



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113840912 A

(43) 申请公布日 2021. 12. 24

(21) 申请号 202080036374.2

(22) 申请日 2020.05.15

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2019/087260 2019.05.16 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2020/090601 2020.05.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/228825 EN 2020.11.19

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼3、4层(江宁高新园)

(72) 发明人 曾明 陈丽丽 刘勋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 初明明

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书78页
序列表37页 附图14页

(54) 发明名称

包含识别分子的工程化免疫细胞

(57) 摘要

本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子。在一方面,该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,并且该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在另一方面,该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,并且该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

1. 一种工程化免疫细胞, 该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子, 该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,

其中该靶分子包含细胞外结构域,

其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,

其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞, 该靶细胞在其表面包含该靶分子, 并且

其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞, 该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

2. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞, 其中

(i) 该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约0.5倍以上,

(ii) 该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸, 任选地其中该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸的区域结合; 和/或任选地其中该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个氨基酸内的区域结合; 和/或

(iii) 该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约30Å。

3. 如权利要求1或2所述的工程化免疫细胞, 其中该靶分子的细胞外结构域包含三个或更多个Ig样结构域, 并且其中:

(i) 该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域外的区域结合; 和/或

(ii) 该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中

(i) 该结合部分与参考抗体竞争结合, 该参考抗体与CD22的结构域1-4内的表位特异性结合 (“抗CD22 D1-4抗体”);

(ii) 该结合部分与CD22的结构域1-4中的表位结合, 该表位与参考抗CD22D1-4抗体的结合表位重叠;

(iii) 该结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链和轻链CDR序列; 和/或

(iv) 该结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL) 序列。

5. 如权利要求4所述的工程化免疫细胞, 其中

(i) 该参考抗CD22 D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链CDR1 (HC-CDR1)、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2 (HC-CDR2)、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链CDR3 (HC-CDR3)、含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的轻链CDR1 (LC-CDR1)、含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的轻链CDR2 (LC-CDR2) 和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链CDR3 (LC-CDR3); 和/或

(ii) 该参考抗CD22 D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域近端部分结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比, 该工程化免疫细胞能够杀伤至少3倍的靶细胞, 该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

7. 一种工程化免疫细胞, 该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子, 该识别分子包含

与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分，

其中该靶分子包含细胞外结构域，

其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合，

其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞，该靶细胞在其表面包含该靶分子，并且

其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力，该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

8. 如权利要求7所述的工程化免疫细胞，其中

(i) 该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约2倍，

(ii) 该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸，任选地其中该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸的区域外的部分结合；和/或任选地其中该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸内的区域结合；和/或

(iii) 该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约90Å。

9. 如权利要求7或8所述的工程化免疫细胞，其中该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个Ig样结构域，并且其中：

(i) 该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域结合；和/或

(ii) 该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域结合。

10. 如权利要求9所述的工程化免疫细胞，其中

(i) 该结合部分与参考抗体竞争结合，该参考抗体与CD22的结构域5-7内的表位特异性结合（“抗CD22 D5-7抗体”）；

(ii) 该结合部分与CD22的结构域5-7中的表位结合，该表位与参考抗CD22D5-7抗体的结合表位重叠；

(iii) 该结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的重链和轻链CDR序列；和/或

(iv) 该结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的VH和VL序列。

11. 如权利要求10所述的工程化免疫细胞，其中

(i) 该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HC-CDR3、含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的LC-CDR1、含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的LC-CDR3；和/或

(ii) 该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:82的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VL。

12. 如权利要求7-11中任一项所述的工程化免疫细胞，其中与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域远端结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比，该工程化免疫细胞杀伤不超过约20%的靶细胞，该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的工程化免疫细胞，其中该结合部分是sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的工程化免疫细胞，其中该识别分子包含该结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子是跨膜受体。
16. 如权利要求15所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子选自由以下组成的组:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。
17. 如权利要求16所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子是CD22。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是多特异性的。
19. 如权利要求18所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子包含特异性识别第二靶分子的第二结合部分,并且其中该结合部分与该第二结合部分串联连接。
20. 如权利要求14-20中任一项所述的工程化免疫细胞,其中
- (i) 该结合部分与该跨膜结构域直接或间接融合;
 - (ii) 该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽非共价地结合;
 - (iii) 该识别分子包含i) 含有该结合部分和结合对的第一成员的第一多肽;和ii) 含有该结合对的第二成员的第二多肽,其中该第一成员和该第二成员彼此结合,并且其中该第二成员与该跨膜结构域直接或间接融合;和/或
 - (iv) 该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽融合。
21. 如权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是嵌合抗原受体 (“CAR”)。
22. 如权利要求21所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自选自由以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152和PD1,任选地其中该跨膜结构域衍生自CD8 α 。
23. 如权利要求21或22所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的初级细胞内信号传导结构域,任选地其中该初级细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ζ 。
24. 如权利要求21-23中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域,任选地其中该共刺激信号传导结构域衍生自选自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83的配体及其组合。
25. 如权利要求21-24中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子进一步包含位于该结合部分的C-末端与该跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域,任选地其中该铰链结构域衍生自CD8 α 或IgG4 CH2-CH3。
26. 如权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是嵌合T细胞受体 (“cTCR”)。
27. 如权利要求26所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自选自由以下组成的组的TCR亚基的跨膜结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ ,任选地其中该跨膜结构域衍生自CD3 ϵ 的跨膜结构域。
28. 如权利要求26或27所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域衍生自选自由以下组成的组的TCR亚基的细胞内信号传导结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ ,任选地其中该细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ϵ 的细胞内信号传导结构域。
29. 如权利要求26-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子的跨膜结构域

和细胞内信号传导结构域衍生自同一TCR亚基。

30. 如权利要求26-29中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子进一步包含TCR亚基的细胞外结构域的至少一部分。

31. 如权利要求30所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与CD3 ϵ 的N-末端融合(“eTCR”)。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该工程化免疫细胞是T细胞。

33. 如权利要求32所述的工程化免疫细胞,其中该免疫细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NK-T)细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。

34. 如权利要求1-33中任一项所述的工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞进一步包含共受体,任选地其中该共受体是趋化因子受体。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶细胞是免疫细胞。

36. 如权利要求1-34中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶细胞是肿瘤细胞。

37. 一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1-36中任一项所述的工程化免疫细胞。

38. 一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如权利要求37所述的药物组合物。

39. 如权利要求38所述的方法,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。

40. 如权利要求38所述的方法,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,并且其中该工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。

41. 如权利要求38-40中任一项所述的方法,其中该癌症选自由以下组成的组:T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B细胞淋巴瘤。

42. 一种治疗患有传染病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如权利要求37所述的药物组合物。

43. 如权利要求42所述的方法,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。

44. 如权利要求42所述的方法,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。

45. 如权利要求42-44中任一项所述的方法,其中该传染病是由选自由HIV和HTLV组成的组的病毒的感染。

46. 如权利要求45所述的方法,其中该传染病是HIV。

47. 一种制造如权利要求1-36中任一项所述的工程化免疫细胞的方法,该方法包括将编码该识别分子的一种或多种核酸引入免疫细胞,从而获得该工程化免疫细胞。

包含识别分子的工程化免疫细胞

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年5月16日提交的国际专利申请号PCT/CN 2019/087260的优先权,其内容通过引用以其全文并入本文。

序列表以ASCII文本文件提交

[0002] 以下以ASCII文本文件提交的内容通过援引以其全文并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:761422003140.txt,记录日期:2020年5月11日,大小:78KB)。

技术领域

[0003] 本发明涉及表面包含识别分子的工程化免疫细胞(如工程化T细胞),其可用于治疗传染病和癌症。

背景技术

[0004] T细胞介导的免疫是发展抗原(Ag)特异性T淋巴细胞以消除病毒、细菌、寄生虫感染、或恶性细胞的自适应过程。

[0005] CD4+T细胞在免疫系统中发挥最重要的协调作用,在T细胞介导的免疫和B细胞介导的(或体液)免疫中都发挥核心作用。在T细胞介导的免疫中,CD4+T细胞在CD8+T细胞的激活和成熟中发挥作用。在B细胞介导的免疫中,CD4+T细胞负责刺激B细胞使其增殖并诱导B细胞抗体类别转换。

[0006] 人免疫缺陷病毒(HIV)感染的后果或许可以最好地说明CD4+T细胞所发挥的核心作用。该病毒是逆转录病毒,这意味着它以RNA携带其遗传信息并且携带逆转录酶,这使得一旦它进入宿主细胞,就可以由其RNA基因组产生DNA。然后将DNA整合到受影响的宿主细胞中,此时病毒基因被转录,并且受感染的细胞产生并释放更多的病毒颗粒。

[0007] HIV优先靶向CD4+T细胞;结果,受感染患者的免疫系统日益受损,因为免疫系统的主要协调细胞群急剧减少。事实上,HIV进展为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是以患者的CD4+T细胞计数为标志的。病毒对CD4+T细胞的这种靶向也导致受感染患者不能成功产生针对各种病原体(包括机会性病原体)的生产性免疫响应。

[0008] 用各种药理学类别的药物靶向病毒防止了病毒抗性,并在受感染患者中显示出显著功效,但需要患者高度依从以确保其完全功效。事实上,不依从可能导致耐药菌株的出现,进一步导致难以有效管理和治疗患者的疾病和随后的并发症。

[0009] 嵌合抗原受体(CAR)是一类重新编程淋巴细胞特异性和功能的合成受体。工程化T细胞原则上适用于多种类型的癌症,有待于在确定合适的靶抗原、克服免疫抑制性肿瘤微环境、降低毒性并防止抗原逃逸方面取得进一步进展。最佳T细胞的选择、基因工程和细胞制造的进展有望扩大基于T细胞的疗法的应用,并在传染病和自身免疫中开启新的应用。随着CAR-T细胞技术的不断发展,研究人员已在T细胞的表面同时表达了一些与T细胞激活密切相关的共刺激分子和抗原受体,从而增强了T细胞的杀伤活性。由于CAR-T细胞的重编程方法是通过慢病毒将相关基因序列直接整合到细胞染色体中,故CAR-T细胞可以长时间地

稳定表达设计的抗原受体和共刺激分子。理论上,抗原受体和共刺激分子的功能可以是长期且稳定的。大量临床报告表明,来自自体来源的CAR-T细胞疗法对各种B细胞恶性肿瘤和多发性骨髓瘤具有良好的效果。然而,一些患者在接受CAR-T细胞疗法后仍复发。

[0010] 典型的CAR包含细胞外抗原识别结构域、铰链结构域、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和TCR信号传导基序。抗原识别结构域可以是来自抗体的可变区,或抗原的天然受体或配体。抗原识别结构域在CAR-T细胞激活中起关键作用。抗原识别结构域的亲和力可能影响CAR-T细胞是否可以区分表达高水平抗原与低水平抗原的细胞,这在将CAR-T设计为靶向肿瘤相关抗原而不是肿瘤特异性抗原时至关重要。肿瘤相关抗原是在肿瘤细胞上高水平表达而在一些正常细胞上低水平表达的抗原。当无肿瘤特异性抗原可用于构建CAR时,需要微调CAR-T的亲和力,以减少肿瘤外中靶作用。广泛使用的抗原识别结构域是scFv,其包含来自抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域。scFv识别抗原上的表位。表位位置也可能在CAR-T的功能中发挥重要作用。

[0011] 在临床报告(NCT 01626495)中,由于CD19⁺白血病异常表达抗CD19 CAR,患者在输注CD19靶向CAR T细胞(CTL019)后9个月复发。在T细胞制造期间,无意地将CAR基因引入了单个白血病B细胞,并且其子代细胞顺式结合白血病细胞表面上的CD19表位,从而遮蔽了此类细胞使其无法被CTL019识别并导致对CTL019的抗性。

[0012] 本文提到的所有出版物、专利、专利申请和公开的专利申请的披露内容通过援引以其全文特此并入本文。

发明内容

[0013] 在一方面,本申请提供了识别分子(例如,跨膜受体)、工程化免疫细胞、组合物和治疗方法。

[0014] 本申请的一个方面提供了工程化免疫细胞(“抗远端部分工程化免疫细胞”),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该识别分子包含该结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该结合部分是单域抗体(sdAb)、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

[0015] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约0.5倍以上。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约1倍以上。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约1.5倍以上。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约2倍以上。

[0016] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸的区域结合。在一些实施例

中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约80个或更多个氨基酸的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120个氨基酸内的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个氨基酸内的区域结合。

[0017] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约30 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约40 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约60 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约90 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约120 Å。

[0018] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域包含三个或更多个Ig样结构域。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前四个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的前三个(例如,第一个)Ig样结构域内的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。

[0019] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子是跨膜受体。在一些实施例中,该靶分子选自由以下组成的组:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。

[0020] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子是CD22。在一些实施例中,该结合部分与参考抗体竞争结合,该参考抗体与CD22的结构域1-4内的表位特异性结合(“抗CD22 D1-4抗体”)。在一些实施例中,该结合部分与CD22的结构域1-4中的表位结合,该表位与参考抗CD22D1-4抗体的结合表位重叠。在一些实施例中,该结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链和轻链CDR序列。在一些实施例中,该结合部分包含与参考抗CD22D1-4抗体相同的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)序列。在一些实施例中,该参考抗CD22D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链CDR1(HC-CDR1)、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2(HC-CDR2)、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链CDR3(HC-CDR3)、含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的轻链CDR1(LC-CDR1)、含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的轻链CDR2(LC-CDR2)和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链CDR3(LC-CDR3)。在一些实施例中,该参考抗CD22D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

[0021] 在根据一个或多个上述抗远端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域近端部分结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比,该工程化免疫细胞能够杀伤至少3倍的靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

[0022] 本申请的一个方面提供了工程化免疫细胞(“抗近端部分工程化免疫细胞”),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力。

力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该识别分子包含该结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该结合部分是sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

[0023] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约2倍。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约1.5倍。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约1倍。

[0024] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸的区域外的部分结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约120个氨基酸内的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸内的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个氨基酸内的区域结合。

[0025] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约120 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约90 Å。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约60 Å。

[0026] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个Ig样结构域。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的前三个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前四个Ig样结构域内的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域结合。

[0027] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子是跨膜受体。在一些实施例中,该靶分子选自由以下组成的组:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。

[0028] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶分子是CD22。在一些实施例中,该结合部分与参考抗体竞争结合,该参考抗体与CD22的结构域5-7内的表位特异性结合(“抗CD22 D5-7抗体”)。在一些实施例中,该结合部分与CD22的结构域5-7中的表位结合,该表位与参考抗CD22D5-7抗体的结合表位重叠。在一些实施例中,该结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的重链和轻链CDR序列。在一些实施例中,该结合部分包含与参考抗CD22D5-7抗体相同的VH和VL序列。在一些实施例中,该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HC-CDR3、含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的LC-CDR1、含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的LC-CDR3。在一些实施例中,该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:82的氨

氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VL。

[0029] 在根据一个或多个上述抗近端部分工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域远端结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比,该工程化免疫细胞杀伤不超过约20%的靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

[0030] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞(包括抗远端部分和抗近端部分工程化免疫细胞)实施例的一些实施例中,该识别分子是单特异性的。在一些实施例中,该识别分子是多特异性的。在一些实施例中,该识别分子包含特异性识别第二靶分子的第二结合部分。在一些实施例中,该第二结合部分是sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。在一些实施例中,该结合部分与该第二结合部分串联连接。在一些实施例中,该结合部分在该第二结合部分的N-末端。在一些实施例中,该结合部分在该第二抗原结合部分的C-末端。在一些实施例中,该结合部分与该第二结合部分经由接头连接。

[0031] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该结合部分与该跨膜结构域直接或间接融合。在一些实施例中,该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽非共价地结合。在一些实施例中,该识别分子包含i)含有该结合部分和结合对的第一成员的第一多肽;和ii)含有该结合对的第二成员的第二多肽,其中该第一成员和该第二成员彼此结合,并且其中该第二成员与该跨膜结构域直接或间接融合。在一些实施例中,该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽融合。

[0032] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该识别分子是嵌合抗原受体("CAR")。在一些实施例中,该跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些实施例中,该跨膜结构域衍生自CD8 α 。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该初级细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ζ 。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,该共刺激信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83的配体及其组合。在一些实施例中,该共刺激信号传导结构域包含4-1BB的胞内结构域。在一些实施例中,该识别分子进一步包含位于该结合部分的C-末端与该跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。在一些实施例中,该铰链结构域衍生自CD8 α 或IgG4 CH2-CH3。

[0033] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该识别分子是嵌合T细胞受体("cTCR")。在一些实施例中,该跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的跨膜结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。在一些实施例中,该跨膜结构域衍生自CD3 ϵ 的跨膜结构域。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的细胞内信号传导结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ϵ 的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该识别分子的跨膜结构域和细胞内信号传导结构域衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,该识别分子进一步包含TCR亚基的细胞外结构域的至少一部分。在一些实

施例中,该结合部分与CD3 ϵ 的N-末端融合(“eTCR”)。

[0034] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该工程化免疫细胞是T细胞。在一些实施例中,该免疫细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NK-T)细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含共受体。在一些实施例中,该共受体是趋化因子受体。

[0035] 在根据一个或多个上述工程化免疫细胞实施例的一些实施例中,该靶细胞是免疫细胞。在一些实施例中,该靶细胞是肿瘤细胞。

[0036] 本申请的一个方面提供了药物组合物(“抗远端部分药物组合物”),该药物组合物包含根据以上所述的抗远端部分工程化免疫细胞中任一种的工程化免疫细胞。

[0037] 本申请的一个方面提供了治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的根据以上所述的抗远端部分药物组合物中任一种的药物组合物。在一些实施例中,这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。在一些实施例中,该癌症选自由以下组成的组:T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B细胞淋巴瘤。

[0038] 本申请的一个方面提供了治疗患有传染病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的根据以上所述的抗远端部分药物组合物中任一种的药物组合物。在一些实施例中,这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。在一些实施例中,该传染病是由选自由HIV和HTLV组成的组的病毒的感染。在一些实施例中,该传染病是HIV。

[0039] 本申请的一个方面提供了药物组合物,该药物组合物包含根据以上所述的抗近端部分工程化免疫细胞实施例中的任一个的抗近端部分工程化免疫细胞。

[0040] 本申请的一个方面提供了治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的根据以上所述的抗近端部分药物组合物中任一种的药物组合物。在一些实施例中,这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。在一些实施例中,该癌症选自由以下组成的组:T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B细胞淋巴瘤。

[0041] 本申请的一个方面提供了治疗患有传染病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的根据以上所述的抗近端部分药物组合物中任一种的药物组合物。在一些实施例中,这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。在一些实施例中,该传染病是由选自由HIV和HTLV组成的组的病毒的感染。在一些实施例中,该传染病是HIV。

[0042] 本申请的另一方面提供了制造根据以上所述的抗远端部分或抗近端部分工程化免疫细胞中任一种的工程化免疫细胞的方法,该方法包括将编码该识别分子的一种或多种核酸引入免疫细胞,从而获得该工程化免疫细胞。

[0043] 还提供了用于在治疗癌症或传染病(例如,HIV)中使用的根据以上所述的实施例中的任一个的远端部分识别分子(例如,跨膜受体)、抗远端部分工程化免疫细胞或组合物,以及使用根据以上所述的实施例中的任一个的近端部分识别分子(例如,跨膜受体)、抗近端工程化免疫细胞或组合物用于治疗癌症或传染病(例如,HIV)。

[0044] 进一步提供了包含以上所述的工程化免疫细胞中任一种的组合物、试剂盒和制品。

附图说明

[0045] 图1A显示了示例性抗CD4 CAR的结构,其由CD4结合部分、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域组成。CD4结合部分可以特异性识别CD4的结构域1中的表位或CD4的结构域2和/或3中的表位。

[0046] 图1B显示了两种不同类型的抗CD4 CAR-T细胞的表型。CAR-T No.1中的CAR含有特异性识别CD4的结构域1中的表位的scFv,并且可以杀死CAR+和CAR-群体中的CD4+细胞。CAR-T No.2中的CAR含有特异性识别CD4的结构域2中的表位的scFv并且在杀伤CAR+靶CD4+细胞中无效。

[0047] 图2显示了抗CD4抗体艾巴利珠单抗、曲加利珠单抗和扎诺利木单抗的结构域图谱(domain mapping)。被人CD4的五个不同结构域取代的小鼠CD4在HEK-293T细胞上瞬时表达。将抗体用于通过流式细胞术检测这些结构域。将扎诺利木单抗VH/VL用于产生CAR-T No.1并且将艾巴利珠单抗VH/VL用于产生CAR-T No.2。将曲加利珠单抗VH/VL用于产生CAR-T No.3。

[0048] 图3A和3B显示了假设的CAR-T和CD4相互作用模型。图3A显示了CAR-T No.1识别CD4结构域1中的表位,并且CAR-T No.2识别CD4结构域2或3中的表位。图3B显示了CAR-T No.2上的CD4被同一细胞上的CAR顺式阻断,而CAR-T No.1上的CD4未被阻断并且可以被另一个CAR-T细胞识别。

[0049] 图4A-4C显示了抗体阻断测定的结果。图4A显示了艾巴利珠单抗、曲加利珠单抗和扎诺利木单抗的表位分组。图4B显示了在不同抗CD4抗体不存在或存在下与CFSE标记的泛T靶细胞共培养的CAR-T细胞的流式细胞术。使用了两种阻断剂量,分别为50nM和100nM。图4C显示了图4B中的CAR-T细胞的定量分析。

[0050] 图5显示了抗CD4 CAR-T细胞的细胞毒性作用。此实验的CAR-T细胞中使用了两种类型的识别CD4结构域1的抗体。将UNT细胞(未转导的T细胞)和CAR-T细胞与CFSE标记的泛T靶细胞以0.5:1的E:T(效应子:靶标)比率共培养24小时。通过流式细胞术来检测CD4的表达。

[0051] 图6A显示了用CAR转导的人皮肤T淋巴瘤细胞系HH的流式细胞术结果。通过流式细胞术来检测CAR%率。将未转导的HH细胞用作对照。图6B显示了与效应细胞共培养的CFSE标记的HH或CAR-HH细胞的流式细胞术结果。将CD4结构域1特异性CAR-T细胞用作效应细胞。将CAR-T No.1和UNT细胞用作对照。通过流式细胞术来检测靶细胞上的CD4表达。图6C显示了基于UNT+HH样品计算的每个样品中的相对CD4+%。图6D显示了CAR-T NO.1细胞对肿瘤生长(上)和体重(下)的作用。

[0052] 图7显示了抗CD4结构域1 CAR-T No.1细胞的体内功效。用 3×10^5 CAR+CAR-T细胞或UNT对照细胞接种具有人免疫系统的小鼠(HIS小鼠)。在过继T细胞处理后第18天收获脾细胞以用于流式细胞术分析。

[0053] 图8A-8D显示了抗CD4结构域1 eTCR-T细胞的表征。图8A显示了抗CD4 eTCR转导的T细胞群中TCR+T细胞的百分比。图8B显示了抗CD4 eTCR-T细胞产生的IFN γ 。图8C显示了抗CD4 eTCR-T细胞的扩增。图8D显示了抗CD4eTCR-T细胞对靶细胞的体外杀伤效果。SEQ ID NO:64列出了此抗CD4 eTCR的序列。

[0054] 图9显示了抗CD4 CAR-T细胞的细胞毒性作用。此实验的CAR-T细胞中使用了两种

类型的识别CD4结构域2和/或结构域3的抗体。将UNT细胞(未转导的T细胞)和CAR-T细胞与CFSE标记的泛T靶细胞以0.5:1的E:T(效应子:靶标)比率共培养24小时。通过流式细胞术来检测CD4的表达。

[0055] 图10显示了示例性抗CD22 CAR的结构,其包含CD22结合部分、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。CD22结合部分可以特异性识别CD22的结构域1-4中的表位或CD22的结构域5-7中的表位。

[0056] 图11A显示了实验中使用的两种抗CD22 CAR识别的CD22结构域。图11B显示了识别CD22的结构域3的CAR-T No.454的细胞毒性作用。图11C显示了识别CD22的结构域5-7的CAR-T No.447的细胞毒性作用。将UNT细胞(未转导的T细胞)和CAR-T细胞与CFSE标记的泛T靶细胞以0.5:1的E:T(效应子:靶标)比率共培养24小时。通过流式细胞术来检测CD22的表达。

[0057] 图12显示了CD22和CD4的细胞外结构域的结构。

具体实施方式

[0058] 本申请提供了工程化免疫细胞,这些工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子与靶细胞表面上相应靶分子的特定区域内的表位结合。示例性识别分子包括嵌合抗原受体(“CAR”)、嵌合T细胞受体(“cTCR”)和在免疫细胞内起作用的其他受体。本申请基于以下出人意料的发现:某些类型的识别分子(当在免疫细胞表面表达时)会导致工程化免疫细胞被(例如表达相同识别分子的其他免疫细胞)消耗或消除(称为“自杀能力”)。另一方面,其他类型的识别分子不具有此自杀能力,而相反可以保护免疫细胞不被表达相同识别分子的其他免疫细胞杀伤。本申请发现具有自杀能力的识别分子类型含有特异性识别靶分子的远端部分(即远离细胞膜的部分)的结合部分,而不具有此自杀能力的识别分子类型含有特异性识别靶分子的近端部分(即,靠近细胞膜的部分)的结合部分。

[0059] 本申请用两个示例性靶分子即CD4和CD22证明了此原理。例如,我们描述了特异性识别CD4+细胞或CD22+细胞并对其应答的CAR-T细胞。我们发现抗CD4结构域1CAR-T不仅杀伤CAR阴性细胞群中的CD4+细胞,还可以消除CD4+CAR+细胞。相反,抗CD4结构域2/3CAR-T不能消除CD4+CAR+细胞。类似地,抗CD22结构域1-4CAR-T不仅杀伤CAR阴性细胞群中的CD22+细胞,还可以消除CD22+CAR+细胞。相反,识别CD22的结构域5-7的CAR-T不能消除CD22+CAR+细胞。

[0060] 不受理论束缚,假设工程化免疫细胞表面上结合分子的自杀能力的不同取决于其结合部分识别的表位。识别靶分子近端的结合部分可以在距同一细胞上内源性表达的靶分子的适当距离内,以阻断另一工程化免疫细胞对表位的识别,从而保护工程化免疫细胞免受攻击。另一方面,识别靶分子远端的结合部分可能与同一细胞上内源性表达的靶分子相距太远而无法阻断另一工程化免疫细胞对靶分子的识别,从而导致杀伤工程化免疫细胞。

[0061] 目前为止,大多数工程化免疫细胞(如CAR-T细胞)由从待治疗的个体中富集的自体免疫细胞制造。对于HIV治疗,如果原始的免疫细胞含有HIV病毒,则工程化免疫细胞也可能含有HIV病毒并成为新的感染源。例如,为了用工程化免疫细胞(如CAR-T)治疗CD4+T细胞淋巴瘤/白血病,需要去除免疫细胞群中污染的任何CD4+白血病/淋巴瘤细胞。在工程化免疫细胞制造期间,富集的T细胞群中的残留肿瘤细胞也可以被表达免疫细胞受体的慢病毒

转导并变得对免疫细胞受体呈阳性。免疫细胞受体可以与其配体顺式结合,从而遮蔽工程化免疫细胞上的靶抗原。然后表达免疫细胞受体的肿瘤细胞可以逃避免疫细胞受体介导的杀伤,并且最终导致耐药疾病复发。因此,本文所述的远端结合分子(具有自杀能力)特别适用于自体治疗方法。

[0062] 相反,以上讨论的自体免疫细胞的风险在同种异体治疗的背景下不存在。在同种异体的情况下,希望工程化免疫细胞不杀伤自身,从而最大地发挥工程化免疫细胞的功效。因此,本文所述的近端结合分子(不具有自杀能力)特别适用于同种异体治疗方法。

[0063] 因此,在一方面,本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。这些工程化免疫细胞(“抗远端部分工程化免疫细胞”)对疾病(如癌症和传染病)的自体治疗特别有用。

[0064] 在另一方面,本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。这些工程化免疫细胞(“抗近端部分工程化免疫细胞”)对疾病(如癌症和传染病)的同种异体治疗特别有用。

定义

[0065] 本文中使用的术语“远端部分”是指细胞表面上靶分子中的细胞外区域,该区域相对于靶细胞中的其他细胞外区域远离细胞膜。

[0066] 本文中使用的术语“近端部分”是指细胞表面上靶分子中的细胞外区域,该区域相对于靶细胞中的其他细胞外区域靠近细胞膜。

[0067] 如本文所用的,从分子区域(例如,靶分子的细胞外结构域的远端部分或近端部分,或识别分子的结合部分)到表达分子的细胞的膜的“距离”是指区域中参与结合其结合配偶体(例如,识别分子的结合部分或分别是靶分子的细胞外结构域的远端部分或近端部分)的氨基酸残基的质心到细胞膜的距离。

[0068] 术语“抗体”以其最广泛的含义使用,并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、全长抗体和其抗原结合片段,只要它们表现出所希望的抗原结合活性即可。术语抗体包括常规的四链抗体和单域抗体,例如仅有重链的抗体或其片段,例如VHH。

[0069] 全长四链抗体包含两条重链和两条轻链。轻链和重链的可变区负责抗原结合。可以分别将重链和轻链的可变结构域称为“V_H”和“V_L”。两种链中的可变区通常含有三个高度可变的环,称为互补决定区(CDR)(包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的轻链(LC)CDR,包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的重链(HC)CDR)。可以通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani的公约来定义或鉴定本文披露的抗体和抗原结合片段的CDR边界(Al-Lazikani, 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948; Chothia 1985, J. Mol. Biol., 186:651-663; Chothia 1987,

J.Mol.Biol.,196:901-917;Chothia 1989,Nature,342:877-883;Kabat 1987,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第四版.US Govt.Printing Off.No.165-492; Kabat 1991,Sequences of Proterons of Immunological Interest,第五版,NIH Publication No.91-3242)。重链或轻链的三个CDR位于称为框架区(FR)的侧翼段之间,该框架区比CDR更高度保守并形成支架以支持高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但表现各种效应子功能。基于抗体重链恒定区的氨基酸序列来对其分类。抗体的五个主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其特征分别是存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。几个主要的抗体类别被分成亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0070] 术语“仅重链抗体”或“HCAb”是指功能性抗体,其包含重链,但缺乏通常在4链抗体中发现的轻链。已知骆驼科动物(如骆驼、美洲驼或羊驼)产生HCAb。

[0071] 术语“单域抗体”或“sdAb”是指具有三个互补决定区(CDR)的单抗原结合多肽。单独的sdAb能够与抗原结合而不与相应的含有CDR的多肽配对。在一些情况下,单域抗体由骆驼科HCAb工程化而成,并且其重链可变结构域在本文中称为“VHH”(重链抗体的重链的可变结构域)。骆驼科sdAb是已知最小的抗原结合抗体片段之一(参见,例如Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-8(1993);Greenberg等人,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等人,Nanomedicine(Lond),8:1013-26(2013))。基本的VHH从N-末端至C-末端具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别是指框架区1至4,并且其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。

[0072] 术语“抗体部分”包括全长抗体及其抗原结合片段。全长抗体包含两条重链和两条轻链。轻链和重链的可变区负责抗原结合。两种链中的可变区通常含有三个高度可变的环,称为互补决定区(CDR)(包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的轻链(LC)CDR,包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的重链(HC)CDR)。可以通过Kabat、Chothia或Al-Lazikani的公约来定义或鉴定本文披露的抗体和抗原结合片段的CDR边界(Al-Lazikani 1997;Chothia 1985;Chothia 1987;Chothia 1989;Kabat 1987;Kabat 1991)。重链或轻链的三个CDR位于称为框架区(FR)的侧翼段之间,该框架区比CDR更高度保守并形成支架以支持高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但表现各种效应子功能。基于抗体重链恒定区的氨基酸序列来对其分类。抗体的五个主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其特征分别是存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。几个主要的抗体类别被分成亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0073] 如本文所用的,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,包括例如双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds双抗体)、单链Fv(scFv)、scFv二聚体(二价双抗体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体、骆驼化单域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或结合抗原但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够结合与亲本抗体或亲本抗体片段(例如亲本scFv)结合的抗原相同的抗原。在一些实施例中,抗原结合片段可以包含移植到来自一种或多种不同人抗体的框架区的来自特定人抗体的一个或多个CDR。

[0074] “Fv”是最小抗体片段,其含有完整的抗原识别位点和抗原结合位点。此片段由紧

密非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。这两个结构域的折叠产生六个高变环(重链和轻链各有3个环),其为抗原结合贡献氨基酸残基并赋予该抗体抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或仅包含三个对抗原有特异性的CDR的半个Fv)就具有识别并结合抗原的能力,虽然通常以比完整结合位点更低的亲和力进行。

[0075] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接到单个多肽链的 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。在一些实施例中,scFv多肽进一步包含在 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头,该多肽接头能够使scFv形成抗原结合所希望的结构。关于scFv的综述,参见Plückthun于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0076] 术语“双抗体”是指通过以下方式来制备的小抗体片段:典型地用在 V_H 与 V_L 结构域之间的短接头(如约5至约10个残基)构建scFv片段(参见前述段落),从而实现V结构域链间而非链内的配对,产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”scFv片段的异二聚体,其中两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。双抗体更全面地描述于,例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)。

[0077] 如本文所用的,术语“CDR”或“互补决定区”旨在意指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区域已由以下描述:Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Al-Lazikani B.等人,J.Mol.Biol.,273:927-948(1997);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996);Abhinandan和Martin,Mol.Immunol.,45:3832-3839(2008);Lefranc M.P.等人,Dev.Comp.Immunol.,27:55-77(2003);和Honegger与Plückthun,J.Mol.Biol.,309:657-670(2001),其中定义包括氨基酸残基相互比较时的重叠或子集。然而,应用任一定义来指代抗体或移植抗体或其变体的CDR旨在落入如本文定义和使用的术语的范围内。作为比较,下表1中列出了涵盖以上引用的每个参考文献所定义的CDR的氨基酸残基。CDR预测算法和接口是本领域已知的,包括,例如,Abhinandan和Martin,Mol.Immunol.,45:3832-3839(2008);Ehrenmann F.等人,Nucleic Acids Res.,38:D301-D307(2010);和Adolf-Bryfogle J.等人,Nucleic Acids Res.,43:D432-D438(2015)。此段落中引用的参考文献内容通过引用以其全文并入本文,以用于在本发明中使用并可能包含在本文的一条或多条权利要求中。除非另外定义,否则本文提供的CDR序列基于Chothia定义。

表1:CDR定义

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

¹残基编号遵循Kabat等人,同上的命名法

²残基编号遵循Chothia等人,同上的命名法

³残基编号遵循MacCallum等人,同上的命名法

⁴残基编号遵循Lefranc等人,同上的命名法

⁵残基编号遵循Honegger和Plückthun,同上的命名法

[0078] 表述“如Chothia中的可变结构域残基编号”或“如Chothia中的氨基酸位置编号”及其变体是指用于上文Chothia等人的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际直链氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入的更少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Chothia的残基52a)以及在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Chothia的残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列与“标准”Chothia编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Chothia编号。

[0079] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0080] 如本文所用的,术语“单克隆抗体”是指从基本上均一的抗体群体中获得的抗体,例如包含群体的个体的抗体是同一的,除了可以少量存在的可能的突变,例如天然存在的突变。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施例中,此单克隆抗体典型地包括包含与靶标结合的多肽序列的抗体,其中该结合靶标的多肽序列是通过以下方法获得的,该方法包括从多个多肽序列中选择单个靶标结合多肽序列。例如,选择方法可以是多个克隆(如,杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的库)中选择独特的克隆。应当理解,所选择的靶标结合序列可以进一步改变,例如以改善对于靶标的亲和力、人源化靶标结合序列、改善其在细胞培养物中的产量、降低其体内免疫原性、产生多特异性抗体等,并且应当理解包含改变的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与多克隆抗体制剂(其典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)不同,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体制剂的优点还在于它们典型地不被其他免疫球蛋白污染。

[0081] 修饰语“单克隆”指示从基本上均一的抗体群体中获得的抗体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制造,包括例如,杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein, *Nature* 256:495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma* 14(3):253-260 (1995), Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如, Clackson等人, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004))、以及用于在具有人类免疫球蛋白基因座或编码人类免疫球蛋白序列的基因的部分或全部的动物中产生人类或人类样抗体的技术(参见例如, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits等人, *Nature* 362:255-258

(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);以及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0082] 本文的单克隆抗体特别地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与对应的衍生自特定种类的抗体或属于特定抗体种类或亚类的序列相同或同源,而该一条或多条链的其余部分是衍生自另一个种类的抗体的或属于另一个抗体种类或亚类的抗体以及此类抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要他们表现出所希望的生物活性(参见,例如美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括 **PRIMATTZED®** 抗体,其中该抗体的抗原结合区衍生自通过例如用目的抗原免疫猕猴产生的抗体。

[0083] “人源化”形式的非人(例如,鼠)抗体是嵌合抗体,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。在一个实施例中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体HVR的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有所希望的特异性、亲和力和/或能力的小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物)的HVR的残基替代。在一些实例中,人免疫球蛋白的FR残基可以被相应的非人残基替代。另外,人源化抗体可以包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。这些修饰可以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个、并且典型地两个可变结构域中的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。有关进一步的细节,参见例如,Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如,Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0084] “人抗体”是这样一种抗体,其具有对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或已经使用如本文披露的任何用于制造人抗体的技术来产生。人抗体的此定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生人抗体。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581(1991)。此外,Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,77(1985);Boerner等人,J.Immunol.147(1):86-95(1991)中描述的方法也可用于制备人单克隆抗体。另请参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。人抗体可以通过将抗原施用至已被修饰以响应抗原攻击而产生此类抗体但其内源基因座已失效的转基因动物(例如,已免疫的xenomice)来制备(参见,例如,有关XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-3562(2006)。

[0085] 如本文所用的,术语“结合”、“特异性结合”或“对……有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,如靶标与抗体之间的结合,其决定了在异质分子(包括生物分子)群体存在时靶标的存在。例如,结合或特异性结合靶标(可以是表位)的抗体是与该靶标结合的抗体,其亲和力、亲合力(avidity)、就绪性和/或持续时间优于与其他靶标的结合。在一个实施例中,抗体与不相关靶标的结合程度小于例如通过放射免疫测定法(RIA)测量的抗体与靶标的结合的约10%。在某些实施例中,特异性结合靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施例中,抗体特异性结合来自不同物种的蛋白质中保守的蛋白质表位。在另一个实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0086] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(如嵌合受体或抗体构建体)对抗原特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所用的,术语“多特异性”表示抗原结合蛋白具有两个或更多个抗原结合位点,其中至少两个结合不同的抗原或表位。如本文所用的,“双特异性”表示抗原结合蛋白具有两种不同的抗原结合特异性。如本文所用的,术语“单特异性”表示具有一个或多个结合位点的抗原结合蛋白,每个结合位点结合相同的抗原或表位。

[0087] 如本文所用的,术语“价”表示抗原结合蛋白中存在指定数目的结合位点。例如,天然抗体或全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。如此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示抗原结合蛋白中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0088] 如本文所用的,“嵌合抗原受体”或“CAR”是指将一种或多种抗原特异性移植到细胞如T细胞上的基因工程化受体。CAR也被称为“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”或“嵌合免疫受体”。在一些实施例中,CAR包含对肿瘤抗原具有特异性的抗体的细胞外可变结构域和T细胞受体和/或其他受体的细胞内信号传导结构域,例如一个或多个共刺激结构域。“CAR-T”是指表达CAR的T细胞。

[0089] 如本文所用的,“T细胞受体”或“TCR”是指内源或重组T细胞受体,该T细胞受体包含与MHC分子中结合的特定抗原肽结合的细胞外抗原结合结构域。在一些实施例中,TCR包含TCR α 多肽链和TCR β 多肽链。在一些实施例中,TCR特异性结合肿瘤抗原。“TCR-T”是指表达重组TCR的T细胞。

[0090] 如本文所用的,“嵌合T细胞受体”或“cTCR”是指包含与特定抗原结合的细胞外抗原结合结构域、TCR复合物的第一亚基的跨膜结构域或其部分和TCR复合物的第二亚基的细胞内信号传导结构域或其部分的工程化受体,其中该TCR复合物的第一或第二亚基是TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链、TCR δ 链、CD3 ϵ 、CD3 δ 或CD3 γ 。cTCR的跨膜结构域和细胞内信号传导结构域可以衍生自TCR复合物的相同亚基或TCR复合物的不同亚基。细胞内结构域可以是全长细胞内信号传导结构域或天然存在的TCR亚基的细胞内结构域的一部分。在一些实施例中,cTCR包含TCR亚基的细胞外结构域或其部分。在一些实施例中,cTCR不包含TCR亚基的细胞外结构域。“eTCR”是指包含CD3 ϵ 的细胞外结构域的cTCR。

[0091] 关于多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列并且引入空位(如果需要的话)以实现最大序列同一性百分比之后,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,候选序列中氨基酸残基与具体的多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的,可以用本领域技术中的多种方式来实现比

对,例如使用公众可得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括需要在被比较序列的全长范围实现最大比对的任何算法。例如,考虑了与本文所述的特定多肽具有至少70%、85%、90%、95%、98%或99%同一性并且优选地表现出基本相同功能的多肽,以及编码此类多肽的多核苷酸。

[0092] 术语“重组”是指生物分子,例如基因或蛋白质,该生物分子(1)已从其天然存在的环境中移除,(2)与在自然界中发现该基因的多核苷酸的全部或部分不相关,(3)与在自然界中未连接的多核苷酸可操作地连接或(4)自然界中不存在。术语“重组”可用于指克隆的DNA分离物、化学合成的多核苷酸类似物或由异源系统生物合成的多核苷酸类似物、以及由此类核酸编码的蛋白质和/或mRNA。

[0093] 术语“表达”是指核酸翻译成蛋白质。蛋白质可以表达并保留在细胞内,成为细胞表面膜的组分,或分泌到细胞外基质或培养基中。

[0094] 术语“宿主细胞”是指支持表达载体的复制或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞(如大肠杆菌)或真核细胞(如酵母)、昆虫细胞、两栖动物细胞或哺乳动物细胞。

[0095] 如本文所用的,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是使用外源核酸转染、转化或转导的细胞。

[0096] 术语“体内”是指在获得细胞的生物体的体内。“离体”或“体外”意指在获得细胞的生物体的体外。

[0097] 术语“细胞”包括原代目标细胞及其子代。

[0098] 如本文所用的,与表达CD3的细胞相关的“激活”是指已被充分刺激以诱导CD3信号传导通路下游效应子功能的可检测增加的细胞的状态,包括但不限于细胞增殖和细胞因子产生。

[0099] 如本文所用的,术语“自体的”意在指源自同一个体的任何材料,其中该材料随后被重新引入该个体。“同种异体的”是指源自相同物种的不同个体的移植物。

[0100] 如本文所用的,“消耗”包括减少至少75%、至少80%、至少90%、至少99%或100%。

[0101] 当提及蛋白质的一部分时,术语“结构域”意在包括构成蛋白质的一种或多种多肽的结构和/或功能相关的部分。例如,免疫细胞受体的跨膜结构域可以指跨越膜的受体的每条多肽链的部分。结构域还可以指单个多肽链的相关部分。例如,单体受体的跨膜结构域可以指跨越膜的受体的单个多肽链的部分。结构域还可以仅包括多肽的单个部分。

[0102] 如本文所用的,术语“分离的核酸”旨在意指基因组、cDNA或合成来源或其某种组合的核酸,由于其来源,“分离的核酸”(1)与多核苷酸(其中,在自然界中发现“分离的核酸”)的全部或部分不相关,(2)与在自然界中不连接的多核苷酸可操作地连接,或(3)不在自然界中作为更大序列的一部分存在。

[0103] 除非另外说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此呈简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包含内含子,其程度为编码所述蛋白质的核苷酸序列可以在某些形式中含有一个或多个内含子。

[0104] 术语“可操作地连接”是指调控序列和核酸序列之间的导致后者的表达的功能性

连接。例如,当第一核酸序列被放置成与第二核酸序列有功能关系时,该第一核酸序列与该第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是毗邻的,且在需要时结合两个蛋白编码区,使其处在同一阅读框中。

[0105] 术语“诱导型启动子”是指启动子的活性可以通过添加或去除一种或多种特定信号来调节的启动子。例如,诱导型启动子可以在一组特定条件下,例如在激活启动子和/或解除启动子抑制的诱导剂或条件的存在下,激活可操作地连接的核酸的转录。

[0106] 如本文所用的,“治疗(treatment或treating)”是用于获得有益的或所希望的结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益的或所希望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状、减少疾病的程度、稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化)、预防或延迟疾病的传播(例如,转移)、预防或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、提供疾病的缓解(部分或全部)、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量、延迟疾病的进展、增加或改善生活质量、增加体重和/或延长存活。“治疗”还涵盖减少疾病的病理结果(例如,癌症中的肿瘤体积)。本发明的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。

[0107] 如本文所用的,“药学上可接受的”或“药理学上可相容的”意指不是生物学上或其他方面不期望的材料,例如,可以将该材料掺入施用于患者的药物组合物中而不会造成任何显著的不期望的生物效应或以有害的方式与含有它的组合物的任何其他组分相互作用。药学上可接受的载剂或赋形剂优选地满足毒理学和制造测试的要求标准和/或包括在美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)编制的Inactive Ingredient Guide中。

[0108] 与一或多种其他药剂“组合”施用包括同时施用和以任何顺序依次施用。

[0109] 术语“同时”在本文中用于指施用两种或更多种治疗剂,其中至少部分施用是在时间上重叠的或其中在施用一种治疗剂的短时间段内施用另一种治疗剂。例如,两种或更多种治疗剂以不超过约15分钟(例如不超过约10、5或1分钟中的任一个)的时间间隔施用。

[0110] 术语“依次”在本文中用于指两种或更多种治疗剂的施用,其中一种或多种治疗剂的施用在停止一种或多种其他药剂的施用后继续。例如,将两种或更多种药剂的施用以超过约15分钟,如约20、30、40、50或60分钟,1天、2天、3天、1周、2周或1个月或更长中的任一个的时间间隔施用。

[0111] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人,家畜和农畜,以及动物园、运动或宠物动物,如狗、马、猫、牛等。

[0112] 应当理解,本文所述的发明的实施例包括“由实施例组成”和/或“基本上由实施例组成”。

[0113] 本文对“约”值或参数的引用包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0114] 如本文所用的,对“不是”值或参数的提及通常意指并描述“不同于”值或参数。例如,方法不是用于治疗X型癌症,意味着该方法用于治疗不同于X型的癌症。

[0115] 如本文和所附权利要求中所用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文明确地指示其他的情况。

[0116] 如本文所用的,术语“和/或”短语如“A和/或B”旨在包括A和B两者;A或B;A(单独);和B(单独)。同样,如本文所用的,术语“和/或”短语如“A、B和/或C”旨在涵盖以下实施例中的每个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

包含识别分子的工程化免疫细胞

[0117] 本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子。在一方面,该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,并且该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在另一方面,该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,并且该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

[0118] 本文所述的识别分子可以是工程化免疫细胞的表面上存在的任何含有结合部分的分子。在一些实施例中,该识别分子是包含含有结合部分的细胞外结构域、跨膜结构域和信号传导结构域的免疫细胞受体分子。合适的免疫细胞受体包括,例如,嵌合抗原受体和嵌合T细胞受体。

[0119] 在一些实施例中,该结合部分是抗体或其片段。在一些实施例中,该结合部分是肽配体。

[0120] 在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的例如约0.5倍以上(例如约1倍以上、约1.5倍、2倍或更多倍以上)。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约2倍(例如,不超过约1.5倍或不超过约1倍)。

[0121] 在一些实施例中,该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约30 Å(例如,至少约40、60、90、120或更多Å)。在一些实施例中,该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约120 Å(例如,不超过约100、90、80、70或60 Å)。

[0122] 在一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约100个氨基酸,包括例如长度是至少约110、120、130、140、150、160、170、175、180、190或200个氨基酸。在一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个或八个或更多个IgG样结构域。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体。

[0123] 本文所述的合适的靶分子包括但不限于CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。靶分子在其细胞外结构域中可以具有两个或更多个重复(例如,Ig样结构域)。

[0124] CD4(也称为分化簇4)是免疫细胞(特别是CD4⁺或辅助T细胞)表面上发现的糖蛋白。CD4是HIV-1进入和感染所需的重要细胞表面分子。HIV-1进入由病毒包膜(Env)糖蛋白gp120与T细胞受体CD4的结构域1(D1)相互作用触发。随着HIV感染的进展,更多数量的CD4⁺T细胞被病毒靶向和破坏,导致免疫系统日益受损;因此,将CD4⁺T细胞计数用作个体中HIV/AIDS进展和阶段的代表。此外,HIV基因产物Env、Vpu和Nef参与HIV感染期间CD4的下调(参见Tanaka,M.,等人Virology(2003)311(2):316-325)。

[0125] CD4是免疫球蛋白超家族的成员,并且具有四个细胞外免疫球蛋白结构域。如图12中所示,CD4的细胞外结构域包括(从N-末端至C-末端)Ig样V型结构域(“结构域1”或D1;氨

氨基酸残基26-125)、Ig样C2-1型结构域(“结构域2”或D2;氨基酸残基126-203)、Ig样C2-2型结构域(“结构域3”或D3;氨基酸残基204-317)和Ig样C2-3型结构域(“结构域4”或D4;氨基酸残基318-374),其中氨基酸残基位置基于人CD4(UniProtKB ID:P01730),例如,SEQ ID NO:45的全长氨基酸序列。D1和D3显示了与免疫球蛋白可变结构域的相似性,而D2和D4显示了与免疫球蛋白恒定结构域的相似性。

[0126] CD22(也称为B细胞受体CD22)是细胞表面受体,结合唾液酸化的糖蛋白(例如CD45)并介导B细胞/B细胞相互作用。如图12中所示,CD22的细胞外结构域具有7个Ig样结构域包括(从N-末端至C-末端)Ig样V型结构域(“结构域1”或“D1”;氨基酸残基20-138)、Ig样C2-1型结构域(“结构域2”或“D2”;氨基酸残基143-235)、Ig样C2-2型结构域(“结构域3”或“D3”;氨基酸残基242-326)、Ig样C2-3型结构域(“结构域4”或“D4”;氨基酸残基331-416)、Ig样C2-4型结构域(“结构域5”或“D5”;氨基酸残基419-500)、Ig样C2-5型结构域(“结构域6”或“D6”;氨基酸残基505-582)和Ig样C2-6型结构域(“结构域7”或“D7”;氨基酸残基593-676),其中氨基酸残基位置基于人CD22(UniProtKB ID:P20273),例如,SEQ ID NO:66的全长氨基酸序列。

[0127] CD21(也称为补体受体2型(CR2))是补体C3、人B细胞和T细胞上的EB(Epstein-Barr)病毒和HNRNPU的受体。CD21参与B淋巴细胞激活。CD21的细胞外结构域具有15个Sushi结构域,包括(从N-末端至C-末端)Sushi 1(氨基酸残基21-84)、Sushi 2(氨基酸残基89-148)、Sushi 3(氨基酸残基152-212)、Sushi 4(氨基酸残基213-273)、Sushi 5(氨基酸残基274-344)、Sushi 6(氨基酸残基349-408)、Sushi 7(氨基酸残基409-468)、Sushi 8(氨基酸残基469-524)、Sushi 9(氨基酸残基525-595)、Sushi 10(氨基酸残基600-659)、Sushi 11(氨基酸残基660-716)、Sushi 12(氨基酸残基717-781)、Sushi 13(氨基酸残基786-845)、Sushi 14(氨基酸残基849-909)和Sushi 15(氨基酸残基910-970),其中氨基酸残基位置基于人CD21(UniProtKB ID:P20023)的全长氨基酸序列。

[0128] CD30(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员8(TNFRSF8))是TNFSF8/CD30L的受体。CD30可以在调节细胞生长和转化激活的淋巴母细胞中发挥作用。它通过激活NF- κ -B来调节基因表达。CD30的细胞外结构域具有6个TNFR-Cys结构域,包括(从N-末端至C-末端)TNFR-Cys结构域1(氨基酸残基28-66)、TNFR-Cys结构域2(氨基酸残基68-106)、TNFR-Cys结构域3(氨基酸残基107-150)、TNFR-Cys结构域4(氨基酸残基205-241)、TNFR-Cys结构域5(氨基酸残基243-281)和TNFR-Cys结构域6(氨基酸残基282-325),其中氨基酸残基位置基于人CD30(UniProtKB ID:P28908)的全长氨基酸序列。

[0129] ROR1(也称为无活性酪氨酸蛋白激酶跨膜受体ROR1)是配体WNT5A(其激活下游NF κ B信号传导通路并可能导致抑制WNT3A介导的信号传导)的受体。ROR1的细胞外结构域包括各种亚结构域,包括(从N-末端至C-末端)Ig样C2型结构域(氨基酸残基42-147)、FZ结构域(氨基酸残基165-299)和Kringle结构域(氨基酸残基312-391),其中氨基酸残基位置基于人ROR1(UniProtKB ID:Q01973)的全长氨基酸序列。

[0130] CD5(也称为T细胞表面糖蛋白CD5)可以用作调节T细胞增殖中的受体。CD5的细胞外结构域具有3个SRCR结构域,包括(从N-末端至C-末端)SRCR1(氨基酸残基35-133)、SRCR 2(氨基酸残基159-268)和SRCR 3(氨基酸残基276-368),其中氨基酸残基位置基于人CD5(UniProtKB ID:P06127)的全长氨基酸序列。

[0131] CD20 (也称为B淋巴细胞抗原CD20或MS4A1) 是B淋巴细胞特异性膜蛋白,其在B淋巴细胞发育、分化和激活所必需的细胞钙内流的调节中发挥作用。CD20在氨基酸残基79-84和142-188处具有两个细胞外结构域,其中氨基酸残基位置基于人CD20 (UniProtKB ID: P11836) 的全长氨基酸序列。

[0132] 靶细胞可以是表达靶分子(如本文所述的示例性靶分子)的任何细胞。在一些实施例中,该靶细胞是免疫细胞。在一些实施例中,该靶细胞是肿瘤细胞。

包含与靶分子细胞外结构域远端部分特异性结合的结合部分的识别分子(“远端部分识别分子”)

[0133] 在一些实施例中,本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域近端部分结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比,该工程化免疫细胞能够杀伤至少2倍,如至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约10倍或更多的靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

[0134] 结合部分可以是,但不限于sdAb (例如,VHH)、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

[0135] 我们已经证明,含有抗CD4 D1免疫细胞受体(即具有特异性识别CD4的结构域1的结合部分的免疫细胞受体)的工程化免疫细胞能杀伤自己。我们已经进一步证明,含有抗CD22 D1-4免疫细胞受体(即具有特异性识别CD22的结构域1-4的结合部分的免疫细胞受体)的工程化免疫细胞也能杀伤自己。不受理论束缚,据信工程化免疫细胞中的抗CD4 D1部分和抗CD22 D1-4部分可能与同一细胞上的内在CD4或CD22相距太远而无法阻断CD4的结构域1或CD22的结构域1-4分别被另一工程化免疫细胞识别,从而导致杀伤工程化免疫细胞。类似地,具有与靶分子的远端部分结合的结合部分的其他识别分子将具有与本文所述的抗CD4 D1和抗CD22 D1-4分子相同的特性。因此,这些识别分子对自体疗法(其中希望去除表达免疫细胞受体的自体细胞)特别有用。

[0136] 在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸的区域(例如表位)结合。“细胞外结构域的C-末端”是指紧邻细胞外结构域的C-末端,也称为靶分子上的“近膜残基”。当靶分子是跨膜受体时,紧随近膜残基的是跨膜结构域中的第一个残基。远端部分-识别分子与离靶分子近膜残基足够远的区域结合,使得当与靶分子共表达时,它不能阻止其他结合部分与靶分子的结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150或更多个氨基酸的区域(例如表位)结合。

[0137] 在一些实施例中,该结合部分与距该靶分子的细胞外结构域的N-末端约130个氨基酸(如约120、110、100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与落在以下区域中的任何一个或多个内的表位结合:该靶分子的细胞外结构域的N-末端的氨基酸残基26-125、26-46、46-66、66-86、86-106和106-125。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个氨基酸内的区域(例如表位)结合。

[0138] 在一些实施例中,该靶分子包含三个或更多个Ig样结构域,并且该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的第一个Ig样结构域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域(例如,表位)结合。

[0139] 在一些实施例中,该识别分子的结合部分与约0.1pM至约500nM之间(如0.1pM、1.0pM、10pM、50pM、100pM、500pM、1nM、10nM、50nM、100nM或500nM中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的靶分子结合。

抗CD22 D1-4结合部分

[0140] 在一些实施例中,该抗CD22 D1-4识别分子的CD22结合部分以约0.1pM至约500nM之间(如0.1pM、1.0pM、10pM、50pM、100pM、500pM、1nM、10nM、50nM、100nM或500nM中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的K_d与CD22的结构域1-4(D1-4)结合。在一些实施例中,该CD22是人CD22。在一些实施例中,该CD22包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与CD22的D1中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与CD22的D2中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与CD22的D3中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与CD22的D4中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与桥接CD22的D1-D4之间的任何两个或更多个结构域的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与SEQ ID NO:66的氨基酸残基20-416内的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4结合部分与落在以下区域中的任何一个或多个内的表位结合:SEQ ID NO:66的氨基酸残基20-138、143-235、242-326和331-416。在一些实施例中,该CD22是人CD22。

[0142] 在一些实施例中,该CD22结合部分与距CD22细胞外结构域的C-末端至少约50个氨基酸残基(如至少约60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240或260个氨基酸残基中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的表位结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与距CD22的细胞外结构域的N-末端约400、380、360、340、320、300、280、260、240、220、200、180、160、140、120、100、90、80、70、60、50或更少个氨基酸残基中的任一个(包括这些值之间的任何值和范围)内的表位结合。

[0143] 在一些实施例中,该CD22结合部分与CD22分子的表位(该表位距表达CD22的靶细胞的膜至少约30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260或更多Å)结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与CD22分子的表位(该表位距表达CD22的靶细胞的膜约30-40、40-80、80-120、120-160、160-200、200-240、240-270、30-80、30-120、60-120、60-160、60-100、90-120、100-200、100-150或30-270 Å)结合。

[0144] 在一些实施例中,D1-D4中CD22表位到工程化免疫细胞膜的距离比CD22结合部分到工程化免疫细胞膜的距离大约0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍或更多,包括这些值之间的任何值和范围。

[0145] 在一些实施例中,该CD22结合部分衍生自RFB4或其人源化变体,例如,如US 9139649中所述。在一些实施例中,该CD22结合部分与RFB4竞争结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与和RFB4相同或重叠的表位结合。在一些实施例中,该CD22结合部分包含RFB4或其人源化变体的一个、两个、三个、四个、五个或六个重链和轻链互补决定区(CDR)。在一些实施例中,该CD22结合部分包含RFB4或其人源化变体的重链可变结构域(VH)和/或

轻链可变结构域 (VL)。

[0146] 在一些实施例中,该CD22结合部分衍生自依帕珠单抗或其生物类似物,例如,如US 7074403或US 9139649中所述。在一些实施例中,该CD22结合部分与依帕珠单抗竞争结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与和依帕珠单抗相同或重叠的结合表位结合。在一些实施例中,该CD22结合部分包含依帕珠单抗的一个、两个、三个、四个、五个或六个重链和轻链互补决定区 (CDR)。在一些实施例中,该CD22结合部分包含依帕珠单抗的重链可变结构域 (VH) 和/或轻链可变结构域 (VL)。

[0147] 在一些实施例中,该抗CD22 D1-4识别分子的CD22结合部分与特异性结合CD22的结构域1-4 (D1-4) 内的表位的参考抗体 (“抗CD22 D1-4抗体”) 竞争结合,或与CD22的D1-4中的表位 (该表位与参考抗CD22 D1-4抗体的结合表位重叠) 结合。在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链和轻链CDR序列。在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22D1-4抗体的VH序列具有至少约80% (如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列同一性的VH序列和/或与参考抗CD22 D1-4抗体的轻链可变序列具有至少约80% (如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 的序列同一性的VL序列。在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链和轻链可变序列。

[0148] 已知特异性识别CD22的结构域1-4的任何抗体均可以用作参考抗体,包括但不限于hLL2 (依帕珠单抗)、奥英妥珠单抗 (Pfizer, Groton, Conn.)、BL22 (Cambridge Antibody Technology Group, Cambridge, England)、HA22 (Cambridge Antibody Technology Group, Cambridge, England)、HB22.7 (Duke University, Durham, N.C.) 和RFB4 (例如, Invitrogen, Grand Island, N.Y.; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.)。

[0149] 在一些实施例中,该参考抗体是RFB4或其人源化变体。在一些实施例中,该参考抗CD22 D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链CDR1 (HC-CDR1)、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2 (HC-CDR2)、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链CDR3 (HC-CDR3)、含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的轻链CDR1 (LC-CDR1)、含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的轻链CDR2 (LC-CDR2) 和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链CDR3 (LC-CDR3)。在一些实施例中,该参考抗CD22 D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的重链可变结构域 (VH) 和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的轻链可变结构域 (VL)。

[0150] 在一些实施例中,该CD22结合部分包含VH和VL,该VH包含含有SEQ ID NO:67的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:68的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:69的HC-CDR3;该VL包含含有SEQ ID NO:70的LC-CDR1、含有SEQ ID NO:71的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:72的LC-CDR3。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有SEQ ID NO:73的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的VH和含有SEQ ID NO:74的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的VL。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有与SEQ ID NO:73具有至少约80% (例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个) 的序列同一性的氨基酸序列的VH,和含有与SEQ ID NO:74具有至少约80% (例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个) 的序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有SEQ ID NO:73的VH和含有SEQ ID NO:74的VL。

包含与靶分子细胞外结构域近端部分特异性结合的结合部分的识别分子 (“近端

部分识别分子”)

[0151] 在一些实施例中,本申请提供了工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域远端结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比,该工程化免疫细胞杀伤不超过约20%的靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

[0152] 结合部分可以是,但不限于sdAb(例如,VHH)、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

[0153] 我们已经证明,含有抗CD4 D2/D3免疫细胞受体(即具有特异性识别CD4的结构域2/3的结合部分的免疫细胞受体)的工程化免疫细胞不能杀伤自己。我们已经进一步证明,含有抗CD22 D5-7免疫细胞受体(即具有特异性识别CD22的结构域5-7的结合部分的免疫细胞受体)的工程化免疫细胞也不能杀伤自己。不受理论束缚,据信工程免疫细胞中的抗CD4 D2/D3部分和抗CD22 D5-7部分可以在距同一细胞上的内在CD4或CD22的适当距离内,以阻断CD4的D2/3或CD22的D5-7分别被另一工程化免疫细胞识别,从而保护工程化免疫细胞免受攻击。类似地,具有与靶分子的近端部分结合的结合部分的其他识别分子将具有与本文所述的抗CD4 D2/D3和抗CD22 D5-7分子相同的特性。因此,这些识别分子对同种异体疗法(其中希望包含识别分子的细胞持续存在于整个治疗中)特别有用。

[0154] 在一些实施例中,该结合部分与在距靶分子的细胞外结构域的N-末端约80个(如约85、90、100、110、120或更多个中的任一个)氨基酸的区域外的部分结合。

[0155] 在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约120(如115、110、105或102)个氨基酸内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约120(如102、100、90、80、70、60或50)个氨基酸内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个氨基酸内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与落在以下区域(例如,表位)中的任何一个或多个内的表位结合:该靶分子细胞外结构域的C-末端的氨基酸残基26-125、26-46、46-66、66-86、86-106和106-125。

[0156] 在一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个Ig样结构域并且该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个Ig样结构域并且该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域(例如表位)结合。

[0157] 在一些实施例中,该识别分子的结合部分与约0.1pM至约500nM之间(如0.1pM、1.0pM、10pM、50pM、100pM、500pM、1nM、10nM、50nM、100nM或500nM中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的靶分子结合。

抗CD22 D5-7结合部分

[0158] 在一些实施例中,该抗CD22 D5-7识别分子的CD22结合部分以约0.1pM至约500nM之间(如0.1pM、1.0pM、10pM、50pM、100pM、500pM、1nM、10nM、50nM、100nM或500nM中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的K_d与CD22的D5-7结合。在一些实施例中,该CD22是

人CD22。在一些实施例中,该CD22包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施例中,该抗CD22 D5-7结合部分与CD22的D5中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7结合部分与CD22的D6中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7结合部分与CD22的D7中的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7结合部分与桥接CD22的D5-D7之间的任何两个或更多个结构域的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7结合部分与SEQ ID NO:66的氨基酸残基419-676内的表位结合。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7免疫细胞受体的CD22结合部分与落在以下区域中的任何一个或多个内的表位结合:SEQ ID NO:66的氨基酸残基419-500、505-582和593-676。

[0160] 在一些实施例中,该CD22结合部分与距CD22细胞外结构域的N-末端至少约80个氨基酸残基(如至少约90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400或更多个氨基酸残基中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的表位结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与距CD22的细胞外结构域的C-末端约260、240、220、200、180、160、140、120、100、90、80、70、60、50或更少个氨基酸残基中的任一个(包括这些值之间的任何值和范围)的表位结合。

[0161] 在一些实施例中,该CD22结合部分与CD22分子的表位(该表位距表达CD22的靶细胞的膜不超过约140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30或更少Å)结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与CD22分子的表位(该表位距表达CD22的靶细胞的膜约0-30、0-40、0-80、0-120、30-60、60-80、80-120、40-80或30-120 Å)结合。

[0162] 在一些实施例中,D5-D7中CD22表位到工程化免疫细胞膜的距离不超过CD22结合部分到工程化免疫细胞膜的距离的约2倍、1.75倍、1.5倍、1.25倍、1倍或更少,包括这些值之间的任何值和范围。

[0163] 在一些实施例中,该CD22结合部分衍生自m971或m972,例如,如US 10494435中所述。在一些实施例中,该CD22结合部分与m971竞争结合。在一些实施例中,该CD22结合部分与和m971相同或重叠的表位结合。在一些实施例中,该CD22结合部分包含m971的一个、两个、三个、四个、五个或六个重链和轻链互补决定区(CDR)。在一些实施例中,该CD22结合部分包含m971的VH和/或VL。

[0164] 在一些实施例中,该抗CD22 D5-7识别分子的CD22结合部分与特异性结合CD22的D5-7内的表位的参考抗体(“抗CD22 D5-7抗体”)竞争结合,或与CD22的D5-7中的表位(该表位与参考抗CD22 D5-7抗体的结合表位重叠)结合。

在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的重链和轻链CDR序列。在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体的VH序列具有至少约80%(如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的VH序列和/或与参考抗CD22 D5-7抗体的轻链可变序列具有至少约80%(如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的VL序列。在一些实施例中,该CD22结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的重链和轻链可变序列。

[0165] 已知特异性识别CD22的结构域D5-7的任何抗体均可以用作参考抗体,包括但不限于m971和m972。在一些实施例中,该参考抗体是m971。在一些实施例中,该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HC-CDR3、含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的

LC-CDR1、含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的LC-CDR3。在一些实施例中,该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:82的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VL。

[0166] 在一些实施例中,该CD22结合部分包含VH和VL,该VH包含含有SEQ ID NO:76的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:77的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:78的HC-CDR3;该VL包含含有SEQ ID NO:79的LC-CDR1、含有SEQ ID NO:80的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:81的LC-CDR3。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有SEQ ID NO:82的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的VH和含有SEQ ID NO:83的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的VL。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有与SEQ ID NO:82具有至少约80% (例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个) 的序列同一性的氨基酸序列的VH,和含有与SEQ ID NO:83具有至少约80% (例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个) 的序列同一性的氨基酸序列的VL。在一些实施例中,该CD22结合部分包含含有SEQ ID NO:82的VH和含有SEQ ID NO:83的VL。

识别分子的结构

[0167] 识别分子可以是工程化免疫细胞的表面上存在的任何含有结合部分的分子。在一些实施例中,该工程化免疫细胞包含编码识别分子或其部分的一种或多种核酸。此节中的讨论对于远端部分识别分子和近端部分识别分子都适用。

[0168] 在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如包含含有结合部分(如,上节中所述的结合部分)的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的免疫细胞受体。在一些实施例中,该细胞外结构域中的结合部分与该跨膜结构域直接或间接融合。例如,识别分子(在此上下文中也称为免疫细胞受体)可以是单个多肽,其包含(从N-末端到C-末端):结合部分、任选的接头(例如铰链序列或TCR亚基的细胞外结构域)、跨膜结构域、任选的接头(例如共刺激结构域)和细胞内信号传导结构域。

[0169] 在一些实施例中,该细胞外结构域中的结合部分与包含该跨膜结构域的多肽非共价地结合。这可以例如通过使用结合对的两个成员(一个与结合部分融合,另一个与跨膜结构域融合)来实现。这两个组分通过结合对的两个成员的相互作用而聚在一起。例如,识别分子(在此上下文中也称为免疫细胞受体)可以包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含:
i) 含有该结合部分和结合对的第一成员的第一多肽;和
ii) 含有该结合对的第二成员的第二多肽,其中该第一成员和该第二成员彼此非共价地结合,并且其中该结合对的第二成员与该跨膜结构域直接或间接融合。合适的结合对包括但不限于亮氨酸拉链、生物素/链霉亲和素、MIC配体/iNKG2D等。参见Cell 173,1426-1438,Oncoimmunology.2018;7(1):e1368604,US 10259858 B2。在一些实施例中,该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽融合。

[0170] 在一些实施例中,该识别分子单价的,即具有一个结合部分。在一些实施例中,该识别分子是多价的,即具有超过一个结合部分。

[0171] 本文所述的识别分子可以是单特异性的。在一些实施例中,该识别分子是多特异性的。例如,在一些实施例中,该识别分子的细胞外结构域包含特异性识别第二抗原的第二抗原结合部分。该第二抗原结合部分可以是,例如,sdAb(例如,VHH)、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。该结合部分与该第二抗原结合部分串联连接。在一些实施例中,该结合部分在

该第二抗原结合部分的N-末端。在一些实施例中,该结合部分在该第二抗原结合部分的C-末端。在一些实施例中,该结合部分与该第二抗原结合部分经由接头连接。在一些实施例中,该第二抗原结合部分与T细胞表面的抗原(如CCR5)特异性结合。

[0172] 在一些实施例中,该识别分子(在此上下文中称为免疫细胞受体)的跨膜结构域包含一个或多个源自例如CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

[0173] 在一些实施例中,该识别分子(在此上下文中称为免疫细胞受体)的细胞内信号传导结构域包含功能性初级免疫细胞信号传导序列,这些功能性初级免疫细胞信号传导序列包括但不限于在选自以下组成的组蛋白质中发现的那些:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。“功能性”初级免疫细胞信号传导序列是当与合适的受体可操作地偶联时能够转导免疫细胞激活信号的序列。“非功能性”初级免疫细胞信号传导序列(可能包含初级免疫细胞信号传导序列的片段或变体)不能转导免疫细胞激活信号。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域缺乏功能性初级免疫细胞信号传导序列。在一些实施例中,该细胞内信号传导结构域缺乏任何初级免疫细胞信号传导序列。

CAR

[0174] 在一些实施例中,该识别分子(在此上下文中称为免疫细胞受体)是嵌合抗原受体(“CAR”)。此节中的讨论对于远端部分识别分子和近端部分识别分子都适用。

[0175] 在一些实施例中,该CAR的跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些实施例中,该CAR的跨膜结构域衍生自CD8 α 。在一些实施例中,该CAR的跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该CAR的跨膜结构域具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0176] 在一些实施例中,该CAR的细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该CAR的初级细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ζ 。在一些实施例中,该CAR的初级细胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该CAR的初级细胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO:39的序列。

[0177] 在一些实施例中,该CAR的细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激信号传导结构域。在一些实施例中,该CAR的共刺激信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83的配体及其组合。在一些实施例中,该CAR的共刺激信号传导结构域包含4-1BB的胞内结构域。在一些实施例中,该CAR的共刺激信号传导结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该CAR的共刺激信号传导结构域具有SEQ ID NO:38的序列。

[0178] 在一些实施例中,该CAR进一步包含位于该细胞外结构域的C-末端与该跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。在一些实施例中,该铰链结构域衍生自CD8 α 。在一些实施例

中,该铰链结构域衍生自免疫球蛋白(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和IgD,例如IgG4 CH2-CH3)。在一些实施例中,该铰链结构域包含与SEQ ID NO:40具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该铰链结构域具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施例中,提供了包含与SEQ ID NO:75或84具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更多中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列的CAR或多肽。在一些实施例中,提供了包含SEQ ID NO:75或84的CAR或多肽。

cTCR

[0180] 在一些实施例中,该免疫细胞受体是嵌合T细胞受体(“cTCR”)。此节中的讨论对于远端部分识别分子和近端部分识别分子都适用。

[0181] 在一些实施例中,本文所述的免疫细胞受体是嵌合TCR受体(“cTCR”)。cTCR典型地包含与全长或部分TCR亚基,如TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 直接或间接连接(例如,融合)的嵌合受体(CR)抗原结合结构域。融合多肽可以与其他TCR亚基一起并入功能性TCR复合物中,并赋予该TCR复合物抗原特异性。在一些实施例中,该结合结构域直接或间接地连接(例如融合)全长或部分CD3 ϵ 亚基(称为“eTCR”)。该cTCR的细胞内信号传导结构域可以衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。该cTCR的跨膜结构域还可以衍生自TCR亚基。在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域和跨膜结构域衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域和跨膜结构域衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该结合结构域可以与该TCR亚基(或其部分)经由接头(如GS接头)融合。在一些实施例中,该cTCR进一步包括TCR亚基的细胞外结构域或其部分,该TCR亚基可以与细胞内信号传导结构域和/或跨膜结构域所衍生的TCR亚基相同或不同。

[0182] 在一些实施例中,该cTCR的跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的跨膜结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。在一些实施例中,该cTCR的跨膜结构域衍生自CD3 ϵ 的跨膜结构域。在一些实施例中,该cTCR的跨膜结构域包含与SEQ ID NO:41具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该cTCR的跨膜结构域具有SEQ ID NO:41的序列。

[0183] 在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的细胞内信号传导结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ϵ 的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:42具有至少约80%(例如,至少约85%、90%、95%、98%、99%或更高中的任一个)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,该cTCR的细胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO:42的序列。

[0184] 在一些实施例中,该cTCR的跨膜结构域和细胞内信号传导结构域衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,该cTCR进一步包含TCR亚基的细胞外序列的至少一部分,并且在一些实施例中,TCR细胞外序列可以衍生自与跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域相同的TCR亚基。在一些实施例中,该cTCR包含全长TCR亚基。例如,在一些实施例中,该cTCR包含与TCR亚基(例如,CD3 ϵ)的N-末端融合(直接或间接)的结合结构域。

结合部分

[0185] 本文所述的结合部分可以是抗体部分或特异性识别靶分子的细胞外结构域中的

一部分的配体。此节中的讨论对于远端部分识别分子和近端部分识别分子都适用。

[0186] 在一些实施例中,该结合部分以如下亲和力或 K_d 与靶分子特异性结合:a)该亲和力是该结合部分对其他分子的结合亲和力的至少约10倍(包括例如至少约10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000或更多倍中的任何一个),或b)该 K_d 不超过该结合部分与其他分子结合的 K_d 的约1/10(如不超过约1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/75、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/750、1/1000或更少中的任何一个)。结合亲和力可以通过本领域已知的方法来确定,如ELISA、荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀测定(RIA)。 K_d 可以通过本领域已知的方法来确定,如利用例如Biacore仪器的表面等离子共振(SPR)测定或利用例如Sapidyne仪器的动力学排斥测定(KinExA)。

[0187] 在一些实施例中,该结合部分选自自由以下组成的组:Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、单域抗体(sdAb)和与靶分子特异性结合的肽配体。

[0188] 在一些实施例中,该结合部分是抗体部分。在一些实施例中,该抗体部分是单特异性的。在一些实施例中,该抗体部分是多特异性的。在一些实施例中,该抗体部分是双特异性的。在一些实施例中,该抗体部分是串联scFv、双抗体(Db)、单链双抗体(scDb)、双亲和重靶向(DART)抗体、双可变结构域(DVD)抗体、化学交联抗体、异多聚体抗体或异源缀合抗体。在一些实施例中,该抗体部分是scFv。在一些实施例中,该抗体部分是单域抗体(sdAb)。在一些实施例中,该抗体部分是VHH。在一些实施例中,该抗体部分是全人的、用人抗体框架区半合成的或人源化的。

[0189] 在一些实施例中,该抗体部分包含衍生自一个或多个抗体部分(如本文披露的参考抗体中的任一个)的特定CDR序列或包含一个或多个氨基酸取代的此类序列的某些变体。在一些实施例中,变体序列中的氨基酸取代基本上不会降低抗原结合结构域结合靶抗原的能力。还考虑了显著提高靶抗原结合亲和力或影响一些其他特性(如特异性和/或与靶抗原的相关变体的交叉反应性)的改变。

[0190] 在一些实施例中,该结合部分以约0.1pM至约500nM之间(如0.1pM、1.0pM、10pM、50pM、100pM、500pM、1nM、10nM、50nM、100nM或500nM中的任一个,包括这些值之间的任何值和范围)的 K_d 与靶分子结合。

示例性抗CD22免疫细胞受体

[0191] 在一些实施例中,提供了抗CD22 D1-4免疫细胞受体,其包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含抗CD22 D1-4免疫细胞受体的工程化免疫细胞,该免疫细胞受体包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和,iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D1-4免疫细胞受体的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,其中该抗CD22免疫细胞受体包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和,iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

[0192] 在一些实施例中,提供了抗CD22 D5-7免疫细胞受体,其包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和iii)细胞内信号

传导结构域。在一些实施例中,提供了包含抗CD22 D5-7免疫细胞受体的工程化免疫细胞,该免疫细胞受体包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和,iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D5-7免疫细胞受体的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,其中该抗CD22 D5-7免疫细胞受体包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域;ii)跨膜结构域和,iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

[0193] 在一些实施例中,本文所述的抗CD22免疫细胞受体是嵌合抗原受体(“CAR”)。因此,例如,在一些实施例中,提供了抗CD22 D1-4 CAR,其包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,提供了包含抗CD22 D1-4 CAR的工程化免疫细胞,该抗CD22 D1-4 CAR包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D1-4 CAR的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,该抗CD22 D1-4 CAR包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

[0194] 在一些实施例中,提供了抗CD22 D5-7 CAR,其包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,提供了包含抗CD22D5-7 CAR的工程化免疫细胞,该抗CD22D5-7 CAR包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D5-7 CAR的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,该抗CD22 D5-7 CAR包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);

iv) 细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ξ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

[0195] 在一些实施例中,该抗CD4免疫细胞受体是嵌合T细胞受体(“cTCR”)。在一些实施例中,提供了抗CD22 D1-4 cTCR,其包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D1-4抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含抗CD22 D1-4 cTCR的工程化免疫细胞,该抗CD22 D1-4 cTCR包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D1-4抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D1-4 cTCR的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,该抗CD22 D1-4 cTCR包含:i)含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D1-4抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该抗CD22 D1-4 cTCR包含与全长CD3 ϵ 的N-末端融合的CD22结合结构域。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

[0196] 在一些实施例中,提供了抗CD22 D5-7 cTCR,其包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含抗CD22 D5-7 cTCR的工程化免疫细胞,该抗CD22 D5-7 cTCR包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,提供了包含编码抗CD22 D5-7 cTCR的一种或多种核酸的工程化免疫细胞,该抗CD22 D5-7 cTCR包含:i)含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分(例如,抗CD22 D5-7抗体部分,如scFv或sdAb)的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基

的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3g。在一些实施例中,该抗CD22 D5-7 cTCR包含与全长CD3g的N-末端融合的CD22结合结构域。在一些实施例中,该工程化免疫细胞进一步包含一种或多种共受体(如细胞因子受体)或编码一种或多种共受体(如细胞因子受体)的一种或多种的核酸。

工程化免疫细胞

[0197] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸(如约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200或更多个氨基酸中的任一个)的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120个氨基酸(如约110、100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0198] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含含有三个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0199] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含免疫细胞受体,该免疫细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该免疫细胞受体。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸(如约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200或更多个氨基酸中的任一个)的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120个氨基酸(如约110、100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜

受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0200] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含免疫细胞受体,该免疫细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有三个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该免疫细胞受体。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0201] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该CAR。在一些实施例中,该CAR包含:i) 含有该结合部分的细胞外结构域;ii) 任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii) 跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv) 细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v) 细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸(如约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200或更多个氨基酸中的任一个)的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120个氨基酸(如约110、100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0202] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有三个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该CAR。在一些实施例中,该CAR包含:i) 含有该结合部分的细胞外结构域;ii) 任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii) 跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv) 细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v) 细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个

Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0203] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合T细胞受体(cTCR),该嵌合T细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该cTCR。在一些实施例中,该cTCR包含:i) 含有该结合部分的细胞外结构域;ii) 任选的接头(如GS接头);iii) 任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv) 衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v) 衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该cTCR包含与全长CD3g的N-末端融合的结合部分。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸(如约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200或更多个氨基酸中的任一个)的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120个氨基酸(如约110、100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0204] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合T细胞受体(cTCR),该嵌合T细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有三个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该cTCR。在一些实施例中,该cTCR包含:i) 含有该结合部分的细胞外结构域;ii) 任选的接头(如GS接头);iii) 任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv) 衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v) 衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该cTCR包含与全长CD3 ϵ 的N-末端融合的结合部分。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域外的区域结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域内的区域结合。在一

些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0205] 在另一方面,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸(如约90、100、110、120或更多个氨基酸中的任一个)的区域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸(例如约100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0206] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含含有两个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0207] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含免疫细胞受体,该免疫细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该免疫细胞受体。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸(如约90、100、110、120或更多个氨基酸中的任一个)的区域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸(例如约100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21

(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0208] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含免疫细胞受体,该免疫细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有两个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该免疫细胞受体。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0209] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该CAR。在一些实施例中,该CAR包含:i)含有该结合部分的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸(如约90、100、110、120或更多个氨基酸中的任一个)的区域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸(例如约100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0210] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有两个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该CAR。在一些实施例中,该CAR包含:i)含有该结合部分的细胞外结构域;ii)任选的铰链序列(如衍生自CD8的铰链序列);iii)跨

膜结构域(如CD8跨膜结构域);iv)细胞内共刺激结构域(如衍生自4-1BB或CD28的共刺激结构域),和v)细胞内信号传导结构域(如衍生自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域)。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0211] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合T细胞受体(cTCR),该嵌合T细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该cTCR。在一些实施例中,该cTCR包含:i)含有该结合部分的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该cTCR包含与全长CD3 ϵ 的N-末端融合的结合部分。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸(如约90、100、110、120或更多个氨基酸中的任一个)的区域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约102个氨基酸(例如约100、90、80、70、60、50、40或30个氨基酸中的任一个)内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自由以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

[0212] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含嵌合T细胞受体(cTCR),该嵌合T细胞受体包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中该靶分子包含含有两个或更多个Ig样结构域的细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该cTCR。在一些实施例中,该cTCR包含:i)含有该结合部分的细胞外结构域;ii)任选的接头(如GS接头);iii)任选的TCR亚基的细胞外结构域或其部分;iv)衍生自TCR亚基的跨膜结构域,和v)衍生自TCR亚基的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,该TCR亚基选自由以下组成的组:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 和CD3 ϵ 。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自同一TCR亚基。在一些实施例中,TCR亚基的跨膜结构域、细胞内

信号传导结构域和任选的细胞外结构域或其部分衍生自CD3 ϵ 。在一些实施例中,该cTCR包含与全长CD3 ϵ 的N-末端融合的结合部分。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个Ig样结构域外的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个Ig样结构域内的区域(例如表位)结合。在一些实施例中,该靶分子是跨膜受体,如选自以下组成的组的跨膜受体:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。在一些实施例中,该靶分子是CD4。在一些实施例中,该靶分子是CD22。

免疫细胞

[0213] 可用于本发明的示例性工程化免疫细胞包括但不限于树突状细胞(包括未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞)、T淋巴细胞(如初始T细胞、效应T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤T细胞、Treg细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、外周血单核细胞(PBMC)及其组合。免疫细胞亚群可以通过本领域已知的一种或多种细胞表面标记(例如,CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD11c、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33等)的存在或不存在来定义。在药物组合物包含多个工程化哺乳动物免疫细胞的情况下,这些工程化哺乳动物免疫细胞可以是免疫细胞类型的特定亚群、免疫细胞类型的亚群的组合或者两种或更多种免疫细胞类型的组合。在一些实施例中,该免疫细胞存在于同质细胞群中。在一些实施例中,该免疫细胞存在于可在免疫细胞中增强的异质细胞群中。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是淋巴细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞不是淋巴细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞适用于过继免疫疗法。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是PBMC。在一些实施例中,该工程化免疫细胞衍生自PBMC的免疫细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施例中,该治疗细胞是表达TCR α 和TCR β 链的T细胞(即 $\alpha\beta$ T细胞)。在一些实施例中,该治疗细胞是表达TCR γ 和TCR δ 链的T细胞(即 $\gamma\delta$ T细胞)。在一些实施例中,该治疗细胞是 $\gamma 9\delta 2$ T细胞。在一些实施例中,该治疗细胞是 $\delta 1$ T细胞。在一些实施例中,该治疗细胞是 $\delta 3$ T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是B细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是NK细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是NK-T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是树突状细胞(DC)。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是DC激活的T细胞。

[0214] 在一些实施例中,该工程化免疫细胞衍生自原代细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是分离自个体的原代细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞从分离自个体的原代细胞繁殖(例如,增殖和/或分化)而来。在一些实施例中,该原代细胞获取自胸腺。在一些实施例中,该原代细胞获取自淋巴或淋巴结(例如,肿瘤引流淋巴结)。在一些实施例中,该原代细胞获取自脾。在一些实施例中,该原代细胞获取自骨髓。在一些实施例中,该原代细胞获取自血液,例如外周血。在一些实施例中,该原代细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施例中,该原代细胞衍生自血浆。在一些实施例中,该原代细胞衍生自肿瘤。在一些实施例中,该原代细胞获取自粘膜免疫系统。在一些实施例中,该原代细胞获取自活检样品。

[0215] 在一些实施例中,该工程化免疫细胞衍生自细胞系。在一些实施例中,该工程化免疫细胞获取自商业细胞系。在一些实施例中,该工程化免疫细胞从分离自个体的原代细胞

建立的细胞系繁殖(例如,增殖和/或分化)而来。在一些实施例中,该细胞系是短命(mortal)细胞系。在一些实施例中,该细胞系是永生化(immortalized)细胞系。在一些实施例中,该细胞系是肿瘤细胞系,例如白血病或淋巴瘤细胞系。在一些实施例中,该细胞系是衍生自PBMC的细胞系。在一些实施例中,该细胞系是干细胞系。在一些实施例中,该细胞系是NK-92。

[0216] 在一些实施例中,该工程化免疫细胞衍生自干细胞。在一些实施例中,该干细胞是胚胎干细胞(ESC)。在一些实施例中,该干细胞是造血干细胞(HSC)。在一些实施例中,该干细胞是间充质干细胞。在一些实施例中,该干细胞是诱导多能干细胞(iPSC)。

共受体(“COR”)

[0217] 在一些实施例中,这些工程化免疫细胞进一步包含一个或多个共受体(“COR”)。

[0218] 在一些实施例中,该COR促进免疫细胞向滤泡的迁移。在一些实施例中,该COR促进免疫细胞向肠道的迁移。在一些实施例中,该COR促进免疫细胞向皮肤的迁移。

[0219] 在一些实施例中,该COR是CXCR5。在一些实施例中,该COR是CCR9。在一些实施例中,该COR是 $\alpha 4\beta 7$ (也称为整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$)。在一些实施例中,该工程化免疫细胞包含选自以下组成的组的两种或更多种受体: CXCR5、 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9。在一些实施例中,该工程化免疫细胞同时包含 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9。在一些实施例中,该工程化免疫细胞包含CXCR5、 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9。

[0220] CCR9(也称为C-C趋化因子受体9型)(CCR9)是 β 趋化因子受体家族的成员并介导响应其结合配体CCL25的趋化性。预测CCR9是七跨膜结构域蛋白,其结构类似于G蛋白偶联受体。CCR9在胸腺和小肠的T细胞上表达,并且它在调节T淋巴细胞的发育和迁移中起作用(Uehara, S.等人(2002) J. Immunol. 168 (6): 2811-2819)。已证实CCR9/CCL25可将免疫细胞引导至小肠(Pabst, O.等人(2004) J. Exp. Med. 199 (3): 411)。因此,在免疫细胞中共表达CCR9可以将工程化免疫细胞引导至肠道。在一些实施例中,使用CCR9的剪接变体。

[0221] $\alpha 4\beta 7$ 或淋巴细胞派尔集合淋巴结粘附分子(LPAM)是在淋巴细胞上表达的整联蛋白,并且其负责T细胞归巢到肠道相关淋巴组织中(Petrovic, A.等人(2004) Blood 103 (4): 1542-1547)。 $\alpha 4\beta 7$ 是由CD49d (ITGA4的蛋白产物,编码 $\alpha 4$ 整联蛋白亚基的基因)和ITGB7 (ITGB4的蛋白产物,编码 $\beta 7$ 整联蛋白亚基的基因)组成的异二聚体。在一些实施例中,将 $\alpha 4$ 的剪接变体并入 $\alpha 4\beta 7$ 异二聚体中。在一些实施例中,将 $\beta 7$ 的剪接变体并入 $\alpha 4\beta 7$ 异二聚体中。在其他实施例中,将 $\alpha 4$ 的剪接变体和 $\beta 7$ 的剪接变体并入异二聚体中。 $\alpha 4\beta 7$ (单独或与CCR9组合)的共表达可以将工程化免疫细胞引导至肠道。

[0222] 尽管 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9两者均在归巢到肠道中起作用,但它们不一定是共调节的。维生素A代谢物视黄酸在CCR9和 $\alpha 4\beta 7$ 两者的表达诱导中都起作用。然而,可以通过其他方式诱导 $\alpha 4\beta 7$ 表达,而CCR9表达需要视黄酸。此外,嗜结肠T细胞(colon-tropic T-cell)仅表达 $\alpha 4\beta 7$ 而不表达CCR9,表明这两种受体并不总是共表达或共调节。(See Takeuchi, H.等人 J. Immunol. (2010) 185 (9): 5289-5299.)

[0223] 在一些实施例中,CCR9和 $\alpha 4\beta 7$ 作为将工程化免疫细胞靶向至肠道的COR起作用。

[0224] 在一些实施例中,免疫细胞表达CXCR5,也称为C-X-C趋化因子受体5型。CXCR5是含有七个跨膜结构域的G蛋白偶联受体,属于CXC趋化因子受体家族。CXCR5及其配体(趋化因子CXCL13)在将淋巴细胞运送到次级淋巴组织(包括淋巴结和脾脏)内的滤泡中起核心作用。(Bürkle, A.等人(2007) Blood 110: 3316-3325.) 特别地, CXCR5使T细胞能迁移到响应于

CXCL13的淋巴结B细胞区 (Schaerli, P. 等人 (2000) J. Exp. Med. 192 (11) :1553-1562.)。当在免疫细胞中表达时, CXCR5可以起到将工程化免疫细胞靶向至滤泡的COR的作用。在一些实施例中, 使用CXCR5的剪接变体。

[0225] 通常, 以上讨论的任何COR的非天然存在的变体可包含在工程化免疫细胞中/在工程化免疫细胞中表达。例如, 这些变体可以含有一个或多个突变, 但仍然保持相应天然受体的一些或更多功能。例如, 在一些实施例中, 该COR是天然存在的CCR9、 $\alpha 4\beta$ 或CXCR5的变体, 其中该变体具有与天然CCR9、 $\alpha 4\beta$ 或CXCR5具有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个的同一性的氨基酸序列。在一些实施例中, 该COR是天然存在的CCR9、 $\alpha 4\beta$ 或CXCR5的变体, 其中该变体与天然CCR9、 $\alpha 4\beta$ 或CXCR5相比包含不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代中的任一个。

[0226] 在一些实施例中, 该COR是趋化因子受体。在一些实施例中, 该COR是整联蛋白。在一些实施例中, 该COR选自由以下组成的组: CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX₃CR1、XCR1、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACKR4和CCRL2。

[0227] 在一些实施例中, 该COR通常不在衍生工程化免疫细胞的免疫细胞中表达。在一些实施例中, 该COR在衍生工程化免疫细胞的免疫细胞中以低水平表达。

抗HIV抗体

[0228] 在一些实施例中, 本文所述的工程化免疫细胞进一步表达(并分泌)抗HIV抗体, 如广泛中和抗体。bNAb最初在精英控制者中发现, 这些精英控制者感染HIV但可以在不服用抗逆转录病毒药物的情况下自然控制病毒感染。bNAb是中和抗体, 其中和多种HIV病毒株。bNAb靶向病毒的保守表位, 即使病毒发生突变。在一些实施例中, 本文所述的工程化免疫细胞可以分泌广泛中和抗体以阻断其他宿主细胞的HIV感染。

[0229] 在一些实施例中, bNAb特异性识别gp41、V1V2聚糖、聚糖的外结构域、V3聚糖或CD4结合位点的MPER上的病毒表位。bNAb可以阻断病毒包膜糖蛋白与CD4的相互作用。参见, Mascola和Haynes, Immunol. Rev. 2013年7月; 254 (1) : 225-44。

[0230] 合适的bNAb包括但不限于, VRC01、PGT-121、3BNC117、10-1074、UB-421、N6、VRC07、VRC07-523、eCD4-IG、10E8、10E8v4、PG9、PGDM 1400、PGT151、CAP256.25、35022和8ANC195。参见, Science Translational Medicine, 2015年12月23日: Vol. 7, Issue 319, pp. 319ra206; PLoS Pathog. 2013; 9 (5) : e1003342; 2015年6月25日; 522 (7557) : 487-91; Nat Med. 2017年2月; 23 (2) : 185-191; 和Nature Immunology, volume 19, 1179-1188页 (2018)。其他合适的广泛中和抗体可以发现于例如Cohen等人, Current Opin. HIV AIDS, 2018年7月; 13 (4) : 366-373; 和Mascola和Haynes, Immunol. Rev. 2013年7月; 254 (1) : 225-44。

制备方法

[0231] 还提供了组合物和用于制备本文所述的识别分子和工程化免疫细胞的方法。

抗体部分

[0232] 在一些实施例中, 本文所述的结合部分包含抗体部分(例如抗CD22D1-4抗体部分和抗CD22 D5-7抗体部分)。在一些实施例中, 抗体部分包含来自单克隆抗体的VH和VL结构域或其变体。在一些实施例中, 抗体部分进一步包含来自单克隆抗体的C_H1和C_L结构域或其变体。可以例如使用杂交瘤方法(如由Kohler和Milstein, Nature, 256: 495 (1975) 和

Sergeeva等人,Blood,117(16):4262-4272所述的那些)来制备单克隆抗体。

[0233] 在杂交瘤方法中,将仓鼠、小鼠或其他合适的宿主动物典型地用免疫剂免疫以引发产生或能够产生与免疫剂特异性结合的抗体的淋巴细胞。可替代地,淋巴细胞可以在体外免疫。免疫剂可以包括目的蛋白的多肽或融合蛋白,或包含至少两个分子的复合物,例如包含肽和MHC蛋白的复合物。通常,如果需要人类来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果需要非人哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。可以将杂交瘤细胞在合适的培养基中培养,该培养基优选地含有抑制未融合的、永生化细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT培养基”),其会阻止缺乏HGPRT的细胞的生长。

[0234] 在一些实施例中,永生化细胞系有效融合,支持产生所选抗体的细胞稳定高水平表达抗体,并且对培养基(如HAT培养基)敏感。在一些实施例中,永生化细胞系是鼠骨髓瘤系,其可以获得自例如Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California和American Type Culture Collection, Manassas, Virginia。还描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp.51-63。

[0235] 然后可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对多肽的单克隆抗体。可以通过免疫沉淀或体外结合测定(例如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA))来确定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定是本领域已知的。可以例如通过Munson和Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的Scatchard分析来确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0236] 在鉴定出所希望的杂交瘤细胞后,可以将克隆通过有限稀释程序来亚克隆,并通过标准方法生长。用于此目的合适培养基包括,例如,杜氏改良伊戈尔培养基(Dulbecco's modified eagle's medium)和RPMI-1640培养基。可替代地,杂交瘤细胞可以作为哺乳动物的腹水在体内生长。

[0237] 可以通过常规免疫球蛋白纯化程序(例如蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法)来从培养基或腹水中分离或纯化由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0238] 在一些实施例中,该抗体部分包含来自选自抗体部分文库(如存在scFv或Fab片段的噬菌体文库)的克隆的序列。可以通过筛选具有所希望的一种或多种活性的抗体片段的组合文库来鉴定克隆。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库和筛选具有所希望的结合特征的抗体的此类文库的多种方法。此类方法综述于例如, Hoogenboom等人, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人, 编辑, Human Press, Totowa, N.J., 2001) 中并进一步描述于例如, 以下中McCafferty等人, Nature 348:552-554; Clackson等人, Nature 352:624-628 (1991); Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, 编辑, Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu等人, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee等人, J. Mol. Biol. 340(5):

1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); 和 Lee 等人, J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004)。

[0239] 在某些噬菌体展示方法中, 将 V_H 和 V_L 基因库通过聚合酶链反应 (PCR) 来分别克隆并在噬菌体文库中随机重组, 然后可以将其针对抗原结合噬菌体筛选, 如以下中所述的: Winter 等人, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)。噬菌体典型地以单链 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段的形式展示抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 而无需构建杂交瘤。可替代地, 可以 (例如, 从人) 克隆原始库, 为提供针对多种非自身抗原以及自身抗原的单一抗体来源, 而无需任何免疫, 如由以下中所述的: Griffiths 等人, EMBO J, 12: 725-734 (1993)。最后, 还可以通过从干细胞中克隆未重排的 V 基因片段, 并使用含有随机序列的 PCR 引物来编码高度可变的 CDR3 区域并完成体外重排来合成原始文库, 如由以下中所述的: Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括, 例如: 美国专利号 5,750,373 和美国专利公开号 2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936 和 2009/0002360。

[0240] 可以使用噬菌体展示针对靶抗原 (如 CD4 或 CD22 多肽) 具有特异性的抗体来筛选文库以制备抗体部分。文库可以是具有至少一个 $\times 10^9$ (如至少约 1×10^9 、 2.5×10^9 、 5×10^9 、 7.5×10^9 、 1×10^{10} 、 2.5×10^{10} 、 5×10^{10} 、 7.5×10^{10} 或 1×10^{11} 中的任一个) 独特人抗体片段的多样性的人 scFv 噬菌体展示文库。在一些实施例中, 文库是由从健康供体的人 PMBC 和脾脏提取的 DNA 构建的初始人文库, 涵盖所有人重链和轻链亚家族。在一些实施例中, 文库是由从患有各种疾病的患者, 如患有自身免疫病的患者、癌症患者和患有传染病的患者分离的 PBMC 中提取的 DNA 构建的初始人文库。在一些实施例中, 文库是半合成的人文库, 其中重链 CDR3 是完全随机的, 其中所有氨基酸 (除半胱氨酸外) 同样可能存在于任何给定位置 (参见, 例如, Hoet, R.M. 等人, Nat. Biotechnol. 23 (3): 344-348, 2005)。在一些实施例中, 半合成人文库的重链 CDR3 的长度为约 5 至约 24 (如约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 中的任一) 个氨基酸。在一些实施例中, 该文库是完全合成的噬菌体展示文库。在一些实施例中, 该文库是非人噬菌体展示文库。

[0241] 可以通过噬菌体与靶抗原的反复结合来选择以高亲和力与靶抗原结合的噬菌体克隆, 该靶抗原结合于与固体支持物 (例如, 用于溶液淘选的珠或用于细胞淘选的哺乳动物细胞), 随后去除未结合的噬菌体并洗脱特异性结合的噬菌体。在溶液淘选的实例中, 可以将靶抗原生物素化以固定到固体支持物上。将生物素化的靶抗原与噬菌体文库和固体支持物 (如链霉亲和素偶联的 Dynabeads M-280) 混合, 然后分离靶抗原-噬菌体-珠复合物。然后将结合的噬菌体克隆洗脱并用于感染合适的宿主细胞, 如大肠杆菌 XL1-Blue, 以进行表达和纯化。在细胞淘选的实例中, 将表达 CD4 或 CD22 的细胞与噬菌体文库混合, 然后收集细胞并将结合的克隆洗脱并用于感染合适的宿主细胞, 以进行表达和纯化。可以以溶液淘选、细胞淘选或两者的组合来进行多轮 (如约 2、3、4、5、6 或更多轮中的任一个) 淘选, 以富集与靶抗原特异性结合的噬菌体克隆。可以通过本领域已知的任何方法, 包括例如 ELISA 和 FACS, 针对与靶抗原的特异性结合来测试富集的噬菌体克隆。

[0242] 在一些实施例中, 该 CD22 结合部分与参考抗体相同的表位结合。在一些实施例中, 该 CD22 结合部分与参考抗体竞争结合。竞争测定可用于通过识别相同或空间重叠的表

位来确定两种抗体部分是否结合相同的表位(或彼此竞争),或者一种抗体竞争性地抑制另一种抗体与抗原的结合。示例性竞争测定包括但不限于常规测定,例如在以下中提供的那些:Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)。Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”,Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,N.J.)中提供了定位抗体所结合的表位的详细示例性方法。在一些实施例中,如果两种抗体彼此阻断50%或更多的结合,则认为两种抗体与相同的表位结合。

人和人源化抗体部分

[0243] 本文所述的抗体部分可以是人的或人源化的。非人(例如鼠)抗体部分的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv或抗体的其他抗原结合子序列),其典型地含有来自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体部分包括人免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(受体抗体),其中来自受体CDR的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有所希望的特异性、亲和力和/或能力的小鼠、大鼠或兔)的CDR替代。在一些实例中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基替代。人源化抗体部分还可以包含既不在受体抗体部分中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基。通常,人源化抗体部分可以包含至少一个、并且典型地两个可变结构域中的基本上全部,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。参见例如,Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-329(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992)。

[0244] 通常,人源化抗体部分具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,这些残基典型地取自“输入”可变结构域。根据一些实施例,基本上可以按照Winter和同事的方法(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988))通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体部分的相应序列来进行人源化。因此,此“人源化”抗体部分是抗体部分(美国专利号4,816,567),其中基本上小于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体部分典型地是人抗体部分,其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0245] 作为人源化的替代品,可以产生人抗体部分。例如,现在有可能产生转基因动物(例如小鼠),这些转基因动物在免疫后能够在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生完整的人抗体库。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体的产生。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移至此种系突变小鼠中将导致在抗原攻击时产生人抗体。参见例如,Jakobovits等人,PNAS USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.,7:33(1993);美国专利号5,545,806;5,569,825;5,591,669;5,545,807;和WO 97/17852。可替代地,可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如小鼠(其中内源性免疫球蛋白基因已部分灭活或完全灭活)中来制备人抗体。在攻击时,观察到人抗体产生,其在所有方面(包括基因重排、组装和抗体库)都与在人中所见的非常相似。此方法描述于例如美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016,以及Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature,368:856-

859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild等人, Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg和Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)。

[0246] 还可以通过体外激活的B细胞(参见美国专利5,567,610和5,229,275)或通过使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)来产生人抗体。Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等人, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。Cole等人 and Boemer等人的技术也可用于制备人单克隆抗体。Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985) 和 Boerner等人, J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)。

抗体变体

[0247] 在一些实施例中,考虑了本文提供的抗原结合结构域(例如,抗CD22D1-4抗体部分、抗CD22 D5-7抗体部分和抗CD4抗体部分)的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗原结合结构域的结合亲和力和/或其他生物特性。抗原结合结构域的氨基酸序列变体可通过将适当的修饰引入编码抗原结合结构域的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗原结合结构域的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终的构建体,条件是最终的构建体具有所希望的特征,例如抗原结合。

[0248] 在一些实施例中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗原结合结构域变体。取代诱变的目的位点包括抗体部分的HVR和FR。可以将氨基酸取代引入目的抗原结合结构域,并针对所希望的活性(例如保留/改善的抗原结合或降低的免疫原性)筛选产物。

[0249] 保守取代显示于下表2中。本文讨论的变体CORS也可以含有此类保守取代。

表2:保守取代

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0250] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分成不同的类别：

- a. 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- b. 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- c. 酸性：Asp、Glu；
- d. 碱性：His、Lys、Arg；
- e. 影响链取向的残基：Gly、Pro；
- f. 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0251] 非保守取代将需要将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0252] 示例性取代变体是亲和力成熟的抗体部分，其可以方便地产生，例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术。简而言之，一个或多个CDR残基突变并且变体抗体部分在噬菌体上展示并针对特定的生物活性（例如，结合亲和力）来筛选。可以在HVR中进行改变（例如取代），例如以提高抗体部分的亲和力。可在HVR“热点”，即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基（参见，例如，Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)）和/或特异性决定残基（SDR）中进行此类改变，其中测试所得变体 V_H 或 V_L 的结合亲和力。通过从二级文库中构建和重新选择的亲和力成熟描述于例如：Hoogenboom等人Methods in Molecular Biology 178:1-37中（O'Brien等人，编辑，Human Press, Totowa, NJ, (2001)）。

[0253] 在亲和力成熟的一些实施例中，通过多种方法（例如，易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变）中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所希望的亲和力的任何抗体部分变体。另一种引入多样性的方法涉及

HVR导向的方法,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可以特异性鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地,CDR-H3和CDR-L3经常被靶向。

[0254] 在一些实施例中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体部分结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行不显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文提供的保守取代)。此类改变可以在HVR“热点”或SDR之外。在以上提供的变体V_H和V_L序列的一些实施例中,每个HVR是未改变的或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0255] 如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述,用于鉴定可以靶向诱变的抗原结合结构域的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴定靶残基的残基或残基组(例如,带电荷的残基,例如arg、asp、his、lys和glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换,以确定抗原结合结构域与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的取代,证明对初始取代的功能敏感性。可替代地,或另外地,可以确定抗原-抗原结合结构域复合物的晶体结构以鉴定抗原结合结构域和抗原之间的接触点。这样的接触残基和邻近残基可以被靶向或消除作为取代候选。可以筛选变体以确定它们是否含有所希望的特性。

[0256] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合,长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗原结合结构域。抗原结合结构域的其他插入变体包括将抗原结合结构域的N-末端或C-末端与增加抗原结合结构域的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽融合。

核酸

[0257] 本文还提供了编码本文所述的识别分子(或其一个或多个部分)、COR和/或bNAbs的核酸(或一组核酸),以及包含这种或这些核酸的载体。

[0258] 识别分子(或其一个或多个部分)、COR和/或bNAbs的表达可以通过将一种或多种核酸插入适当的表达载体来实现,使得该一种或多种核酸与5'和/或3'调控元件(包括例如启动子(如淋巴细胞特异性启动子)和3'非翻译区(UTR))可操作地连接。这些载体可以适用于在宿主细胞中复制和整合。典型的克隆和表达载体含有转录和翻译终止子、启动序列、以及用于调控所希望的核酸序列的表达的启动子。

[0259] 可以将一种或多种核酸克隆至许多类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,该载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0260] 此外,可以将表达载体以病毒载体的形式提供至细胞。病毒载体技术是本领域熟知的。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种可选择的标记。

[0261] 已经开发了用于将基因转移到哺乳动物细胞中的许多基于病毒的系统。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便利的平台。使用本领域已知的技术可以将选择的基因插入载体并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以将重组病毒分离,并经体内或离体递送到受

试者的细胞中。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施例中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一些实施例中,使用慢病毒载体。来源于逆转录病毒(如慢病毒)的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期、稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体比来源于癌逆转录病毒(如鼠白血病病毒)的载体具有更多的优势,因为它们可以转导非增殖细胞(如肝细胞)。它们还具有低免疫原性的另外的优势。

[0262] 另外的启动子元件(例如,增强子)调节转录启动的频率。典型地,这些位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的,使得当元件相对于彼此反向或移动时能保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至50bp。

[0263] 合适的启动子的一个实例是即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个实例是延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽类白血病病毒启动子、EB病毒即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酐激酶启动子。

[0264] 为了评估多肽或其部分的表达,要引入细胞的表达载体也可以含有可选择的标记基因或报道基因或两者,以促进从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群中识别和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可以携带在分离的DNA上,并用于共转染过程。可选择的标记和报道基因都可以侧接适当的调控序列,以在宿主细胞中表达。有用的可选择的标记包括,例如,抗生素抗性基因,如neo等。

[0265] 报道基因用于识别潜在的转染细胞和评估调控序列的功能。通常,报道基因是在受体生物体或组织中不存在或不表达的基因,该报道基因编码多肽,该多肽的表达通过一些易于检测的特性(例如,酶活性)来表现。报道基因的表达在DNA被引入受体细胞后的合适的时间检测。合适的报道基因可以包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因。合适的表达系统是熟知的,并且可以使用已知技术制备或从商业上获得。通常,显示出报道基因的最高表达水平的具有最小5'侧翼区域的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区域可与报道基因连接,并用于评估药剂调节启动子驱动的转录能力。

[0266] 证实哺乳动物细胞中存在一种或多种核酸的示例性方法包括例如本领域技术人员熟知的分子生物学测定,例如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;生物化学测定,例如通过免疫学方法(例如,ELISA和蛋白质印迹)来检测特定肽的存在或不存在。

[0267] 在一些实施例中,一种或多种核酸序列包含在分开的载体中。在一些实施例中,至少一些核酸序列包含在相同载体中。在一些实施例中,所有核酸序列包含在相同载体中。载体可以选自,例如,由哺乳动物表达载体和病毒载体(如衍生自逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒的那些)组成的组中。

[0268] 例如,在一些实施例,核酸包含编码免疫细胞受体多肽链的第一核酸序列,任选地

包含编码COR多肽链的第二核酸和任选地包含编码bNAb多肽的第三核酸。在一些实施例中,该第一核酸序列包含在第一载体中,任选的第二核酸序列包含在第二载体中,并且任选的第三核酸序列包含在第三载体中。在一些实施例中,该第一和第二核酸序列包含在第一载体中,并且该第三核酸序列包含在第二载体中。在一些实施例中,该第一和第三核酸序列包含在第一载体中,并且该第二核酸序列包含在第二载体中。在一些实施例中,该第二和第三核酸序列包含在第一载体中,并且该第一核酸序列包含在第二载体中。在一些实施例中,该第一、第二和第三核酸序列包含在相同载体中。在一些实施例中,该第一、第二和第三核酸经由选自内部核糖体进入位点(IRES)和编码自切割2A肽(如P2A、T2A、E2A或F2A)的核酸组成的组的接头来相互连接。

[0269] 在一些实施例中,该第一核酸序列在第一启动子的控制下,任选的第二核酸序列在第二启动子的控制下,并且任选的第三核酸序列在第三启动子的控制下。在一些实施例中,第一、第二和第三启动子中的一些或全部具有相同的序列。在一些实施例中,第一、第二和第三启动子中的一些或全部具有不同的序列。在一些实施例中,第一、第二和第三核酸序列中的一些或全部在多顺反子载体中的单个启动子控制下以单个转录物表达。在一些实施例中,这些启动子中的一种或多种是可诱导的。

[0270] 在一些实施例中,第一、第二和第三核酸序列中的一些或全部在免疫细胞(如T细胞)中具有相似(如基本上或几乎相同)的表达水平。在一些实施例中,第一、第二和第三核酸序列中的一些在免疫细胞(如T细胞)中的表达水平相差至少约2(例如至少约2、3、4、5或更多中的任一)倍。表达可以在mRNA或蛋白水平上确定。mRNA表达水平可以通过使用各种熟知的方法,包括RNA印迹法、定量RT-PCR、微阵列分析等测量从核酸转录的mRNA的量来确定。可以通过已知方法测量蛋白质表达,这些方法包括免疫细胞化学染色、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹分析、发光测定法、质谱法、高效液相色谱法、高压液相色谱法-串联质谱法等。

[0271] 将基因引入并表达至细胞(如,免疫细胞)中的方法在本领域中是已知的。在表达载体的背景下,该载体可以通过本领域的任何方法容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可以通过物理、化学或生物手段转移到宿主细胞中。

[0272] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生含有载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。在一些实施例中,将多核苷酸引入宿主细胞是通过磷酸钙转染进行的。

[0273] 将目的多核苷酸引入宿主细胞的生物方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入哺乳动物(例如,人细胞)的最广泛使用的方法。其他病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒1、腺病毒和腺相关病毒等。

[0274] 用于将多核苷酸引入宿主细胞(如,免疫细胞)的化学方法包括胶体分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如人造膜囊泡)。

[0275] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。考虑使用脂质配制品将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。在另一方面,核酸可与脂质相关。可以将与脂质缔合的核酸包封在脂质体的含水内部、散布在脂质体的脂质双层、经由与脂质体和寡核苷酸二者缔合的连接分子附接至脂质体、捕获在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂

质的溶液中、与脂质混合、与脂质合并、作为脂质中的悬浮液而含有、含有微团或与微团复合或以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可能以双层结构、微团或“折叠”结构存在。它们也可以简单地散布在溶液中,可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质是可能是天然存在的或合成的脂质的脂肪性物质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴,以及含有长链脂族烃及其衍生物的一类化合物,如脂肪酸、乙醇、胺、氨基醇和醛。

[0276] 无论用于将外源核酸引入宿主细胞或将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中是否存在重组DNA序列,可以进行多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,例如通过免疫学方法(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的测定来检测特定肽的存在或不存在,以确定属于本发明范围的药剂。

[0277] 本文所述的核酸可以瞬时或稳定地整合到免疫细胞中。在一些实施例中,核酸在工程化免疫细胞中瞬时表达。例如,核酸可以存在于包含异源基因表达盒的染色体外阵列中的工程化免疫细胞的细胞核中。使用本领域已知的任何转染或转导方法(包括病毒或非病毒方法),将核酸引入工程化哺乳动物中。示例性非病毒转染方法包括但不限于基于化学的转染,如使用磷酸钙、树状聚合物、脂质体或阳离子聚合物(例如,DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺);非化学方法,如电穿孔、细胞挤压、声孔效应、光学转染、刺穿染、原生质体融合、水动力递送或转座子;基于粒子的方法,如使用基因枪、磁连接或磁辅助转染、粒子轰击;和混合方法,如核转染。在一些实施例中,核酸是DNA。在一些实施例中,核酸是RNA。在一些实施例中,核酸是线性的。在一些实施例中,核酸是环状的。

[0278] 在一些实施例中,一种或多种核酸存在于工程化免疫细胞的基因组中。例如,通过本领域已知的任何方法,可以将一种或多种核酸整合到免疫细胞的基因组中,这些方法包括但不限于病毒介导的整合、随机整合、同源重组方法和定点整合方法,如使用位点特异性重组酶或整合酶、转座酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN[®])、CRISPR/Cas9和锌指核酸酶。在一些实施例中,将一种或多种核酸整合在工程化免疫细胞基因组的专门设计的基因座中。在一些实施例中,将一种或多种核酸整合在工程化免疫细胞基因组的整合热点中。在一些实施例中,将一种或多种核酸整合在工程化免疫细胞基因组的随机基因座中。在单个工程化免疫细胞中存在多个核酸拷贝的情况下,一种或多种核酸可以整合在工程化免疫细胞的基因组的多个位点上。

[0279] 编码识别分子、COR和/或bNAb的一种或多种核酸可以与启动子可操作地连接。在一些实施例中,该启动子是内源启动子。例如,可以使用本领域已知的任何方法(如,CRISPR/Cas9方法),将编码识别分子、COR或bNAb的一种或多种核酸敲入内源启动子下游的工程化免疫细胞基因组中。在一些实施例中,该内源启动子是丰度蛋白如 β -肌动蛋白的启动子。在一些实施例中,该内源启动子是诱导型启动子,例如可由工程化免疫细胞的内源激活信号诱导。在其中工程化免疫细胞是T细胞的一些实施例中,启动子是T细胞激活依赖性启动子(例如,IL-2启动子、NFAT启动子或NF κ B启动子)。

[0280] 在一些实施例中,该启动子是异源启动子。

[0281] 在一些实施例中,将编码识别分子、COR和/或bNAb的一种或多种核酸可操作地连接至组成型启动子。在一些实施例中,将编码识别分子、COR和/或bNAb的一种或多种核酸可

操作地连接至诱导型启动子。在一些实施例中,将组成型启动子与编码识别分子的一种或多种核酸可操作地连接,并且将诱导型启动子与编码COR或bNAbs的核酸可操作地连接。在一些实施例中,将第一诱导型启动子与编码识别分子的核酸可操作地连接,并且将第二诱导型启动子与编码COR的核酸可操作地连接,或反之亦然。在一些实施例中,将第一诱导型启动子与编码识别分子的核酸可操作地连接,并且将第二诱导型启动子与编码bNAbs的核酸可操作地连接,或反之亦然。在一些实施例中,将第一诱导型启动子与编码COR的核酸可操作地连接,并且将第二诱导型启动子与编码bNAbs的核酸可操作地连接,或反之亦然。在一些实施例中,第一诱导型启动子可由第一诱导条件诱导,而第二诱导型启动子可由第二诱导条件诱导。在一些实施例中,第一诱导条件与第二诱导条件相同。在一些实施例中,同时诱导第一诱导型启动子和第二诱导型启动子。在一些实施例中,依次诱导第一诱导型启动子和第二诱导型启动子,例如,在第二诱导型启动子之前诱导第一诱导型启动子,或在第二诱导型启动子之后诱导第一诱导型启动子。

[0282] 组成型启动子允许异源基因(也称为转基因)在宿主细胞中组成性地表达。本文考虑的示例性组成型启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、人延伸因子-1 α (hEF1 α)、泛素C启动子(UbiC)、磷酸甘油激酶启动子(PGK)、猿猴病毒40早期启动子(SV40)以及与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAGG)。在许多研究中,已经广泛地比较了此类组成型启动子对驱动转基因表达的效率。例如,Michael C.Milone等人比较了CMV、hEF1 α 、UbiC和PGK驱动原代人T细胞中嵌合抗原受体表达的效率,并得出结论,hEF1 α 启动子不仅诱导了最高水平的转基因表达,并且最优地维持在CD4和CD8人T细胞中(Molecular Therapy, 17(8):1453-1464(2009))。在一些实施例中,核酸中的启动子是hEF1 α 启动子。

[0283] 诱导型启动子可以由一种或多种条件诱导,例如物理条件、工程化免疫细胞的微环境或工程化免疫细胞的生理状态、诱导物(即,诱导剂)或其组合。在一些实施例中,诱导条件不诱导工程化免疫细胞和/或接受药物组合物的受试者中内源基因的表达。在一些实施例中,诱导条件选自自由以下组成的组:诱导物、辐射(例如,电离辐射、光)、温度(例如,热)、氧化还原状态、肿瘤环境和工程化免疫细胞的激活状态。

[0284] 在一些实施例中,启动子可由诱导物诱导。在一些实施例中,诱导物是小分子,例如化学化合物。在一些实施例中,小分子选自自由多西环素、四环素、醇、金属或类固醇组成的组。化学诱导的启动子得到了最广泛的探索。此类启动子包括其转录活性受存在或不存在小分子化学物质(例如,多西环素、四环素、醇、类固醇、金属和其他化合物)调节的启动子。具有反向四环素控制的反式激活因子(rtTA)和四环素应答元件启动子(TRE)的多西环素诱导型系统是目前最成熟的系统。WO 9429442描述了四环素应答启动子对真核细胞中基因表达的严格控制。WO 9601313披露了四环素调节的转录调节剂。另外地,例如在TetSystems.com的网站上描述了Tet技术(例如,Tet-on系统)。任何已知的化学调节的启动子可用于驱动本申请的治疗蛋白的表达。

[0285] 在一些实施例中,诱导物是多肽,例如生长因子、激素或细胞表面受体的配体,例如特异性结合肿瘤抗原的多肽。在一些实施例中,该多肽由工程化免疫细胞表达。在一些实施例中,该多肽由核酸中的核酸编码。许多多肽诱导物也是本领域已知的,并且它们可适用于本发明。例如,基于蜕皮激素受体的基因开关、基于孕酮受体的基因开关和基于雌激素受体的基因开关属于使用类固醇受体衍生的反式激活因子的基因开关(WO 9637609和WO

9738117等)。

[0286] 在一些实施例中,诱导物同时包含小分子组分和一种或多种多肽。例如,依赖于多肽二聚化的诱导型启动子是本领域已知的,并且可以适用于本发明。1993年开发的第一个小分子CID系统使用FK1012(药物FK506的衍生物)以诱导FKBP的同源二聚化。通过使用类似的策略,Wu等人通过使用Rapalog/FKBP-FRB*和Gibberelline/GID1-GAI二聚化依赖性基因开关成功地使CAR-T细胞可通过启动开关(ON-switch)方式滴定(C.-Y.Wu等人,Science 350,aab4077(2015))。其他二聚化依赖性开关系统包括香豆霉素/GyrB-GyrB(Nature 383(6596):178-81)和HaXS/Snap-tag-HaloTag(Chemistry and Biology 20(4):549-57)。

[0287] 在一些实施例中,启动子是光诱导型启动子,并且诱导条件是光。用于调节哺乳动物细胞中的基因表达的光诱导型启动子也是本领域熟知的(参见,例如Science 332,1565-1568(2011);Nat.Methods 9,266-269(2012);Nature 500:472-476(2013);Nature Neuroscience 18:1202-1212(2015))。基于此类基因调节系统对(1)DNA结合或(2)转录激活结构域募集到DNA结合蛋白的调节,它们可大致归为两类。例如,在哺乳动物细胞中开发并测试了基于视黑蛋白的合成哺乳动物蓝光控制转录系统,该系统响应于蓝光(480nm)而触发细胞内钙增加,从而导致钙调磷酸酶介导的NFAT动员。最近,Motta-Mena等人描述了从天然存在的EL222转录因子开发的新的诱导型基因表达系统,该系统在人细胞系和斑马鱼胚胎中赋予对转录起始的高水平且蓝光敏感性控制(Nat.Chem.Biol.10(3):196-202(2014))。另外地,利用红光诱导的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的光感受器光敏色素B(PhyB)和光敏色素相互作用因子6(PIF6)的相互作用进行红光触发的基因表达调节。此外,还开发了紫外线B(UVB)诱导型基因表达系统并证明其在哺乳动物细胞中的靶基因转录中是有效的(Gene and Cell Therapy:Therapeutic Mechanisms and Strategies,第25章,第四版,CRC Press,2015年1月20日)。本文所述的任何光诱导型启动子可用于驱动本发明的治疗蛋白的表达。

[0288] 在一些实施例中,启动子是由光诱导型分子和光的组合诱导的光诱导型启动子。例如,化学诱导物上的可光切割的光笼化基团(photocaged group)保持诱导物无活性,除非通过辐射或其他方式去除该光笼化基团。此类光诱导型分子包括小分子化合物、寡核苷酸和蛋白质。例如,已经开发了笼化蜕皮激素、与lac操纵子一起使用的笼化IPTG、用于核酶介导的基因表达的笼化丰加霉素、与Tet-on系统一起使用的笼化多西环素以及用于光介导的FKBP/FRB二聚化的笼化Rapalog(参见,例如Curr Opin Chem Biol.16(3-4):292-299(2012))。

[0289] 在一些实施例中,启动子是辐射诱导型启动子,并且诱导条件是辐射,例如电离辐射。辐射诱导型启动子也是本领域已知的,用以控制转基因表达。辐射细胞后发生基因表达的改变。例如,一组称为“立即早期基因(immediate early gene)”的基因可在电离辐射后迅速反应。示例性立即早期基因包括但不限于Erg-1、p21/WAF-1、GADD45 α 、t-PA、c-Fos、c-Jun、NF- κ B和AP1。立即早期基因在其启动子区包含辐射应答序列。共有序列CC(A/T)₆GG(SEQ ID NO:65)已在Erg-1启动子中发现,并且被称为血清应答元件或被称为CAR_G元件。已经深入研究了辐射诱导的启动子和转基因的组合,并证明其具有有效的治疗益处。参见,例如Cancer Biol Ther.6(7):1005-12(2007)和Gene and Cell Therapy:Therapeutic Mechanisms and Strategies,第25章,第四版,CRC Press,2015年1月20日。任何立即早期

基因启动子或任何包含血清响应元件或SEQ ID NO:65的启动子都可用作辐射诱导型启动子以驱动本发明的治疗蛋白的表达。

[0290] 在一些实施例中,启动子是热诱导型启动子,并且诱导条件是热。本领域还广泛研究了驱动转基因表达的热诱导型启动子。包括Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40、Hsp10等在内的热休克或应激蛋白(HSP)在热或其他物理和化学应激下在保护细胞方面起着重要作用。已经在临床前研究中尝试了几种热诱导型启动子,包括热休克蛋白(HSP)启动子以及生长停滞和DNA损伤(GADD)153启动子。1985年首次描述的人hsp70B基因的启动子似乎是最高效的热诱导型启动子之一。Huang等人报道,在引入hsp70B-EGFP、hsp70B-TNF α 和hsp70B-IL12编码序列后,肿瘤细胞在热处理后表达极高的转基因表达,而在没有热处理的情况下,未检测到转基因的表达。此外,在IL12转基因加热处理的小鼠组中,体内肿瘤生长显著延迟(Cancer Res.60:3435(2000))。另一组科学家将HSV-tk自杀基因与hsp70B启动子相关联,并在携带小鼠乳腺癌的裸鼠中测试该系统。与未进行热处理的对照相比,向其肿瘤施用了hsp70B-HSVtk编码序列并进行了热处理的小鼠显示出肿瘤消退和显著的存活率(Hum.Gene Ther.11:2453(2000))。本领域已知的另外的热诱导型启动子可以在例如Gene and Cell Therapy:Therapeutic Mechanisms and Strategies,第25章,第四版,CRC Press,2015年1月20日中找到。本文讨论的任何热诱导型启动子可用于驱动本发明的治疗蛋白的表达。

[0291] 在一些实施例中,启动子可由氧化还原状态诱导。可由氧化还原状态诱导的示例性启动子包括诱导型启动子和低氧诱导型启动子。例如,Post DE等人开发了低氧诱导型因子(HIF)应答启动子,其特异性且强烈地诱导HIF活性肿瘤细胞中的转基因表达(Gene Ther.8:1801-1807(2001);Cancer Res.67:6872-6881(2007))。

[0292] 在一些实施例中,启动子可由工程化免疫细胞的生理状态(例如,内源激活信号)诱导。在其中工程化免疫细胞是T细胞的一些实施例中,启动子是T细胞激活依赖性启动子,其可由工程化T细胞的内源激活信号诱导。在一些实施例中,工程化T细胞被诱导物(例如,PMA、离子霉素或植物血凝素)激活。在一些实施例中,通过经由内源T细胞受体或工程化受体(如,重组TCR或CAR)识别肿瘤细胞上的肿瘤抗原来激活工程化T细胞。在一些实施例中,通过免疫检查点的阻断,如通过由工程化T细胞或由第二工程化免疫细胞表达的免疫调节剂来激活工程化T细胞。在一些实施例中,T细胞激活依赖性启动子是IL-2启动子。在一些实施例中,T细胞激活依赖性启动子是NFAT启动子。在一些实施例中,T细胞激活依赖性启动子是NF κ B启动子。

[0293] 不受任何理论或假设的束缚,由IL-2启动子的基因转录启动的IL-2表达是T细胞激活的主要活动。佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸(PMA)或离子霉素或植物血凝素对人T细胞的非特异性刺激导致受刺激的T细胞分泌IL-2。探索了IL-2启动子在基因工程化T细胞中激活诱导的转基因表达(Virology Journal 3:97(2006))。我们发现在人T细胞系中存在PMA/PHA-P激活的情况下IL-2启动子可有效启动报道基因表达。T细胞受体刺激引发一系列细胞内反应,导致细胞溶质钙浓度增加并导致NFAT和NF κ B两者的核翻译。激活T细胞的核因子(NFAT)成员是介导T淋巴细胞中的免疫响应的Ca²⁺依赖性转录因子。已证实NFAT对激活的T细胞中诱导型白介素-2(IL-2)的表达至关重要(Mol Cell Biol.15(11):6299-310(1995);Nature Reviews Immunology 5:472-484(2005))。我们发现在人T细胞系中存在PMA/PHA-P激活的情况下NFAT启动子可有效启动报道基因表达。包括核因子 κ B(NF κ B)的其他途径也可

用于经由T细胞激活来控制转基因表达。

工程化免疫细髓的制备

[0294] 工程化免疫细胞可以获得自外周血、脐带血、骨髓、肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴组织或胸腺组织。宿主细胞可以包括胎盘细胞、胚胎干细胞、诱导多能干细胞或造血干细胞。细胞可以获得自人、猴、黑猩猩、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。细胞可以获得自己建立的细胞系。

[0295] 可以通过将编码识别分子、COR和/或bNAbs的一种或多种核酸(包括,例如慢病毒载体)引入免疫细胞来产生表达识别分子、COR和/或bNAbs的工程化免疫细胞。在一些实施例中,载体是病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘载体、单纯疱疹病毒载体及其衍生物。病毒载体技术是本领域熟知的,并且描述于例如Sambrook等人(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)以及其他病毒学和分子生物学手册中。

[0296] 已经开发了用于将基因转移到哺乳动物细胞中的许多基于病毒的系统。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便利的平台。可以使用本领域已知的技术将核酸插入载体并包装在逆转录病毒粒子中。然后可以分离重组病毒,并在体外或离体将其递送至工程化免疫细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施例中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一些实施例中,使用慢病毒载体。在一些实施例中,使用自灭活的慢病毒载体。例如,可以用本领域已知的方案包装携带编码识别分子、COR和/或bNAbs的一种或多种核酸序列的自灭活慢病毒载体。可以使用本领域已知的方法,将所得的慢病毒载体用于转导哺乳动物细胞(例如,原代人T细胞)。

[0297] 在一些实施例中,将转导的或转染的哺乳动物细胞在引入核酸后离体繁殖。在一些实施例中,将转导的或转染的哺乳动物细胞培养以繁殖至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中的任一个。在一些实施例中,将转导的或转染的哺乳动物细胞培养不超过约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中的任一个。在一些实施例中,进一步评估或筛选转导的或转染的哺乳动物细胞以选择工程化免疫细胞。

[0298] 可以使用本领域已知的技术来完成将一种或多种核酸引入免疫细胞。在一些实施例中,工程化免疫细胞(如工程化T细胞)能够在体内复制,导致长期持续存在,这可导致持续控制与靶抗原的表达相关的疾病(如病毒感染)。

[0299] 在对免疫细胞进行扩增和基因修饰之前,从受试者获得免疫细胞来源。免疫细胞可以获得自许多来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的一些实施例中,可以使用本领域可用的任何数量的免疫细胞系。在本发明的一些实施例中,可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(例如,FICOLL™分离)来从受试者收集的血液中获得免疫细胞。在一些实施例中,来自个体循环血的细胞是通过单采(apheresis)获得的。单采产物典型地含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施例中,可以洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆级分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在一些实施例中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施例中,洗涤溶液缺乏钙,并且可能缺乏镁,或可能缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子。本领域的普通技术人员很容易理解,洗涤步骤可以通过本领域已知的方法完成,如根据制造

商的说明使用半自动化“流动”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液中,如无Ca²⁺、无Mg²⁺的PBS、勃脉力(PlasmaLyte)A或其他有或没有缓冲液的盐溶液。可替代地,可以除去单采样品的不良组分,并将细胞直接重悬浮于培养基中。

[0300] 在一些实施例中,通过例如,通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析来裂解红细胞并且消耗单核细胞来从外周血淋巴细胞分离免疫细胞(如T细胞)。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群,如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,在一些实施例中,通过与抗CD3/抗CD28(即,3×28)共轭珠(如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T)孵育足以对所希望的T细胞进行阳性选择的一段时间而分离T细胞。在一些实施例中,该时间段为约30分钟。在一些实施例中,该时间段为从30分钟到36小时或更长的范围(包括这些数值之间的所有范围)。在一些实施例中,该时间段为至少一小时、2、3、4、5或6小时。在一些实施例中,该时间段为10到24小时。在一些实施例中,该孵育时间段为24小时。在T细胞与其他细胞类型相比很少的任何情况下,可以使用更长的孵育时间来分离T细胞。此外,使用较长的孵育时间可以增加CD8⁺T细胞的捕获效率。因此,通过简单地缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或增加或减少珠与T细胞的比率,可以在培养开始时或在培养过程中的其他时间点优先选择不选择T细胞的亚群。另外地,通过增加或减少珠或其他表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或其他所希望的时间点优先选择不选择T细胞的亚群。本领域的技术人员会认识到,在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。在一些实施例中,可能希望进行选择过程,并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以进行新一轮的选择。

[0301] 通过阴性选择富集T细胞群可以通过结合针对阴性选择细胞特有的表面标记的抗体来实现。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,该方法使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物典型地包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施例中,可能希望富集或正向选择调节性T细胞,这些细胞典型地表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺。可替代地,在一些实施例中,通过抗CD25共轭珠或其他类似的选择方法消耗T调控细胞。

[0302] 为了通过阳性或阴性选择分离所希望的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,粒子(如珠))的浓度。在一些实施例中,可能希望显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一些实施例中,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在一些实施例中,使用约10亿个细胞/ml的浓度。在一些实施例中,使用大于约1亿个细胞/ml。在一些实施例中,使用约1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml中的任一个的浓度。在一些实施例中,使用约7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml中的任一个。在一些实施例中,使用约1.25或约1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。此外,使用高浓度的细胞允许更有效地捕获可能弱表达目的靶抗原的细胞(如CD28阴性T细胞)或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群可能具有治疗价值,并且期望能够获得。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0303] 无论是在对免疫细胞进行基因修饰以表达所希望的识别分子(任选地COR和任选地bNAb)之前或之后,均可以激活和扩增免疫细胞。

[0304] 在一些实施例中,通过与附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触来扩增本文所述的免疫细胞(如T细胞)。特别地,可以如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与钙离子载体结合的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)来刺激T细胞群。为了共刺激T细胞表面的辅助分子,可使用结合辅助分子的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,可以将T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,可使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, **Besançon**, France),如本领域公知的其他方法那样(Berg等人,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人,J.Immunol.Meth.227(1-2):53-63,1999)。

基因修饰

[0305] 在一些实施例中,工程化免疫细胞是经修饰以阻断或降低CCR5表达的T细胞。修饰细胞以破坏基因表达包括本领域已知的任何此类技术,包括例如RNA干扰(例如,siRNA、shRNA、miRNA)、基因编辑(例如,基于CRISPR-或TALEN的基因敲除)等。

[0306] 在一些实施例中,使用CRISPR/Cas系统来产生具有降低的CCR5表达的工程化T细胞。有关基因编辑的CRISPR/Cas系统的综述,参见例如Jian W&Marraffini LA,Annu.Rev.Microbiol.69,2015;Hsu PD等人,Cell,157(6):1262-1278,2014;和O'Connell MR等人,Nature 516:263-266,2014。在一些实施例中,例如使用基于TALEN的基因组编辑来产生工程化T细胞,该T细胞的内源TCR链中的一个或两个的表达降低。在一些实施例中,可以修饰工程化免疫细胞,特别是从供体获得的同种异体免疫细胞,以灭活参与MHC识别的TCR组分。在一些实施例中,这些经修饰的免疫细胞不会引起移植物抗宿主病。

[0307] 在一些实施例中,使用CRISPR/Cas9基因编辑灭活CCR5基因(或TCR基因)。CRISPR/Cas9涉及两个主要特征:短向导RNA(gRNA)和CRISPR相关的内切核酸酶或Cas蛋白。Cas蛋白能与含有工程化间隔子(允许定向靶向并随后敲除目的基因)的gRNA结合。一旦靶向,Cas蛋白就会切割DNA靶序列,导致基因敲除。

[0308] 在一些实施例中,使用基于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN[®])的基因组编辑来灭活CCR5基因(或TCR基因)。基于TALEN[®]的基因组编辑涉及限制性内切酶的使用,可以将这些限制性内切酶工程化以靶向DNA的特定区域。将转录激活因子样效应(TALE)DNA结合结构域与DNA切割结构域融合。TALE负责将核酸酶靶向目的序列,切割结构域(核酸酶)负责切割DNA,从而去除该DNA片段并随后敲除该基因。

[0309] 在一些实施例中,使用锌指核酸酶(ZFN)基因组编辑方法来灭活CCR5基因(或TCR基因)。锌指核酸酶是由锌指DNA结合结构域和DNA切割结构域组成的人工限制性内切酶。可以将ZFN DNA结合结构域工程化为靶向DNA的特定区域。DNA切割结构域负责切割目的DNA序列,从而去除该DNA片段并随后敲除该基因。

[0310] 在一些实施例中,通过使用RNA干扰(RNAi)如小干扰RNA(siRNA)、微小RNA和短发夹RNA(shRNA)来降低CCR5基因的表达。siRNA分子是长度为20-25个核苷酸的寡核苷酸双链体,这些寡核苷酸双链体与来自目的基因的信使RNA(mRNA)互补。siRNA靶向这些mRNA以进

行破坏。通过靶向, siRNA防止mRNA转录物被翻译, 从而防止细胞产生蛋白质。

[0311] 在一些实施例中, 通过使用反义寡核苷酸来降低CCR5基因(或TCR基因)的表达。靶向mRNA的反义寡核苷酸是本领域公知的并且通常用于下调基因表达。(参见Watts, J. and Corey, D (2012) J. Pathol. 226 (2) : 365-379.)

工程化免疫细胞的富集

[0312] 在一些实施例中, 提供了富集根据本文所述的工程化免疫细胞中的任一种的工程化免疫细胞的异质细胞群的方法。

[0313] 可以通过阳性选择技术富集与靶抗原和靶配体(例如, CD22 D1-4或CD22 D5-7)特异性结合的工程化免疫细胞(如工程化T细胞)的特定亚群。例如, 在一些实施例中, 通过与靶抗原-共轭珠和/或靶配体-共轭珠孵育足以对所希望的工程化免疫细胞进行阳性选择的一段时间而富集工程化免疫细胞(如工程化T细胞)。在一些实施例中, 该时间段为约30分钟。在一些实施例中, 该时间段为从30分钟到36小时或更长的范围(包括这些数值之间的所有范围)。在一些实施例中, 该时间段为至少一小时、2、3、4、5或6小时。在一些实施例中, 该时间段为10到24小时。在一些实施例中, 该孵育时间段为24小时。对于异质细胞群中以低水平存在的工程化免疫细胞的分离, 使用较长的孵育时间(如24小时)可以增加细胞产量。在与其他细胞类型相比工程化免疫细胞很少的任何情况下, 可以使用更长的孵育时间来分离工程化免疫细胞。本领域的技术人员会认识到, 在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。

[0314] 为了通过阳性选择分离所希望的工程化免疫细胞群, 可以改变细胞和表面(例如, 粒子(如珠))的浓度。在一些实施例中, 可能希望显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即, 增加细胞的浓度), 以确保细胞和珠的最大接触。例如, 在一些实施例中, 使用约20亿个细胞/ml的浓度。在一些实施例中, 使用约10亿个细胞/ml的浓度。在一些实施例中, 使用大于约1亿个细胞/ml。在一些实施例中, 使用约1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml中的任一个的浓度。在一些实施例中, 使用约7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml中的任一个。在一些实施例中, 使用约1.25或约1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产量、细胞激活和细胞扩增增加。此外, 使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达识别分子、COR和/或bNAb的工程化免疫细胞。

[0315] 在一些实施例中, 富集导致工程化免疫细胞的最小或基本上没有衰竭。例如, 在一些实施例中, 富集导致少于约50% (如少于约45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中的任一个)的工程化免疫细胞衰竭。免疫细胞衰竭可以通过本领域已知的任何方法来确定, 包括本文所述的任何方法。

[0316] 在一些实施例中, 富集导致工程化免疫细胞的最小或基本上没有末端分化。例如, 在一些实施例中, 富集导致少于约50% (如少于约45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中的任一个)的工程化免疫细胞末端分化。免疫细胞分化可以通过本领域已知的任何方法来确定, 包括本文所述的任何方法。

[0317] 在一些实施例中, 富集导致工程化免疫细胞上的最小或基本上没有识别分子或COR的内化。例如, 在一些实施例中, 富集导致少于约50% (例如少于约45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中的任一个)的工程化免疫细胞上的识别分子或COR变得内化。可以通过本领域已知的任何方法(包括本文所述的任何方法)来确定工程化免疫细胞上的识别分子或COR的内化。

[0318] 在一些实施例中,富集导致工程化免疫细胞的增殖增加。例如,在一些实施例中,富集导致工程化免疫细胞数量在富集后增加至少约10% (如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%或更多中的任一个)。

[0319] 因此,在一些实施例中,提供了富集表达识别分子(或其一个或多个部分)的工程化免疫细胞的异质细胞群的方法,该方法包括:a)将异源细胞群与包含靶分子(如CD22)或其中含有一个或多个表位的第一分子和/或包含靶分子(如CD22)或其中含有一个或多个表位的第二分子接触,以形成包含与该第一分子结合的工程化免疫细胞的复合物和/或包含与该第二分子结合的工程化免疫细胞的复合物;以及b)将这些复合物从异质细胞群中分离,从而产生富集工程化免疫细胞的细胞群。在一些实施例中,将该第一和/或第二分子单独固定到固体支持物上。在一些实施例中,该固体支持物是颗粒(如珠)。在一些实施例中,该固体支持物是表面(如孔的底部)。在一些实施例中,将该第一和/或第二分子分别用标签标记。在一些实施例中,该标签是荧光分子、亲和标签或磁性标签。在一些实施例中,该方法进一步包括将工程化免疫细胞从该第一和/或第二分子中洗脱并回收洗脱液。

[0320] 在一些实施例中,免疫细胞或工程化免疫细胞富集CD4⁺和/或CD8⁺细胞,例如通过使用阴性富集,由此使用涉及物理(柱)和磁性(MACS磁珠)纯化步骤两者的两步纯化方法来纯化细胞混合物(Gunzer, M. 等人(2001) J. Immunol. Methods 258 (1-2):55-63)。在其他实施例中,细胞群可以通过使用专门设计用于富集CD4⁺或CD8⁺细胞的T细胞富集柱来富集CD4⁺和/或CD8⁺细胞。在其他实施例中,细胞群可以通过使用可商购的试剂盒来富集CD4⁺细胞。在一些实施例中,可商购的试剂盒是EASYSEP™人CD4⁺T细胞富集试剂盒(Stemcell Technologies)。在其他实施例中,可商购的试剂盒是MAGNISORT™小鼠CD4⁺T细胞富集试剂盒(Thermo Fisher Scientific)。

药物组合物

[0321] 本文还提供了包含本文所述的工程化免疫细胞(如T细胞)的工程化免疫细胞组合物(如药物组合物,在本文中也称为配制品)。

[0322] 在一些实施例中,提供了工程化免疫细胞组合物,其包含相同细胞类型的工程化免疫细胞(如工程化T细胞)的同质细胞群,并表达相同识别分子(或其一个或多个部分)和任选地COR和/或任选地bNAbs。在一些实施例中,该工程化免疫细胞是T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施例中,该工程化免疫细胞组合物是药物组合物。

[0323] 在一些实施例中,提供了包含异质细胞群的工程化免疫细胞组合物,该异源细胞群包含多个工程化免疫细胞群,该多个工程化免疫细胞群包含不同细胞类型的工程化免疫细胞,表达不同的识别分子(或其一个或多个部分)、任选地不同COR和/或任选地不同bNAbs。

[0324] 在一些实施例中,该药物组合物适用于施用于个体,如人类个体。在一些实施例中,该药物组合物适用于注射。在一些实施例中,该药物组合物适用于输注。在一些实施例中,该药物组合物基本上不含细胞培养基。在一些实施例中,该药物组合物基本上不含内毒素或过敏蛋白。在一些实施例中,“基本上不含”小于药物组合物的总体积或重量的约10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1ppm或更少中的任一个。在一些实施例中,该药物组合物不含支原体、微生物剂和/或传染病病原。

[0325] 本申请人的药物组合物可以包含任何数量的工程化免疫细胞。在一些实施例中,

该药物组合物包含单拷贝的工程化免疫细胞。在一些实施例中,该药物组合物包含至少约1、10、100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或更多个拷贝中任一个的工程化免疫细胞。在一些实施例中,该药物组合物包含单一类型的工程化免疫细胞。在一些实施例中,该药物组合物包含至少两种类型的工程化免疫细胞,其中不同类型的工程化免疫细胞的区别在于细胞来源、细胞类型、表达的治疗蛋白(例如识别分子、COR和/或bNAb)和/或启动子等。

[0326] 在制备组合物的各个阶段,冷冻保存细胞可能是必要的或有益的。术语“冷冻(frozen/freezing)”和“冷冻保存(cryopreserved/cryopreserving)”可互换使用。冷冻包括冷冻干燥。

[0327] 在一些实施例中,可以从培养基中收获细胞,并以治疗有效量将其洗涤并浓缩到载剂中。示例性载剂包括盐水、缓冲盐水、生理盐水、水、汉克斯(Hanks')溶液、林格氏(Ringer's)溶液、Nonnosol-R (Abbott Labs)、血浆溶解液A(R) (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL)、甘油、乙醇、及其组合。

[0328] 在一些实施例中,载剂可以补充有人血清白蛋白(HSA)或其他人血清组分或胎牛血清。在特定的实施例中,用于输注的载剂包括含有5% HAS或右旋糖的缓冲盐水。另外的等渗剂包括多羟糖醇,这些多羟糖醇包括三羟或更高级糖醇,如甘油(glycerin)、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇或甘露醇。

[0329] 载剂可以包括缓冲剂,如柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液、富马酸盐缓冲液、葡萄糖酸盐缓冲液、草酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和/或三甲基胺盐。

[0330] 稳定剂是指广泛的赋形剂,其功能范围从膨胀剂到有助于防止细胞粘附于容器壁的添加剂。典型的稳定剂可以包括多羟糖醇;氨基酸,如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸和苏氨酸;有机糖或糖醇,如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘油和环多醇,如肌醇;PEG;氨基酸聚合物;含硫还原剂,如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α 单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(即,<10个残基);蛋白质如HSA、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖;二糖如乳糖、麦芽糖和蔗糖;三糖如棉子糖和多糖如葡聚糖。

[0331] 如有必要或有益时,组合物可以包括局部麻醉剂(如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。

[0332] 示例性防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯甲羟铵卤化物、氯化六甲铵、对羟基苯甲酸烷基酯(如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。

[0333] 组合物中细胞的治疗有效量可以是大于 10^2 个细胞、大于 10^3 个细胞、大于 10^4 个细胞、大于 10^5 个细胞、大于 10^6 个细胞、大于 10^7 个细胞、大于 10^8 个细胞、大于 10^9 个细胞、大于 10^{10} 个细胞或大于 10^{11} 个细胞(包括这些值之间的任何值和范围)。

[0334] 在本文披露的组合物和配制品中,细胞的体积通常为一升或更少、500ml或更少、250ml或更少或100ml或更少。因此,施用的细胞密度典型地大于 10^4 个细胞/ml、 10^7 个细胞/ml或 10^8 个细胞/ml。

[0335] 本文还提供了核酸组合物(如药物组合物,在本文中也称为配制品),其包含编码

本文所述的识别分子(或其一个或多个部分)、任选的COR和/或任选的bNAbs的核酸中的任一个。在一些实施例中,该核酸组合物是药物组合物。在一些实施例中,该核酸组合物进一步包含等渗剂、赋形剂、稀释剂、增稠剂、稳定剂、缓冲液和/或防腐剂中的任一种;和/或水性媒介物,如纯化水、糖水溶液、缓冲液溶液、生理盐水、聚合物水溶液或无RNA酶的水。可以根据核酸组合物的使用形式来适当地选择待添加的此类添加剂和水性媒介物的量。

[0336] 本文披露的组合物和配制品可以通过例如注射、输液、灌注或灌洗来制备用于施用。组合物和配制品可以进一步配制用于骨髓、静脉内、皮内、动脉内、结内、淋巴管内、腹膜内、病灶内、前列腺内、阴道内、直肠内、局部、鞘内、肿瘤内、肌内、囊内和/或皮下注射。

[0337] 用于体内施用的配制品必须是无菌的。这可以通过例如穿过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

赋形剂

[0338] 本申请的药物组合物可用于治疗目的。因此,与包含工程化免疫细胞(如表达识别分子、任选地COR和/或任选地bNAbs的生产细胞)的其他组合物不同,本申请的药物组合物包含适用于施用于个体的药学上可接受的赋形剂。

[0339] 合适的药学上可接受的赋形剂可以包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。在一些实施例中,该药学上可接受的赋形剂包含自体血清。在一些实施例中,该药学上可接受的赋形剂包含人血清。在一些实施例中,该药学上可接受的赋形剂是无毒的、生物相容的、非免疫原性的、可生物降解的,并且可以避免被宿主的防御机制识别。赋形剂还可以含有佐剂,如防腐稳定剂、润湿剂、乳化剂等。在一些实施例中,该药学上可接受的赋形剂增强工程化免疫细胞或其分泌的抗体或其他治疗蛋白的稳定性。在一些实施例中,该药学上可接受的赋形剂减少由工程化免疫细胞分泌的抗体或其他治疗蛋白的聚集。最终形式可以是无菌的并且还可以能容易地通过如空心针的注射装置。通过恰当地选择赋形剂可以实现和维持适当的粘度。

[0340] 在一些实施例中,将药物组合物配制成具有约4.5至约9.0范围内的pH,包括例如约5.0至约8.0、约6.5至约7.5或约6.5至约7.0中的任一个的pH范围。在一些实施例中,还可以通过添加合适的张力改性剂如甘油使药物组合物与血液等渗。

[0341] 在一些实施例中,药物组合物适用于施用于人。在一些实施例中,药物组合物适用于通过肠胃外施用来施用于人。适用于肠胃外施用的配制品包括水性和非水性等渗无菌注射溶液(其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使配制品与预期接受体的血液相容的溶质),以及水性和非水性无菌悬浮液(其包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂)。配制品可以存在于单位剂量或多剂量密封容器(如安瓿和小瓶)中,并且可以在临使用前储存在仅需要添加用于注射的本文所述的治疗方法、施用方法和剂量方案的无菌液体赋形剂(即水)的条件下。在一些实施例中,药物组合物包含在单次使用的小瓶中,例如单次使用的密封小瓶。在一些实施例中,药物组合物包含在多次使用的小瓶中。在一些实施例中,药物组合物以散装包含在容器中。在一些实施例中,将药物组合物冷冻保存。

[0342] 在一些实施例中,将药物组合物配制成用于静脉内施用。在一些实施例中,将药物组合物配制成用于皮下施用。在一些实施例中,将药物组合物配制用于对肿瘤部位进行局

部施用。在一些实施例中,将药物组合物配制用于瘤内注射。

[0343] 在一些实施例中,药物组合物必须满足用于向个体施用的某些标准。例如,美国食品与药品管理局已经发布了为基于细胞的免疫治疗产品设定标准的监管指南,包括21 CFR 610和21 CFR 610.13。本领域已知评估药物组合物的外观、特性、纯度、安全性和/或效力的方法。在一些实施例中,药物组合物基本上不含能够产生过敏作用的外来蛋白质,例如细胞培养中使用的除工程化哺乳动物免疫细胞之外的动物来源的蛋白质。在一些实施例中,“基本上不含”小于药物组合物的总体积或重量的约10%、5%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、1ppm或更少中的任一个。在一些实施例中,药物组合物在GMP级工作坊(GMP-level workshop)中制备。在一些实施例中,对于肠胃外施用,药物组合物包含小于约5EU/kg体重/小时的内毒素。在一些实施例中,对于静脉内施用,药物组合物中至少约70%的工程化免疫细胞是活的。在一些实施例中,当使用如美国药典(USP)中所述的14天直接接种测试方法评估时,药物组合物具有“无生长”结果。在一些实施例中,在施用药物组合物之前,包括工程化免疫细胞和药学上可接受的赋形剂两者的样品应在最终收获前约48-72小时(或与培养物的最后再补料(re-feeding)同时)取出用于无菌测试。在一些实施例中,药物组合物不含支原体污染。在一些实施例中,药物组合物不含可检测的微生物剂。在一些实施例中,药物组合物不含传染病病原,例如HIV I型、HIV II型、HBV、HCV、人嗜T淋巴细胞病毒I型和人嗜T淋巴细胞病毒II型。

使用工程化免疫细胞治疗疾病的方法

[0344] 本申请进一步提供了施用工程化免疫细胞以治疗疾病的方法,这些疾病包括但不限于传染病、EBV阳性T细胞淋巴增生性疾病、T幼淋巴细胞白血病、EBV阳性T细胞淋巴增生性疾病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、蕈样真菌病/塞扎里综合征、原发性皮肤T细胞淋巴增生性疾病、外周T细胞淋巴瘤(非特指型)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤以及自身免疫病。

[0345] 含有远端部分-识别分子的工程化免疫细胞特别适用于自体疗法。在一些实施例中,在治疗中使用自体淋巴细胞输注。从需要治疗的患者中收集自体PBMC,并且使用本文所述和本领域已知的方法激活和扩增T细胞,然后回输给患者。在一些实施例中,工程化免疫细胞的施用导致个体中包含远端部分-识别分子的工程化免疫细胞的消耗(例如约70%、80%、90%、99%或更多的减少,或完全消除)。

[0346] 含有近端部分识别分子的工程化免疫细胞特别适用于同种异体疗法。在一些实施例中,工程化免疫细胞的施用导致个体中包含近端部分-识别分子的工程化免疫细胞减少不超过约50%(如不超过约40%、30%、20%、10%或5%中的任一个)。

[0347] 工程化免疫细胞可以进行强力的体内扩增,并且可以建立靶抗原(例如,CD4或CD22)特异性记忆细胞,这些靶抗原特异性记忆细胞在血液和骨髓中长期维持在高水平。在一些实施例中,输注到患者体内的工程化免疫细胞可以消耗癌症或病毒感染的细胞。在一些实施例中,输注到患者体内的工程化免疫细胞可以消除癌症或病毒感染的细胞。可以通过以下评估病毒感染治疗,例如,通过病毒载量、存活持续时间、生活质量、蛋白质表达和/或活性。

[0348] 在一些实施例中,可以将本申请的工程化免疫细胞施用于个体(例如哺乳动物,如人)以治疗癌症,例如T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B

细胞淋巴瘤。因此,在一些实施例中,本申请提供了治疗个体的癌症的方法,该方法包括向该个体施用有效量的包含根据本文所述的实施例中任一个的工程化免疫细胞的组合物(如药物组合物)。在一些实施例中,癌症是T细胞淋巴瘤。

[0349] 在一些实施例中,本文所述的治疗癌症的方法进一步包括向个体施用第二抗癌剂。合适的抗癌剂包括但不限于,CD70靶向药物、TRBC1、CD30靶向药物、CD37靶向药物、CCR4靶向药物、CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松)、CHOEP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、依托泊苷和泼尼松)、EPOCH (依托泊苷、长春新碱、多柔比星、环磷酰胺和泼尼松)、Hyper-CVAD (环磷酰胺、长春新碱、多柔比星和地塞米松)、HDAC抑制剂、CD52抗体贝利司他、苯达莫司汀、BL-8040、硼替佐米、CPI-613、莫加利珠单抗、奈拉滨、纳武单抗、罗米地辛和鲁索替尼。在一些实施例中,第二药剂是免疫检查点抑制剂(例如,抗CTLA4抗体、抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)。在一些实施例中,将第二抗癌剂与工程化免疫细胞同时施用。在一些实施例中,将第二抗癌剂与工程化免疫细胞依次(例如,之前或之后)施用。在一些实施例中,将本发明的工程化免疫细胞组合物与第二、第三或第四药剂(包括例如抗肿瘤剂、生长抑制剂、细胞毒性剂或化疗剂)组合施用以治疗涉及靶抗原表达的疾病或障碍。

[0350] 还可以将本申请的工程化免疫细胞施用于个体(例如哺乳动物,如人)以治疗传染病,例如HIV。因此,在一些实施例中,本申请提供了治疗个体的传染病的方法,该方法包括向该个体施用有效量的包含根据本文所述的实施例中的任一个的工程化免疫细胞的组合物(如药物组合物)。在一些实施例中,病毒感染由选自例如人T细胞白血病病毒(HTLV)和HIV(人免疫缺陷病毒)的病毒引起。

[0351] 在一些实施例中,提供了治疗HIV的方法,这些方法包括施用本文所述的工程化免疫细胞中的任一个。HIV有两种亚型:HIV-1和HIV-2。HIV-1是导致全球大流行的原因,并且是具有高毒力和高传染性的病毒。然而,HIV-2仅在西非流行,并且不具有像HIV-1那样的毒力和传染性。HIV-1和HIV-2感染之间毒力和传染性的差异可能源于HIV-2感染中针对病毒蛋白的更强免疫响应,导致在受影响个体中的更有效地控制(Leligdowicz, A. 等人(2007) J.Clin.Invest.117(10):3067-3074)。这也可能是HIV-1全球传播和HIV-2有限地理流行的控制性原因。

[0352] 尽管与HIV-1感染相比,HIV-2感染得到更好的控制,但HIV-2影响的个体仍然受益于治疗。在一些实施例中,将工程化免疫细胞用于治疗HIV-1感染。在其他实施例中,将工程化免疫细胞用于治疗HIV-2感染。在一些实施例中,将工程化免疫细胞用于治疗HIV-1和HIV-2感染。

[0353] 在一些实施例中,本文所述的治疗传染病的方法进一步包括向个体施用第二抗传染病剂。合适的抗传染病剂包括但不限于,抗逆转录病毒药物、广泛中和抗体、toll样受体激动剂、潜伏再激活剂(latency reactivation agent)、CCR5拮抗剂、免疫刺激剂(例如,TLR配体)、疫苗、核苷逆转录酶抑制剂、核苷逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、HIV蛋白酶抑制剂和融合抑制剂。在一些实施例中,将第二抗感染剂与工程化免疫细胞同时施用。在一些实施例中,将第二抗感染剂与工程化免疫细胞依次(例如,之前或之后)施用。

[0354] 在一些实施例中,个体是哺乳动物(例如,人、非人灵长类、大鼠、小鼠、牛、马、猪、羊、山羊、狗、猫等)。在一些实施例中,个体是人。在一些实施例中,个体是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。在一些实施例中,该个体小于约60岁(包括例如小于约50、40、30、

25、20、15或10岁中的任一个)。在一些实施例中,个体年龄大于约60岁(包括例如大于70、80、90或100岁中的任一个)。在一些实施例中,个体被诊断患有或环境上或遗传上倾向于本文所述的一种或多种疾病或障碍(如癌症或病毒感染)。在一些实施例中,个体具有与本文所述的一种或多种疾病或障碍相关的一种或多种危险因素。

[0355] 在一些实施例中,将药物组合物以至少约 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或 10^9 个细胞/kg体重中的任一个剂量施用。在一些实施例中,将药物组合物以约 10^4 至约 10^5 、约 10^5 至约 10^6 、约 10^6 至约 10^7 、约 10^7 至约 10^8 、约 10^8 至约 10^9 、约 10^4 至约 10^9 、约 10^4 至约 10^6 、约 10^6 至约 10^8 或约 10^5 至约 10^7 个细胞/kg体重中的任一个剂量施用。

[0356] 在其中施用多于一种类型的工程化免疫细胞的一些实施例中,可以将不同类型的工程化免疫细胞同时施用于个体(例如在单一组合物中),或以任何合适的顺序依次施用于个体。

[0357] 在一些实施例中,施用一次药物组合物。在一些实施例中,施用多次(例如2、3、4、5、6或更多次中的任一个)药物组合物。在一些实施例中,每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次、每6个月一次、每7个月一次、每8个月一次、每9个月一次或每年一次施用药物组合物。在一些实施例中,施用之间的间隔是约1周至2周、2周至1个月、2周至2个月、1个月至2个月、1个月至3个月、3个月至6个月或6个月至一年中的任一个。通过监测患者的疾病体征并相应调整治疗,医学领域的技术人员可以容易地确定针对特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0358] 因此,例如,在一些实施例中,提供了治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

[0359] 在一些实施例中,提供了治疗患有癌症(例如,B细胞相关的癌症,例如B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病或B细胞淋巴瘤)的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的包含抗CD22免疫细胞受体的工程化免疫细胞(或包含工程化免疫细胞的药物组合物),其中该抗CD22免疫细胞受体包含含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D1-4 CAR。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D1-4 cTCR。在一些实施例中,该癌症是CD22⁺。在一些实施例中,该癌症是B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病。在一些实施例中,该癌症是B细胞淋巴瘤。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用第二抗癌剂,例如选自以下组成的组的抗癌剂:CD70靶向药物、TRBC1、CD30靶向药物、CD37靶向药物、CCR4靶向药物、CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松)、CHOEP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、依托泊苷和泼尼松)、EPOCH(依托泊苷、长春新碱、多柔比星、环磷酰胺和泼尼松)、Hyper-CVAD(环磷酰胺、长春新碱、多柔比星和地塞米松)、HDAC抑制剂、CD52抗体贝利司他、

苯达莫司汀、BL-8040、硼替佐米、CPI-613、莫加利珠单抗、奈拉滨、纳武单抗、罗米地辛和鲁索替尼。在一些实施例中,该第二抗癌剂是检查点抑制剂(如抗CTLA4、抗PD1和抗PD-L1)。在一些实施例中,该方法进一步包括从该个体获得免疫细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括将编码抗CD22 D1-4免疫细胞受体的一种或多种核酸引入免疫细胞中,以产生包含抗CD22 D1-4免疫细胞受体的工程化免疫细胞。在一些实施例中,工程化免疫细胞的施用导致个体中包含抗CD22 D1-4免疫细胞受体的工程化免疫细胞的减少(例如约70%、80%、90%、99%或更多的减少,或完全消除)。

[0360] 在一些实施例中,提供了将在其表面表达靶分子的靶细胞(如癌细胞)数量减少的方法,该方法包括将这些靶细胞与有效量的工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 γ δ T细胞)接触,这些工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与在该靶细胞的表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中这些工程化免疫细胞和这些靶细胞衍生自相同个体。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

[0361] 在一些实施例中,提供了减少CD22+细胞(例如,B细胞相关的CD22+癌细胞,例如B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病细胞或B细胞淋巴瘤细胞)数量的方法,该方法包括将这些CD22+细胞与有效量的包含抗CD22免疫细胞受体的工程化免疫细胞(或包含工程化免疫细胞的药物组合物)接触,其中该抗CD22免疫细胞受体包含含有与CD22的D1-4内的表位特异性结合的CD2结合部分的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,并且其中这些工程化免疫细胞和这些CD22+细胞衍生自相同个体。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D1-4CAR。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D1-4 cTCR。

[0362] 在一些实施例中,提供了治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 γ δ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

[0363] 在一些实施例中,提供了治疗患有癌症(例如,B细胞相关的癌症,例如B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病或B细胞淋巴瘤)的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的包含抗CD22免疫细胞受体的工程化免疫细胞(或包含工程化免疫细胞的药物组合物),其中该抗CD22免疫细胞受体包含含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D5-7 CAR。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D5-7 cTCR。在一些实施例中,该癌症是

CD22⁺。在一些实施例中,该癌症是B细胞淋巴瘤。在一些实施例中,该方法进一步包括向该个体施用第二抗癌剂,例如选自由以下组成的组的抗癌剂:CD70靶向药物、TRBC1、CD30靶向药物、CD37靶向药物和CCR4靶向药物。在一些实施例中,该第二抗癌剂是检查点抑制剂(如抗CTLA4、抗PD1和抗PD-L1)。在一些实施例中,该方法进一步包括从供体个体获得免疫细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括将编码抗CD22D5-7免疫细胞受体的一种或多种核酸引入免疫细胞中,以产生包含抗CD22 D5-7免疫细胞受体的工程化免疫细胞。在一些实施例中,工程化免疫细胞的施用导致个体中包含抗CD22 D5-7免疫细胞受体的工程化免疫细胞减少不超过约50%(如不超过约40%、30%、20%、10%或5%中的任一个)。在一些实施例中,修饰工程化免疫细胞以灭活参与MHC识别的TCR组分。在一些实施例中,工程化免疫细胞不引起GvHD。

[0364] 在一些实施例中,提供了将在其表面表达靶分子的靶细胞(如癌细胞)数量减少的方法,该方法包括将这些靶细胞与有效量的工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)接触,这些工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与在该靶细胞的表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度为至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中这些工程化免疫细胞和这些靶细胞衍生自不同个体。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

[0365] 在一些实施例中,提供了减少CD22⁺细胞(例如,B细胞相关的CD22⁺癌细胞,例如B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病细胞或B细胞淋巴瘤细胞)数量的方法,该方法包括将这些CD22⁺细胞与有效量的包含抗CD22免疫细胞受体的工程化免疫细胞(或包含工程化免疫细胞的药物组合物)接触,其中该抗CD22免疫细胞受体包含含有与CD22的D5-7内的表位特异性结合的CD22结合部分的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,并且其中这些工程化免疫细胞和这些CD22⁺细胞衍生自不同个体。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22D5-7CAR。在一些实施例中,该抗CD22免疫细胞受体是抗CD22 D5-7 cTCR。

[0366] 因此,例如,在一些实施例中,提供了治疗患有传染病(如HIV)的个体的方法,该方法包括向该个体施用工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

[0367] 在一些实施例中,提供了治疗患有传染病(如HIV)的个体的方法,该方法包括向该个体施用工程化免疫细胞(如细胞毒性T细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞),该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域(如长度是至少约175个氨基酸的细胞外结构域),其中该结

合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合,其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子,并且其中该工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异体的。在一些实施例中,该识别分子是免疫细胞受体,如CAR或cTCR。

制品和试剂盒

[0368] 在本申请的一些实施例中,提供了含有对治疗癌症(例如,B细胞相关癌症)或传染病如病毒感染(例如,被HIV感染)有用的材料的制品。该制品可以包括容器和该容器上或与该容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如,瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。通常,容器容纳有效治疗本文所述的疾病或障碍的组合物,并且可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是在其表面存在本文所述的识别分子的工程化免疫细胞。标签或包装插页指示组合物用于治疗特定疾病或病症。标签或包装插页将进一步包含向患者施用工程化免疫细胞组合物的说明书。还考虑了包含本文描述的组合疗法的制品和试剂盒。

[0369] 包装插页是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,这些说明书含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。在其他实施例中,包装插页指示组合物用于治疗靶抗原阳性病毒感染(例如被HIV感染)或癌症(例如,B细胞相关癌症)。

[0370] 另外地,该制品可以进一步包含第二容器,该容器包含药学上可接受的缓冲液,如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。其可以进一步包括从商业和用户角度所希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0371] 还提供了可用于各种目的的试剂盒,例如任选地与制品组合的用于治疗本文所述的靶抗原阳性疾病或障碍。本发明的试剂盒包括包含工程化免疫细胞组合物(或单位剂型和/或制品)的一个或多个的容器,并且在一些实施例中,进一步包含另一种药剂(如本文所述的药剂)和/或根据本文所述的任一方法的使用说明。该试剂盒可进一步包含选择适合治疗个体的描述。本申请的试剂盒中提供的说明书典型地是标签或包装插页上的书面说明(例如,试剂盒中包含的纸片),但机器可读的说明书(例如,磁性或光学存储盘上携带的说明)也是可以接受的。

[0372] 本领域技术人员将会认识到,在本发明的范围和精神内,多个实施例是可能的。现在将参考以下非限制性示例性实施例和实例更详细地描述本发明。以下示例性实施例和实例进一步说明本发明,但当然不应解释为以任何方式限制其范围。

示例性实施例

[0373] 本申请提供以下实施例:

1. 一种工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子,该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分,其中该靶分子包含细胞外结构域,其中该结合部分与该细胞外结构域的远端部分特异性结合,其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面包含该靶分子,并且其中该免疫细胞能够杀伤靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

2.如实施例1所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子包含该结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

3.如实施例1或2所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分是单域抗体(sdAb)、scFv、Fab'、(Fab')₂Fv或肽配体。

4.如实施例1-3中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞外结构域的远端部分到该靶细胞的膜的距离是该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的例如约0.5倍以上(例如约1倍、1.5倍、2倍或更多倍以上)。

5.如实施例1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸。

6.如实施例1-5中任一项所述的工程化免疫细胞,其中

(i) 该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个或更多个氨基酸的区域结合;

(ii) 该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约80个或更多个氨基酸的区域结合;和/或

(iii) 该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约120(例如,约80)个氨基酸内的区域结合。

7.如实施例1-6中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞外结构域的远端部分距该靶细胞的膜至少约30 Å(例如,至少约40、60、90、120或更多Å)。

8.如实施例1-7中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子的细胞外结构域包含三个或更多个Ig样结构域。

9.如实施例8所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前两个(例如,前三个)Ig样结构域外的区域结合。

10.如实施例8或9所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的前四个(例如,第一个)Ig样结构域内的区域结合。

11.如实施例1-10中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子是跨膜受体。

12.如实施例11所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子选自以下组成的组:CD22、CD4、CD21(CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。

13.如实施例12所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子是CD22。

14.如实施例13所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与参考抗体竞争结合,该参考抗体与CD22的结构域1-4内的表位特异性结合(“抗CD22 D1-4抗体”)。

15.如实施例13或14所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与CD22的结构域1-4中的表位结合,该表位与参考抗CD22 D1-4抗体的结合表位重叠。

16.如实施例13-15中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分包含与参考抗CD22 D1-4抗体相同的重链和轻链CDR序列。

17.如实施例16所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分包含与参考抗CD22D1-4抗体相同的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)序列。

18.如实施例14-17中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该参考抗CD22 D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链CDR1(HC-CDR1)、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的重链CDR2(HC-CDR2)、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链CDR3(HC-CDR3)、含

有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的轻链CDR1 (LC-CDR1)、含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的轻链CDR2 (LC-CDR2) 和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链CDR3 (LC-CDR3)。

19. 如实施例14-18中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该参考抗CD22D1-4抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

20. 如实施例1-19中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域近端部分结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比, 该工程化免疫细胞能够杀伤至少3倍的靶细胞, 该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

21. 一种工程化免疫细胞, 该工程化免疫细胞在其表面包含识别分子, 该识别分子包含与靶细胞表面上的靶分子特异性结合的结合部分, 其中该靶分子包含细胞外结构域, 其中该结合部分与该细胞外结构域的近端部分特异性结合, 其中该工程化免疫细胞能够杀伤靶细胞, 该靶细胞在其表面包含该靶分子, 并且其中该工程化免疫细胞不具有杀伤靶细胞的能力或具有减少的杀伤靶细胞的能力, 该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

22. 如实施例21所述的工程化免疫细胞, 其中该识别分子包含该结合部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

23. 如实施例21或22所述的工程化免疫细胞, 其中该结合部分是sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

24. 如实施例21-23中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该细胞外结构域的近端部分到该靶细胞的膜的距离不超过该结合部分到该工程化免疫细胞的膜的距离的约2倍(例如, 不超过约1.5倍或不超过约1倍)。

25. 如实施例21-24中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该靶分子的细胞外结构域的长度是至少约175个氨基酸。

26. 如实施例21-25中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中

(i) 该结合部分与距该细胞外结构域的N-末端约80个或更多个氨基酸的区域外的部分结合;

(ii) 该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约120(例如, 约102)个氨基酸内的区域结合; 和/或

(iii) 该结合部分与该细胞外结构域中距该细胞外结构域的C-末端约50个氨基酸内的区域结合。

27. 如实施例21-26中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该细胞外结构域的近端部分距该靶细胞的膜不超过约120 Å(例如, 不超过约100、90、80、70或60 Å)。

28. 如实施例21-27中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该靶分子的细胞外结构域包含两个或更多个Ig样结构域。

29. 如实施例28所述的工程化免疫细胞, 其中该结合部分与该细胞外结构域的N-末端的第一个(例如, 前四个) Ig样结构域外的区域结合。

30. 如实施例29所述的工程化免疫细胞, 其中该结合部分与该细胞外结构域的C-末端的前三个(例如, 前两个) Ig样结构域内的区域结合。

31. 如实施例21-30中任一项所述的工程化免疫细胞, 其中该靶分子是跨膜受体。

32. 如实施例31所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子选自由以下组成的组: CD22、CD4、CD21 (CR2)、CD30、ROR1、CD5和CD20。

33. 如实施例32所述的工程化免疫细胞,其中该靶分子是CD22。

34. 如实施例33所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与参考抗体竞争结合,该参考抗体与CD22的结构域5-7内的表位特异性结合(“抗CD22 D5-7抗体”)。

35. 如实施例33或34所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与CD22的结构域5-7中的表位结合,该表位与参考抗CD22 D5-7抗体的结合表位重叠。

36. 如实施例33-35中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分包含与参考抗CD22 D5-7抗体相同的重链和轻链CDR序列。

37. 如实施例36所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分包含与参考抗CD22D5-7抗体相同的VH和VL序列。

38. 如实施例34-37中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HC-CDR1、含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HC-CDR2、含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HC-CDR3、含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的LC-CDR1、含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的LC-CDR2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的LC-CDR3。

39. 如实施例35-38中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该参考抗CD22 D5-7抗体包含含有SEQ ID NO:82的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VL。

40. 如实施例21-39中任一项所述的工程化免疫细胞,其中与在其表面包含含有与靶分子细胞外结构域远端结合的结合部分的识别分子的工程化免疫细胞相比,该工程化免疫细胞杀伤不超过约20%的靶细胞,该靶细胞在其表面同时包含该靶分子和该识别分子。

41. 如实施例1-40中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是单特异性的。

42. 如实施例1-40中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是多特异性的。

43. 如实施例42所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子包含特异性识别第二靶分子的第二结合部分。

44. 如实施例43所述的工程化免疫细胞,其中该第二结合部分是sdAb、scFv、Fab'、(Fab')₂、Fv或肽配体。

45. 如实施例43或44所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与该第二结合部分串联连接。

46. 如实施例45所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分在该第二结合部分的N-末端。

47. 如实施例45所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分在该第二抗原结合部分的C-末端。

48. 如实施例43-47中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与该第二结合部分经由接头连接。

49. 如实施例2-48中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与该跨膜结构域直接或间接融合。

50.如实施例49所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽非共价地结合。

51.如实施例50所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子包含i)含有该结合部分和结合对的第一成员的第一多肽;和ii)含有该结合对的第二成员的第二多肽,其中该第一成员和该第二成员彼此结合,并且其中该第二成员与该跨膜结构域直接或间接融合。

52.如实施例49所述的工程化免疫细胞,其中该结合部分与包含该跨膜结构域的多肽融合。

53.如实施例1-52中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是嵌合抗原受体(“CAR”)。

54.如实施例53所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、4-1BB、CD80、CD86、CD152和PD1。

55.如实施例54所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自CD8 α 。

56.如实施例53-55中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的初级细胞内信号传导结构域。

57.如实施例56所述的工程化免疫细胞,其中该初级细胞内信号传导结构域衍生自CD3 ζ 。

58.如实施例53-57中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。

59.如实施例58所述的工程化免疫细胞,其中该共刺激信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD40、PD-1、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、TNFRSF9、TNFRSF4、TNFRSF8、CD40LG、ITGB2、KLRC2、TNFRSF18、TNFRSF14、HAVCR1、LGALS9、DAP10、DAP12、CD83、CD83的配体及其组合。

60.如实施例59所述的工程化免疫细胞,其中该共刺激信号传导结构域包含4-1BB的胞内结构域。

61.如实施例53-60中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子进一步包含位于该结合部分的C-末端与该跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。

62.如实施例61所述的工程化免疫细胞,其中该铰链结构域衍生自CD8 α 或IgG4CH2-CH3。

63.如实施例1-52中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子是嵌合T细胞受体(“cTCR”)。

64.在如实施例63所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的跨膜结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。

65.如实施例64所述的工程化免疫细胞,其中该跨膜结构域衍生自CD3 ϵ 的跨膜结构域。

66.如实施例63-65中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的TCR亚基的细胞内信号传导结构域:TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 和CD3 δ 。

67.如实施例66所述的工程化免疫细胞,其中该细胞内信号传导结构域衍生自CD3

ε的细胞内信号传导结构域。

68.如实施例66或67所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子的跨膜结构域和细胞内信号传导结构域衍生自同一TCR亚基。

69.如实施例63-68中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该识别分子进一步包含TCR亚基的细胞外结构域的至少一部分。

70.如实施例69所述的工程化免疫细胞,其中将该结合部分与CD3ε的N-末端融合(“eTCR”)。

71.如实施例1-70中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该工程化免疫细胞是T细胞。

72.如实施例71所述的工程化免疫细胞,其中该免疫细胞选自由以下组成的组:细胞毒性T细胞、辅助T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NK-T)细胞和γδT细胞。

73.如实施例1-72中任一项所述的工程化免疫细胞,该工程化免疫细胞进一步包含共受体。

74.如实施例73所述的工程化免疫细胞,其中该共受体是趋化因子受体。

75.如实施例1-74中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶细胞是免疫细胞。

76.如实施例1-74中任一项所述的工程化免疫细胞,其中该靶细胞是肿瘤细胞。

77.一种药物组合物,该药物组合物包含如实施例1-20和41-76中任一项所述的工程化免疫细胞。

78.一种药物组合物,该药物组合物包含如实施例21-76中任一项所述的工程化免疫细胞。

79.一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如实施例77所述的药物组合物。

80.如实施例79所述的方法,其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。

81.如实施例79或80所述的方法,其中该癌症选自由以下组成的组:T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B细胞淋巴瘤。

82.一种治疗患有传染病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如实施例77所述的药物组合物。

83.如实施例82所述的方法,其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是自体的。

84.如实施例82或83所述的方法,其中该传染病是由选自由HIV和HTLV组成的组的病毒的感染。

85.如实施例84所述的方法,其中该传染病是HIV。

86.一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如实施例78所述的药物组合物。

87.如实施例86所述的方法,其中该工程化免疫细胞对于该个体来说同种异体的。

88.如实施例86或87所述的方法,其中该癌症选自由以下组成的组:T细胞淋巴瘤、白血病、B细胞前体急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和B细胞淋巴瘤。

89.一种治疗患有传染病的个体的方法,该方法包括向该个体施用有效量的如实施例78所述的药物组合物。

90.如实施例89所述的方法,其中这些工程化免疫细胞对于该个体来说是同种异

体的。

91. 如实施例89或90所述的方法, 其中该传染病是由选自由HIV和HTLV组成的组的病毒的感染。

92. 如实施例91所述的方法, 其中该传染病是HIV。

93. 一种制造如实施例1-76中任一项所述的工程化免疫细胞的方法, 该方法包括将编码该识别分子的一种或多种核酸引入免疫细胞, 从而获得该工程化免疫细胞。

94. 一种组合物, 该组合物包含编码如实施例1-76中任一项所述的工程化免疫细胞的识别分子的一种或多种核酸。

实例

实例1: 材料与方法

[0374] CAR-T细胞构建。含有编码CAR的编码序列的质粒由Genscript合成并克隆到pLVX慢病毒载体中。将第二代慢病毒包装在293T细胞中。将泛T细胞从人PBMC (Hemacare) 中分离出来, 并通过抗CD3/抗CD28珠 (Miltenyi) 在体外活化2天, 然后在8 μ g/ml聚凝胺存在下用编码CAR的慢病毒转导。将细胞在32 $^{\circ}$ C下以1000g用慢病毒离心接种 (spinoculated) 1小时并在24孔板中培养。除去旧的培养基并在转导后一天添加新鲜培养基。

[0375] CAR-T细胞维持和表型。将CAR-T细胞在AIM-V培养基 (Thermal Fisher Scientific) +5%胎牛血清 (FBS) +300IU/ml IL-2中培养。在通过抗Fab抗体 (Jackson Laboratories) 转导后4天检测到CAR+百分比。细胞还用抗CD4和抗CD8抗体染色以表征群体。

[0376] 细胞杀伤测定。将T细胞白血病/淋巴瘤细胞系Sup-T1和HH或CFSE标记的人泛T细胞用作靶细胞。将CAR-T细胞用作效应细胞。以所希望的E:T比率下混合CAR-T细胞和靶细胞。共培养这些细胞, 然后收集以进行流式细胞术。另外收集上清液以用于细胞因子检测。通过CFSE阳性细胞率或CD4+阳性细胞率来确定靶细胞杀伤。

[0377] 结构域图谱。人CD4蛋白含有四个细胞外免疫球蛋白样结构域 (D1至D4) 和一个细胞内结构域 (D5)。将每个人CD4结构域克隆到小鼠CD4骨架中并替换小鼠CD4反向结构域以产生杂合CD4蛋白。将杂合CD4编码序列克隆到pcDNA3.4载体中, 并且在HEK-293细胞中瞬时表达。将抗人CD4抗体用于这些细胞的染色以确定每种抗体将识别哪个人CD4结构域。在BD FACS Celesta流式细胞仪上收集数据并通过Flowjo软件分析。

[0378] 表位分组实验。在Biacore仪器上进行表位分组实验。简而言之, 将第一抗体固定在芯片上, 在第一阶段期间CD4-Fc蛋白流过芯片。将第二抗体与CD4-Fc蛋白以2:1的比率混合, 并在第二阶段期间流过芯片。通过Biacore记录信号。

[0379] 抗体阻断测定。艾巴利珠单抗、曲加利珠单抗和扎诺利木单抗单克隆抗体由Genscript制造并用作实验中的阻断抗体。如图中所示的, 在50nM或100nM的阻断抗体不存在或存在下, 共培养效应子和CFSE标记的靶细胞。通过流式细胞术检测CFSE来测量靶细胞杀伤。如图中所示使用不同浓度的抗体。

[0380] CAR+肿瘤细胞杀伤测定。用抗CD4 CAR慢病毒转导人皮肤T淋巴瘤细胞系HH细胞并通过流式细胞术检测CAR+率。将 8×10^4 HH细胞或CAR-HH细胞用作靶细胞并与抗CD4 CAR-T效应细胞或UNT细胞以E:T=2:1共培养。在共培养8天后, 通过流式细胞术检测CD4+%。

[0381] 体内功效。NOD-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/NjuCr小鼠 (NCG) 小鼠购自南京大学南京

生物医药研究院(Nanjing Biomedical Research Institute of Nanjing University)并饲养在Genscript模型动物设施中。将新生NCG小鼠用人造血干细胞移植并且在实验中使用>15周龄的小鼠。用 3×10^5 CAR+抗CD4结构域1 CAR-T细胞或相同总量的未转导细胞(作为对照)治疗NCG小鼠。在治疗18天后,处死小鼠并用抗人CD45抗体、抗人CD4抗体和抗人CD8抗体染色脾细胞。将数据收集在BD FACS celesta流式细胞仪上并通过Flowjo软件分析。

实例2.抗CD4 CAR-T细胞的分析

[0382] 图1A描绘了抗CD4 CAR的结构,其由CD4结合部分(例如,scFv或sdAb)、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域组成。

[0383] 实例中使用的CAR-T细胞的CAR scFv区的SEQ ID NO如下:

CAR-T No.	HC-C DR1	HC-C DR2	HC-C DR3	LC-C DR1	LC-C DR2	LC-C DR3	VH	VL	CAR
1	1	2	3	4	5	6	7	8	33
4	9	10	11	12	13	14	15	16	34
5	17	18	19	20	21	22	23	24	35
2	25	26	27	28	29	30	31	32	36
3	46	47	48	49	50	51	52	53	54
6	55	56	57	58	59	60	61	62	63
跨膜结构域 (CD8 α 跨膜结构域): SEQ ID NO: 37									
共刺激结构域 (4-1-BB 共刺激结构域): SEQ ID NO: 38									
CD3 ζ 信号传导结构域: SEQ ID NO: 39									
铰链结构域 (CD8 α 铰链结构域): SEQ ID NO: 40									
CD3 ϵ 跨膜结构域: SEQ ID NO: 41									
CD3 ϵ 信号传导结构域: SEQ ID NO: 42									
CD3 ϵ 细胞外结构域: SEQ ID NO: 43									
全长 CD3 ϵ : SEQ ID NO: 44									
全长人 CD4: SEQ ID NO: 45									
抗 CD4 eTCR: SEQ ID NO: 64									

[0384] CAR-T No.1细胞中CAR+%率为13.9%并且在No.2细胞中CAR+%率为44.2%。No.2细胞中CAR+%率高于No.1,但杀伤效果与CAR+百分比无相关性。在No.1总细胞群中CD4+%为0%并且在No.2总细胞群中为17.2%。CD4+细胞主要是CAR+细胞,如图1B中的No.2细胞中的CAR+群体所示。因此,No.2 CAR+群体不容易被CAR-T杀伤。据报道,抗CD19 CAR可以阻断同一细胞上的CD19抗原(即,顺式阻断),并导致保护CAR转导的白血病细胞不被CAR-T细胞杀伤(参考:Nature Medicine volume 24,1499-1503页(2018))。我们的No.2 CAR-T的表型表明CAR可以阻断同一细胞上CD4被第二CAR杀伤。在No.1CAR-T细胞上未观察到自我保护。

[0385] 由于所有CAR均以相同的方式生成,并且它们唯一的区别是scFv区域。scFv可能导致我们在CAR-T No.1和No.2之间看到的不同表型。CAR-T No.1和No.2中的scFv分别衍生自扎诺利木单抗和艾巴利珠单抗。进行结构域图谱实验以检测识别这些抗体的CD4结构域。此实验中还包括一种另外的抗体,曲加利珠单抗。

[0386] CD4是免疫球蛋白超家族的成员。它含有四个细胞外免疫球蛋白结构域,从远端到近端到细胞膜的结构域1至4。将四个CD4细胞外结构域及其细胞内结构域命名为D1-D5并与

小鼠CD4骨架在HEK-293细胞中瞬时表达。将三种抗体用于在这293个细胞上通过流式细胞术检测人CD4 D1-D5表达。如图2中所示,艾巴利珠单抗和曲加利珠单抗与人CD4结构域2相互作用,而扎诺利木单抗主要识别人CD4结构域1。

[0387] 如图3A-3B中所示,基于本文讨论的结果,假设相互作用模型。如图3A中所示,CAR-T No.1带有可以识别人CD4结构域1的scFv,而CAR-T No.2具有可以识别结构域2的scFv。如图3B右侧所示,细胞膜的近端结构域与在同一细胞表面上表达的嵌合抗原受体的距离较短,因此嵌合抗原受体也许能与该近端结构域结合。嵌合抗原受体与同一细胞上的CD4之间的相互作用将防止CD4被另一个CAR-T识别,从而保护细胞不被第二CAR-T细胞杀伤。

实例3. 抗体阻断测定

[0388] 将抗CD4抗体用于模拟CAR scFv区与CD4分子之间的顺式相互作用。在阻断测定中使用三种抗体,即艾巴利珠单抗、曲加利珠单抗、扎诺利木单抗,这三种抗体在流式细胞术测定中分别主要识别CD4结构域2、结构域2和结构域1(图2)。首先,进行表位分组实验以检查三种抗体是否竞争相同的CD4结合位点。如图4A中所示,艾巴利珠单抗与曲加利珠单抗彼此竞争其与人CD4蛋白的结合。艾巴利珠单抗或曲加利珠单抗对扎诺利木单抗-CD4相互作用的影响很小。其次,将这些抗体用于测试其是否可以阻断CAR-T介导的靶细胞杀伤(图4B)。在抗体阻断实验中,将与CD4结构域1相互作用的CAR-T No.1用作效应细胞。如图4B中所示,当靶细胞与对照UNT细胞共培养时,有55%的CD4+细胞。当靶细胞与CAR-T No.1效应细胞一起孵育时,该百分比下降到6.5%。当将艾巴利珠单抗或曲加利珠单抗添加到培养物中时,CD4+细胞的百分比保持在约7%,表明这两种抗体不阻断CAR-T No.1介导的靶细胞识别和杀伤。当将扎诺利木单抗抗体添加到培养物中时,CD4+百分比增加到30%以上,表明CAR-T No.1介导的杀伤可以被结构域1识别扎诺利木单抗抗体阻断。这些结果表明,嵌合抗原受体与同一细胞上CD4的相互作用可以阻断另一个CAR-T细胞对CD4的识别。针对此实验的图4B的定量分析显示于图4C中。

实例4. 针对抗CD4 CAR-T细胞的测定

[0389] 对于自体疗法,当使用患者自身的T细胞生成CAR-T细胞时,识别CD4结构域1的抗CD4 CAR-T优于识别其他结构域的抗CD4 CAR-T。靶向抗CD4 CAR-T的结构域1不顺式阻断CD4并且可以消除CAR+和CAR-群体中的CD4+细胞,以避免CAR-T产物中任何可能感染HIV的CD4+T细胞污染或恶性T细胞污染。为了进一步证明抗CD4结构域1CAR-T的优势,测试了另外两种识别CD4的结构域1的抗CD4 CAR-T细胞。数据呈现在图5中。CAR-T No.4和No.5两者均识别CD4结构域1。CAR-T No.4和No.5中的scFv分别衍生自SK3和RPA-T4。为了证明识别CD4其他结构域的抗体的自我保护作用,测试了另外两种抗CD4 CAR-T(结构域2-3)。数据呈现在图9中。CAR-T No.3和No.6两者均识别CD4结构域2-3。

[0390] 将未转导的泛T细胞(UNT)用作阴性对照。将UNT和CAR-T细胞与CFSE标记的泛T细胞共培养24小时,然后收集它们以用于流式细胞术。通过CFSE区分效应细胞群和靶细胞群。在对照UNT样品中,共培养后18.9%的效应细胞是CD4+。No.4细胞的效应细胞群中有0%的CD4+细胞。对于CAR-T No.5,效应细胞群和靶细胞群中的CD4+百分比均小于1%。相反,No.3和No.6细胞的效应细胞群中分别有12.5%和13.1%的CD4+细胞。这进一步表明抗CD4结构域1CAR-T可以消除CAR-T细胞和靶细胞两者中的CD4+群体,在CAR-T细胞中无顺式阻断。

实例5. 抗CD4 CAR-T细胞的细胞杀伤测定

[0391] 为了进一步证明抗CD4 CAR-T细胞对在与CAR相同的细胞上表达的CD4分子无顺式保护,用CAR慢病毒转导CD4⁺T淋巴瘤细胞系HH。图6A中所呈现的数据显示77.8%的HH细胞在转导后是CAR⁺。这些细胞表达CD4和抗CD4结构域1CAR,并被命名为CAR-HH细胞。将CAR-HH细胞和单独的HH细胞与抗CD4结构域1CAR-T No.1细胞或对照UNT细胞共培养。图6B-6C显示培养8天后,UNT处理的HH细胞中有20%的CD4⁺细胞,并且UNT处理的CAR-HH细胞中有17.3%的CD4⁺细胞。然而,在与CAR-T细胞共培养的HH和CAR-HH样品中,剩余CD4⁺细胞的百分比均小于0.1%。CAR-T细胞可以杀死HH细胞,无论其是否表达CAR。这些数据证明抗CD4结构域1CAR未顺式阻断由抗CD4结构域CAR-T识别的CD4抗原。如果需要自体疗法,则它们可以消除残留的病毒感染的CD4⁺T细胞或CAR-T产品中污染的CD4⁺T淋巴瘤细胞。

实例6. 抗CD4 CAR-T细胞的体内分析

[0392] 为了测试抗CD4结构域1CAR-T细胞在体内是否有效,使用了具有人免疫系统的小鼠和恒河猴实验。对具有人T细胞的成年HIS小鼠静脉内注射抗CD4CAR-T细胞或UNT细胞。治疗后第18天,小鼠脾脏中的CD4/CD8比率示显于图7中。UNT小鼠脾脏中的CD4⁺百分比为43.1%,而CAR-T小鼠脾脏中的百分比降至1.25%。这些数据表明,抗CD4结构域1CAR-T No.1细胞在体内消除CD4⁺细胞方面非常有效。

[0393] 还在细胞衍生的异种移植小鼠(CDX)模型中评估了抗CD4结构域1CAR-T细胞的功效。将移植HH T细胞淋巴瘤细胞的小鼠用抗CD4 CAR-T No.1细胞、HBSS缓冲液或UNT细胞治疗。如图6D中所示,CAR-T治疗后15天内,肿瘤大小减小至0,而在两个对照组中,肿瘤持续生长直至实验结束或直至由于肿瘤负荷必需处死小鼠。

[0394] 还将抗CD4结构域1scFv构建到嵌合T细胞受体("cTCR")中。在此实例中,将它与CD3 ϵ 连接,因此被命名为抗CD4 eTCR。如图8A中所示,转导后46%的T细胞为eTCR⁺。当与泛T细胞靶细胞一起培养时,抗CD4 eTCR细胞产生IFN γ ,但水平仅略有增加。图8C显示了抗CD4 eTCR细胞的扩增。细胞在培养10天内剧烈扩增。图8D显示了这些抗CD4 eTCR细胞对靶细胞的杀伤。将CFSE标记的泛T细胞用作靶细胞,并与抗CD4 eTCR细胞共培养24小时,然后收获他们以用于流式细胞术。抗CD4 eTCR细胞可以消除所有CD4⁺T细胞,如图8D右侧所示。

实例7. 针对抗CD22 CAR-T的测定

[0395] 与CD4的实例类似,我们假设当细胞膜附近有3个结构域时,可能会有自我保护作用。细胞膜的近端结构域与在同一细胞表面上表达的嵌合抗原受体的距离更短(3个结构域内),因此嵌合抗原受体也许能与该近端结构域结合。嵌合抗原受体与同一细胞上的CD22之间的相互作用将防止CD22被另一个抗CD22 CAR-T识别,从而保护细胞不被第二抗CD22 CAR-T细胞杀伤。

[0396] 为了检验此假设,测试了两种抗CD22 CAR-T(图10和11A)。CAR-T No.454识别CD22的结构域3,并且CAR-T No.447识别CD22的结构域5-7(细胞膜附近的3个结构域)。将UNT细胞(未转导的T细胞)和CAR-T细胞与CFSE标记的泛T靶细胞("ARH细胞")以0.5:1的E:T(效应子:靶标)比率共培养24小时。通过流式细胞术检测剩余的靶细胞。

[0397] 抗CD22 CAR-T细胞的CAR scFv区的序列如下:

CAR-T No.	HC-C DR1	HC-C DR2	HC-C DR3	LC-C DR1	LC-C DR2	LC-C DR3	VH	VL	CAR
454	67	68	69	70	71	72	73	74	75
447	76	77	78	79	80	81	82	83	84
跨膜结构域 (CD8 α 跨膜结构域): SEQ ID NO: 37									
共刺激结构域 (4-1-BB 共刺激结构域): SEQ ID NO: 38									
CD3 ζ 信号传导结构域: SEQ ID NO: 39									
铰链结构域 (CD8 α 铰链结构域): SEQ ID NO: 40									
CD3 ϵ 跨膜结构域: SEQ ID NO: 41									
CD3 ϵ 信号传导结构域: SEQ ID NO: 42									
CD3 ϵ 细胞外结构域: SEQ ID NO: 43									
全长 CD3 ϵ : SEQ ID NO: 44									
全长人 CD22: SEQ ID NO: 66									

[0398] 如图11B和11C中所示, CAR-T No. 454可以杀伤靶ARH和CAR454-ARH细胞, 表明CAR-T No. 454对自身没有保护作用。相反, 识别结构域5-7的CAR-T No. 447仅能杀伤靶ARH细胞, 其中剩余8.15%的CAR447-ARH细胞。这表明CAR-T No. 447对共表达CAR和CD22的细胞具有保护作用。

序列表

[0399] 根据本发明的实施例的示例性构建体的序列:

名称	Seq ID	CDR1 序列	Seq ID	CDR2 序列	Seq ID	CDR3 序列
CAR-T No. 1 VH	1	GGSFSGY	2	NHSGS	3	VINWFDP
CAR-T No. 1 VL	4	RASQDISSWLA	5	AASSLQS	6	QQANSFPYT
CAR-T No. 4 VH	9	GYTFTDYV	10	TYTGSGSS	11	RGKGTGFAF
CAR-T No. 4 VL	12	QSVDDYDGDSY	13	AASNLES	14	QQSYEDPPT
CAR-T No. 5 VH	17	GYTFTNY	18	DPSTGY	19	EGGIGGFAY
CAR-T No. 5 VL	20	RASESVDSYDNSFMH	21	RASNLES	22	QQSKEDPYT
CAR-T No. 2 VH	25	GYTFTSY	26	NPYNDG	27	EKDNYATGAWFAY
CAR-T No. 2 VL	28	KSSQSLLYSTNQK	29	WASTRES	30	QQYYSYRT
CAR-T No. 3 VH	46	GFSFSDC	47	SVKSENYG	48	SYRYDVGAWFAY
CAR-T No. 3 VL	49	RASKSVSTSGYSIY	50	LASILES	51	QHSRELPWT
CAR-T No. 6 VH	55	GYTFTNY	56	NTNTGE	57	LGLYYDYGYYAM
CAR-T No. 6 VL	58	RASESVDSYGN	59	LASNLES	60	QQNNEDPYT
CAR-T No. 545 VH	67	GFAFSIYDMS	68	YISSGGGTTYYPDTVKG	69	HSYGSSYGVLFAF
CAR-T No. 545 VL	70	RASQDISNYLN	71	YTSILHS	72	QQGNTLPWT
CAR-T No. 447 VH	76	GDSVSSNSAAWN	77	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	78	EVTGDLEDAFDI
CAR-T No. 447 VL	79	RASQTIWSYLN	80	AASSLQS	81	QQSYSIPQT

SEQ ID NO 07: (CAR No.1 VH氨基酸序列)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVINWFDPWGQGLVT

SEQ ID NO 08: (CAR No.1 VL氨基酸序列)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQANSFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO 15: (CAR-T No.4 VH氨基酸序列)

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWVKQRTGQGLEWIGETITGSGSS
YYNEKFKDKATLTVDKASNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGKGTGFAFWGQGLVT
VSA

SEQ ID NO 16: (CAR-T No.4 VL氨基酸序列)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLE
SGIPARFTGSGSGTDFLTNIHPVEEDTATYYCQQSYEDPPTFAGGTNLEIK

SEQ ID NO 23: (CAR-T No.5 VH氨基酸序列)

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYLMHWVKQRPQGQLEWIGYIDPSTGY
TVYLQKFKDKATLTADKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCAKEGGIGGFAYWGQGTSLV
VSA

SEQ ID NO 24: (CAR-T No.5 VL氨基酸序列)

DIVLTPSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL
ESGIPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQQSKEDPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO 31: (CAR-T No.2 VH氨基酸序列)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDG
TDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQ
GTLTVSSA

SEQ ID NO 32: (CAR-T No.2 VL氨基酸序列)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 33: (CAR No.1氨基酸序列)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWI
RQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
VINWFDPPWGQGTSLVGGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDI
SSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QANSFPYTFGQGTLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELVRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

SEQ ID NO 34: (CAR No.4氨基酸序列)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWV
KQRTGQGLEWIGETYTGSGSSYNEKFKDKATLTVDKASNIAYMQLSSLTSEDSAVYF
CARRGKGTGFAFWGQGTSLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAVSLGQRAT
ISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFTGSGSGTDFTLN
IHVVEEDTATYYCQQSYEDPPTFAGGTNLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
LSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO 35: (CAR No.5氨基酸序列)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYLMHW
VKQRPQGQLEWIGYIDPSTGYTVYLQKFKDKATLTADKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYY
CAKEGGIGGFAYWGQGTSLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTPSPASLAVSLGQRAT
ISCRASESVDSYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLGIPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEADDVATYYCQQSKEDPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
LSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO 36: (CAR No.2氨基酸序列)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWV
RQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CAREKDNYATGAWFAYWGQGLTVTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVS
LGERVTMCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG
SGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPL
SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO 37: (CD8 α 跨膜结构域氨基酸序列)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

SEQ ID NO 38: (4-1BB共刺激结构域氨基酸序列)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO 39: (CD3 ζ 信号传导结构域氨基酸序列)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO 40: (CD8 α 铰链结构域氨基酸序列)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO 41: (CD3 ϵ 跨膜结构域氨基酸序列)

VMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWS

SEQ ID NO 42: (CD3 ϵ 信号传导结构域氨基酸序列)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQ

SEQ ID NO 43: (CD3 ϵ 细胞外结构域氨基酸序列)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL
SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

SEQ ID NO 44: (全长CD3 ϵ 氨基酸序列)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL
WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRA
RVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR
GQNKERPPVPNPDIYPIRKQQRDLYSGLNQRRRI

SEQ ID NO 45: (全长人CD4氨基酸序列)

MNRGVPRHLLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSN
QIKILGNQGSFLTKGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIHKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEV
QLLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQD
SGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVS VKRVTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSG
NLTLALEAKTGKLGHEVN LVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLM LSLKLENKEAKVS
KREKAVVVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLSNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLL
LFIGLGIFFCVRCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTCCPHRFQKTCSP

SEQ ID NO 52: (CAR No.3 VH氨基酸序列)

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENY
GANYAESVRGRFTISRDDSKNTVY LQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAYW
GQGLTVTVSSA

SEQ ID NO 53: (CAR No.3 VL氨基酸序列)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRAKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTFGQGTKVEIKR

MALPVTALLPLALLLHAARPEEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWL
RQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAV
YYCSASYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
AVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPLLIYLAILESGVPDRFSGSGSG
TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTFTGQGTKVEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF
KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYOGSLSTATKDTYDALHMOALPPR

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKCMGWINTNTGEP
TYAEFEKGRFAFSLETSATTAFLQINNPKDEDTATYFCARLGLYYDYGYYAMDYWGQ
GASVTVSS

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPLFIYLASNLES
GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCOONNEDPYTFGGGTKLEIK

MALPVTALLPLALLLHAARPQIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTNYGMNWV
KQAPGKGLKCMGWINTNTGEPTYAEFEKGRFAFSLETSATTAFLQINNPKDEDATATYFC
ARLGLYYDYGYYAMDYWGQGASVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGNIVLTQSPASLAVSL
GQRATISCRASESVDSYGNSEFMHWYQKPKGQPPKLFYILASNLESGVPARFSGSGSRTD
FTLTIDPVEADDAATYYCQQNEDPYTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYOGLSATKDTYDALHMOALPPR

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWQQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAYVYGGSFSGYYW
SWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CARVINWFDPWGQGTLTGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRA
SQDISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQANSFPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSDGNEEMGGITQTPYKVSISGTT
VILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSK
PEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPV
TRGAGAGGRORGONKERPPVPNPDIYPIRGKORDLYSGLNORRI

CC(A/T)₆GG

SEQ ID NO 66: (全长人CD22氨基酸序列)

MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILF
HNPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRQVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQL
GLRMESKTEKWMERIHLNVSERPFPPHQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWL
LEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSSHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQL
NVKHTPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLN
LREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCM
SLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGE
LDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTVTLSNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEPSLGLVK
IQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDVVRRIKPLSEIHSNGSVSLQC
DFSSSHPKVEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDSDISPEDAGSYSCWVNSISQGTASKAWTLE
VLYAPRRLRVSMSPGDQVMGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRL
LEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCAILILAICG
LKLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEPHSLGCYNPMMEDGISYT
TLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYS
ELIQFGVGERPQAQENVVILKH

SEQ ID NO 73: (CAR-T No.454 VH氨基酸序列)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTT
YYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQ
GTLVTVSA

SEQ ID NO 74: (CAR-T No.454 VL氨基酸序列)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO 75: (CAR No.454氨基酸序列)

MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWV
RQTPEKRLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYY
CARHSGYGSSYGVLFAFWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTTSSLSASL
GDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO 82: (CAR No.447 VH氨基酸序列)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK
WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQ
GTMVTVSS

SEQ ID NO 83: (CAR No.447 VL氨基酸序列)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSISIPQTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO 84: (CAR No.447氨基酸序列)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWN
WIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAV
YYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTI
SSLQAEDFATYYCQQSISIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

序列表

- <110> 南京传奇生物科技有限公司 (Nanjing Legend Biotech Co., Ltd)
- <120> 包含识别分子的工程化免疫细胞
- <130> 76142-20031.40
- <140> 尚未指定
- <141> 一并同时提交
- <150> PCT/CN2019/087260
- <151> 2019-05-16
- <160> 84
- <170> Windows用FastSEQ 4.0版
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <400> 1
- [0001] Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
- 1 5
- <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <400> 2
- Asn His Ser Gly Ser
- 1 5
- <210> 3
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <400> 3
- Val Ile Asn Trp Phe Asp Pro
- 1 5

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 4
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 5
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

[0002] <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 7
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
50						55				60					
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70				75						80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85						90					95	
Arg	Val	Ile	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

[0003]

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

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val
1				5			

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

- <400> 10
Thr Tyr Thr Gly Ser Gly Ser Ser
1 5
- <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- <400> 11
Arg Gly Lys Gly Thr Gly Phe Ala Phe
1 5
- <210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- [0004] <400> 12
Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
1 5 10
- <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- <400> 13
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
- <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- <400> 14
Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 15
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 15
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Val Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Thr Tyr Thr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ala Ser Asn Ile Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Lys Gly Thr Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

[0005] <210> 16
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 16
 Asp Ile Val 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 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Ala Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Asp Pro Ser Thr Gly Tyr
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Glu Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Asp Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 22
Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0007] <400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Leu Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asp Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Val Tyr Leu Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Glu Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 24
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24
Asp Ile Val Leu Thr Pro Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

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

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 25
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 1 5

[0008]

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 26
 Asn Pro Tyr Asn Asp Gly
 1 5

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 27
 Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 13

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 28
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 29
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 30
Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr
1 5

<210> 31
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 31
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 32
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 32
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

[0010]

<210> 33
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 33
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu
 20 25 30
 Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly
 35 40 45
 Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ile Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 165 170 175
 Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 180 185 190
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 195 200 205
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 210 215 220
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
 225 230 235 240
 Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr
 245 250 255
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 260 265 270
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 275 280 285
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 290 295 300
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 305 310 315 320
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 325 330 335
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 340 345 350
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 355 360 365
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 370 375 380
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 405 410 415
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 420 425 430
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 435 440 445
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 450 455 460
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470 475

[0011]

<210> 34
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成构建体

<400> 34

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Thr Tyr Thr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ala
 85 90 95
 Ser Asn Ile Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Gly Lys Gly Thr Gly Phe Ala Phe
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
 165 170 175
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
 195 200 205
 Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp
 225 230 235 240
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Thr Phe
 245 250 255
 Ala Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380
 Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 405 410 415
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu

			420					425					430				
Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser		
			435					440					445				
Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly		
			450				455					460					
Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu		
465					470					475					480		
His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg										
				485													

<210> 35
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 35

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu		
1				5					10					15			
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu		
			20					25					30				
Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr		
		35					40					45					
Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln		
	50					55					60						
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Thr	Val		
65				70					75						80		
Tyr	Leu	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser		
			85					90						95			
Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser		
			100					105						110			
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Glu	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Phe	Ala	Tyr		
		115					120					125					
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	130					135					140						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Pro		
145				150					155						160		
Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser		
			165						170					175			
Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Tyr	Asp	Asn	Ser	Phe	Met	His		
		180					185						190				
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg		
		195					200					205					
Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly		
		210				215					220						
Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp		
225				230					235						240		
Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe		
			245						250					255			
Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg		
			260					265					270				
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg		
		275					280					285					

[0013]

```

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290                295                300
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305                310                315                320
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325                330                335
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340                345                350
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355                360                365
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370                375                380
Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385                390                395                400
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405                410                415
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
420                425                430
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
435                440                445
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
450                455                460
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
465                470                475                480
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

```

[0014]

```

<210> 36
<211> 495
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

```

```

<400> 36
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1      5      10      15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val
20      25      30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35      40      45
Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln
50      55      60
Gly Leu Asp Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp
65      70      75      80
Tyr Asp Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser
85      90      95
Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
100     105     110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala
115     120     125
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130     135     140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

```

	145		150		155		160
	Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu						
		165		170		175	
	Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr						
		180		185		190	
	Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser						
		195		200		205	
	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro						
		210		215		220	
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile						
	225		230		235		240
	Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr						
		245		250		255	
	Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg						
		260		265		270	
	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala						
		275		280		285	
	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly						
		290		295		300	
	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile						
	305		310		315		320
	Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val						
		325		330		335	
	Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe						
		340		345		350	
	Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly						
		355		360		365	
[0015]	Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg						
		370		375		380	
	Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln						
	385		390		395		400
	Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp						
		405		410		415	
	Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro						
		420		425		430	
	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Lys Asp						
		435		440		445	
	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg						
		450		455		460	
	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr						
	465		470		475		480
	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg						
		485		490		495	

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 38
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 38
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0016]

<400> 39
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 40
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 40
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			
		35					40					45			

<210> 41
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 41
Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly
1 5 10 15
Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser
20 25

<210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0017] <220>
 <223> 合成构建体

<400> 42
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15
Val Gly Val Trp Gly Gln
20

<210> 43
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 43
Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val
1 5 10 15
Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly
20 25 30
Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu
35 40 45
Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu
50 55 60
Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly
65 70 75 80

Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
 85 90 95
 Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
 100

<210> 44
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 44
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 [0018] 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140
 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175
 Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190
 Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 45
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 45
 Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys
 20 25 30
 Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser
 35 40 45
 Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 46

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 47

Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly
1 5

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50
Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 51
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0021] <400> 52
Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
20 25 30
Arg Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

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

<210> 54

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

[0022]

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

[0023]	Arg	Glu	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				260					265					270			
	Arg	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	
			275					280					285				
	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	
	305					310					315					320	
	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	
					325					330					335		
	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	
				340					345					350			
	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	
			355					360					365				
	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	
		370					375					380					
	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	
	385					390					395					400	
	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	
					405					410					415		
	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	
				420					425					430			
	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	
			435					440					445				
	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	
		450					455					460					
	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	
	465					470					475					480	
	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	
					485					490					495		

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

1

5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 56

Asn Thr Asn Thr Gly Glu

1

5

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 57
Leu Gly Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 58
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn
1 5 10

[0024] <210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 59
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 60
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 61
<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Cys	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Glu	Glu	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Thr	Thr	Ala	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

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

<210> 63

<211> 493

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0025]

<223> 合成构建体

<400> 63

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Lys Cys Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
 85 90 95
 Ala Thr Thr Ala Phe Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr
 115 120 125
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn
 145 150 155 160
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 165 170 175
 Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly
 180 185 190
 [0026] Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
 195 200 205
 Leu Phe Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
 210 215 220
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
 225 230 235 240
 Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu
 245 250 255
 Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
 275 280 285
 Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 290 295 300
 Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
 305 310 315 320
 Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
 325 330 335
 Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 340 345 350
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 355 360 365
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 370 375 380
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln
 385 390 395 400
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 405 410 415
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

			420					425					430				
Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met		
			435					440					445				
Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly		
			450					455					460				
Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp		
465						470					475				480		
Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
				485						490							

<210> 64

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 64

[0027]

Met	Gln	Ser	Gly	Thr	His	Trp	Arg	Val	Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser		
1				5					10					15			
Val	Gly	Val	Trp	Gly	Gln	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly		
			20					25					30				
Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly		
		35					40					45					
Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly		
	50					55					60						
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn		
65					70				75						80		
Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser		
				85					90					95			
Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr			
			100					105					110				
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Ile	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly		
		115					120					125					
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	130					135					140						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val		
145					150					155					160		
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln		
				165					170					175			
Asp	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala		
			180					185					190				
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro		
		195					200					205					
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile		
	210					215					220						
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala		
225					230					235					240		
Asn	Ser	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
				245						250				255			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp		
			260					265					270				
Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Thr	Pro	Tyr	Lys	Val	Ser		
		275					280						285				

```

Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser
290                295                300
Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp
305                310                315                320
Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys Glu Phe
325                330                335
Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser
340                345                350
Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
355                360                365
Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val Ile
370                375                380
Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp
385                390                395                400
Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly
405                410                415
Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val
420                425                430
Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr
435                440                445
Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
450                455

```

<210> 65
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0028]

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 3, 4, 5, 6, 7, 8
 <223> n = A or T

<400> 65
 ccnnnnnnngg

10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66
 Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 68

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0029]

<400> 69

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 70

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 71
Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser
1 5

<210> 72
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 72
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
1 5 10 15
Lys Ser

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0030]

<400> 73
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 74
His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 75
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 76
 Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 77
 Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr
 1 5

[0031]

<210> 78
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 78
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
 35 40 45
 Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
 50 55 60
 Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
 85 90 95
 Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
 100 105 110
 Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
 115 120 125
 Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
 130 135 140

[0032]

Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Glu	Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr
145					150					155					160
Cys	Leu	Leu	Asn	Phe	Ser	Cys	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp
				165						170					175
Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Thr	Ser
			180					185						190	
Leu	Thr	Ile	Lys	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro
		195					200						205		
Gln	Trp	Ser	His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Gln	Asp	Ala
	210					215					220				
Asp	Gly	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His
225					230					235					240
Thr	Pro	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Val	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Ile	Val	Arg
				245					250					255	
Glu	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro
			260					265						270	
Glu	Tyr	Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Lys
		275					280					285			
Gln	Asn	Thr	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Gln	Ser
	290					295					300				
Gly	Lys	Tyr	Cys	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser
305					310					315					320
Glu	Glu	Val	Phe	Leu	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Val
				325					330					335	
Gln	Ile	Leu	His	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Phe	Leu
			340					345					350		
Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Trp	Tyr	His
		355					360					365			
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Glu	Lys	Val	His	Ile	Pro
	370				375						380				
Lys	Ile	Leu	Pro	Trp	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn
385					390					395					400
Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Gln
				405					410					415	
Tyr	Pro	Pro	Lys	Lys	Val	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Asn	Pro	Met	Pro	Ile
			420					425					430		
Arg	Glu	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Asn
		435					440					445			
Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu
	450					455					460				
Pro	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr
465					470					475					480
Thr	Ile	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro
				485					490					495	
Val	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Arg	Lys
			500					505					510		
Ile	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Gln
		515					520					525			
Cys	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Trp	Glu
	530					535					540				
Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser
545					550					555					560
Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser
				565					570					575	
Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala
			580					585					590		

Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu
 595 600 605
 Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val
 610 615 620
 Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His
 625 630 635 640
 Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala
 645 650 655
 Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
 660 665 670
 Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val
 675 680 685
 Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys
 690 695 700
 Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
 705 710 715 720
 Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
 725 730 735
 Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
 740 745 750
 Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro
 755 760 765
 Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
 770 775 780
 Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
 785 790 795 800
 Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
 805 810 815
 Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
 820 825 830
 Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 835 840 845

[0033]

<210> 79
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 79
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

			100					105			110
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	
		115					120				

<210> 80
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 80
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0034]

<210> 81
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 81
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys
 50 55 60
 Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly
 115 120 125
 Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

	130		135		140										
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp
	145					150				155					160
	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
					165					170					175
	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
					180					185					190
	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
					195				200				205		
	Tyr	Thr	Ser	Ile	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
					210				215				220		
	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
	225					230						235			240
	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp
					245					250					255
	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala
					260					265					270
	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser
					275					280					285
	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr
					290					295			300		
	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala
	305					310					315				320
	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys
					325					330					335
	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
					340					345					350
[0035]	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
					355					360					365
	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
					370					375					380
	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
	385					390					395				400
	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
					405					410					415
	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
					420					425					430
	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
					435					440					445
	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
					450					455					460
	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
	465					470					475				480
	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
					485										

<210> 82

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 82

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu Glu Asp Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0036] <400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 84
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 84
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30

	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp
		35					40						45			
	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro
	50						55					60				
	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp
65					70					75					80	
	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro
				85					90						95	
	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro
			100						105					110		
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Asp	Leu
	115							120					125			
	Glu	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser
	130						135					140				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
145						150					155					160
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
				165						170					175	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Trp	Ser	Tyr
			180						185					190		
	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile
		195						200					205			
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	210					215						220				
	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala
225					230						235					240
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Pro	Gln
				245						250					255	
[0037]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala
			260						265						270	
	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser
		275						280					285			
	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr
	290					295						300				
	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala
305					310						315					320
	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys
				325						330					335	
	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
			340						345					350		
	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
			355					360					365			
	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg
	370					375						380				
	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn
385					390						395					400
	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg
				405						410					415	
	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro
			420						425					430		
	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala
			435					440					445			
	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His
	450					455						460				
	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp
465					470						475					480
[0038]	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
				485						490						

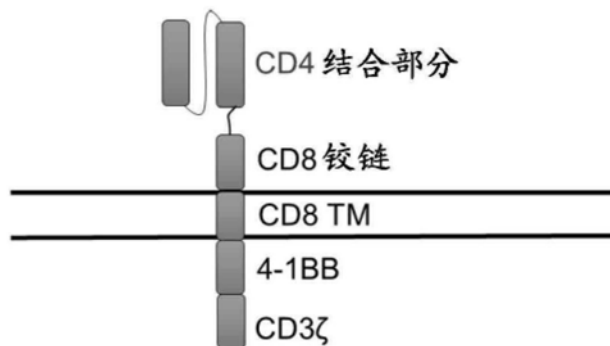


图1A

抗 CD4 CAR-T	抗体	识别结构域
CAR-T No. 1	扎诺利木单抗	D1
CAR-T No. 2	艾巴利珠单抗	D2

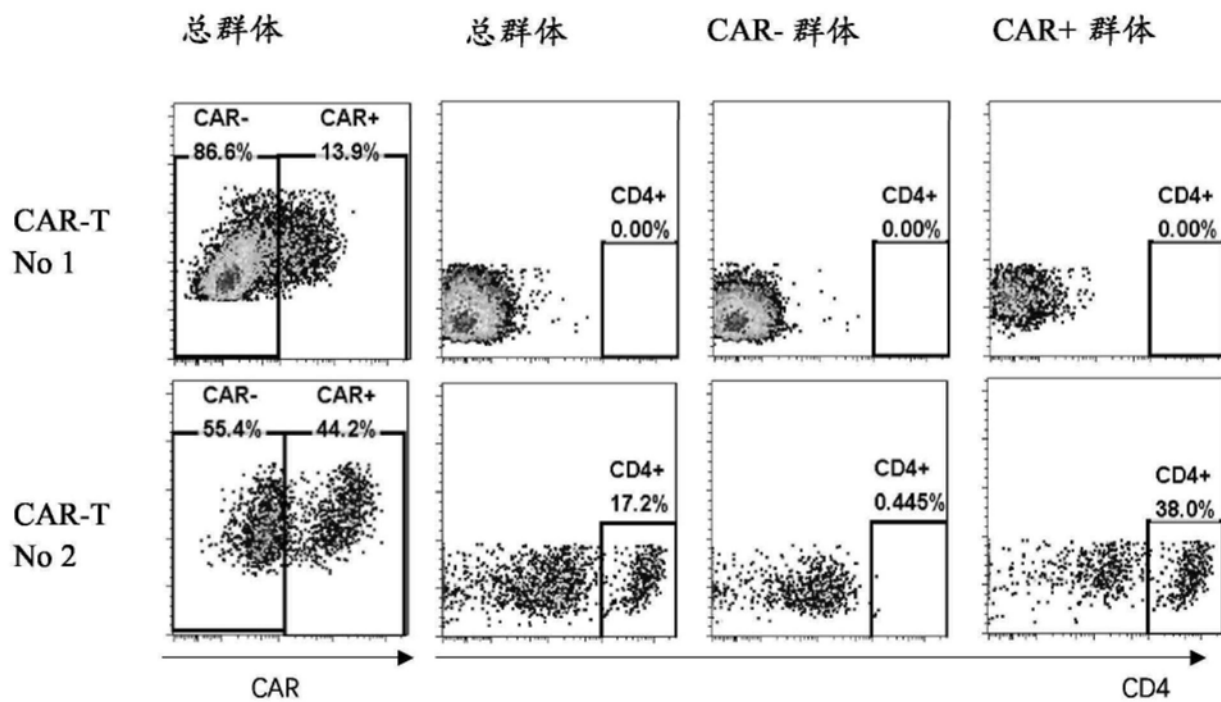


图1B

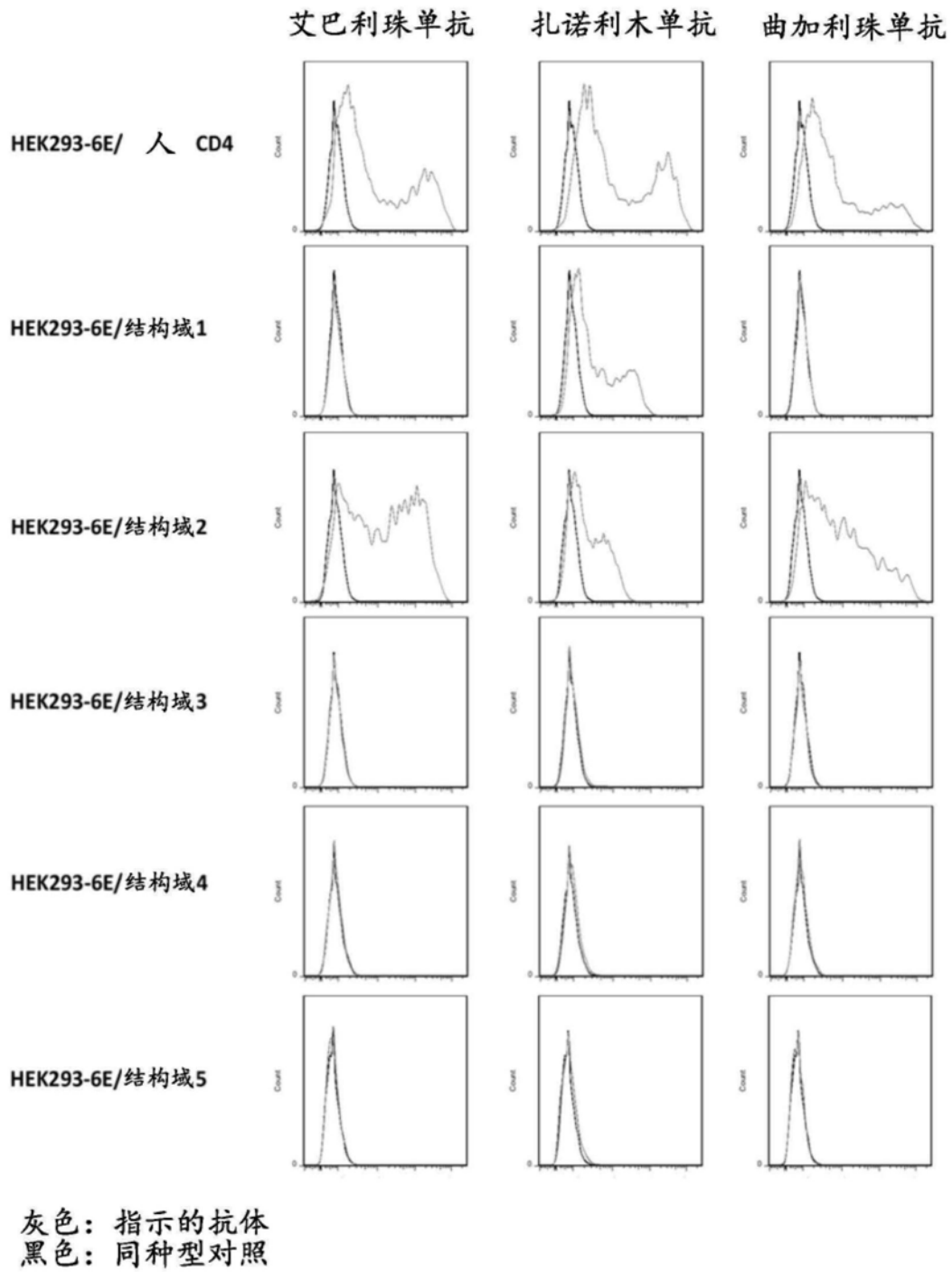


图2

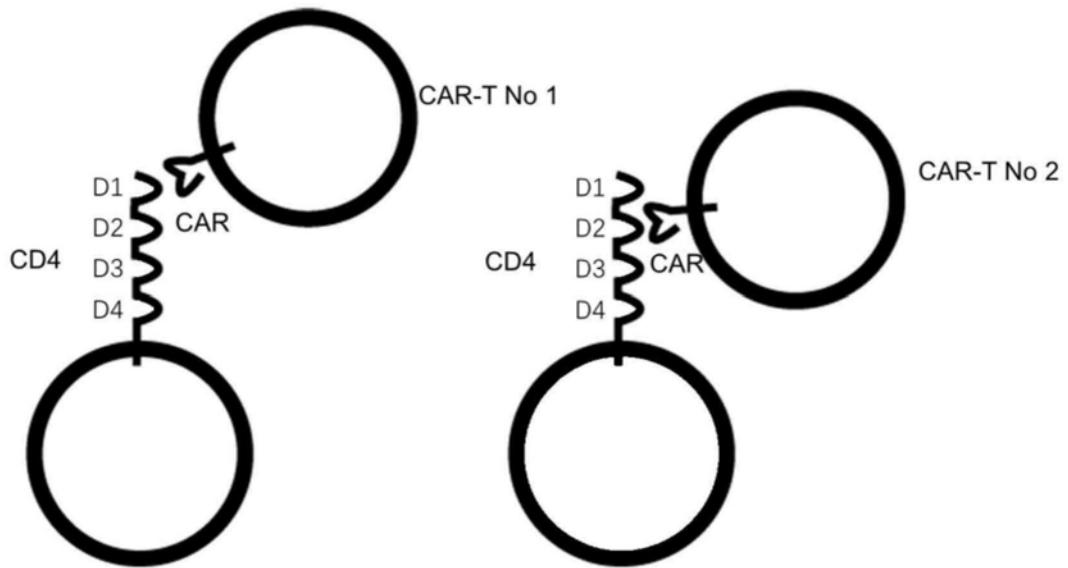


图3A

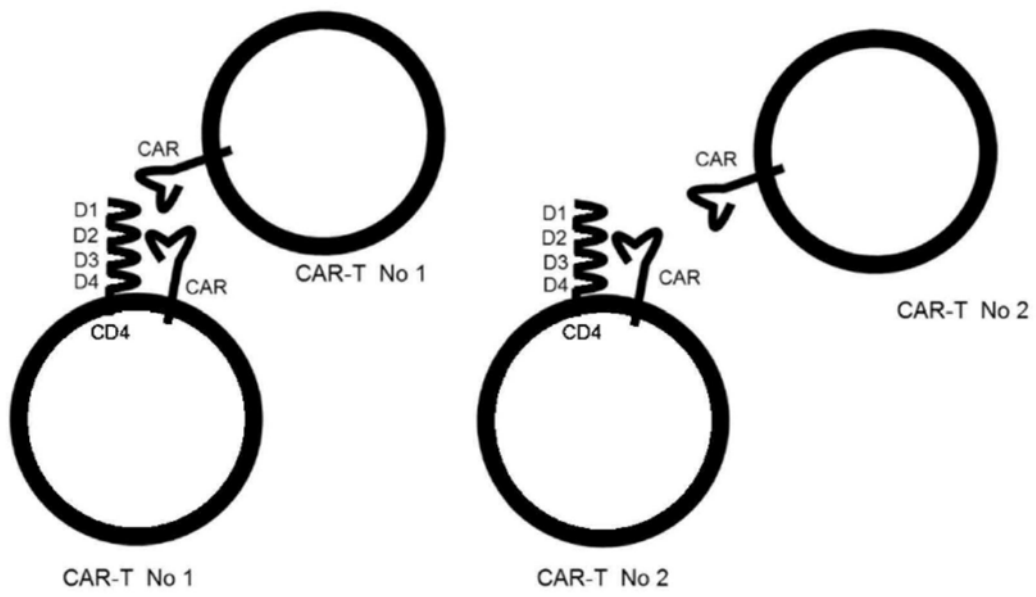


图3B

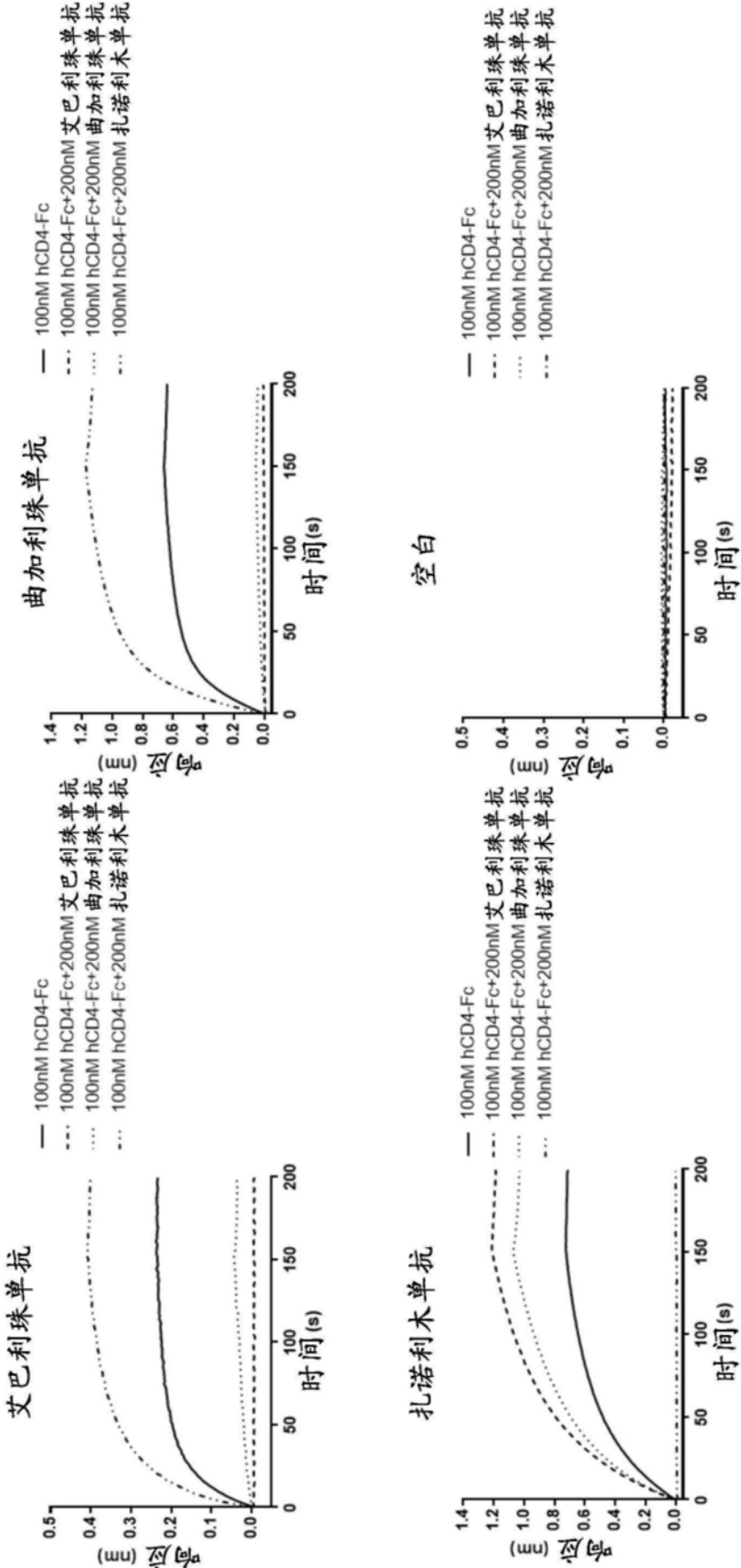


图4A

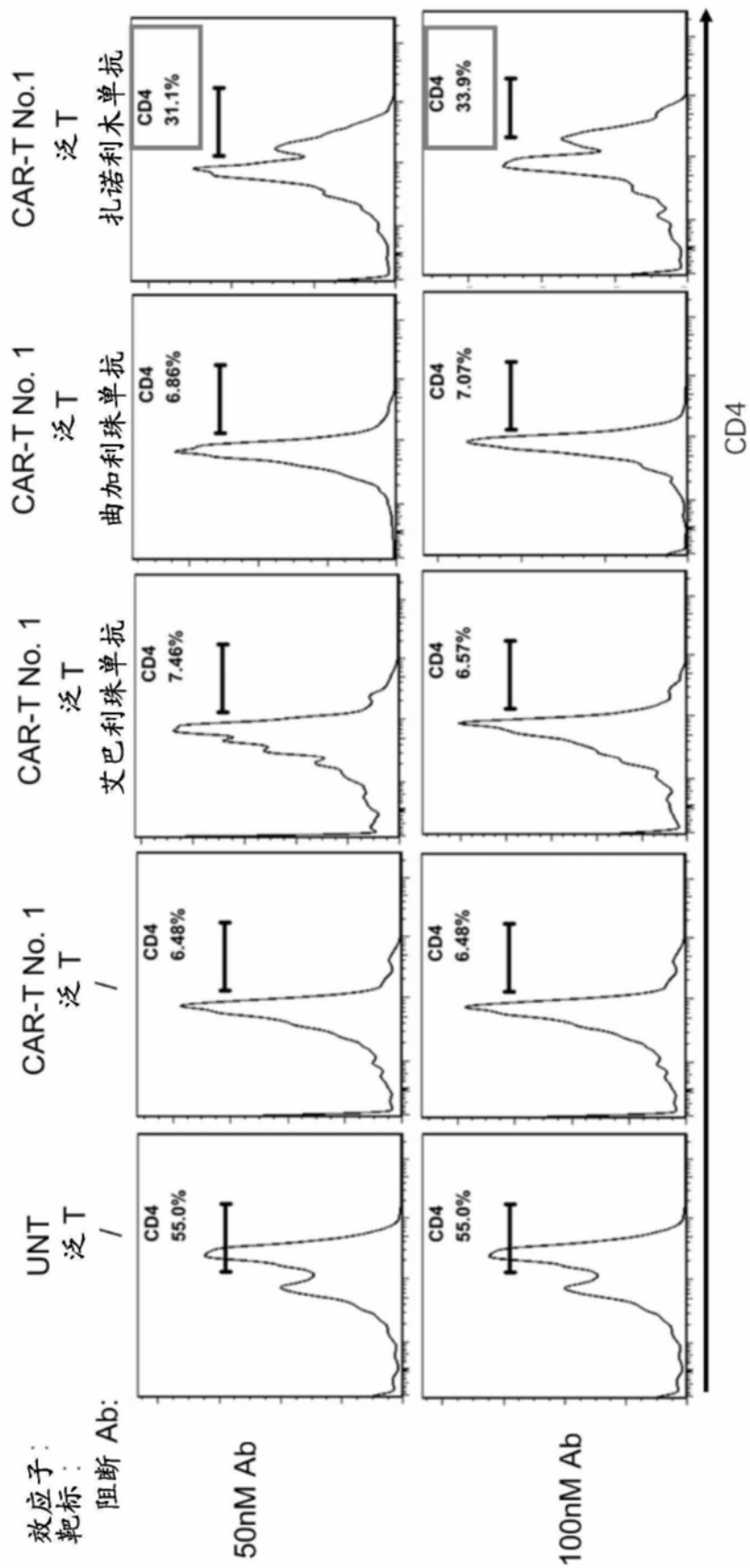


图4B

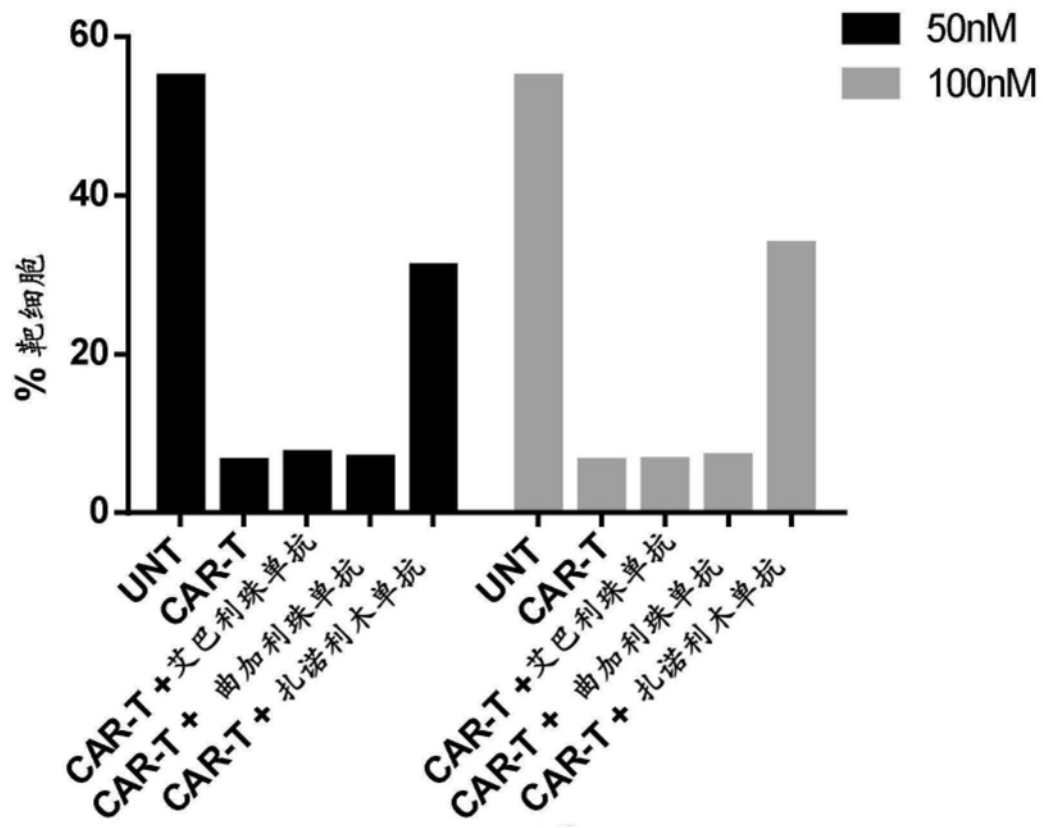


图4C

CAR-T	抗体	识别结构域
CAR-T No. 4	SK3	D1
CAR-T No. 5	RPA-T4	D1

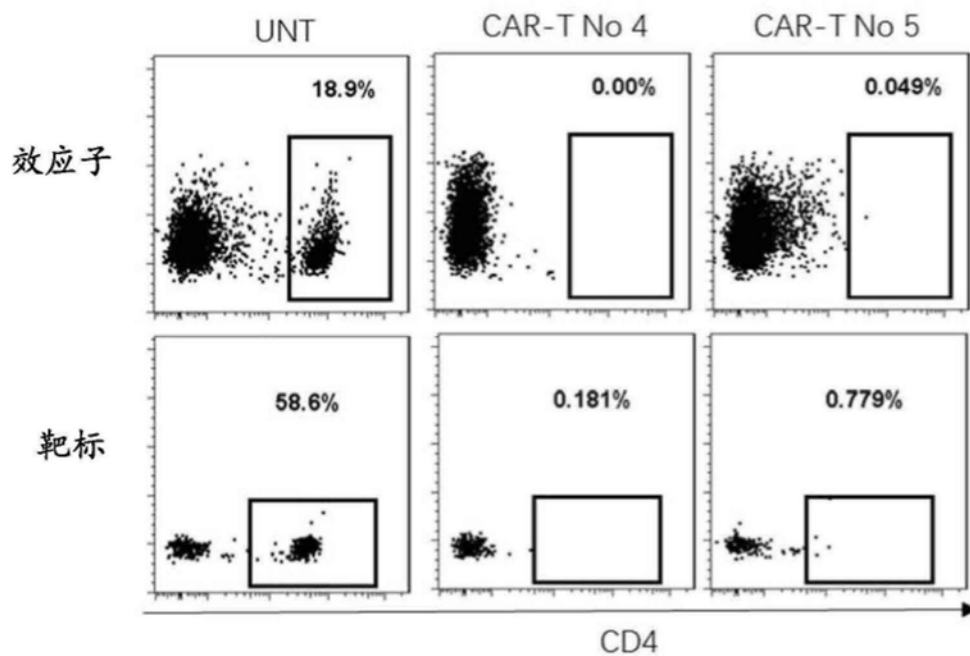


图5

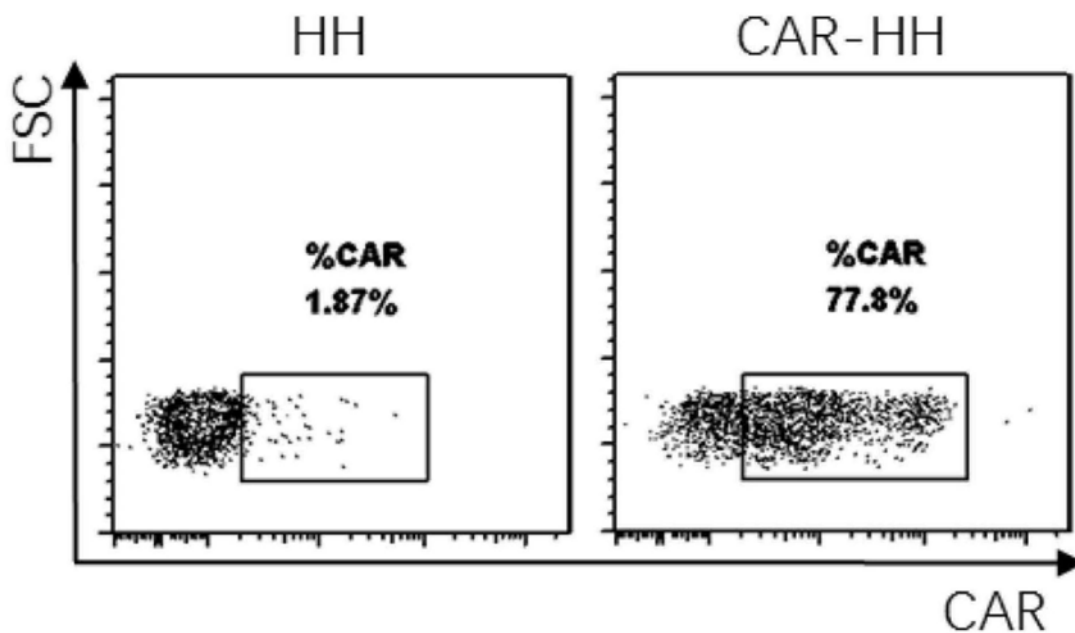


图6A

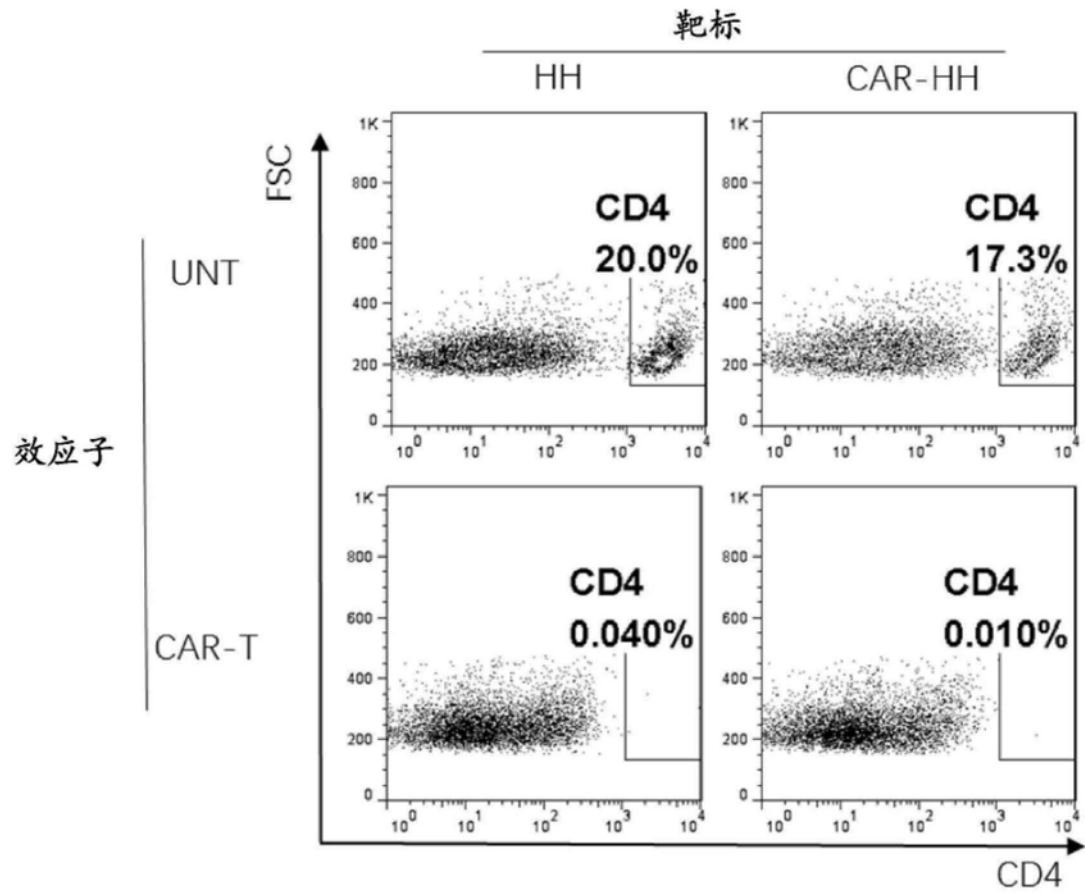


图6B

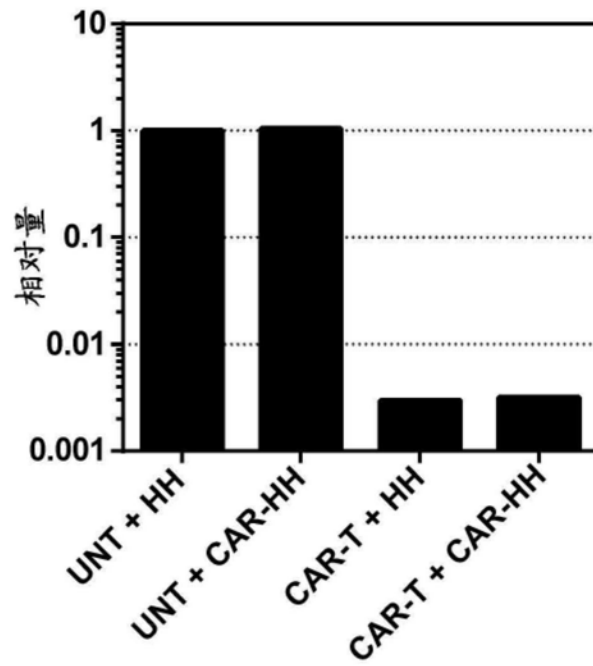


图6C

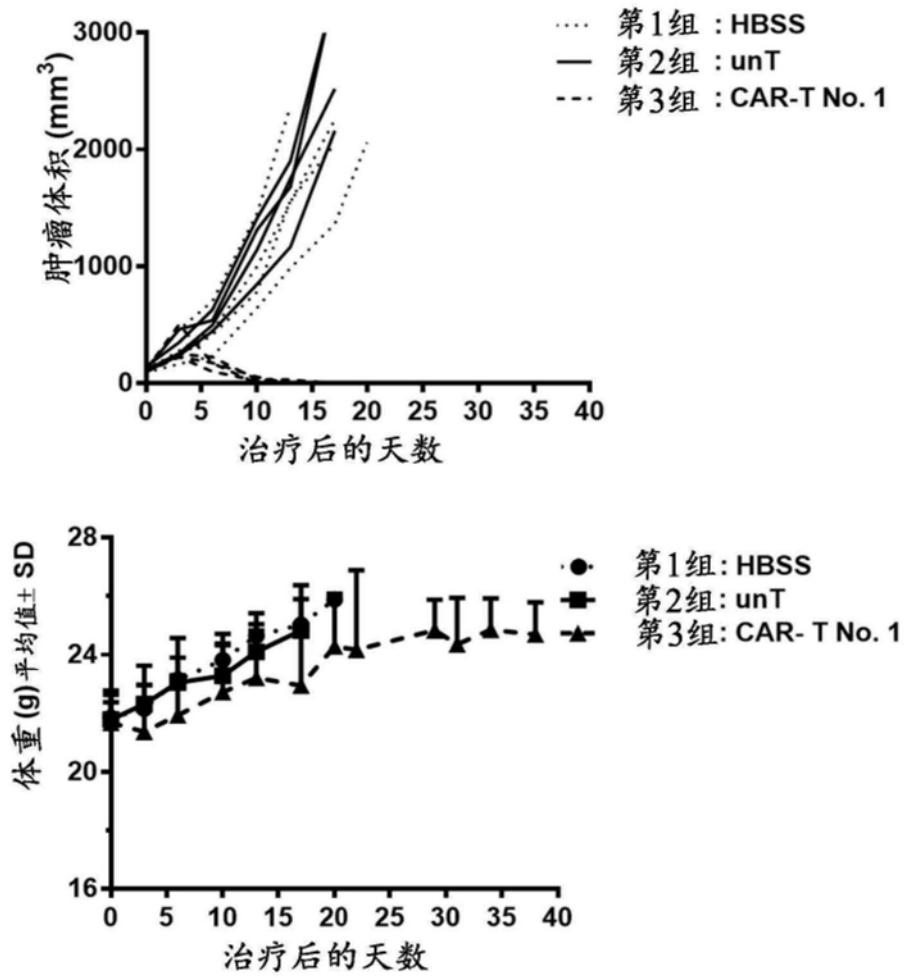


图6D

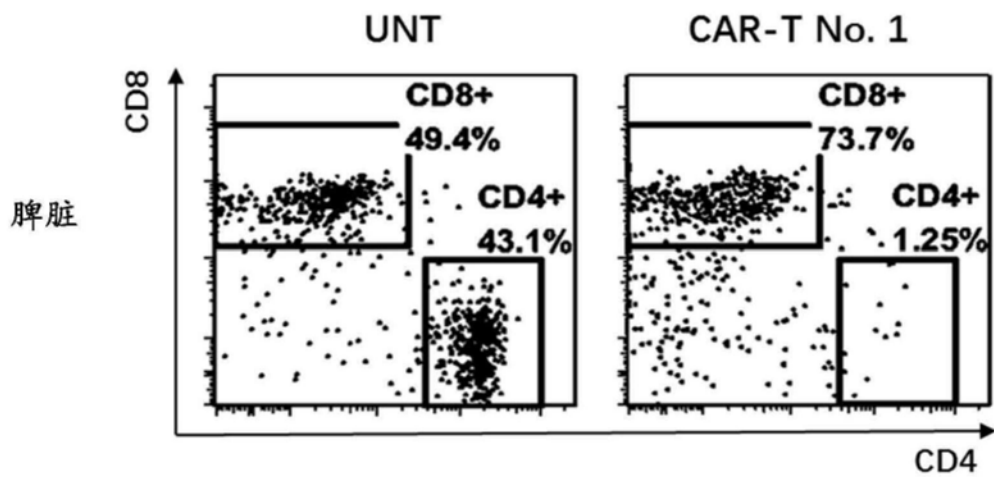


图7

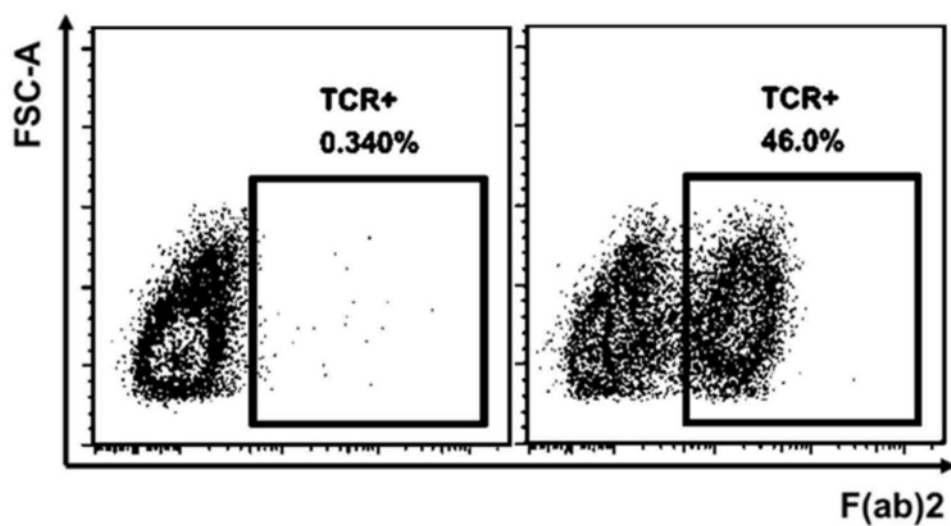


图8A

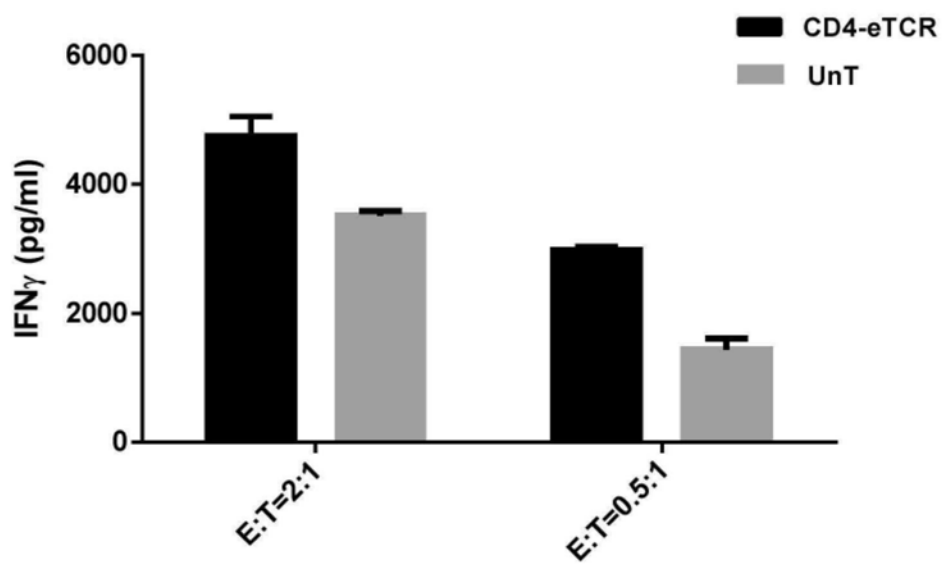


图8B

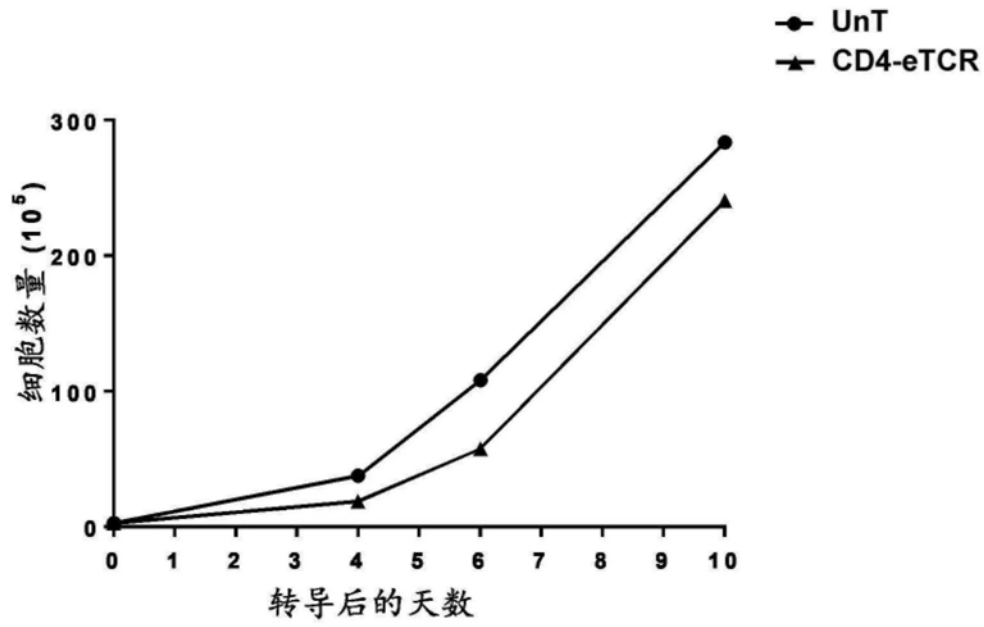


图8C

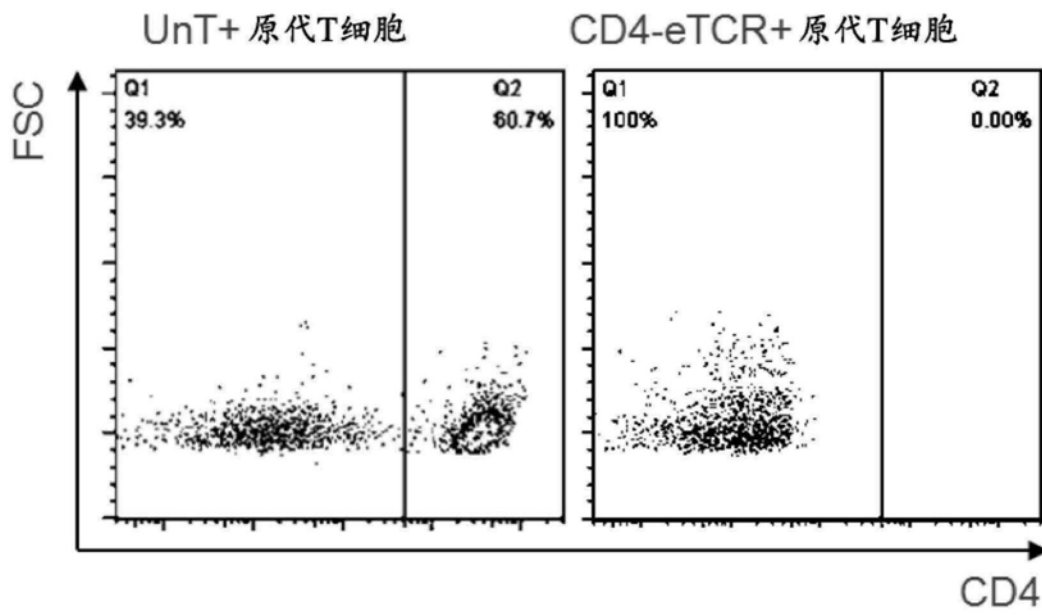


图8D

CAR-T	抗体	识别结构域
CAR-T No. 3	OKT4	D3
CAR-T No. 6	Clone 10	D2-D3

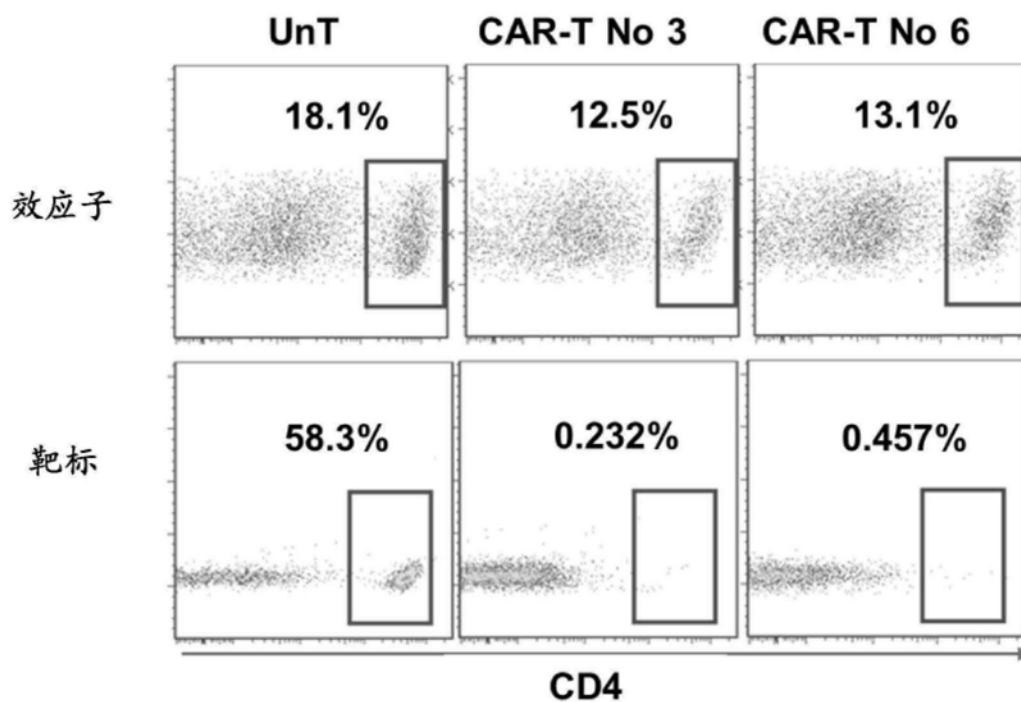


图9

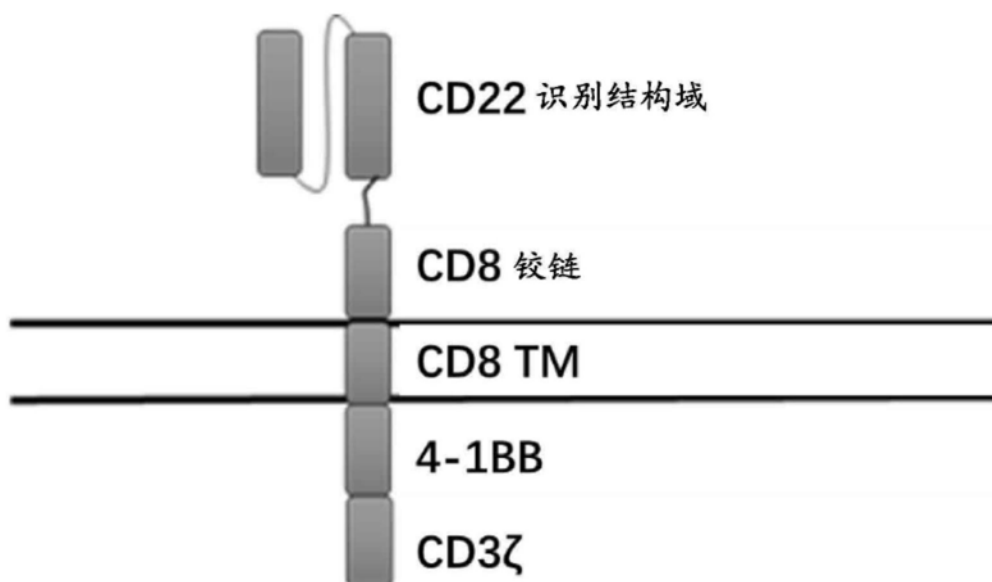


图10

抗 CD22 CAR-T	抗体	识别结构域
CAR-T No. 447	m971	D5-D7
CAR-T No. 454	RFB4	D3

图11A

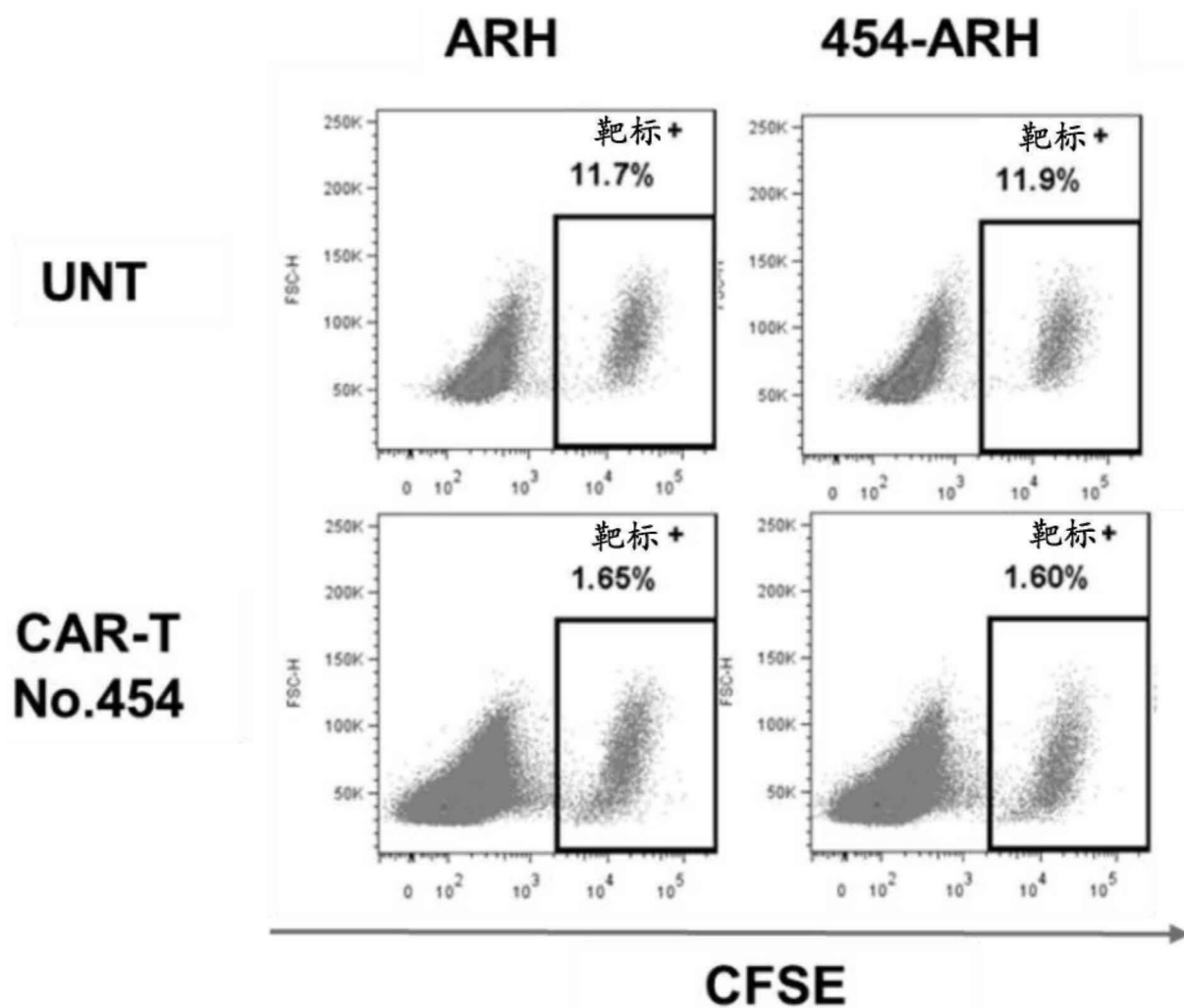


图11B

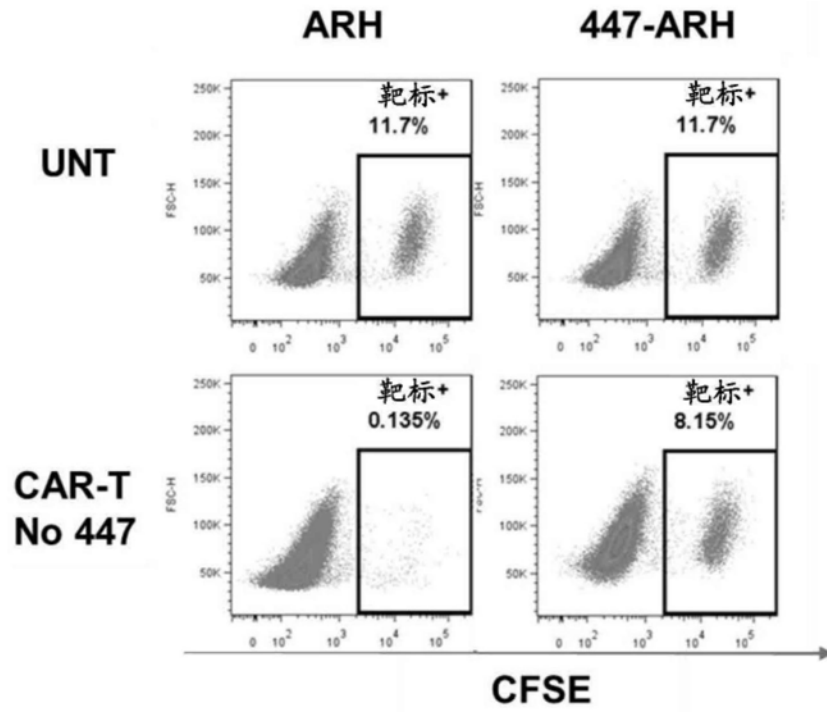


图11C

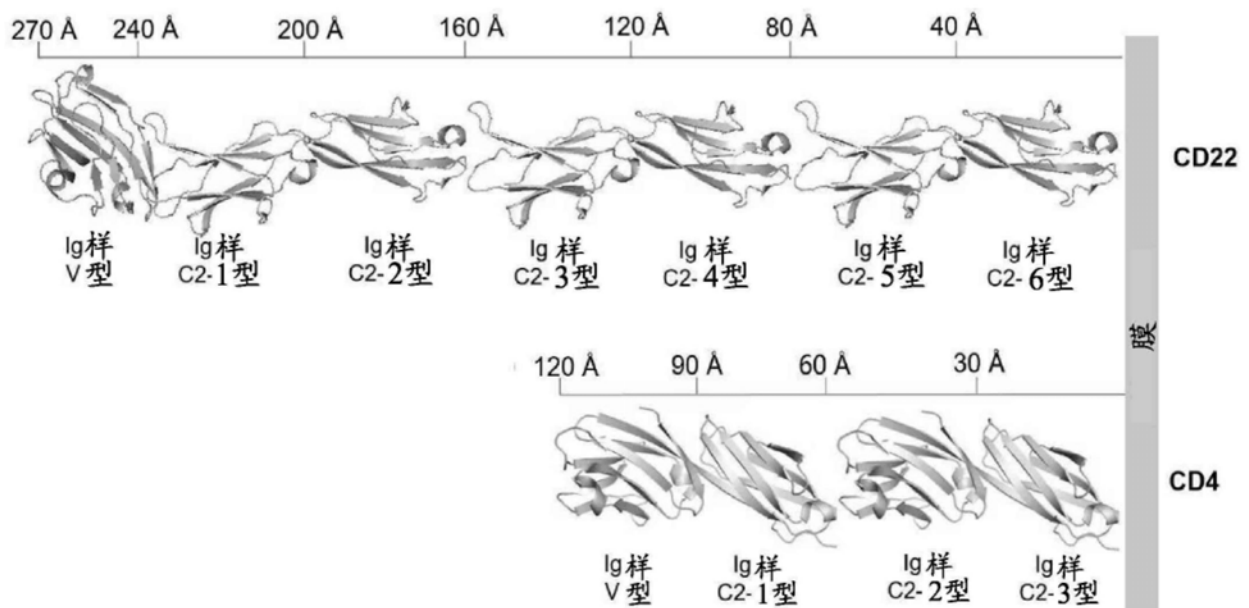


图12