[0027] 图6示出了在博纳吐单抗施用后CD4+T细胞(左)和CD8+T细胞(右)的瞬时激活的条形图。

[0028] 图7是示出在慢病毒和/或博纳吐单抗施用后B细胞的数量随时间变化的图。

[0029] 图8示出了在研究第33天从小鼠收集的血样的代表性流式细胞术图。所述图对CD3+活单线态(singlet)门控。细胞内抗2A肽染色被包括在检测组套中作为用于检测CAR的可替代方法。

[0030] 图9示出在研究第52天收获的来自所指示的研究组的脾和骨髓样品的对活单线态门控的代表性流式细胞术图。

## 具体实施方式

[0031] 本公开文本提供了与使用多特异性抗体以促进载体中基因工程化的目标细胞的产生相关的组合物和方法。在一些实施方案中,多特异性抗体的使用改进了载体的体内转导效率。在一些实施方案中,在向受试者施用载体之前、并行地或之后向受试者施用一种或多种多特异性抗体时,可以增强受试者中目标细胞的转导。

[0032] 不希望受任何特定理论的束缚,设想根据本公开文本的多特异性抗体可以通过一种或多种作用机制发挥其作用,所述作用机制包括但不限于:(i)刺激目标细胞(例如免疫细胞)进入更激活和/或更增殖的状态。这可以增加载体的转导效率。当目标细胞处于活性/

增殖状态时,病毒载体进入和有效负荷递送通常更高效。(ii)使免疫细胞退出细胞周期的G<sub>0</sub>阶段。(iii)使免疫细胞复制至少一次。(iv)增加免疫细胞的代谢适应性。(v)将增加数量的免疫细胞吸引到生理相关位点(例如淋巴结)。

[0033] 因此,本文所述的方法和组合物可以用于转导显著更多的细胞和/或在较低有效浓度的载体下转导相同数量的细胞。本公开文本的组合物和方法可以促进将载体直接施用于需要治疗的受试者。此外,通过降低载体在体内有效的浓度,本公开文本的组合物和方法可以限制由于载体毒性或脱靶转导引起的副作用。因此,本公开文本提供了更安全和更有效的基因疗法。

[0034] 多特异性抗体

[0035] 术语多特异性抗体是指具有两个或更多个抗原结合结构域,例如两个(双特异性)或三个(三特异性)或四个(四特异性)结合结构域的抗体分子。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是三特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是具有多于三种(例如,四种、五种……)特异性的构建体。

[0036] 本公开文本的多特异性抗体分子可以由本领域已知的各种抗体片段构建。例如,双抗体是由ScFv片段的非共价二聚体构成的双特异性抗体分子,而F(ab')<sub>2</sub>是由通过铰链区连接的2个Fab片段构成的双特异性抗体分子。因此,技术人员将意识到,不同的抗体片段可以以各种组合布置以产生双特异性或多特异性抗体分子。

[0037] 各种多特异性和/或双特异性形式包括重组IgG样双靶向分子,其中所述分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的一部分;IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的部分偶联;Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定化的双抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分偶联;Fab融合分子,其中不同的Fab片段偶联在一起;基于ScFv和双抗体的抗体和重链抗体(例如,结构域抗体、纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体(例如结构域抗体、纳米抗体)彼此偶联或与另一蛋白质或载体分子偶联;或通过臂交换产生的多特异性抗体。示例性的多特异性和/或双特异性形式包括双靶向分子,包括双靶向(DT)-Ig(GSK/Domantis)、二合一抗体(Genentech)和mAb2(F-Star)、双可变结构域(DVD)-Ig(Abbott)、Ts2Ab(MedImmune/AZ)和BsAb(Zymogenetics)、HERCULES(Biogen Idec)和TvAb(Roche)、ScFv/Fc融合物(Academic Institution)、SCORPION(Emergent BioSolutions/Trubion、Zymogenetics/BMS)和双亲和重靶向技术(Fc-DART)(MacroGenics)、F(ab)<sub>2</sub>(Medarex/AMGEN)、双效(Dual-Action)或Bis-Fab(Genentech)、对接和锁定(Dock-and-Lock)(DNL)(ImmunoMedics)、二价双特异性(Bivalent Bispecific)(Biotechnol)和Fab-Fv(UCB-Celltech)、双特异性T细胞衔接器(BITE)(Micromet)、串联双抗体(Tandab)(Affimed)、双亲和性重靶向技术(DART)(MacroGenics)、单链双抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合物(Merrimak)和COMBODY(Epigen Biotech)、双靶向纳米抗体(Ablynx)、双靶向仅重链的结构域抗体。例如在Chames和Baty(2009)Curr Opin Drug Disc Dev 12:276以及Nunez-Prado等人,(2015)Drug Discovery Today 20(5):588-594中已经描述了不同形式的双特异性抗体。

[0038] 三特异性或四特异性抗体形式的例子包括但不限于Fab3、三抗体(triobody)、四

抗体、三抗体(tribody)、DVD-Ig、IgG-scFv、ScFv2-Fc、tandAb和DNL-Fab3。

[0039] 在一些实施方案中,本公开文本的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)包含针对选自下表1的两种抗原的组的特异性抗原结合结构域(每个“X”标记指示组合):

[0040] 表1

[0041]

|             | CD<br>3 | CD<br>4 | CD<br>8 | CTLA-<br>4 | TC<br>R | CD1<br>6 | CD2<br>5 | CD2<br>8 | CD6<br>4 | CD8<br>9 | NKG2<br>D | NKp4<br>6 |
|-------------|---------|---------|---------|------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| CD19        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| EpCAM       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD20        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD123       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| BCMA        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| B7-H3       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CDE         | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| PSMA        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| Her2/neu    | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| EGFR        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD66e       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD33        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| EphA2       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| MCSP        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD22        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD79a       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD79b       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| sIgM        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| DC-SIG<br>N | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD11b       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD11c       | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |
| CD18        | X       | X       | X       | X          | X       | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         |

[0042] 双特异性抗体

[0043] 如本文所采用的双特异性抗体分子是指具有两个抗原结合结构域分子,其可以结合不同的抗原。双特异性抗体形式的例子包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE)、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')-ScFv2、双scFv、双抗体、微型抗体、scFv-Fc、DART、TandAb、ScDiabody、ScDiabody-CH3、双抗体-CH3、三抗体、微型抗体(miniantibody)、TriBi微型抗体、ScFv-CH3KIH(杵臼结构)、Fab-ScFv、SCFv-CH-CL-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、胞内抗体、对接和锁定抗体、ImmTAC、HSAbody、ScDiabody-HAS、humabody和串联ScFv-毒素(参见例如Christoph Spiess等人,Molecular Immunology 67 (2015) 第95-106页)。

[0044] 多特异性抗体的至少两个结合结构域和可变结构域(VH/VL)可以包含肽接头(间隔肽)。根据本公开文本,术语“肽接头”包含这样的氨基酸序列,本公开文本的抗体构建体的一个(可变和/或结合)结构域和另一个(可变和/或结合)结构域的氨基酸序列通过所述氨基酸序列彼此连接。肽接头还可以用于将第三结构域融合至本公开文本的抗体构建体的其他结构域。这种肽接头的基本技术特征在于它不包含任何聚合活性。其中,合适的肽接头是美国专利号4,751,180和4,935,233或W0 88/09344中披露的那些。肽接头也可以用于将其他结构域或模块或区域(诸如半衰期延长结构域)附接至本公开文本的抗体构建体。说明性的双特异性单链抗体构建体描述于W0 99/54440;Mack,J.Immunol.(1997),158,3965-

3970;Mack,PNAS,(1995),92,7021-7025;Kufer,Cancer Immunol.Immunother.,(1997),45,193-197;Löffler,Blood,(2000),95,6,2098-2103;Brühl,Immunol.,(2001),166,2420-2426;Kipriyanov,J.Mol.Biol.,(1999),293,41-56中。

[0045] 二价(bivalent)(也称为二价(divalent))或双特异性单链可变片段(具有形式(scFv)<sub>2</sub>的双scFv(bi-scFv)或双scFv(di-scFv))可以通过连接两个scFv分子(例如,用如上文所述的接头)进行工程化。如果这两个scFv分子具有相同的结合特异性,则所得(scFv)<sub>2</sub>分子将优选被称为二价的(即它对于相同的目标表位具有两个效价)。如果两个scFv分子具有不同的结合特异性,则所得(scFv)<sub>2</sub>分子将优选被称为双特异性的。连接可以通过产生具有两个VH区和两个VL区的单个肽链从而产生串联scFv来进行(参见例如Kufer P.等人,(2004)Trends in Biotechnology 22(5):238-244)。另一种可能性是产生具有接头肽的scFv分子,所述接头肽对于两个可变区太短而使其不能折叠在一起(例如约五个氨基酸),迫使scFv二聚化。这种类型被称为双抗体(参见例如Hollinger,Philipp等人,(1993年7月)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(14):6444-8)。

[0046] 根据本公开文本,第一结构域、第二结构域或第一结构域和第二结构域可以分别包含单结构域抗体、可变结构域或至少单结构域抗体的CDR。单结构域抗体仅包含一个(单体)抗体可变结构域,所述抗体可变结构域能够独立于其他V区或结构域与特定性抗原选择性地结合。第一单结构域抗体是从骆驼科中发现的重链抗体工程化的,并且这些抗体被称为VHH片段。软骨鱼类也具有重链抗体(IgNAR),从其中可以获得被称为VNAR片段的单结构域抗体。一种可替代的方法是将来自普通免疫球蛋白(例如来自人或啮齿动物)的二聚体可变结构域分裂成单体,从而获得作为单结构域Ab的VH或VL。尽管对单结构域抗体的大多数研究目前是基于重链可变结构域,但是也已经表明源自轻链的纳米抗体与目标表位特异性结合。单结构域抗体的例子被称为sdAb、纳米抗体或单可变结构域抗体。

[0047] 抗体构建体是否与另一给定抗体构建体竞争结合可以在竞争测定(诸如竞争ELISA或基于细胞的竞争测定)中测量。也可以使用抗生物素蛋白偶联的微粒(珠粒)。类似于抗生物素蛋白包被的ELISA板,当与生物素化的蛋白质反应时,这些珠粒中的每一个都可以用作底物,在其上可以进行测定。将抗原包被到珠粒上,然后用第一抗体预包被。添加第二抗体并测定任何另外的结合。用于读出的可能手段包括流式细胞术。

[0048] 双特异性T细胞衔接器

[0049] “BiTE”通常是指具有两个抗原结合结构域的单多肽链分子,其中一个抗原结合结构域与免疫效应细胞抗原(例如,CD3)结合,并且第二抗原结合结构域与目标细胞表面上存在的抗原结合。

[0050] 在一些实施方案中,所述抗原结合结构域中的一个对免疫细胞(诸如在T细胞表面上表达的T细胞抗原,诸如CD3受体)是特异性的。在一些实施方案中,所述第二抗原结合结构域经由肿瘤特异性分子与肿瘤细胞结合。因此,BiTE能够在T细胞与肿瘤细胞之间形成连接,这是由于它们对T细胞上的抗原和肿瘤细胞上的抗原的特异性。这导致T细胞的激活,并且可以触发T细胞对肿瘤细胞发挥其细胞毒性作用,而与MHC I或共刺激分子无关。目前批准的或正在进行临床试验的基于BiTE的疗法的例子包括例如博纳吐单抗(Blynicyto®),其靶向CD19并用于治疗非霍奇金淋巴瘤和急性成淋巴细胞性白血病,和索利托单抗,其靶向

EpCAM并用于治疗胃肠癌和肺癌。

[0051] 在一些实施方案中,本公开文本中描述的双特异性抗体是对目的T细胞上的至少一种表面抗原具有特异性的BiTE。T细胞表面抗原的例子包括但不限于:CD3、CD2、VLA-1、CD8、CD4、CCR6、CXCR5、CD25、CD31、CD45RO、CD197、CD127、CD38、CD27、CD196、CD277和CXCR3,特别是CD2、CD3、CD31和CD277。

[0052] 已经针对各种目标抗原构建BiTE分子,所述目标抗原包括CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e (或CEA、CEACAM5)、CD33、EphA2、MCSP (或HMW-MAA)、CD22、CD79a、CD79b和sIgM。BiTE分子通常作为由高等真核细胞系分泌的重组糖基化蛋白产生。

[0053] 在一些实施方案中,本公开文本的BiTE由通过接头偶联在一起的非目标细胞抗原结合片段和目标免疫细胞抗原结合片段构成。免疫细胞包括例如自然杀伤(NK)细胞、包括细胞毒性T细胞的T细胞或B细胞,但髓系的细胞也可以被认为是免疫细胞,诸如单核细胞或巨噬细胞、树突细胞和中性粒细胞。因此,在各种实施方案中,所述免疫细胞是NK细胞、T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或中性粒细胞。如在此相关的,所述免疫细胞可以是任何希望体内转导的目标细胞,BiTE具有增加病毒对所述免疫细胞的转导效率的作用。为了避免非特异性相互作用,可以选择识别免疫效应细胞上的抗原的双特异性抗体,与体内的其他细胞相比,这些免疫效应细胞至少过量表达所述抗原。此类抗原可以包括但不限于CD3、CD16、CD25、CD28、CD64、CD89、NKG2D和Nkp46。在一些实施方案中,所述免疫效应细胞抗原是T细胞抗原。在一些实施方案中,所述免疫效应细胞抗原是CD3。因此,在一些实施方案中,本公开文本的BiTE由通过接头偶联在一起的抗原结合片段和抗CD3抗原结合片段构成。

[0054] 多特异性抗体的第一抗原

[0055] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原结合结构域与免疫细胞抗原结合。在一些实施方案中,所述免疫细胞抗原是T细胞抗原。在一些实施方案中,所述T细胞抗原选自CD3、CD4、CD8和TCR。

[0056] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原是CD3。CD3受体复合物是蛋白质复合物,并且由四条链构成。在哺乳动物中,所述复合物含有CD3 $\gamma$  (gamma) 链、CD3 $\delta$  (delta) 链和两条CD3 $\epsilon$  (epsilon) 链。这些链与T细胞受体(TCR) 和所谓的 $\zeta$  (zeta) 链缔合形成T细胞受体CD3复合物并在T淋巴细胞中产生激活信号。CD3 $\gamma$  (gamma) 链、CD3 $\delta$  (delta) 链和CD3 $\epsilon$  (epsilon) 链是免疫球蛋白超家族的含有单个胞外免疫球蛋白结构域的高度相关细胞表面蛋白。CD3分子的胞内尾含有单个保守基序,所述保守基序被称为免疫受体酪氨酸激活基序或简称ITAM,其是TCR的信号传导能力所必需的。CD3 $\epsilon$  分子是在人体中由位于11号染色体上的CD3E基因编码的多肽。在一些实施方案中,所述第一抗原是CD3 $\epsilon$ 。在一些实施方案中,所述抗原表位包含人CD3 $\epsilon$  胞外结构域的氨基酸残基1-27。

[0057] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原是CD4 (分化簇4)。CD4是免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白,其在发育中的胸腺细胞、主要组织相容性II类(II类MHC) 限制性成熟T淋巴细胞上表达,并且在人体中在巨噬细胞/单核细胞谱系的细胞上表达。在淋巴细胞上,CD4在胸腺细胞个体发育期间和在成熟T细胞的功能中起关键作用。CD4与充当T细胞抗原受体(TCR) 的共受体的II类MHC的非多态性区结合。它增加胸腺细胞与抗原呈递细胞之间的亲合力,并且通过与Src样蛋白酪氨酸激酶p56lck的缔合直接促成信号转导。CD4也是

人和猿猴免疫缺陷病毒 (HIV-1、HIV-2和SIV) 的共受体。具体地,CD4是人类免疫缺陷病毒 (HIV) -gp120糖蛋白的受体。临床上,CD4抗体可以用于实现对移植物和植入物的免疫耐受;治疗自身免疫疾病和免疫缺陷相关障碍,例如像狼疮、糖尿病、类风湿性关节炎等;治疗表达CD4的白血病和淋巴瘤;以及治疗HIV感染。

[0058] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原是CD8 (分化簇8)。CD8是主要在细胞毒性T淋巴细胞上表达的细胞表面糖蛋白,但也在树突细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的子集上表达。所述糖蛋白由两种亚型 $\alpha$ 和 $\beta$ 组成,它们由不同基因编码,并表达为 $\alpha\alpha$ 同二聚体或 $\alpha\beta$ 异二聚体,以后者为主。CD8共受体稳定T细胞受体MHC-1相互作用,并经由淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (Lck) 磷酸化CD3相关的免疫受体酪氨酸激活基序 (ITAM) 启动胞内信号传导以便激活。全长人CD8 $\alpha$ 的氨基酸序列在UniProt中以登录号P01732提供。人全长CD8 $\beta$ 的氨基酸序列在UniProt中以登录号P10966提供。术语“CD8”包括全长CD8 $\alpha$ 或CD8 $\beta$ 、重组CD8、其片段及其融合物。所述术语还包括CD8 $\alpha$ 或CD8 $\beta$ 或其片段,其与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或信号序列偶联。

[0059] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原是CTLA-4 (细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)。CTLA-4 (也被称为CD152) 是一种形成二硫化物连接的同二聚体的单程I型膜蛋白。已经表征了编码不同亚型的可替代的剪接变体,包括充当单体的可溶性亚型。CTLA-4的表面表达受到向细胞表面的限制性运输和快速内化的紧密调节。CTLA-4的胞外区包含单个胞外Ig (V) 结构域,随后是跨膜 (TM) 区和小胞内胞质尾 (约37个氨基酸)。胞内尾含有两个基于酪氨酸的基序,它们与几种胞内蛋白相互作用,所述胞内蛋白包括脂质激酶磷脂酰肌醇3-激酶 (PI3K)、磷酸酶SHP-2和PP2A以及网格蛋白衔接蛋白AP-1和AP-2。CTLA4与CD28同源,并且与CD28类似,与配体CD80 (B7-1) 和CD86 (B7-2) 结合。然而,与CD28不同,CTLA4与B7的结合不产生刺激信号,而是阻止通常由CD28提供的共刺激信号。当幼稚T效应细胞通过其T细胞受体 (TCR) 被激活时,CTLA-4被募集到细胞表面并与CD28 (在T细胞上组成型表达) 竞争CD80/CD86,由此切断通过TCR的进一步信号传导并因此下调通过TCR信号传导的任何进一步的T细胞应答。因此,CTLA-4充当T效应细胞激活的负调节因子,其减弱效应功能并决定T细胞应答的功效和持续时间。此外,CTLA-4可以在增强调节性T细胞在对于癌症的免疫应答上的负面作用中起作用。CTLA-4对B7家族成员的亲和力比对CD28的亲和力高得多,因此其在T细胞上的表达决定了T细胞的显性负调节。据报道,阻断CTLA-4增强了T细胞应答。

[0060] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第一抗原是T细胞受体 (TCR)。TCR是膜蛋白的复合物,其响应于抗原的呈递而参与T细胞的激活。TCR负责识别与主要组织相容性复合体 (MHC) 分子结合的抗原。TCR由 $\alpha$  (alpha) 链和 $\beta$  (beta) 链的异二聚体构成,尽管在一些细胞中,TCR由 $\gamma$  (gamma) 和 $\delta$  (delta) 链组成。TCR可以以 $\alpha/\beta$ 和 $\gamma/\delta$ 形式存在,它们在结构上类似但具有不同的解剖学位置和功能。在一些实施方案中,TCR可以在任何包含TCR的细胞上被修饰,所述细胞包括例如辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。TCR与抗原和MHC的接合通过由相关酶、共受体和特化辅助分子介导的一系列生物化学事件导致其T淋巴细胞的激活。TCR的每条链是免疫球蛋白超家族的成员,并具有一个N末端免疫球蛋白 (Ig) -可变 (V) 结构域、一个Ig-恒定 (C) 结构域、跨膜/细胞跨膜区和在C末端的短胞质尾。TCR $\alpha$ 链和TCR $\beta$ 链两者的可变区都具有三个高变区或互补决定区 (CDR)。TCR结构域的恒定结构域由短连接序列组成,其中半胱氨酸残基形成二硫键,在这两

条链之间形成连接。所述结构允许TCR与哺乳动物中具有三条不同链( $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ )的其他分子如CD3和 $\zeta$ 链缔合。这些辅助分子具有带负电荷的跨膜区,并且对于将信号从TCR传播到细胞中是至关重要的。CD3-和 $\zeta$ -链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。来自T细胞复合物的Rhe信号通过经由特异性共受体与MHC分子的同时结合而增强。在辅助性T细胞上,此共同受体是CD4(对II类MHC特异);而在细胞毒性T细胞上,此共同受体是CD8(对I类MHC特异)。所述共同受体不仅确保TCR对抗原的特异性,而且允许抗原呈递细胞与T细胞之间的长期接合,并在细胞内募集参与激活的T淋巴细胞的信号传导的必需分子(例如,LCK)。因此,术语“T细胞受体”以常规意义使用,意指当被MHC分子呈递时能够识别肽的分子。

[0061] 多特异性抗体的第二抗原

[0062] 在一些实施方案中,多特异性抗体的第二抗原结合结构域与存在于免疫效应细胞靶向的细胞(例如,肿瘤细胞)的表面上的抗原结合。在一些实施方案中,所述第二抗原选自CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3和PSMA。在一些实施方案中,所述第二抗原选自CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2、MCSP、CD22、CD79a、CD79b和sIgM。在一些实施方案中,所述第二抗原是CD19。

[0063] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是EpCAM(上皮细胞粘附分子)。EpCAM(也称为CD326或“肿瘤相关钙信号转导蛋白1”)是指40kDa的I型跨膜糖蛋白,其由两个表皮生长因子样胞外结构域、半胱氨酸贫乏区、跨膜结构域和短胞质尾组成。人EpCAM由4号染色体的长臂上的GA733-2基因编码,并参与细胞至细胞的粘附。EpCAM在大多数上皮组织上表达。EpCAM的序列在本领域中是熟知的。人EpCAM是与各种来源的癌相关的人细胞表面糖蛋白抗原,所述癌包括结直肠癌、胰腺癌、头颈癌、卵巢癌、肺癌、宫颈癌、前列腺癌和乳腺癌。恶性细胞增殖通常总是与肿瘤发展的某一阶段的EpCAM表达相关,并且高水平的EpCAM表达与细胞分化负相关。已经表明高水平的EpCAM表达与乳腺癌患者中的低存活率相关。

[0064] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD19(分化簇19)。CD19是在白血病前体细胞上可检测到的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库(诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot)中找到。例如,人CD19的氨基酸序列可以以UniProt/Swiss-Prot登录号P15391找到,并且编码人CD19的核苷酸序列可以以登录号NM\_001178098找到。CD19在大多数B谱系癌症中表达,所述B谱系癌症包括例如急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤。CD19也是B细胞祖细胞的早期标记物。在一些实施方案中,CD19蛋白在癌细胞上表达。在一些实施方案中,“CD19”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0065] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD20。CD20也被称为B淋巴细胞CD20抗原、MS4A1、B淋巴细胞表面抗原B1、Bp35或白细胞表面抗原Leu-16。术语CD20包括人CD20(AH003353;GenBank登录号M27395、J03574)。人CD20的主要形式包括GenBank Protein ID 23110989所述的297氨基酸蛋白质。CD20序列的例子包括但不限于NCBI参考号NP\_068769.2和NP\_690605.1。CD20表达在淋巴瘤(例如B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞白血病上见到。此类淋巴瘤和淋巴细胞白血病包括例如a)滤泡性淋巴瘤,b)小无裂细胞淋巴瘤/伯基特淋巴瘤(包括地方性伯基特淋巴瘤、偶发性伯基特淋巴瘤和非伯基特淋巴瘤),c)边缘区淋巴瘤(包括结外边缘区B细胞淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织淋巴瘤,MALT)、结

内边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤), d) 套细胞淋巴瘤 (MCL), e) 大细胞淋巴瘤 (包括B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤 (DLCL)、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、血液中心性淋巴瘤-肺B细胞淋巴瘤), f) 毛细胞白血病, g) 淋巴细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症, h) 急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病, i) 浆细胞瘤、浆细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤, j) 霍奇金病。在一些实施方案中, 表达CD20的癌症是B细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。在一些实施方案中, 表达CD20的癌症是套细胞淋巴瘤 (MCL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤 (DLCL)、伯基特淋巴瘤、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增殖性障碍 (PTLD)、HIV相关淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症或原发性CNS淋巴瘤。在一些实施方案中, “CD20” 包括包含突变的蛋白质, 所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0066] 在一些实施方案中, 所述多特异性抗体的第二抗原是CD123。CD123也被称为分化簇123、白细胞介素-3受体 $\alpha$ 链和IL3RA。CD123是I型跨膜糖蛋白, 具有包含预测的Ig样结构域和两个FnIII结构域的胞外结构域。术语“CD123”可以指CD123的任何亚型。CD123优先在某些类型的多能干细胞和癌细胞如白血病癌细胞 (例如, 急性髓性白血病细胞) 上表达。在一些实施方案中, “CD123” 包括包含突变的蛋白质, 所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0067] 在一些实施方案中, 所述多特异性抗体的第二抗原是BCMA。术语“BCMA”是指B细胞成熟抗原。BCMA (也被称为TNFRSF17、BCM或CD269) 是肿瘤坏死受体 (TNFR) 家族的成员, 并且主要在终末分化的B细胞 (例如, 记忆B细胞) 和浆细胞上表达。其配体被称为TNF家族的B细胞激活剂 (BAFF) 和增殖诱导配体 (APRIL)。BCMA参与介导浆细胞的存活以维持长期体液免疫。BCMA的基因在16号染色体上编码, 产生长度为994个核苷酸的初级mRNA转录物 (NCBI登录号NM\_001192.2), 所述初级mRNA转录物编码184个氨基酸的蛋白质 (NP\_001183.2)。已经描述了具有未知意义的另外的转录物变体 (Smirnova A S等人Mol Immunol., 2008, 45 (4): 1179-1183)。已经鉴定出第二亚型, 也被称为TV4 (Uniprot标识符Q02223-2)。如本文所用, “BCMA” 包括包含突变的蛋白质, 所述突变例如全长野生型BCMA的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。在一些实施方案中, BCMA在患者的恶性B细胞的细胞表面上表达。在一些实施方案中, “BCMA” 包括包含突变的蛋白质, 所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0068] 在一些实施方案中, 所述多特异性抗体的第二抗原是PSMA。PSMA也被称为前列腺特异性膜抗原或叶酸水解酶1 (FOLH1)。人PSMA的氨基酸序列可以以UniProt/Swiss-Prot登录号Q04609找到, 并且人PSMA的氨基酸序列的NCBI参考序列ID号是NP\_004467.1。PSMA是一种完整的、非脱落膜糖蛋白, 其在前列腺上皮细胞中高度表达, 并且是前列腺癌的细胞表面标记物。在一些实施方案中, “PSMA” 包括包含突变的蛋白质, 所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0069] 在一些实施方案中, 所述多特异性抗体的第二抗原是HER2/Neu。HER2/neu是185kDa受体蛋白, 其最初被鉴定为来自化学治疗大鼠的神经母细胞瘤的ERBB2转化基因的产物。HER2/neu由于其在几种人癌和哺乳动物发育中的作用而被广泛研究。人HER2/neu的序列可以在GenBank中以登录号X03363获得。HER2/neu包含四个结构域: 与配体结合的胞外

结构域;亲脂性跨膜结构域;保守的胞内酪氨酸激酶结构域;和具有几个可以被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号传导结构域。HER2/neu胞外结构域(ECD)的序列可在蛋白质数据库记录1S78(2004)中获得。HER2/neu充当生长因子受体,并通常由乳腺癌、卵巢癌或肺癌的癌细胞表达。HER2/neu在25%-30%的人乳腺癌和卵巢癌中过表达,并且其过表达与侵袭性临床进展和受影响的不良预后相关。在一些实施方案中,“Her2/Neu”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0070] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是EGFR。EGFR(也被称为人表皮生长因子受体,HER-1或ErbB1)是由c-erbB原癌基因编码的170kDa跨膜受体,并且表现出固有的酪氨酸激酶活性。SwissProt数据库条目P00533提供了EGFR的序列。还有EGFR的亚型和变体(例如,可替代的RNA转录物、截短型式、多态性等),包括但不限于由Swissprot数据库条目号P00533-1、P00533-2、P00533-3和P00533-4标识的那些。已知EGFR结合配体,所述配体包括 $\alpha$ 、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子- $\alpha$ (TGF-双调蛋白)、肝素结合EGF(hb-EGF)、 $\beta$ 细胞素和表皮调节素。EGFR经由酪氨酸激酶介导的信号转导途径调节许多细胞过程,包括但不限于控制细胞增殖、分化、细胞存活、细胞凋亡、血管生成、有丝分裂和转移的信号转导途径的激活。在一些实施方案中,“EGFR”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0071] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD33(分化簇33)。CD33是在白血病细胞上以及在髓系的正常前体细胞上可检测到的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库(诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot)中找到。例如,人CD33的氨基酸序列可以以UniProt/Swiss-Prot登录号P20138找到并且编码人CD33的核苷酸序列可以在登录号NM\_001772.3处找到。在一些实施方案中,CD33蛋白在癌细胞上表达。某些血液恶性肿瘤的特征在于CD33在恶性细胞表面上表达。CD33阳性血液恶性肿瘤包括但不限于急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞白血病、溶栓性白血病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生性障碍、顽固性贫血、白血病前期综合征、淋巴细胞白血病或未分化白血病。在一些实施方案中,“CD33”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0072] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是EphA2(肝配蛋白受体A2)。发现EphA2在各种癌症中过表达、突变或扩增。EphA2多肽的核苷酸和/或氨基酸序列可以在文献或公开的数据库中找到,或者所述核苷酸和/或氨基酸序列可以使用本领域技术人员已知的克隆和测序技术确定。例如,人EphA2的核苷酸序列可以在GenBank数据库中找到(参见例如,登录号BC037166、M59371和M36395)。人EphA2的氨基酸序列可以在GenBank数据库中找到(参见例如,登录号AAH37166和AAA53375)。在一些实施方案中,“EphA2”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0073] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖)。MCSP也被称为硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、硫酸软骨素蛋白聚糖NG2、高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)和黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖。示例性人MCSP的氨基酸序列以Genbank登录号:NP\_001888示出。MCSP是早期细胞表面黑色素瘤进展标记物,其涉及刺激肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭。在一些实施方案中,“MCSP”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0074] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD66e,其也被称为癌胚抗原(CEA)、癌胚抗原相关细胞粘附分子5(CEACAM5)或CD66。作为免疫球蛋白(Ig)家族成员,CD66e是具有六个Ig C2型结构域的糖基磷脂酰肌醇(GPI)-细胞表面锚定的糖蛋白。CD66e的表达可以在大量的上皮来源的肿瘤中找到。编码CEA的核苷酸和氨基酸序列在本领域中是已知的,并且通过已知方法可容易地检索到。人CEA的氨基酸序列在GenBank登录号NM\_004363中描绘。在一些实施方案中,“CD66e”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0075] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是B7-H3(也被称为CD276)。B7-H3是具有单程跨膜的免疫细胞调节分子的B7家族的成员。在人体中,B7-H3蛋白以两种形式表达:变体1在两个位点分别含有V样或C样Ig结构域,并且变体2在一个位点分别含有V样或C样Ig结构域。B7-H3的C末端胞内结构域含有45个氨基酸。B7-H3在包括以下的多种肿瘤细胞和肿瘤脉管系统的表面上表达:神经母细胞瘤、黑色素瘤、肾细胞癌、前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌和小细胞肺癌。B7-H3表达与卵巢癌、RCC、NSCLC、胰腺癌、前列腺癌和结肠癌中的不良预后相关,具有抑制细胞毒性淋巴细胞活性的潜在作用。在一些实施方案中,“B7-H3”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0076] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD22。CD22(也被称为SIGLEC-2(UniProt P20273))是一种在成熟B细胞上表达的细胞表面受体。CD22含有多个Ig结构域,并且是免疫球蛋白超家族的成员。CD22的胞外结构域与唾液酸部分(包括存在于CD45细胞表面蛋白上的那些)相互作用。认为CD22充当B细胞受体信号传导的抑制性受体。CD22在许多类型的恶性B细胞的表面上表达以及在正常成熟B淋巴细胞上表达,所述恶性B细胞包括但不限于急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、慢性B淋巴细胞(B-CLL)、B淋巴瘤细胞(诸如伯基特淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤)和毛细胞白血病。与CD20和CD 19一起,CD22的限制性B细胞表达使其成为治疗性治疗B细胞恶性肿瘤的靶标。CD22特异性抗体的例子是依普妥珠单抗。在一些实施方案中,“CD22”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0077] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD79a。CD79a是已知在一些恶性血液癌症细胞(例如,白血病细胞)上可检测到的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库(诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot)中找到。例如,人CD79a的氨基酸序列可以以登录号NP\_001774.1(亚型1前体)或NP\_067612.1(亚型2前体)找到,并且编码它们的mRNA序列可以以登录号NM\_001783.3(转录物变体1)或NM\_021601.3(转录物变体2)找到。在一些实施方案中,CD79a蛋白在癌细胞上表达。在一些实施方案中,所述多特异性抗体结合CD79a蛋白的胞外结构域内的抗原。在一些实施方案中,“CD79a”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0078] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD79b。CD79b是已知在一些恶性血液癌症细胞(例如,白血病细胞)上可检测到的抗原决定簇。人和鼠氨基酸和核酸序列可以在公共数据库(诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot)中找到。例如,人CD79b的氨基酸序列可以以登录号NP\_000617.1(亚型1前体)、NP\_067613.1(亚型2前体)或NP\_001035022.1(亚型3前体)找到,并且编码它们的mRNA序列可以以登录号NM\_000626.2(转录

物变体1)、NM\_021602.2 (转录物变体2) 或NM\_001039933.1 (转录物变体3) 找到。在一些实施方案中,CD79b蛋白在癌细胞上表达。在一些实施方案中,所述多特异性抗体结合CD79b蛋白的胞外结构域内的抗原。在一些实施方案中,“CD79b”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0079] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是sIgM。sIgM(表面免疫球蛋白M)典型地在B细胞上表达。在一些实施方案中,sIgM在癌细胞上表达。在一些实施方案中,所述多特异性抗体结合sIgM的胞外结构域内的抗原。在一些实施方案中,“sIgM”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0080] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是DC-SIGN。DC-SIGN(树突细胞特异性细胞间粘附分子-3-结合性非整合素)也被称为CD209(分化簇209),其是一种由人体中的CD209基因编码的蛋白质。DC-SIGN是存在于巨噬细胞和树突细胞两者的表面上的C型凝集素受体。巨噬细胞上的DC-SIGN识别高甘露糖型N-聚糖并以高亲和力结合高甘露糖型N-聚糖,所述高甘露糖型N-聚糖是一类常见于病毒、细菌和真菌中的病原体相关分子模式PAMP。这种结合相互作用激活吞噬作用。在髓样细胞和树突细胞上,DC-SIGN介导树突细胞与血管内皮的滚动相互作用和CD4<sup>+</sup>T细胞的激活以及病原体半抗原的识别。在一些实施方案中,“DC-SIGN”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0081] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD11b。CD11b(ITGAM;整合素 $\alpha$ M)能够与CD18形成异二聚体。其充当补体(C3bi)、纤维蛋白原或凝血因子X的受体。在人体中,CD11b在髓样细胞上强烈表达,并且在NK细胞和一些激活的淋巴细胞上以及在脑中的小胶质细胞上弱表达。在一些实施方案中,CD11b也在癌细胞上表达,并且靶向它导致抗癌作用。CD11b的示例性相关序列可以以登录号NP\_001139280.1、NP\_000623.2、XP\_011544153.1、XP\_011544152.1、XP\_006721108.1、AAH99660.1和AH004143.2找到。在一些实施方案中,“CD11b”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0082] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD11c。CD11c也被称为CD11C、CD11c抗原、整合素 $\alpha$ X、补体组分3受体4亚基、ITGAX、LeuM5、整合素 $\alpha$ X前体、白细胞粘附糖蛋白p150、p95 $\alpha$ 链和白细胞粘附受体p150亚基。全长CD11c蛋白具有如Genbank登录号NP\_000878所示的氨基酸序列,并且由如Genbank登录号NM\_000887所示的全长核苷酸序列编码。在一些实施方案中,“CD11c”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0083] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体的第二抗原是CD18。CD18也被称为整合素 $\beta$ 链-2或整合素 $\beta$ 2,其在人体中由ITGB2基因编码。CD18能够与CD11b形成异二聚体。CD18的示例性序列可以以GenBank登录号NP\_000202(氨基酸序列)和GenBank登录号NM\_000211(核酸)找到。在一些实施方案中,“CD18”包括包含突变的蛋白质,所述突变例如全长野生型蛋白质的点突变、片段、插入、缺失和剪接变体。

[0084] 抗体亚型

[0085] 在一些实施方案中,如本文所述的多特异性抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。

[0086] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体是IgG1亚型。在一些实施方案中,所述多特

异性抗体是IgG2亚型。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是IgG3亚型。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是IgG4亚型。

[0087] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含减少多特异性抗体与Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)的结合的一个或多个Fc取代。

[0088] 在一些实施方案中,所述一个或多个Fc取代选自IgG4上的F234A/L235A、IgG1上的L234A/L235A、IgG2上的V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S、IgG4上的F234A/L235A、IgG4上的S228P/F234A/L235A、所有Ig亚型上的N297A、IgG2上的V234A/G237A、IgG1上的K214T/E233P/L234V/L235A/G236缺失/A327G/P331A/D365E/L358M、IgG2上的H268Q/V309L/A330S/P331S、IgG1上的S267E/L328F、IgG1上的L234F/L235E/D265A、IgG1上的L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S、IgG4上的S228P/F234A/L235A/G237A/P238S和IgG4上的S228P/F234A/L235A/G236缺失/G237A/P238S,其中EU残基编号根据EU索引。

[0089] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体进一步包含S228P取代。

[0090] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体包含在第一CH3结构域中或在第二CH3结构域中或在第一CH3结构域和第二CH3结构域两者中的一个或多个不对称取代。

[0091] 在一些实施方案中,一个或多个不对称取代选自F450L/K409R、野生型/F409L\_R409K、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366SL368AY407V、L351YF405AY407V/T394W、T366I\_K392MT394W/F405AY407V、T366LK392MT394W/F405AY407V、L351YY407A/T366AK409F、L351YY407A/T366VK409F、Y407A/T366AK409F和T350V\_L351Y\_F405AY407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W。

[0092] 产生抗体的方法

[0093] 本公开文本的方法中使用的结合特异性抗原的抗体可以从例如噬菌体展示文库从头选择,其中噬菌体被工程化以表达人免疫球蛋白或其部分,诸如Fab、单链抗体(scFv)或未配对或配对的抗体可变区(Knappik等人,J Mol Biol 296:57-86,2000;Krebs等人,J Immunol Meth 254:67-84,2001;Vaughan等人,Nature Biotechnology 14:309-14,1996;Sheets等人,PITAS (USA) 95:6157-62,1998;Hoogenboom和Winter,J Mol Biol 227:381,1991;Marks等人,J Mol Biol 222:581,1991)。表达作为具有噬菌体pIX外壳蛋白的融合蛋白的抗体重链可变区和轻链可变区的噬菌体展示文库如Shi等人(2010) J.Mol.Biol.397:385-96以及国际专利公开号W0 2009/085462中所述。可以筛选与所希望的抗原结合的抗文库,所述抗原诸如BCMA、CD3、CD38、CD123、CD19、CD33、PSMA或TMEFF2胞外结构域,并且可以进一步表征获得的阳性克隆,并且从克隆裂解物分离Fab,随后将其克隆为全长抗体。用于分离人抗体的此类噬菌体展示方法在本领域中已经确立。参见例如:美国专利号5,223,409;5,403,484;5,571,698;5,427,908;5,580,717;5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;和6,593,081。

[0094] 多特异性抗体(例如,双特异性抗体)可以在体外在无细胞环境中通过以下方式产生:在两种单特异性同二聚体抗体的CH3区中引入不对称突变并在还原条件下由两种亲本单特异性同二聚体抗体形成双特异性异二聚体抗体,允许根据国际专利公开号W02011/131746中所述的方法进行二硫键异构化。在所述方法中,两种单特异性二价抗体被工程化

以在CH3结构域具有促进异二聚体稳定性的某些取代;将抗体在足以允许铰链区中的半胱氨酸经历二硫键异构化的还原条件下一起孵育;由此通过Fab臂交换产生双特异性抗体。孵育条件可以最佳地恢复到非还原。可以使用的示例性还原剂是2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇。在一些实施方案中,还原剂选自:2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦。例如,可以使用在至少20℃的温度下、在至少25mM 2-MEA的存在下或在至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下、在5-8的pH下(例如在7.0的pH下或在7.4的pH下)孵育至少90min。

[0095] 可以用于双特异性抗体的第一重链和第二重链的示例性CH3突变是K409R和/或F405L。

[0096] 可以使用的另外的CH3突变包括诸如以下的技术: **Duobody®**突变(Genmab)、杵臼结构突变(Genentech)、静电匹配的突变(Chugai、Amgen、NovoNordisk、Oncomed)、链交换工程化结构域体(SEEDbody)(EMD Serono)和其他不对称突变(例如Zymeworks)。**Duobody®**突变(Genmab)例如披露于美国专利号9,150,663和US2014/0303356中,并且包括突变F405L/K409R、野生型/F405L\_R409K、T350I\_K370TF405L/K409R、K370W/K409R、D399AFGHILMNRSTVWY/K409R、T366ADEFHILMQVY/K409R、L368ADEGHNRSSTVQ/K409AGRH、D399FHKRQ/K409AGRH、F405IKLSTVW/K409AGRH和Y407LWQ/K409AGRH。

[0097] 杵臼结构突变例如披露于WO 1996/027011中,并且包括在CH3区界面上的突变,其中将具有小侧链的氨基酸(臼)引入第一CH3区并且将具有大侧链的氨基酸(杵)引入第二CH3区,导致第一CH3区与第二CH3区之间的优先相互作用。形成杵和臼的示例性CH3区突变是T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S\_L368A\_Y407V。

[0098] 如US 2010/0015133、US 2009/0182127、US 2010/028637或US 2011/0123532中所述,通过取代第一CH3区上的带正电荷残基和第二CH3区上的带负电荷残基,通过使用静电相互作用可以促进重链异二聚体形成。

[0099] 如US 2012/0149876或US2013/0195849中所述,可以用于促进重链异二聚化的其他不对称突变是L351YF405AY407V/T394W、T366IK392MT394W/F405AY407V、T366LK392MT394W/F405AY407V、L351YY407A/T366AK409F、L351YY407A/T366VK409F、Y407A/T366AK409F或T350V\_L351YF405AY407V/T350V\_T366LK392LT394W。

[0100] 如US 20070287170中所述,SEEDbody突变涉及用IgA残基取代选择的IgG残基以促进重链异二聚化。

[0101] 如WO 2007/147901、WO 2011/143545、WO 2013157954、WO 2013096291和US2018/0118849中所述,可以使用的其他示例性突变是R409D\_K370E/D399K\_E357K、S354C\_T366W/Y349C\_T366S\_L368A\_Y407V、Y349C\_T366W/S354C\_T366S\_L368A\_Y407V、T366K/L351D、L351K/Y349E、L351K/Y349D、L351K/L368E、L351YY407A/T366AK409F、L351YY407A/T366VK409F、K392D/D399K、K392D/E356K、K253ED282KK322D/D239KE240KK292D、K392D\_K409D/D356K\_D399K。

[0102] 可以用作T细胞重定向治疗剂的另外的双特异性或多特异性结构包括双可变结构域免疫球蛋白(DVD)(国际专利公开号WO 2009/134776;DVD是全长抗体,其包含具有结构VH1-接头-VH2-CH的重链和具有结构VL1-接头-VL2-CL的轻链;接头是任选的);以下结构,

其包含各种二聚化结构域以连接具有不同特异性的两个抗体臂,诸如亮氨酸拉链或胶原二聚化结构域(国际专利公开号W0 2012/022811、美国专利号5,932,448;6,833,441);缀合在一起的两种或更多种结构域抗体(dAb);双抗体;仅有重链的抗体,诸如骆驼科抗体和工程化的骆驼科抗体;双靶向(DT)-Ig(GSK/Domantis);二合一抗体(Genentech);交联的Mab(Karmanos Cancer Center);mAb2(F-Star)和CovX-body(CovX/Pfizer);IgG样双特异性(InnClone/Eli Lilly);Ts2Ab(MedImmune/AZ)和BsAb(Zymogenetics);HERCULES(Biogen Idec)和TvAb(Roche);ScFv/Fc融合物(Academic Institution);SCORPION(Emergent BioSolutions/Trubion、Zymogenetics/BMS)、双亲和重靶向技术(Fc-DART)(MacroGenics)和双(ScFv)<sub>2</sub>-Fab(国家抗体医学研究中心-中国,National Research Center for Antibody Medicine—China)、双效或Bis-Fab(Genentech);对接和锁定抗体(DNL)(ImmunoMedics);二价双特异性抗体(Biotechnol);以及Fab-Fv(UCB-Celltech)。基于ScFv、双抗体的抗体和结构域抗体包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE)(Micromet)、串联双抗体(Tandab)(Affimed)、双亲和重靶向技术(DART)(MacroGenics)、单链双抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合物(Merrimak)和COMBODY(Epigen Biotech)、双靶向纳米抗体(Ablynx)、双靶向仅重链的结构域抗体。

[0103] 抗体的Fc工程化

[0104] T细胞重定向治疗剂(诸如双特异性或多特异性抗体)的Fc区可以在Fc区中包含至少一个取代,所述取代减少T细胞重定向治疗剂与激活性Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)的结合和/或降低Fc效应子功能,诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或吞噬作用(ADCP)。

[0105] 可以被取代以减少Fc与激活性Fc $\gamma$ R的结合并随后减少效应子功能的Fc位置是以下取代:IgG1上的L234A/L235A、IgG2上的V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S、IgG4上的F234A/L235A、IgG4上的S228P/F234A/L235A、所有Ig亚型上的N297A、IgG2上的V234A/G237A、IgG1上的K214T/E233P/L234V/L235A/G236缺失/A327G/P331A/D365E/L358M、IgG2上的H268Q/V309L/A330S/P331S、IgG1上的S267E/L328F、IgG1上的L234F/L235E/D265A、IgG1上的L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S、IgG4上的S228P/F234A/L235A/G237A/P238S和IgG4上的S228P/F234A/L235A/G236缺失/G237A/P238S。

[0106] 可以用于降低CDC的Fc取代是K322A取代。

[0107] 可以在IgG4抗体中进一步进行熟知的S228P取代以增强IgG4稳定性。

[0108] 示例性野生型IgG1包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,如下:

[0109] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0110] (SEQ ID NO:31)

[0111] 示例性野生型IgG4包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,如下:

[0112] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQP  
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0113] (SEQ ID NO:32)

[0114] 编码多特异性抗体的多核苷酸的体内递送

[0115] 在一些实施方案中,代替多特异性抗体,将编码所述多特异性抗体的多核苷酸施用于受试者,所述受试者允许体内产生多特异性抗体。在一些实施方案中,施用此类多核苷酸在体内产生与直接施用多特异性抗体类似的作用。在一些实施方案中,施用此类多核苷酸改进了载体的体内转导效率。在一些实施方案中,所述多核苷酸是mRNA。

[0116] 在一些实施方案中,此类多核苷酸的体内递送随着时间的推移(例如,在数小时内开始并持续数天)而产生多特异性抗体表达。在一些实施方案中,此类多肽的体内递送导致编码的多特异性抗体的希望的药代动力学、药效学和/或安全性概况。在一些实施方案中,所述多核苷酸可以通过一种或多种手段优化以防止免疫激活、增加稳定性、降低任何(诸如随着时间的推移)聚集的趋势和/或避免杂质。这种优化可以包括使用修饰的核苷、修饰的和/或特定的5'UTR、3'UTR和/或多聚A尾修饰以改进胞内稳定性和翻译效率(参见例如, Stadler等人,2017,Nat.Med.)。此类修饰在本领域中是已知的。

[0117] 体内递送多核苷酸(例如,mRNA)的策略在本领域中是已知的。对于策略的概要,参见Mol Ther.2019年4月10日;27(4):710-728,将其通过引用以其整体并入本文。

[0118] 在一些实施方案中,将编码多特异性抗体的多核苷酸共配制成脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施方案中,LNP配制品由以下构成:(1)可电离的或阳离子脂质或聚合物材料,其带有叔胺或季胺以封装聚阴离子mRNA;(2)与细胞膜中的脂质类似的两性离子脂质(例如,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺[DOPE]);(3)胆固醇,以稳定LNP的脂质双层;和(4)聚乙二醇(PEG)-脂质,以使纳米颗粒具有水化层,改进胶体稳定性,并减少蛋白质吸收。

[0119] 在一些实施方案中,编码多特异性抗体的多核苷酸经由具有阳离子或可电离的脂质和脂质样药剂的配制品来递送。在一些实施方案中,所述阳离子脂质带有烷基化季铵基团并且以不依赖于pH的方式保持其阳离子性质。在一些实施方案中,所述脂质是可电离的(例如,随着pH降低,通过游离胺的质子化获得正电荷)。在一些实施方案中,所述阳离子脂质包括N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)。在一些实施方案中,所述可电离的脂质包含Dlin-MC3-DMA(MC3)。

[0120] 在一些实施方案中,编码多特异性抗体的多核苷酸经由与聚合物材料一起配制来递送。在一些实施方案中,所述聚合物材料包括用脂肪链改性的低分子量聚乙烯亚胺(PEI)。在一些实施方案中,所述聚合物材料包括用脂肪链改性的聚(羟乙酰胺基胺)聚合物。在一些实施方案中,所述聚合物材料包括聚(β-氨基)酯(PBAE)。

[0121] 在一些实施方案中,编码多特异性抗体的多核苷酸经由具有树状聚合物(例如,聚酰胺基胺(PAMAM)或基于聚丙烯亚胺的树状聚合物)或细胞穿透肽(CPP)配制品来递送。在一些实施方案中,所述多核苷酸与CPP共价连接。

[0122] 多特异性抗体的例子

[0123] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体是BCMAxCD3双特异性抗体、GPCR5DxCD3双

特异性抗体、CD33xCD3双特异性抗体、CD19xCD3双特异性抗体、CD123xCD3双特异性抗体、PSMAxCD3双特异性抗体或TMEFF2xCD3双特异性抗体。

[0124] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体是BCMAxCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是GPC5DxCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是CD33xCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是CD19xCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是CD123xCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是PSMAxCD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是TMEFF2xCD3双特异性抗体。

[0125] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体结合CD3 $\epsilon$  (CDR)、CD8、KI2L4、NKG2E、NKG2D、NKG2F、BTNL3、CD186、BTNL8、PD-1、CD195或NKG2C。

[0126] 在一些实施方案中,结合CD19的多特异性抗体包含以下抗体的CD19结合结构域:博纳吐单抗、阿基仑赛(axicabtagene ciloleucel)、司利弗明-t(tisagenlecleucel-t)、英比利珠单抗(ineblizumab)、利基迈仑赛(lisocabtagene maraleucel)、XmAb-5574、CIK-CAR、CD19、ICTCAR-011、IM-19、JCAR-014、替朗妥昔单抗(loncastuximab tesirine)、MB-CART2019.1、OXS-1550、PBCAR-0191、PCAR-019、PCAR-119、Sen1-001、TI-1007、XmAb-5871、PTG-01、PZ01、Sen1\_1904A、Sen1\_1904B、UCART-19、CSG-CD19、DI-B4、ET-190、GC-007F或GC-022。

[0127] 在一些实施方案中,结合CD19的多特异性抗体包括博纳吐单抗、阿基仑赛、司利弗明-t、英比利珠单抗、利基迈仑赛、XmAb-5574、CIK-CAR、CD19、ICTCAR-011、IM-19、JCAR-014、替朗妥昔单抗、MB-CART2019.1、OXS-1550、PBCAR-0191、PCAR-019、PCAR-119、Sen1-001、TI-1007、XmAb-5871、PTG-01、PZ01、Sen1\_1904A、Sen1\_1904B、UCART-19、CSG-CD19、DI-B4、ET-190、GC-007F或GC-022。

[0128] 在一些实施方案中,本公开文本中使用的多特异性抗体是博纳吐单抗。博纳吐单抗是双特异性T细胞衔接器(BiTE)类的CD19/CD3双特异性抗体构建体,并且包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列:

[0129] DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGGLWIGQIWPGDGDTNNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRRETTTVGRYYYAMDYWGQGTITVTVSSGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHSHHHHH

[0130] (SEQ ID NO:34) .

[0131] 博纳吐单抗的CD19结合区包含以下CDR:

[0132] CDRL1:QSVDDYDGDSY (SEQ ID NO:35)

[0133] CDRL2:DAS (SEQ ID NO:36)

[0134] CDRL3:QQSTEDPWT (SEQ ID NO:37)

[0135] CDRH1:GYAFSSYW (SEQ ID NO:38)

[0136] CDRH2:IWPGDGD (SEQ ID NO:39)

[0137] CDRH3:ARRETTTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO:40)

[0138] 博纳吐单抗的CD3结合区包含以下CDR:

[0139] CDRH1:GYTFTRYT (SEQ ID NO:41)

[0140] CDRH2:INPSRGYT (SEQ ID NO:42)

[0141] CDRH3:ARYYDDHYCLDY (SEQ ID NO:43)

[0142] CDRL1:SSVSY (SEQ ID NO:44)

[0143] CDRL2:DTS (SEQ ID NO:45)

[0144] CDRL3:QQWSSNP (SEQ ID NO:46)

[0145] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体是包括包含根据SEQ ID NO:35-40的CDR的CD19结合区和包含根据SEQ ID NO:41-46的CDR的CD3结合区的CD19 x CD3双特异性抗体。在一些实施方案中,所述CD19 x CD3双特异性抗体是CD19 x CD3 BiTE。

[0146] 方法

[0147] 本公开文本的各种实施方案提供了使用多特异性抗体作为载体(例如非病毒载体或病毒载体)转导的增强子的方法。在一些实施方案中,所述多特异性抗体促进载体的细胞转导,诸如设计用于体内基因疗法和/或治疗癌症或血液恶性肿瘤的那些。在一些实施方案中,多特异性抗体和载体两者均在体内施用。在各种实施方案中,所述多特异性抗体可以在施用病毒载体之前、并行地或之后施用。

[0148] 在一些实施方案中,将多特异性抗体和载体施用于受试者以治疗和/或预防疾病、障碍或病症。在一些实施方案中,将多特异性抗体和载体施用于受试者以用于研究和/或药物开发目的。

[0149] 效果

[0150] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致免疫细胞的激活。在一些实施方案中,免疫细胞的激活由多特异性抗体与免疫细胞和表达特异性抗原的细胞两者的结合介导。

[0151] 在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过一种或多种细胞标记物的水平测量。在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过对一种或多种细胞标记物呈阳性的免疫细胞的百分比来测量。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞(T淋巴细胞)或NK细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标记物选自CD71、CD25、CD69、Ki67及其任意组合。

[0152] 在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过CD71阳性的免疫细胞的百分比测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使CD71+免疫细胞的百分比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过在免疫细胞表面上表达的CD71的水平测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使在免疫细胞表面上表达的CD71的水平增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少7倍或至少10倍。

[0153] 在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过CD25阳性的免疫细胞的百分比测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使CD25+免疫细胞的百分比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在一些实

实施方案中,免疫细胞的激活通过在免疫细胞表面上表达的CD25的水平测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使在免疫细胞表面上表达的CD25的水平增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少7倍或至少10倍。

[0154] 在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过CD69阳性的免疫细胞的百分比测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使CD69+免疫细胞的百分比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过在免疫细胞表面上表达的CD69的水平测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使在免疫细胞表面上表达的CD69的水平增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少7倍或至少10倍。

[0155] 在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过Ki67阳性的免疫细胞的百分比测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使Ki67+免疫细胞的百分比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在一些实施方案中,免疫细胞的激活通过在免疫细胞表面上表达的Ki67的水平测量。在一些实施方案中,多特异性抗体的施用使在免疫细胞表面上表达的Ki67的水平增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少7倍或至少10倍。

[0156] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致易于和/或易接近载体转导的免疫细胞的增加。

[0157] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致活跃的免疫细胞增殖。在一些实施方案中,免疫细胞的增殖增加了由载体实现的转导的数量和/或易感性。

[0158] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致G0期的免疫细胞(例如,T细胞)的数量减少和/或非G0期的免疫细胞(例如,T细胞)的数量增加。

[0159] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体增加处于载体转导的代谢适应性状态的免疫细胞的数量和/或百分比。

[0160] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致免疫细胞在淋巴结中的积累。在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体导致免疫细胞在肿瘤部位的积累。

[0161] 在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体促进载体(例如病毒颗粒)进入目标免疫细胞中。在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体增强载体颗粒的感染滴度。在一些实施方案中,在受试者中施用多特异性抗体增加免疫细胞对载体颗粒的细胞摄取。

[0162] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,此处免疫细胞是可以被多特异性抗体的至少一个抗原特异性结合结构域识别的体内免疫细胞的子集。在一些实施方案中,所述免疫细胞驻留在淋巴结中。

[0163] 施用方案

[0164] 在本文所述方法的一些实施方案中,在向受试者施用所述载体之前、并行地或之后或其任何组合向受试者施用所述多特异性抗体持续任何本文所公开的时间段后,可以增

强T淋巴细胞(例如,原代人T淋巴细胞)的转导(例如,逆转录病毒转导,例如慢病毒转导)。

[0165] 在一些实施方案中,在施用所述载体之前施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,在施用载体之前约0.5小时、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约6小时、约9小时、约12小时、约16小时、约20小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天或更长时间施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,当重复施用多特异性抗体和/或载体时,基于最后一次施用多特异性抗体与第一次施用载体之间的间隔计算在此列出的时间间隔。

[0166] 在一些实施方案中,多特异性抗体在施用载体之后施用。在一些实施方案中,在施用载体之后约0.5小时、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约6小时、约9小时、约12小时或约16小时施用多特异性抗体。在一些实施方案中,当重复施用多特异性抗体和/或载体时,基于最后一次施用载体与第一次施用多特异性抗体之间的间隔计算在此列出的时间间隔。

[0167] 在一些实施方案中,多特异性抗体与载体并行地施用。如本文所用的术语“并行地”不限于在完全相同的时间施用治疗剂,而是意指将多特异性抗体和载体按一定顺序且在一定时间间隔内施用于受试者和/或细胞,使得它们可以一起作用于目标细胞。例如,每种药剂可以在时间上足够接近地施用,以提供所希望的治疗或预防效果,例如,在约10分钟内、在约20分钟内、在约30分钟内、在约60分钟内、在约2小时内、在约3小时内、在约6小时内、在约12小时内或在约24小时内。可以将每种药剂以任何适当的形式和通过任何合适的途径分别施用于受试者。并行施用的每种药剂可以在同一药物中施用(同时),在单独的药物中按任何顺序相继地施用,或按任何顺序依序施用。

[0168] 在一些实施方案中,当重复施用多特异性抗体和/或载体时,多特异性抗体的至少一次施用与载体的至少一次施用并行地发生。在一些实施方案中,载体的第一次或仅第一次施用与多特异性抗体的最后一次或仅最后一次施用并行地发生。在一些实施方案中,多特异性抗体的第一次或仅第一次施用与载体的最后一次或仅最后一次施用并行地发生。在一些实施方案中,多特异性抗体的每次施用与载体的施用并行地发生。在一些实施方案中,载体的每次施用与多特异性抗体的施用并行地发生。

[0169] 本公开文本进一步设想了改进载体的转导效率的一种或多种另外的药剂可以与本文所述的多特异性抗体和载体组合使用。而且,所述一种或多种另外的药剂可以在向受试者施用多特异性抗体和/或载体之前、并行地或之后施用。

[0170] 剂量

[0171] 载体剂量

[0172] 载体可以以任何有效剂量用于体内感染细胞。在一些实施方案中,所述载体通过直接注射至需要治疗的细胞、组织、器官或受试者而体内施用于受试者。

[0173] 病毒载体也可以根据病毒滴度(TU/mL)递送。直接注射的慢病毒的量由总TU确定,并且可以基于可行地注射至部位的体积和待注射组织的类型两者而变化。在一些实施方案中,可以使用的递送的病毒滴度是每次注射约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^6$ 、约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 、约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{11}$ 、或约 $1 \times 10^9$ 至 $1 \times 10^{11}$ 或更大。在一些实施方案中,可以使用的递送的病毒滴度是每次注射约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 、约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{11}$ 、约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{12}$ 、或约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{12}$ 或更大。例如,脑注射部位可能只允许注射非常小体积的病毒,因此

优选高滴度的制剂,可以使用的TU为每次注射约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 、约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{11}$ 、约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{12}$ 、或约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{12}$ 或更大。然而,全身性递送可以容纳大得多的TU,可以递送约 $1 \times 10^8$ 、约 $1 \times 10^9$ 、约 $1 \times 10^{10}$ 、约 $1 \times 10^{11}$ 、约 $1 \times 10^{12}$ 、约 $1 \times 10^{13}$ 、约 $1 \times 10^{14}$ 或约 $1 \times 10^{15}$ 的负荷。

[0174] 在一些实施方案中,以在约 $1 \times 10^{12}$ 与 $5 \times 10^{14}$ 载体基因组(vg)的载体/千克(vg)的受试者总体重(vg/kg)之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $1 \times 10^{13}$ vg/kg与 $5 \times 10^{14}$ vg/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $5 \times 10^{13}$ vg/kg与 $3 \times 10^{14}$ vg/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $5 \times 10^{13}$ vg/kg与 $1 \times 10^{14}$ vg/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以小于约 $1 \times 10^{12}$ vg/kg、小于约 $3 \times 10^{12}$ vg/kg、小于约 $5 \times 10^{12}$ vg/kg、小于约 $7 \times 10^{12}$ vg/kg、小于约 $1 \times 10^{13}$ vg/kg、小于约 $3 \times 10^{13}$ vg/kg、小于约 $5 \times 10^{13}$ vg/kg、小于约 $7 \times 10^{13}$ vg/kg、小于约 $1 \times 10^{14}$ vg/kg、小于约 $3 \times 10^{14}$ vg/kg、小于约 $5 \times 10^{14}$ vg/kg、小于约 $7 \times 10^{14}$ vg/kg、小于约 $1 \times 10^{15}$ vg/kg、小于约 $3 \times 10^{15}$ vg/kg、或小于约 $7 \times 10^{15}$ vg/kg的剂量施用所述载体。

[0175] 在一些实施方案中,以约 $1 \times 10^{12}$ 与 $5 \times 10^{14}$ 载体颗粒(vp)的载体/千克(vp)的受试者总体重(vp/kg)之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $1 \times 10^{13}$ vp/kg与 $5 \times 10^{14}$ vp/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $5 \times 10^{13}$ vp/kg与 $3 \times 10^{14}$ vp/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以在约 $5 \times 10^{13}$ vp/kg与 $1 \times 10^{14}$ vp/kg之间的剂量施用所述载体。在一些实施方案中,以小于约 $1 \times 10^{12}$ vp/kg、小于约 $3 \times 10^{12}$ vp/kg、小于约 $5 \times 10^{12}$ vp/kg、小于约 $7 \times 10^{12}$ vp/kg、小于约 $1 \times 10^{13}$ vp/kg、小于约 $3 \times 10^{13}$ vp/kg、小于约 $5 \times 10^{13}$ vp/kg、小于约 $7 \times 10^{13}$ vp/kg、小于约 $1 \times 10^{14}$ vp/kg、小于约 $3 \times 10^{14}$ vp/kg、小于约 $5 \times 10^{14}$ vp/kg、小于约 $7 \times 10^{14}$ vp/kg、小于约 $1 \times 10^{15}$ vp/kg、小于约 $3 \times 10^{15}$ vp/kg、小于约 $5 \times 10^{15}$ vp/kg、或小于约 $7 \times 10^{15}$ vp/kg的剂量施用所述载体。

[0176] 抗体剂量和时机

[0177] 给予患有疾病或障碍(例如,癌症,诸如血液恶性肿瘤)的受试者的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的剂量足以改进如本文所述的载体转导效率(“有效量”)。虽然可以使用足以诱导对细胞的细胞毒性或其他二次治疗效果的多特异性抗体剂量,但更优选使用减少的剂量,特别是当非目标细胞(例如对于CD3 x CD19双特异性,B细胞)是非恶性细胞或对于在转导后将产生的目标免疫细胞(例如T细胞)的治疗效果所希望的细胞时。在一些实施方案中,选择的剂量比在单一疗法中使用的多特异性抗体的剂量低10x、100x、1000x、5000x或10000x。在一些实施方案中,所述剂量包括约5 $\mu$ g/kg至约10mg/kg,例如约0.005mg/kg至约3mg/kg、或约0.5mg/kg至约2.5mg/kg、或约0.4mg/kg、约0.8mg/kg、约1.6mg/kg、或约2.4mg/kg的抗体。合适的剂量包括例如约0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.05mg/kg、0.07mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、4.0mg/kg、5.0mg/kg、6.0mg/kg、7.0mg/kg、8.0mg/kg、9.0mg/kg或10.0mg/kg。在一些实施方案中,所述剂量包括约0.05 $\mu$ g/kg至约1mg/kg,例如约0.5 $\mu$ g/kg至约0.30mg/kg、或约0.005mg/kg至约0.25mg/kg、或约0.04mg/kg、约0.08mg/kg、约0.16mg/kg、或约0.24mg/kg的抗体。合适的剂量包括例如约0.001mg/kg、0.002mg/kg、0.005mg/kg、0.007mg/kg、0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg

kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.01mg/kg、0.015mg/kg、0.016mg/kg、0.017mg/kg、0.018mg/kg、0.019mg/kg、0.02mg/kg、0.021mg/kg、0.022mg/kg、0.023mg/kg、0.024mg/kg、0.025mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg或0.1mg/kg。

[0178] 也可以给予多特异性抗体的固定单位剂量,例如,约1mg、2mg、5mg、10mg、20mg、50mg、100mg、200mg、500mg或1000mg,或者所述剂量可以基于患者的表面积,例如,约500mg/m<sup>2</sup>、400mg/m<sup>2</sup>、300mg/m<sup>2</sup>、250mg/m<sup>2</sup>、200mg/m<sup>2</sup>、100mg/m<sup>2</sup>、50mg/m<sup>2</sup>、20mg/m<sup>2</sup>、10mg/m<sup>2</sup>、5mg/m<sup>2</sup>、2mg/m<sup>2</sup>或1mg/m<sup>2</sup>。在一些实施方案中,所述多特异性抗体的固定单位剂量是例如约0.1mg、0.2mg、0.5mg、0.1mg、0.2mg、0.5mg或1mg,或者所述剂量可以基于患者的表面积,例如,约50mg/m<sup>2</sup>、40mg/m<sup>2</sup>、30mg/m<sup>2</sup>、25mg/m<sup>2</sup>、20mg/m<sup>2</sup>、10mg/m<sup>2</sup>、5mg/m<sup>2</sup>、2mg/m<sup>2</sup>、1mg/m<sup>2</sup>、0.5mg/m<sup>2</sup>、0.2mg/m<sup>2</sup>或0.1mg/m<sup>2</sup>。在一些实施方案中,所述多特异性抗体的固定单位剂量是例如约0.01mg、0.02mg、0.05mg、0.01mg、0.02mg、0.05mg、0.01mg、0.02mg、0.05mg或0.1mg,或者所述剂量可以基于患者的表面积,例如,约5mg/m<sup>2</sup>、4mg/m<sup>2</sup>、3mg/m<sup>2</sup>、2.5mg/m<sup>2</sup>、2mg/m<sup>2</sup>、1mg/m<sup>2</sup>、0.5mg/m<sup>2</sup>、0.2mg/m<sup>2</sup>、0.1mg/m<sup>2</sup>、0.05mg/m<sup>2</sup>、0.02mg/m<sup>2</sup>或0.01mg/m<sup>2</sup>。

[0179] 可以在施用载体(例如,病毒载体)之前、期间或之后施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,在载体之前一周、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,在施用载体前1小时-4小时或4小时-8小时、或约1小时、约2小时、约3小时、或约4小时施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,与所述载体的施用并行地施用所述多特异性抗体。在一些实施方案中,在所述载体之后(例如,在载体之后1小时-4小时、1小时-8小时或1天)施用所述多特异性抗体。

[0180] 而所用的当前治疗中的多特异性抗体通常重复施用(即,以每周、每两周或每月的时间表)。在本公开文本的方法中,所述多特异性抗体可以施用少至一次、两次或三次。在特定的实施方案中,所述多特异性抗体的施用恰好进行一次。类似地陈述,在施用所述载体之前或并行地施用所述多特异性抗体的单次注射。当希望重复施用所述载体时,可以选择在每次用载体进行治疗时重复所述多特异性抗体的施用方案。

#### [0181] 施用途径

[0182] 在一些实施方案中,所述载体经由选自肠胃外、静脉内、肌内、皮下、肿瘤内和淋巴管内的途径施用。在一些实施方案中,多次施用所述载体。在一些实施方案中,通过淋巴管内注射载体来施用所述载体。在一些实施方案中,通过将载体注射到肿瘤部位(即肿瘤内)来施用所述载体。在一些实施方案中,皮下施用所述载体。在一些实施方案中,全身施用所述载体。在一些实施方案中,静脉内施用所述载体。在一些实施方案中,动脉内施用所述载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。

[0183] 在一些实施方案中,所述多特异性抗体经由选自肠胃外、静脉内、肌内、皮下、肿瘤内和淋巴管内的途径施用。在一些实施方案中,多次施用所述抗体。在一些实施方案中,通过淋巴管内注射抗体来施用所述抗体。在一些实施方案中,通过将抗体注射到肿瘤部位(即肿瘤内)来施用所述抗体。在一些实施方案中,皮下施用所述抗体。在一些实施方案中,全身施用所述抗体。在一些实施方案中,静脉内施用所述抗体。在一些实施方案中,动脉内施用所述抗体。在一些实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。

[0184] 多特异性抗体和载体不需要共享相同的施用模式,例如,第一药剂(例如,抗体)可

以经全身施用,而第二药剂(例如,载体)可以经淋巴管内施用。

[0185] 转导效率

[0186] 在一些实施方案中,与在不使用多特异性抗体的情况下病毒载体的转导效率相比,本公开文本的使用此类多特异性抗体的组合物和方法可以使病毒载体的转导效率增加至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多。

[0187] 在一些实施方案中,与在不使用多特异性抗体的情况下病毒载体的转导效率相比,本公开文本的使用此类多特异性抗体的组合物和方法可以使病毒载体的转导效率增加至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约5倍、至少约7倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约50倍、至少约70倍、至少约100倍、至少约200倍、至少约300倍、至少约500倍、至少约700倍、至少约1000倍或更多。

[0188] 组合疗法

[0189] 本公开文本进一步设想了改进载体的转导效率的一种或多种另外的药剂可以与本文所述的多特异性抗体和载体组合使用。

[0190] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向受试者施用一种或多种抗癌疗法。

[0191] 在一些实施方案中,所述一种或多种抗癌疗法选自自体干细胞移植(ASCT)、放射、手术、化疗剂、免疫调节剂和靶向癌症疗法。

[0192] 在一些实施方案中,所述一种或多种抗癌疗法选自来那度胺、沙利度胺、泊马度胺、硼替佐米、卡非佐米、埃罗妥珠单抗、伊沙佐米、美法仑、地塞米松、长春新碱、环磷酰胺、羟基道诺霉素、泼尼松、利妥昔单抗、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、博舒替尼、泊那替尼、巴非替尼、塞卡替尼、陶扎色替或达鲁舍替、阿糖胞苷、道诺霉素、伊达比星、米托蒽醌、羟基脲、地西他滨、克拉屈滨、氟达拉滨、托泊替康、依托泊苷6-硫鸟嘌呤、皮质类固醇、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、阿扎胞苷、三氧化二砷和全反式视黄酸或其任何组合。

[0193] 载体

[0194] 所述载体可以是病毒或非病毒载体。说明性非病毒载体包括例如裸DNA、阳离子脂质体复合物、阳离子聚合物复合物、阳离子脂质体-聚合物复合物和外来体。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒和腺相关病毒(AAV)载体。

[0195] 在一些实施方案中,所述载体包含多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸编码至少一种治疗性多肽。术语“治疗性多肽”是指正被开发用于治疗用途的多肽,或已被开发用于治疗用途的多肽。在一些实施方案中,所述治疗性多肽在目标细胞(例如,宿主T细胞)中表达以用于治疗用途。在一些实施方案中,所述治疗性多肽包含T细胞受体、嵌合抗原受体或细胞因子受体。

[0196] 在一些实施方案中,如本文所述的载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,所述载体是腺相关病毒载体。

[0197] 术语病毒载体可以指能够将核酸转移到细胞中的载体或病毒颗粒,或者指转移的核酸本身。病毒载体含有主要源自病毒的结构性和/或功能性遗传元件。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要源自逆转录病毒的结构性和功能性遗传元件或其部分的病毒载体。术语“慢病毒载体”是指含有包含主要源自慢病毒的结构性和功能性遗传元件或其部分(包括LTR)的病毒载体。术语“杂合体”是指含有逆转录病毒(例如,慢病毒)序列和非慢病毒病毒

序列两者的载体、LTR或其他核酸。在一些实施方案中,杂合载体是指包含用于逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒(例如,慢病毒)序列的载体或转移质粒。

[0198] 载体类型

[0199] 逆转录病毒载体

[0200] 逆转录病毒包括慢病毒、 $\gamma$  逆转录病毒和 $\alpha$ 逆转录病毒,它们中的每一种都可以用于使用本领域已知的方法将多核苷酸递送至细胞。慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,其还含有具有调节或结构功能的其他基因。较高的复杂性使得所述病毒能够调节其生命周期,如在潜伏感染的过程中。说明性慢病毒包括但不限于:HIV(人类免疫缺陷病毒;包括1型HIV和2型HIV;梅迪-维斯纳病毒(visna-maedi virus) (VMV) 病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一些实施方案中,骨架是基于HIV的载体骨架(即,HIV顺式作用序列元件)。已经通过多次减弱HIV毒力基因产生慢病毒载体,例如使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失,使得载体在生物学上是安全的。

[0201] 说明性慢病毒载体包括Naldini等人(1996) *Science* 272:263-7;Zufferey等人(1998) *J. Virol.* 72:9873-9880;Dull等人(1998) *J. Virol.* 72:8463-8471;美国专利号6,013,516;以及美国专利号5,994,136中描述的那些,所述文献各自通过引用以其整体并入本文。通常,这些载体被配置成携带用于选择含有所述载体的细胞、用于将外来核酸掺入慢病毒颗粒中以及用于将核酸转移到目标细胞中的必需序列。

[0202] 常用的慢病毒载体系统是所谓的第三代系统。第三代慢病毒载体系统包含四个质粒。“转移质粒”编码由慢病毒载体系统递送至目标细胞的多核苷酸序列。所述转移质粒通常具有一个或多个侧接长末端重复(LTR)序列的目的转基因序列,所述长末端重复序列促进转移质粒序列整合到宿主基因组中。出于安全原因,转移质粒通常被设计成使所得载体不能复制。例如,转移质粒缺乏在宿主细胞中产生感染性颗粒所必需的基因元件。此外,转移质粒可以被设计成缺失3'LTR,使病毒“自我失活”(SIN)。参见Dull等人(1998) *J. Virol.* 72:8463-71;Miyoshi等人(1998) *J. Virol.* 72:8150-57。病毒颗粒还可以包含3'非翻译区(UTR)和5'UTR。所述UTR包含逆转录病毒调节元件,所述逆转录病毒调节元件支持在细胞与逆转录病毒颗粒接触后,将前病毒基因组包装、逆转录和整合到细胞中。

[0203] 第三代系统通常还包含两个“包装质粒”和一个“包膜质粒”。“包膜质粒”通常编码与启动子可操作地连接的Env基因。在示例性第三代系统中,所述Env基因是VSV-G,并且所述启动子是CMV启动子。第三代系统使用两个包装质粒,一个编码gag和pol,且另一个编码作为另一个安全特征的rev—对所谓的第二代系统的单包装质粒的改进。尽管更安全,但第三代系统使用起来可能更麻烦,并且由于添加了另外的质粒而导致更低的病毒滴度。示例性包装质粒包括而限于pMD2.G、pRSV-rev、pMDLG-pRRE和pRRL-GOI。

[0204] 许多逆转录病毒载体系统依赖于“包装细胞系”的使用。通常,包装细胞系是这样的细胞系,当将转移质粒、一个或多个包装质粒和包膜质粒引入细胞中时,其细胞能够产生感染性逆转录病毒颗粒。可以使用将质粒引入细胞的各种方法,包括转染或电穿孔。在一些情况下,包装细胞系适合于将逆转录病毒载体系统高效包装到逆转录病毒颗粒中。

[0205] 如本文所用,术语“逆转录病毒载体”或“慢病毒载体”是指包含编码异源蛋白(例如嵌合抗原受体)的多核苷酸、一种或多种衣壳蛋白和将所述多核苷酸转导到目标细胞中

所必需的其他蛋白质的病毒颗粒。逆转录病毒颗粒和慢病毒颗粒通常包含RNA基因组(源自转移质粒)、包埋有Env蛋白的脂质双层包膜和包括整合酶、蛋白酶和基质蛋白的其他辅助蛋白。

[0206] 逆转录病毒或慢病毒载体系统的离体效率可以用包括以下方法在内的本领域已知的多种方法来评估:测量载体拷贝数(VCN)或载体基因组(vg),诸如通过定量聚合酶链式反应(qPCR)或以感染单位/毫升(IU/mL)为单位的病毒滴度来测量。例如,可以如Humbert等人Development of Third-generation Coccal Envelope Producer Cell Lines for Robust Retroviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells.Molecular Therapy 24:1237-1246 (2016)中所述,使用对培养的肿瘤细胞系HT1080进行的功能测定来评估滴度。当对连续分裂的培养的细胞系评估滴度时,不需要刺激,因此测量的滴度不受逆转录病毒颗粒的表面工程化的影响。其他用于评估逆转录病毒载体系统的效率的方法提供于Gaererts等人Comparison of retroviral vector titration methods.BMC Biotechnol.6:34 (2006)中。

[0207] 在一些实施方案中,本公开文本的逆转录病毒颗粒和/或慢病毒颗粒包括包含编码与半抗原特异性结合的受体的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,编码与半抗原特异性结合的受体的序列与启动子可操作地连接。说明性启动子包括而限于巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、SV40启动子、SV40/CD43启动子和MND启动子。

[0208] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒颗粒包含转导增强子。在一些实施方案中,所述逆转录病毒颗粒包括包含编码T细胞激活蛋白的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,所述逆转录病毒颗粒包括包含编码半抗原结合受体的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,所述逆转录病毒颗粒包含标记蛋白。

[0209] 在一些实施方案中,每个逆转录病毒颗粒包含多核苷酸,所述多核苷酸按5'至3'顺序包含:(i)5'长末端重复(LTR)或非翻译区(UTR)、(ii)启动子、(iii)编码与半抗原特异性结合的受体的序列以及(iv)3'LTR或UTR。

[0210] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒颗粒包含与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体,从而允许宿主细胞转导。所述病毒载体可以包含给出假型化病毒载体的异源病毒包膜糖蛋白。例如,病毒包膜糖蛋白可以源自RD114或其变体VSV-G、长臂猿白血病病毒(GALV)之一,或者是双嗜性包膜、麻疹包膜或狒狒逆转录病毒包膜糖蛋白。在一些实施方案中,所述细胞表面受体是来自科卡尔菌株的VSV G蛋白或其功能变体。在一些实施方案中,所述病毒融合糖蛋白包含SEQ ID NO:33(科卡尔G蛋白)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述病毒融合糖蛋白包含与SEQ ID NO:33(科卡尔G蛋白)至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述病毒融合糖蛋白包含与SEQ ID NO:33(科卡尔G蛋白)至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,如下:

[0211] N F L L L T F I V L P L C S H A K F S I V F P Q S Q K G N W K N V P S S Y H Y C P S S D Q N W H N D L L G I T M K V K M P K T H K A I Q  
A D G W M C H A A K W I T T C D F R W Y G P K Y I T H S I H S I Q P T S E Q C K E S I K Q T K Q G T W M S P G F P P Q N C G Y A T V T D S V A V V V Q A T  
P H H V L V D E Y T G E W I D S Q F P N G K C E T E E C E T V H N S T V W Y S D Y K V T G L C D A T L V D T E I T F F S E D G K K E S I G K P N T G Y R S  
N Y F A Y E K G D K V C K M N Y C K H A G V R L P S G V W F E F V D Q D V Y A A A K L P E C P V G A T I S A P T Q T S V D V S L I L D V E R I L D Y S L C  
Q E T W S K I R S K Q P V S P V D L S Y L A P K N P G T G P A F T I I N G T L K Y F E T R Y I R I D I D N P I I S K M V G K I S G S Q T E R E L W T E W F

PYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELI  
EGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRIRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

[0212] (SEQ ID NO:33)

[0213] 各种融合糖蛋白可以用于假型化慢病毒载体。虽然最常用的例子是来自水疱性口炎病毒的包膜糖蛋白 (VSVG), 但许多其他病毒蛋白也已用于慢病毒载体的假型化。参见 Joglekar 等人 Human Gene Therapy Methods 28:291-301 (2017)。本公开文本设想了各种融合糖蛋白的取代。值得注意地, 一些融合糖蛋白导致更高的载体效率。

[0214] 在一些实施方案中, 使融合糖蛋白或其功能变体假型化促进包括但不限于T细胞或NK细胞的特定细胞类型的靶向转导。在一些实施方案中, 所述融合糖蛋白或其功能变体是以下病毒的一种或多种全长多肽、一种或多种功能片段、一种或多种同源物或一种或多种功能变体: 人类免疫缺陷病毒 (HIV) gp160、鼠白血病病毒 (MLV) gp70、长臂猿白血病病毒 (GALV) gp70、猫白血病病毒 (RD114) gp70、双嗜性逆转录病毒 (Ampho) gp70、10A1 MLV (10A1) gp70、亲嗜性逆转录病毒 (Eco) gp70、狒狒猿白血病病毒 (BaEV) gp70、麻疹病毒 (MV) H和F、尼帕病毒 (NiV) H和F、狂犬病病毒 (RabV) G、莫科拉病毒 (MOKV) G、埃博拉病毒 (EboZ) G、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) GP1和GP2、杆状病毒GP64、基孔肯雅病毒 (CHIKV) E1和E2、罗斯河病毒 (RRV) E1和E2、塞姆利基森林病毒 (SFV) E1和E2、辛德毕斯病毒 (SV) E1和E2、委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) E1和E2、西方马脑炎病毒 (WEEV) E1和E2、流感A、B、C或D HA、鸡瘟病毒 (FPV) HA、水疱性口炎病毒VSV-G、或金迪普拉病毒和帛黎病毒CNV-G以及PRV-G。

[0215] 在一些实施方案中, 所述融合糖蛋白或其功能变体是以下病毒的G蛋白的全长多肽、功能片段、同源物或功能变体: 水疱性口炎阿拉戈斯病毒 (VSAV)、卡拉加斯水疱性口炎病毒 (CJSV)、钱迪普拉水疱性口炎病毒 (CHPV)、科卡尔水疱性口炎病毒 (COCV)、水疱性口炎印度病毒 (VSIV)、伊斯法罕水疱性口炎病毒 (ISFV)、马拉巴水疱性口炎病毒 (MARAV)、水疱性口炎新泽西病毒 (VSNJV)、下刚果病毒 (BASV)。在一些实施方案中, 所述融合糖蛋白或其功能变体是科卡尔病毒G蛋白。

[0216] 在一些实施方案中, 所述融合糖蛋白或其功能变体是以下病毒的G蛋白的全长多肽、功能片段、同源物或功能变体: 水疱性口炎阿拉戈斯病毒 (VSAV)、卡拉加斯水疱性口炎病毒 (CJSV)、钱迪普拉水疱性口炎病毒 (CHPV)、科卡尔水疱性口炎病毒 (COCV)、水疱性口炎印度病毒 (VSIV)、伊斯法罕水疱性口炎病毒 (ISFV)、马拉巴水疱性口炎病毒 (MARAV)、水疱性口炎新泽西病毒 (VSNJV)、下刚果病毒 (BASV)。在一些实施方案中, 所述融合糖蛋白或其功能变体是科卡尔病毒G蛋白。

[0217] 在一些实施方案中, 所述载体是尼帕病毒 (NiV) 包膜假型化慢病毒颗粒 (“尼帕包膜假型化载体”)。在一些实施方案中, 所述尼帕包膜假型化载体是使用尼帕病毒包膜糖蛋白NiV-F和NiV-G假型化的。在一些实施方案中, 在这种尼帕包膜假型化载体上的NiV-F和/或NiV-G糖蛋白是修饰的变体。在一些实施方案中, 修饰在这种尼帕包膜假型化载体上的NiV-F和/或NiV-G糖蛋白以包含抗原结合结构域。在一些实施方案中, 所述抗原是EpCAM、CD4或CD8。在一些实施方案中, 所述尼帕包膜假型化载体可以高效转导表达EpCAM、CD4或CD8的细胞。参见美国专利号9,486,539以及Bender等人 PLoS Pathog. 2016年6月;12(6): e1005641。

[0218] 在一些实施方案中, 所述逆转录病毒载体是表面工程化的。使逆转录病毒载体表

面工程化的说明性方法在例如WO 2019/200056、PCT/US2019/062675和US 62/916,110中提供,将所述文献各自通过引用以其整体并入本文。

[0219] 本公开文本提供了能够实现病毒表面展示的各种非病毒蛋白。在一些实施方案中,所述非病毒蛋白是共刺激分子。通常,体外慢病毒转导需要另外的外源激活剂,诸如“刺激珠粒”,例如Dynabeads™人T激活剂CD3/CD28。在一些实施方案中,本公开文本的逆转录病毒(例如慢病毒)载体掺入一个或多个拷贝的非病毒蛋白,诸如一个或多个T细胞激活或共刺激分子。在载体中掺入一个或多个T细胞激活或共刺激分子可以使载体能够在缺乏或存在较少量的外源激活剂,即在没有刺激珠粒或等效药剂的情况下激活和高效转导T细胞。这允许载体进一步增强根据本文公开的方法使用多特异性抗体的T细胞的体内转导。

[0220] 在一些实施方案中,所述T细胞激活或共刺激分子可以选自抗CD3抗体、CD28配体(CD28L)和41bb配体(41BBL或CD137L)。各种T细胞激活或共刺激分子在本领域中是已知的,并且包括而限于特异性结合T细胞表达的蛋白质CD3、CD28、CD134(也被称为OX40)或41bb(也被称为4-1BB或CD137)或TNFRSF9中的任一种的药剂。例如,特异性结合CD3的药剂可以是抗CD3抗体(例如,OKT3、CRIS-7或I2C)或抗CD3抗体的抗原结合片段。

[0221] 在一些实施方案中,特异性结合CD3的药剂是抗CD3抗体的单链Fv片段(scFv)。在一些实施方案中,所述T细胞激活或共刺激分子选自抗CD3抗体、CD28的配体(例如,CD28L)和41bb配体(41BBL或CD137L)。CD86(也被称为B7-2)是CD28和CTLA-4两者的配体。在一些实施方案中,CD28的配体是CD86。CD80是CD28的另外的配体。在一些实施方案中,CD28的配体是CD80。在一些实施方案中,CD28的配体是与跨膜结构域偶联以在载体表面上展示的抗CD28抗体或抗CD28 scFv。包含一个或多个T细胞激活或共刺激分子的载体可以通过以下方式制成:通过由WO 2016/139463提供的方法使包装细胞系工程化;或如PCT/US2019/062675中所述自多顺反子辅助载体表达所述一个或多个T细胞激活或共刺激分子。

[0222] 在一些实施方案中,所述载体包含与CD19的天然跨膜结构域或异源跨膜结构域偶联的CD19的配体或其功能片段。在一些实施方案中,CD19充当博纳吐单抗的配体,因此提供了用于经由博纳吐单抗的抗CD3部分将颗粒偶联至T细胞的衔接子。在一些实施方案中,另一类型的颗粒表面配体可以用于使用包含颗粒表面配体的结合部分的多特异性抗体将适当表面工程化的慢病毒颗粒偶联至T细胞。在一些实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体,例如双特异性T细胞衔接器(BiTE)。

[0223] 所述非病毒蛋白质可以是细胞因子。在一些实施方案中,所述细胞因子可以选自IL-15、IL-7和IL-2。当所用的非病毒蛋白是可溶性蛋白(诸如scFv或细胞因子)时,其可以通过与跨膜结构域(诸如CD8的跨膜结构域)融合而束缚于慢病毒颗粒的表面。可替代地,可以通过使用经工程化以结合可溶性蛋白的跨膜蛋白将其间接束缚于慢病毒颗粒。进一步包含一个或多个胞质残基可以增加融合蛋白的稳定性。

[0224] 在一些实施方案中,表面工程化的载体包含跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。在特定的实施方案中,所述促有丝分裂结构域结合T细胞表面抗原,诸如CD3、CD28、CD134和CD137。在一些实施方案中,所述促有丝分裂结构域与CD3ε链结合。

[0225] CD28是在T细胞上表达的蛋白质之一,其提供T细胞激活和存活所需的共刺激信号。除了T细胞受体(TCR)之外,通过CD28实现的T细胞刺激可以提供产生各种白细胞介素

(特别是IL-6)的有效信号。

[0226] CD134(也被称为OX40)是受体TNFR超家族的成员,其不在静息幼稚T细胞上组成型表达,与CD28不同。OX40是次级共刺激分子,在激活后24小时至72小时之后表达;其配体OX40L也不在静息抗原呈递细胞上表达,但在其激活后表达。OX40的表达依赖于T细胞的完全激活;在没有CD28的情况下,OX40的表达被延迟并且其表达水平低四倍。

[0227] CD137(也被称为4-1BB)是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。CD137可以由激活的T细胞表达,但是在CD8 T细胞上的表达程度大于在CD4 T细胞上的表达程度。此外,CD137表达在树突细胞、滤泡树突细胞、自然杀伤细胞、粒细胞和炎症部位的血管壁细胞上见到。CD137的最佳表征活性是其对激活的T细胞的共刺激活性。CD137的交联增强了T细胞增殖、IL-2分泌存活和细胞溶解活性。

[0228] 所述促有丝分裂结构域可以包含与T细胞表面抗原特异性结合的抗体或其他分子的全部或部分。所述抗体可以激活TCR或CD28。所述抗体可以结合TCR、CD3或CD28。此类抗体的例子包括:OKT3、15E8和TGN1412。其他合适的抗体包括:

[0229] 抗CD28:CD28.2、10F3

[0230] 抗CD3/TCR:UCHT1、YTH12.5、TR66

[0231] 所述促有丝分裂结构域可以包含来自OKT3、15E8、TGN1412、CD28.2、10F3、UCHT1、YTH12.5或TR66的结合结构域。

[0232] 所述促有丝分裂结构域可以包含共刺激分子(诸如OX40L和41BBL)的全部或部分。例如,所述促有丝分裂结构域可以包含来自OX40L或41BBL的结合结构域。

[0233] 在一些实施方案中,所述载体包含与跨膜结构域偶联的抗CD3 $\epsilon$ 抗体或其抗原结合片段。说明性抗CD3 $\epsilon$ 抗体是OKT3。OKT3(也被称为莫罗单抗-CD3)是靶向CD3 $\epsilon$ 链的单克隆抗体。临床上将其用于减少器官移植患者的急性排斥反应。它是第一种被批准用于人类临床应用的单克隆抗体。OKT3的CDR如下:

[0234] CDRH1:GYTFTRY (SEQ ID NO.1)

[0235] CDRH2:NPSRGY (SEQ ID NO.2)

[0236] CDRH3:YYDDHYCLDY (SEQ ID NO.3)

[0237] CDRL1:SASSSVSYMN (SEQ ID NO.4)

[0238] CDRL2:DTSKLAS (SEQ ID NO.5)

[0239] CDRL3:QQWSSNPFT (SEQ ID NO.6)

[0240] 15E8是人CD28的小鼠单克隆抗体。其CDR如下:

[0241] CDRH1:GFSLTSY (SEQ ID NO.7)

[0242] CDRH2:WAGGS (SEQ ID NO.8)

[0243] CDRH3:DKRAPGKLYYGPDY (SEQ ID NO.9)

[0244] CDRL1:RASESVEYYVTSLMQ (SEQ ID NO.10)

[0245] CDRL2:AASNVES (SEQ ID NO.11)

[0246] CDRL3:QQTRKVPST (SEQ ID NO.12)

[0247] 在一些实施方案中,所述载体包含与跨膜结构域偶联的抗CD28抗体或其抗原结合片段。TGN1412(也被称为CD28-SuperMAB)是人源化单克隆抗体,其不仅结合至CD28受体,而且是CD28受体的强激动剂。其CDR如下。

[0248] CDRH1:GYTFSY (SEQ ID NO.13)

[0249] CDRH2:YPGNVN (SEQ ID NO.14)

[0250] CDRH3:SHYGLDWNFDV (SEQ ID NO.15)

[0251] CDRL1:HASQNIYVLN (SEQ ID NO.16)

[0252] CDRL2:KASNLHT (SEQ ID NO.17)

[0253] CDRL3:QQGQTYPYT (SEQ ID NO:18)

[0254] 在一些实施方案中,所述载体包含与跨膜结构域偶联的CD134配体或其功能片段。OX40L是CD134的天然配体,并且在诸如DC2 (树突细胞的亚型) 的细胞上表达,使得能够扩增Th2细胞分化。OX40L也被表示为CD252 (分化簇252)。

[0255] OX40L的序列是:

[0256] MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDTNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL (SEQ ID NO:19)

[0257] 在一些实施方案中,所述载体包含4-1BB的配体或其功能片段,其与4-1BB的天然跨膜结构域或异源跨膜结构域偶联。4-1BBL是属于肿瘤坏死因子 (TNF) 配体家族的细胞因子。这种跨膜细胞因子是双向信号转导子,其充当作为T淋巴细胞中的共刺激受体分子的4-1BB配体。已经表明4-1BBL除了促进T淋巴细胞增殖外,还重新激活无能T淋巴细胞。

[0258] 41BBL的序列是

[0259] MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:20)

[0260] 转导增强子间隔子结构域

[0261] 促有丝分裂转导增强子和/或基于细胞因子的转导增强子可以包含“间隔子序列”以连接抗原结合结构域与跨膜结构域。柔性间隔子允许抗原结合结构域沿不同方向定向以促进结合。如本文所用,术语“偶联”是指两个蛋白的化学连接,即直接C末端至N末端融合;与非肽空间的化学连接;与多肽空间的化学连接;以及两个蛋白经由与多肽间隔子 (例如间隔子序列) 的肽键的C末端至N末端融合。

[0262] 间隔子序列可以例如包含IgG1 Fc区、IgG1铰链或人CD8茎或小鼠CD8茎。间隔子可以可替代地包含具有与IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎类似的长度和/或结构域间隔特性的可替代接头序列。可以改变人IgG1间隔子以去除Fc结合基序。在一些实施方案中,所述间隔子序列可以源自人蛋白质。

[0263] 这些间隔子的氨基酸序列的例子如下。

[0264] 人IgG1的铰链-CH2CH3:

[0265] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKD (SEQ ID NO:21)

[0266] 人CD8茎:

[0267] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI (SEQ ID NO:22)

[0268] 人IgG1铰链:

[0269] AEPKSPDKTHTCPPCKDPK (SEQ ID NO:23)

[0270] CD2胞外域:

[0271] KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDDLKKIAQFRKEKETFKEDTYKLFKNGTL  
KIKHLKTDDQDIYKVSIIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLS  
QRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD (SEQ ID NO:24)

[0272] CD34胞外域:

[0273] SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSQETTTSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVI  
TSVYGNTNSSVQSQTSTVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIAEI  
KCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRT  
EISSKLQLMKKHQSDLKGLDFTQDVASHQSYSQKT (SEQ ID NO:25)

[0274] 所述跨膜结构域是跨膜的促有丝分裂转导增强子和/或基于细胞因子的转导增强子的序列。所述跨膜结构域可以包含疏水性 $\alpha$ 螺旋。所述跨膜结构域可以源自CD28。在一些实施方案中,所述跨膜结构域源自人蛋白质。

[0275] 跨膜结构域的一种可替代的选择是膜靶向结构域,诸如GPI锚。GPI锚定是在内质网中发生的翻译后修饰。将预组装的GPI锚前体转移到带有C末端GPI信号序列的蛋白质上。在加工期间,GPI锚替换GPI信号序列,并经由酰胺键与目标蛋白连接。GPI锚将成熟蛋白靶向膜。在一些实施方案中,本发明的标记蛋白包含GPI信号序列。

[0276] 本公开文本的病毒载体可以在病毒包膜中包含基于细胞因子的转导增强子。在一些实施方案中,所述基于细胞因子的转导增强子在病毒载体产生期间源自宿主细胞。在一些实施方案中,所述基于细胞因子的转导增强子由宿主细胞制成并在细胞表面表达。当新生病毒载体从宿主细胞膜出芽时,基于细胞因子的转导增强子可以作为包装细胞衍生的脂质双层的一部分掺入病毒包膜中。

[0277] 所述基于细胞因子的转导增强子可以包含细胞因子结构域和跨膜结构域。其可以具有结构C-S-TM,其中C是细胞因子结构域,S是任选的间隔子结构域(例如间隔子序列),并且TM是跨膜结构域。间隔子结构域和跨膜结构域如以上所定义。

[0278] 所述细胞因子结构域可以包含T细胞激活细胞因子(诸如来自IL2、IL7和IL15)或其功能片段。如本文所用,细胞因子的“功能片段”是多肽的片段,其保留了结合其特定受体和激活T细胞的能力。

[0279] IL2是由T细胞分泌的因子之一,其调节T细胞和某些B细胞的生长和分化。IL2是诱导应答性T细胞的增殖的淋巴因子。其作为单一糖基化多肽被分泌,并且信号序列的切割是其活性所必需的。溶液NMR表明IL2的结构包含4个螺旋(称为A-D)的束,侧接2个较短的螺旋和几个边界不清的环。螺旋A中的残基以及螺旋A与B之间的环区域中的残基对于受体结合是重要的。IL2的序列是:

[0280] MYRQQLLSIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK  
KATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT  
FCQSIISTLT (SEQ ID NO:26)

[0281] IL7是充当B细胞谱系和T细胞谱系两者的早期淋巴样细胞的生长因子的细胞因

子。IL7的序列是：

[0282] MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL KEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILM GTKEH (SEQ ID NO:27)

[0283] IL15是与IL-2结构类似的细胞因子。与IL-2一样,IL-15与由IL-2/IL-15受体 $\beta$ 链和共同的 $\gamma$ 链构成的复合物结合并通过所述复合物进行信号传导。IL-15是在被一种或多种病毒感染后由单核吞噬细胞和一些其他细胞分泌的。这种细胞因子诱导自然杀伤细胞(主要作用是杀伤病毒感染的细胞的先天免疫系统的细胞)的细胞增殖。IL-15的序列是:MRISKPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVH IVQMFINTS (SEQ ID NO:28)

[0284] 所述基于细胞因子的转导增强子可以包含以下序列之一或其功能片段或变体:膜-IL7:

[0285] MAHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL KEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGGGSPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO:29)

[0286] 膜-IL15:

[0287] MGLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO:30)

[0288] 所述基于细胞因子的转导增强子可以包含如SEQ ID NO:29或30所示的序列的变体,所述变体与所述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,条件是变体序列是具有所需的特性(即当存在于逆转录病毒或慢病毒载体的包膜蛋白中时激活T细胞的能力)的基于细胞因子的转导增强子。

[0289] 本公开文本进一步提供了各种逆转录病毒载体,包括但不限于 $\gamma$ -逆转录病毒载体、 $\alpha$ -逆转录病毒载体和慢病毒载体。

[0290] AAV

[0291] 在一些实施方案中,所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。AAV是4.7kb的单链DNA病毒。基于AAV的重组载体与极好的临床安全性相关,因为野生型AAV是非致病性的,并且与任何已知的疾病没有病因学联系。此外,AAV在许多组织中提供高效基因递送和持续转基因表达的能力。“AAV载体”意指源自腺相关病毒血清型的载体,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAVrh.74等。AAV载体可以具有整体或部分缺失的AAV野生型基因中的一种或多种(例如,rep和/或cap基因),但保留功能侧翼反向末端重复(ITR)序列。功能ITR序列是AAV病毒粒子的救援、复制和包装所必需的。因此,AAV载体在本文中定义为至少包含以顺式进行病毒的复制和包装所需的那些序列(例如,功能ITR)。ITR不需要是野生型核苷酸序列,并且可以例如通过核苷酸的插入、缺失或取代而改变,只要序列提供功能救援、复制和包装即可。AAV载体可以包含其他修饰,包括但不

限于一个或多个修饰的衣壳蛋白(例如,VP1、VP2和/或VP3)。例如,可以修饰衣壳蛋白以改变向性和/或降低免疫原性。

[0292] 基于AAV的重组载体与极好的临床安全性相关,因为野生型AAV是非致病性的,并且与任何已知的疾病没有病因学联系。此外,AAV在许多组织中提供高效基因递送和持续转基因表达的能力。AAV的各种血清型是已知的,包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh.10、AAVrh.74等。AAV载体可以具有整体或部分缺失的AAV野生型基因中的一种或多种(例如rep和/或cap基因),但保留功能侧翼反向末端重复(ITR)序列。重组AAV载体的血清型由其衣壳决定。国际专利公开号W0 2003042397A2披露了多种衣壳序列,包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV8、AAV9和rh10的那些衣壳序列。国际专利公开号W0 2013078316A1披露了来自AAVrh74的VP1的多肽序列。许多不同的天然存在的或遗传修饰的AAV衣壳序列在本领域中是已知的。

[0293] 可用于本公开文本的实践的AAV载体可以使用包括基于腺病毒的和无辅助病毒的系统各种系统包装到AAV病毒粒子(病毒颗粒)中。AAV生物学中的标准方法包括Kwon和Schaffer.Pharm Res.(2008) 25(3):489-99;Wu等人Mol.Ther.(2006) 14(3):316-27;Burger等人Mol.Ther.(2004) 10(2):302-17;Grimm等人Curr Gene Ther.(2003) 3(4):281-304;Deyle DR,Russell DW.Curr Opin Mol Ther.(2009) 11(4):442-447;McCarty等人Gene Ther.(2001) 8(16):1248-54;以及Duan等人Mol Ther.(2001) 4(4):383-91中描述的那些。无辅助病毒的系统包括US 6,004,797;US 7,588,772;以及US 7,094,604中描述的那些。

[0294] 可以使用分子生物学领域中已知的方法构建可用于本公开文本的实践的基因递送病毒载体。典型地,携带转基因的病毒载体由编码转基因的多核苷酸、合适的调节元件和产生病毒蛋白所必需的元件(其介导细胞转导)组装而成。此类重组病毒可以通过本领域中已知的技术产生,例如通过转染包装细胞或通过用辅助质粒或病毒瞬时转染。病毒包装细胞的例子包括但不限于HeLa细胞、SF9细胞(任选地与杆状病毒辅助载体一起)、293细胞等。基于疱疹病毒的系统可以用于产生AAV载体,如US20170218395A1中所述。用于产生此类复制缺陷型重组病毒的详细方案可以在例如W095/14785、W096/22378、美国专利号5,882,877、美国专利号6,013,516、美国专利号4,861,719、美国专利号5,278,056和W094/19478中找到,所述文献中的每一个的完整内容特此通过引用并入。

[0295] 可用于本公开文本的组合物和方法的病毒载体的说明性例子披露于W0 2016/139463;W0 2017/165245;W0 2018111834中;其每一个都以其整体并入本文。

[0296] 非病毒载体

[0297] 在一些实施方案中,本公开文本的组合物和方法可以与非病毒载体一起使用。说明性非病毒载体提供于例如Smith等人Nat Nanotechnol.12(8):813-820(2017)中。在一些实施方案中,所述非病毒载体是一种类型的纳米颗粒。在一些实施方案中,所述纳米颗粒是基于聚合物的。在一些实施方案中,所述非病毒载体是基于脂质体的。在一些实施方案中,所述纳米颗粒配备有免疫细胞靶向分子。在一些实施方案中,所述纳米颗粒负载有编码一种或多种表达盒的多核苷酸分子。

[0298] 嵌合抗原受体

[0299] 在一些实施方案中,本文所述的载体用于将编码一种或多种嵌合抗原受体(CAR)

的核酸序列(多核苷酸)转导到细胞(例如,T淋巴细胞)中。在一些实施方案中,所述载体的转导导致一种或多种CAR在转导的细胞中表达。

[0300] CAR是人工膜结合蛋白,其将T淋巴细胞定向至抗原,并且刺激T淋巴细胞以杀伤展示所述抗原的细胞。参见例如Eshhar,美国专利号7,741,465。通常,CAR是基因工程化的受体,其包含与抗原(例如,细胞上的抗原)结合的胞外结构域、任选的接头、跨膜结构域和含有共刺激结构域和/或将激活信号传递至免疫细胞的信号传导结构域的胞内(胞质)结构域。在CAR的情况下,单个受体可以被编程为既识别特定抗原,又在与所述抗原结合时激活免疫细胞以攻击和破坏带有所述抗原的细胞。当这些抗原存在于肿瘤细胞上时,表达CAR的免疫细胞可以靶向并杀伤肿瘤细胞。在满足所有其他条件的情况下,当CAR在例如T淋巴细胞的表面上表达并且CAR的胞外结构域与抗原结合时,胞内信号传导结构域将信号传递至T淋巴细胞以激活和/或增殖,并且如果所述抗原存在于细胞表面上,则杀伤表达所述抗原的细胞。因为T淋巴细胞需要两种信号,即初级激活信号和共刺激信号,为了最大限度地激活,CAR可以包含刺激结构域和共刺激结构域,使得抗原与胞外结构域的结合导致初级激活信号和共刺激信号两者的传递。

[0301] CAR胞内结构域

[0302] 在一些实施方案中,CAR的胞内结构域是或包含在T淋巴细胞表面上表达并触发所述T淋巴细胞激活和/或增殖的蛋白质的胞内结构域或基序。这种结构域或基序能够传递初级抗原结合信号,所述信号是T淋巴细胞响应抗原与CAR的胞外部分结合而激活所必需的。典型地,此结构域或基序包含或者是ITAM(免疫受体酪氨酸激活基序)。适合于CAR的含ITAM的多肽包括例如 $\zeta$ CD3链(CD3 $\zeta$ )或其含ITAM的部分。在一些实施方案中,所述胞内结构域是CD3 $\zeta$ 胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述胞内结构域来自淋巴细胞受体链、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基或IL-2受体亚基。在一些实施方案中,CAR的胞内信号传导结构域可以源自例如003 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD22、CD79a、CD66d或CD39的信号传导结构域。“细胞内信号传导结构域”是指CAR多肽的一部分,所述部分参与将有效CAR与目标抗原结合的信息转导至免疫效应细胞内部,以引发效应细胞功能,例如激活、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括向CAR结合的目标细胞释放细胞毒性因子,或在抗原与胞外CAR结构域结合后引发的其他细胞应答。

[0303] 在一些实施方案中,CAR另外包含一个或多个共刺激结构域或基序,例如作为多肽的胞内结构域的一部分。共刺激分子是除了抗原受体或Fc受体之外的熟知的细胞表面分子,其在与抗原结合时提供T淋巴细胞的有效激活和功能所需的第二信号。所述一个或多个共刺激结构域或基序可以例如是或包含以下各项中的一个或多个:共刺激CD27多肽序列、共刺激CD28多肽序列、共刺激OX40(CD134)多肽序列、共刺激4-1BB(CD137)多肽序列、或共刺激诱导型T细胞共刺激(ICOS)多肽序列、或其他共刺激结构域或基序、或其任何组合。在一些实施方案中,所述一个或多个共刺激结构域选自以下各项的胞内结构域:4-1BB、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM和ZAP70。

[0304] 在一些实施方案中,所述胞内结构域可以经进一步修饰以编码可检测的例如荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白)或其已知的任何变体。

### [0305] CAR跨膜区

[0306] 跨膜区可以是掺入功能CAR的任何跨膜区,例如,来自CD4或CD8分子的跨膜区。

[0307] 在一些实施方案中,CAR的跨膜结构域可以源自以下各项的跨膜结构域:CD8,T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、4-1BBL、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRFI)、CD160、CD19、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C。

### [0308] CAR接头区

[0309] 位于胞外结构域与跨膜结构域之间的CAR的任选接头可以是长度为约2至100个氨基酸的多肽。所述接头可以包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸)或由其构成,使得相邻的蛋白质结构域相对于彼此自由移动。例如,当希望确保两个相邻的结构域彼此之间不发生空间干扰时,可以使用更长的接头。接头可以是可切割的或不可切割的。可切割的接头的例子包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等效物及其组合。在一些实施方案中,所述接头源自任何免疫球蛋白的铰链区或铰链区的部分。

### [0310] CAR胞外结构域

[0311] 在一些实施方案中,使用本文所述的方法转导到细胞中的核酸包含编码多肽的序列,其中所述多肽的胞外结构域与目的抗原结合。在一些实施方案中,所述胞外结构域包含与所述抗原结合的受体或受体的一部分。在一些实施方案中,所述胞外结构域包含或者是抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,所述胞外结构域包含或者是单链Fv结构域。所述单链Fv结构域可以包含例如通过柔性接头连接至VH的VL,其中所述VL和VH来自结合所述抗原的抗体。

[0312] 在一些实施方案中,CAR的胞外结构域可以含有结合所希望的抗原(例如前列腺新抗原)的任何多肽。所述胞外结构域可以包含scFv、抗体的一部分或可替代的支架。CAR也可以经工程化以结合两个或更多个所希望的抗原,所述抗原可以串联布置并且由接头序列分开。例如,一个或多个结构域抗体、scFv、美洲驼VHH抗体或其他仅VH的抗体片段可以经由接头串联地组织,以向CAR提供双特异性或多特异性。

[0313] 多肽的胞外结构域结合的抗原可以是任何目的抗原,例如可以是肿瘤细胞上的抗原。所述肿瘤细胞可以是例如实体瘤中的细胞或血癌中的细胞。所述抗原可以在任何类型的肿瘤或癌症的细胞上表达的任何抗原,例如以下肿瘤或癌症的细胞:淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑色素瘤(如恶性黑色素瘤)、皮肤癌、结直肠癌、硬纤维瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、内分泌肿瘤、尤因肉瘤、外周原始神经外胚层肿瘤、实体生殖细胞肿瘤、肝母细胞瘤、神经母细胞瘤、非横纹肌肉瘤软组织肉瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肾母细胞瘤、胶质母细胞瘤、粘液瘤、纤维瘤、脂肪瘤等。在一

些实施方案中,所述淋巴瘤可以是慢性淋巴细胞白血病(小淋巴细胞淋巴瘤)、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、结内边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、T淋巴细胞幼淋巴细胞白血病、T淋巴细胞大粒状淋巴细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、成人T淋巴细胞白血病/淋巴瘤、结外NK/T淋巴细胞淋巴瘤、鼻型肠病型T淋巴细胞淋巴瘤、肝脾T淋巴细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿病、塞扎里综合征、原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、血管免疫母细胞T淋巴细胞淋巴瘤、外周T淋巴细胞淋巴瘤(未指定)、间变性大细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,其中癌症是慢性淋巴细胞白血病(CLL),CLL的B细胞具有正常核型。在一些实施方案中,其中癌症是慢性淋巴细胞白血病(CLL),CLL的B细胞携带17p缺失、11q缺失、12q三体性、13q缺失或p53缺失。

[0314] 在一些实施方案中,所述抗原是肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)。在一些实施方案中,在不受限制的情况下,所述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是B细胞成熟抗原(BCMA)、B细胞激活因子(BAFF)、Her2、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、EGFRvIII、癌抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙网膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、CD19、CD20、CD34、CD45、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液状蛋白(GCDFP-15)、HMB-45抗原、蛋白黑色素-A(由T淋巴细胞识别的黑色素瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌肉特异性肌纤蛋白(MSA)、神经丝、神经特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白(synaptophysin)、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、丙酮酸激酶同工酶M2型(肿瘤M2-PK)的二聚体形式、异常ras蛋白或异常p53蛋白。

[0315] 在一些实施方案中,TAA或TSA是癌症/睾丸(CT)抗原,例如BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM-TES-85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ESO-1、NY-SAR-35、OY-TES-1、SPANXB1、SPA17、SSX、SYCP1或TPTE。

[0316] 在一些实施方案中,TAA或TSA是碳水化合物或神经节苷脂,例如fuc-GM1、GM2(癌胚抗原-免疫原性-1;OFA-I-1);GD2(OFA-I-2)、GM3、GD3等等。

[0317] 在一些实施方案中,TAA或TSA是 $\alpha$ -肌动蛋白-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Abl融合蛋白、 $\beta$ -连环蛋白、CA 125、CA 15-3(CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can融合蛋白、EBNA、EF2、埃巴病毒抗原、ETV6-AML1融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2和3、neo-PAP、I类肌球蛋白、OS-9、pml-RAR $\alpha$ 融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、磷酸丙糖异构酶、Gage 3、Gage 4、Gage 5、Gage 6、Gage 7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15(58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、H-Ras、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、13-连环蛋白、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、

CD68\KP1、C0-029、FGF-5、G250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-C0-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、CD19、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2 (神经节苷脂G2)、EGFRvIII (表皮生长因子III)、精子蛋白17 (Sp17)、间皮素、PAP (前列腺酸性磷酸酶)、prostein、TARP (T细胞受体  $\gamma$  交替阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAP1 (前列腺六次跨膜表皮抗原1)、异常ras蛋白或异常p53蛋白。在一些实施方案中,所述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原整合素 $\alpha$ V $\beta$ 3 (CD61)、催乳素、K-Ras (V-Ki-ras2柯尔斯顿大鼠肉瘤病毒致癌基因)或Ral-B。其他肿瘤相关和肿瘤特异性抗原是本领域技术人员已知的。

[0318] 与TSA和TAA结合的抗体和scFv包括本领域已知的抗体和scFv,编码它们的核苷酸序列也是如此。

[0319] 在一些实施方案中,所述抗原是这样的抗原,其不被认为是TSA或TAA,但与肿瘤细胞或由肿瘤引起的损伤相关。在一些实施方案中,例如,所述抗原是例如生长因子、细胞因子或白细胞介素,例如与血管生成或血管发生相关的生长因子、细胞因子或白细胞介素。此类生长因子、细胞因子或白细胞介素可以包括例如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)或白细胞介素-8(IL-8)。肿瘤也可以在肿瘤局部产生低氧环境。因此,在一些实施方案中,所述抗原是低氧相关因子,例如HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-2 $\beta$ 、HIF-3 $\alpha$ 或HIF-3 $\beta$ 。肿瘤也可以引起对正常组织的局部损伤,引起被称为损伤相关分子模式分子(DAMP;也被称为警报素)的分子释放。因此,在一些实施方案中,所述抗原是DAMP,例如热休克蛋白、染色质相关蛋白高迁移率组盒1(HMGB1)、S100A8(MRP8,钙粒蛋白A)、S100A9(MRP14,钙粒蛋白B)、血清淀粉样蛋白A(SAA),或者可以是脱氧核糖核酸、三磷酸腺苷、尿酸或硫酸肝素。

[0320] 在本文所述的多肽的一些实施方案中,所述胞外结构域直接或通过接头、间隔子或铰链多肽序列(例如,来自CD28的序列或来自CTLA4的序列)与所述跨膜结构域连接。

[0321] 在一些实施方案中,结合所希望的抗原的胞外结构域可以源自使用本文所述的技术产生的抗体或其抗原结合片段。

[0322] CAR的例子

[0323] 可以与本公开文本的组合物和方法结合使用的嵌合抗原受体的非限制性例子披露于W0 2019/200056;PCT/US2019/062675;US 62/916,110;W02015/017214;W0/2018/148224;W0 2019156795中,所述文献的中的每一个以其整体并入本文。

[0324] 基因编辑

[0325] 许多基因编辑方法在本领域中是已知的,并且正在持续地创建另外的方法。本公开文本的方法和组合物能够递送多种遗传有效负荷,所述遗传有效负荷包括旨在插入目标细胞和/或基因编辑系统(CRISPR-Cas、大范围核酸酶、归巢核酸内切酶、锌指酶等等)的基因组中的多核苷酸。在实施方案中,将多核苷酸(例如转基因)、酶和/或指导RNA在一个、两个、三个或更多个相同类型的载体(例如慢病毒、AAV等)或不同类型的载体(包括例如非病毒载体和病毒载体的组合或不同类型的病毒载体)中递送。本公开文本的方法和系统可以用于产生一个或多个点突变、插入、缺失等。随机诱变和多位点基因编辑也在本公开文本的范围内。

[0326] 目标免疫细胞

[0327] 可以是本文所述的载体的靶标的细胞的非限制性例子包括T淋巴细胞、树突细胞(DC)、Treg细胞、B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞……。

#### [0328] T细胞

[0329] T细胞(“T淋巴细胞”)是一类淋巴细胞(本身是一类白细胞),其在细胞介导的免疫中起主要作用。有几个T细胞亚群,每个亚群具有不同的功能。通过在细胞表面上T细胞受体(TCR)的存在,可以将T细胞与其他淋巴细胞(诸如B细胞和NK细胞)区分开。TCR负责识别与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原,并且由两个不同的蛋白质链构成。在95%的T细胞中,TCR由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链组成。当TCR与抗原肽和MHC(肽/MHC复合物)接合时,T淋巴细胞通过一系列由相关酶、共受体、特化衔接子分子和激活或释放的转录因子介导的生化事件而被激活。

[0330] 在一些实施方案中,本文提供的方法中使用的细胞是原代T淋巴细胞(例如,原代人T淋巴细胞)。用于本文提供的方法中的原代T淋巴细胞可以是幼稚T淋巴细胞或MHC限制性T淋巴细胞。在一些实施方案中,所述T淋巴细胞是 $CD4^+$ 。在其他实施方案中,所述T淋巴细胞是 $CD8^+$ 。在一些实施方案中,所述原代T淋巴细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。在一些实施方案中,所述原代T淋巴细胞已经从肿瘤活检分离,或者已经从自肿瘤活检分离的T淋巴细胞扩增。在一些实施方案中,所述原代T淋巴细胞已经从分离自外周血、脐带血或淋巴的T淋巴细胞分离或扩增。在一些实施方案中,所述T淋巴细胞对于特定个体(例如,所述T淋巴细胞的接受者)是同种异体的。在某些其他实施方案中,所述T淋巴细胞对于某些个体(例如,所述T淋巴细胞的接受者)不是同种异体的。在一些实施方案中,所述T淋巴细胞对于特定个体(例如,所述T淋巴细胞的接受者)是自体的。

[0331] 在一些实施方案中,用于本文所述的方法的原代T淋巴细胞自肿瘤分离,例如,是肿瘤浸润性淋巴细胞。在一些实施方案中,此类T淋巴细胞对肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)是特异性的。在一些实施方案中,从个体获得原代T淋巴细胞,将其任选地扩增,然后使用本文所述的方法用编码一种或多种嵌合抗原受体(CAR)的核酸转导,然后任选地扩增。T淋巴细胞可以例如通过使培养物中的T淋巴细胞与抗CD3和/或CD28的抗体接触(例如,抗体附接至珠粒,或附接至细胞培养板的表面)而扩增;参见例如,美国专利号5,948,893;6,534,055;6,352,694;6,692,964;6,887,466;以及6,905,681。在一些实施方案中,所述抗体是抗CD3和/或抗CD28的,并且所述抗体不与固体表面结合(例如,所述抗体接触溶液中的T淋巴细胞)。在一些实施方案中,抗CD3抗体或抗CD28抗体中的任一种与固体表面(例如珠粒、组织培养皿塑料)结合,且另一种抗体不与固体表面结合(例如,存在于溶液中)。

#### [0332] NK细胞

[0333] 自然杀伤(NK)细胞是构成先天免疫系统的主要组分的细胞毒性淋巴细胞。NK细胞典型地占正常外周血中单个核细胞分数的大约10%至15%。NK细胞不表达T细胞抗原受体(TCR)、CD3或表面免疫球蛋白(Ig)B细胞受体,但通常表达在人类中的表面标记物CD16(Fc $\gamma$ RIII)和CD56。NK细胞是细胞毒性的;其细胞质中的小颗粒含有特殊的蛋白质,诸如穿孔素和被称为颗粒酶的蛋白酶。在非常接近预定杀伤的细胞释放时,穿孔素在目标细胞的细胞膜中形成孔,颗粒酶和相关分子可以通过所述孔进入,从而诱导细胞凋亡。一种颗粒酶即颗粒酶B(也被称为颗粒酶2和细胞毒性T淋巴细胞相关丝氨酸酯酶1)是一种丝氨酸蛋白酶,

其对于细胞介导的免疫应答中目标细胞凋亡的快速诱导是至关重要的。

[0334] NK细胞响应于干扰素或巨噬细胞衍生的细胞因子而被激活。激活的NK细胞被称为淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞。NK细胞具有两种类型的表面受体,被标记为“激活受体”和“抑制受体”,它们控制细胞的细胞毒性活性。

[0335] 在其他活性中,NK细胞在肿瘤的宿主排斥中起作用。因为许多癌细胞具有降低的I类MHC表达或没有I类MHC表达,所以它们可以成为NK细胞的靶标。自然杀伤细胞可以被缺乏主要组织相容性复合体(MHC)蛋白或显示降低水平的主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的细胞激活。除了参与直接的细胞毒性杀伤,NK细胞还在细胞因子产生中起作用,这可能对于控制癌症和感染是重要的。激活和扩增的NK细胞和LAK细胞已经用于晚期癌症患者的离体疗法和体内治疗两者,其中对骨髓相关疾病(如白血病)、乳腺癌和某些类型的淋巴瘤取得了一定的成功。

[0336] 药物组合物和配制品

[0337] 本公开文本的配制品和组合物可以包含任何数量的多特异性抗体和/或载体的组合,以及任选地一种或多种另外的药剂(多肽、多核苷酸、化合物等),它们配制在药学上可接受的或生理学上可接受的组合物中,以便单独或与一种或多种其他形式的疗法组合施用于细胞、组织、器官或动物。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂进一步增加载体的转导效率。

[0338] 在一些实施方案中,本公开文本提供了组合物,所述组合物包含与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的如本文所述的多特异性抗体(例如双特异性抗体)。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含其他药剂,例如像细胞因子、生长因子、激素、小分子或各种药学活性剂。

[0339] 在一些实施方案中,根据本公开文本使用的抗体的组合物和配制品可以通过将具有所希望的纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980))混合来制备以用于以冻干的配制品或水性溶液的形式储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的。在一些实施方案中,在配制品中使用一种或多种药学上可接受的表面活性剂(surface-active agent)(表面活性剂(surfactant))、缓冲液、等渗剂、盐、氨基酸、糖、稳定剂和/或抗氧化剂。

[0340] 合适的药学上可接受的表面活性剂包括但不限于聚乙烯-脱水山梨糖醇-脂肪酸酯、聚乙二醇-聚丙二醇-聚氧乙烯-硬脂酸酯和十二烷基硫酸钠。合适的缓冲液包括但不限于组氨酸缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。

[0341] 使用等渗剂来提供等渗配制品。等渗配制品是液体或从固体形式(例如冻干形式)重构的液体,并且表示具有与与其比较的一些其他溶液相同的张力的溶液,诸如生理盐溶液和血清。合适的等渗剂包括但不限于盐,包括但不限于氯化钠(NaCl)或氯化钾;糖,包括但不限于葡萄糖、蔗糖、海藻糖或和任何来自氨基酸、糖、盐及其组合的组的组分。在一些实施方案中,等渗剂通常以约5mM至约350mM的总量使用。

[0342] 盐的非限制性例子包括阳离子钠离子、钾离子、钙离子或镁离子与阴离子氯离子、磷酸根离子、柠檬酸根离子、琥珀酸根离子、硫酸根离子或其混合物的任何组合的盐。氨基酸的非限制性例子包括精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨

酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸。根据本公开文本的糖的非限制性例子包括海藻糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺(也称为“葡甲胺”)、半乳糖胺和神经氨酸及其组合。稳定剂的非限制性例子包括如上所述的氨基酸和糖以及如本领域已知的任何种类和分子量的可商购的环糊精和葡聚糖。抗氧化剂的非限制性例子包括赋形剂,诸如甲硫氨酸、苯甲醇或用于使氧化最小化的任何其他赋形剂。

[0343] 在一些实施方案中,本公开文本提供了包含治疗有效量的如本文所述的载体的组合物,所述载体与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的细胞培养基)一起配制。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含其他药剂,例如像细胞因子、生长因子、激素、小分子或各种药学活性剂。

[0344] 短语“药学上可接受的”是指当施用于人时不产生变态反应或类似不良反应的分子实体和组合物。含有蛋白质作为活性成分的水性组合物的制备在本领域中是熟知的。典型地,将此类组合物制备为作为液体溶液或悬浮液的可注射剂;也可以制备适合于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。也可以乳化所述制剂。

[0345] 如本文所用,“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等等。此类介质和药剂针对药物活性物质的用途在本领域中是熟知的。除非任何常规的介质或药剂与活性成分不相容,否则设想其在治疗组合物中使用。还可以将补充性活性成分掺入组合物中。

[0346] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理学上相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等,包括药学上可接受的细胞培养基。在一些实施方案中,包含载体的组合物适合于肠胃外施用,例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用。药学上可接受的载体包括无菌水性溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途在本领域是熟知的。除非任何常规介质或药剂与转导的细胞不相容,否则设想其在本公开文本的药物组合物中的用途。

[0347] 所述组合物可以进一步包含一种或多种多肽、多核苷酸、包含其的载体、增加载体转导效率的化合物,它们配制在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液中,以便单独或与一种或多种其他方式的疗法组合施用于细胞或动物。还应理解,如果需要,本公开文本的组合物也可以与其他药剂组合施用,所述药剂例如像细胞因子、生长因子、激素、小分子或各种药学活性剂。实际上对还可以包含在所述组合物中的其他组分没有限制,条件是另外的药剂不会不利地影响组合物递送预期疗法的能力。

[0348] 本公开文本还提供了药物组合物,其包含本文公开的表达盒或载体(例如,治疗载体)和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中,所述药物组合物包含慢病毒载体,所述慢病毒载体包含本文公开的表达盒,例如,其中所述表达盒包含编码一种或多种嵌合抗原受体(CAR)及其变体的一种或多种多核苷酸序列。

[0349] 含有所述表达盒或载体的药物组合物可以呈适合于所选的施用模式的任何形式,所述施用模式例如心室内、心肌内、冠状动脉内、静脉内、动脉内、肾内、尿道内、硬膜外、鞘内或肌内施用。所述载体可以作为唯一的活性剂或与其他活性剂组合以单位施用形式作为与常规药物支持物的混合物施用于动物和人类。在一些实施方案中,所述药物组合物包含

用根据本公开文本的载体中的任一种离体转导的细胞。

[0350] 在一些实施方案中,所述载体(例如慢病毒载体)或包含所述载体的药物组合物在全身施用时是有效的。例如,在一些情况下,当静脉内施用于受试者(例如,灵长类动物,诸如非人灵长类动物或人)时,本公开文本的病毒载体显示出功效。在一些实施方案中,本公开文本的病毒载体当全身施用时能够在各种免疫细胞中(例如,在T细胞、树突细胞、NK细胞中)诱导CAR的表达。

[0351] 在各种实施方案中,所述药物组合物含有对于能够被注射的配制品是药学上可接受的媒介物(例如,载体、稀释剂和赋形剂)。示例性赋形剂包括泊洛沙姆。用于病毒载体的配制缓冲液通常含有防止聚集的盐和降低载体粘性的其他赋形剂(例如泊洛沙姆)。特别地,这些可以是等渗的、无菌的盐溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等等或此类盐的混合物),或干燥的、尤其是冻干的组合物,其在根据情况添加无菌水或生理盐水后允许构成可注射溶液。在一些实施方案中,配制品在冷冻(例如在低于0℃、约-60℃或约-72℃下)时对于储存和使用是稳定的。

[0352] 本公开文本的药物组合物、药学上可接受的赋形剂和载体溶液的配制是本领域技术人员熟知的,对于在多种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案的开发也是如此,所述治疗方案包括例如口服、肠胃外、静脉内、鼻内和肌肉施用以及配制。

[0353] 在某些情况下,将希望肠胃外、静脉内、肌肉或腹膜内递送本文公开的组合物,例如在美国专利号5,543,158;5,641,515;以及5,399,363(各自通过引用以其整体特别地并入本文)中。可以在与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0354] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉剂(美国专利号5,466,468,其通过引用以其整体具体地并入本文)。在所有情况下,所述形式应是无菌的并且应是以易于注射的程度存在的流体。其在制造和储存条件下应是稳定的并且应该抵抗微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用而保存。所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)、其合适的混合物和/或植物油。可以例如通过使用包衣如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。抑制微生物作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等)来促进。在一些实施方案中,添加等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在所述组合物中使用延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶),可以延长可注射组合物的吸收。

[0355] 例如,对于在水性溶液中的肠胃外施用,如有必要,应适当缓冲所述溶液,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水性溶液尤其适合于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在这一点上,根据本公开文本,可以采用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并添加至1000ml皮下灌注液中或注射到拟定的输注部位处(参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版.Baltimore,Md.:Lippincott Williams&Wilkins,2005)。

根据被治疗受试者的状况,剂量必然将发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人将为单独受试者确定适当的剂量。此外,对于人施用,制剂应当满足如由FDA生物标准办公室所要求的无菌性、致热原性以及一般安全性和纯度标准。

[0356] 在一些实施方案中,本公开文本提供了适合于递送病毒载体系统(即,病毒介导的转导)(包括但不限于逆转录病毒(例如,慢病毒)载体)的配制品或组合物。

[0357] 疾病

[0358] 本公开文本还提供了一种增强可以用于治疗疾病、障碍或病症的免疫疗法的功效的方法。在一些实施方案中,所述疾病或障碍是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是血液恶性肿瘤或实体瘤。在一些实施方案中,所述受试者对于用先前的抗癌治疗剂的治疗是复发的或难治的。

[0359] 血液恶性肿瘤

[0360] 在一些实施方案中,所述癌症是血液恶性肿瘤。

[0361] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是淋巴瘤、B细胞恶性肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、DLBCL、FL、MCL、边缘区B细胞淋巴瘤(MZL)、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)、CLL、ALL、AML、华氏巨球蛋白血症或T细胞淋巴瘤。

[0362] 在一些实施方案中,所述实体瘤是肺癌、肝癌、宫颈癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、前列腺癌、食管癌或胃癌。WO 2019057124A1披露了适于用结合CD19的T细胞重定向治疗剂治疗的癌症。

[0363] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特淋巴瘤(BL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、华氏巨球蛋白血症、浆细胞白血病、轻链淀粉样变性(AL)、前体B细胞成淋巴细胞性白血病、前体B细胞成淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞恶性肿瘤、慢性骨髓性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、母细胞性浆细胞样树突细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(MZL)、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)、浆细胞白血病、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、白血病或淋巴瘤。

[0364] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0365] 在一些实施方案中,所述多发性骨髓瘤是新诊断的多发性骨髓瘤。

[0366] 在一些实施方案中,所述多发性骨髓瘤是复发性或难治性多发性骨髓瘤。

[0367] 在一些实施方案中,所述多发性骨髓瘤是高风险多发性骨髓瘤。已知患有高风险多发性骨髓瘤的受试者早期复发,且预后和结果差。受试者可以被分类为具有高风险多发性骨髓瘤,他们具有以下细胞遗传学异常中的一种或多种:t(4;14)(p16;q32),t(14;16)(q32;q23),del17p,1qAmp,t(4;14)(p16;q32)和t(14;16)(q32;q23),t(4;14)(p16;q32)和del17p,t(14;16)(q32;q23)和del17p,或t(4;14)(p16;q32)、t(14;16)(q32;q23)和del17p。

[0368] 在一些实施方案中,具有高风险多发性骨髓瘤的受试者具有一种或多种染色体异常,所述染色体异常包括:t(4;14)(p16;q32),t(14;16)(q32;q23),del17p,1qAmp,t(4;14)(p16;q32)和t(14;16)(q32;q23),t(4;14)(p16;q32)和del17p,t(14;16)(q32;q23)和del17p,或t(4;14)(p16;q32)、t(14;16)(q32;q23)和del17p,或其任何组合。

[0369] 可以使用各种定性和/或定量方法来确定疾病的复发或难治性质。可能相关的症状是例如患者健康的下降或平台期,或与实体瘤相关的各种症状的重建或恶化,和/或癌细胞在体内从一个位置扩散到其他器官、组织或细胞。

[0370] 所述细胞遗传学异常可以例如通过荧光原位杂交 (FISH) 检测。在染色体易位中,致癌基因易位到染色体14q32上的IgH区,导致这些基因的调节异常。t (4;14) (p16;q32) 涉及成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 和含有多发性骨髓瘤SET结构域的蛋白质 (MMSET) (也称为WHSC1/NSD2) 的易位,并且t (14;16) (q32;q23) 涉及MAF转录因子C-MAF的易位。17p的缺失 (del17p) 涉及p53基因座的缺失。

[0371] 在一些实施方案中,所述多发性骨髓瘤对于用抗CD38抗体、来那度胺、硼替佐米、泊马度胺、卡非佐米、艾洛珠单抗、伊沙佐米、美法仑或沙利度胺或其任何组合的治疗是复发的或难治的。

[0372] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是AML。

[0373] 在一些实施方案中,所述AML是具有至少一种遗传异常的AML、具有多系发育不良的AML、疗法相关的AML、未分化的AML、最低成熟型AML、成熟型AML、急性骨髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红系细胞白血病、急性巨核细胞白血病、急性嗜碱性粒细胞白血病、伴有纤维化的急性髓细胞增殖症或髓样肉瘤。

[0374] 在一些实施方案中,所述AML是具有至少一种遗传异常的AML。在一些实施方案中,所述AML是具有多系发育不良的AML。在一些实施方案中,所述AML是疗法相关的AML。在一些实施方案中,所述AML是未分化的AML。在一些实施方案中,所述AML是最低成熟型AML。在一些实施方案中,所述AML是成熟型AML。在一些实施方案中,所述AML是急性骨髓单核细胞白血病。在一些实施方案中,所述AML是急性单核细胞白血病。在一些实施方案中,所述AML是急性红系细胞白血病。在一些实施方案中,所述AML是急性巨核细胞白血病。在一些实施方案中,所述AML是急性嗜碱性粒细胞白血病。在一些实施方案中,所述AML是伴有纤维化的急性髓细胞增殖症。在一些实施方案中,所述AML是髓样肉瘤。

[0375] 在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是8号染色体与21号染色体之间的易位、16号染色体中的易位或倒位、15号染色体与17号染色体之间的易位、11号染色体中的改变、或以下各项中的突变:fms相关酪氨酸激酶3 (FLT3)、核仁磷蛋白 (NPM1)、异柠檬酸脱氢酶1 (IDH1)、异柠檬酸脱氢酶2 (IDH2)、DNA (胞嘧啶-5)-甲基转移酶3 (DNMT3A)、CCAAT/增强子结合蛋白α (CEBPA)、U2小核RNA辅助因子1 (U2AF1)、zeste 2多梳阻抑复合物2亚基的增强子 (EZH2)、1A号染色体的结构维持 (SMC1A) 或3号染色体的结构维持 (SMC3)。

[0376] 在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是8号染色体与21号染色体之间的易位。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是16号染色体的易位或倒位。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是15号染色体与17号染色体之间的易位。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是11号染色体中的改变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是fms相关酪氨酸激酶3 (FLT3) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是核仁磷蛋白 (NPM1) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是异柠檬酸脱氢酶1 (IDH1) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是异柠檬酸脱氢酶2 (IDH2) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是DNA (胞嘧啶-5)-甲基转移酶3 (DNMT3A) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是CCAAT/增强子结合蛋白α

(CEBPA) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是U2小核RNA辅助因子1 (U2AF1) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是zeste 2多梳阻抑复合物2 亚基的增强子 (EZH2) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是1A号染色体的结构维持 (SMC1A) 中的突变。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是3号染色体的结构维持 (SMC3) 中的突变。

[0377] 在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是易位t (8;21) (q22;q22)、倒位inv (16) (p13;q22)、易位t (16;16) (p13;q22)、易位t (15;17) (q22;q12)、突变FLT3-ITD、IDH1中的突变R132H或R100Q/R104V/F108L/R119Q/I130V、或IDH2中的突变R140Q或R172。

[0378] 在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是易位t (8;21) (q22;q22)。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是倒位inv (16) (p13;q22)。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是易位t (16;16) (p13;q22)。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是易位t (15;17) (q22;q12)。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是突变FLT3-ITD。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是IDH1中的突变R132H。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是IDH1中的突变R100Q/R104V/F108L/R119Q/I130V。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是IDH2中的突变R140Q。在一些实施方案中,所述至少一种遗传异常是IDH2中的突变R172。

[0379] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是ALL。

[0380] 在一些实施方案中,所述ALL是B细胞谱系ALL、T细胞谱系ALL、成人ALL或儿科ALL。

[0381] 在一些实施方案中,所述ALL是B细胞谱系ALL。在一些实施方案中,所述ALL是T细胞谱系ALL。在一些实施方案中,所述ALL是成人ALL。在一些实施方案中,所述ALL是儿科ALL。

[0382] 在一些实施方案中,患有ALL的受试者具有费城染色体或对用BCR-ABL激酶抑制剂的治疗具有抗性或对其具有获得性抗性。

[0383] 在一些实施方案中,所述患有ALL的受试者具有费城染色体。在一些实施方案中,所述患有ALL的受试者对用BCR-ABL激酶抑制剂的治疗具有抗性或对其具有获得性抗性。

[0384] Ph染色体存在于约20%的患有ALL的成人和小百分比的患有ALL的儿童中,并且与不良预后相关。在复发时,患有Ph+阳性ALL的患者可能正在接受酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 方案,并且可能因此而对TKI具有抗性。因此,可以将如本文所述的方法施用于对选择性或部分选择性BCR-ABL抑制剂具有抗性的受试者。示例性的BCR-ABL抑制剂是例如伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、博舒替尼、帕纳替尼、巴氟替尼、塞卡替尼、陶扎色替或达鲁舍替。

[0385] 在B谱系ALL患者中鉴定出的其他染色体重排是t (v;11q23) (MLL重排)、t (1;19) (q23;p13.3);TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)、t (12;21) (p13;q22);ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) 和t (5;14) (q31;q32);IL3-IGH。

[0386] 在一些实施方案中,所述受试者患有具有以下项的ALL:t (v;11q23) (MLL重排)、t (1;19) (q23;p13.3);TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)、t (12;21) (p13;q22);ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) 或t (5;14) (q31;q32);IL3-IGH染色体重排。

[0387] 染色体重排可以使用熟知的方法,例如荧光原位杂交、核型分析、脉冲场凝胶电泳或测序来鉴定。

[0388] 在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤是冒烟型多发性骨髓瘤、MGUS、ALL、DLBCL、

BL、FL、MCL、华氏巨球蛋白血症、浆细胞白血病、AL、前体B细胞成淋巴细胞性白血病、前体B细胞成淋巴细胞性白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、CLL、B细胞恶性肿瘤、CML、HCL、母细胞性浆细胞样树突细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、MZL、MALT、浆细胞白血病、ALCL、白血病或淋巴瘤。

[0389] 实体瘤

[0390] 在一些实施方案中,所述癌症是实体瘤。

[0391] 在一些实施方案中,所述实体瘤是前列腺癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肝癌、宫颈癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胰腺癌、黑色素瘤、食管癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、肾癌、膀胱癌、肝细胞癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌、甲状腺癌、上皮癌或腺癌。

[0392] 在一些实施方案中,所述前列腺癌是复发性前列腺癌。在一些实施方案中,所述前列腺癌是难治性前列腺癌。在一些实施方案中,所述前列腺癌是恶性前列腺癌。在一些实施方案中,所述前列腺癌是去势抵抗性前列腺癌。

[0393] 定义

[0394] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中的术语“相同”或“同一性”百分比是指当在比较窗口或如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和视觉检查测量的指定区域中为了最大一致进行比较和比对时,相同的或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在特定区域与参考序列共享至少约80%同一性,例如至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性)的两个或更多个序列或子序列。则将此序列称为“基本上相同的”。这个定义还涉及测试序列的互补体。在一些实施方案中,在长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域中,例如在长度为50、100、200、300、400个氨基酸或核苷酸的区域中或在参考序列的全长中存在同一性。

[0395] 对于序列比较,典型地,一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定可替代的参数。序列比较算法随后基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。在一些实施方案中,使用BLAST和BLAST 2.0算法和默认参数。

[0396] 如本文所用的“比较窗口”包括对选自以下项的连续位置数量的任何一个的区段的提及:20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150,其中可以在两个序列最佳比对之后将序列与具有相同数量的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域中是熟知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过以下方法进行:Smith和Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)的同源性比对算法;Pearson和Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)的相似性方法的搜索;这些算法的计算机化实施(在威斯康辛州麦迪逊市科学大道575号Genetics Computer Group的Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或人工比对和目视检查(参见例如Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology (1995增刊))。适合确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的例子是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)以及Altschul等人, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

(1977) 中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(在万维网ncbi.nlm.nih.gov/处)公开获得。

[0397] 两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一核酸编码的多肽与抵抗由第二核酸编码的多肽产生的抗体具有免疫学交叉反应性,如以下所述。因此,例如,在两个肽仅因保守取代而不同时,一个多肽与第二多肽典型地基本上相同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或其互补体在严格条件下彼此杂交。两个核酸序列基本上相同的又另一个指示是可以使用相同的引物来扩增序列。

[0398] 如本文所用,“施用”是指局部和全身施用,例如包括肠内、肠胃外、肺部和局部/透皮施用。可用于本文所述的方法的药物成分(例如,载体)的施用途径包括例如向受试者口服(经口(P.O.))施用、经鼻或吸入施用、作为栓剂施用、局部接触、透皮递送(例如,经由透皮贴剂)、鞘内(IT)施用、静脉内(“iv”)施用、腹膜内(“ip”)施用、肌肉内(“im”)施用、病灶内施用、或皮下(“sc”)施用、或植入缓释装置,例如微型渗透泵、储库配制品等。施用可以通过任何途径进行,所述途径包括肠胃外和透粘膜(例如,口服、经鼻、经阴道、经直肠或透皮)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌肉内、动脉内、肾内、尿道内、心内、冠状动脉内、心肌内、皮内、硬膜外、皮下、腹膜内、心室内、离子电泳和颅内施用。其他递送方式包括但不限于使用脂质体配制品、静脉内输注、透皮贴剂等。

[0399] 术语“全身施用”和“全身地施用”是指将药物成分或组合物施用于哺乳动物,使得药物成分或组合物经由循环系统递送至体内部位(包括药物作用的靶向部位)的方法。全身施用包括但不限于口服、鼻内、经直肠和肠胃外(例如,除了通过消化道以外,诸如肌肉内、静脉内、动脉内、透皮和皮下)施用。

[0400] 术语“共同施用”或“并行施用”,当例如关于药物成分(例如,载体)和/或其类似物和另一活性剂(例如,多特异性抗体)使用时,是指施用药物成分和/或类似物和活性剂使得两者可以同时实现生理作用。然而,这两种药剂不必一起施用。在一些实施方案中,一种药剂的施用可以在另一药剂的施用之前。同时的生理作用不一定需要两种药剂同时存在于循环中。然而,在一些实施方案中,共同施用典型地导致两种药剂对于任何给定剂量以其最大血清浓度的显著分数(例如,20%或更大,例如30%或40%或更大,例如,50%或60%或更大,例如,70%或80%或90%或更大)同时存在于体内(例如,在血浆中)。

[0401] 术语“有效量”或“药学有效量”是指产生所希望的结果所必需的一种或多种药物成分(例如,载体)的量和/或剂量和/或给药方案。

[0402] 短语“施用的缘由(cause)”是指由医学专业人员(例如,医师)或控制受试者的医疗护理的人所采取的行动,其控制和/或允许将正在讨论的一种或多种药剂/一种或多种化合物施用于受试者。施用的缘由可以包括适当的治疗或预防方案的判断和/或确定,和/或为受试者开出一种或多种特定药剂/化合物。这种开处方可以包括例如起草处方表格、注释医疗记录等等。

[0403] 如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指延迟所述术语所应用的疾病或病症或这种疾病或病症的一种或多种症状的发作、阻滞或逆转其进展、降低其严重程度、或减轻或预防所述疾病或病症或这种疾病或病症的一种或多种症状。术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”还包括预防、减轻、改善、减少、抑制、消除和/或逆转疾病或病症的一种或多种症状。

[0404] 术语“减轻”是指病理或疾病的一种或多种症状的减少或消除,和/或病理或疾病的一种或多种症状的发作或变严重的速率的降低或其发作或变严重的延迟,和/或病理或疾病的预防。在一些实施方案中,病理或疾病的一种或多种症状的减少或消除可以包括例如肿瘤体积的可测量的和持续的减小。

[0405] 如本文所用,短语“基本上由……组成”是指在方法或组合物中所述的活性药剂的属或种,并且可以进一步包括本身不具有用于所述适应症或目的实质活性的其他药剂。

[0406] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换地指哺乳动物,优选人或非人灵长类动物,但也指驯养的哺乳动物(例如,犬或猫)、实验室哺乳动物和农业哺乳动物。在各种实施方案中,所述受试者可以是人(例如,成年男性、成年女性、青少年男性、青少年女性、男性儿童、女性儿童)。

[0407] 如本文所用的术语“载体”是指能够独立于另一药剂将外来核酸分子递送至细胞中的大分子复合物。如本文所用,术语载体不包括裸核酸分子,诸如质粒,因为裸核酸分子无法独立于其他因素(诸如转染试剂或电穿孔)而有效地将自身转导至目标细胞中。所述载体可以是病毒载体或非病毒载体。病毒载体包括逆转录病毒载体和慢病毒载体。非病毒载体限于脂质体、纳米颗粒和用于将多核苷酸递送至细胞中的其他封装系统。

[0408] 如本文所用,术语“表达盒”是指能够在适当的设置中驱动多核苷酸(“转基因”)的表达的DNA区段,所述多核苷酸编码掺入所述表达盒中的多肽(例如,嵌合抗原受体)。当引入宿主细胞中时,表达盒尤其能够导向细胞机器以将转基因转录至RNA,然后通常进行进一步加工并最终翻译成多肽。所述表达盒可以包含在载体(例如,病毒载体)中。通常,术语表达盒不包括多核苷酸序列5'至5' ITR和多核苷酸序列3'至3' ITR。

[0409] 术语“源自”用于表示细胞已经从其生物来源获得并且在体外生长或以其他方式操作(例如,在生长培养基中培养以扩增群体和/或产生细胞系)。

[0410] 术语“转导”是指通过载体(例如,慢病毒载体)将核酸引入细胞或宿主生物体中。因此,通过病毒载体将转基因引入细胞中可以被称为细胞的“转导”。所述转基因可以整合到或不整合到转导的细胞的基因组核酸中。如果引入的转基因变得整合到接受者细胞或生物体的核酸(基因组DNA)中,则它可以稳定地维持在所述细胞中。可替代地,引入的转基因可以在染色体外或仅短暂地存在于接受者细胞或宿主生物体中。因此,“转导的细胞”是已经通过转导将转基因引入其中的细胞。因此,“转导的”细胞是其中已经引入了多核苷酸的细胞。

[0411] 术语“转导效率”是当细胞培养物与载体颗粒接触时表达或转导转基因的细胞比例的表达。在一些实施方案中,所述效率可以表示为当给定数量的细胞与给定数量的载体颗粒接触时表达转基因的细胞的数量。在一些实施方案中,“相对转导效率”是在一种条件下由给定数量的病毒颗粒转导的细胞的比例相对于在包含类似数量的相同细胞类型的细胞的另一条件下由相同数量的颗粒转导的细胞的比例。相对转导效率最常用于比较转导效率的调节剂对用所述调节剂处理或未用其处理的细胞和/或动物的作用。

[0412] 在本说明书中提及和鉴定的所有专利、专利出版物和其他出版物出于所有目的单独地和明确地通过引用以其整体并入本文。

[0413] 其他编号的实施方案-A部分

[0414] 本公开文本的一组编号的实施方案提供如下:

- [0415] 条款1.一种在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括:
- [0416] a)施用多特异性抗体以使所述受试者中的免疫细胞更易转导;以及
- [0417] b)施用载体,任选地病毒载体;
- [0418] 其中所述方法转导所述免疫细胞。
- [0419] 条款2.根据条款1所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。
- [0420] 条款3.根据条款1或2所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体。
- [0421] 条款4.根据条款1至3中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。
- [0422] 条款5.根据条款4所述的方法,其中所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。
- [0423] 条款6.根据条款1至5中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。
- [0424] 条款7.根据条款6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19。
- [0425] 条款8.根据条款6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2或MCSP。
- [0426] 条款9.根据条款6所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。
- [0427] 条款10.根据条款6所述的方法,其中所述第二抗原是髓样细胞或树突细胞抗原。
- [0428] 条款11.根据条款10所述的方法,其中所述第二抗原是CD33、DC-SIGN、CD11b、CD11c或CD18。
- [0429] 条款12.根据条款1至11中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。
- [0430] 条款13.根据条款12所述的方法,其中所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。
- [0431] 条款14.根据条款13所述的方法,其中所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。
- [0432] 条款15.根据条款14所述的方法,其中所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。
- [0433] 条款16.根据条款1至15中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。
- [0434] 条款17.根据条款1至16中任一项所述的方法,其中与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。
- [0435] 条款18.根据条款1至18中任一项所述的方法,所述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。
- [0436] 条款19.根据条款1至18中任一项所述的方法,其中与单独施用所述病毒载体相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。
- [0437] 条款20.根据条款1至19中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。
- [0438] 条款21.根据条款1至20中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度(EC50)。
- [0439] 条款22.根据条款1至21中任一项所述的方法,其中所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。

- [0440] 条款23.根据条款1至22中任一项所述的方法,其中步骤a)和/或步骤b)包括皮下施用。
- [0441] 条款24.根据条款1至23中任一项所述的方法,其中步骤a)和/或步骤b)包括淋巴管内施用。
- [0442] 条款25.根据条款1至24中任一项所述的方法,其中所述病毒载体包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸。
- [0443] 条款26.根据条款25所述的方法,其中所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。
- [0444] 条款27.根据条款1至26中任一项所述的方法,其中所述病毒载体包含编码细胞因子受体的多核苷酸。
- [0445] 条款28.根据条款27所述的方法,其中所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。
- [0446] 条款29.根据条款1至28中任一项所述的方法,其中所述载体进一步包含一种或多种转基因。
- [0447] 条款30.根据条款29所述的方法,所述病毒载体包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。
- [0448] 条款31.根据条款3至30中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。
- [0449] 条款32.根据条款31所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。
- [0450] 条款33.根据条款3至32中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体用科卡尔病毒包膜蛋白假型化。
- [0451] 条款34.根据条款3至33中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。
- [0452] 条款35.根据条款34所述的方法,其中将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。
- [0453] 条款36.根据条款1至35中任一项所述的方法,其中步骤a)或步骤b)包括静脉内施用。
- [0454] 条款37.根据条款36所述的方法,其中步骤a)和步骤b)两者都包括静脉内施用。
- [0455] 条款38.根据条款1至37中任一项所述的方法,其中将所述多特异性抗体以约0.001mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。
- [0456] 条款39.根据条款1至38中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。
- [0457] 条款40.一种在有需要的受试者中转导免疫细胞的方法,其包括:
- [0458] a)施用编码多特异性抗体的多核苷酸以激活所述受试者中的免疫细胞;以及
- [0459] b)施用载体,任选地病毒载体;

- [0460] 其中所述方法转导所述免疫细胞。
- [0461] 条款41.根据条款40所述的方法,其中所述编码多特异性抗体的多核苷酸是RNA。
- [0462] 条款42.根据条款40或41所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。
- [0463] 条款43.根据条款40至42中任一项所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体。
- [0464] 条款44.根据条款40至43中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域。
- [0465] 条款45.根据条款44所述的方法,其中所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。
- [0466] 条款46.根据条款40至45中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域。
- [0467] 条款47.根据条款46所述的方法,其中所述第二抗原是CD19。
- [0468] 条款48.根据条款46所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2、MCSP、CD22、CD79a、CD79b或sIgM。
- [0469] 条款49.根据条款46所述的方法,其中所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA。
- [0470] 条款50.根据条款46所述的方法,其中所述第二抗原是淋巴结抗原。
- [0471] 条款51.根据条款40至50中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体是三特异性抗体。
- [0472] 条款52.根据条款40至50中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。
- [0473] 条款53.根据条款52所述的方法,其中所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器(BiTE)。
- [0474] 条款54.根据条款53所述的方法,其中所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE。
- [0475] 条款55.根据条款54所述的方法,其中所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。
- [0476] 条款56.根据条款40至55中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体激活所述免疫细胞。
- [0477] 条款57.根据条款40至56中任一项所述的方法,其中与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活。
- [0478] 条款58.根据条款40至57中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量。
- [0479] 条款59.根据条款40至58中任一项所述的方法,其中与单独施用所述病毒载体相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的转导。
- [0480] 条款60.根据条款40至59中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体增强所述病毒载体对所述免疫细胞的体内转导。
- [0481] 条款61.根据条款40至60中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体降低所述病毒载体的有效浓度(EC50)。
- [0482] 条款62.根据条款40至61中任一项所述的方法,其中所述方法实现与包括施用更高浓度的所述病毒载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。
- [0483] 条款63.根据条款40至62中任一项所述的方法,其中步骤a)和/或步骤b)包括皮下施用。

[0484] 条款64.根据条款40至63中任一项所述的方法,其中步骤a)和/或步骤b)包括淋巴管内施用。

[0485] 条款65.根据条款40至64中任一项所述的方法,其中步骤a)和/或步骤b)包括静脉内施用。

[0486] 条款66.根据条款40至65中任一项所述的方法,其中所述病毒载体包含编码T细胞受体或嵌合抗原受体的多核苷酸。

[0487] 条款67.根据条款66所述的方法,其中所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。

[0488] 条款68.根据条款40至67中任一项所述的方法,其中所述病毒载体包含编码细胞因子受体的多核苷酸。

[0489] 条款69.根据条款68所述的方法,其中所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。

[0490] 条款70.根据条款43至69中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白,所述跨膜蛋白包含暴露于所述慢病毒载体的表面和/或与所述慢病毒载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域。

[0491] 条款71.根据条款70所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。

[0492] 条款72.根据条款43至70中任一项所述的方法,其中所述载体进一步包含一种或多种转基因。

[0493] 条款73.根据条款72所述的方法,所述病毒载体包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0494] 条款74.根据条款43至73中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体用科卡尔病毒包膜蛋白假型化。

[0495] 条款75.根据条款43至74中任一项所述的方法,其中所述慢病毒载体用尼帕病毒包膜蛋白假型化。

[0496] 条款76.根据条款75所述的方法,其中将所述尼帕包膜蛋白工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。

[0497] 条款77.根据条款43至77中任一项所述的方法,其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0498] 条款78.一种用于体内转导免疫细胞的组合疗法,其包含多特异性抗体和载体,任选地病毒载体。

[0499] 条款79.一种药物组合物,其包含多特异性抗体和载体,任选地病毒载体。

[0500] 条款80.一种试剂盒,其包含1)多特异性抗体和2)载体,任选地病毒载体。

[0501] 条款81.一种试剂盒,其包含1)编码多特异性抗体的多核苷酸和2)载体,任选地病毒载体。

[0502] 条款82.根据条款80或81所述的试剂盒,其用于:

[0503] a) 在有需要的受试者中转导免疫细胞;和/或

- [0504] b) 治疗有需要的受试者的疾病或障碍。
- [0505] 条款83. 一种治疗有需要的受试者的疾病或障碍的方法, 其包括:
- [0506] a) 施用多特异性抗体以激活所述受试者中的免疫细胞; 以及
- [0507] b) 在步骤a) 之前、之后和并行地施用载体, 任选地病毒载体。
- [0508] 条款84. 根据条款83所述的方法, 其中所述方法转导所述免疫细胞。
- [0509] 条款85. 根据条款83或84所述的方法, 其中所述疾病或障碍是癌症。
- [0510] 条款86. 根据条款83或84所述的方法, 其中所述疾病或障碍是血液恶性肿瘤。
- [0511] 条款87. 根据条款86所述的方法, 其中所述血液恶性肿瘤是B细胞淋巴瘤。
- [0512] 条款88. 根据条款83至87中任一项所述的方法, 其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比, 所述方法更快地治疗所述疾病或障碍。
- [0513] 条款89. 根据条款83至88中任一项所述的方法, 其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比, 所述方法导致对所述疾病或障碍的更好的治疗结果。
- [0514] 条款90. 根据条款83至89中任一项所述的方法, 其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合, 其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体, 并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。
- [0515] 条款91. 根据条款87或90所述的方法, 其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比, 所述方法导致所述受试者中的恶性B细胞的更快耗尽。
- [0516] 条款92. 根据条款87或90-91中任一项所述的方法, 其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比, 所述方法导致所述受试者中较低数量的残留恶性B细胞和/或较低的B细胞淋巴瘤复发率。
- [0517] 其他编号的实施方案-B部分
- [0518] 本公开文本的另一组其他编号的实施方案作为以下条款提供:
- [0519] 条款1. 一种在治疗方法中使用的载体, 其中所述载体包含多核苷酸; 并且其中所述方法包括:
- [0520] (a) 施用多特异性抗体以使受试者中的免疫细胞更易转导; 以及
- [0521] (b) 向所述受试者施用所述载体以转导所述免疫细胞, 其中所述转导包括将所述多核苷酸递送至所述细胞。
- [0522] 条款2. 一种在治疗方法中使用的多特异性抗体, 其中
- [0523] 所述方法包括:
- [0524] (a) 施用所述多特异性抗体以使受试者中的免疫细胞更易转导; 以及
- [0525] (b) 向所述受试者施用包含多核苷酸的载体以转导所述免疫细胞, 其中所述转导包括将所述多核苷酸递送至所述细胞。
- [0526] 条款3. 一种在治疗方法中使用的多核苷酸, 其中
- [0527] 所述方法包括:
- [0528] (a) 施用多特异性抗体以使受试者中的免疫细胞更易转导; 以及
- [0529] (b) 向所述受试者施用包含所述多核苷酸的载体以转导所述免疫细胞, 其中所述转导包括将所述多核苷酸递送至所述细胞。
- [0530] 条款4. 根据条款1所述的供使用的载体、根据条款2所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3所述的供使用的多核苷酸, 其中所述免疫细胞是T细胞。

[0531] 条款5.根据条款1或条款4所述的供使用的载体、根据条款2或条款4所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3或条款4所述的供使用的多核苷酸,其中所述多特异性抗体激活所述免疫细胞;任选地其中所述激活导致CD71表达增加。

[0532] 条款6.根据条款1和4-5中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-5中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-5中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中与施用媒介物对照相比,所述多特异性抗体增加所述免疫细胞的激活;任选地其中所述激活导致CD71表达增加。

[0533] 条款7.根据条款1和4-6中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-6中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-6中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述多特异性抗体:

[0534] (i) 增加所述受试者的淋巴结中的免疫细胞的数量;和/或

[0535] (ii) 与单独施用所述载体相比,增加所述免疫细胞的转导;和/或

[0536] (iii) 增强所述载体对所述免疫细胞的体内转导;和/或

[0537] (iv) 降低所述载体的有效浓度(EC50)。

[0538] 条款8.根据条款1和4-7中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-7中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-7中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述方法实现与包括施用更高浓度的所述载体而不施用所述多特异性抗体的方法相同的免疫细胞转导水平。

[0539] 条款9.根据条款1和4-8中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-8中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-8中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中步骤a) 和/或步骤b) 包括:

[0540] (i) 皮下施用;或

[0541] (ii) 淋巴管内施用;或

[0542] (iii) 静脉内施用;任选地其中步骤a) 和步骤b) 两者都包括静脉内施用。

[0543] 条款10.根据条款1和4-9中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-9中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-9中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述多特异性抗体以约0.001mg/kg至约1mg/kg的剂量施用。

[0544] 条款11.根据条款1和4-10中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-10中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-10中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中步骤b) 在步骤a) 之前、之后和/或并行地发生。

[0545] 条款12.根据条款1和4-11中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-11中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-11中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述方法用于治疗癌症。

[0546] 条款13.根据条款1和4-12中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-12中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-12中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述方法用于治疗血液恶性肿瘤;任选地其中所述血液恶性肿瘤是B细胞淋巴瘤。

[0547] 条款14.根据条款1和4-13中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-13中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-13中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述方法用于治疗疾病或障碍,并且其中

[0548] 与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法更快地治疗所述疾病或障碍;或

[0549] 与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致对所述疾病或障碍的更好的治疗结果。

[0550] 条款15.根据条款13所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸,其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致所述受试者中的恶性B细胞的更快耗尽。

[0551] 条款16.根据条款13或条款15所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸,其中与单独施用所述多特异性抗体和/或单独施用所述载体相比,所述方法导致所述受试者中较低数量的残留恶性B细胞和/或较低的B细胞淋巴瘤复发率。

[0552] 条款17.根据条款1和4-16中任一项所述的供使用的载体、根据条款2和4-16中任一项所述的供使用的多特异性抗体或根据条款3-16中任一项所述的供使用的多核苷酸,其中所述多特异性抗体作为编码所述特异性抗体的多核苷酸施用。

[0553] 条款18.一种药物组合物,其包含多特异性抗体和载体。

[0554] 条款19.一种试剂盒,其包含1)多特异性抗体和2)载体。

[0555] 条款20.一种试剂盒,其包含1)编码多特异性抗体的多核苷酸和2)载体。

[0556] 条款21.根据条款17所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸或根据条款20所述的试剂盒,其中所述编码多特异性抗体的多核苷酸是RNA。

[0557] 条款22.根据条款1、4-17和21中任一项所述的供使用的载体,根据条款2、4-17和21中任一项所述的供使用的多特异性抗体,根据条款3-17和21中任一项所述的供使用的多核苷酸,根据条款18所述的药物组合物,或根据条款19-21中任一项所述的试剂盒,其中所述载体是病毒载体;任选地慢病毒载体。

[0558] 条款23.根据条款1、4-17和21-22中任一项所述的供使用的载体,根据条款2、4-17和21-22中任一项所述的供使用的多特异性抗体,根据条款3-17和21-22中任一项所述的供使用的多核苷酸,根据条款18或条款22所述的药物组合物,或根据条款19-22中任一项所述的试剂盒,其中所述多特异性抗体包含T细胞抗原特异性结合结构域;任选地其中所述T细胞抗原是CD3、CD4、CD8或TCR。

[0559] 条款24.根据条款1、4-17和21-23中任一项所述的供使用的载体,根据条款2、4-17和21-23中任一项所述的供使用的多特异性抗体,根据条款3-17和21-23中任一项所述的供使用的多核苷酸,根据条款18和22-23中任一项所述的药物组合物,或根据条款19-23中任一项所述的试剂盒,其中所述多特异性抗体包含第二抗原特异性结合结构域;任选地其中:

[0560] (i) 所述第二抗原是CD19;或

[0561] (ii) 所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2或MCSP;或

[0562] (iii) 所述第二抗原是CD19、EpCAM、Her2/neu、EGFR、CD66e、CD33、EphA2、MCSP、CD22、CD79a、CD79b或sIgM

[0563] (iv) 所述第二抗原是CD19、EpCAM、CD20、CD123、BCMA、B7-H3、CDE或PSMA;或

[0564] (v) 所述第二抗原是淋巴结抗原;或

[0565] (vi) 所述第二抗原是髓样细胞或树突细胞抗原;任选地CD33、DC-SIGN、CD11b、CD11c或CD18。

[0566] 条款25. 根据条款1、4-17和21-24中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17和21-24中任一项所述的供使用的多特异性抗体, 根据条款3-17和21-24中任一项所述的供使用的多核苷酸, 根据条款18和22-24中任一项所述的药物组合物, 或根据条款19-24中任一项所述的试剂盒, 其中所述多特异性抗体是双特异性抗体或三特异性抗体; 任选地其中所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接器 (BiTE); 任选地其中所述BiTE是CD19 x CD3 BiTE; 并且任选地其中所述CD19 x CD3 BiTE是博纳吐单抗。

[0567] 条款26. 根据条款1、4-17和21-25中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17和21-25中任一项所述的供使用的多特异性抗体, 根据条款3-17和21-25中任一项所述的供使用的多核苷酸, 根据条款18和22-25中任一项所述的药物组合物, 或根据条款19-25中任一项所述的试剂盒, 其中递送至所述细胞的所述多核苷酸编码至少一种治疗性多肽。

[0568] 条款27. 根据条款26所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸, 或根据条款26所述的药物组合物或试剂盒, 其中所述至少一种治疗性多肽包含T细胞受体或嵌合抗原受体; 并且任选地其中所述T细胞受体或嵌合抗原受体靶向与癌症或血液恶性肿瘤相关的抗原。

[0569] 条款28. 根据条款27所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸或根据条款27所述的药物组合物或试剂盒, 其中所述嵌合抗原受体是抗CD19嵌合抗原受体。

[0570] 条款29. 根据条款26所述的供使用的载体、多特异性抗体或多核苷酸, 或根据条款26所述的药物组合物或试剂盒, 其中所述至少一种治疗性多肽包含细胞因子受体; 任选地其中所述细胞因子受体是药物诱导型细胞因子受体。

[0571] 条款30. 根据条款1、4-17和21-29中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17和21-29中任一项所述的供使用的多特异性抗体, 根据条款3-17和21-29中任一项所述的供使用的多核苷酸, 根据条款18和22-29中任一项所述的药物组合物, 或根据条款19-29中任一项所述的试剂盒, 其中所述载体进一步包含一种或多种转基因; 任选地其中所述一种或多种转基因包含编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0572] 条款31. 根据条款1、4-17和21-30中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17和21-30中任一项所述的供使用的多特异性抗体, 根据条款3-17和21-30中任一项所述的供使用的多核苷酸, 根据条款18和22-30中任一项所述的药物组合物, 或根据条款19-30中任一项所述的试剂盒, 其中所述载体包含一种或多种与目标宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体、异源病毒包膜糖蛋白、融合糖蛋白、T细胞激活或共刺激分子、CD19的配体或其功能片段、细胞因子或基于细胞因子的转导增强子和/或跨膜蛋白, 所述跨膜蛋白包含暴露于所述载体的表面和/或与所述载体的表面缀合的促有丝分裂结构域和/或基于细胞因子的结构域; 任选地其中所述一种或多种T细胞激活或共刺激分子包含一种或多种T细胞配体。

[0573] 条款32. 根据条款1、4-17和21-31中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17和21-31中任一项所述的供使用的多特异性抗体, 根据条款3-17和21-31中任一项所述的供使用的多核苷酸, 根据条款18和22-31中任一项所述的药物组合物, 或根据条款19-31中任一项所述的试剂盒, 其中所述载体是慢病毒载体, 并且其中所述慢病毒载体用科卡尔病毒包膜蛋白和/或尼帕病毒包膜蛋白假型化; 任选地其中所述尼帕包膜蛋白经工程化以结合EpCAM、CD4或CD8。

[0574] 条款33. 根据条款1、4-17和21-32中任一项所述的供使用的载体, 根据条款2、4-17

和21-32中任一项所述的供使用的多特异性抗体,根据条款3-17和21-32中任一项所述的供使用的多核苷酸,根据条款18和22-32中任一项所述的药物组合物,或根据条款19-32中任一项所述的试剂盒,其中所述多特异性抗体与CD3和CD19特异性结合,其中所述载体是用科卡尔病毒包膜蛋白假型化的慢病毒载体,并且其中所述载体包含编码抗CD19嵌合抗原受体的多核苷酸和编码TGFβ显性负性受体的转基因。

[0575] 条款34.根据条款19-33中任一项所述的试剂盒,其用于治疗方法中。

[0576] 实施例

[0577] 实施例1:博纳吐单抗增强慢病毒载体对T细胞的转导

[0578] 此实施例涉及皮下、淋巴管内或肿瘤内注射的CD19 x CD3双特异性抗体(博纳吐单抗)用于激活淋巴结中的T细胞并由此增加由表面工程化的慢病毒载体实现的转导的用途。

[0579] 慢病毒载体

[0580] VivoVec

[0581] 慢病毒载体(VivoVec)使用改良的第三代包装系统产生。为了产生慢病毒颗粒,将编码2A连接的多顺反子表达构建体(CD86-2A-抗CD3scFv-2A-CD137L-2A-COCVG)的包膜质粒与编码抗CD19嵌合抗原受体的转移质粒(其与组成型CMV启动子或MND启动子可操作地连接,侧接5'长末端重复序列和3'长末端重复序列);以及分别编码gag和pol以及rev基因的两个包装质粒共转染至293细胞中。

[0582] 由包膜质粒表达CD86、跨膜融合的抗CD3单链可变片段、CD137L和科卡尔病毒G蛋白(COCVG)导致慢病毒载体表面工程化,以对表达CD3的细胞具有特异性(抗CD3);刺激T细胞(CD86和CD137L);并转导T细胞(用科卡尔G蛋白假型化)。慢病毒载体的基因组是由来自转移质粒的Pol蛋白转录的RNA。Gag介导G蛋白、Gag和Rev蛋白以及RNA基因组的病毒包装。

[0583] VSV颗粒

[0584] 慢病毒载体(VSV颗粒)使用改良的第三代包装系统产生。为了产生慢病毒颗粒,将编码水疱性口炎病毒(VSV)的G蛋白的包膜质粒与编码抗CD19嵌合抗原受体的转移质粒(其与组成型CMV启动子或MND启动子可操作地连接,侧接5'长末端重复序列和3'长末端重复序列);以及分别编码gag和pol以及rev基因的两个包装质粒共转染至293细胞中。

[0585] 由包膜质粒表达VSV病毒的G蛋白(VSVG)导致用VSV G蛋白假型化的慢病毒载体。慢病毒载体的基因组是由来自转移质粒的Pol蛋白转录的RNA。Gag介导G蛋白、Gag和Rev蛋白以及RNA基因组的病毒包装。

[0586] 多特异性(双特异性)抗体

[0587] 博纳吐单抗是“BiTE”类的双特异性抗体,其在临床上被批准治疗表达CD19的血液恶性肿瘤、B细胞前体急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。博纳吐单抗的治疗作用机制涉及在T细胞与肿瘤B细胞之间产生“免疫突触”,所述免疫突触诱导T细胞杀伤肿瘤B细胞。在此,博纳吐单抗的生物化学活性被用于可替代的目的——向患者(患有或未患有血液恶性肿瘤)施用,目的是引起正常B细胞与T细胞在体内接合,从而使T细胞易于被慢病毒转导。

[0588] 体外转导增加的证明

[0589] 将纯化的人原代T细胞解冻,并且重悬于3mL培养基(RPMI-1640加10%胎牛血清)中。T细胞单独使用或与B细胞以50:50的比率一起使用。测试的处理是:媒介物对照;单独的

博纳吐单抗;博纳吐单抗加慢病毒颗粒 (VivoVec);对照VSV假型化慢病毒颗粒;和博纳吐单抗加对照VSV假型化慢病毒颗粒。

[0590] 在培养开始后三天,收集细胞,并通过流式细胞术分析T细胞激活表面标记物CD25的表达(图2A和图2B)和载体递送的抗CD19嵌合抗原受体的表达(图3A和图3B)。博纳吐单抗(“Blin”)使CD25+激活的T细胞的浓度从约7%-17%增加至约87%-92%(图2A)。所述作用依赖于培养物中B细胞的存在,因为在没有B细胞的情况下,与未用博纳吐单抗处理的样品相比,在博纳吐单抗处理的样品中没有观察到激活的增加(图2B)。博纳吐单抗(“Blin”)使由VivoVec载体转导的T细胞的百分比从约12%增加至约41%;其还使由VSV颗粒(“VSVG”)实现的转导从约4%增加至约24%(图3A)。所述作用依赖于培养物中B细胞的存在,因为在没有B细胞的情况下,VivoVec转导约10%-11%的T细胞且VSV颗粒转导约4%的T细胞(图3B)。

[0591] 在50:50B:T细胞样品中,评估培养物中B细胞与T细胞的比率。B细胞扩增导致约80:20的最终比率。对于所有测试处理,所述比率是相似的,证明博纳吐单抗可以在不导致快速B细胞杀伤的浓度下用于T细胞激活(图4)。

[0592] 体内转导增加的证明

[0593] 在向受试者(小鼠、灵长类动物或人)施用慢病毒载体如VivoVec之前或并行地施用亚临床剂量的博纳吐单抗(在人体中,在第1天单次注射约1mg至约10mg)。使用淋巴结活检来分离T细胞,测定T细胞中转基因(例如抗CD19嵌合抗原受体)的表达。用VivoVec与博纳吐单抗组合治疗患有B细胞恶性肿瘤的受试者。观察到疾病进展减少,通过B细胞负荷和肿瘤大小来测量。

[0594] 实施例2:博纳吐单抗介导的慢病毒载体对T细胞的体内转导

[0595] 使用博纳吐单抗作为体内激活T细胞以促进转导的工具,我们评估了由编码抗CD19CAR的慢病毒载体在CD34人源化NSG小鼠中实现的T细胞的体内转导。本研究中所解决的主要问题是1)博纳吐单抗是否促进CAR产生,2)多少剂量的博纳吐单抗是CAR T细胞产生所必需的,以及3)我们是否可以检测到CAR+细胞并且其是否与B细胞耗尽相关。

[0596] 研究设计

[0597] 病毒制备和QC数据

[0598] 病毒有效负荷:U4367EA110\_5,pRRL-MND-人-Frb-CD19\_CAR-TGF B dn-VTw。按照与实施例1中所用的方案相似的方案,在弗雷德哈钦森(Fred Hutchinson)制造携带也表达FRB的抗CD19-CAR有效负荷和TGFβ显性负性受体(CD19CAR-TGFβ)有效负荷的科卡尔假型化慢病毒颗粒。如通过显色内毒素Quant试剂盒(目录号A39552S)所测量,内毒素活性为2.1EU/mL。如通过Lonza MycoAlert支原体检测试剂盒所测定,培养物是支原体阴性的。

[0599] 动物研究方案

[0600] 在Lumigenics LLC使用CD34+人源化小鼠(Jackson Laboratories)进行动物研究。将CD34+HSC植入后的18周-26周的HuNSG小鼠用于研究目的。在到达后使小鼠适应环境1周。在研究第-2天收集血液以评估植入。将小鼠分配在研究组中以确保组间等效的人T细胞特征。

[0601] 在研究过程期间,从第-2天开始,每周收集血液到EDTA包被的管中。每次抽血收集至少70μL。通过倒置混合样品并在冷包上运输至Umoja过夜。对于研究过程,每周测量两次

体重。显示体重减轻超过初始体重的20%的动物将被安乐死并记录为“条件性死亡”。

[0602] 在研究的第1天、第2天和第4天静脉内 (IV) 治疗博纳吐单抗治疗组中的小鼠。在研究第4天, 经由IV注射用慢病毒治疗适当组中的小鼠。

[0603] 在第52天完成研究后,将血液、一小部分脾和股骨在冷包上运输到Umoja Biopharma以通过流式细胞术进行分析。

[0604] 研究终点包括:1)通过流式细胞术分析的CAR-T细胞转导和扩增,2)通过流式细胞术分析的CAR-T细胞表型,3)B细胞耗尽,和4)毒性、存活率。

[0605] 下表2概述了研究的时间线。

[0606] 表2

|        |   |          |                        |         |                |       |        |      |
|--------|---|----------|------------------------|---------|----------------|-------|--------|------|
| [0607] | 组 | <i>n</i> | 博纳吐单抗<br>(第1天、第2天、第4天) | 博纳吐单抗体积 | 慢病毒(第4天下午,静脉内) | 慢病毒体积 | Raji细胞 | 样品收集 |
|--------|---|----------|------------------------|---------|----------------|-------|--------|------|

| 组             | n | 博纳吐单抗<br>(第1天、第2天、第4天) | 博纳吐单抗体积 | 慢病毒(第4天下午, 静脉内) | 慢病毒体积 | Raji细胞                     | 样品收集                                        |
|---------------|---|------------------------|---------|-----------------|-------|----------------------------|---------------------------------------------|
| 1(仅慢病毒)       | 4 | N/A                    | 5ml/kg  | 25,000,000 TU   | 200μL | 2.0E5, 第24天<br>5.0E5, 第39天 | 第-2天、第5天、第12天、第19天、第26天、第33天、第40天、第47天、第52天 |
| 2a(低博纳吐单抗)    | 3 | 0.004 mg/kg IV         | 5ml/kg  | N/A             | N/A   | 2.0E5, 第24天<br>5.0E5, 第39天 | 第-2天、第5天、第12天、第19天、第26天、第33天、第40天、第47天、第52天 |
| 2b(高博纳吐单抗)    | 3 | 0.04 mg/kg IV          | 5ml/kg  | N/A             | N/A   | 2.0E5, 第24天<br>5.0E5, 第39天 | 第-2天、第5天、第12天、第19天、第26天、第33天、第40天、第47天、第52天 |
| 3(低博纳吐单抗和慢病毒) | 5 | 0.004 mg/kg IV         | 5ml/kg  | 25,000,000 TU   | 200μL | 2.0E5, 第24天<br>5.0E5, 第39天 | 第-2天、第5天、第12天、第19天、第26天、第33天、第40天、第47天、第52天 |
| 4(高博纳吐单抗和慢病毒) | 5 | 0.04 mg/kg IV          | 5ml/kg  | 25,000,000 TU   | 200μL | 2.0E5, 第24天<br>5.0E5, 第39天 | 第-2天、第5天、第12天、第19天、第26天、第33天、第40天、第47天、第52天 |

[0609] 结果

[0610] 流式细胞术检测组套的验证:我们验证了我们的针对在培养物中(图5A)和在人源化小鼠中(图5B)产生并维持的抗CD19CAR-TGFβT细胞的流式细胞术检测组套。在每个样品收集日,将离体产生的CAR T细胞用作阳性对照。在图5A中,将离体制造的CAR-TGFβT细胞用于经由检测TGFβ双阴性受体来验证CAR T细胞检测。所有群体均避开排除碎片的/单线态/

活/人CD45。CAR T细胞被定义为CD3+和FITC+。非CAR T细胞被定义为CD3+和FITC-。将非CAR T细胞群用作阴性对照以定义针对TGFβ双阴性受体的阳性染色。图5B示出了用于鉴定CD3+T细胞的门控方案,所述CD3+T细胞是CD4+或CD8+并且表达CD25或CD71激活标记物。

[0611] 博纳吐单抗施用激活了T细胞,如通过在注射后第5天在CD4 T细胞和CD8 T细胞两者中的CD71表达所测量的,如图6中所示(“+”指示“低博纳吐单抗”组,并且“++”指示“高博纳吐单抗”组;“\*\*”、“\*\*\*”和“\*\*\*\*”分别指示p值<0.01、<0.001、<0.0001)。CD25被包括在流动检测组套中但未用作体内激活标记物,因为在所有时间点在所有组中都观察到CD25的极低表达。

[0612] 我们还测量了用0.004mg/kg博纳吐单抗(低博纳吐单抗)、0.04mg/kg(高博纳吐单抗)治疗的小鼠中的循环B细胞,其中进行了或未进行CD19CAR-TGFβ科卡尔慢病毒治疗(图7)。仅博纳吐单抗的治疗组在第5天左右显示即刻B细胞耗尽,但后来B细胞的数量增加。另一方面,CD19CAR-TGFβ科卡尔慢病毒治疗导致显著和延长的B细胞耗尽,不管是否施用博纳吐单抗。在仅慢病毒治疗的研究组中的小鼠在第12天左右开始B细胞耗尽,而在慢病毒+博纳吐单抗治疗的研究组中的小鼠在第5天左右开始B细胞耗尽。在研究的第12天-第52天,慢病毒治疗组中的所有小鼠都具有很少的或没有循环B细胞(图7)。在研究过程期间,使用仅博纳吐单抗的组作为阴性门控对照,我们在任何组中都没有观察到显著的CAR T细胞群(图8)。

[0613] 在研究第52天,在慢病毒治疗的小鼠的骨髓和脾中观察到完全B细胞消除(图9)。由于快速的B细胞耗尽,我们推测瞬时CAR+群以低于我们的检测阈值的水平存在。

[0614] 总之,静脉内施用具有CD19CAR-TGFβ有效负荷的科卡尔包膜慢病毒足以在CD34人源化小鼠中诱导显著和延长的B细胞耗尽。博纳吐单抗施用加速了B细胞耗尽。在研究结束时,在慢病毒治疗组的脾或骨髓中没有检测到B细胞。相比之下,用两种剂量水平的博纳吐单抗治疗但未用慢病毒治疗的小鼠在瞬时耗尽后恢复了循环B细胞群,并且在骨髓和脾中具有容易检测到的B细胞群(图9)。这些结果与体内抗CD19 CAR T细胞产生的预测活性一致。

[0615] 实施例3:博纳吐单抗和慢病毒载体的共施用

[0616] 本实施例涉及CD19 x CD3双特异性抗体(博纳吐单抗)和包含编码抗CD19 CAR的转基因的表面工程化慢病毒载体的共施用。

[0617] 向CD34+人源化小鼠共施用博纳吐单抗和慢病毒载体。在相应的对照组中,向小鼠单独施用博纳吐单抗、单独施用慢病毒载体或模拟溶液。可以皮下、淋巴管内和/或肿瘤内进行施用。收集血液和组织样品(例如,肝、肺、脾、骨髓)以用于分析以下因素:1)通过流式细胞术分析的CAR-T细胞转导和扩增,2)通过流式细胞术分析的CAR-T细胞表型,3)B细胞的数量,和4)毒性、存活率。将共施用组的结果与对照组进行比较。

## 序列表

<110> 优莫佳生物制药股份有限公司

<120> 双特异性转导增强子

<130> UMOJ-004/01W0 337798-2139

<160> 46

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRH1

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRH2

<400> 2

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRH3

<400> 3

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRL1

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRL2

<400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3 $\epsilon$ 抗体OKT3 CDRL3

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28抗体15E8 CDRH1

<400> 7

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28抗体15E8 CDRH2

<400> 8

Trp Ala Gly Gly Ser

1 5  
<210> 9  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 抗CD28抗体15E8 CDRH3  
<400> 9  
Asp Lys Arg Ala Pro Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp Tyr  
1 5 10 15  
<210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 抗CD28抗体15E8 CDRL1  
<400> 10  
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln  
1 5 10 15  
<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 抗CD28抗体15E8 CDRL2  
<400> 11  
Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser  
1 5  
<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 抗CD28抗体15E8 CDRL3  
<400> 12  
Gln Gln Thr Arg Lys Val Pro Ser Thr  
1 5  
<210> 13  
<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRH1

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRH2

<400> 14

Tyr Pro Gly Asn Val Asn

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRH3

<400> 15

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRL1

<400> 16

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Leu Asn

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRL2

<400> 17

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28受体抗体TGN1412 CDRL3

<400> 18

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 173

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> OX40L CD134的天然配体

<400> 19

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg

1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln

20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser

35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val

50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln

65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Tyr Leu Ile Ser Leu Lys

85 90 95

Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp

100 105 110

Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu

115 120 125

Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr

130 135 140

Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu             |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |     |
| <210> 20                                                        |     |     |     |
| <211> 254                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 未知                                                        |     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |     |
| <223> 4-1BBL细胞因子                                                |     |     |     |
| <400> 20                                                        |     |     |     |
| Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val |     |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu         |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |     |
| <210> 21                                                        |     |     |     |
| <211> 233                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 智人(Homo sapiens)                                          |     |     |     |
| <400> 21                                                        |     |     |     |
| Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Trp Val |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp                             |     |     |     |
| 225                                                             | 230 |     |     |
| <210> 22                                                        |     |     |     |

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 22

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Thr | Thr | Pro | Ala | Pro | Arg | Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Gln | Pro | Leu | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Ala | Val | His | Thr | Arg | Gly | Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile |     |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 23

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Pro | Lys | Ser | Pro | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Lys | Asp | Pro | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 185

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 24

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp                             |     |     |
| 180                                                             | 185 |     |
| <210> 25                                                        |     |     |
| <211> 259                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 智人(Homo sapiens)                                          |     |     |
| <400> 25                                                        |     |     |
| Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Gln Lys Thr                                                     |     |     |
| <210> 26                                                        |     |     |
| <211> 153                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 智人(Homo sapiens)                                          |     |     |
| <400> 26                                                        |     |     |
| Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr                             |     |     |
| 145                                                             | 150 |     |
| <210> 27                                                        |     |     |
| <211> 177                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 智人(Homo sapiens)                                          |     |     |
| <400> 27                                                        |     |     |
| Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys |     |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |     |
| Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu |     |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |     |
| Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |

His

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 28

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

|                                                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Val                                                             | Ile | Ser | Leu | Glu | Ser | Gly | Asp | Ala | Ser | Ile | His | Asp | Thr | Val | Glu |  |  |
| 100                                                             |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn                                                             | Leu | Ile | Ile | Leu | Ala | Asn | Asn | Ser | Leu | Ser | Ser | Asn | Gly | Asn | Val |  |  |
| 115                                                             |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |  |  |
| Thr                                                             | Glu | Ser | Gly | Cys | Lys | Glu | Cys | Glu | Glu | Leu | Glu | Glu | Lys | Asn | Ile |  |  |
| 130                                                             |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |  |
| Lys                                                             | Glu | Phe | Leu | Gln | Ser | Phe | Val | His | Ile | Val | Gln | Met | Phe | Ile | Asn |  |  |
| 145                                                             |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Thr Ser                                                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <210> 29                                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <211> 271                                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <220>                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <223> 膜-IL7                                                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <400> 29                                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Met                                                             | Ala | His | Val | Ser | Phe | Arg | Tyr | Ile | Phe | Gly | Leu | Pro | Pro | Leu | Ile |  |  |
| 1                                                               |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |  |  |
| Leu                                                             | Val | Leu | Leu | Pro | Val | Ala | Ser | Ser | Asp | Cys | Asp | Ile | Glu | Gly | Lys |  |  |
| 20                                                              |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |  |  |
| Asp                                                             | Gly | Lys | Gln | Tyr | Glu | Ser | Val | Leu | Met | Val | Ser | Ile | Asp | Gln | Leu |  |  |
| 35                                                              |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu                                                             | Asp | Ser | Met | Lys | Glu | Ile | Gly | Ser | Asn | Cys | Leu | Asn | Asn | Glu | Phe |  |  |
| 50                                                              |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn                                                             | Phe | Phe | Lys | Arg | His | Ile | Cys | Asp | Ala | Asn | Lys | Glu | Gly | Met | Phe |  |  |
| 65                                                              |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |  |  |
| Leu                                                             | Phe | Arg | Ala | Ala | Arg | Lys | Leu | Arg | Gln | Phe | Leu | Lys | Met | Asn | Ser |  |  |
| 85                                                              |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |  |  |
| Thr                                                             | Gly | Asp | Phe | Asp | Leu | His | Leu | Leu | Lys | Val | Ser | Glu | Gly | Thr | Thr |  |  |
| 100                                                             |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |  |  |
| Ile                                                             | Leu | Leu | Asn | Cys | Thr | Gly | Gln | Val | Lys | Gly | Arg | Lys | Pro | Ala | Ala |  |  |
| 115                                                             |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu                                                             | Gly | Glu | Ala | Gln | Pro | Thr | Lys | Ser | Leu | Glu | Glu | Asn | Lys | Ser | Leu |  |  |
| 130                                                             |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |  |
| Lys                                                             | Glu | Gln | Lys | Lys | Leu | Asn | Asp | Leu | Cys | Phe | Leu | Lys | Arg | Leu | Leu |  |  |
| 145                                                             |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Gln                                                             | Glu | Ile | Lys | Thr | Cys | Trp | Asn | Lys | Ile | Leu | Met | Gly | Thr | Lys | Glu |  |  |
| 165                                                             |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |  |  |
| His Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

|              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|              |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |  |  |  |  |
| Arg          | Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser | Leu |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |  |  |  |  |
| Arg          | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr | Arg |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |  |  |  |  |
| Gly          | Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Tyr | Ile | Trp | Ala | Pro | Leu | Ala | Gly |  |  |  |  |
| 225          |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Thr          | Cys | Gly | Val | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Leu | Tyr | Cys | Asn |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |  |  |  |  |
| His          | Arg | Asn | Arg | Arg | Arg | Val | Cys | Lys | Cys | Pro | Arg | Pro | Val | Val |     |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |  |  |  |  |
| <210> 30     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <211> 256    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <212> PRT    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <213> 人工序列   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <220>        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <223> 膜-IL15 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <400> 30     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Met          | Gly | Leu | Val | Arg | Arg | Gly | Ala | Arg | Ala | Gly | Pro | Arg | Met | Pro | Arg |  |  |  |  |
| 1            |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly          | Trp | Thr | Ala | Leu | Cys | Leu | Leu | Ser | Leu | Leu | Pro | Ser | Gly | Phe | Met |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |  |  |  |
| Ala          | Gly | Ile | His | Val | Phe | Ile | Leu | Gly | Cys | Phe | Ser | Ala | Gly | Leu | Pro |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |  |  |  |
| Lys          | Thr | Glu | Ala | Asn | Trp | Val | Asn | Val | Ile | Ser | Asp | Leu | Lys | Lys | Ile |  |  |  |  |
| 50           |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu          | Asp | Leu | Ile | Gln | Ser | Met | His | Ile | Asp | Ala | Thr | Leu | Tyr | Thr | Glu |  |  |  |  |
| 65           |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Ser          | Asp | Val | His | Pro | Ser | Cys | Lys | Val | Thr | Ala | Met | Lys | Cys | Phe | Leu |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |  |  |  |  |
| Leu          | Glu | Leu | Gln | Val | Ile | Ser | Leu | Glu | Ser | Gly | Asp | Ala | Ser | Ile | His |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |  |  |  |  |
| Asp          | Thr | Val | Glu | Asn | Leu | Ile | Ile | Leu | Ala | Asn | Asn | Ser | Leu | Ser | Ser |  |  |  |  |
|              |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |  |  |  |  |
| Asn          | Gly | Asn | Val | Thr | Glu | Ser | Gly | Cys | Lys | Glu | Cys | Glu | Glu | Leu | Glu |  |  |  |  |
| 130          |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu          | Lys | Asn | Ile | Lys | Glu | Phe | Leu | Gln | Ser | Phe | Val | His | Ile | Val | Gln |  |  |  |  |
| 145          |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |  |
| Met          | Phe | Ile | Asn | Thr | Ser | Ser | Pro | Ala | Lys | Pro | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala |  |  |  |  |

|                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|                        |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Pro                    | Arg | Pro | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser |  |  |
|                        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |  |
| Leu                    | Arg | Pro | Glu | Ala | Cys | Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr |  |  |
|                        |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |  |
| Arg                    | Gly | Leu | Asp | Phe | Ala | Cys | Asp | Ile | Tyr | Ile | Trp | Ala | Pro | Leu | Ala |  |  |
|                        |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |  |
| Gly                    | Thr | Cys | Gly | Val | Leu | Leu | Leu | Ser | Leu | Val | Ile | Thr | Leu | Tyr | Cys |  |  |
| 225                    |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Asn                    | His | Arg | Asn | Arg | Arg | Arg | Val | Cys | Lys | Cys | Pro | Arg | Pro | Val | Val |  |  |
|                        |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| <210> 31               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <211> 330              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <212> PRT              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <213> 智人(Homo sapiens) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <400> 31               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala                    | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys |  |  |
| 1                      |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |  |
| Ser                    | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |  |  |
|                        |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |  |  |
| Phe                    | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |  |  |
|                        |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |  |  |
| Gly                    | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |  |  |
|                        |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |  |  |
| Leu                    | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr |  |  |
| 65                     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Tyr                    | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |  |  |
|                        |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |  |  |
| Lys                    | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys |  |  |
|                        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |  |  |
| Pro                    | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro |  |  |
|                        |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |  |  |
| Lys                    | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |  |  |
|                        |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |  |  |
| Val                    | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |  |  |
| 145                    |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Tyr                    | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |  |  |
|                        |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |  |  |
| Glu                    | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |  |  |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| 240                                                             |     |     |
| Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| 320                                                             |     |     |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                         |     |     |
| 325                                                             | 330 |     |

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 32

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys                                     |     |     |
| 325                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 511

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 水疱性口炎病毒科卡尔病毒

&lt;400&gt; 33

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His Ala |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 |
| Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |
| Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |
| His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys Thr |    |    |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro Gln |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val Gln |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu Thr |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser Asn |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe Val |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val Gly |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile Asp |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln Thr |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |

Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu Ile  
 370 375 380  
 Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr Ser  
 405 410 415  
 Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys Gln  
 420 425 430  
 Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser Lys  
 435 440 445  
 Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Thr  
 450 455 460  
 Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr Val  
 465 470 475 480  
 Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser Asn  
 485 490 495  
 Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys  
 500 505 510

<210> 34

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 博纳吐单抗、CD19/CD3双特异性抗体构建体

<400> 34

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu |     |     |
| 485                                                             | 490 | 495 |
| Leu Lys His His His His His His                                 |     |     |

500

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 博纳吐单抗、CD19 CDRL1

&lt;400&gt; 35

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 博纳吐单抗、CD19 CDRL2

&lt;400&gt; 36

Asp Ala Ser

1

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 博纳吐单抗、CD19 CDRL3

&lt;400&gt; 37

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr

1

5

&lt;210&gt; 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 博纳吐单抗、CD19 CDRH1

<400> 38

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 博纳吐单抗、CD19 CDRH2

<400> 39

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr

1 5

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 博纳吐单抗、CD19 CDRH3

<400> 40

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRH1

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列  
<220>  
<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRH2  
<400> 42  
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
1 5  
<210> 43  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRH3  
<400> 43  
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr  
1 5 10  
<210> 44  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRL1  
<400> 44  
Ser Ser Val Ser Tyr  
1 5  
<210> 45  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRL2  
<400> 45  
Asp Thr Ser  
1  
<210> 46  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 博纳吐单抗、CD3 CDRL3

<400> 46

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro

1

5

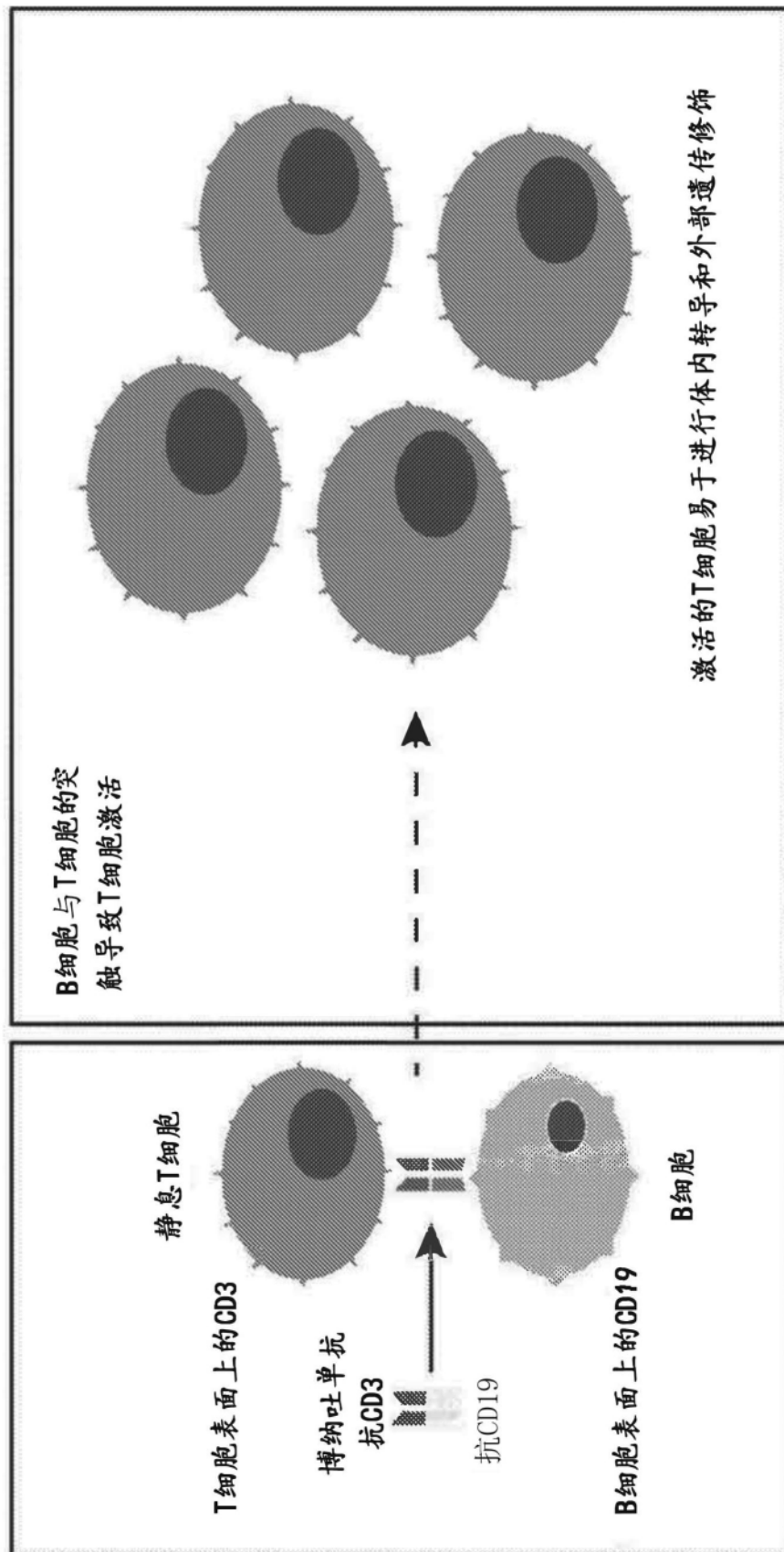


FIG.1

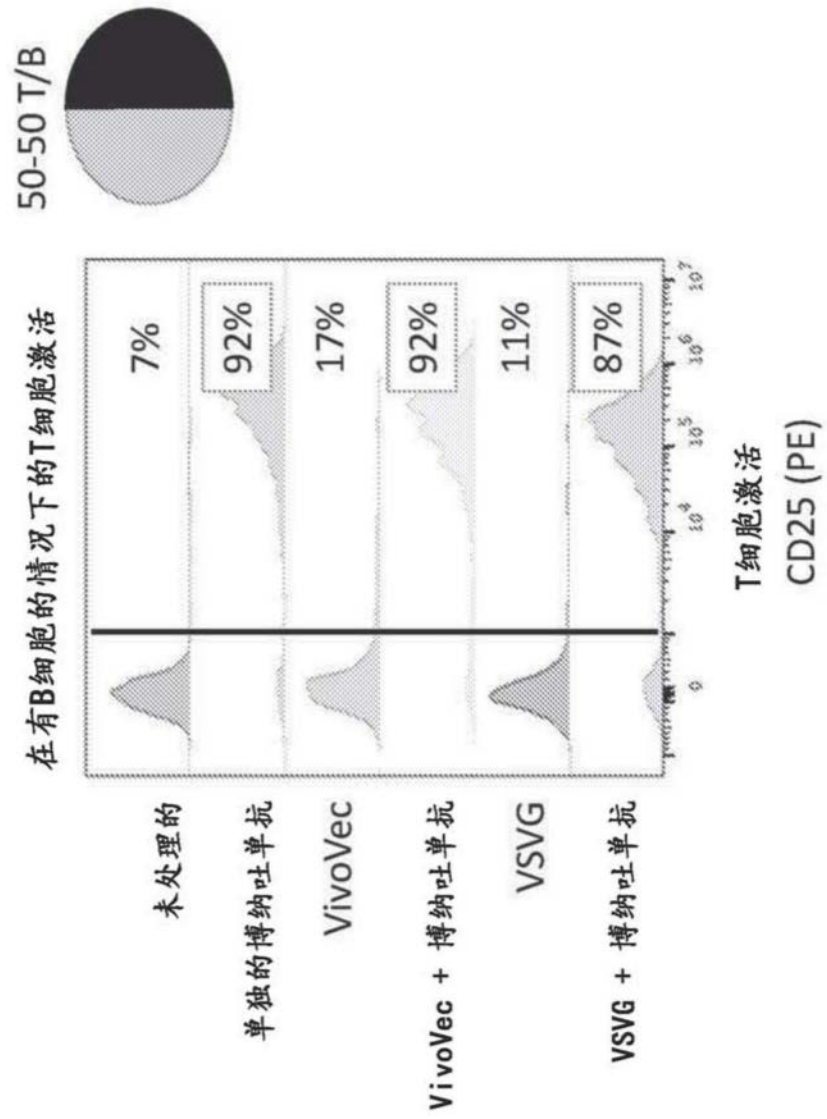


FIG.2A

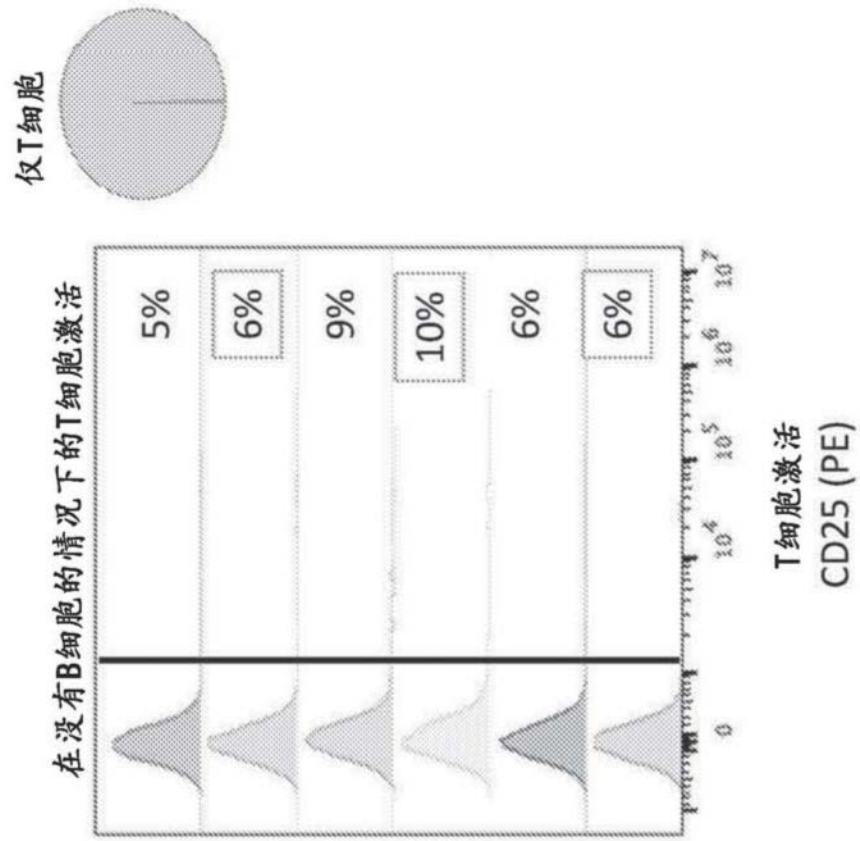


FIG.2B

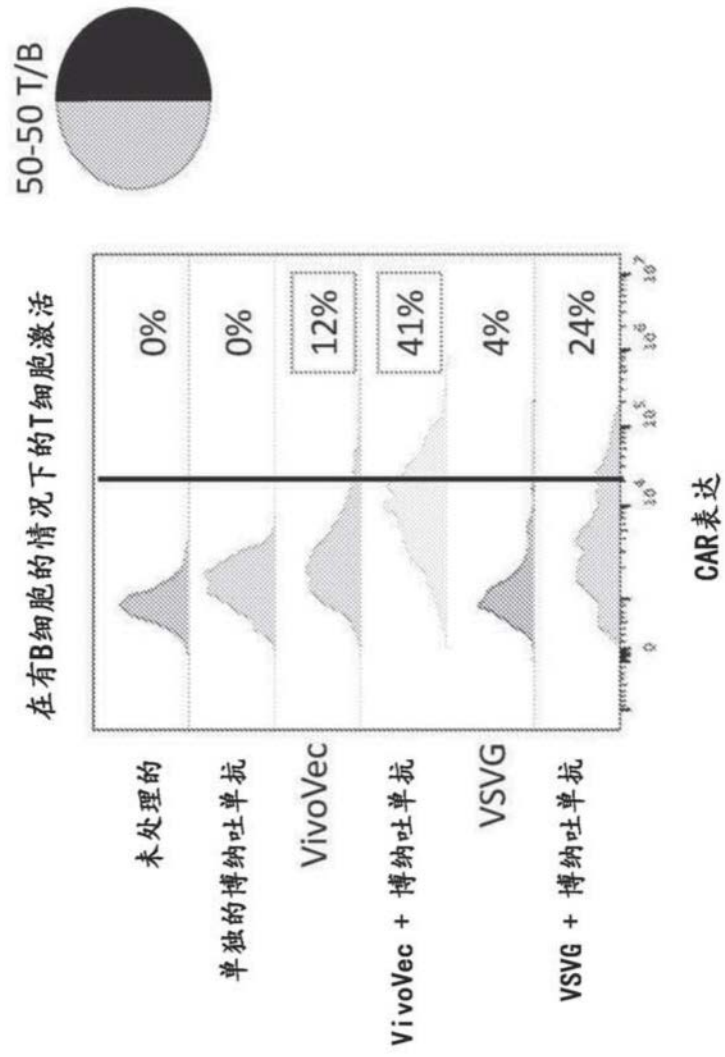


FIG.3A

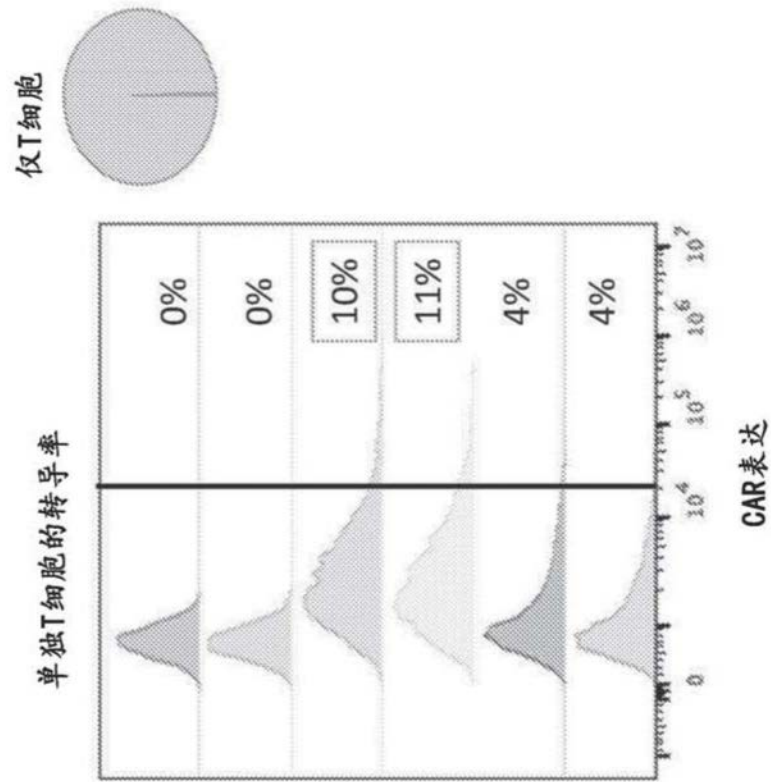


FIG.3B

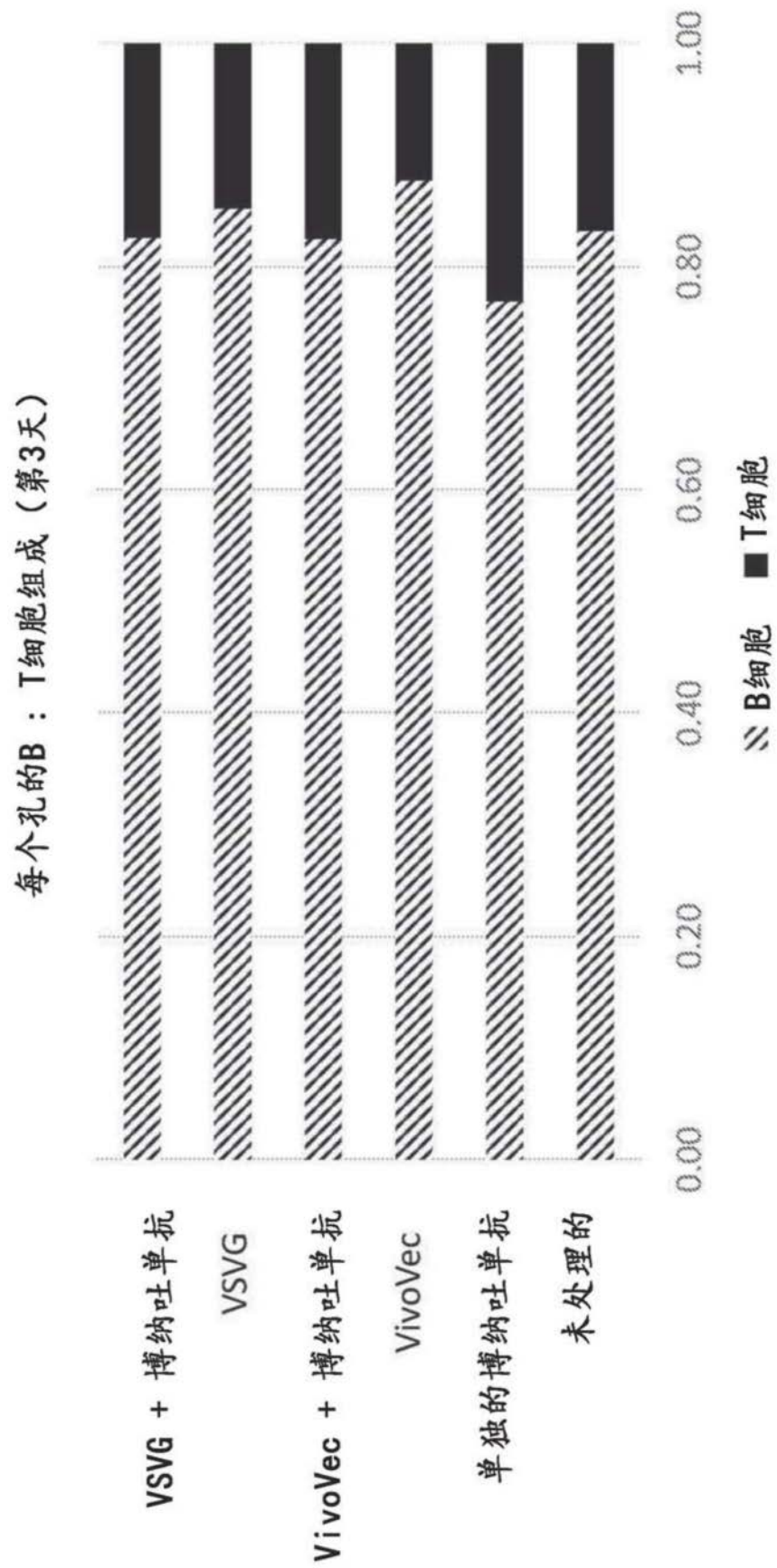


FIG.4

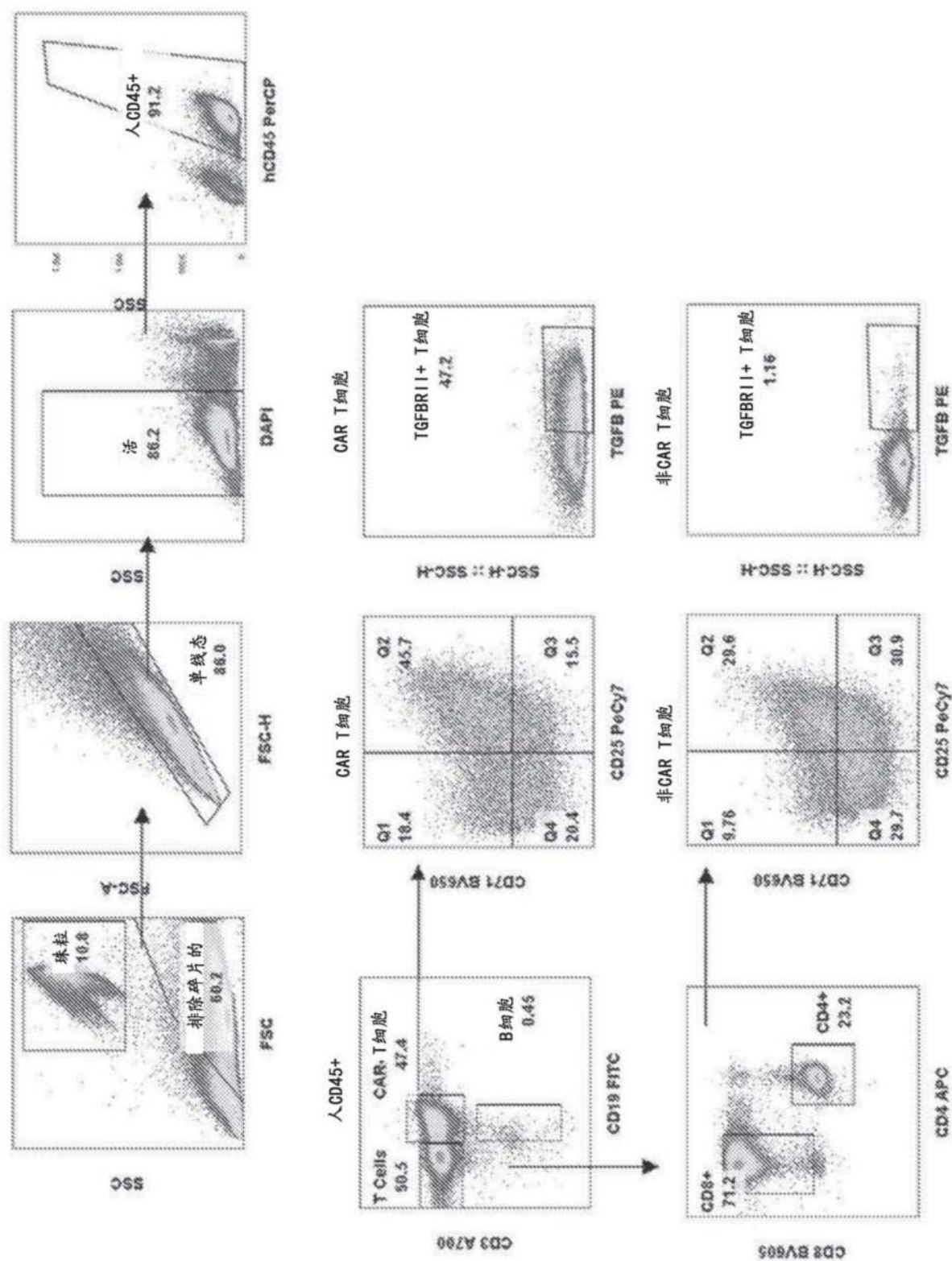


FIG. 5A

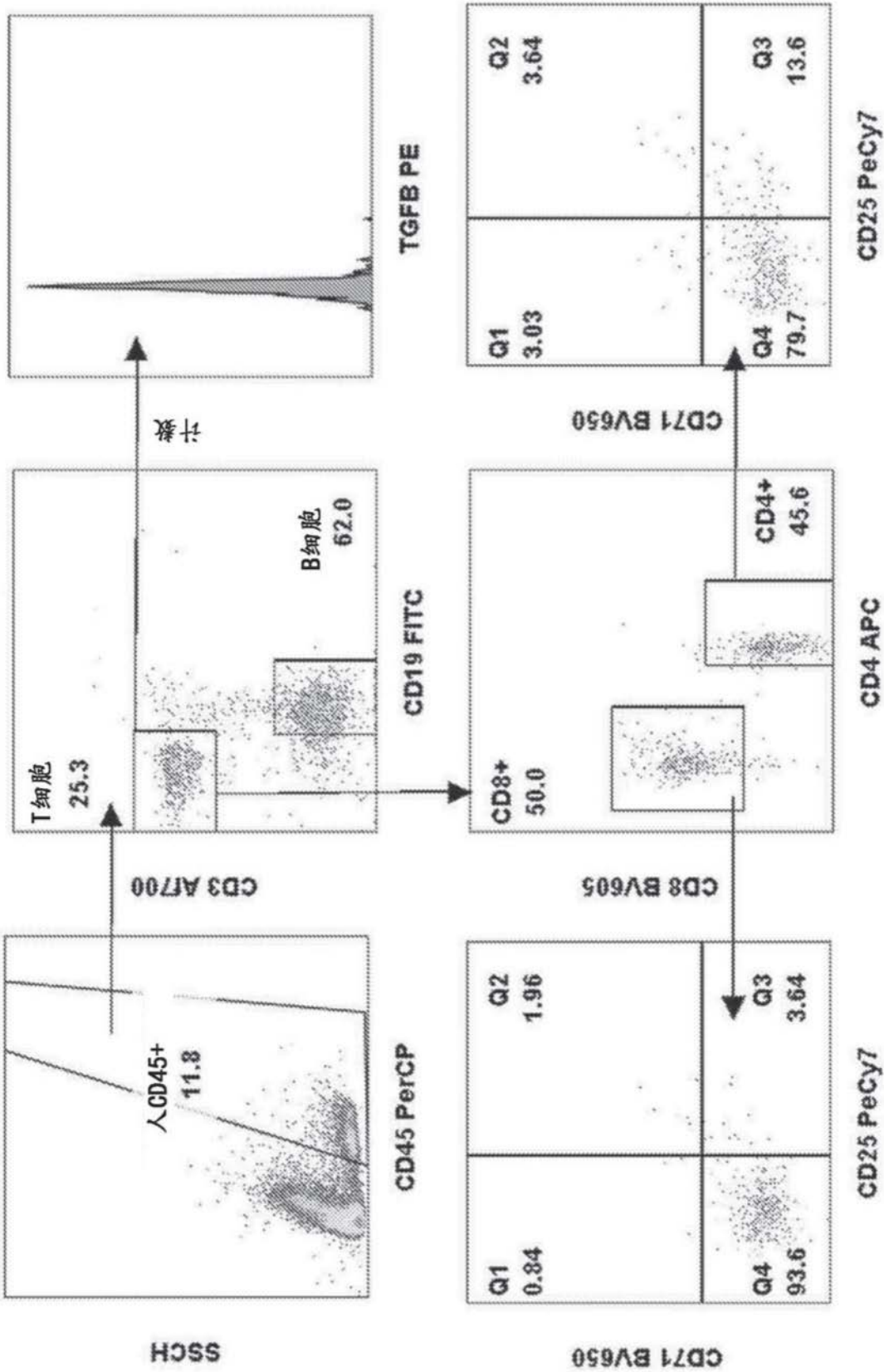


FIG.5B

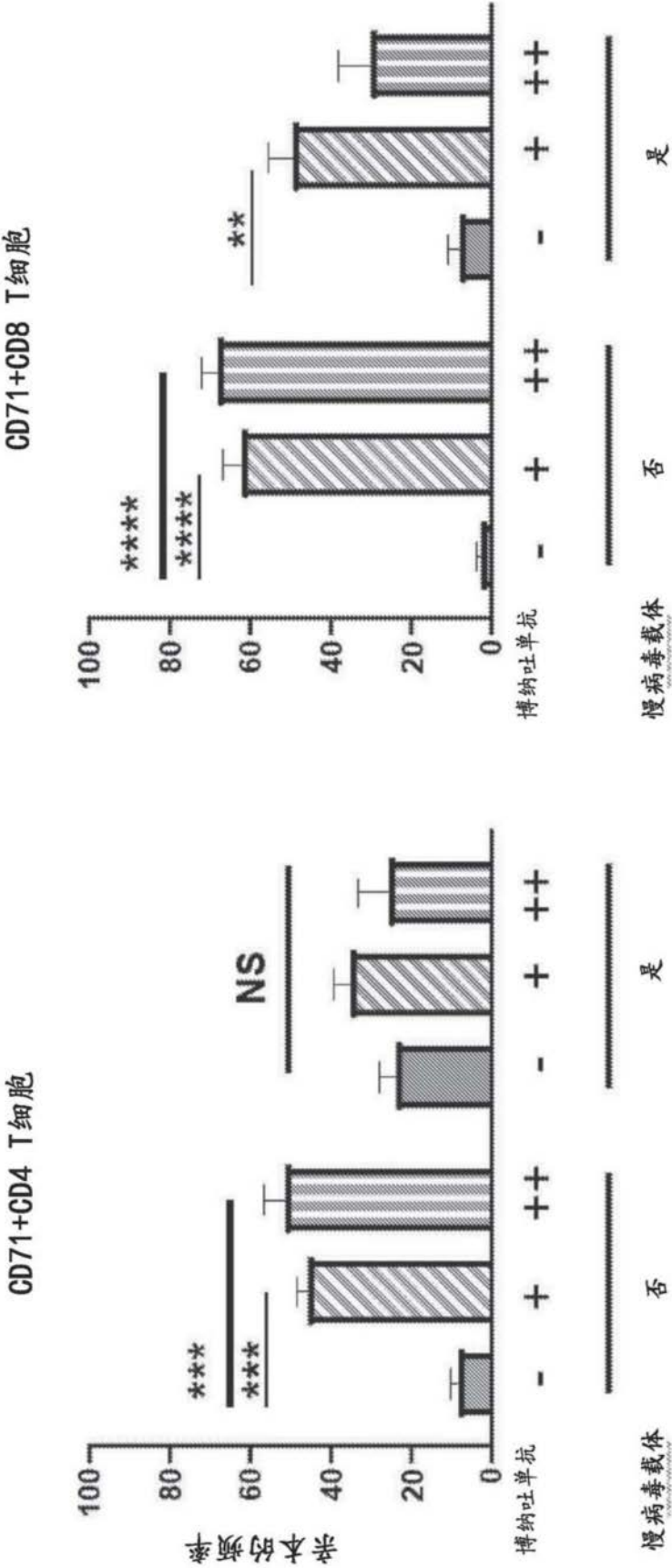


FIG.6

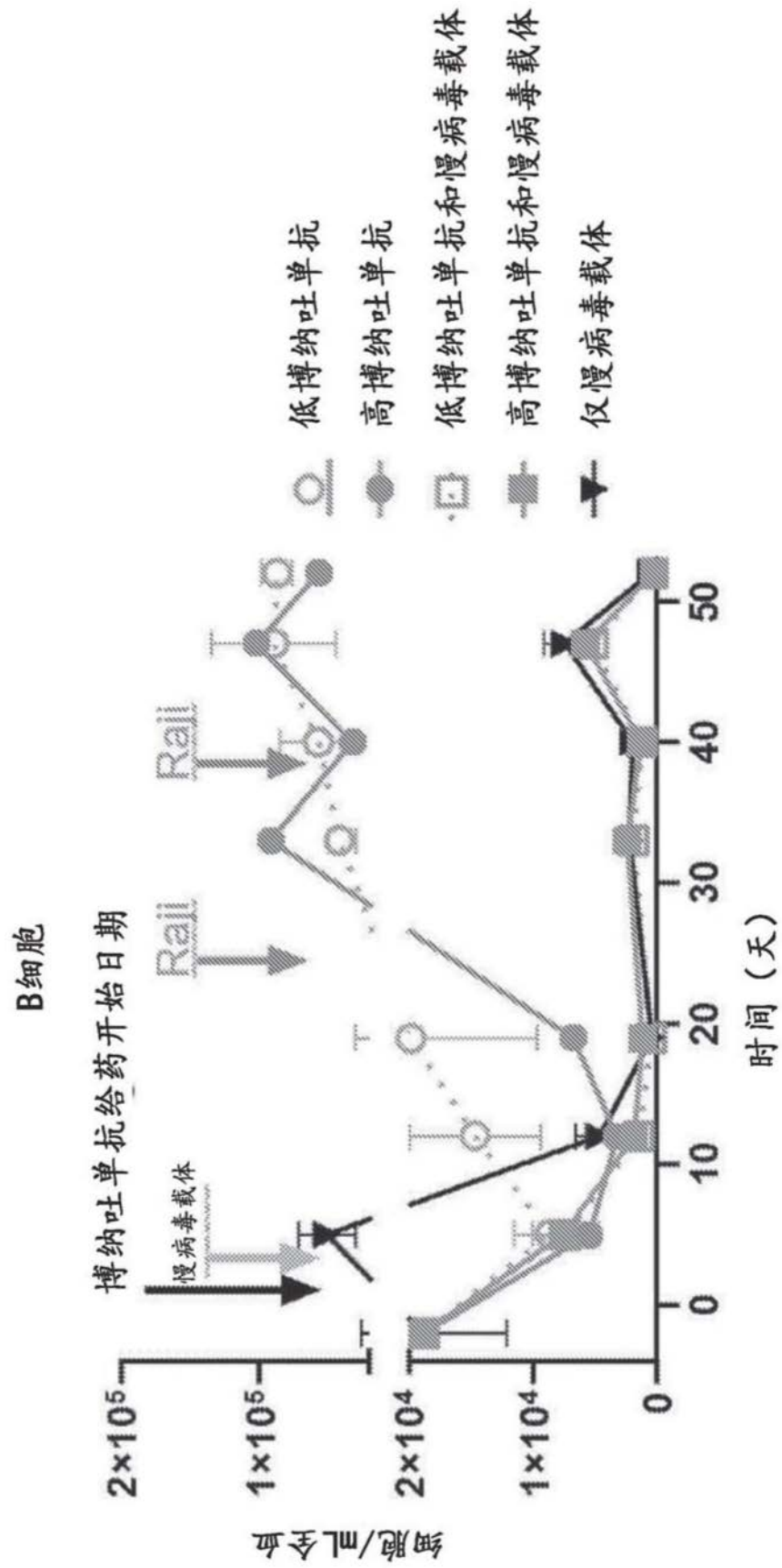


FIG.7

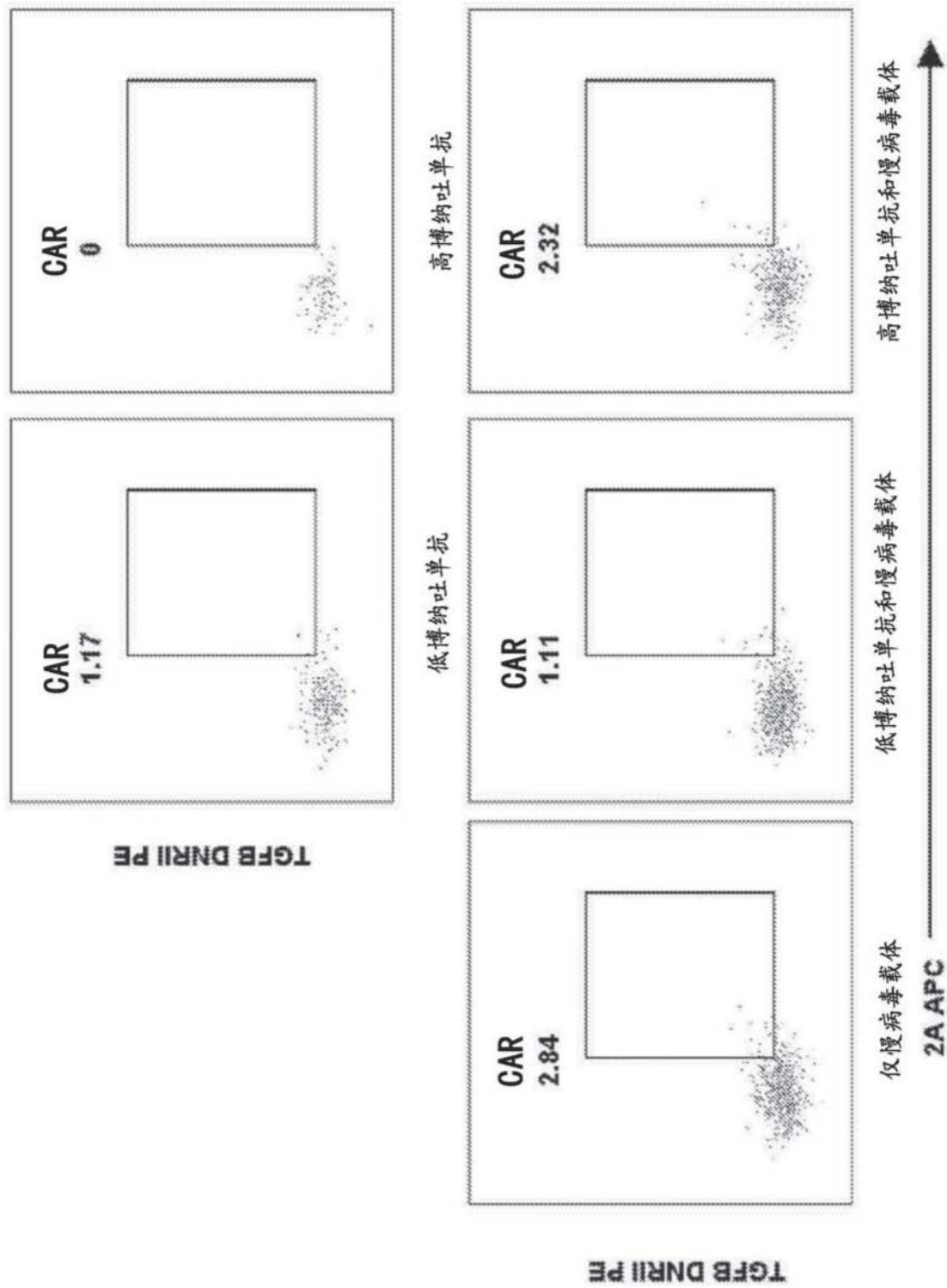


FIG.8

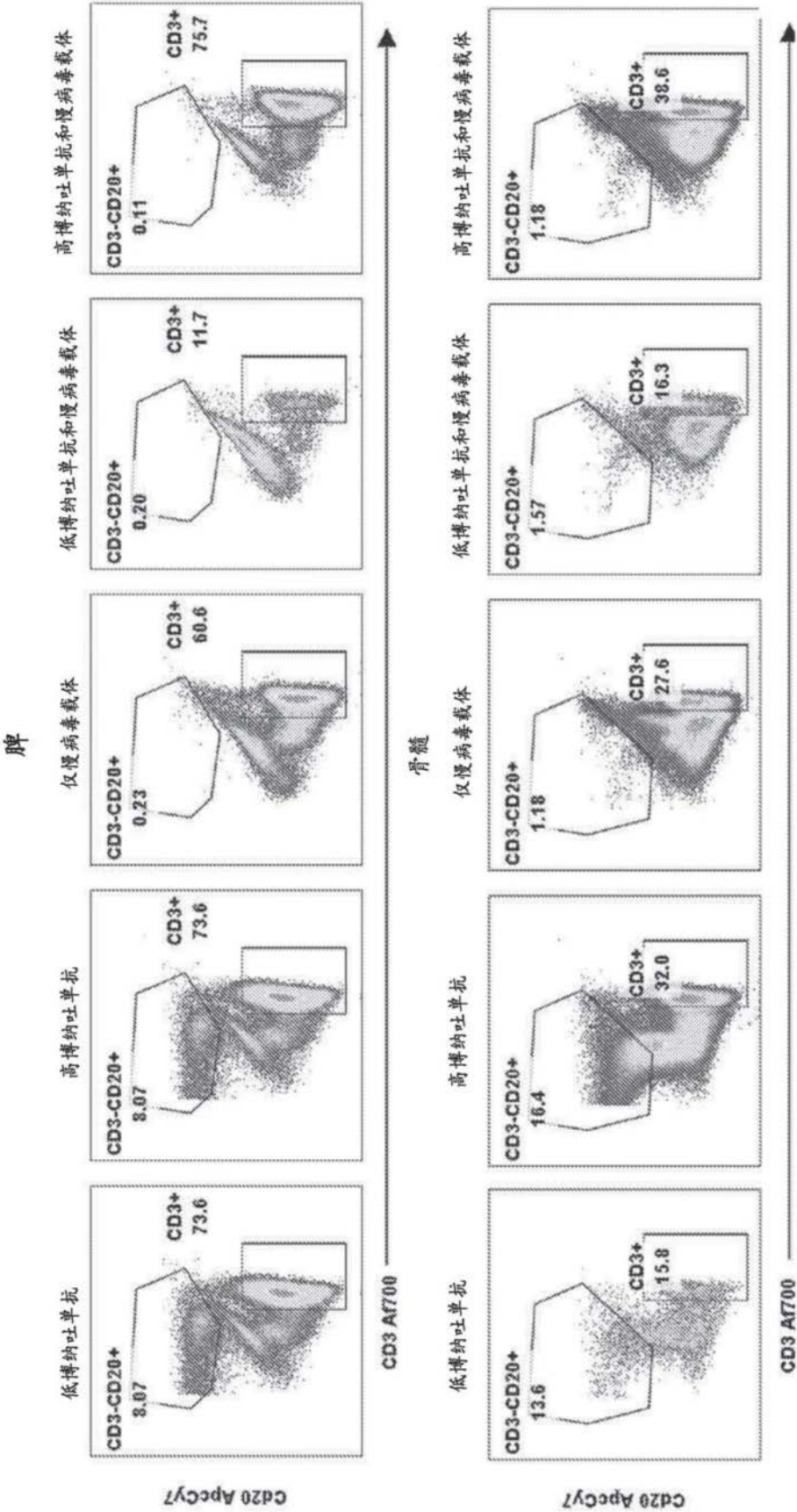


FIG.9