



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113710703 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 26

(21) 申请号 202080020167.8

郑龙

(22) 申请日 2020.02.14

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理
事务所(普通合伙) 44348

(30) 优先权数据

62/806,632 2019.02.15 US

62/815,961 2019.03.08 US

62/924,151 2019.10.21 US

代理人 何锦标

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.10

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/018441 2020.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/168298 EN 2020.08.20

(71) 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 艾伦·L·爱泼斯坦 胡培生

权利要求书2页 说明书71页 附图19页

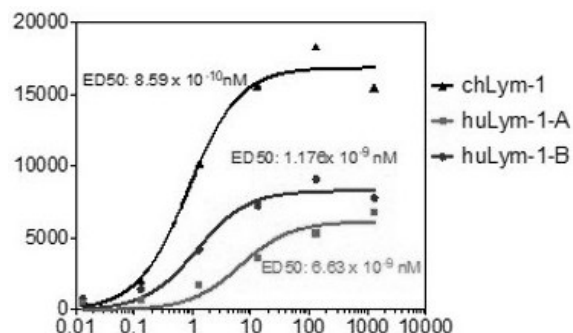
(54) 发明名称

LYM-1和LYM-2抗体组合物及改进的CAR构建

体

(57) 摘要

本文提供了新的抗体和包含这些抗体的抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR)细胞。还提供了包含所述抗体和细胞、编码所述抗体和CAR的载体或质粒的组合物,以及产生它们的方法或使用它们检测或治疗癌症的方法,以及用于实施所述方法的试剂盒。



1. 一种抗体, 包括:

(i) 重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列, 其包含SEQ ID NO:2或6中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物; 和/或

(ii) 轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列, 其包含SEQ ID NO:4或8中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物。

2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:2, 并且所述轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:4, 或其每一个的等效物。

3. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:2, 并且所述轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:8, 或其每一个的等效物。

4. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:6, 并且所述轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:4, 或其每一个的等效物。

5. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:6, 并且所述轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:8, 或其每一个的等效物。

6. 一种抗体, 包括:

(i) 重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列, 其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其等效物; 和/或

(ii) 轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列, 其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其等效物。

7. 一种权利要求1至6中任一项所述的抗体的抗原结合片段。

8. 一种多肽, 其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10或12中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物。

9. 一种嵌合抗原受体(CAR), 包含: (a) 权利要求1至6中任一项所述的抗体的抗原结合域, (b) 铰链结构域, (c) 跨膜结构域, 和(d) 细胞内信号传导结构域或DAP结构域。

10. 根据权利要求9所述的CAR, 进一步包括一个或多个共刺激信号传导区域。

11. 根据权利要求9或10所述的CAR, 其中所述DAP结构域是DAP10和/或DAP12。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述的CAR, 进一步包含插入在HC和LC可变结构域之后的肽AVPPQQWALS。

13. 一种分离的核酸序列, 其中所述核酸序列包含选自本文公开的序列中的任一个的序列或其等效物, 并且任选地与启动子和/或增强子元件可操作地连接。

14. 一种分离的核酸序列, 其编码权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽或权利要求9至12中任一项所述的CAR。

15. 一种包含权利要求14所述的分离的核酸序列的载体。

16. 一种分离的细胞, 其包含权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽、权利要求9至12中任一项所述的CAR、权利要求13或14所述的分离的核酸和/或权利要求15所述的载体。

17. 根据权利要求16所述的分离的细胞,其中所述分离的细胞是免疫细胞。

18. 根据权利要求17所述的分离的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞或自然杀伤(NK)细胞。

19. 一种组合物,其包含载体和权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽、权利要求9至12中任一项所述的CAR、权利要求13或14所述的分离的核酸、权利要求15所述的载体和/或权利要求16至18中任一项所述的分离的细胞中的一种或多种。

20. 一种产生表达CAR的细胞的方法,包括:

(i) 将编码权利要求 9 至 12 中任一项所述的 CAR 的核酸序列引入免疫细胞群;和

(ii) 选择已经成功地用步骤(i)的所述核酸序列转导的免疫细胞亚群,从而产生表达CAR的细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

22. 根据权利要求20或21所述的方法,其中所述免疫细胞群已被修饰以减少或消除内源性免疫细胞受体的表达。

23. 一种在有需要的对象中抑制肿瘤生长和/或治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括向所述对象施用有效量的权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合结构域、权利要求8所述的多肽或权利要求9至12中任一项所述的CAR。

24. 根据权利要求23所述的方法,进一步包括施用一种或多种抗癌治疗剂、检查点抑制剂、调节性T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)、氟尿嘧啶(5-FU)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、IL-12 治疗、CpG(TLR9 激动剂)和/或干扰素基因刺激剂(STING)通路激动剂。

25. 根据权利要求23或24所述的方法,其中所述肿瘤或癌细胞表达或过表达Lym1和/或Lym2或CD19。

26. 一种抑制癌细胞或癌症干细胞增殖的方法,包括使细胞与有效量的权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合结构域、权利要求8所述的多肽或权利要求9至12中任一项所述的CAR接触。

27. 一种用于确定对象是可能对治疗有反应还是不太可能对治疗有反应的方法,包括使从患者分离的样品与权利要求1至6中任一项所述的抗体或权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽接触,其中抗体、抗原结合片段或多肽之间的复合物的存在表明对象可能对治疗有反应,而复合物的不存在表明对象不太可能对治疗有反应。

28. 一种用于监测对象中的治疗的方法,包括使从所述对象中分离的样品与权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽或权利要求8所述的多肽中的一种或多种接触,并检测样品中的复合物。

29. 一种试剂盒,包含权利要求1至6中任一项所述的抗体、权利要求7所述的抗原结合片段、权利要求8所述的多肽或权利要求9至12中任一项所述的CAR中的一种或多种,以及使用说明。

LYM-1和LYM-2抗体组合物及改进的CAR构建体

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U.S.C. §119(e) 对分别于2019年2月15日、2019年3月8日和2019年10月21 日提交的美国临时申请序列号 62/806632、62/815961和 62/924151要求优先权,其各自通过引用整体并入本文中。

背景技术

[0002] 本发明公开一般涉及人类免疫学领域,特别是癌症免疫疗法。

[0003] 以下对背景技术的讨论仅用于帮助读者理解本发明的公开内容,并不承认其描述或构成本发明公开内容的现有技术。在本发明的公开内容中,各种出版物都用阿拉伯数字引用,其完整的书目引用位于权利要求书之前。这些参考文献以及引用的技术和专利文献通过引用并入本文。

[0004] Lym-1和Lym-2针对已知主要在人B细胞、树突细胞和B细胞衍生的淋巴瘤和白血病的表面上表达的MHC II类HLA-DR分子。

[0005] 鼠单克隆抗体Lym-1和Lym-2(Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840)最初被开发用于靶向在大多数人类B细胞恶性肿瘤的细胞表面上表达的HLA-Dr抗原(Rose et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43(1): 26-30)。而后鉴定出Lym-1结合表位,它是人HLA-Dr轻链上的不连续位点。Lym-2不与Lym-1竞争,因此与HLA-Dr抗原上的不同表位结合。Lym-1作为I-131放射性标记的药物和用于治疗弥漫性大细胞淋巴瘤的裸抗体已在人体中进行了测试,并证实了其有效且安全(DeNardo SJ et al., 1988, Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals 1:17-33; DeNardo, S.J. et al., 1988, Int. J. Cancer 3:96-101; 及 Hu E. et al., 1989, Hematologic Oncology 7:155-166)。与针对其他B细胞抗原(如CD19和CD20)的抗体不同,由于抗原位于人淋巴瘤细胞表面的脂筏中,Lym-1而不是 Lym-2会在结合后产生肿瘤细胞凋亡(Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840)。此外,Lym-1和Lym-2抗原不会脱落或内化到任何程度,并且仅以与淋巴瘤细胞相比的1/4的浓度在正常循环和淋巴结结合的B细胞上表达。

[0006] 发明概述

由于上述特性,Lym-1和Lym-2是可用于治疗抗原阳性白血病和淋巴瘤的理想靶向抗体。最近,Lym-1和 Lym-2都已作为用于这些恶性肿瘤免疫治疗的新物质组合物被用于产生有效的人类 CAR T 细胞,并已获得专利。本发明公开的内容表明,新产生的人源化Lym-1和Lym-2对抗原的亲合力低于亲本抗体,可用于产生临床有效的人 CAR T细胞以治疗B细胞恶性肿瘤,并且在NSG小鼠异种移植时有效地对抗转移性抗原阳性肿瘤。这些数据提供了关于这些人源化抗体构建体在产生能够治疗B细胞肿瘤患者的人类CAR T细胞中的潜在用途的关键信息。

[0007] 由于最近使用基因工程嵌合抗原受体(CAR)T细胞的自体治疗在B细胞淋巴瘤和白血病的治疗中获得了前所未有的结果,许多实验室已经开始将这种方法应用于实体瘤。CAR修饰细胞将单克隆抗体的HLA非依赖性靶向特异性与活化 T 细胞的细胞溶解活性、增殖和

归巢特性相结合,但对检查点抑制没有反应。由于它们能够直接杀死表达抗原的靶标,CAR细胞对任何抗原阳性细胞或组织都具有高毒性,因此需要构建具有高度特异性抗体的CAR。在一方面,本文公开了具有所需安全性和功效特征的新型抗体、CAR及其在诊断和治疗上的使用方法。

[0008] 在一方面,本文公开提供了包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成的抗体:重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列,其包含SEQ ID NO:2或6中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物;和/或轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,其包含SEQ ID NO:4或8中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物组成。在另一方面,本文公开了一种抗体,其包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其等效物的重链(HC)免疫球蛋白可变域序列;和/或包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其等效物的轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列。

[0009] 在一方面,本文公开的抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。抗体的恒定区也可以变化。例如,可以提供具有任何同种型的Fc区的抗体:IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)或IgM。在一个实施方案中,本文公开的抗体的恒定区是IgG1恒定区或Ig κ 恒定区。在一个特定方面,本文公开的抗体可进一步包含可检测标记或纯化标记,或基本上由其组成,或由其组成。本文进一步提供了一种产生本文公开的抗体的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:培养上述分离的细胞,其中所述分离的细胞任选地是哺乳动物细胞。

[0010] 本文进一步提供了本文所公开的抗体的抗原结合片段。在本文提供的抗体的一些方面中,抗体片段选自Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFv和Fv。在另一方面,本文提供如本文所公开的分离的抗体或其片段以及可检测或纯化标记,单独或与抗原或其片段组合。本文进一步提供了离体(ex vivo)细胞,其包含所述抗原/抗体复合物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0011] 本文公开提供了多肽,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10或12中的任一个或其每一个的等效物的氨基酸序列,或基本上由其组成,或由其组成。进一步提供了一种分离的多肽,其包含本文公开的抗体的氨基酸序列或其片段以及编码它们的分离的多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。

[0012] 还进一步提供了编码本文公开的抗体及其片段的分离的核酸。在一方面,所述分离的核酸序列包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9和11或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,多核苷酸序列与启动子和/或增强子元件可操作地连接。它们还可以与载体或合适的宿主细胞和/或合适的载体组合用于诊断或治疗用途。在一方面,核酸被包含在宿主细胞中,用于多肽和蛋白质的重组生产。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。

[0013] 本文公开的各方面涉及一种嵌合抗原受体(CAR),其包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:(a)本文公开的任何抗体的抗原结合结构域,(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和(d)细胞内信号传导结构域。在一个方面,CAR还包含一个或多个共刺激信号传导区域,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,本文公开的CAR是第一代CAR,第二代CAR,第三代CAR或第四代CAR。

[0014] 本文还提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:(a)抗原结合结构域(例如抗Lym抗体的),(b)铰链结构域,(c)跨膜

结构域,和(d)DAP 10和/或DAP 12结构域。在另一方面,CAR还包含至少在抗原结合结构域后直接插入的10氨基酸表位“AVPPQQWALS”。所述抗原结合结构域可以来自任何适当的物种,例如哺乳动物、鼠、大鼠或例如人。

[0015] 本文公开提供了一种CAR构建体,所述构建体包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:(a)抗体(例如抗Lym抗体、人源化抗Lym抗体或抗CD19抗体)的抗原结合域,(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和(d)包括一个或多个DAP10和/或DAP12的跨膜结构域的细胞内信号传导结构域。非限制性的抗体的示例包括可来自任何适当的物种的抗Lym-1、抗huLym-1或Lym2、抗Lym2抗体或抗CD19抗体。所述构建体可以进一步包含连接以上元件(a)至(d)的一种或多种接头多肽,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,所述CAR进一步包括位于所述抗原结合结构域的胺末端的前导肽,或基本上由其组成,或由其组成。在一个实施方案中,所述铰链结构域是CD8 α 或IgG1铰链结构域。在另一个方面,跨膜结构域包含CD8 α 跨膜结构域。在另一个方面,所述CAR还包括至少在抗原结合域后直接插入的10氨基酸表位“AVPPQQWALS”。抗原结合结构域可以来自任何适当的物种,例如哺乳动物、鼠、大鼠或例如人。

[0016] 在具体的实施方案中,CAR包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:本发明公开的任何抗体或其片段(例如,scFv)的抗原结合结构域,CD8 α 铰链结构域或IgG1铰链结构域,CD8 α 跨膜结构域,以及DAP 10和/或DAP 12跨膜结构域。在另一方面,CAR包括DAP 10和DAP 12跨膜结构域。

[0017] 在一个特定方面,本发明公开的抗体或CAR可进一步包含可检测的标记物或纯化标记物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明公开的CAR包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列组成:CD8 α 或IgG1铰链结构域,跨膜结构域包含CD 28或CD8 α 跨膜结构域,一个或多个共刺激信号传导域选自CD27、CD28、4-1BB(CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、CD27、LIGHT、NKG2C和B7-H3;和细胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域。

[0019] 本文还提供了一种制备表达CAR(例如,抗Lym CAR或抗CD19)的细胞的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:将编码本文公开的CAR的核酸序列引入免疫细胞群;并选择已经用所述步骤(i)的核酸序列成功转导的免疫细胞亚群,从而产生表达CAR的细胞。

[0020] 本发明公开的各方面涉及一种分离的细胞,其包含本发明公开的CAR,或基本上由其组成,或由其组成,以及产生此类细胞的方法。

[0021] 本文还提供了一种载体,其包含编码本发明公开的抗体或CAR的分离的核酸序列,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,本发明公开提供了一种载体,其包含编码所述抗体或CAR构建体的分离的核酸序列,或基本上由其组成,或由其组成。

[0022] 在另一方面,本发明公开提供了一种组合物,其包含载体(carrier)和本发明公开的抗体、抗原结合片段、多肽、CAR、分离的核酸、载体(vector)和/或分离的细胞中的一种或多种,或基本上由其组成,或由其组成。

[0023] 本文公开的其他方法方面涉及在有需要的对象中抑制肿瘤生长和/或治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:

向所述对象给药有效量的本文提供的CAR(例如抗Lym或CD19)表达细胞、有效量的抗体、有效量的其抗原结合片段和/或有效量本文提供的多肽。在一方面,CAR表达针对待治疗或抑制的癌症或肿瘤细胞上表达的抗原的抗原结合结构域。在一方面,CAR表达细胞对于所述被治疗对象是自体同源的或同种异体的,并且任选地是一线、二线、三线、四线或五线疗法。在另一方面,肿瘤或癌细胞表达或过表达CAR结合的抗原,例如CD19、Lym1和/或Lym2。在另一方面,所述癌症或肿瘤选自癌、肉瘤或白血病。在一个特定方面,所述肿瘤或癌症是B细胞淋巴瘤或白血病。在一个实施方案中,肿瘤是实体瘤。所述实体瘤可以是黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌和/或脑肿瘤。在一方面,所治疗的癌症是癌、肉瘤、神经母细胞瘤、宫颈癌、肝细胞癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、腺瘤、腺癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤或黑色素瘤。

[0024] 该方法可用于治疗例如人类、非人类灵长类动物(例如猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、猴子、猕猴等)、家畜(例如狗和猫)、农场动物(例如马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠)的对象。哺乳动物可以是任何年龄或处于任何发育阶段(例如成人、青少年、儿童、婴儿或子宫内的哺乳动物)。哺乳动物可以是雄性或雌性。在某些实施方案中,该对象患有或怀疑患有肿瘤性疾病、瘤形成、肿瘤、恶性肿瘤或癌症。

[0025] 本文公开的方法可进一步包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向所述对象施用除CAR疗法之外的抗肿瘤疗法。

[0026] 本文公开的内容还涉及用于抑制癌细胞或癌症干细胞增殖的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:将细胞与有效量的表达CAR的细胞、有效量的抗体、有效量的抗原结合片段和/或有效量的本文公开的多肽接触。所述CAR可以是抗Lym-1、抗Lym-2或抗-CD19表达的CAR。

[0027] 本文进一步提供了用于确定对象是可能对治疗有反应还是不太可能对治疗有反应的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:使从患者分离的样品与本文公开的抗体、抗原结合片段和/或多肽接触,并检测样品中的抗体-细胞复合物、抗原结合片段-细胞复合物和/或多肽-细胞复合物,其中复合物的存在表明该对象可能对治疗有反应,复合物的不存在表明该对象不太可能对治疗有反应。所述抗体、抗原结合片段和/或多肽可以被可检测地标记。本文还进一步公开了包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成的方法:将有效量的本文公开的抗体或CAR施用于被确定可能对治疗有反应的对象。

[0028] 本文进一步公开了涉及用于监测用于对象的治疗的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:使从所述对象分离的样品与本文公开的抗体或抗原结合片段接触,并检测样品中的抗体-细胞复合物。所述方法可以在将本文公开的有效量的CAR表达细胞、有效量的抗体、有效量的抗原结合片段和/或有效量的多肽施用于所述对象之前和/或之后进行。所述CAR可以是表达抗-Lym-1、抗-Lym-2或抗-CD19的CAR。在一方面,CAR、抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。在另一方面,样品包括痰、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水、血液或组织中的一种或多种。

[0029] 本文还提供了用于实施本文公开的方法的试剂盒以及实施本文公开的方法的说明。该试剂盒包含以下部分、或基本上由以下部分组成、或由以下部分组成:本文公开的抗体、CAR、抗原结合片段、多肽、分离的核酸、载体、分离的细胞和/或组合物中的一种或多种

和使用说明书。

附图说明

[0030] 图1: 两种人源化 Lym-1 抗体对表位阳性细胞具有不同的结合能力。将 5×10^5 个 Raji 细胞与浓度从 0.013 增加到 1300 nM 的所示抗体一起培养。用 (AF488) 偶联山羊抗人 IgG 检测后, 通过流式细胞术定量平均荧光强度 (MFI)。

[0031] 图2: CAR T 细胞的成功生产。在第 10 天, CAR T 细胞制剂用生物素-抗-Lym-1 抗体标记, 然后用 APC-链霉亲和素检测。空白 T 细胞用作阴性对照。

[0032] 图3A-3C: 两种人源化 Lym-1 的 CAR-T 基细胞均在 Raji 异种移植物中诱导完全缓解。一百万个 Raji/Luc-eGFP 细胞被静脉注射进 8-10 周龄雄性 NSG 小鼠体内 (第 0 天)。在第 6 天测量荧光素酶活性以评估治疗前的肿瘤负荷。(图3A) 在第 7 天, 将 100 μ l PBS 中的一千万个空白和 CAR T 细胞 (50% CAR 阳性) 静脉注射到随机产生的荷瘤小鼠组 (n=5) 中。(图3B) 来自背侧和腹侧图像的平均生物发光辐射被量化并求和。(图3C) Kaplan-Meier 图显示了来自对照组和实验组的小鼠的存活率。

[0033] 图4: 功能性人源化 Lym-1 抗体的产生。将 5×10^5 个 ARH-77 细胞与浓度从 2.218 增加至 266 nM 的所示抗体一起培养。用 (AF488) 偶联山羊抗人 IgG 检测后, 通过流式细胞术定量平均荧光强度 (MFI)。

[0034] 图5 : huLym-1 和 huLym-2 CAR-T 细胞的成功生产。在第 10 天, 用生物素-蛋白质-L 标记 CAR T 细胞制剂, 然后用 APC-链霉亲和素检测。空白 T 细胞用作阴性对照。

[0035] 图6: huLym-2 CAR 表现出对表位阳性细胞系的细胞毒性增加。空白或 CAR T 细胞与 ARH-77 eGFP/Luc 以 2 到 0.25 的效应/靶 (E/T) 比率孵育。共培养后 17 小时, 根据荧光素酶活性计算细胞毒性。

[0036] 图7: 基于 41BB3z 和 DAP10-12 的 CAR T 细胞构建体的示意图。

[0037] 图8: CAR-T 细胞的成功生产。在第 10 天, CAR T 细胞制剂用生物素-抗-Lym-1 抗体标记, 然后用 APC-链霉亲和素检测。空白 T 细胞用作阴性对照。

[0038] 图9A-9B: huLym-1-B-DAP 转导的 CAR T 细胞的稳定基因表达和细胞增殖。原代人 T 细胞在第 0 天用抗 CD3/CD28 磁珠 (Dynabeads) 激活, 并在第 3 天用每个构建体转导。每组中的 100 万个 T 细胞在第 7 天和第 14 天用抗 CD3/CD28 再刺激。(图9A) 在第 4 天、第 7 天、第 8 天和第 12 天对空白和 CAR-T 细胞制剂中的绝对细胞数进行计数。(图9B) 在第 7 天、第 14 天、和第 21 天对 CAR 的表达进行测量。

[0039] 图10: 表位驱动的对 Raji 细胞的细胞毒性。空白或 CAR T 细胞与 Raji-eGFP/Luc 以 2 到 0.25 的效应/靶 (E/T) 比率孵育。共培养后 17 小时, 根据荧光素酶活性测量细胞毒性。

[0040] 图11A-11D: 空白和 CAR 治疗小鼠的肿瘤负荷和体重变化的背侧生物发光成像。一百万个 Raji/Luc-eGFP 细胞被静脉注射进 8-10 周龄雄性 NSG 小鼠体内 (第 0 天)。在第 7 天测量荧光素酶活性以评估治疗前肿瘤负荷。在第 8 天, 将 100 μ l PBS 中的 100 万个空白和 CAR T 细胞静脉注射到随机生成的荷瘤小鼠组 (n=5) 中。(图11A) 示例生物发光图像。(图11B) 小鼠的 Kaplan-Meier 存活图像。(图11C) 来自背侧和腹侧图像的平均生物发光辐射的量化并求和。(图11D) 治疗小鼠的体重随时间变化图像。每只小鼠在第 0 天的体重用作计算体重变化百分比的参考。用数字秤每周测量两次小鼠体重。

[0041] 图12:显示了DAP CD19 CAR T细胞用于治疗NSG小鼠中的播散性Raji淋巴瘤的实验。给小鼠静脉注射Raji 8天后,用100万个huLym-1 DAP、CD19第二代或CD19 DAP的CAR T细胞进行处理。然后每周通过生物发光对小鼠进行成像,结果显示具有第二代构建体的CD19 CAR T细胞全部死亡,但接受CD19 DAP CAR构建体的那些在21天时仍然存活,尽管在该剂量下它们仍然有肿瘤。

[0042] 图13A-13C:具有4-1BB3z细胞内结构域的Lym-1和huLym-1-B CAR均可在体内消除Raji肿瘤。(图13A)体内研究时间表的示意图。(图13B)在第0天接种 10^6 个Raji-eGFP/Luc,随后在第6天用 5×10^6 个空白T细胞、Lym-1-BB3z CAR T细胞、huLym-1-B-BB3z CAR T细胞或100 μ l PBS进行处理的NSG小鼠的生物发光图像。将来自每只NSG小鼠的背侧和腹侧图像的生物发光信号相加并根据时间绘制。(n=5只小鼠/组,数据未显示)。(图 13C)Kaplan-Meier生存曲线(* $p < 0.001$ 通过对数秩检验)。

[0043] 图14A-14F:细胞内信号结构域对huLym-1-B CAR T细胞扩增的影响。(图14A)转导和再刺激后空白或CAR阳性T细胞的体外扩增(来自五个供体的汇总结果)。(图14B)在所示天数时T细胞制剂上的CAR表达。T细胞在第7天和第14天用基于 α -CD2/CD3/CD28的抗体的刺激剂重新激活。(图14C)转导和再刺激后空白或CAR 阳性T细胞的体外扩增(来自3个供体的汇总结果)。(图14D)在所示天数时T细胞制剂上的CAR表达。T细胞在第7天和第14天用 α -CD2/CD3/CD28刺激剂再激活(来自 3 个供体的代表性结果)。(图14E)转导和再刺激后空白或CAR阳性T细胞的体外扩增(来自3个供体的汇总结果)。(图14F)在所示天数时T细胞制剂上的CAR表达。T 细胞在第 7 天和第 14 天用 α -CD2/CD3/CD28 刺激剂重新激活(来自五个供体的代表性结果)。

[0044] 图15A-15B:配体依赖性强直信号是huLym-1-B-BB3z CAR T细胞增殖受损的主要机制。(图15A)评估来自第9天的空白或CAR转导的T细胞的膜联蛋白V (Annexin V) 和死细胞绿菁(Sytox-Green)染色(来自两个供体的代表性结果)。(图15B)CD19-BB3zCAR T细胞用细胞痕量远红染料(Cell trace far-red dye)预先标记,然后与空白或所示的CAR T细胞以1:1的比例共培养过夜。然后对CD19-BB3zCAR T细胞进行膜联蛋白V (Annexin V) 和绿菁(Sytox-Green)染色,以测量huLym-1-B-BB3z或huLym-1-B-DAP CAR T细胞的潜在自相残杀(来自两个供体的代表性结果)。

[0045] 图16A-16B:huLym-1-B-DAP CAR T细胞表现出激活诱导的细胞死亡减少。空白、huLym-1-B-BB3z和huLym-1-B-DAP CAR T细胞在 α -CD2/3/28刺激物的存在下培养,或与K562细胞或Raji细胞一起培养过夜。然后对空白和CAR T细胞进行膜联蛋白V和绿菁(死细胞染料)染色。(图16A)来自三个供体之一的代表性图。(图16B)活细胞中膜联蛋白V阳性细胞的百分比通过以下公式量化: $Q3/(Q3+Q4)$ (来自三个供体,*通过Student's t 检验 $P < 0.05$ 。条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0046] 图 17A-17C:huLym-1-B-DAP显示出针对一组 B 淋巴瘤和白血病细胞系的效应子功能。(图17A)当与一组人淋巴瘤B细胞系以1:1的效应物与靶标比例共培养过夜时,从空白、huLym-1-B-DAP和huLym-1-B-BB3z释放的细胞因子。分泌细胞因子的量化标准化为pg/10000细胞(GM-CSF)或ng/10000 细胞(IL-2和INF- γ)(n=3次技术重复。代表性结果来自两个供体)。(图17B)为了测量空白、huLym-1-B-DAP和huLym-1-B-BB3z的细胞毒性,用细胞痕量远红染料(Cell trace far-red dye)预先标记肿瘤细胞,然后与效应细胞以 1:1 的比

例共培养;对每个时间点的活肿瘤细胞进行门控。(图17C)活肿瘤细胞的百分比被量化并作图。裂解百分比计算为 $(\%1\text{小时时的肿瘤}-\%48\text{小时时的肿瘤})/(\%1\text{小时时的肿瘤})$ ($n=3$ 次技术性重复和来自两个供体的代表性结果如图所示。条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0047] 图18A-18B:Lym-1表位在huLym-1-B-DAP CAR T细胞存在下不会显著下调。空白T、huLym-1-B-DAP和CD19-BB3z与一组B淋巴瘤和白血病细胞系以1:2的比例共培养。共培养过夜后,B细胞系用抗CD22、Lym-1和CD19的抗体标记。

[0048] 图19A-19D:CAR信号域不影响抗原调节。(图19A)空白T、CD19-BB3z、CD19-DAP、huLym-1-B-BB3z和huLym-1-B-DAP CAR T细胞与Raji-eGFP/Luc细胞在以接近1:2的比率下共培养过夜。然后通过流式细胞术通过荧光团缀合的单克隆抗体测量残留的活Raji细胞中的CD19抗原和Lym-1表位表达。(图19B)残留Raji细胞中Lym-1表位和CD19抗原表达的平均荧光强度(MFI)的散点图。过夜共培养后活Raji细胞的(图19C)百分比和(图19D)浓度($n=3$ 次技术重复,来自两个供体的代表结果)。

[0049] 图20A-20F:huLym-1-B-DAP CAR在较低剂量下介导无肿瘤存活。(图20A)空白和CD19-DAP T细胞与Raji-eGFP/Luc细胞以1:2的比例共培养过夜。然后通过流式细胞术测量通过荧光团缀合的单克隆抗体CD19抗原和Lym-1表位表达(来自三个重复的代表性结果)。(图20B)体内研究的示意图。(图20C)在第0天用 10^6 个Raji-eGFP/Luc接种,随后在第8天以所示剂量的空白、huLym-1-B-DAP、CD19-BB3z或CD19-DAP CAR T细胞处理的NSG小鼠的生物发光图像(每组 $n=5$ 只小鼠)。(图20D)Kaplan-Meier生存曲线(ns =对数秩(Mantel-Cox)检验不显著)。(图20E)在第0天用 10^6 个Raji-eGFP/Luc接种,然后在第8天用 10^6 个空白、CD19-BB3z或CD19-DAP CAR T细胞处理的NSG小鼠的生物发光图像($n=5$ 只小鼠/组)。该实验与图25E中的实验并排进行,使用相同的空白T对照组。(图20F)Kaplan-Meier生存曲线(通过对数秩(Mantel-Cox)检验 $P=0.002$)。

[0050] 图21A-21C:选择huLym-1-B作为CAR开发的候选者。(图21A)一组12种人源化Lym-1抗体对Raji细胞的结合能力。所有抗体均以人IgG1同种型表达。huLym-1-60与chLym-1具有相同的序列。hu51是内部生产的人IgG1同种型对照。Raji细胞在所示浓度下培养30分钟,然后用AF-488偶联的山羊抗人IgG检测。通过流式细胞术评估平均荧光强度(MFI)以比较抗体的差异结合。(图21B)通过流式细胞术评价内部生产的huLym-1-B和嵌合Lym-1(chLym-1)在Raji细胞上的结合能力。这里使用的二级抗体是APC偶联的小鼠抗人IgG单克隆抗体。(图21C)chLym-1和huLym-1-B与一组chLym-1阳性和阴性细胞系的结合。对于这些测量,使用APC偶联的小鼠抗人IgG单克隆抗体作为二级抗体。

[0051] 图22A-22H:尽管增殖受损,但具有BB3z-CD3z信号结构域的Lym-1和huLym-1-B CAR T细胞在培养中具有细胞毒性。(图22A)CAR构建体的示意图。261标签是一个10个氨基酸的线性表位,源自人胎盘生长因子(图22B)CAR-T生产和扩增的时间表。(图22C)第7天时空白或转导的原代人T细胞上CAR表达的流式细胞术分析;CAR表达通过Dylight 650偶联抗体针对261标签进行测量。(图22D)CAR T细胞对Lym-1表位阴性(K562)和阳性(Raji)细胞系在所示的效应物与靶标(E:T)比率下的细胞毒性;第9天的CAR T细胞用于测量细胞毒性。在该实验的第7天未进行再刺激($n=3$ 次技术重复,代表结果来自3个供体)。(图22E)体外培养的空白或CAR阳性T细胞从第7-14天的倍数扩增(来自6个供体的汇总结果。 ns -不显著,*通过Student's t 检验 $P<0.001$)。(图22F)显示第9天CD3 ζ 磷酸化的代表性

图(第7天无刺激;n=3个供体)(图22G)再刺激前第7天和第14天的代表性CAR和抑制性受体表达。(图22H)空白或CAR阳性T细胞上抑制性受体百分比的量化,来自3个供体(* $P<0.05$, Student's *t*检验。散点图和条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0052] 图23A-23G:huLym-1-B-BB3zCAR T细胞增殖受损与T细胞上弱表达的Lym-1表位有关,并由 ITAM CD3 ζ 介导。(图23A)在huLym-1-B可变重链的CDR3中引入两个氨基酸突变以产生huLym-1-Bmut抗体或huLym-1-Bmut-BB3zCAR; CAR中CD3 ζ 部分的所有三个ITAM中的酪氨酸(Y)突变为苯丙氨酸(F)以消除huLym-1-B-BB3z活性(huLym-1-BBB3zY-F)。(图 23B) chLym-1、huLym-1-B 和 huLym-1-Bmut 对 Raji 细胞的结合能力。这里使用的二级抗体是 AF-488偶联的山羊抗人 IgG;每条曲线上都标注了 ED50。(图23C)用10 μ g/100 μ l所示抗体染色50万个活化的T细胞,然后用APC-抗-huIgG检测。计算并绘制平均荧光强度;散点图显示了MFI的中值。每个颜色点代表一个供体。(图 23D)体外培养的空白 T、huLym-1-BBB3zY-F和huLym-1-Bmut-BB3z CAR阳性 T 细胞从第 7 天到第 14 天的倍数扩增(来自 3 个供体的汇总结果。ns:Student's *t*检验显示不显著,散点图显示平均值 $\pm$ SD)。(图23E)显示第9天CD3 ζ 磷酸化的代表性图;通过 Dylight 650偶联的抗261标签抗体检测 CAR 表达(n = 2 个供体)。(图23F)第7天和第14天CAR和PD-1和LAG-3表达的代表性图。(图23G)空白或CAR阳性T细胞中PD-1和LAG-3百分比的量化,汇集自三个供体(* $P<0.05$ Student's *t* 检验。条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0053] 图24A-24G:用DAP信号替代BB3z解决了huLym-1-B CAR T细胞的增殖问题。(图 24A)左图说明ITIM和ITAM的共有氨基酸(AA),右图显示DAP12和CD3 ζ 中ITAM的AA;阴影强调了DAP12的ITAM中存在ITIM共有序列。(图24B)具有BB3z或DAP作为细胞内信号结构域的 huLym-1-B CAR的示意图。(图24C)来自第7-14 天的空白、huLym-1-B-DAP 和 huLym-1-B-BB3z CAR 阳性 T 细胞的体外扩增(来自 5 个供体的汇总结果。ns:Student's *t*检验不显著)。(图24D)显示第9天CD3 ζ 磷酸化(p-CD3 ζ)的代表性图(三个供体的代表)。(图24E)空白和CAR阳性T细胞(n=3个供体)中p-CD3 ζ 的定量。(图24F)第7天和第14天的代表性CAR和抑制性受体表达(n=3个供体,* $P<0.05$, Student's *t*检验)。(图24G)空白和CAR阳性T细胞中抑制性受体百分比的量化(来自三个供体;ns:不显著;* $P<0.05$ 通过 Student's *t*检验。散点图和条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0054] 图25A-25F:huLym-1-B-DAP CAR T细胞在体内介导的抗肿瘤功效优于其BB3z对应物。(图 25A)空白、huLym-1-B-DAP或huLym-1-B-BB3z对Lym-1阳性(Raji,左图)或阴性(K562,右图)细胞的细胞毒性。(图 25B)当与K562或Raji以1:1的效应物与靶标比例共培养时,空白组、huLym-1-B-DAP或huLym-1-B-BB3z的细胞因子释放。分泌细胞因子的定量标准化为 pg/10000 个细胞(GM-CSF)或 ng/10000 个细胞(IL-2和INF- γ)(n=3 个技术重复。代表性结果来自三个供体)。(图25C)具有修改方案的体内研究的示意图。(图 25D、图 25E) NSG小鼠在第0天接种 10^6 个Raji-eGFP/Luc,随后在第8天用 1×10^6 空白、huLym-1-B-DAP或 huLym-1-B-BB3z CAR T 细胞处理的生物发光图像(每组 n=5只小鼠)。来自不同供体的两项独立研究。(图 25F)Kaplan-Meier 生存曲线($P = 0.000325$,通过对数秩 (Mantel-Cox) 检验。汇集自两项独立研究。条形图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0055] 图26A-26D:Lym-1表位不会响应于 huLym-1-B-DAP CAR T细胞而下调。(图 26A)空白 T、CD19-BB3z和huLym-1-B-DAP CAR T细胞与Raji-eGFP/Luc细胞以1:2的比例共培养

过夜,然后通过流式细胞术使用荧光团缀合的单克隆抗体对CD19抗原和Lym-1表位表达进行测量。(来自三个重复实验的代表)。(图 26B)Raji上Lym-1表位和 CD19 抗原表达的平均荧光强度(MFI)的散点图(n=3个技术重复)。(图 26C)NSG小鼠在第0天接种 10^6 Raji-eGFP/Luc,然后在第8天用 1×10^6 个空白、CD19-BB3z或huLym-1-B-DAP CAR T细胞进行处理。在第16天,采集骨髓样本并通过流式细胞术使用荧光团缀合的单克隆抗体评估 Lym-1 表位和CD19抗原表达。(图26D)Lym-1表位的平均荧光强度(MFI)和Raji上的CD19抗原表达的散点图。(n=每组5只小鼠,* $P < 0.001$;ns:Kruskal-Wallis 检验不显著。散点图显示平均值 $\pm$ SD)。

[0056] 详细说明

应当理解,本发明公开的不限于所描述的特定方面,因此当然可能发生变化。还应理解,本文所使用的术语仅用于描述特定方面的目的,而非旨在限制,因为本发明公开的范围将仅由所附权利要求限制。此外,在本发明公开全文中和在本发明公开内,各种技术和专利出版物通过引文或阿拉伯数字引用,其完整引文可在权利要求书之前找到。这些出版物的公开内容通过引用并入本文以进一步描述现有技术。

[0057] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本技术的实践或测试中可以使用与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料,但现在描述的是优选的方法、装置和材料。本文引用的所有技术和专利出版物均通过引用整体并入本文。此处的任何内容均不应被解释为承认本技术无权凭借在先发明而先于此类公开。

[0058] 除非另有说明,否则本技术的实践将采用本领域技术范围内的组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术。参见例如Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*系列;Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) 系列;MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press);MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*;Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*;Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition;Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*;美国专利号4683195;Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*;Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*;Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*;Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986));Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*;Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory);Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*;Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London);以及Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*。

[0059] 所有数字名称,例如 pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,都是近似值,它们以1.0 或 0.1的增量发生变化(+)或(-),视情况而定,或变化 $\pm$ 15%,或者10%,或者5%,或

者2%。应当理解,虽然并不总是明确说明,但所有数字名称前都有术语“约”。还应理解,虽然并不总是明确说明,但本文所述的试剂仅是示例性的并且其等效物在本领域中是已知的。

[0060] 无需明确叙述并且除非另有意图可以推断,当本技术涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,其等效物或生物学等效物意在在本技术的范围内。

[0061] 定义

如在说明书和权利要求中使用的,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括它们的混合物。

[0062] 如本文所用,术语“动物”是指活的多细胞脊椎动物生物体,该类别包括例如哺乳动物和鸟类。术语“哺乳动物”包括人和非人哺乳动物。

[0063] 术语“对象/受试者”、“宿主”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用以指代动物,通常是哺乳动物。任何合适的哺乳动物均可通过本文所述的方法、细胞或组合物进行治疗。哺乳动物的非限制性示例包括人、非人灵长类动物(例如,猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、猴子、猕猴等)、家畜(例如,狗和猫)、农场动物(例如,马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。在一些实施方案中,哺乳动物是人。哺乳动物可以是任何年龄或处于任何发育阶段(例如,成人、青少年、儿童、婴儿或子宫内的哺乳动物)。哺乳动物可以是雄性或雌性。哺乳动物可以是怀孕的雌性。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象患有或怀疑患有癌症或肿瘤性疾病。

[0064] “真核细胞”包括除了原核生物之外的所有生命界。它们可以通过膜结合核轻松区分。动物、植物、真菌和原生生物是真核生物或生物,其细胞通过内膜和细胞骨架组织成复杂的结构。最具特征的膜结合结构是细胞核。除非特别说明,否则术语“宿主”包括真核宿主,包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。真核细胞或宿主的非限制性示例包括猿、牛、猪、鼠、大鼠、禽、爬行动物和人类。

[0065] “原核细胞”通常没有细胞核或任何其他膜结合的细胞器并且被分成两个领域,细菌和古细菌。除了染色体DNA,这些细胞还可以在称为附加体的环形环中包含遗传信息。细菌细胞非常小,大约相当于动物线粒体的大小(直径约 1-2 μm ,长10 μm)。原核细胞具有三种主要形状:杆状、球形和螺旋状。细菌细胞不是通过像真核生物那样复杂的复制过程,而是通过二元裂变进行分裂。例子包括但不限于芽孢杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌。

[0066] 如本文所用,术语“抗体”统称为免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括例如但不限于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM、它们的组合以及在任何脊椎动物(例如人类、山羊、兔子和小鼠等哺乳动物,以及非哺乳动物物种)的免疫过程中产生的类似分子,例如鲨鱼免疫球蛋白。除非另有特别说明,否则术语“抗体”包括完整的免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”,它们与感兴趣的分子(或一组高度相似的感兴趣分子)特异性结合而基本上排除与其他分子结合(例如,对感兴趣的分子的结合常数比其他生物样品中其他分子的结合常数大至少 10^3 M^{-1} 、大至少 10^4 M^{-1} 或大至少 10^5 M^{-1} 的抗体和抗体片段)。术语“抗体”还包括基因工程形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、异源偶联抗体(例如双特异性抗体)。另见Pierce Catalog and Handbook (1994-1995) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J. (1997) Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York。抗体的“抗原结合片段”是抗体的一部分,它保留了与抗体的靶抗原特异性结合的能力。

[0067] 在抗体结构方面,免疫球蛋白具有通过二硫键互连的重(H)链和轻(L)链。有两种

类型的轻链, λ 和 κ 。有五种主要的重链类别(或同种型)决定了抗体分子的功能活性: IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。每条重链和轻链都包含恒定区和可变区(这些区域也称为“结构域”)。抗体的恒定区也可以变化。例如,可以提供具有任何同种型的 Fc 区的抗体: IgA (IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 或 IgM。恒定区序列的非限制性示例包括: SEQ ID No: 19-27 或其各自的等效物。

[0068] 在组合中,重链可变区和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区包含被三个高变区中断的“框架”区,高变区也称为“互补决定区”或“CDR”。框架区和 CDR 的范围已被定义(参见 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 其通过引用并入本文)。Kabat 数据库现在在线维护。不同轻链或重链的框架区序列在物种内相对保守。抗体的框架区,即组分轻链和重链的组合框架区,主要采用 β -折叠构象,CDR 形成环,连接 β -折叠结构,在某些情况下构成 β -折叠结构的一部分。因此,框架区起到形成支架的作用,该支架通过链间、非共价相互作用将 CDR 定位在正确的方向上。美国申请号 15/173,534 中提供了 Lym1 和 Lym2 CDR 的非限制性示例。

[0069] CDR 主要负责结合抗原的表位。每条链的 CDR 通常称为 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N 端开始依次编号,并且通常还通过特定 CDR 所在的链(标记为 CDHR 的重链区域和标记为 CDLR 的轻链区域)进行识别。因此,CDHR3 是来自其所在抗体重链可变域的 CDR3,而 CDLR1 是来自其所在抗体轻链可变域的 CDR1。TNT 抗体将具有 TNT 相关抗原特有的特定 V_H 区和 V_L 区序列,因此具有特定的 CDR 序列。具有不同特异性(即不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。尽管 CDR 因抗体而异,但 CDR 中只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR 中的这些位置称为特异性决定残基(SDR)。

[0070] 当术语“人源化”用于抗体时,是指抗体的氨基酸序列具有一个或多个特异性结合受体人免疫球蛋白分子中的所需抗原的互补决定区(CDR)的非人氨基酸残基(例如,小鼠、大鼠、山羊、兔等),以及 Fv 框架区(FR)中的一个或多个非人氨基酸残基,它们是位于 CDR 侧翼的氨基酸残基。与从中获得或基于一个或多个 CDR 的非人亲本抗体相比,此类抗体通常具有降低的免疫原性并因此在人体中具有更长的半衰期。

[0071] 如本文所用,术语“抗原”是指可被特定体液或细胞免疫的产物(如抗体分子或 T 细胞受体)特异性结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单的中间代谢物、糖(例如,寡糖)、脂质和激素以及大分子,例如复合碳水化合物(例如,多糖)、磷脂和蛋白质。常见的抗原类别包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物和其他寄生虫抗原、肿瘤抗原、涉及自身免疫疾病的抗原、过敏和移植排斥、毒素和其他杂项抗原。

[0072] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指可特异性结合抗原靶标的任何蛋白质或多肽结构域。

[0073] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指融合蛋白,其包含能够结合抗原的胞外结构域、衍生自不同于胞外结构域衍生的多肽的多肽的跨膜结构域,和至少一个细胞内结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”有时被称为“嵌合受体”、“T 体”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合抗原的胞外域”是指可以结合特定抗原的任何寡肽或多肽。“细胞内结构域”是指已知用作传递信号以引起细胞中生物过程的激活或抑制结构域的任何寡肽或多肽。在某些

实施方案中,除了初级信号传导结构域之外,细胞内结构域可以包含一个或多个共刺激信号传导结构域,或者基本上由其组成,或者还进一步包含一个或多个共刺激信号传导结构域。“跨膜结构域”是指任何已知跨越细胞膜并且可以起到连接细胞外和信号结构域的作用的寡肽或多肽。嵌合抗原受体可以任选地包含“铰链结构域”,其充当细胞外结构域和跨膜结构域之间的接头。本文提供了此类域的非限制性示例,例如:

铰链结构域:IgG1 重链铰链序列:

CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCG

跨膜结构域:CD28跨膜区:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTG

胞内域:4-1BB共刺激信号传导区:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

胞内域:CD28共刺激信号传导区:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACC
CGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

胞内域:CD3 ζ 信号传导区:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGA
TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA。

[0074] 每个示例性域组分的进一步实施方案包括具有类似生物学功能的其他蛋白质,这些蛋白质与由上述公开的核酸序列编码的蛋白质具有至少 70%或者至少 80% 的氨基酸序列同一性,优选 90% 的序列同一性,更优选至少 95% 的序列同一性。此外,本文提供了此类结构域的非限制性示例。

[0075] 如本文所用,“第一代CAR”是指包含能够结合抗原的胞外域、衍生自不同于胞外结构域衍生的多肽的多肽的跨膜结构域和至少一个胞内结构域的CAR。“第二代CAR”是指进一步包含一个共刺激域(例如4-1BB或CD28)的第一代CAR。“第三代CAR”是指进一步包含两个共刺激域(例如CD27、CD28、ICOS、4-1BB 或 OX40)的第一代CAR。“第四代CAR”(也称为“TRUCK”)是指经过进一步改造以分泌额外因子(例如促炎细胞因子IL-12)的CAR T细胞。对这些CAR技术和细胞疗法的综述可以在Maus, M. et al. Clin. Cancer Res. 22(3): 1875-84 (2016)中找到。

[0076] 如本文所用,术语“信号肽”或“信号多肽”意指通常存在于新合成的分泌或膜多肽或蛋白质的N-末端的氨基酸序列。它的作用是引导多肽穿过或进入细胞膜,然后被去除。这样的例子是本领域公知的。非限制性示例被描述于美国专利号8,853,381和 5,958,736中。

[0077] 如本文所用,关于调节性多核苷酸,术语“可操作地连接”是指调节性多核苷酸与其连接的多核苷酸序列之间的关联,使得当特定蛋白质与调节性多核苷酸结合时,连接的多核苷酸被转录。

[0078] “组合物”通常意指活性剂(例如CAR T细胞或CAR NK细胞)、抗体、化合物和天然存在或非天然存在的载体的组合,所述载体是惰性的(对于例如,可检测试剂或标记)或活性的,例如佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等,并且包括药学上可接受的载体。载体还包括药物赋形剂和添加剂蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如,糖,包括单糖、二、三、四寡糖和寡糖;衍生糖,例如糖醇、醛糖酸、酯化糖和类似物;和多糖或糖聚合物),它们可以单独或组合存在,单独或组合包含 1-99.99% 的重量或体积。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HAS)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。代表性的氨基酸/抗体成分也可以起到缓冲效能的作用,包括丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。碳水化合物赋形剂也在本技术的范围内,其实例包括但不限于:单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;双糖,如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,例如棉子糖、松三糖、麦芽糊精、葡聚糖、淀粉等;和糖醇,如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(葡萄糖醇)和肌醇。

[0079] 根据本发明公开使用的组合物,包括细胞、治疗、疗法、药剂、药物和药物制剂,可以以剂量单位形式包装以易于给药和剂量均匀。术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于对象的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的组合物,经计算以产生与其给药相关的所需反应,即适当的途径和方案。根据治疗次数和单位剂量,给药量取决于所需的结果和/或保护。组合物的精确量也取决于从业者的判断并且因每个人而异。影响剂量的因素包括受试者的身体和临床状态、给药途径、治疗的预期目标(缓解症状与治愈)以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。在配制时,溶液将以与剂量制剂相容的方式并且以治疗或预防有效的量给药。该制剂易于以多种剂型给药,例如本文所述的可注射溶液类型。

[0080] 如本文所用,术语“共有序列”是指通过比对一系列多个序列而确定的氨基酸或核酸序列,其定义了理想化的序列,该序列代表在多个序列的每个相应位置处的氨基酸或碱基的主要选择。根据多序列系列的序列,该系列的共有序列可以与每个序列相差零、一个、几个或多个取代。此外,根据多序列系列的序列,可以为该系列确定一个以上的共有序列。共有序列的产生已经进行了深入的数学分析。可以使用各种软件程序来确定共有序列。

[0081] 如本文所用,术语“CD8 α 铰链结构域”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和具有与如本文所示的CD8 α 铰链结构域序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。人、小鼠和其他物种的CD8 α 铰链结构域的示例性序列提供于Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177。与 CD8 α 铰链结构域相关的序列提供于Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177。此类的非限制性示例包括:

人CD8 α 铰链结构域;

PAKPTTTPAPRPPTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY

小鼠CD8 α 铰链域;

KVNSTTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

猫CD8 α 铰链结构域;

PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY,及其等效物。

[0082] 如本文所用,术语“CD8 α 跨膜结构域”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的CD8 α 跨膜结构域序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。与人 T 细胞表面糖蛋白 CD8 α 链的氨基酸位183至203位相关的 (NCBI 参考序列:NP_001759.3),或小鼠 T 细胞表面糖蛋白 CD8 α 链的 197 至 217 位氨基酸相关的 (NCBI 参考序列:NP_001074579.1)和大鼠 T 细胞表面糖蛋白 CD8 α 链的氨基酸位190 至 210相关的片段序列 (NCBI 参考序列:NP_113726.1)提供了 CD8 α 跨膜结构域的其他示例序列。与列出的每个 NCBI 相关的序列提供如下:

人 CD8 α 跨膜结构域: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT;

小鼠 CD8 α 跨膜结构域: IWAPLAGICVALLLSLIITLI;

大鼠 CD8 α 跨膜结构域: IWAPLAGICAVLLLSLVITLI, 及其等效物。

[0083] 如本文所用,术语“CD28跨膜结构域”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的CD28跨膜结构域序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。与 GenBank Accession Nos: XM_006712862.2 and XM_009444056.1相关的片段序列提供了 CD28 跨膜结构域的额外的、非限制性的示例序列。与列出的每个登记号相关的序列并入本文。

[0084] 如本文所用,术语“4-1BB共刺激信号区”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的4-1BB共刺激信号区序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。美国专利申请公开号2013/0266551 A1 (作为美国申请号13/826258 提交)中提供了 4-1BB 共刺激信号区域的示例序列。在美国申请号 13/826258 中公开的 4-1BB 共刺激信号区的序列公开如下:

4-1BB共刺激信号传导区域:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL, 及其各自的等效物。

[0085] 如本文所用,术语“CD28共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的CD28共刺激信号传导区序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。CD28 共刺激信号传导区包括跨膜结构域和细胞内结构域。CD28共刺激信号传导区的示例序列提供于美国专利号 5686281; Geiger, T.L. et al. (2001) Blood 98:2364-2371; Hombach, A. et al. (2001) J Immunol. 167:6123-6131; Maher, J. et al. (2002) Nat Biotechnol. 20:70-75; Haynes, N.M. et al. (2002) J Immunol. 169: 5780-5786; Haynes, N.M. et al. (2002) Blood 100:3155-3163。非限制性示例包含如下 CD28序列的残基114-220:

MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE
FRASLHKGLDSAVEVCVVG NYSQQLQVYS KTGFNC DGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY
FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR
SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS, 及其等效物。

[0086] 如本文所用,术语“ICOS共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白质片

段和和与如本文所示的ICOS共刺激信号传导区序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。ICOS共刺激信号传导区的非限制性示例序列提供于美国公开文件2015/0017141A1,示例性多核苷酸序列如下提供。

[0087] ICOS共刺激信号传导区:

ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAA
CACAGCCAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA。

[0088] 如本文所用,术语“OX40共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的OX40共刺激信号区序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。美国公开文件2012/20148552A1中公开了OX40共刺激信号区的非限制性示例序列,并且包括以下提供的示例性序列。

[0089] OX40共刺激信号传导区:

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA GTTTCGGGAC
CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATC。

[0090] 如本文所用,术语“CD3 ζ 信号传导结构域”是指与该名称相关的特定蛋白质片段和与如本文所示的CD3 ζ 信号传导结构域序列具有至少70%或至少80%的氨基酸序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。CD3 ζ 信号传导域的示例序列提供于美国申请号 13/826,258(作为 US 2013/0266551 公布)中。与 CD3 ζ 信号域相关的序列如下所列:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR,及其等效物。

[0091] 如本文所用,术语“T2A”和“2A肽”可互换使用,指任何2A肽或其片段、任何2A样肽或其片段、或在含有共有多肽基序 D-V/I-E-X-N-P-G-P 的相对较短的肽序列(长约20个氨基酸,取决于病毒来源)中包含必需氨基酸的人工肽,其中 X 是指通常被认为是自切割的任何氨基酸。

[0092] 如本文所用,术语“自杀基因”是能够诱导细胞凋亡的基因;非限制性实例包括 HSV-TK(单纯疱疹病毒胸苷激酶)、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、羧酸酯酶、细胞色素P450或 PNP(嘌呤核苷磷酸化酶)、截短的 EGFR 或诱导型半胱天冬酶(“iCasp”)。自杀基因可能沿着多种途径发挥作用,并且在某些情况下,可能被诱导剂(例如小分子)诱导。例如,iCasp自杀基因包含与优化的结合诱导剂的蛋白质可操作地连接的半胱天冬酶蛋白的一部分;将诱导剂引入包含自杀基因的细胞导致半胱天冬酶的活化和随后所述细胞的凋亡。

[0093] 如本文所用,术语“用于控制CAR的表达和/或活化的开关机制”是指胞外、跨膜和胞内结构域,其中胞外结构域包含靶特异性结合元件,该结合元件包括标记对靶细胞上表达的或由靶细胞表达的靶抗原之外的分子具有特异性的标签、结合域或标记。CAR的特异性由包含靶抗原结合域和被CAR上的标记、结合域或标签识别或结合的域的第二构建体提供。参见例如,WO 2013/044225、WO 2016/000304、WO 2015/057834、WO 2015/057852、WO 2016/070061、US 9,233,125、US 2016/0129109。以此方式,可将表达CAR的T细胞给药于对象,但在给药包含特异性结合域的第二组合物之前,其不能结合其靶抗原。

[0094] 如本文所用,术语“B细胞”是指适应性免疫系统的体液免疫中的一类淋巴细胞。B细胞的主要功能是制造抗体、充当抗原呈递细胞、释放细胞因子,并在抗原相互作用激活后产生记忆 B 细胞。B 细胞与其他淋巴细胞(如 T 细胞)的区别在于细胞表面存在 B 细胞受体。B 细胞可以被分离出来或从市售来源获得。市售 B 细胞系的非限制性示例包括 AHH-1 (ATCC® CRL-8146™)、BC-1 (ATCC® CRL-2230™)、BC-2 (ATCC® CRL-2231™)、BC-3 (ATCC® CRL-2277™)、CA46 (ATCC® CRL-1648™)、DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™)、DS-1 (ATCC® CRL-11102™)、EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™)、Z-138 (ATCC® CRL-3001)、DB (ATCC CRL-2289)、Toledo (ATCC CRL-2631)、Pfiffer (ATCC CRL-2632)、SR (ATCC CRL-2262)、JM-1 (ATCC CRL-10421)、NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693)、NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694)、NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695)、AND SUP-B15 (ATCC CRL-1929)。其他示例包括但不限于源自间变性和大细胞淋巴瘤的细胞系,例如 DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas 299、Ki-JK、Mac-2A Ply1、SR-786、SU-DHL-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, 和 -16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL;霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)例如 DEV、HD-70、HDL-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L 428、L 540、L1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1。此类市售细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)或 ATCC(www.atcc.org/)和德国微生物和细胞培养物保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)(<https://www.dsmz.de/>)。

如本文所用,术语“T细胞”是指一种在胸腺中成熟的淋巴细胞。T 细胞在细胞介导的免疫中发挥重要作用,并且与其他淋巴细胞(如B细胞)的区别在于细胞表面存在 T 细胞受体。T细胞可以被分离出来或从市售来源获得。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 $\gamma\delta$ T细胞。“细胞毒性细胞”包括 CD8+ T 细胞、自然杀伤(NK)细胞和中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。市售 T 细胞系的非限制性示例包括BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™)、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™)、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™)、Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™)、TALL-104 细胞毒性人 T 细胞系(ATCC # CRL-11386)。进一步的示例包括但不限于成熟的 T 细胞系,例如Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1和T34;以及未成熟 T 细胞系,例如 ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1 至 T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1, -2, -3, 和 -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119);以及皮肤 T 细胞淋巴瘤系,例如 HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ [G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162)。无效白血病细胞系(Null leukemia cell lines),包括但不限于 REH、NALL-1、KM-3、L92-221,是另一种可商购的免疫细胞来源,同样的是源自其他白血病和淋巴瘤的细胞系,例如 K562 红白血病、THP-1 单核细胞白血病、

U937 淋巴瘤、HEL 红白血病、HL60 白血病、HMC-1 白血病、KG-1 白血病、U266 骨髓瘤。此类市售细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心或 ATCC (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0095] 如本文所用,术语“NK细胞”,也称为自然杀伤细胞,是指起源于骨髓并在先天免疫系统中起关键作用的一类淋巴细胞。即使在细胞表面没有抗体和主要组织相容性复合体的情况下,NK 细胞也能提供针对病毒感染细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫反应。NK细胞可以被分离出来或从市售来源获得。商业 NK 细胞系的非限制性实例包括 NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™) 细胞系。进一步的例子包括但不限于 NK 系 HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90 和 YT。此类市售细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心或ATCC (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0096] 如本文所用,术语“CRISPR”是指依赖于成簇的规则间隔的短回文重复途径的序列特异性遗传操作技术。CRISPR可用于执行基因编辑和/或基因调控,以及简单地将蛋白质靶向特定基因组位置。“基因编辑”是指一种基因工程,其中通过向多核苷酸序列引入缺失、插入、单链或双链断裂或碱基替换来改变目标多核苷酸的核苷酸序列。

[0097] 在某些方面,CRISPR介导的基因编辑利用非同源末端连接 (NHEJ) 或同源重组途径来进行编辑。基因调控是指增加或减少特定基因产物(如蛋白质或 RNA) 的产生。

[0098] 如本文所用,术语“gRNA”或“向导RNA”是指用于靶向特定多核苷酸序列以使用 CRISPR 技术进行基因编辑的向导RNA序列。为靶标特异性设计gRNA和供体治疗性多核苷酸的技术是本领域公知的。例如,Doench, J., et al. Nature biotechnology 2014;32 (12):1262-7、Mohr, S. et al. (2016) FEBS Journal 283: 3232-38 和 Graham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260。gRNA包含包含CRISPR RNA(crRNA)和反式激活 CRISPR RNA(tracrRNA)的融合多核苷酸;或包含 CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 CRISPR RNA (tracrRNA) 的多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。在某些方面,gRNA 是合成的 (Kelley, M. et al. (2016) J of Biotechnology 233 (2016) 74-83)。

[0099] 术语“Cas9”是指由此名称所指的CRISPR相关核酸内切酶。非限制性的示例性Cas9 包括金黄色葡萄球菌 Cas9、核酸酶死亡的 Cas9,以及它们各自的直向同源物和生物学等效物。直向同源物包括但不限于化脓性链球菌 Cas9 (“spCas9”)、来自嗜热链球菌、嗜肺军团菌、乳酰胺奈瑟球菌 (*Neisseria lactamica*)、脑膜炎奈瑟菌、新凶手弗朗西丝菌 (*Francisella novicida*) 的 Cas 9;和来自各种细菌物种,包括酸胺球菌属和新凶手弗朗西丝菌U112的Cpf1(执行类似于 Cas9 的切割功能)。

[0100] 如本文所用,术语“核酸序列”和“多核苷酸”可互换使用以指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链 DNA 或 RNA、基因组 DNA、cDNA、DNA-RNA 杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生化修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。

[0101] 当应用于核酸序列时,术语“编码”是指如果在其天然状态下或当通过本领域技术人员熟知的方法操作时,被称为“编码”多肽的多核苷酸被转录和/或翻译以产生多肽的 mRNA 和/或其片段。反义链是这种核酸的互补链,可以从中推导出编码序列。

[0102] 如本文所用,术语信号肽或信号多肽意指通常存在于新合成的分泌或膜多肽或蛋

白质的N-末端的氨基酸序列。它的作用是引导多肽穿过或进入细胞膜,然后被去除。这样的例子是本领域公知的。非限制性示例是美国专利号8853381 和 5958736 中描述的那些。

[0103] 如本文所用,术语“载体”是指用于在不同宿主之间转移的核酸构建体,包括但不限于质粒、病毒、粘粒、噬菌体、BAC、YAC等。“病毒载体”定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含要在体内、离体或体外递送到宿主细胞中的多核苷酸。在一些实施方案中,质粒载体可以是市购的载体。在其他实施方案中,病毒载体可以根据本领域已知的技术从杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒、AAV等产生。在一个实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、甲病毒载体等。基于传染性烟草花叶病毒(TMV)的载体可用于制造蛋白质,据报道可在烟叶中表达 Griffithsin(0' Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106(15):6099-6104)。甲病毒载体,例如基于 Semliki Forest 病毒的载体和基于 Sindbis 病毒的载体,也已被开发用于基因治疗和免疫治疗。参见 Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 and Ying et al. (1999) Nat. Med. 5(7):823-827。在由逆转录病毒载体介导基因转移的方面,载体构建体是指包含逆转录病毒基因组或其部分和感兴趣的基因的多核苷酸(例如编码CAR的多核苷酸)。关于用于基因转移的现代载体方法的更多细节可以在例如Kotterman et al. (2015) Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook Annual Review of Biomedical Engineering 17中找到。包含启动子和克隆位点的载体是本领域众所周知的,多核苷酸可操作地连接至所述克隆位点。此类载体能够在体外或体内转录RNA,并且可从诸如Agilent Technologies (Santa Clara, Calif.)和 Promega Biotech (Madison, Wis.)等来源商购获得。

[0104] 如本文所用,术语“分离的细胞”通常是指基本上与组织的其他细胞分离的细胞。该术语包括原核细胞和真核细胞。

[0105] “免疫细胞”包括例如源自骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白细胞(白细胞)、淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和髓细胞衍生细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞)。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 γ - δ T细胞。“细胞毒性细胞”包括 CD8+ T 细胞、自然杀伤(NK)细胞和中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。

[0106] 如本文所用,短语“免疫反应”或其等同的“免疫学反应”是指细胞介导的反应(例如,由抗原特异性T细胞或其分泌产物介导)的发展。通过与 I 类或 II 类 MHC 分子相关的多肽表位的呈递引发细胞免疫反应,以治疗或预防病毒感染,扩增抗原特异性 B-reg 细胞、TC1、CD4+ T 辅助细胞和/或 CD8+细胞毒性 T 细胞和/或疾病产生、自动调节 T 细胞和 B 细胞“记忆”细胞。该反应还可能涉及其他组分的激活。在某些方面,术语“免疫反应”可用于涵盖免疫细胞调节网络的形成。因此,术语“调节网络形成”可以指引发的免疫应答,使得免疫细胞,优选T细胞,更优选T调节细胞,触发其他免疫细胞的进一步分化,例如但不限于B细胞或抗原呈递细胞——其非限制性示例包括树突细胞、单核细胞和巨噬细胞。在某些实施方案中,调节网络形成涉及B细胞分化为调节性B细胞;在某些实施方案中,调节网络的形成涉及致耐受性抗原呈递细胞的形成。

[0107] 术语“转导”或“转导作用”是指在用于产生嵌合抗原受体细胞时将外源核苷酸序

列引入细胞的过程。在一些实施方案中,这种转导是通过载体完成的。

[0108] 如本文所用,关于细胞的术语“自体同源的”是指被分离并输回到同一对象(受体或宿主)中的细胞。“同种异体”是指非自体细胞。

[0109] “有效量”或“有效的量”是指药剂(例如,HLA-DR CAR细胞)或两种或更多种药剂的组合物,当被给药以治疗哺乳动物时或其他对象时,足以实现对这种疾病的治疗。“有效量”将根据要治疗的对象的药剂、疾病及其严重程度以及年龄、体重等而变化。

[0110] 如本文所用,“癌症”是一种疾病状态,其特征存在于对象存在表现出异常不受控制的复制的细胞,并且可以与术语“肿瘤”互换使用。

[0111] “实体瘤”是指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名。实体瘤的例子包括肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0112] 术语“B细胞淋巴瘤或白血病”是指在淋巴系统或骨髓的问题中形成并经历了恶性转化的一种癌症,这使得病理性癌症内的细胞对宿主生物体具有侵入或扩散到身体的其他部位的能力。

[0113] 如本文所用,术语“包括”旨在表示组合物和包含了所列举的要素的方法,但不排除其他要素。当用于定义组合物和方法时,“基本上由……组成”意味着排除对预期用途的组合具有任何重要意义的其他元素。例如,基本上由本文定义的元素组成的组合物不会从分离和纯化方法和药学上可接受的载体(例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)中排除痕量污染物。“由……组成”是指排除多于微量元素的其他成分和用于施用本文公开的组合物的基本方法步骤。由这些过渡术语中的每一个定义的方面在本发明公开的范围内。

[0114] 如本文所用,术语“可检测标志物”是指至少一种能够直接或间接产生可检测信号的标志物。该标志物的非详尽列表包括:例如通过比色法、荧光、发光产生可检测信号的酶,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;发色团,例如荧光、发光染料;具有通过电子显微镜或通过其电学特性(例如电导率、电流法、伏安法、阻抗)检测到的电子密度的基团;可检测基团,例如其分子大小足以诱导其物理和/或化学性质发生可检测变化的基团,这样的检测可以通过光学方法如衍射、表面等离子体共振、表面变化、接触角变化或物理方法如原子力光谱、隧道效应或放射性分子如 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 来完成。

[0115] 如本文所用,术语“纯化标记物”是指用于纯化或鉴定的至少一种标记物。该标记物的非详尽列表包括 His、lacZ、GST、麦芽糖结合蛋白、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、cherry、硫氧还蛋白(thioredoxin)、poly (NANP)、V5、Snap、HA、几丁质结合蛋白、Softag 1、Softag 3、Strep 或 S-蛋白。合适的直接或间接荧光标记包括 FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、cherry、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、DNP、AMCA、生物素、地高辛(Digoxigenin)、Tamra、Texas Red、罗丹明(rhodamine)、Alexa fluors、FITC、TRITC 或任何其他荧光染料或半抗原。

[0116] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸源自基因组DNA,则表达可包括mRNA在真核细胞中的剪接。基因的表达水平可以通过测量细胞或组织样品中的mRNA或蛋白质的量来确定。在一方面,来自一个样品的基因的表达水平可以直接与来自对照或参考样品的基因的表达水平进行比较。在另一方面,来自一个样品的基因的表达水平可以与施用化合物后

来自同一样品的该基因的表达水平直接比较。

[0117] 如本文所用,“同源性”或“相同”、“同一性”或“相似性”百分比,当在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中使用时,是指两个或多个序列或子序列是相同或具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,例如在特定区域(例如,编码本文所述的抗体的核苷酸序列或本文所述的抗体的氨基酸序列)至少 60% 同一性,优选至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92 %、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,该位置可以为了比较的目的而对齐。当比较序列中的某个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共享的匹配或同源位置数量的函数。可以使用本领域已知的软件程序来确定序列的比对和百分比同源性或序列同一性,例如描述于Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1。优选的,默认参数用于对齐。优选的比对程序是 BLAST,使用默认参数。特别地,优选程序是 BLASTN 和 BLASTP,使用以下默认参数:遗传代码=标准;过滤器=无;股=两者;截止= 60;期望 = 10;矩阵 = BLOSUM62;描述 = 50 个序列;排序依据 = 高分;数据库 = 非冗余,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻译 + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详细信息可以在以下 Internet 地址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。术语“同源性”或“相同”、百分比“同一性”或“相似性”也指或可应用于测试序列的互补。该术语还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有取代的序列。如本文所述,优选算法可以考虑间隙等。优选地,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域,或更优选长度至少50-100个氨基酸或核苷酸的区域。“无关”或“非同源”序列与本文公开的序列之一具有小于40%的同一性,或者小于25%的同一性。

[0118] 短语“一线”或“二线”或“三线”是指患者接受的治疗顺序。一线治疗方案是首先给予的治疗,而二线或三线治疗分别在一线治疗或二线治疗之后给予。美国国家癌症研究所将一线治疗定义为“对疾病或症状的首次治疗。对于癌症患者,主要治疗手段可以是手术、化学疗法、放射疗法或这些疗法的组合。一线治疗也被本领域技术人员称为“初级疗法和初级治疗”。参见美国国家癌症研究所网站 www.cancer.gov, 最后一次访问在2008年5月1日。通常情况下,由于患者对一线治疗没有表现出积极的临床或亚临床反应,或者一线治疗已经停止,患者会接受后续化疗方案。

[0119] 一方面,术语抗体的“等效的”或“生物学等效的”是指通过如ELISA或其他合适的方法测量的抗体选择性结合其表位蛋白或其片段的能力。生物学等效抗体包括但不限于与参照抗体结合相同表位的那些抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。

[0120] 无需明确叙述,除非另有意图,否则可以推断,当本发明公开涉及多肽、蛋白质、多核苷酸、抗体或其片段时,其等效物或生物学等效物意在在本发明的范围内公开。如本文所用,术语“其生物等效物”在提及参照蛋白质、抗体或其片段、多肽或核酸时旨在与“其等效物”同义,意指具有最小同源性同时仍保持所需结构或功能的那些物质。除非在本文中特别说明,否则预期上述任何一项也包括其等效物。例如,等效物意指与参照蛋白质、多肽、抗体或其片段或核酸至少约 70% 的同源性或同一性,或至少 80% 的同源性或同一性,或者至少约 85%,或至少约 90%,或至少约 95%,或者,至少 98% 的同源性或同一性和/或表现出基本等效的生物活性。或者,当提及多核苷酸时,其等效物是在严格条件下与参照多核苷酸

或其互补物杂交的多核苷酸。

[0121] 短语“等效的多肽”或“等效的肽片段”是指由在高严格性条件下与编码示例多肽的多核苷酸或编码示例多肽的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的,和/或与标准或对照生物活性相比表现出相似的体内生物活性(例如,接近100%,或超过90%,或超过85%,或超过70%)的蛋白质、多核苷酸或肽片段。本发明公开范围内的其他实施方案具有超过60%,或超过65%,或超过70%,或超过75%,或超过80%,或超过85%,或超过90%,或超过95%,或超过97%,或超过98%或99%的序列同源性。百分比同源性可以通过使用程序进行序列比较来确定,例如在适当条件下使用运行的BLAST程序。在一方面,该程序在默认参数下运行。

[0122] 与另一序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)意味着,当比对时,比较两个序列时该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定比对和百分比同源性或序列同一性,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1.中描述的那些程序。优选地,默认参数用于对齐。优选的比对程序是使用默认参数的BLAST。特别地,首选程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传代码 = 标准;过滤器 = 无;股=两者;截止 = 60;期望 = 10;矩阵 = BLOSUM62;描述 = 50 个序列;排序依据 = 高分;数据库 = 非冗余,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻译 + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详细信息可以在以下 Internet 地址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0123] “杂交”是指一种反应,其中的一种或多种多核苷酸反应形成复合物,该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键而稳定。氢键可以通过 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 结合或以任何其他序列特异性方式发生。复合物可包含两条链形成的双链体结构、三条或更多条链形成的多链复合物、单条自杂交链、或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛过程中的步骤,例如PCR反应的起始,或核酶对多核苷酸的酶促切割。

[0124] 严格杂交条件的示例包括:约25℃至约37℃的培养温度;约6xSSC至约10xSSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;和约4xSSC到约8x SSC的洗涤溶液。中等杂交条件的示例包括:约40℃至约50℃的培养温度;约9xSSC至约2x SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;和约5xSSC至约2xSSC的洗涤溶液。高严格条件的示例包括:约55℃至约68℃的培养温度;约1x SSC至约0.1x SSC的缓冲液浓度;约55% 至约75%的甲酰胺浓度;和约1xSSC、0.1xSSC或去离子水的洗涤溶液。通常,杂交培养时间为 5 分钟至 24小时,具有1、2 或多个洗涤步骤,并且洗涤培养时间约为 1、2 或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应当理解,可以采用使用其他缓冲系统的SSC等效物。

[0125] “与肿瘤组织类型相对应的正常细胞”是指来自与肿瘤组织的相同组织类型的正常细胞。非限制性示例是来自患有肺肿瘤患者的正常肺细胞,或来自患有结肠肿瘤患者的正常结肠细胞。

[0126] 如本文所用,术语“分离的”是指基本上不含其他材料的分子或生物制品或细胞材料。在一方面,术语“分离的”是指核酸(例如DNA或RNA)、或蛋白质或多肽(例如,抗体或其衍生物)、或细胞或细胞器、或组织或器官,分别与天然来源中存在的其他 DNA 或 RNA、或蛋白质或多肽、或细胞或细胞器、或组织或器官分离。术语“分离的”还指当通过重组DNA技术

产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意在包括不是天然存在的片段并且不会在天然状态下发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白质中分离的多肽并且意在包括纯化的和重组的多肽。术语“分离的”在本文中也用于指与其他细胞或组织分离的细胞或组织,并且意在包括培养的和工程化的细胞或组织。

[0127] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指由B淋巴细胞的单个克隆或由单个抗体的轻链和重链基因已被转染到其中的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合物制备杂交抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0128] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用并以其最广泛的意义指代两个或多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物的化合物。亚基可以通过肽键连接。在另一方面,亚基可以通过其他键连接,例如酯、醚等。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸并且对可能包含蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、氨基酸类似物和肽模拟物。

[0129] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,是指任何长度的核苷酸的聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、RNAi、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则可以在多核苷酸组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸成分阻断。聚合后可以进一步修饰多核苷酸,例如通过与标记组分缀合。该术语还指双链和单链分子。除非另有说明或要求,否则本技术的任何方面的多核苷酸包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种。

[0130] 如本文所用,术语“纯化的”不要求绝对纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的核酸、肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物是完全或部分地与蛋白质或其他污染物分离的化合物。通常,在用于治疗性给药的完整药物制剂中,将肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物与药物载体、赋形剂、缓冲剂、吸收促进剂、稳定剂、防腐剂、佐剂或其他共成分混合或配制之前,用于本发明公开的基本上纯化的肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物占制剂中存在的所有大分子物质的80%以上。更典型地,在与其他制剂成分混合之前,肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物被纯化以代表存在于纯化制剂中的所有大分子种类的大于90%,通常大于95%。在其他情况下,纯化的制剂可能基本上是均质的,其中其他大分子物质无法通过常规技术检测到。

[0131] 如本文所用,术语“特异性结合”是指抗体与抗原之间以至少 10^{-6} M的结合亲和力接触。在某些方面,抗体以至少约 10^{-7} M的亲和力结合,并且优选为 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M。

[0132] 如本文所用,术语“重组蛋白”是指通过重组DNA技术产生的多肽,其中通常将编码该多肽的DNA插入合适的表达载体中,该表达载体继而用于将宿主细胞转化为产生异源蛋白质。

[0133] 如本文所用,“治疗”对象的疾病是指(1)防止在易感或尚未表现出疾病症状的对象中发生症状或疾病;(2)抑制疾病或者阻止其发展;(3)改善或引起疾病或疾病症状的消退。如本领域所理解的,“治疗”是用于获得有益的或期望的结果,包括临床结果的方法。对于本技术的目的,有益的或期望的结果可以包括一种或多种,但不限于一种或多种无论是可检测的还是不可检测的症状的减轻或改善、病症(包括疾病)程度的减轻、稳定(即,不恶化)病症(包括疾病)的状态,病症(包括疾病)的延迟或减缓,病症(包括疾病)的进展、改善或缓解,维持状态和缓解(无论是部分还是全部)。当疾病是癌症时,以下临床终点是治疗的非限制性实例:减少肿瘤负荷、减缓肿瘤生长、更长的总生存期、更长的肿瘤进展时间、肿瘤的抑制转移或减少转移。在一方面,治疗不包括预防。

[0134] 如本文所用,关于细胞、组织或器官的术语“过表达”表达的是蛋白质的量大于在对照细胞、对照组织或器官中的量。过表达的蛋白质可以是宿主细胞的内源性蛋白质或宿主细胞的外源性蛋白质。

[0135] 如本文所用,术语“接头序列”涉及包含1至10个氨基酸、或8个氨基酸、或6个氨基酸、或5个氨基酸的任何氨基酸序列,该氨基酸序列可重复1至10次,或约8次,或约6次,或约5,或4次,或3次,或2次。例如,所述接头可包含多达15个由重复3次的五肽组成的氨基酸残基。接头序列的非限制性示例是本领域已知的,例如,GGGSGGGSGGGG(及其等效物);三肽EFM;或Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met,以及它们各自的等效物。在一方面,接头序列是(甘氨酸4丝氨酸)₃ 柔性多肽接头,该接头包含gly-gly-gly-gly-ser的三个拷贝及其等效物。

[0136] 如本文所用,术语“增强子”,如本文所用,表示不管其相对于要表达的核酸序列的位置和方向而增加、改进或改善核酸序列的转录的序列元件。增强子可以增强单个启动子或同时一个以上启动子的转录。只要保留或基本上保留了这种改善转录的功能(例如,野生型活性(即全长序列活性)的至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95%),野生型增强子序列的任何截短、突变或以其他方式修饰的变体也在上述定义内。

[0137] 如本文所用,术语“启动子”是指调节编码序列(如基因表达)的任何序列。例如,启动子可以是组成型的、诱导型的、抑制型的或组织特异性的。“启动子”是多核苷酸序列的控制转录的起始和速率区域的控制序列。它可能包含调节蛋白和分子可以结合(例如 RNA 聚合酶和其他转录因子)的遗传元件。

[0138] 如本文所用,术语“WPRE”或“土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件”是指与该名称相关的特定核苷酸片段和与本文所示的WPRE序列共享至少70%、或至少80%的氨基酸序列同一性、优选90%的序列同一性、更优选至少95%的序列同一性的具有类似生物学功能的任何其他分子。例如,WPRE是指与土拨鼠肝炎病毒基因组序列(GenBank Accession No. J04514)中存在的人类乙型肝炎病毒转录后调控元件(HBVPRE)相似的区域,该基因组的1093至1684位的592个核苷酸序列对应于转录后调控区(Donello, J.E. et al. (1998) Journal of Virology 72:5085-5092)。使用逆转录病毒载体的分析表明,插入目标基因3'-末端非翻译区的 WPRE 使产生的蛋白质量增加了5到8倍。也有报道称,引入WPRE会抑制mRNA降解(Zufferey, R. et al. (1999) Journal of Virology 73:2886-2892)。从广义上讲,通过稳定mRNA来提高氨基酸翻译效率的WPRE等元素也被认为是增强子。

[0139] 术语“接触”是指两个或多个之间的直接或间接结合或相互作用。直接相互作用的

特定示例是结合。间接相互作用的特定示例是实体作用于中间分子,中间分子又作用于第二个参照实体。如本文所用,接触包括在溶液中、固相中、体外、离体、细胞中和体内。体内接触可称为施用或给药。

[0140] 术语“引入”应用于产生修饰细胞(例如嵌合抗原受体细胞)的方法,是指将外源(即外源性或细胞外)剂引入宿主细胞从而产生包含外源剂的细胞的过程。引入核酸的方法包括但不限于本领域已知的转导、逆转录病毒基因转移、转染、电穿孔、转化、病毒感染和其他重组DNA技术。在一些实施方案中,转导是通过载体(例如,病毒载体)进行的。在一些实施方案中,转染是通过化学载体、DNA/脂质体复合物或胶束(例如,Lipofectamine (Invitrogen))来进行的。在一些实施方案中,病毒感染是通过用包含感兴趣的多核苷酸(例如,AAV)的病毒颗粒感染细胞来进行的。在一些实施方案中,引入进一步包括CRISPR介导的基因编辑或转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)介导的基因编辑。引入非核酸外源剂(例如,可溶性因子、细胞因子、蛋白质、肽、酶、生长因子、信号分子、小分子抑制剂)的方法包括但不限于在外源剂存在的环境下培养细胞,将细胞与药剂接触,将细胞与包含药剂和赋形剂的组合物接触,以及将细胞与包含药剂的囊泡或病毒颗粒接触。

[0141] 术语“培养”是指在有利于细胞扩增和增殖的条件下在培养基中培养细胞。术语“培养介质”或“培养基”是本领域公认的,通常是指用于培养活细胞的任何物质或制剂。用于细胞培养时的术语“培养基”,包括细胞周围环境的成分。培养基可以是固体、液体、气体或相和材料的混合物。培养基包括液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。培养基还包括凝胶状培养基,例如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性的气态培养基包括在培养皿或其他固体或半固体支持物上生长的细胞所暴露的气相。术语“培养基”还指旨在用于细胞培养的材料,即使它尚未与细胞接触。换句话说,为培养准备的富含营养的液体是培养基。类似地,与水或其他液体混合而变得适合细胞培养的粉末混合物可称为“粉末培养基”。“限定培养基”是指由化学限定的(通常是纯化的)成分制成的培养基。“限定培养基”不包含表征不佳的生物提取物,例如酵母提取物和牛肉汤。“富培养基”包括旨在支持特定物种的大多数或所有可行形式的生长的培养基。富培养基通常包括复杂的生物提取物。“适合高密度培养物生长的培养基”是当其他条件(例如温度和氧转移速率)允许细胞培养物生长时允许细胞培养物达到3或更高的OD600的任何培养基。术语“基础培养基”是指促进多种微生物生长的培养基,不需要任何特殊的营养补充剂。大多数基础培养基通常包含四种基本化学基团:氨基酸、碳水化合物、无机盐和维生素。基础培养基通常用作更复杂培养基的基础,向其中添加补充剂,例如血清、缓冲液、生长因子、脂质等。在一方面,生长培养基可以是具有必要的生长因子以支持本发明公开的细胞的生长和扩增同时保持它们的自我更新能力的复杂培养基。基础培养基的示例包括但不限于 Eagles 基础培养基、最低必需培养基(Minimum Essential Medium)、Dulbecco改良Eagle培养基、培养基199、营养混合物(Nutrient Mixtures)Ham's F-10和 Ham's F-12、McCoy's 5A、Dulbecco's MEM/FI 2、RPMI 1640和Iscove改良Dulbecco培养基(IMDM)。

[0142] 如本文所用,“细胞群”意指在表型和/或基因型上相同(克隆)或不同的多于一个细胞的集合。

[0143] 如本文所用,“基本上同质的”细胞群是具有至少70%、或者至少75%、或者至少80%、或者至少85%、或者至少90%、或者至少95%、或者至少98%相同的表型的细胞群,如通过预选

标记、表型或基因组性状测量的。一方面,该细胞群是克隆细胞群。

[0144] 如本文所用,“异质的”细胞群是如通过预选标记、表型或基因组特征测量的,具有高达69%、或者高达60%、或者高达50%、或者高达40%、或者高达30%、或者高达 20%、或者高达 10%、或者高达 5%、或者高达 4%、或者高达 3%、或者高达 2%、或者高达 61%、或者高达 0.5% 的相同表型的细胞群。

[0145] “冷冻保护剂”是本领域已知的并且包括但不限于例如蔗糖、海藻糖和甘油。通常使用在生物系统中表现为低毒性的冷冻保护剂。

[0146] 缩写列表

CAR:嵌合抗原受体

HLA:组织相容性淋巴细胞抗原

Ip:腹膜内

IRES:内部核糖体进入位点

MFI:平均荧光强度

MOI:感染复数

PBMC:外周血单个核细胞

PBS:磷酸盐缓冲盐水

scFv:单链可变片段

WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件。

[0147] 用于执行本发明的模式

CAR T细胞是基因工程化的自体T细胞,其中单链抗体片段(scFv)或配体连接到能够促进T细胞活化的T细胞信号结构域(Maher, J. (2012) *ISRN Oncol.* 2012:278093; Curran, K.J. et al. (2012) *J. Gene Med.* 14:405-415;Fedorov, V.D. et al. (2014) *Cancer J.* 20:160-165;Barrett, D.M. et al. (2014) *Annu. Rev. Med.* 65:333-347)。CAR将具有溶细胞活性的单克隆抗体的 HLA 非依赖性靶向特异性与活化 T 细胞的归巢特性相结合。这些特性能够识别降低的 HLA 表达或下调抗原加工途径的靶细胞,这是肿瘤逃避宿主免疫反应的两种常用方法(Jakobsen, M.K. et al. (1995) *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 17:222-228;Lou, Y. et al. (2008) *Clin. Cancer Res.* 14:1494-1501;Singh, R. et al. (2007) *Cancer Res.* 67:1887-1892)。CAR 修饰的T细胞在临床前和临床环境中作为治疗包括癌症在内的各种疾病的新疗法显示出巨大的前景。

[0148] 本发明公开提供了对Lym1和Lym2具有特异性的抗体以及与其用途和生产相关的方法和组合物。此外,本发明公开提供作为嵌合抗原受体(CAR)的细胞,其包含对 Lym1、Lym2或CD19特异的抗原结合结构域,在某些方面是本发明公开的抗体的抗原结合结构域,以及涉及到其使用和生产的方法和组合物。

[0149] 与这些原理和发现一致,本发明公开提供以下实施方案。

[0150] 抗体及其片段

抗体的一般结构是本领域已知的,这里将仅简要概括。免疫球蛋白单体包含通过二硫键连接的两条重链和两条轻链。每条重链都与通过二硫键直接结合的轻链之一配对。每条重链都包含恒定区(根据抗体的同种型而不同)和可变区。可变区包含三个高变区(或

互补决定区),它们被命名为CDRH1、CDRH2和CDRH3并且它们被支持在框架区内。每条轻链包含恒定区和可变区,其中可变区包含类似于重链可变区的方式的由框架区支持的三个高变区(指定为CDRL1、CDRL2和CDRL3)。

[0151] 每对重链和轻链的高变区相互协作以提供能够结合靶抗原的抗原结合位点。一对重链和轻链的结合特异性由重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列定义。因此,一旦确定了一组产生特定的结合特异性的CDR序列(即重链和轻链的CDR1、CDR2 和 CDR3的序列),原则上可以将这组CDR序列插入到与任何抗体恒定区连接的任何其他抗体框架区内的适当的位置,以提供具有相同抗原结合特异性的不同抗体。

[0152] 在一个实施方案中,本发明公开提供了一种分离的抗体,其包含以下序列,或基本上由以下序列组成,或由以下序列组成:重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,其中抗体与Lym1或Lym2的表位结合。

[0153] 与这些原理和发现一致,本发明公开提供以下实施方案。一种抗体,包括以下序列,或基本上由以下序列组成,或由以下序列组成:重链(HC)免疫球蛋白可变域序列,其包含SEQ ID NO:2或6中任一项的氨基酸序列或其各自的等效物;和/或轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,其包含SEQ ID NO:4或8中任一项的氨基酸序列或其各自的等效物。在一方面,重链(HC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2,或基本上由其组成,或由其组成,并且轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:4,或基本上由其组成,或由其组成,或其各自的等效物。在另一方面,重链(HC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2,或基本上由其组成,或由其组成,并且轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:8,或基本上由其组成,或由其组成,或其各自的等效物。在另一方面,重链(HC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6,或基本上由其组成,或由其组成,并且轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO:8,或基本上由其组成,或由其组成,或其各自的等效物。本文还提供具有突变的某些氨基酸的抗体,其序列在本文中公开。

[0154] 在特定的实施例中,所述抗体包含以下序列,或基本上由以下序列组成,或由以下序列组成:重链(HC)免疫球蛋白可变域序列,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成;和/或轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0155] 在一方面,本发明公开的抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。抗体的恒定区也可以变化。例如,可以提供具有任何同种型的Fc区的抗体:IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)或IgM。恒定区序列的非限制性实例包括:SEQ ID NO:19-27或其各自的等效物。在一个实施方案中,本公开的抗体的恒定区是IgG1恒定区或Igκ恒定区。在一些实施方案中,本技术的免疫球蛋白相关组合物包含与SEQ ID NO:19-27至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99% 或100%相似的重链恒定区。

[0156] 等效物包含与多肽具有至少80%的氨基酸同一性的多肽或由在高度严格的条件下与编码所述多肽的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的多肽,或基本上由其组成,或由其组成。

[0157] 本文还提供了与本文公开的任何抗体竞争结合的抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体或人源化抗体。在某些方面,本发明公开的抗体是多克隆的,即具有不同氨基酸序列的多种类型抗体的混合物。在一方面,本发明公开的抗体具有至少 10^{-6} M的结合亲和力。在某些方面,抗体以至少约 10^{-7} M,或者至少约 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M的亲和力结合。

[0158] 在一些实施方案中,重链可变区的CDRH1序列包含本文公开的任何一个HC序列的CDRH1区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2或1个氨基酸。

[0159] 在一些实施方案中,重链可变区的CDRH2序列包含本发明公开的任何一种HC序列的CDRH2区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2个或1个氨基酸。

[0160] 在一些实施方案中,重链可变区的CDRH3序列包含本文公开的任何一种HC序列的CDRH3区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2个或1个氨基酸。

[0161] 在一些实施方案中,轻链可变区的CDRL1序列包含本文公开的任何一个LC序列的CDRL1区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2个或1个氨基酸。

[0162] 在一些实施方案中,轻链可变区的CDRL2序列包含本文公开的任一LC序列的CDRL2区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2个或1个氨基酸。

[0163] 在一些实施方案中,轻链可变区的CDRL3序列包含本文公开的任一LC序列的CDRL3区的氨基酸序列或其等效物,或基本上由其组成,或由其组成,随后是额外的羧基末端的50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4个、或3个、或2个或1个氨基酸。

[0164] 在本技术的另一方面,该抗体包括一个或多个以下特征:

(a) 轻链免疫球蛋白可变域序列包含一个或多个与任何公开的轻链序列的轻链可变结构域的CDR具有至少 85% 同一性的 CDR,或基本上由其组成,或由其组成;

(b) 重链免疫球蛋白可变域序列包含一个或多个与任何公开的重链序列的重链可变结构域的CDR具有至少 85% 同一性的 CDR,或基本上由其组成,或由其组成;

(c) 轻链免疫球蛋白可变域序列与任何公开的轻链序列的轻链可变域具有至少 85%同一性;

(d) HC免疫球蛋白可变域序列与任何公开的轻链序列的重链可变域具有至少 85%同一性;和

(e) 抗体结合与任何公开序列结合的表位重叠的表位。在CDR突变的一方面,等价

抗原结合域必须保留从亲本或野生型版本改变的氨基酸。

[0165] 在其他方面,本文提供的抗体的CDR中的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸取代。在相同氨基酸家族内的取代的意义上,取代可以是“保守的”。天然存在的氨基酸可分为以下四个家族,这些家族内将发生保守取代:

- 1) 具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸、精氨酸、组氨酸;
- 2) 具有酸性侧链的氨基酸:天冬氨酸、谷氨酸;
- 3) 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸:天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸;
- 4) 具有非极性侧链的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、半胱氨酸。

[0166] 在另一方面,一个或多个氨基酸残基被添加到抗体的一个或多个CDR中或从其中删除。这种添加或缺失发生在CDR的N或C末端或CDR内的某个位置。

[0167] 通过添加、缺失或取代氨基酸来改变抗体的CDR的氨基酸序列,可以获得各种效果,例如增加对靶抗原的结合亲和力。在CDR突变的一方面,等效抗原结合域必须保留从亲本或野生型版本改变的氨基酸。

[0168] 应当理解,包含这些不同的CDR序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成的本发明公开的抗体仍然以与所公开的抗体相似的特异性和敏感性特征结合Lym1或Lym2。这可以通过结合实验来测定。

[0169] 在本文提供的抗体的一些方面中,HC和LC可变域序列是相同多肽链的组分。在本文提供的抗体的一些方面中,HC和LC可变域序列是不同多肽链的组分。

[0170] 在一些方面,抗体包含与本文公开的那些中的任一个具有至少80%同一性的重链恒定区,或基本上由其组成,或由其组成。

[0171] 在一些方面,抗体包含与本文公开的那些中的任一个具有至少80%同一性的轻链恒定区,或基本上由其组成,或由其组成。

[0172] 在一个特定方面,本发明公开的抗体可进一步包含可检测标记物或纯化标记物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0173] 本文进一步提供了所公开的抗体的抗原结合片段。在本文提供的抗体的一些方面中,所述抗体片段选自Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFv和Fv。

[0174] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体包含结构修饰以促进快速结合和细胞的摄取和/或缓慢释放。在一些方面,抗体在抗体的CH₂恒定重链区中含有缺失以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在某些方面,F(ab)'₂片段用于促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。

[0175] 抗体、其片段和等效物可以与载体(例如药学上可接受的载体)或其他试剂组合以提供用于使用和/或储存的制剂。

[0176] 制备抗体的方法

本文提供了一种生产本发明公开的抗体的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:培养上述分离的细胞,其中分离的细胞任选地是哺乳动物细胞。

[0177] 抗体、它们的制造和用途是众所周知的,并且公开于例如Harlow, E. and Lane,

D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999中。可以使用本领域已知的标准方法产生抗体。抗体的实例包括(但不限于)抗体的单克隆、单链和功能片段。产生这种抗体的方法是本领域已知的;参见例如, Collarini et al. (2009) *J. Immunol.* 183(10):6338-6345, Carter, P. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-4289和 Baldi L. et al. (2005) *Biotechnol. Prog.* 21:148-153。

[0178] 抗体可以在一系列宿主中产生,例如山羊、兔、大鼠、小鼠、人等。在一方面,通过以下方法来制备抗体:在宿主细胞中表达如本文所述的编码CDR(例如重链和轻链)的多核苷酸,培养细胞并表达,然后纯化由多核苷酸表达的抗体。所述多核苷酸可以插入到载体中并且可以进一步包含调控序列,例如为表达系统所选的启动子和增强子,其可操作地连接至编码抗DCKL1抗体的CDR的多核苷酸。

[0179] 抗体可以通过注射具有免疫原性特性的靶抗原或其片段或寡肽来制备。根据宿主物种,可以添加和使用各种佐剂来增加免疫反应。此类佐剂包括但不限于弗氏(Freund's)、矿物凝胶(例如氢氧化铝)和表面活性物质(例如溶血卵磷脂)、普朗尼克多元醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔戚血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)和二硝基酚(dinitrophenol)。在人类使用的佐剂中,BCG(*Bacille Calmette-Guerin*)和 *Corynebacterium parvum* 特别有用。本发明还公开提供了分离的多肽和佐剂。

[0180] 在某些方面,本发明公开的抗体是多克隆的,即具有不同氨基酸序列的多种类型抗体的混合物。在一方面,多克隆抗体包括具有不同CDR的多种类型抗体的混合物。因此,培养出了产生不同抗体的细胞混合物,并且可以使用从所得培养物中纯化的抗体(参见 W02004/061104)。

[0181] 单克隆抗体生产:单克隆抗体可以使用任何技术来制备,该技术通过培养的连续细胞系提供抗体分子的生产。此类技术包括但不限于杂交瘤技术(参见例如 Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975));三瘤体(trioma)技术;人B细胞杂交瘤技术(参见例如, Kozbor, et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983))和EBV杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(参见例如 Cole, et al., Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。人单克隆抗体可以在本技术的实践中使用并且可以通过使用人杂交瘤产生(参见例如Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983))或通过用EB病毒(Epstein Barr Virus)体外转化人B细胞(参见例如 Cole, et al., Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。例如,可以分离编码抗体区域的核酸群体。利用源自编码抗体保守区的序列的引物的PCR被用于从群体中扩增编码抗体部分的序列,然后从扩增的序列中重建编码抗体或其片段(例如可变域)的DNA。这种扩增的序列也可以与编码其他蛋白质(例如,噬菌体外壳或细菌细胞表面蛋白)的DNA融合,用于在噬菌体或细菌上表达和展示融合多肽。然后可以表达扩增的序列并进一步基于例如表达的抗体或其片段对存在于Lym1或Lym2多肽上的抗原或表位的亲和力进行选择或分离。

[0182] 或者,可以通过以下方法来制备表达单克隆抗体的杂交瘤:对对象进行免疫,例如使用分离的多肽,其包含本文公开的任何抗体或其片段的氨基酸序列,或基本上由其组成,或由其组成,然后使用常规方法从所述对象的脾脏中分离杂交瘤。参见例如Milstein et al., (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981))。使用标准方法筛选杂

交瘤将产生具有不同特异性(即针对不同表位)和亲和力的单克隆抗体。具有所需特性(例如,Lym1 或 Lym2 结合)的选定单克隆抗体可以(i)用作由杂交瘤的表达,(ii)与分子例如聚乙二醇(PEG)结合以改变其特性,或(iii)可以以各种方式分离、测序和操作编码单克隆抗体的cDNA。在一方面,单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包括从转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,其基因组包含与永生化细胞融合的人类重链转基因和轻链转基因,或基本上由其组成,或由其组成。杂交瘤技术包括那些本领域已知的并教导在Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988);Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981)中。

[0183] 噬菌体展示技术:如上所述,本发明公开的抗体可以通过应用重组DNA和噬菌体展示技术产生。例如,可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来制备抗体。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。通过直接选择抗原,通常是结合或捕获到固体表面或珠子上的抗原,从库或组合抗体文库(例如,人或鼠)中选择具有所需结合特性的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括具有Fab、Fv或二硫键稳定的Fv抗体结构域的fd和M13的抗体与噬菌体基因III或基因VIII蛋白重组融合。此外,方法可以适用于构建 Fab 表达文库(参见例如, Huse, et al., *Science* 246: 1275-1281, 1989)以允许快速有效地鉴定对 Lym1 具有所需特异性的单克隆Fab片段或Lym2多肽,例如,多肽或其衍生物、片段、类似物或同源物。可用于制备本发明公开的分离的人源化抗体的噬菌体展示方法的其他实例包括在Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988);Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070 (1990);Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995);Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995);Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994);Persic et al., *Gene* 187: 9-18 (1997);Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994);PCT/GB91/01134;WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;WO 96/06213;WO 92/01047 (Medical Research Council et al.);WO 97/08320 (Morphosys);WO 92/01047 (CAT/MRC);WO 91/17271 (Affymax);及美国专利号 5698426、5223409、5403484、5580717、5427908、5750753、5821047、5571698、5427908、5516637、5780225、5,658,727和5733743中公开的方法。

[0184] 通过二硫键连接多肽的可用于在噬菌体颗粒表面展示多肽的方法已在Lohning(美国专利号6753136)中描述。如以上参考文献所述,在噬菌体选择后,可以分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人抗体或任何其他所需的抗原结合片段,并在任何理想的宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中表达。例如,也可以使用本领域已知的重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术方法,例如在WO 92/22324;Mullinax et al., *BioTechniques* 12: 864-869 (1992);Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1995)和 Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988)中公开的方法。

[0185] 通常,可以针对合适的抗原选择克隆到展示载体中的杂交抗体或杂交抗体片段,以鉴定保持良好结合活性的变体,因为抗体或抗体片段将存在于噬菌体或噬菌粒颗粒的表面上。参见例如Barbas III et al., *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)。然而,其他载体形式也可用于该过程,例如将抗体片段文库克隆到裂解噬菌体载体(修饰的T7或Lambda Zap系统)中以进行选择性和/或筛选。

[0186] 抗体产生的替代方法:抗体也可以通过在体内淋巴细胞群体中产生或通过筛选重组免疫球蛋白文库或高特异性结合试剂组产生(Orlandi et al., PNAS 86: 3833-3837 (1989); Winter, G. et al., Nature, 349: 293-299 (1991))。

[0187] 或者,可以使用生产单链抗体的技术。单链抗体(scF_v)包含通过接头肽(通常长度约为 5 到 25 个氨基酸)相连的重链可变区和轻链可变区。此类技术的非限制性示例展示在Carter, P. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289和Baldi L. et al. (2005) Biotechnol. Prog. 21:148-153中。在scF_v中,重链和轻链的可变区可以来自相同的抗体或不同的抗体。可以使用重组技术合成scF_v,例如通过在宿主生物(例如大肠杆菌)中表达编码scF_v的载体。可以通过以下方法来获得编码scF_v的DNA:使用局部DNA作为模板,所述局部DNA编码选自编码上述抗体的重链或重链可变区的DNA和编码其轻链或其轻链可变区的DNA的全部或所需的DNA氨基酸序列,通过PCR使用限定其两端的引物对,进行扩增,并进一步将编码多肽接头部分的DNA和限定其两端的引物对组合进行扩增,以便将接头的两端分别连接到重链和轻链上。包含编码scF_v的DNA的表达载体和由该表达载体转化的宿主可以根据本领域已知的常规方法获得。

[0188] 还可以产生抗原结合片段,例如,可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的F(ab')₂片段和可以通过还原F(ab')₂片段的二硫键产生的Fab片段。或者,可以构建Fab表达文库以允许快速且容易地鉴定具有所需特异性的单克隆Fab片段(Huse et al., Science, 256: 1275-1281 (1989))。

[0189] 抗体修饰。本发明公开的抗体可以被多聚化以增加对抗原的亲合力。待多聚化的抗体可以是识别相同抗原的多个表位的一种抗体或多种抗体。作为抗体的多聚化方法,可以例如IgG CH3结构域与2个scF_v分子的结合、链霉亲和素的结合、螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)基序的导入等。

[0190] 本文公开的抗体组合物可以是这些抗体中的任一个与另一种试剂(免疫偶联物)之间形成的偶联物的形式。在一方面,本文公开的抗体与放射性物质缀合。在另一方面,本文公开的抗体可以结合各种类型的分子,例如聚乙二醇(PEG)。

[0191] 抗体筛选。各种免疫测定可用于筛选以鉴定具有所需特异性的抗体。使用具有确定的特异性的多克隆或单克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射测定的许多方案是本领域公知的。此类免疫测定通常涉及测量 Lym1 或 Lym2 或其任何片段或寡肽与其特异性抗体之间的复合物形成。可以使用利用对两个非干扰性 Lym1 或 Lym2 表位特异的单克隆抗体的双位点、基于单克隆的免疫测定,但也可以使用竞争性结合测定(Maddox et al., J. Exp. Med., 158: 1211-1216 (1983))。

[0192] 可以使用 Ventana Medical Systems, Inc (VMSI) Discovery XT 和福尔马林固定、石蜡包埋在载玻片上的人体组织,进行潜在抗体的自动免疫组织化学(IHC)筛选。组织样本首先进行脱蜡、抗原修复,然后添加潜在抗体和检测抗体。检测抗体使用来自VMSI的色原检测试剂进行可视化。染色的载玻片在显微镜下手动筛选。选择具有正确一抗染色模式的样品作为潜在候选物。

[0193] 抗体纯化。本文公开的抗体可以纯化至均质。抗体的分离纯化可以采用常规的蛋白质分离纯化方法进行。

[0194] 仅作为示例,可以通过适当地选择和组合色谱柱、过滤器、超滤、盐沉淀、透析、制备聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳等来分离和纯化抗体。蛋白质纯化和表征策略: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

[0195] 色谱的实例包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱和吸附色谱。在一方面,可以通过使用液相色谱(例如HPLC或FPLC)来进行色谱。

[0196] 在一方面,蛋白A柱或蛋白G柱可用于亲和层析。其他示例性柱包括蛋白A柱、Hyper D、POROS、Sephacrose F. F. (Pharmacia) 等。

[0197] 分离的多肽和多核苷酸

本发明公开提供了多肽,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10或12中的任一个的氨基酸序列或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。进一步提供了一种分离的多肽,其包含本文公开的抗体的氨基酸序列或其片段以及编码它们的分离的多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。

[0198] 还进一步提供了编码本文公开的抗体及其片段的分离的核酸。在一方面,分离的核酸序列包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9和11或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,多核苷酸序列与启动子和/或增强子元件可操作地连接。它们还可以与载体或合适的宿主细胞和/或合适的载体组合用于诊断或治疗用途。在一方面,核酸包含在宿主细胞中,用于多肽和蛋白质的重组生产。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。

[0199] 在一方面,分离的多肽或多核苷酸进一步包含标记或选择标记和/或连续多肽序列(例如,匙孔血蓝蛋白(KLH)载体蛋白)或与多肽或多核苷酸可操作地偶联的编码序列的多核苷酸(在多核苷酸的情况下),或基本上由其组成,或由其组成。多肽或多核苷酸可以与各种载体组合,例如磷酸盐缓冲盐水。进一步提供了宿主细胞,例如原核或真核细胞,例如细菌、酵母、哺乳动物(大鼠、猿猴、仓鼠或人),其包含分离的多肽或多核苷酸,或基本上由其组成,或由其组成。宿主细胞可以与载体组合。

[0200] 嵌合抗原受体

本文提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含以下序列、或基本上由以下阻力组成、或由以下序列组成:(a)本文公开的任何抗体的抗原结合结构域,(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和(d)细胞内信号传导结构域。在一方面,CAR进一步包含一个或多个共刺激信号传导区,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,本发明公开的CAR是第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR或第四代CAR。在一个特定方面,本发明公开的抗体可进一步包含可检测标记或纯化标记,或基本上由其组成,或由其组成。

[0201] 本发明公开提供了结合Lym1或Lym2的CAR,其包含包含细胞外、跨膜和细胞内结构域的细胞活化部分,或基本上由其组成,或由其组成。胞外域包含靶特异性结合元件,也称为抗原结合域。胞内结构域或胞质结构域包含至少一个共刺激信号传导区和 ζ 链部分。在一方面,本发明公开的CAR由氨基酸序列编码,所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:14、16或18或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,本发明公开的CAR包含多核

核苷酸序列SEQ ID NO:13、15或17或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0202] 间隔结构域:CAR可任选地进一步包含多达300个氨基酸、优选10至100个氨基酸、更优选25至50个氨基酸的间隔结构域,或基本上由其组成,或由其组成。例如,间隔子可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或50个氨基酸。间隔结构域可包含例如人Fc结构域的一部分、CH3结构域或任何免疫球蛋白的铰链区,例如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM或其变体。例如,一些实施方案可包含具有或不具有S228P、L235E和/或N297Q突变(根据Kabat编号)的IgG4铰链。额外的间隔区包括但不限于 CD4、CD8 和 CD28 铰链区。

[0203] 抗原结合结构域:在某些方面,本发明公开提供了一种CAR,包含对本文提供的任何抗体具有特异性的抗原结合结构域,或基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,抗原结合域包含靶特异性抗体(即抗-Lym1或抗-Lym2抗体)的片段,例如,scFv,或基本上由其组成,或由其组成。本发明公开的CAR可以进一步包含源自抗MUC-16的抗体或抗间皮素的抗体的抗原结合结构域,或基本上由其组成,或由其组成。

[0204] scFv区可包含与短接头肽连接的免疫球蛋白重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区。接头肽可以是1至50个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或50个氨基酸。在一些实施方案中,接头富含甘氨酸,但它也可含有丝氨酸或苏氨酸。

[0205] 跨膜结构域。跨膜结构域可以源自天然或合成来源。如果来源是天然的,则所述结构域可以来自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本文公开中特别使用的跨膜区可以源自CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD6、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD154、TCR。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下它将主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,长度优选在2至10个氨基酸之间的短寡或多肽接头可以形成跨膜结构域和CAR的细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。

[0206] 细胞质结构域。所述CAR的细胞质结构域或细胞内信号结构域负责激活已放置CAR的免疫细胞的至少一种传统效应器功能。细胞内信号结构域是指转导效应功能信号并指导免疫细胞执行其特定功能的蛋白质的一部分。可以使用整个信号域或其截短的部分,只要截短的部分足以转导效应器功能信号。T细胞受体(TCR)和共受体的细胞质序列,以及其衍生物或变体,可以作为用于CAR的细胞内信号结构域。在本发明公开中特别使用的细胞内信号结构域可以源自FcR、TCR、CD3、CD6、CD22、CD79a、CD79b、CD66d。在一些实施方案中,CAR的信号域包含CD3 ζ 信号传导结构域,或基本上由其组成,或由其组成。

[0207] 由于通过TCR产生的信号单独不足以完全激活T细胞,可能还需要二次或共刺激信号。因此,至少一种共刺激信号分子的胞内区域,包括但不限于CD27、CD28、4-1BB(CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体,也可以包括在CAR的细胞质结构域中。本发明公开的CAR可以包含一个或多个共刺激结构域,或基本上由其组成,或由其组成。例如,除了信号域(例

如,CD3 ζ 信号域)之外,CAR可以包含一个、两个或更多个共刺激域,或基本上由其组成,或由其组成。

[0208] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体的细胞活化部分是T细胞信号结构域,其包含一种或多种蛋白质或其片段,或基本上由其组成,或由其组成,所述蛋白质或其片段选自:CD8蛋白、CD28蛋白、4-1BB蛋白、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD27、LIGHT、NKG2C、B7-H3和CD3- ζ 蛋白。

[0209] 在具体实施方案中,CAR包含本发明公开的任何抗体的抗原结合域或其片段(例如,scFv)、CD8 α 或IgG1铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、至少一个共刺激信号区和CD3 ζ 信号域,或基本上由其组成,或由其组成。在进一步的实施方案中,共刺激信号区包括CD28共刺激信号区和4-1BB共刺激信号区之一或两者,或基本上由其组成,或由其组成。

[0210] 在一个特定的实施方案中,CAR进一步包含位于HC可变区和LC可变区之间的接头多肽,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,CAR的接头多肽包含序列(GGGGS) n 的多肽,其中 n 是1至6的整数,或基本上由其组成,或由其组成。

[0211] 在一些实施方案中,CAR可进一步包含可检测标记或纯化标记,或基本上由其组成,或由其组成。

[0212] 开关机制。在一些实施方案中,CAR还可以包含用于控制CAR的表达和/或活化的开关机制,或基本上由其组成,或由其组成。例如,CAR可以包含细胞外、跨膜和细胞内结构域,或基本上由其组成,或由其组成,其中细胞外结构域包含靶特异性结合元件,其包含对在靶细胞上表达或由靶细胞表达的靶抗原以外的分子具有特异性的标记、结合域或标签。在此类实施方案中,CAR的特异性由第二构建体提供,所述第二构建体包含目标抗原结合结构域和被CAR上的标记、结合结构域或标签识别或结合的结构域,或基本上由其组成,或由其组成。参见例如,WO 2013/044225、WO 2016/000304、WO 2015/057834、WO 2015/057852、WO 2016/070061、US 9233125/US 1099。以此方式,可将表达CAR的T细胞施用于对象,但在施用包含特异性结合域的第二组合物之前,其不能结合靶抗原。

[0213] 本发明公开的CAR可能同样需要多聚化以激活它们的信号功能(参见例如,US 2015/0368342、US 2016/0175359、US 2015/0368360)和/或外源信号(例如小分子药物)(US 2016/0166613, Yung et al., Science, 2015)以引发T细胞反应。

[0214] 此外,所公开的CAR可以包含“自杀开关”,或基本上由其组成,或由其组成,以在治疗后诱导CAR T细胞的细胞死亡(Buddee et al., PLoS One, 2013)或在与靶抗原结合后下调CAR的表达(WO 2016/011210)。

[0215] DAP CAR细胞

在一方面,本文提供了新型嵌合抗原受体(CAR),其以表位特异性DAP10和/或DAP12依赖性方式重定向效应细胞的功能。在携带Lym-1阳性伯基特(Burkitt's)淋巴瘤异种移植物的鼠中,使用huLym-1-B(一种人源化Lym-1抗体)的识别域对新型CAR进行了评估。发现这种名为huLym-1-B-DAP CAR的新构建体在转导原代人T细胞后,与第二代Lym-1-41BB3zCAR T细胞相比,体外细胞增殖增加,体内毒性显著降低,肿瘤控制更佳。因此,本发明公开的CAR旨在通过减少治疗的有害副作用和提高抗肿瘤细胞毒性来改进人类CAR T细胞在治疗多种人类癌症和相关疾病中的临床应用。虽然抗Lym CAR是示例性的,但其他抗原结合结构域可以替代Lym抗原结合结构域,例如抗CD19。其他抗原结合结构域包括例

如,抗 CD-20、抗 HER、抗 EGFR、抗IL13、抗间皮素、抗CD123、抗BCMA、抗MUC1、抗CD38、抗CD138、抗CD70、抗EpCAM、抗CD133、抗CEA、抗CD5抗GD2、抗-PSMA、抗黄体生成素受体(LHR)、抗-B7-H4、抗-HLA、抗-HLA-G,以及PCT/US2016/0243573;PCT/US2016/0243613和 PCT/US2016/0243543中描述的那些。

[0216] 为了证明DAP CAR T细胞构建体的临床效用,使用鼠Lym-1抗体的单链结合位点制备了huLym-1 DAP CAR T细胞构建体,该位点先前显示可靶向人类B细胞恶性肿瘤,如伯基特(Burkitt's)淋巴瘤、弥漫性和滤泡性淋巴瘤以及 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的子集。(Rose LM et al., 1996, *Cancer Immunol Immunother* 43(1): 26-30)表明鼠Lym-1与HLA-Dr分子轻链上的不连续表位结合,该表位在多种人类B细胞肿瘤中表达。它被认为是CAR T 细胞治疗的良好靶点,因为只有正常 B 细胞表达这种抗原,但与其他B细胞靶点如CD19、CD20和CD22不同,它们表达的结合位点数量约为B 细胞恶性肿瘤的 $\frac{1}{4}$ (Epstein AL et al., 1987, *Cancer Res.* 47:830-840)。此外,Lym-1识别的HLA-Dr人类抗原不会脱落或内化,从而能够与人类淋巴瘤细胞表面良好且稳定地结合。它还作为I-131放射性标记抗体在人体中进行了广泛的研究,用于 Lym-1阳性肿瘤的成像和治疗,并且展示出了即使在I-131的治疗剂量下也是安全的(DeNardo SJ et al., 1988, *Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals* 1:17-33;DeNardo, S.J. et al., 1988, *Int. J. Cancer* 3:96-101)。最后,Hu等人进行的临床研究(Hu E et al., 1989, *Hematologic Oncology* 7:155-166)使用裸Lym-1没有显示出明显的毒性,例如目前接受抗CD20(Rituxan)治疗的患者中出现的低丙种球蛋白血症。

[0217] 正如June等人最近综述的那样(June CH et al., 2018, *Science* 359:1361-1365),根据申请人对T细胞受体信号传导机制的早期理解而设计的CAR T细胞在治疗人类造血系统恶性肿瘤方面取得了显著的成功。尽管早期取得了包括FDA批准了Yescarta和Kymiriah等抗CD19 CAR T细胞产品的成功,但正在深入研究这些试剂的基本结构和靶向的改进。与CAR T细胞疗法相关的主要毒性在一定程度上限制了它们的使用并且需要仔细的患者管理。最常见的毒性,即细胞因子释放综合征(CRS),是由注入的CAR T细胞释放的细胞因子引起的全身炎症反应引起的。CRS可导致广泛的可逆器官功能障碍,需要早期干预低血压和治疗并发感染。此外,用托珠单抗阻断IL-6受体仍然是CRS的主要药物治疗法。此外,CAR T细胞疗法可导致全身性脑病以及局部缺陷,例如失语、震颤、共济失调、偏瘫和神经麻痹(Brudno JN and Kochenderfer JN (2016) *Blood* 127:3321-3330)。治疗选择包括使用皮质类固醇,特别是对于那些对托珠单抗无反应的患者。

[0218] 综述自Srivastava和Riddell(Srivastava S and Riddell SR (2015) *Trends in Immunology* 36 (8):494-502),许多研究人员已经解决了疗效和毒性问题。具体而言,研究人员已经调查了(A)使用CAR T细胞上的两个识别位点的分裂触发机制,一个连接到CD3 ϵ ,另一个连接到41BB基序,以提高特异性和安全性;(B)改变scFv的构型以优化细胞毒性 T 细胞和肿瘤靶细胞之间的特殊限制;(C)条件性表达的CAR T细胞的产生;(D)使用不同的细胞类型来生产 CAR T 细胞,例如记忆T细胞和NK细胞等;(E)使用T细胞抗原偶联剂(TAC)模拟 TCR-CD3:共受体复合物(Helsen CW et al. (2018) *Nature Communications* 9(1):3049);和(F)其他用于信号传导的共刺激基序,例如ICOS(Guedan S. et al., (2018) *JCI insight* 3(1))。虽然TAC方法很有前途,但它需要使用DaRPin序列连接到

CD3,使其分子生物学复杂化。尽管如此,这些研究以及以下首次显示的研究表明,CRC和CAR T细胞疗法的其他毒性对于体内CAR T细胞的最佳疗效不是必需的。总而言之,解耦CRC和当今在CAR T细胞疗法期间看到的其他常见毒性的方法可能是有可能的,并且可以改变申请人对这些没有危及生命的毒性的疗法的看法。对于CAR T细胞的未来工作,提高嵌合受体T细胞疗法的安全性和有效性的方法和途径由Li 和Zhao进行了综述(Li H et al., (2017) Protein & Cell 8(8):573-589)。对于实体瘤治疗,其他问题也开始如 D'Aloia等人所述的发挥作用(D'Aloia MM et al., (2018) Cell Death and Disease 9:282-293),其中需要在治疗骨髓和循环白血病和淋巴瘤所需的参数之上实现成功的额外参数。具体而言,需要解决向肿瘤脉管系统迁移和穿透、增殖持续到遇到抗原以及对抑制性肿瘤微环境的抵抗问题,以便静脉注射的CAR T细胞在最终进入肿瘤后有效工作。

[0219] 本文公开的DAP构建的CAR T细胞即使对于对标准刺激方法和细胞生长没有反应的CAR T细胞也能增殖,并且比使用相同结合表位的第二代构建体显示为更有效的产品(需要少10倍的细胞),并且显示出更低的毒性(最小的重量损失)。由于这些特性,DAP CAR T细胞可能是为人类造血系统恶性肿瘤和可能的实体瘤产生成功和安全的细胞疗法的重要一步。

[0220] 嵌合抗原受体

本文提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列以下组成:(a)抗原结合结构域(例如抗Lym抗体(例如人源化抗Lym抗体)或抗CD19抗体),(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和(d)DAP 10 和/或 DAP 12 细胞内信号传导结构域。抗-Lym人源化抗-Lym抗体可以是抗-Lym1或抗-Lym 2抗体,例如人抗-Lym1或人抗-Lym2抗体。在另一方面,抗体是抗CD19抗体或其抗原结合片段。在另一方面,铰链结构域包含CD8 α 铰链结构域或IgG铰链结构域。跨膜结构域可以源自天然或合成来源。如果来源是天然的,则结构域可以来自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本文公开中特别使用的跨膜区可以源自CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCR。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,长度优选在2至10个氨基酸之间的短寡或多肽接头可以形成跨膜结构域和CAR的细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。在一个具体实施方案中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域。元件可以是任何物种的,例如人或鼠。在一个特定方面,本发明公开的CAR可以进一步包含可检测标记物或纯化标记物,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,它们的CAR还包含信号肽。

[0221] 在一个方面,本发明公开的CAR包含氨基酸序列,该氨基酸序列包含以下所示的CAR氨基酸序列或其各自的等效物,或基本上由其组成,或由其组成。

[0222] CAR可任选地进一步包含最多300个氨基酸、优选10至100个氨基酸、更优选25至50个氨基酸的间隔区,或基本上由其组成,或由其组成。例如,该间隔可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或50个氨基酸。

[0223] 在某些方面,本发明公开提供了一种CAR,其包含抗CD19抗体或Lym-1或Lym-2抗体

的抗原结合结构域,或基本上由其组成,或由其组成。在一些实施方案中,抗原结合域包含靶特异性抗体(例如,抗-CD19、抗-Lym1或抗-Lym2抗体)的片段,例如scFv,或基本上由其组成,或由其组成。

[0224] 在一方面,抗原结合域是scFv区。scFv区可包含免疫球蛋白重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区,与短接头肽相连。接头肽可以是1至50个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或50个氨基酸。在一些实施方案中,接头富含甘氨酸,但它也可含有丝氨酸或苏氨酸。

[0225] 在具体的实施方案中,CAR包含本发明公开的任何抗体或其片段(例如,scFv)的抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域或IgG1铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域和DAP 10和/或DAP 12结构域,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,CAR包含DAP 10和/或DAP 12域。

[0226] 在一个具体的实施方案中,CAR进一步包含位于抗体的HC可变区和LC可变区之间的接头多肽,或基本上由其组成,或由其组成。在一方面,CAR的接头多肽包含序列(GGGGS) n 的多肽,其中 n 是1至6的整数,或基本上由其组成,或由其组成。

[0227] 在一些实施例中,CAR可进一步包含可检测标记或纯化标记,或基本上由其组成,或由其组成。

[0228] 开关机构。在一些实施方案中,CAR还可以包含用于控制CAR的表达和/或活化的开关机制,或基本上由其组成,或由其组成。例如,CAR可以包含细胞外、跨膜和细胞内结构域,或基本上由其组成,或由其组成,其中胞外域包含靶特异性结合元件,该元件包含对靶细胞上或由靶细胞表达的靶抗原以外的分子特异的标记、结合域或标签。在此类实施方案中,CAR的特异性由第二构建体提供,所述第二构建体包含目标抗原结合结构域和CAR上的标记、结合结构域或标签识别或结合的结构域,或基本上由其组成,或由其组成。参见例如,WO 2013/044225、WO 2016/000304、WO 2015/057834、WO 2015/057852、WO 2016/070061、US 9,233,125/US 1099。以此方式,可将表达CAR的T细胞施用于对象,但在施用包含特异性结合域的第二组合物之前,其不能结合它的靶抗原。

[0229] 本发明公开的CAR可能同样需要多聚化以激活它们的信号功能(参见,例如,US 2015/0368342、US 2016/0175359、US 2015/0368360)和/或外源信号(例如小分子药物)(US 2016/0166613, Yung et al., Science, 2015)以引发T细胞反应。

[0230] 此外,本发明所公开的CAR可以包含“自杀开关”,或基本上由其组成,或由其组成,以在治疗后诱导CAR T细胞的细胞死亡或在与靶抗原结合后下调CAR的表达(WO 2016/011210)。

[0231] 分离的细胞

本文还提供了一种产生抗Lym CAR表达细胞的方法,其包含以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:将编码本文公开的CAR的核酸序列引入免疫细胞群中;并选择已成功转导核酸序列的免疫细胞亚群,从而产生抗Lym CAR表达的细胞。

[0232] 本发明公开的方面涉及分离的细胞,其包含本发明公开的CAR,或基本上由其组成,或由其组成,以及产生此类细胞的方法。细胞是原核或真核细胞。在一方面,细胞是T细胞或NK细胞。真核细胞可以来自任何优选的物种,例如动物细胞、哺乳动物细胞例如人、猫科动物或犬科动物细胞。

[0233] 在本发明公开的一些方面,用如本文所述的编码CAR的核酸序列转导的分离的细胞群是NK前体细胞和/或T细胞前体细胞群。前体细胞的转导产生能够分化为 CAR T 细胞和/或 CAR NK 细胞的长寿细胞群。T 细胞前体包括但不限于HSC;长期 HSC;MPP; CLP; LMPP/ELP;DN1;DN2;DN3;DN4;DP。NK前体包括但不限于HSC、长期HSC、MPP、CMP、GMP、pro-NK、pre-NK和iNK细胞。在一个特定方面,分离的细胞群包括成熟的T细胞和T细胞前体,以提供短寿命效应CAR T细胞和长寿 CAR T 细胞前体两者用于移植到对象中。在另一方面,分离的细胞群包括成熟的NK细胞和NK前体两者,以提供短寿命效应CAR NK细胞和长寿CAR NK前体以移植入对象。

[0234] 在具体的实施方案中,分离的细胞包含外源性CAR,或基本上由其组成,或由其组成,所述外源性CAR包含本文提供的抗体的抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD28共刺激信号传导区和/或4-1BB共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导区,或基本上由其组成,或由其组成。

[0235] 在另一方面,CAR包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列以下组成:(a)抗原结合结构域(例如抗Lym抗体或抗CD19抗体的),(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和 (d)DAP 10和/或DAP 12细胞内信号域。抗-Lym抗体可以是抗-Lym1或抗-Lym 2抗体,例如人抗-Lym1或人抗-Lym2抗体。在另一方面,抗体是抗CD19抗体或其抗原结合片段。在另一方面,铰链域包含CD8 α 铰链域或IgG铰链域。跨膜结构域可以源自天然或合成来源。如果来源是天然的,则结构域可以来自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本发明公开中特别使用的跨膜区可以源自 CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCR。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,长度优选在2至10个氨基酸之间的短寡或多肽接头可以形成跨膜结构域和CAR的细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。在一个具体实施方案中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域。元件可以是任何物种的,例如人或鼠。在一个特定方面,本发明公开的CAR可以进一步包含可检测标记物或纯化标记物,或基本上由其组成,或由其组成。在另一方面,它们的CAR还包含信号肽。

[0236] 在某些实施方案中,分离的细胞是T细胞,例如动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞。在某些实施方案中,分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞。

[0237] 在一些实施方案中,可以进一步修饰本发明所公开的CAR的T细胞表达以减少或消除内源性TCR的表达。减少或消除内源性TCR可以减少脱靶效应并提高T细胞的有效性。可以使用多种方法生产稳定地缺乏功能性TCR表达的 T 细胞。T细胞将整个T细胞受体作为复合物内在化、分类和降解,静息T细胞的半衰期约为10小时,受刺激的T细胞的半衰期约为3小时(von Essen, M. et al. 2004. J. Immunol. 173:384-393)。TCR复合物的正常功能需要组成 TCR 复合物的蛋白质的适当化学计量比。TCR功能还需要两个具有 ITAM基序的功能性TCR ζ 蛋白。在与MHC肽配体结合后激活TCR需要在同一个T细胞上结合多个TCR,所有这些都必须正确发出信号。因此,如果TCR复合物与不能正确结合或不能以最佳方式发出信号的蛋白质不稳定,则T细胞将不会被充分激活以开始细胞反应。

[0238] 因此,在一些实施方案中,可以使用RNA干扰(例如shRNA、siRNA、miRNA等)、CRISPR或其他靶向编码原代T细胞中特定TCR(例如,TCR- α 和TCR- β)和/或CD3链的核酸的方法来消除TCR表达。通过阻断一种或多种这些蛋白质的表达,T细胞将不再产生一种或多种TCR复合物的关键成分,从而使TCR复合物不稳定并阻止功能性TCR的细胞表面表达。尽管使用RNA干扰时一些TCR复合物可以再循环到细胞表面,但所述RNA(例如shRNA、siRNA、miRNA等)将阻止TCR蛋白的新产生,导致整个TCR复合物的降解和去除,导致产生功能性TCR表达稳定缺陷的T细胞。

[0239] 使用任何常规表达系统(例如,慢病毒表达系统)都可以在原代T细胞中表达抑制性RNA(例如,shRNA、siRNA、miRNA等)。尽管慢病毒可用于靶向静止的原代T细胞,但并非所有T细胞都会表达shRNA。这些T细胞中的一些可能无法表达足够量的RNA,以使得TCR表达的足够抑制量来改变T细胞的功能活性。因此,在病毒转导后保留中度至高TCR表达的T细胞可以被移除,例如通过细胞分选或分离技术,以便剩余的T细胞缺乏细胞表面TCR或CD3,从而能够扩增缺乏功能性TCR或CD3表达的分离的T细胞群。

[0240] 在原代T细胞中的CRISPR表达可以使用常规CRISPR/Cas系统和对靶TCR具有特异性的指导RNA来实现。合适的表达系统例如本领域已知的慢病毒或腺病毒表达系统。与抑制剂RNA的递送类似,CRISPR系统可用于CAR细胞治疗中的特异性靶向静息原代T细胞或其他适合的免疫细胞。此外,在CRISPR编辑不成功的情况下,可以为了成功根据上文公开的方法选择细胞。例如,如上所述,在病毒转导后保留中度至高TCR表达的T细胞可以被移除,例如通过细胞分选或分离技术,以便剩余的T细胞缺乏细胞表面TCR或CD3,从而实现扩增缺乏功能性TCR或CD3表达的分离的T细胞群。进一步理解,CRISPR编辑构建体可用于敲除内源性TCR和敲入本文公开的CAR构建体。因此,可以理解,CRISPR系统可以被设计用于实现这些目的中的一个或两个。

[0241] 虽然描述了许多关于T细胞的上述技术,但应理解,本文和本公开通篇描述的生成和修饰的用途和方法不限于T细胞,而是可以扩展到任何相关细胞包括但不限于免疫细胞,例如B细胞、NK细胞和相关干细胞。

[0242] 分离的细胞的来源:在本文公开的细胞的扩增和遗传修饰之前,细胞可以从对象获得——例如,在涉及自体疗法的实施方案中——或市售培养物,可从例如,美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。

[0243] 细胞可以从多种对象来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、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。

[0244] 分离相关细胞的方法是本领域众所周知的并且可以容易地适用于本申请;示例性方法在以下示例中描述。与本发明公开相关使用的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads®系统;STEMcell Technologies EasySep™、RoboSep™、RosetteSep™、SepMate™;Miltenyi Biotec MACS™细胞分离试剂盒,以及其他市售的细胞分离和分隔试剂盒。免疫细胞和前体的特定亚群可以通过使用荧光激活细胞分选(FACS)、珠子或此类试剂盒中可用的其他结合剂来分离,这些试剂对独特的细胞表面标志物具有特异性。例如,MACS™CD4⁺和CD8⁺微珠可用于分离CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0245] 或者,细胞可以通过市售细胞培养物获得,包括但不限于,对于T细胞,BCL2 (AAA) Jurkat(ATCC® CRL-2902™)、BCL2 (S70A) Jurkat(ATCC® CRL-2900™)、BCL2 (S87A)

Jurkat (ATCC® CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™)、Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™) 细胞系;对于NK细胞,NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™) 细胞系。

[0246] 在某些方面,在从对象中获得细胞前可以向对象施用预处理方案以诱导前体细胞动员到外周血中。例如,可以向受试者施用有效量的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、非格司亭(Neupogen)、沙格司亭(Leukine)、聚乙二醇化非格司亭(Neulasta)和莫佐比尔(Plerixafor)中的至少一种,在从对象中分离细胞之前最多两周或同时进行。可以通过本领域已知的任何方法从对象中获得动员的前体细胞,包括例如在施用预处理方案后1-14天的白细胞去除术。

[0247] T细胞的活化和扩增:无论是在对T细胞进行基因修饰以表达所需的CAR之前还是之后,都可以使用公知的方法来激活和扩增细胞,例如描述于美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041的那些方法。用Lym1或Lym2抗原离体刺激可以激活和扩大选定的CAR表达细胞亚群。或者,细胞可以通过与Lym1或Lym2抗原的相互作用在体内激活。

[0248] 激活相关细胞的方法是本领域众所周知的并且可以容易地适用于本申请;示例性方法在以下示例中描述。与本发明公开使用的相关分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads® 系统激活和扩展套件;BD Biosciences Phosflow™ 激活试剂盒、Miltenyi Biotec MACS™ 激活/扩增试剂盒,以及其他特定于相关细胞激活部分的市售细胞试剂盒。通过使用珠子或此类试剂盒中可用的其他试剂,可以激活或扩增特定的免疫细胞亚群。例如, α -CD3/ α -CD28 Dynabeads® 可用于激活和扩增分离的T细胞群。

[0249] 本文还公开了分离的细胞,其包含本发明公开的抗体、CAR、分离的核酸和/或载体,或基本上由其组成,或由其组成。

[0250] 多核苷酸和载体

可以使用载体制备CAR。本发明公开内容的方面涉及编码本文公开的CAR的分离的核酸序列和载体,所述载体包含编码CAR及其互补序列和它们各自的等效物的分离的核酸序列,或基本上由其组成,或由其组成。

[0251] 示例性载体的制备和使用所述载体的表达CAR细胞的产生在以下实施例中详细讨论。总之,编码CAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子并将构建体并入表达载体来实现。所述载体可适用于复制和整合真核生物。

[0252] 在一些实施方案中,分离的核酸序列编码CAR,其包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列以下组成:本文提供的抗体的抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD28 共刺激信号区和/或 4-1BB共刺激信号区,以及 CD3 ζ 信号区。在具体的实施方案中,分离的核酸序列包含编码以下的序列、或基本上由其组成、或由其组成:(a)本发明公开的抗体的抗原结合结构域,随后是(b)CD8 α 铰链结构域,(c)CD8 α 跨膜结构域,然后是(d)CD28共刺激信号传导区和/或 4-1BB共刺激信号传导区,然后是(e)CD3 ζ 信号传导结构域。

[0253] 在另一方面,CAR包含以下序列、或基本上由以下序列组成、或由以下序列以下组

成：(a) 抗原结合结构域（例如，抗Lym抗体或抗CD19抗体的），(b) 铰链结构域，(c) 跨膜结构域，和(d) DAP 10和/或DAP 12域。抗-Lym抗体可以是抗-Lym1或抗-Lym 2抗体，例如人抗-Lym1或人抗-Lym2抗体。在另一方面，抗体是抗CD19抗体或其抗原结合片段。在另一方面，铰链结构域包含CD8 α 铰链结构域或IgG铰链结构域。跨膜结构域可以源自天然或合成来源。在一方面，在抗原结合域之后插入包含序列AVPPQQWALS的肽。如果来源是天然的，则结构域可以来自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在本发明公开中特别使用的跨膜区可以源自 CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCR。或者，跨膜结构域可以是合成的，在这种情况下，它将主要包含疏水性残基，例如亮氨酸和缬氨酸。优选地，在合成跨膜结构域的每一端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地，长度优选在2至10个氨基酸之间的短寡或多肽接头可以形成跨膜结构域和CAR的细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。在一个具体实施方案中，跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域。元件可以是任何物种的，例如人或鼠。在一个特定方面，本发明公开的CAR可以进一步包含可检测标记物或纯化标记物，或基本上由其组成，或由其组成。在另一方面，它们的CAR还包含信号肽。

[0254] 在一些实施方案中，分离的核酸序列包含编码抗体的抗原结合结构域或增强子的序列上游的Kozak共有序列，或基本上由其组成，或由其组成。在一些实施方案中，分离的核酸包含赋予抗生素抗性的多核苷酸，或基本上由其组成，或由其组成。在一个特定的实施方案中，编码CAR的分离的核酸进一步包含用于控制CAR的表达和/或活化的开关机制，或基本上由其组成，或由其组成。

[0255] 在一些实施方案中，分离的核酸序列包含位于抗体的抗原结合域上游的信号肽编码多核苷酸序列，或基本上由其组成，或由其组成。

[0256] 在一个特定的实施方案中，分离的核酸序列包含编码位于抗体的抗原结合域上游的2A自切割肽(T2A)的多核苷酸序列，或基本上由其组成，或由其组成。

[0257] 在一些实施方案中，分离的核酸序列包含在载体中。在某些实施方案中，载体是质粒。在其他实施方案中，载体是病毒载体。在具体实施方案中，载体是慢病毒载体。

[0258] 示例性载体的制备和使用所述载体产生CAR表达细胞在以下实施例中详细讨论。总之，编码CAR的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子并将构建体并入表达载体来实现。载体可适用于复制和整合真核生物。生产包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。例如，参见，Sambrook 等人(2001，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

[0259] 在一些方面，载体源自或基于野生型病毒。在进一步的方面，载体源自或基于野生型慢病毒。这样的例子包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)。或者，预期其他逆转录病毒可用作载体骨架如鼠白血病病毒(MLV)的基础。很明显，根据本发明公开的病毒载体不必限于特定病毒的组分。病毒载体可包含源自两种或更多种不同病毒的成分，也可包含合成成分。可以操纵载体成分以获得所需的特征，例如靶细胞特异性。

[0260] 本发明公开的重组载体可以源自灵长类动物和非灵长类动物。灵长类慢病毒的例子包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体 and 猿猴免疫

缺陷病毒 (SIV)。非灵长类慢病毒组包括原型“慢病毒”visna/maedi 病毒 (VMV), 以及相关的山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)、马传染性贫血病毒 (EIAV) 和最近描述的猫科动物免疫缺陷病毒 (FIV) 和牛免疫缺陷病毒 (BIV)。现有技术重组慢病毒载体是本领域已知的, 例如, 参见, 美国专利号 6,924,123; 7,056,699; 7,419,829 和 7,442,551, 通过引用并入本文。

[0261] 美国专利号 6,924,123 公开了某些逆转录病毒序列有助于整合到靶细胞基因组中。该专利教导了每个逆转录病毒基因组都包含了称为gag、pol和env的用于编码病毒体蛋白质和酶的基因。这些基因的两端两侧是称为长末端重复序列 (LTR) 的区域。LTR负责原病毒整合和转录。它们还用作增强子-启动子序列。换句话说, LTR可以控制病毒基因的表达。逆转录病毒RNA的衣壳化通过位于病毒基因组5'端的 psi 序列发生。LTR本身是相同的序列, 可以分为三个元件, 分别称为U3、R和U5。U3源自 RNA 3'端特有的序列。R来源于RNA两端重复的序列, U5来源于RNA 5'端特有的序列。这三个元件的大小在不同的逆转录病毒中可能有很大差异。对于病毒基因组, poly (A) 添加 (终止) 位点位于LTR右侧的R和U5之间的边界处。U3包含原病毒的大部分转录控制元件, 其中包括启动子和多个增强子序列, 对细胞和某些情况下的病毒转录激活蛋白有反应。

[0262] 关于结构基因gag、pol和env本身, gag编码病毒的内部结构蛋白。Gag蛋白被蛋白水解加工成成熟蛋白 MA (基质)、CA (衣壳) 和 NC (核衣壳)。所述pol基因编码逆转录酶 (RT), 其中包含 DNA 聚合酶、相关的 RNase H和整合酶 (IN), 后者介导基因组的复制。

[0263] 为了产生病毒载体颗粒, 载体RNA基因组从编码它的DNA构建体在宿主细胞中表达。未由载体基因组编码的颗粒组分由在宿主细胞中表达的附加核酸序列 (“包装系统”, 通常包括gag/pol和env基因中的一个或两个) 反式提供。生产病毒载体颗粒所需的一组序列可以通过瞬时转染引入宿主细胞, 或者它们可以整合到宿主细胞基因组中, 或者它们可以以混合方式提供。所涉及的技术是本领域技术人员已知的。

[0264] 用于本发明公开的逆转录病毒载体包括但不限于: Invitrogen的pLenti系列版本4、6和6.2的“ViraPower”系统, 制造自Lentigen Corp.; pHIV-7-GFP, 生成和使用的实验室来自希望之城研究所 (City of Hope Research Institute); “Lenti-X”慢病毒载体pLVX, 由Clontech制造; pLK0.1-puro, 由Sigma-Aldrich制造; pLemiR, 由Open Biosystems制造; 及pLV, 生成和使用的实验室来自德国柏林病毒学研究所 (Institute of Virology) (CBF) Charité医学院。

[0265] 不管用本发明公开的将外源核酸引入宿主细胞的方法, 或以其他方式将细胞暴露于抑制剂的方法, 为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在, 可以执行多种测定法。此类测定法包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定, 例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR; “生化”测定, 例如检测特定肽的存在或不存在, 例如通过免疫学手段 (ELISA和蛋白质印迹) 或通过本文所述的测定来鉴定落入本发明公开范围内的试剂。

[0266] 包装载体和细胞系: CAR可以通过使用包装载体和细胞系被包装成慢病毒或逆转录病毒包装系统。包装质粒包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。包装载体包含促进遗传物质进入细胞的元件和序列。例如, 逆转录病毒构建体是包含至少一个逆转录病毒辅助DNA序列的包装质粒, 该序列源自无复制能力的逆转录病毒基因组, 反式编码包装无复制能力的逆转录病毒载体所需的所有病毒粒子蛋白, 并且用于生产能够以高滴度包装无复制能力的逆转录病毒载体的病毒粒子蛋白, 而不产生有复制

能力的辅助病毒。逆转录病毒DNA序列缺少编码病毒5' LTR 的天然增强子和/或启动子的区域,并且缺少负责包装辅助基因组和3' LTR的psi功能序列,但编码外源多聚腺苷酸化位点,例如SV40多聚腺苷酸化位点,以及在需要病毒产生的细胞类型中指导有效转录的外源增强子和/或启动子。逆转录病毒是白血病毒,例如莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)或长臂猿白血病毒(GALV)。外源增强子和启动子可以是人巨细胞病毒(HCMV)即早(IE)增强子和启动子、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MMSV)的增强子和启动子(U3 区)、劳斯肉瘤病毒(RSV)的U3区、脾病灶形成病毒(SFFV)的 U3 区或 HCMV IE 增强子与天然莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)启动子相连。逆转录病毒包装质粒可由基于质粒的表达载体编码的两个逆转录病毒辅助DNA序列组成,例如其中第一个辅助序列包含编码单嗜性(ecotropic)MMLV或GALV的gag和pol蛋白的cDNA,而第二个辅助序列包含编码env蛋白的cDNA。决定宿主范围的所述 Env 基因可能来源于编码异性(xenotropic)、双嗜性(amphotropic)、单嗜性(ecotropic)、多嗜性(polytropic)(水貂病灶形成)或10A1鼠白血病毒 env 蛋白、或长臂猿白血病毒(GALV env蛋白)、人类免疫缺陷病毒env(gp160)蛋白、水泡性口炎病毒(VSV)G蛋白、人类T细胞白血病(HTLV)I型和II型env基因产物的基因、源自一种或多种上述env 基因组合的嵌合包膜基因或编码上述env基因产物的细胞质和跨膜的嵌合包膜基因和针对所需靶细胞上的特定表面分子的单克隆抗体。

[0267] 在包装过程中,将包装质粒和逆转录病毒载体瞬时共转染到能够产生病毒的第一群哺乳动物细胞中,例如人胚胎肾细胞,例如293细胞(ATCC No. CRL1573, ATCC, Rockville, Md.),以产生高滴度的含有重组逆转录病毒的上清液。在本发明公开的另一种方法中,这种瞬时转染的第一细胞群而后与哺乳动物靶细胞(例如人淋巴细胞)共培养,以高效率转导具有外源基因的靶细胞。在本发明公开的又一方法中,将来自上述瞬时转染的第一细胞群的上清液与哺乳动物靶细胞(例如人淋巴细胞或造血干细胞)一起培养,以高效率转导具有外源基因的靶细胞。

[0268] 在另一方面,所述包装质粒在能够产生病毒的第一哺乳动物细胞群中稳定表达,例如人胚胎肾细胞,例如293细胞。逆转录病毒或慢病毒载体通过与选择标记共转染或用假型病毒感染被引入细胞。在这两种情况下,所述载体都会整合。或者,可以将载体引入附加型保持的质粒中。产生了含有高滴度重组逆转录病毒的上清液。

[0269] 治疗和诊断方法

在一个方面,本文提供了一种组合物,其包含本发明公开的载体和一种或多种抗体、抗原结合片段、多肽、CAR、分离的核酸、载体和/或分离的细胞,或基本上由其组成,或由其组成。本发明公开的抗体和多核苷酸、载体或宿主细胞也可以与许多不同的载体结合。因此,本发明公开内容还提供了包含抗体和另一种活性或惰性物质的组合物。众所周知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿(magnetite)。出于本发明公开的目的,载体的性质可以是可溶的或不可溶的。本领域技术人员将知晓用于结合抗体的其他合适载体,或将能够使用常规实验确定这些载体。在患者接受huLym-1或huLym-2 CAR T细胞或抗体治疗之前,可以用huLym-1或huLym-2对来自肿瘤的冷冻切片进行染色,以证明肿瘤的抗原阳性。Lym-1和Lym-2抗原都会被切片的石蜡包埋破坏,因此需要进行冷冻切片。

[0270] 本发明公开的抗体或其片段可用于治疗肿瘤和癌症。本文提供的抗Lym CAR表达

细胞、抗体、其抗原结合片段和/或本文提供的多肽可以单独或与稀释剂、已知的抗癌治疗剂和/或与其他组分(如作为免疫刺激的细胞因子或其他细胞群)共同施用。它们可以作为一线疗法、二线疗法、三线疗法或进一步疗法施用。因此,所公开的抗体可以与其他疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术等)结合。附加疗法的非限制性实例包括化学治疗剂或生物制剂。为了改变肿瘤微环境而使本发明公开的CAR T细胞或抗体更有效,检查点抑制剂可能在CAR T细胞和/或抗体治疗之前或期间是有用的。额外疗法的进一步非限制性实例包括删除或抑制抑制细胞例如调节性T细胞(Treg)和骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的方法也将是有用的。Treg可以通过低剂量环磷酰胺和 MDSC通过低剂量氟尿嘧啶(5-FU)化疗或目前未知的方法删除。此外,其他疗法的其他非限制性例子包括抗原的上调可以使肿瘤细胞对CAR T细胞疗法更敏感。HLA-DR的上调可以通过使用组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂、IL-12 治疗、CpG (TLR9 激动剂)和干扰素基因刺激剂(STING)通路激动剂来完成。适当的治疗方案将由治疗医师或兽医确定。

[0271] 本文提供的抗Lym CAR表达细胞、本发明公开的抗体、其抗原结合片段和/或多肽可以单独施用或与稀释剂、已知抗癌治疗剂和/或其他成分(如细胞因子或其他免疫刺激细胞群)组合施用。

[0272] 在一个实施方案中,本文公开了一种在有需要的对象中抑制肿瘤生长和/或治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括向对象施用有效量的本文提供的CAR表达细胞、有效量的抗体、有效量的其抗原结合片段和/或有效量的本文提供的多肽,或基本上由其组成,或由其组成。在一个方面,CAR表达细胞对于被治疗对象是自体同源的或同种异体的,并且任选地是一线、二线、三线、四线或五线疗法。

[0273] 在另一方面,肿瘤或癌细胞表达或过表达CD 19、Lym1和/或Lym2。在另一方面,癌症或肿瘤选自癌、肉瘤、淋巴瘤或白血病。在一个特定方面,肿瘤或癌症是B细胞淋巴瘤或白血病。在一个实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。所述实体瘤可以是黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌和/或脑肿瘤。在一方面,待治疗的癌症是癌、肉瘤、神经母细胞瘤、宫颈癌、肝细胞癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、腺瘤、腺癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤或黑色素瘤。

[0274] 所述方法可用于治疗对象诸如人、非人灵长类动物(例如,猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、猴子、猕猴等)、家养动物(例如,狗和猫)、农场动物(例如,马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。哺乳动物可以是任何年龄或处于任何发育阶段(例如,成人、青少年、儿童、婴儿或子宫内的哺乳动物)。哺乳动物可以是雄性或雌性。在某些实施方案中,对象患有或怀疑患有肿瘤性疾病、瘤形成、肿瘤、恶性肿瘤或癌症。

[0275] 本文公开的方法可以进一步包括向对象施用除CAR疗法之外的抗肿瘤疗法,或基本上由其组成,或由其组成。

[0276] 因此,本发明公开的方法方面涉及用于抑制有需要的对象的肿瘤生长和/或用于治疗有需要的癌症患者的方法。

[0277] 本发明公开还涉及用于抑制癌细胞或癌症干细胞增殖的方法,其包括使细胞与有效量的表达抗-Lym CAR的细胞、有效量的抗体、有效量的抗原结合片段和/或有效量的本发明公开的多肽接触,或基本上由其组成,或由其组成。

[0278] 本文进一步提供了用于确定对象是可能对治疗有反应还是不太可能对治疗作出

反应的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:使从患者分离的样品与本发明公开的抗体、其抗原片段、和/或多肽接触,并检测样品中的抗体-细胞复合物、抗原结合片段-细胞复合物和/或多肽-细胞复合物,其中复合物的存在表明对象可能对治疗有反应,而复合物的不存在表明对象不太可能对治疗有反应。抗体、抗原结合片段和/或多肽可以被可检测地标记。

[0279] 本文还公开了的方法进一步包括将有效量的本发明公开的抗体或CAR施用至确定可能对治疗有反应对象,或基本上由其组成,或由其组成。

[0280] 本文公开的疗法可以是一线、二线、三线、四线或五线疗法。

[0281] 本发明公开进一步涉及用于监测治疗对象的方法,包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:使从对象中分离的样品与本发明公开的抗体或抗原结合片段接触,并检测样品中的抗体-细胞复合物。该方法可以在向对象施用有效量的CAR表达细胞、有效量的抗体、有效量的抗原结合片段和/或有效量的本发明公开的多肽之前和/或之后进行。在一方面,抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。在另一方面,样品包括痰、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水、血液或组织中的一种或多种。

[0282] 在另一方面,本文提供了一种用于刺激对癌症或肿瘤细胞群的免疫应答的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用有效刺激免疫反应的量的本发明公开的抗体、抗原其结合片段和/或多肽。在一方面,该对象患有、曾患有或需要治疗癌症或肿瘤。在另一方面,癌症的特征在于低反应性。在另一方面,提供了一种用于刺激对癌症或肿瘤细胞的免疫应答的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:将靶细胞群与本发明公开的抗体接触,其中所述接触是体外或体内的。直接反应的一个特殊示例是结合。间接反应的一个特殊示例是一个实体作用于中间分子,中间分子又作用于第二个引用实体。如本文所用的接触包括在溶液、固相中、体外、离体、细胞和体内中。体内接触可称为给药或施用。在另一方面,癌症或肿瘤的特征在于低反应性。在一方面,选择与癌症或肿瘤细胞特异性结合的抗体。细胞可以来自任何物种,例如哺乳动物或人类细胞。它们可以从对象(例如,从活检)或培养细胞中分离。在另一方面,癌症或肿瘤细胞表达或过表达 Lym1或Lym2。

[0283] 本文还提供了一种在对象中提供抗肿瘤免疫力的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向对象施用有效向对象提供免疫力的量的本文提供的CAR表达细胞、抗体、其抗原结合片段组成和/或多肽。本文提供的CAR表达细胞、抗体、其抗原结合片段和/或多肽的提供是为了防止在易患或尚未表现出癌症症状的对象中发生症状或癌症。

[0284] 在一些实施方案中,本文提供的CAR表达细胞、抗体、其抗原结合片段和/或多肽可以递送或施用到通过切除肿瘤组织形成的腔中(即腔内递送)或直接在切除之前进入肿瘤(即肿瘤内递送)。在一些实施方案中,所公开的抗体可以通过静脉内、鞘内、腹膜内、肌肉内、皮下或其他合适的给药方式给药。

[0285] 本发明公开的药物组合物可以以适合于待治疗或预防的疾病的方式给药。给药的数量和频率将取决于诸如患者状况、患者疾病的类型和严重程度等因素,但适当的剂量可通过临床试验确定。

[0286] 对于上述方法,施用了有效量,并且细胞或细胞群的施用是为了减轻任何症状或

防止出现另外的症状。当施用是为了预防或降低癌症复发或转移的可能性时,细胞或组合物可以在任何可见或可检测的症状出现之前施用。施用途径包括但不限于口服(例如片剂、胶囊或悬浮液)、局部、透皮、鼻内、阴道、直肠、皮下静脉内、动脉内、肌内、骨内、腹膜内、硬膜外和鞘内。

[0287] 所述方法提供以下中的一项或多项:(1)防止在易感或尚未表现出疾病症状的对象中发生症状或疾病;(2)抑制疾病或者阻止其发展;或(3)改善或引起疾病或疾病症状的消退或复发。如本领域所理解的,“治疗”是用于获得有益的或期望的结果,包括临床结果的方法。对于本技术的目的,有益的或期望的结果可以包括一种或多种,但不限于:一种或多种症状的减轻或改善,病症(包括疾病)的程度减轻,病症(包括疾病)的状态稳定(即,不恶化),延迟或减缓病症(包括疾病),病症(包括疾病)的发展、改善或缓解,状态和缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。包含所公开的组合物和方法的治疗可以是一线、二线、三线、四线、五线疗法并且旨在用作单独疗法或与其他适当疗法例如手术衰退、化学疗法、放射疗法组合使用。在一方面,治疗不包括预防。

[0288] 试剂盒

在一个特定方面,本发明公开提供了用于执行本发明公开的方法的试剂盒以及用于执行本发明公开的方法的说明。该试剂盒包含以下中的一种或多种,或基本上由其组成,或由其组成:本发明公开的抗体、CAR、抗原结合片段、多肽、分离的核酸、载体、分离的细胞和/或组合物和使用说明。

[0289] 该试剂盒可用于检测生物样品中Lym1或Lym2多肽的存在,生物样品例如是任何体液,包括但不限于例如痰、血清、血浆、淋巴液、囊性液、尿液、粪便、脑脊髓液液体、酸性液体或血液,包括身体组织的活检样本。测试样品也可以是肿瘤细胞、与肿瘤相邻的正常细胞、与肿瘤组织类型对应的正常细胞、血细胞、外周血淋巴细胞或其组合。上述方法中使用的测试样品将根据测定形式、检测方法的性质以及用作待测定样品的组织、细胞或提取物而变化。用于制备细胞的蛋白质提取物或膜提取物的方法是本领域已知的并且可以容易地进行调整以获得与所用系统相容的样品。

[0290] 试剂盒组分(例如,试剂)可以包装在合适的容器中。该试剂盒还可以包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂,或基本上由其组成,或由其组成。该试剂盒可以进一步包含检测可检测标记所必需的组分(例如酶或底物),或基本上由其组成,或由其组成。该试剂盒还可以包含一个对照样品或一系列对照样品,可以对其进行分析并与测试样品进行比较。试剂盒的每个组件都可以封装在单独的容器中,所有不同的容器都可以封装在单个包装中,与解释使用该试剂盒进行的化验结果的说明一起。本发明公开的试剂盒可以在试剂盒容器之上或之中包含书面产品。书面产品描述了如何使用试剂盒中包含的试剂。

[0291] 在可行的情况下,这些所建议的试剂盒组分可以以本领域技术人员惯用的方式包装。例如,这些建议的试剂盒组分可以以溶液形式或以液体分散体等形式提供。

[0292] 实验方法

实验1

人源化Lym-1和Lym-2抗体的表征

通过CDR移植产生两种人源化Lym-1抗体和一种人源化Lym-2抗体。人源化抗体展示出了低于其亲本嵌合抗体的结合能力(图1和图4)。

[0293] huLym-1-A转导的原代人T细胞的体外表达和功能评估

huLym-1-A、huLym-1-B和huLym-2 CAR可以在原代人T细胞上表达,如通过抗Lym-1独特型抗体或蛋白-L检测(图2和图5)。huLym-2CAR介导的针对ARH-77的表位特异性杀伤显示于图4中。

[0294] huLym-1CAR-T细胞诱导Raji异种移植完全缓解

在用Lym-1和huLym-1 CAR-T细胞治疗的小鼠中,仅检测到背景生物发光,并且在整个60天的实验中抗肿瘤作用是持久的(图3A-图3C)。在接受空白转导T细胞和PBS的五只小鼠中,肿瘤负荷增加,所有小鼠在第27天因后腿麻痹而被处死,中等存活期为20天。(图3A、图3C)。

[0295] 细胞系

ARH-77细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)。ARH-77 eGFP/Luc细胞系是在实验室中通过用eGFP/Luc病毒转导亲本ARH-77产生的。Raji/Luc-GFP细胞来自加州大学洛杉矶分校的 Yvonne Y. Chen 博士所赠送。所有细胞系均在RPMI-1640中培养,该RPMI-1640补充有10%透析FCS(dFCS, Hyclone, Logan, UT)、2%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)(Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA)。用于慢病毒生产的HEK-293 LTV细胞(Cell Biolabs Inc, San Diego, CA)在补充有10% dFCS、2%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)的DMEM(Corning, Manassas, VA)中培养。Jurkat人T淋巴瘤细胞获自ATCC,并在含有10%FCS、1%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)的RPMI-1640培养基中培养。

[0296] 人源化抗体表征

通过流式细胞术分析分别评估了人源化Lym-1和Lym-2对Raji和ARH-77细胞系的结合能力。在每种情况下,将100 μ l洗涤缓冲液中的 5×10^5 个靶细胞与浓度增加的抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。在加入2 μ g (AF488)偶联的山羊抗人IgG(Thermo-fisher)之前用洗涤缓冲液(2%FBS, PBS)洗涤细胞两次。然后将标记的细胞在4 $^{\circ}$ C下再培养30分钟。通过流式细胞术测量和量化平均荧光强度(MFI)。

[0297] 慢病毒载体构建与制备

Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-A-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR和 huLym-2-41BB3zCAR的编码基因通过EcoRI和MluI限制性位点被连接到慢病毒载体 pLVX-EF1 α -IRES-ZsGreen(Clontech, Mountain View, CA)中。慢病毒是通过瞬时共转染由包装质粒 psPAX2和pMD2.G(Addgene)和HEK-293LTV细胞系组成的 CAR转移载体产生的。在转染后 24 和 48 小时收集含有病毒颗粒的上清液,并且合并、过滤并通过超速离心浓缩。然后将沉淀的病毒重新悬浮在补充有1%BSA和7%海藻糖的PBS中,等分并储存在-80 $^{\circ}$ C。通过用病毒载体的10倍系列稀释液转导 10^6 个Jurkat T细胞来测量病毒滴度。转导后48小时,用实验室开发的生物素标记的抗Lym-1独特型抗体或生物素标记的 ProteinL(Genescript)标记细胞,并通过APC偶联链霉亲和素(BioLegend)检测。使用 10~20%范围内的阳性转导细胞通过以下公式计算病毒转导单位(TU):

$$\text{TU/mL} = (10^6 \text{ 接种细胞} \times \% \text{ 阳性细胞} \times 1000) / \mu\text{l 病毒载体}$$

原代T细胞分离和转导

人血沉棕黄层(buffy coat)制剂购自Zenbio Inc.(Research Triangle Park,

NC)并用于获得用于转导程序的原代血单核细胞(PBMC)。根据制造商的方案,使用淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque)(Life Technologies, Inc.)分离 PBMC,然后使用T细胞阴性选择试剂盒(Stem Cell Technologies, Seattle, WA)进行T细胞分离程序。然后在T细胞培养基(43%Clicks、43%RPMI 1640、2%Glutamax、10%dFCS、1%非必需氨基酸溶液和 1%青霉素/链霉素溶液)中培养分离的细胞。转导前三天,通过以1:1的比例添加抗CD3/CD28珠(Life Technologies, Inc.)激活T细胞,然后用慢病毒(MOI = 15)和 Lentiblast (OZ Bioscience, San Diego, CA)以800g离心90分钟进行转导。进行一次转导,24小时后更换培养基,在此之后将细胞转移到补充有新鲜 T 细胞培养基的24孔G-Rex板(Wilson Wolf, St Paul, MN)中。在转导后第10天将T细胞用于测定。CAR病毒转导效率在第10天使用生物素化的抗Lym-1独特型抗体通过流式细胞术评估,然后用APC偶联的链霉亲和素进行检测。空白转导如上所述作为阴性对照进行,但不存在活病毒载体。

[0298] 细胞毒性

通过添加空白T细胞,将转导的效应CAR T细胞制剂调整为50%阳性的CAR T细胞。这些调整后的制剂与10万个Raji Luc/eGFP细胞一起在没有添加细胞因子的情况下,以CAR T细胞与靶标的比例为2:1、1:1、0.5:1和0.25:1每个在平底96孔板中培养24小时。将来自没有效应细胞的Raji细胞的发光读数用作对照。使用20万Raji Luc/eGFP的两倍系列稀释来生成标准曲线,以将活细胞与发光读数相关联。24小时孵育后的活靶细胞数通过将发光信号读数与标准曲线相关联来计算。细胞裂解百分比由下式计算:

$$\text{裂解}\% = \left(\frac{\text{对照中的}\#Raji - \text{效应子中的}\#Raji}{\text{对照中的}\#Raji} \right) \times 100\%。$$

[0299] 在NOD Scid-IL2Rgammanull (NSG) 小鼠中进行Raji/Luc-eGFP异种移植研究

所有小鼠实验均得到USC动物护理和使用委员会(USC Animal Care and Use Committee) (Protocol #20585)的批准。从杰克森实验室(Jackson Laboratories) (Bar Harbor, ME)购买的8周龄雄性NSG小鼠被安置在USC生态缸的无菌笼子中。使用胰岛素注射器通过侧尾静脉注射100μl PBS中的100万个Raji/Luc-GFP细胞(指定为第0天)。在第7天通过生物发光成像测量荧光素酶活性以评估肿瘤负荷。在第8天,在100μl PBS 中制备了100万个空白T细胞、Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR 和 huLym-1-B-DAPCAR并使用胰岛素注射器静脉注射。每周测量两次小鼠体重,并使用南加州大学核心分子成像中心(USC Core Molecular Imaging Center)的IVIS成像系统通过生物发光成像监测肿瘤进展。

[0300] 实验2

细胞系

Raji/Luc-GFP细胞来自加州大学洛杉矶分校的Yvonne Y. Chen博士所赠送。所有细胞系均在RPMI-1640中培养,该RPMI-1640补充有10%透析FCS(dFCS, Hyclone, Logan, UT)、2%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep) (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA)。用于慢病毒生产的HEK-293 LTV细胞(Cell Biolabs Inc, San Diego, CA)在补充有10%dFCS、2%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)的DMEM(Corning, Manassas, VA)中培养。Jurkat人T淋巴瘤细胞获自美国典型培养物保藏中心(Manassas, Va),并在含有10%FCS、1%

谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素(Pen/Strep)的RPMI-1640培养基中培养。

[0301] 慢病毒载体的构建与制备

将Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR和huLym-1-B-DAPCAR的编码基因通过 *EcoRI* 和 *MluI* 限制性位点连接到慢病毒载体 pLVX-EF1 α -IRES-ZsGreen (Clontech, Mountain View, CA)。慢病毒是通过瞬时共转染由包装质粒、psPAX2和 pMD2.G (Addgene) 和 HEK-293LTV 细胞 (8) 组成的 CAR 转移载体产生的。在转染后 24 和 48 小时收集含有病毒颗粒的上清液, 合并、过滤并通过超速离心浓缩。然后将沉淀的病毒重新悬浮在补充有 1% BSA 和 7% 海藻糖的 PBS 中, 等分并储存在 -80 °C。通过用病毒载体的 10 倍系列稀释液转导 10⁶ 个 Jurkat T 细胞来测量病毒滴度。转导后 48 小时, 用申请人实验室开发的生物素标记的抗 Lym-1 独特型抗体标记细胞, 并通过 APC 偶联的链霉亲和素 (BioLegend) 检测。使用 10~20% 范围内的阳性转导细胞计算病毒转导单位 (TU), 公式如下: TU/mL = (10⁶ 个接种细胞 × % 阳性细胞 × 1000) / μ l 病毒载体。

[0302] 原代 T 细胞分离和转导

人血沉棕黄层制剂购自 Zenbio Inc. (Research Triangle Park, NC) 并用于获得用于转导程序的原代血单核细胞 (PBMC)。根据制造商的方案, 使用 Ficoll-Paque (Life Technologies, Inc.) 分离 PBMC, 然后使用 T 细胞阴性选择试剂盒 (Stem Cell Technologies, Seattle, WA) 进行 T 细胞分离程序。然后在 T 细胞培养基 (43% Clicks、43% RPMI 1640、2% Glutamax、10% dFCS、1% 非必需氨基酸溶液和 1% 青霉素/链霉素 (Pen/Strep) 溶液中培养分离的细胞。转导前三天, 通过以 1:1 的比例加入 CD3/CD28 珠 (Life Technologies, Inc.) 激活 T 细胞, 然后用慢病毒 (MOI = 15) 和 Lentiblast (OZ Bioscience, San Diego, CA) 以 800g 离心 90 分钟进行转导。进行一次转导, 24 小时后更换培养基, 然后将细胞转移到补充有新鲜 T 细胞培养基的 24 孔 G-Rex 板 (Wilson Wolf, St Paul, MN)。在转导后第 10 天使用 T 细胞进行测定。CAR 病毒转导效率在第 10 天使用生物素化的抗 Lym-1 独特型抗体通过流式细胞术评估, 然后用 APC 偶联的链霉亲和素进行检测。空白转导如上所述作为阴性对照进行, 但不存在活病毒载体。

[0303] 细胞毒性

通过添加空白 T 细胞, 将转导的效应 CAR T 细胞制剂调整为 50% 阳性的 CAR T 细胞。这些调整后的制剂与 10 万个 Raji Luc/eGFP 细胞在没有添加细胞因子的情况下一起在平底 96 孔板中培养 24 小时, CAR T 细胞与靶标的比例分别为 2:1、1:1、0.5:1 和 0.25:1。来自没有效应细胞的 Raji 细胞的发光读数用作对照。使用 20 万 Raji Luc/eGFP 的两倍系列稀释来生成标准曲线, 以将活细胞与发光读数相关联。通过将发光信号读数与标准曲线相关联来计算培养 24 小时后的活靶细胞数。细胞裂解百分比由下式计算

$$\text{裂解}\% = \left(\frac{\text{对照中的}\#Raji - \text{效应子中的}\#Raji}{\text{对照中的}\#Raji} \right) \times 100\%。$$

[0304] NOD Scid-IL2R γ manull (NSG) 小鼠中的 Raji/Luc-eGFP 异种移植研究

所有小鼠实验均获得 USC 动物护理和使用委员会 (Protocol #20585) 的批准。从杰克森实验室 (Jackson Laboratories) 购买的八周龄雄性 NSG 小鼠被安置在 USC 生态缸的无菌笼子里。使用胰岛素注射器 (指定为第 0 天) 通过侧尾静脉注射 100 μ l PBS 中的 100 万

个Raji/Luc-GFP细胞。在第7天通过生物发光成像测量荧光素酶活性以评估肿瘤负荷。在第8天,在100 μ l PBS中制备了100万个空白T细胞、Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR和huLym-1-B-DAPCAR并使用胰岛素注射器静脉注射。每周测量两次小鼠体重,并使用USC核心分子影像中心的IVIS成像系统通过生物发光成像监测肿瘤进展。

[0305] huLym-1-B-DAPCAR转导的原代人类T细胞的体外表达和功能评估

huLym-1-B-DAPCAR构建体由CD8 α 铰链和跨膜结构域(TM)(其能够使细胞膜锚定)组成,然后是DAP10和DAP12的细胞质区域(在DAP10-DAP12的方向上)(图7)。经由scFv指导从huLym-1-B抗体获得CAR T细胞的特异性。这种新构建体在原代人类T细胞上成功表达,如抗Lym-1独特型抗体所检测(图8),并对Lym-1阳性细胞系Raji(一种EBV阳性非洲伯基特淋巴瘤细胞系)发挥细胞毒性(图10)。更重要的是,用DAPCAR转导的T细胞具有与空白T细胞相似的增殖特征,并在用抗CD3/CD28珠子反复刺激后保留了转基因表达(图9A-9B)。然而,重要的是,基于41BB3z的CAR-T细胞显示出了CAR阳性细胞群的逐渐减少(图9A-9B)。

[0306] huLym-1-B-DAPCAR T细胞在Raji异种移植物中表现出优异的肿瘤控制

在Raji eGFP/Luc异种移植模型中评估了不同构建体的抗肿瘤作用。对于这些研究,使用的CAR T细胞数量减少了10倍,以便更好地评估每组效力的差异。这些体内研究的结果显示在图10中并显示以下内容。到第22天,空白T细胞组中的所有小鼠都死于肿瘤进展(图11A-11D)。相比之下,CAR T细胞治疗组的小鼠表现出显著的改善和存活率(图11B)。然而,对于鼠Lym-1-41BB3z组,肿瘤在第21天后进展(图11A)并最终导致后腿麻痹。在该组中,只有两只小鼠在第44天存活(图11B)。在huLym-1-B-41BB3zCAR T细胞治疗的小鼠中,第21天后观察到剧烈的肿瘤进展,但一只小鼠在第42天出现后腿麻痹,2/4小鼠在第44天具有非常高的肿瘤负荷,如生物发光成像所证明的(图11A-11C)。相比之下,huLym-1-B-DAPCAR T细胞诱导了更一致的肿瘤控制,并且到第44天没有小鼠出现后腿麻痹(图11A-11C)。此外,与使用4-1BB-CD3 ζ 信号域的第二代CAR T细胞处理的组相比,huLym-1-B-DAPCAR的体重减轻显著减少(5%与20%的体重减轻)。这些结果表明,与基于第二代的CAR-T细胞相比,这种新的DAP构建体可以更安全、更有效地增殖。

[0307] 实验3

该实验证明了DAP信号传导部分对CAR T细胞的效用,以及用于治疗Lym-1阳性肿瘤的细胞疗法的开发。

[0308] Mice小鼠

小鼠实验经USC动物护理和使用委员会(IACUC 20585)批准,涉及从杰克逊实验室购买或在IACUC 20697下在USC动物设施中饲养的8-13周龄NSG小鼠(雌性和雄性)。

[0309] 细胞因子和抗体

chLym-1、IL-7-Fc、IL-15-Fc和Dylight 650抗261tag抗体是在申请人的实验室中开发和制备的。使用的商业抗体是:Alexa 488羊抗人IgG(H+L)(ThermoFisher, CAT#A-11013),Alexa Fluor 647抗人IgG Fc(Biolegend, CAT#409320),藻红蛋白(PE)抗人磷酸化CD3 ζ (pY142)(BD Sciences, CAT#558448),PE小鼠抗人CD22(Biolegend, CAT#302506),PE小鼠抗人CD19(Biolegend, CAT#302254),PE小鼠抗人PD-1(Biolegend, CAT#329906),PE小鼠抗人LAG-3(Biolegend, CAT#369306)。

[0310] 试剂

用于进行这些研究的试剂包括:RPMI-1640 (Genesee Scientific, Lot#0519108)、DMEM (Genesee Scientific, Lot#05191016)、透析胎牛血清 (dFCS) (Hyclone, Cat#SH30079.03)、GlutaMAX (ThermoFisher, CAT#35050-061)、青霉素/链霉素 (Corning, CAT#30-002-CI)、非必需氨基酸 (Genesee Scientific, CAT#25-536)、Click's 培养基 (SIGMA, CAT#C5572-500ML)、*EcoRI* (NEB, CAT#R3101M)、*MluI* (NEB, CAT#R3198L)、psPAX2 (Addgene, CAT#12260)、pMD2.G (Addgene, CAT#12259)、Xfect (Clontech, CAT#631418)、Ficoll-Paque (Life Technologies, CAT#GE17-1440-02)、EasySep 人类T细胞分离试剂盒 (STEMCELL, CAT#19051)、D- (+)-海藻糖二水合物 (SIGMA, CAT#90210-50G)、Lentiblast (OZBiosciences, CAT#LB01500)、24孔G-Rex板 (Wilson Wolf, CAT#80240M)、免疫磁珠 (Dynabeads) 人T-激活剂CD3/CD28 (ThermoFisher, CAT#11131D)、ImmunoCult 人CD3/CD28/CD2 T细胞激活剂 (STEM CELL)、CAT#10970)、IL-2 ELISA 试剂盒 (ThermoFisher, CAT#EH2IL2)、GM-CSF ELISA 试剂盒 (ThermoFisher, CAT#EHGMCSF) 和INF- γ ELISA 试剂盒 (ThermoFisher, CAT#EHIFN)、细胞内染色透化洗涤缓冲液 (Biolegend, CAT#421002) 和FluoroFix 缓冲液 (Biolegend, CAT#422101)、Sytox Green (ThermoFisher, CAT#S7020)、CountBright 绝对计数珠子 (ThermoFisher, CAT#C36950)。

[0311] 细胞

Jurkat、K562、Daudi、Karpas-299、B35M、BALL-1、Chevallier 和 Raji 细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。SU-DHL-6 (Epstein AL et al, 1974, 1851-72 doi 10.1002/1097-0142 (1974)12:34:6<1851::aid-cnrcr2820340602>3.0.co;2-DHL-), 10 (1851-72 doi 10.1002/1097-0142 (1974)12:34:6<1851::aid-cnrcr2820340602>3.0.co;2-4) 和 NU-DHL-1 (Epstein AL et al, 6195-198 27 doi 10.1002/ijc.2910350509) 人淋巴瘤细胞系由申请人内部开发。Raji-eGFP/Luc 细胞是来自加州大学洛杉矶分校的 Yvonne Y. Chen 博士所赠送。所有淋巴瘤细胞系都在 RPMI-1640 中培养, 该 RPMI-1640 补充有 10% 透析胎牛血清 (dFCS)、1% GlutaMAX 和 1% 青霉素/链霉素。HEK-293 LTV 细胞 (Cell Biolabs, CAT# LTV-100) 在补充有 10% dFCS、1% GlutaMax、1% 非必需氨基酸和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中培养。原代人 T 细胞从人血沉棕黄层 (Zen-Bio、CAR#SER-BC-SDS) 中富集, 并在 T 细胞培养基 (43% Click's 培养基、43% RPMI-1640、10% dFCS、2% GlutaMAX、1% 非必需氨基酸、1% 青霉素/链霉素) 中培养, 补充有 50ng/mL IL-7-Fc 和 100ng/mL IL-15-Fc。使用 MycoFluor 支原体检测试剂盒 (ThermoFisher, CAT#M7006) 对所有使用的细胞系进行常规的支原体污染检测。

[0312] 人源化 Lym-1 结合研究

图21A、图21B和图23B: 浓度范围为0.013nM至1300nM的100 μ l 抗体与 20 万个 Raji 细胞在4 $^{\circ}$ C下培养30分钟, 然后用洗涤缓冲液 (PBS中的2%FBS) 洗涤 3 次。然后将结合的抗体与Alexa Fluor (AF) 488偶联的山羊抗人IgG (H+L) 二抗以 5ug/mL的浓度或与AF 647偶联的抗人IgG Fc 以5 μ l/样品培养30分钟。将细胞洗涤两次并进行流式细胞术分析。记录并绘制平均荧光强度 (MFI) 以评估抗体结合。对于图1c和3c中的染色, 将10 μ g 抗体与100 μ l 中的 20万个细胞在4 $^{\circ}$ C下培养30 分钟。如上所述洗涤后, 将5 μ l AF-647缀合的抗人IgG Fc加入洗涤缓冲液残留物中的细胞中以进行检测。使用Attune流式细胞仪 (ThermoFisher) 评估样

品并使用 Flowjo 软件(BD)进行分析。

[0313] 慢病毒载体构建与制备

CAR的编码基因由Integrated DNA Technologies (IDT) 合成,并通过*EcoRI*和*MluI*限制位点连接到慢病毒载体pLVX-EF1 α -IRES-ZsGreen(Clontech)中。对于所有CAR构建体,源自人胎盘生长因子的10个氨基酸表位“AVPPQQWALS”(261标签)直接插入scFv序列之后。慢病毒是通过按照先前描述的Xfect方案(Zheng L等人,2017,doi 10.3390/ijms18122773)瞬时转染 HEK-293LTV产生的。简而言之,将单独的转移载体与psPAX2和pMD2.G(摩尔比 2:1:1)混合并共转染至HEK-293LTV 细胞。在转染后24和48小时收集含有病毒颗粒的上清液,合并、过滤并通过 20000g的超速离心2小时浓缩。然后将沉淀的病毒重新悬浮在补充有1%BSA和7%海藻糖的PBS中,等分并储存在-80°C。通过用病毒载体的10倍系列稀释液转导 10^6 个Jurkat T细胞来测量病毒滴度。转导后48小时,洗涤Jurkat细胞并通过流式细胞术分析转基因表达。使用10~20%范围内的阳性转导细胞通过以下公式计算病毒转导单位(TU): $TU/mL = (10^6 \text{个接种细胞} \times \% \text{阳性细胞} \times 1000) / \mu\text{l病毒载体}$ 。

[0314] 原代 T 细胞分离、转导、扩增和分析

人血沉棕黄层制剂购自Zenbio Inc.,用于获得原代血液单核细胞(PBMC)以富集T细胞。根据制造商的方案,使用Ficoll-Paque分离PBMC,然后使用EasySep 人类T细胞分离试剂盒分离T细胞。然后在T细胞培养基中培养分离的细胞。在第 0 天,通过以 1:1 的比例添加Dynabeads人T-激活剂CD3/CD28来激活T细胞,并在第 3天通过使用慢病毒(MOI=10)和Lentiblast以1200g离心45分钟进行转导。转导进行一次,24小时后更换培养基,然后将细胞转移到补充有新鲜 T 细胞培养基的 24 孔 G-Rex板中。在第7天使用Dylight 650偶联的抗261tag抗体通过流式细胞术评估转导效率。对于再刺激,在第7天,在2ml T细胞培养基中加入20 μ l ImmunoCult 人 CD3/CD28/CD2 T细胞激活剂和100 万个T细胞,并在第9天加入5ml T细胞培养基。在第12天,去除沉淀细胞上方约5ml的培养基并加入5ml新鲜的T细胞培养基。在第14天,可以用和在第7天相同的程序进行额外的再刺激。使用ImmunoCult进行再刺激,因为在申请人的手中,dynabeads CD3/CD28 刺激物主要促进CD4+T细胞的扩增,而ImmunoCult人CD3/ CD28/CD2 T细胞激活剂导致CD4+和CD8+ T细胞的平衡扩增。对于所有细胞计数,使用Countess自动细胞计数器(Invitrogen)。在重新刺激前的第7天和第14天,评估了空白或CAR T细胞上的PD-1 和LAG-3表达。将50万个细胞与Dylight 650偶联的抗261tag 抗体和PE偶联的抗人PD-1或抗LAG-3共培养。然后对标记的细胞进行流动分析。“空白T细胞”是指通过上述程序进行的除了在第3天的转导步骤中不添加病毒外的T细胞。

[0315] 细胞毒性测试

基于发光的细胞毒性测定:第9天的CAR T细胞(第 7 天未重新刺激)通过添加空白T细胞调整至50%阳性CAR T细胞。这些调整后的制剂与10万个靶细胞在不添加细胞因子的情况下,以不同比例的CAR T细胞在平底96孔板中孵育24小时。来自没有效应细胞的靶细胞的发光读数用作对照。使用20万个靶细胞的两倍系列稀释来生成标准曲线,以将活细胞与发光读数相关联。通过将发光信号读数与标准曲线相关联来计算孵育24小时后的活靶细胞数。细胞裂解百分比由下式计算:

$$\text{裂解}\% = \left(\frac{\text{对照中的}\#Raji - \text{效应子中的}\#Raji}{\text{对照中的}\#Raji} \right) \times 100\%。$$

[0316] 基于流式细胞术的细胞毒性测定:将 2×10^5 个CAR T细胞与靶细胞以1:1的比例在24孔板中培养。记录混合后1小时和48小时的活靶细胞百分比并用于通过以下公式计算裂解百分比:

$$\text{裂解}\% = \left(\frac{1 \text{ 小时活靶细胞百分比} - 48 \text{ 小时活靶细胞百分比}}{1 \text{ 小时活靶细胞百分比}} \right) \times 100\%。$$

[0317] 细胞因子分泌实验

来自第9天的、在第7天未重新刺激的空白或CAR T细胞,用于细胞因子分泌测定。 2×10^5 个效应细胞和靶细胞在不添加细胞因子的情况下以1:1的比例在96孔板中共培养24小时。收集上清液并按照制造商的说明进行酶联免疫吸附测定(ELISA)测量。

[0318] CD3-ζ磷酸化检测

50万个来自第9天的空白或CAR T细胞(第7天未受刺激)被固定,然后用2μg Dylight偶联的抗261标签抗体染色。按照制造商的说明对标记的细胞进行透化。然后将透化细胞用PE偶联的抗人磷酸化CD3ζ抗体染色,每个样品5μl。洗涤样品并进行流式细胞术分析。

[0319] 抗原下调实验

离体实验:来自第9天的、在第7天未重新刺激的空白细胞或CAR T细胞,用于该测定。肿瘤细胞(4×10^5)与 2×10^5 CAR T细胞以1:2的E:T比率在2ml没有细胞因子补充的T细胞培养基中共培养24小时。收集了100 μl含有细胞的培养基并用CD22、Lym-1、CD19和Sytox Green进行染色。对于Raji-eGFP/Luc,不使用CD22,而是使用GFP来识别肿瘤细胞。在室温下培养20分钟后,将400 μl PBS和25 μl计数珠加入每个管中。然后对样品进行流式细胞术分析。平均荧光强度由Flowjo软件量化。

[0320] *NOD Scid-IL2R^{gammanull}* (NSG)小鼠的Raji/Luc-eGFP异种移植研究

通过侧尾静脉注射100 μl PBS中的100万个Raji/Luc-GFP细胞(指定为第0天)。在第6天通过生物发光成像(BLI)测量荧光素酶活性以评估肿瘤负荷。在同一天,在100 μl PBS中制备了500万个空白T或CAR T细胞并使用胰岛素注射器静脉注射。使用USC分子影像中心(Molecular Imaging Center)的Xenogen IVIS 200或USC转化研究实验室(Translational Research Laboratory)的IVIS Lumina Series III在指定天数通过生物发光监测肿瘤进展。小鼠用汽化异氟醚麻醉,并在成像前通过腹腔注射给予D-荧光素(50mg/kg)。在一些实验中,如图例中所述,第一次BLI测量在第7天进行,然后在第8天注射不同数量的空白或CAR T细胞。在所有研究中,空白或CAR T细胞从第9天开始(在第7天无再刺激)被使用,后腿麻痹被用作安乐死的终点。生存数据由Kaplan-Meier图显示并通过对数秩检验进行分析。

[0321] 统计分析

使用GraphPad Prism软件绘制图形。使用SPSS软件(IBM)分析数据。统计分析方法在图例中指出。除非另有说明,否则数据表示为平均值±标准差, $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0322] 结果**人源化Lym-1抗体的选择**

申请人证明了Lym-1-B-BB3z CAR T细胞在患有播散性Raji肿瘤的小鼠中诱导完全缓解(Zheng L et al, 2017, doi 10.3390/ijms18122773)。由于这些有希望的结果,进行抗体人源化以降低Lym-1 ScFv在用于未来患者研究的CAR T细胞中的潜在免疫原性。人源化外包给Oak BioScience并向我们提供了一组12种人源化抗体(图 21A)。通过流式细胞术测量这些抗体对Raji细胞的结合能力,并选择在每个测试浓度显示最高结合的huLym-1-B抗体用于CAR T细胞的开发(图 21A)。而后申请人使用瞬时表达和内部提供的序列产生huLym-1-B抗体以帮助这些评估。与chLym-1相比,huLym-1-B与Raji细胞结合,MFI降低,ED50高约2倍(图21B)。类似于其与Raji 细胞的结合,huLym-1-B在大多数Lym-1阳性细胞系中显示出比chLym-1略低的MFI(图 21C)。chLym-1和huLym-1-B均不结合K562细胞,表明huLym-1-B保留了与亲本 Lym-1抗体相似的特异性(图 21C)。

[0323] huLym-1-BB3zCAR T细胞功能强大,但扩增受损

为了生成针对Lym-1表位的CAR,将源自Lym-1或 huLym-1-B的ScFv融合到具有4-1BB和CD3 ζ 信号结构域的常规第二代CAR框架(图22A)。将源自人胎盘生长因子的10个氨基酸表位“AVPPQQWALS”(261标签)插入ScFv和CD8a铰链之间,以使用内部抗体(Dylight 650 共轭抗261标签抗体)进行CAR检测(图22A)。两种构建体均以相当的转导效率在人原代T细胞中成功表达(图22C)。申请人接下来评估了Lym-1-和huLym-1-B-BB3z CAR T在Lym-1 阴性 K562-eGFP/Luc 和 Lym-1 阳性 Raji-eGFP/Luc 细胞系中的表位特异性细胞毒性。表达 Lym-1-或 huLym-1-B-BB3z CAR T的T细胞在共培养过夜后有效裂解Raji,而与K562细胞共培养时未观察到细胞毒性增加,表明两种CAR T细胞的表位特异性细胞毒性(图22D)。此外,剂量为500万的Lym-1-和huLym-1-B-BB3z CAR T细胞在NSG小鼠中根除播散性Raji-eGFP/Luc肿瘤并导致无肿瘤存活至少60天(图13)。然而,响应于 α -CD2/CD3/CD28刺激,Lym-1-和 huLym-1-B-BB3z CAR T 细胞表现出受损的扩增(图 22E)。从第7-14天起,空白T细胞增加了大约 30 倍,而Lym-1-和huLym-1-B-BB3z CAR T细胞的平均增加不到4倍(图 22E)。此外,在Lym-1-和 huLym-1-B-BB3z CAR阳性细胞中观察到 CD3 ζ 磷酸化增加,但在同一制剂中未转导的 T 细胞中未观察到,表明CAR转导细胞的活化较弱(图 22F、图 22G)。与这些结果一致,huLym-1-B-BB3z CAR阳性T细胞也表现出增加的PD-1和LAG-3表达(图 22H、图22I)。CAR T细胞中增强的CD3 ζ 磷酸化和抑制性受体表达表明增殖受损是由基础水平激活(即强直信号)增加引起的。尽管huLym-1-B-BB3z CAR T细胞在体外和体内表现出很强的活性,但有限的增殖将挑战临床应用huLym-1-B-BB3z CAR T细胞的生产,因为需要广泛的离体扩增才能产生最佳治疗剂量。

[0324] huLym-1-B-BB3z CAR T细胞的离体扩增受损是抗原依赖性的

在申请人实验室中产生的由FMC63 ScFv组成的CD19-BB3z CAR T细胞(一种具有与 huLym-1-B-BB3z相同的CAR框架的构建体),未显示huLym-1-B-BB3z CAR T细胞制剂所见的受损扩增(Zheng L et al, 2017, doi 10.3390/ijms18122773)。这种差异表明原因与huLym-1-B ScFv相关。Lym-1识别HLA-DR的几种亚型中的构象表位(Rose LM et al, 1999, 789-97),但尚未报道Lym-1与人类T细胞的结合。申请人假设之前未报告的活化T细胞上稀疏的Lym-1表位表达可能足以诱导配体依赖性强直信号或导致 CAR介导的自相残

杀,这两种情况中的任何一种都可能导致 huLym-1-B-BB3z CAR T细胞的扩增受损。为了检验该假设,仔细评估了Lym-1和huLym-1-B与活化T细胞的结合,并检测到少量但真实的结合量(图 23C)。为了进一步检验这一假设,生成了两个 CAR 构建体。在一个构建体中,两个点突变被引入可变重链的CDR3区以破坏huLym-1-B的结合能力并构建huLym-1-Bmut-BB3z CAR(图23A)。还生产了在CDR3中具有两个突变(huLym-1-Bmut)的huLym-1-B抗体版本。当针对Raji细胞进行测量时,huLym-1-Bmut的ED50比huLym-1-B高大约 25 倍(ED50, 1.4×10^{-7} 对比 5.9×10^{-9} ,图23B)并且与同种型相比没有显示与T细胞的结合增强(图23C)。尽管在约5%的huLym-1-Bmut-BB3z CAR T细胞中发现 CD3 ζ 磷酸化并且PD-1和LAG-3在第7天被瞬时上调(图23E-23G),但huLym-1-Bmut-BB3z CAR T细胞制剂没有表现出受损的扩增,表明受损需要表位识别(图23G)。

[0325] 为了确定是否需要CAR信号传导来削弱扩增,产生了第二个构建体huLym-1-B-BB3zY-F,其中CAR-CD3 ζ 结构域的三个ITAM中的所有6个酪氨酸都被转化为苯丙氨酸(图23A)。HuLym-1-B-BB3zY-F CAR T细胞既没有增加CD3 ζ 磷酸化,也没有增加 PD-1和LAG-3上调,并且与空白T细胞一样有效地扩增,表明受损需要涉及 CAR-CD3 ζ 的信号传导(图23G)。

[0326] 申请人接下来研究了自相残杀是否是huLym-1-B-BB3z CAR T细胞扩增减弱的重要原因。申请人发现huLym-1-B-BB3z CAR T细胞在相同制剂中表现出比CAR阴性群体(~10%)显著增强的自发凋亡(~56%)(图14A);此外,当CD19-BB3z CAR T细胞与huLym-1-B-BB3z CAR T细胞共培养过夜时,申请人没有观察到CD19-BB3z CAR T细胞的凋亡显著增加(图14B)。综上所述,这些结果支持了这样一种假设,即huLym-1-B-BB3zCAR-T细胞离体增殖受损的主要原因是配体依赖性CAR强直信号,而不是自相残杀。

[0327] 用DAP替代BB3z实现huLym-1-B CAR T细胞的高效离体扩增

接下来,申请人使用DAP信号传导结构域来构建huLym-1-B-DAP CAR(图24A、图24B)。HuLym-1-B-DAP CAR以与huLym-1-BB3z CAR相当的转导效率在人原代T细胞上成功表达(图24D)。重要的是,huLym-1-B-DAP CAR T细胞的离体扩增未受损(图24C)。此外,与huLym-1-B-BB3z CAR T细胞相比,huLym-1-B-DAPCAR T 细胞在培养中没有表现出增强的自发性膜联蛋白V染色(图14A),并且在与Raji细胞一起培养时表现出较少的AICD(图15)。申请人发现约10%的 huLym-1-B-DAP CAR T细胞显示CD3 ζ 磷酸化,而 huLym-1-B-BB3z CAR 中平均约30%(图 24D,图 24E)。与 huLym-1-B-DAP CAR T细胞中CD3 ζ 磷酸化的基础水平一致,在第14天,PD-1 和 LAG-3表达也高于空白T细胞,但显著低于huLym-1-B-BB3z CAR T 细胞(图24F、图24G)。总之,这些数据表明huLym-1-B-DAP CAR T细胞的强直信号减弱和正常扩增。

[0328] huLym-1-B-DAPCAR T细胞在体外和体内都具有高度功能

为了在体外评估huLym-1-B-DAP CAR T细胞的效应子功能,评估了响应于Lym-1表位阴性(K562)和阳性(Raji)细胞系的细胞毒性和细胞因子释放。HuLym-1-B-DAP CAR T细胞与增加的效应物与靶标比例成比例地裂解Raji细胞,在过夜共培养后以2:1的比例达到约80%的杀伤(图25A)。当K562细胞用作靶细胞时,没有明显增强的细胞毒性(图25A)。与这些发现一致,huLym-1-B-DAP CAR T细胞在与Raji 而不是 K562 细胞共培养时也分泌多种细胞因子(图 25B)。此外,申请人评估了 huLym-1-B-DAP CAR T细胞针对一组具有可变Lym-1表位表达的人淋巴瘤和白血病 B 细胞系的功能。尽管细胞因子释放高度可变,但

huLym-1-B-DAP CAR T 细胞表现出相同的细胞毒性(图 16)。这些数据表明 huLym-1-B-DAP CAR T 细胞保留了亲本 Lym-1 抗体的这种特异性。

[0329] 申请人接下来测试了huLym-1-B-DAP CAR T细胞在NSG小鼠中对抗播散性Raji肿瘤的体内抗肿瘤功效。为了更好地揭示 DAP 信号传导结构域赋予的改进功能,仅注射了100 万个 CAR T 细胞而不是 500 万个细胞,并在注射 Raji 细胞后第 8 天而不是第 6 天进行了增加肿瘤负荷挑战治疗。使用该修改后的方案,一百万个huLym-1-B-BB3z CAR T 细胞无法消除 Raji 肿瘤,所有小鼠在第 51 天死于肿瘤进展(图 25F、图 25E、图 25F)。相比之下,用一百万个 huLym-1-B-DAP CAR T 细胞治疗导致持久的肿瘤控制和显著更好的存活率(图 25F)。

[0330] *Lym-1*表位在与 huLym-1-B-DAP CAR 结合后不会快速下调

在通过靶向 CD19(CD19CAR)的CAR T细胞治疗 B 细胞恶性肿瘤时经常观察到复发,这种下调代表了一种能够对 CD19CAR 疗法产生抗性的重要机制(Majzner RG et al, 2018, 1219-26 doi 10.1158/2159-8290.cd-18-0442)。补偿抗原逃逸的一种策略是使用组合靶向,例如目前正在临床研究的靶向 CD22(Fry TJ et al, 2018, 20-8 doi 10.1038/nm.4441)。或者,针对不易下调的抗原的CAR T细胞可以减少抗原逃逸并提高治疗效果。为了确定huLym-1-B-DAP CAR T细胞是否促进Lym-1表位的下调,申请人将 Raji细胞与空白、huLym-1-B-DAP CAR或CD19-BB3z CAR T细胞共培养。在 24 小时内,huLym-1-B-DAP CAR 和 CD19-BB3z CAR T细胞均抑制Raji细胞生长(图 26C、图 26D)。然而,当Raji与CD19-BB3z CAR T细胞共培养时,存在明显的CD19抗原下调,而当与huLym-1-B-DAP CAR T细胞共培养时,CD19 和 Lym-1表位均未明显下调(图26A、图26B)。从一组人B淋巴瘤细胞系中获得了类似的结果(图17)。为了确定这种差异是否是由于使用DAP信号域而不是BB3z域造成的,生产了CD19-DAP CAR T细胞并与Raji共培养。Raji细胞上CD19抗原的下调仍然发生(图18)。相比之下,当Raji细胞与 huLym-1-B-BB3z 或 huLym-1-B-DAP CAR T 细胞共培养时,未在Raji细胞上观察到显著的 Lym-1 表位下调(图 18)。这些结果表明,目标下调归因于抗原的特性,而不是CAR构建体的信号结构域。

[0331] 为了评估体内表位下调,在从接受CAR T细胞治疗的小鼠的骨髓获得的Raji细胞上测量CD19和Lym-1表位表达。如离体中所见,当用CD19-BB3z CAR处理携带Raji细胞的NSG小鼠时,也注意到Raji细胞中显著的CD19抗原下调(图26B)。重要的是,在 huLym-1-B-DAP CAR T 细胞处理期间,Lym-1 表位和 CD19 抗原均未下调(图 26B)。huLym-1-B-DAP、CD19-BB3z 和CD19-DAP CAR T细胞在携带播散性Raji的 NSG 小鼠中的体内抗肿瘤功效在也在以下方案中得到表征,其中第0天静脉注射了 10^6 个Raji 细胞然后在第8天使用不同剂量的空白或CAR T细胞。一剂200万个huLym-1-B-DAP CAR T细胞治疗导致无肿瘤存活至少90天(图 19B、图 19C)。相比之下,在用CD19-BB3z或CD19-DAP CAR T细胞治疗的大多数NSG小鼠中存在高肿瘤负荷并且所有小鼠在200万个细胞的剂量下在第79天死亡(图19B、图 19C)。此外,在该实验模型中,将CD19 CAR T细胞剂量增加至500万个细胞仍然未能实现无肿瘤存活(图19B、图19C)。总之,未发现 Lym-1 表位在 huLym-1-B-DAP CAR T 细胞治疗的压力下下调,这一特征可能有助于 huLym-1-DAP CAR T 细胞在体内功效优于CD19-CAR T 细胞。

[0332] 讨论

CD19 CAR T细胞的临床试验证明了使用这种细胞治疗方式治疗复发性和耐药性B细胞恶性肿瘤的前景。尽管初始完全缓解率很高,但仍有很大一部分接受治疗的患者会因CD19阴性或CD19低的肿瘤复发(Majzner RG et al., (2018), 1219-26 doi 10.1158/2159-8290.cd-18-0442),表明需要确定额外的有效目标。在此,申请人描述了针对在大多数B细胞淋巴瘤和白血病中高度表达的Lym-1表位的工程化CAR T细胞的设计和开发(DeNardo GL et al., (1998), 239-54 doi 10.1089/cbr.1998.13.239; DeNardo GL et al., (1999), 1-11 doi 10.1089/hyb.1999.18.1)。通过用DAP替代传统的4-1BB ζ 信号结构域,申请人能够避免由huLym-1-B-CAR和Lym-1表位在T细胞上的持续相互作用(强直信号)诱导的huLym-1-B-CAR T细胞的离体增殖受损。此外,huLym-1-B-DAP CAR T细胞表现出表位驱动的效应子功能,这可以通过增加体外细胞毒性、细胞因子释放以及有效的体内肿瘤控制来证明,即使CAR T细胞剂量减少。此外,在huLym-1-B-DAP CAR T细胞存在的情况下,B细胞系上的Lym-1表位和CD19抗原均未下调。这些发现表明huLym-1-B-DAP CAR T细胞似乎是一种有希望在临床上探索的细胞治疗产品。

[0333] 在这些研究过程中,申请人观察到靶向Lym-1表位的hLym-1-B-BB3 ζ CAR T细胞的扩增受损,但这种有限的扩增在具有残缺的结合能力或消融的CD3 ζ 活性的huLym-1-B-BB3 ζ CAR T细胞中没有被发现。这些数据表明,有限的扩增是由huLym-1-B-BB3 ζ CAR构建体中CD3 ζ ITAM信号传导部分的配体依赖性激活介导的。这一观察结果与之前的第二代CAR的报告一致,CD28共刺激域重定向到GD2(Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838)和ErbB2(Zhao Y et al., (2009), 5563-74 doi 10.4049/jimmunol.0900447),其中有限的扩增、激活诱导的细胞死亡(AICD)、渐进性衰竭和体内疗效不佳归因于不受约束的CAR-CD3 ζ 激活。在这两种情况下,用来自4-1BB的信号域替换CD28共刺激域减轻了慢性CAR-CD3 ζ 信号通过不完全了解的机制引起的不利影响。然而,在申请人手中,4-1BB共刺激结构域仍然导致huLym-1-B-BB3 ζ CAR T细胞体外扩增不良的制剂。

[0334] Combadiere等人(Combadiere B et al., (1996), 2109-17)首先记录了ITAM的定性不同功能,他们报道CD3 ζ 中第一个和第三个ITAM的磷酸化比T细胞中第二个ITAM的磷酸化刺激了更大的细胞凋亡。与这一观察结果一致,在鼠B细胞淋巴瘤模型中,Kochenderfer等人证明了具有突变的第一个和第三个CAR-CD3 ζ ITAM抗鼠CD19 CAR T细胞对细胞凋亡具有抗性,并且可以比具有3个功能性ITAM的CD19CAR更好地介导抗淋巴瘤功效(Kochenderfer JN et al., (2010), 3875-86 doi 10.1182/blood-2010-01-265041)。Feucht等人最近的一项研究(Feucht J et al., (2018), doi 10.1038/s41591-018-0290-5)发现消融CD19CAR的CD3 ζ 部分中第二个和第三个ITAM的功能导致优先中枢记忆分化,减少T细胞耗竭,并增加体内持久性。这些数据表明,每个ITAM在性质上都不同,并且CAR信号域中ITAM的选择是控制CAR T细胞命运的一种方法。

[0335] 来自其他的证据(Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838; Zhao Y et al., (2009), 5563-74 doi 10.4049/jimmunol.0900447)和本报告支持了以下假设,即慢性次优CAR-CD3 ζ ITAM的激活是CAR T细胞表型异常的原因。因此,申请人试图通过使用其他含有ITAM的基序来替代CAR-CD3 ζ 部分同时保留T细胞活化潜力来减轻这些不利影响。申请人选择DAP12是因为它在细胞内结构域中同时具有ITIM和ITAM基序,可提

供不同的信号输出以响应不同强度的刺激(Peng Q et al., (2010), ra38 doi 10.1126/scisignal.2000500)。DAP12在细胞外区域没有识别域。其相关受体如KIR2DS2 (Wang E et al., (2015), 815-26 doi 10.1158/2326-6066.cir-15-0054)、TREM1 (Chen B et al., (2019), 1043-55 doi 10.2217/imt-2019-0017)和 NKp44 (Campbell KS et al., (2004), 899-906)负责目标识别和细胞溶解重定向。Teng等人(Teng MW et al., (2005), 38235-41 doi 10.1074/jbc.M505331200)和Wang等人(Wang E et al., (2015), 815-26 doi 10.1158/2326-6066.cir-15-0054)证明了DAP12与其相关的scFv修饰受体在鼠或人T细胞中的异位共表达以抗原特异性方式介导肿瘤根除,表明DAP12的激活足以驱动T细胞的细胞毒性。最近的一篇使用scFv修饰的TREM1作为DAP12的共同受体的论文也证明了相同的概念(Chen B et al., (2019), 1043-55 doi 10.2217/imt-2019-0017)。在申请人的CAR构建体设计中,申请人没有使用多链格式,而是直接用DAP12替换 CD3 ζ 信号域并使用DAP10作为协同刺激。由此产生的 huLym-1-B-DAP CAR 解决了在 huLym-1-B-BB3z 中出现的体外扩增问题,最重要的是,huLym-1-B-DAP CAR 介导的体内功效明显优于huLym-1-B-BB3z CAR,尽管两者在体外表现出相同的细胞毒性(图25)。这些结果进一步支持了体外细胞毒性不足以反映体内功效的发现(Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838)并强调了信号结构域对CAR T细胞体内功能的影响。

[0336] 申请人的结果表明,与CD19不同,Lym-1表位在CAR接合时不会迅速下调。尽管CAR T细胞吞噬作用可能在抗原下调中发挥作用(Hamieh M et al., (2019), 112-6 doi 10.1038/s41586-019-1054-1),但是当与 huLym-1-DAP CAR T 细胞共培养时,申请人在一组人 B 淋巴瘤细胞系中没有观察到等效的 Lym-1 表位下调,表明快速CD19抗原下调可能涉及其他机制(图 26;图 18)。与抗CD19抗体交联可以通过受体介导的内吞作用诱导 CD19 抗原下调(Ingle GS et al., (2008), 46-58 doi 10.1111/j.1365-2141.2007.06883.x),表明CD19CAR和CD19抗原相互作用可能有助于表面CD19抗原下调。尽管在 CD19CAR T 细胞压力下肿瘤细胞中的CD19下调是一个可逆过程(Schneider D et al., (2017), 42 doi 10.1186/s40425-017-0246-1),但瞬时抗原下调可能会减少CD19CAR T 细胞抗肿瘤功效并促进肿瘤免疫逃逸(Hamieh M et al., (2019), 112-6 doi 10.1038/s41586-019-1054-1)。与这一假设一致,CD19-BB3z和CD19-DAP CAR在修改后的动物实验方案中均无法在高达500万的剂量下诱导无肿瘤存活,而 huLym-1-B-DAP CAR T细胞在200万个细胞的较低剂量下介导了快速和持续的肿瘤控制导致无肿瘤存活(图19B、图19C)。有趣的是,在100万细胞剂量水平下,CD19-DAP CAR治疗诱导的存活率明显优于CD19-BB3z(图19D),尽管两种CAR在较高细胞剂量(200万和500万)下表现出相同的功效(图19B、图19C)。值得注意的是,无论CAR T细胞剂量如何,在CD19-DAP CAR中第41天之前均未观察到后腿麻痹(图 19)。相比之下,在CD19-BB3z CAR治疗的小鼠中反复观察到后腿麻痹的早期发展(在第20-30天之间)(图19)。这种差异的潜在机制和意义仍有待研究。

[0337] 总之,申请人的工作表明huLym-1-B-DAP CAR T细胞有望治疗Lym-1阳性B细胞淋巴瘤。DAP信号域的观察可以在基于 CD3 ζ 的CAR中规避由配体依赖性信号诱导的增殖受损,同时保持等效或更高的抗肿瘤功效,突出了刺激域选择对 CAR 设计的重要性,并确定了新的CAR结构格式以解决强直信号诱导对 T 细胞的不利影响。此外,即使没有弱强直信号的证据,DAP信号域也可以改善其他CAR T细胞制剂的功能。最后,申请人的报告表明,靶向在

CAR 参与时不会迅速下调的表位也可能有助于持续的 CAR T 细胞功效。

[0338] 实施方案

以下实施方案具体地描述了本发明公开的各个方面。

[0339] 一种抗体,包括:

a. 重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列,包含SEQ ID NO:2 或 6中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物;和/或

b. 轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,包含SEQ ID NO:4或8中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物。

[0340] 如本文所述的抗体,其中重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 并且轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 4,或其每一个的等效物。

[0341] 如本文所述的抗体,其中重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 2并且轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 8,或其每一个的等效物。

[0342] 如本文所述的抗体,其中重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 6并且轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 4,或其每一个的等效物。

[0343] 如本文所述的抗体,其中重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 6并且轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 8,或其每一个的等效物。

[0344] 一种抗体,包括:

a.重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其等效物;和/或

b.轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或其等效物。

[0345] 如本文所述的抗体,其中所述抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。

[0346] 如本文所述的抗体,其中所述抗体包含恒定区。

[0347] 如本文所述的抗体,其中恒定区包含IgA、IgD、IgE、IgG或IgM恒定区。

[0348] 如本文所述的抗体,其中恒定区是IgG1恒定区或Igκ恒定区。

[0349] 与如本文所述的抗体竞争性结合的抗体。

[0350] 如本文所述的抗体,其中所述抗体是多克隆、单克隆或人源化抗体。

[0351] 如本文所述的抗体,其中等效物包含与多肽具有至少80%氨基酸同一性的多肽,或由在高度严格的条件下与编码该多肽的多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸编码的多肽。

[0352] 如本文所述的抗体的抗原结合片段。

[0353] 如本文所述的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv和Fv。

[0354] 一种多肽,包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10或12中任一项的氨基酸序列或其每一个的等效物。

[0355] 一种嵌合抗原受体(CAR),包括:(a)所述抗体的抗原结合域,(b)铰链结构域,(c)

跨膜结构域,和(d)细胞内信号传导结构域或DAP结构域。

[0356] 嵌合抗原受体(CAR),包含:(a)抗体的抗原结合结构域,(b)铰链结构域,(c)跨膜结构域,和(d)细胞内 DAP 10和/或DAP 12结构域。一方面,(d)包含细胞内DAP 10和DAP 12结构域。在另一方面,抗体选自抗-Lym1、抗-Lym2或抗-CD19抗体。在另一方面,抗原结合结构域包含位于抗体的HC可变结构域和LC可变结构域之间的接头多肽,例如序列(GGGGS)_n的多肽,其中n是1至6的整数。CAR还可包含位于(a)至(d)之间的接头多肽。

[0357] 如本文所述的CAR,进一步包含位于抗体的抗原结合结构域的胺末端的信号多肽。

[0358] 如本文所述的CAR,进一步包含一个或多个共刺激信号传导区域。

[0359] 如本文所述的CAR,其中所述铰链结构域包含CD8 α 或IgG1铰链结构域,所述跨膜结构域包含CD 28或CD8 α 跨膜结构域,一个或多个共刺激信号区传导选自CD27、CD28、4-1BB(CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、CD27、LIGHT、NKG2C和B7-H3;及所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域。

[0360] 如本文所述的CAR,进一步包含位于所述HC可变结构域和所述LC可变结构域之间的接头多肽。

[0361] 如本文所述的CAR,其中所述DAP结构域是DAP10和/或DAP12。

[0362] 如本文所述的CAR,进一步包含插入在所述HC和所述LC可变结构域之后的肽AVPPQQWALS。

[0363] 如本文所述的抗体或如本文所述的CAR,进一步包含可检测标记或纯化标记。

[0364] 一种分离的核酸序列,其中所述核酸序列包含选自本文公开的序列中的任一个的序列或其每一个的等效物,并且任选地与启动子和/或增强子元件可操作地连接。

[0365] 一种编码如本文所述的抗体或CAR的分离的核酸序列。

[0366] 如本文所述的分离的核酸序列,进一步包含位于抗体的抗原结合结构域上游的信号肽多核苷酸序列。

[0367] 如本文所述的分离的核酸序列,其中所述编码CAR的分离的核酸进一步包含位于抗体的抗原结合结构域或增强子上游的Kozak共有多核苷酸序列。

[0368] 如本文所述的分离的核酸序列,其中编码所述CAR的分离的核酸进一步包含编码位于所述抗体的所述抗原结合结构域上游的2A自切割肽(T2A)的多核苷酸序列。

[0369] 如本文所述的分离的核酸序列,其中编码CAR的分离的核酸进一步包含编码抗生素抗性的多核苷酸序列。

[0370] 如本文所述的分离的核酸序列,其中编码CAR的分离的核酸进一步包含用于控制CAR的表达和/或活化的开关机制。

[0371] 一种包含如本文所述的分离的核酸序列的载体。

[0372] 如本文所述的载体,其中所述载体是质粒或病毒载体。

[0373] 如本文所述的载体,其中所述载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0374] 如本文所述的载体,其中该载体是CRISPR载体。

[0375] 一种分离的细胞,其包含本文所述的抗体和/或CAR和/或分离的核酸和/或载体。在一方面,分离的细胞是免疫细胞,例如。

[0376] 一种组合物,其包含载体和本文所述的抗体和/或抗原结合片段、和/或多肽和/或

CAR和/或分离的核酸和/或载体和/或分离的细胞中的一种或多种。

[0377] 一种产生如本文所述的抗体的方法,包括培养如本文所述的分离的细胞,其中所述分离的细胞任选地是哺乳动物细胞。

[0378] 一种产生抗-Lym CAR表达细胞的方法,包括:将编码如本文所述的表达抗-Lym的CAR的核酸序列引入免疫细胞群;并选择已成功转导所述核酸序列的免疫细胞亚群。在一方面,免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一方面,免疫细胞群已被修饰以减少或消除内源性免疫细胞受体的表达,例如,其中免疫细胞群使用采用RNA干扰或CRISPR的方法进行修饰。

[0379] 在有需要的对象中抑制肿瘤生长和/或治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括向对象施用有效量的根据如本文公开的方法产生的CAR表达细胞、有效量的如本文所述的抗体、有效量的如本文所述的抗原结合片段和/或有效量的如本文所述的多肽中的一种或多种。这些方法可以与传统疗法如肿瘤切除术或传统化疗相结合。

[0380] 在有需要的对象中抑制肿瘤生长和/或治疗癌症和/或预防癌症复发的方法,包括向所述对象施用有效量的根据如本文所述的方法产生的表达CAR的细胞、有效量的如本文所述的抗体、有效量的如本文所述的抗原结合片段和/或有效量的如本文所述的多肽中的一种或多种,其与抗癌治疗剂,检查点抑制剂、调节性T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)、氟尿嘧啶(5-FU)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、IL-12 治疗、CpG (TLR9 激动剂)和/或干扰素基因刺激剂(STING)通路激动剂组合。

[0381] 如本文所述的方法,其中表达所述CAR的细胞对于被治疗对象是自体同源的或同种异体的,并且任选地是一线、二线、三线、四线或五线疗法。在一方面,其中所述肿瘤或癌细胞表达或过表达CD 19、Lym1和/或Lym2。在另一方面,所述癌症或肿瘤选自癌、肉瘤或白血病。在另一方面,所述肿瘤或癌症是B细胞淋巴瘤或白血病。在另一方面,所述肿瘤是实体瘤。在另一方面,所述实体瘤是黑素瘤、结肠癌、乳腺癌和/或脑肿瘤。在另一方面,所述对象是人、动物、非人灵长类动物、狗、猫、绵羊、小鼠、马或牛。在另一方面,该方法还包括向对象施用除CAR疗法之外的抗肿瘤疗法。

[0382] 一种抑制癌细胞或癌症干细胞增殖的方法,包括使细胞与有效量的根据本文所述的方法产生的表达CAR的细胞、有效量的如本文所述的抗体、有效量的如本文所述的抗原结合片段、和/或有效量的如本文所述的多肽接触。

[0383] 一种确定对象是可能对治疗有反应还是不太可能对治疗有反应的方法,包括使从患者分离的样品与如本文所述的抗体、如本文所述的抗原结合片段和/或如本文所述的多肽接触,并检测所述样品中的抗体-细胞复合物、抗原结合片段-细胞复合物和/或多肽-细胞复合物,其中复合物的存在表明对象可能对治疗有反应,而复合物的不存在表示对象不太可能对治疗有反应。在一方面,抗体、抗原结合片段和/或多肽被可检测地标记。

[0384] 如本文所述的方法,还包括将有效量的如本文所述的抗体或如本文所述的CAR中的一种或多种施用给确定可能对治疗有反应的对象。该疗法是一线、二线、三线、四线或五线疗法。

[0385] 一种用于监测对象中的治疗的方法,包括使从对象分离的样品与如本文所述的抗体或其如本文所述的抗原结合片段接触,并检测样品中的抗体-细胞复合物。当抗体是抗-Lym抗体时,所述方法为在施用有效量的如本文所述产生的抗-Lym CAR表达细胞、有效量的如本文所述的抗体、有效量的如本文所述的抗原结合片段、和/或有效量的如本文所述的多

肽中的一种或多种之前和/或之后进行。在一方面,其中所述抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。在另一方面,所述样品包括痰、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水、血液或组织中的一种或多种。

[0386] 一种试剂盒,其包含如本文所述的抗体、如本文所述的CAR、如本文所述的抗原结合片段、如本文所述的多肽、如本文所述的分离的核酸、如本文所述的载体、如本文所述的分离的细胞和/或如本文所述的组合物中的一种或多种和使用说明。使用说明提供了进行本文所述方法的指导。

[0387] 等效物

除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0388] 本文示例性描述的本技术可在不存在本文未具体公开的任何要素、限制的情况下适当地实施。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“含有”等应被广泛地而非限制地解读。此外,本文中使用的术语和表达已被用作描述性而非限制性的术语,并且在使用此类术语和表达时无意排除所示和描述的特征或其部分的任何等效物,但应认识到,在要求保护的本技术的范围内可以进行各种修改。

[0389] 因此,应当理解,这里提供的材料、方法和实施例代表优选方面的,是示例性的,并不旨在限制本技术的范围。

[0390] 本技术已在本文中广泛且一般地进行了描述。一般公开内容的每个较窄的种类和亚一般分组也属于构成本技术的一部分。这包括本技术的一般性描述,带有从属中去除任何主题的附带条件或否定限制,无论此处是否具体引用了切除的材料。

[0391] 此外,在根据马库什组描述本技术的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到本技术也由此根据马库什组的任何个体成员或成员子组来描述。

[0392] 在此提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用明确地整体并入,其程度与每个单独通过引用并入一样。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0393] 其他方面在以下权利要求中阐述。

[0394] 序列表

SEQ ID NO: 1 huLym-1-A VH

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGACTTGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCCAGCGGCTTTAGCCTGACATCTTATGGCGTGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGCTGGT
GGTCATTTGGAGCGACGGCAGCACCACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACAGCA
AGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCCACTACGGC
TCTACCCTGGCCTTTGCTTCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGC

SEQ ID NO: 2 huLym-1-A VH氨基酸

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLSYGVHWVRQAPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHYGSTLAFASWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 3 huLym-1-A VL

GATATTGTGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTCCTGGACAGAGAGTGACCATCAGCTGC
AGAGCCAGCGTGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGACAGGCTCCTAAGCTGCTGGTGT
CAACGCCAAGATTCTGGCCGAGGGCGTGCCCGATAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA

TCTCTGGCCTGCAGCCTGAGGACGAGGCCGATTACTATTGCCAGCACCCTATGGCACCTTCACCTTCGGCGGAGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: huLym-1-A VL氨基酸

DIVLTQSPSSLSASPGQRTVITCRASVNIYSYLAWYQQKPGQAPKLLVYNKILAEGLVPDRFSGSGSG
TDFTLTISGLQPEDEADYYCQHHYGTFTFGGGTKLEIK 4

SEQ ID NO: 5 huLym-1-B VH

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCTGAGACTGACCTGTACC
GCCAGCGGCTTTAGCCTGACAAGCTATGGCGTGCACTGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGC
CGTGATTTGGAGCGACGGCAGCACCATACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCA
AGAGCCAGGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGACACTACGGC
TCTACCCTGGCCTTTGCTTCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT

SEQ ID NO: 6 huLym-1-B VH氨基酸

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLTCTASGFSLSYGVHWRQPPGKGLEWLAVIWSDGSTTYNSALKSRLTI
SKDNSKSQVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYGSTLAFASWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 7 huLym-1-B VL

GACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCTCCCTAAGTGCCTCTGTCTCGGGATCGTGTGACCATAACGTGT
AGAGCTTCCGTTAATATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCAACAAAAACCAGTAAGGCCCAAATCTGCTTATTTA
CAACGCAAAAATACTTGCTGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAGTGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTTACCA
TAAGTTCACTGCAACCTGAGGACTTCGCCTCTTACTACTGTCAACATCATTATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGG
ACTAAGGTGGAGATAAAG

SEQ ID NO: 8 huLym-1-B VL氨基酸

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNKILAEGLVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFASYYCQHHYGTFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 9 huLym-2 VH

GAGGTGCAACTGGTCAATCCGGTGGCGGCCCTTATCCAACCCGGTCTCTTCGCTTGTCTCTGTTCT
GGTAGTGGCTTCACTTTTCACTAAGTACTGGATGAAGTGGGTGAGGAGGCTCCCGGTAAGGGGTTGGAATGGGTAGG
TGAAATCAGGTTCAAGTCTCATAACTATGCTACCCATTTTGCTGAAAGTGTTAAGGGACGTTTACTATTAGCAGAG
ACGACTACAAGTCTGTAGTGTACCTTCAGATGAATCACTCCGGTCCGAAGATACCGCCGTATATTACTGTACTCGG
AGAATTGGTAACTCTGACTATGACTGGTGGTATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGCACTATGGTTACCGTCAGCTCA

SEQ ID NO: 10 huLym-2 VH氨基酸

EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCSGSGFTFSNYWMNWVRQAPGKLEWVGEIRFKSHNYATHFAESVKGR
FTISRDDYKSVVYLQMNSLRSEDVAVYYCTRRIGNSDYDWWYFDVWGQGMVTVSS

SEQ ID NO: 11 huLym-2 VL

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTTCTAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGT
AAAGCCAGCCAGAACGTGGGCAACAACGTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCAAGGTGCCAAGCTGCTGATCTA
CAGCGCCAGCTACAGATACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACATACCCCTTCACCTTCGGCCAG
GGCACCAAGGTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 12 huLym-2 VL氨基酸

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGNVAVYQQKPGKVPKLLIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDVATYYCQQYNTYPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 13 huLym-1-A CAR

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGCCAGGCCGGAGGTG
CAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGACTTGTGAAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTTAG
CCTGACATCTTATGGCGTGCAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGCTGGTGGTCATTTGGAGCG
ACGGCAGCACCACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTTACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTAC
CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCCACTACGGCTCTACCCTGGCCTT
TGCTTCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGCGGAGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGTG
GTGGTTCTGATATTGTGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTCCTGGACAGAGAGTGACCATCAGCTGC
AGAGCCAGCGTGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGACAGGCTCCTAAGCTGTGGTGT
CAACGCCAAGATTCTGGCCGAGGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCTCTGGCCTGCAGCCTGAGGACGAGGCCGATTACTATTGCCAGCACCACTATGGCACCTTCACCTTCGGCGGAGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT
GTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATA
TCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGG
GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG
AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCA
GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC
TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 14 huLym-1-A CAR 氨基酸

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFSLTSGVHWVRQAPGKLEWL
VVIWSDGSTTYSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMSLR AEDTAVYYCASHYGSTLAFASWGQGLTVTVSSGGGSGG
GGSGGGGSDIVLTQSPSSLSASPGQRVTISCRASVNIYSYLAWYQQKPGQAPKLLVYNKILAEGVPDRFSGSGSGT
DFTLTISGLQPEDEADYYCQHHYGTFTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSR
SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 15 huLym-1-B CAR

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGCCAGGCCGGAGGTG
CAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCTGAGACTGACCTGTACCGCCAGCGGCTTTAG
CCTGACAAGCTATGGCGTGCAGTGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGCCGTGATTTGGAGCG
ACGGCAGCACCACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTAC
CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCCAGACACTACGGCTCTACCCTGGCCTT
TGCTTCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGTG
GTGGTTCTGACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCTCCCTAAGTGCGTCTGTGCGGGATCGTGTGACCATAACGTGT
AGAGCTTCGGTTAATATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGTAAGGCCCCAAATCTGCTTATTTA

CAACGCAAAAATACTTGCTGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAGTGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTTACCA
TAAGTTCACTGCAACCTGAGGACTTCGCCTCTTACTACTGTCAACATCATTATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGG
ACTAAGGTGGAGATAAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT
GTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATA
TCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGG
GGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGTGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCG
CGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG
AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCA
GAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC
TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 16 huLym-1-B CAR 氨基酸

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLTCTASGFSLSYGVHWRQPPGKLEWL
AVIWSDGSTTYNSALKSRLTISKDNSKSQVYLMNSLRAEDTAVYYCARHYGSTLAFASWGQGLVTVSSGGGSGG
GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNKILAEGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFASYQCQHHYGTFTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 17 huLym-2 CAR

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCTCTTTTGTGTCATGCAGCCAGGCCGGAGGTG
CAACTGGTGAATCCGGTGGCGGCCCTTATCCAACCCGGTCGGTCTCTTCGCTTGTCTGTTAGTGGCTTCAC
TTTCAGTAATACTACTGGATGAACTGGGTACAGCAGGCTCCCGGTAAGGGTTGGAATGGGTAGGTGAAATCAGGTTCA
AGTCTCATAACTATGCTACCCATTTTGCTGAAAGTGTTAAGGGACGTTTTACTATTAGCAGAGACGACTACAAGTCT
GTAGTGTACCTTCAGATGAATTCCTCCGGTCCGAAGATACCGCCGTATATTACTGTACTCGGAGAATTGGTAACCTC
TGACTATGACTGGTGGTATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGCACTATGGTTACCGTCAGCTCAGGAGGCGGAGGTTCTG
GCGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGCTCTGAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTTCTAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGC
GACAGAGTGACCATCACCTGTAAAGCCAGCCAGAACGTGGGCAACAACGTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCAA
GGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTG
GCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACA
TACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGGCCGTTCCTCCACAGCAGTGGGCCCTGTCTACCAC
GACGCCAGCGCCTAGGCCACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGT
GCCGGCCAGCGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTG
GCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTA
TATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG
CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA

GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 18 huLym-2 CAR 氨基酸

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCSGSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWV
GEIRFKSHNYATHFAESVKGRFTISRDDYKSVVYLQMNLSRSEDYAVYYCTRRIGNSDYDWWYFDVWGQGTMTVTVSS
GGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGNNAWYQQKPGKVPKLLIYSASYRSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYNTYPTFTFGQGTKVEIKAVPPQQWALSTTTPAPRPPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 19 人 IgD恒定区, Uniprot: P01880

APTAPDVFPPIISGRHPKDNVLAACITGYHPTSVTVWYMGTSQSPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQ
LSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEK
EKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERH
SNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS
PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYV
TDHGPMK

SEQ ID NO: 20 人 IgG1恒定区, Uniprot: P01857

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 人 IgG2恒定区, Uniprot: P01859

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22 人 IgG3恒定区, Uniprot: P01860

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE
PKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCFSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23 人 IgM恒定区, Uniprot: P01871

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATS
QVLLPSKDVMTGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQV
SWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPVDQDTAIR
VFAIPPSFASIFLTKSTKLTCVTDLTYSVTISWTRQNGEAVKHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGER

FTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKY
VTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO: 24 人 IgG4 恒定区, Uniprot: P01861

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 25 人 IgA1 恒定区, Uniprot: P01876

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVGFFPQEPLSVTWSESGQVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQ
LTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPTPTSPSTPTPTSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLSEANLT
CTLTGLRDASGVTFWTWTPSSGKSAVQGPPERDLGCYSVSSVLPGCAEPWNHGTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSG
NTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRV
AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

SEQ ID NO: 26 人 IgA2 恒定区, Uniprot: P01877

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVGFFPQEPLSVTWSESGQVNTARNFPPSQDASGDLYTTSSQ
LTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGAT
FTWTPSSGKSAVQGPPERDLGCYSVSSVLPGCAQPNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPP
SEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSC
MVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

SEQ ID NO: 27 人 Ig κ 恒定区, Uniprot: P01834

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 28 DAP-CAR 框架 DNA 序列

CCACGACGCCAGCGCCTAGGCCTCCAACACCAGCTCCAACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGC
CAGAAGCTTG TAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATCTACATCTGG
GCCCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTTCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCCTGTACTGCCTGTGTGCCCGGCCTAG
AAGATCCCCTGCTCAGGATGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCCGCGAGAGGCTACTTCCTGGGCAGACTGGTTCCTA
GAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCCACAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCTACCAAGAGCTGCAG
GGCCAGAGATCCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCCTTACTACAAGTGA

1-135: CD8a 铰链

136-207: CD8a 跨膜

208-276: DAP10

277-435: DAP12

SEQ ID NO: 29 DAP-CAR 框架氨基酸

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CLCARPRRSPAQDGKVIYNMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK*

1-45: CD8a 铰链

46-69: CD8a 跨膜

70-92: DAP10

93-144: DAP12

SEQ ID NO: 30 huLym-1-B-DAPCAR DNA序列

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGCCAGGCCGAGGTG
CAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCTGAGACTGACCTGTACCGCCAGCGGCTTTAG
CCTGACAAGCTATGGCGTGCCTGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGCCGTGATTTGGAGCG
ACGGCAGCACCATACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTGACCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTAC
CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGACACTACGGCTCTACCCTGGCCTT
TGCTTCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCAGGTGGCGGTGGATCTGGCGGTG
GTGGTTCTGACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCCTCCCTAAGTGCCTCTGTCTGGGGATCGTGTGACCATAACGTGT
AGAGCTTCCGTTAATATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGTAAGGCCCAATCTGCTTATTTA
CAACGCAAAAATACTTGCTGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAGTGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTTACCA
TAAGTTCACTGCAACCTGAGGACTTCGCTCTTACTACTGTCAACATCATTATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGG
ACTAAGGTGGAGATAAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCTCCAACACCAGCTCCAACAATCGCCAGCCAGCCTCT
GTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTTCGCTGCGACA
TCTACATCTGGGCCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTTCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCCTGTGT
GCCCCGCTAGAAATCCCTGCTCAGGATGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCAGAGGCTACTTCTGGGCAG
ACTGGTTCTAGAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCCACAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCTACC
AAGAGCTGCAGGGCCAGAGATCCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCCCTTACTACAAGTGA

1-63: CD8a前导序列

64-780: huLym-1-B ScFv

781-915: CD8a 铰链

916-987: CD8a跨膜

988-1056: DAP10

1057-1215: DAP12

SEQ ID NO: 31 huLym-1-B-DAPCAR氨基酸

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLTCTASGFSLSYGVHWRQPPGKGLEW
LAVIWSDGSTTYNSALKSRLTISKDNSKSQVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYGSTLAFASWGQGLTVTVSSGGGGS
GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNAKILAEGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFASYQCQHHYGTFTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCLCARPRRSPAQDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAEEAATRK
QRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK*

1-21: CD8a前导序列

22-260: huLym-1-B ScFv

261-305: CD8a铰链

306-329: CD8a跨膜

330-352: DAP10

353-404: DAP12

SEQ ID NO: 32 抗CD19-261标签-BB3zCAR-DNA序列

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATC
CAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGA
CATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGAT
TACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAG
CAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
GATCACAGGCGGCGGAGGCTCCGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGAC
CTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTA
AGCTGGATTGCGCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGC
AAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGC
CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCGTGCCCCCCCAGCAGTGGGGCCCTGAGCACCACGACGCCAGCGCCGCG
ACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGG
GCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTC
CTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT
TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTG
AACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA
TGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

1-63: CD8a 前导

64-789: FMC63 ScFv

790-819: 261标签

820-954: CD8a 铰链

955-1026: CD8a 跨膜

1027-1152: 4-1BB

1153-1488: CD3z

SEQ ID NO: 33 抗CD19-261标签-BB3zCAR-AA

MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSE
VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQ
VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAVPPQQWALSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC
RFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

1-21: CD8a 前导

22-263: FMC63-ScFv

264-273: 261标签

274-318: CD8a铰链

319-342: CD8a跨膜

343-384: 4-1BB

385-495: CD3z

SEQ ID NO: 34抗CD19-261标签-DAPCAR DNA 序列

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATC
CAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGA
CATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGAT
TAACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAG
CAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
GATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGAC
CTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGT
AGCTGGATTGCGCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAA
TTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGC
AACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGC
CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCGTGCCCCCCCAGCAGTGGGCCCTGAGCACCACGACGCCAGCGCCTAG
GCCTCCAACACCAGCTCCAACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCG
GAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTT
CTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCCTGTGTGCCCCGCCTAGAAGATCCCCTGCTCAGGATGGCAAGGT
GTACATCAACATGCCCCGAGAGGCTACTTCTGGGCAGACTGGTTCCTAGAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCCA
CAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCCTACCAAGAGCTGCAGGGCCAGAGATCCGACGTGTACAGCGAC
CTGAATACCCAGCGGCCTTACTACAAATGA

1-63: CD8a 前导

64-789: FMC63 ScFv

790-819: 261标签

820-954: CD8a 铰链

955-1026: CD8a 跨膜

1027-1095: DAP10

1096-1254: DAP12

SEQ ID NO: 35 抗-CD19-261标签-DAPCAR AA序列

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL
IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGSE
VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQ
VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAVPPQQWALSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCLCARPRRSPAQDGKVYINMPGRGYFLGRLV
PRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK*

1-21: CD8a前导

22-263: FMC63-ScFv

264-273: 261标签

274-318: CD8a铰链

319-342: CD8a跨膜

343-365: DAP10

366-417: DAP12。

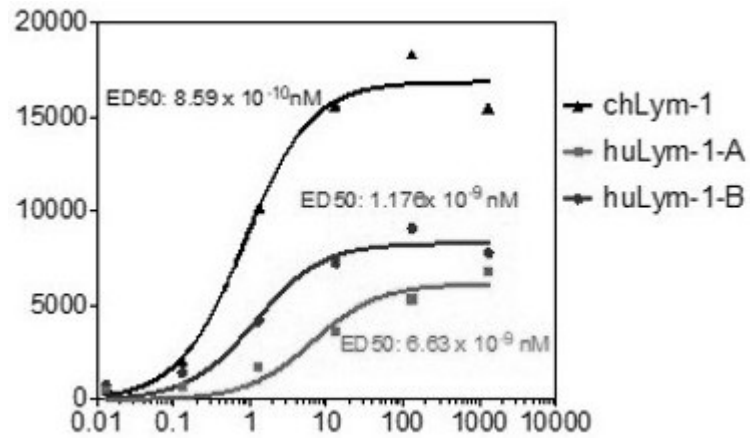


图1

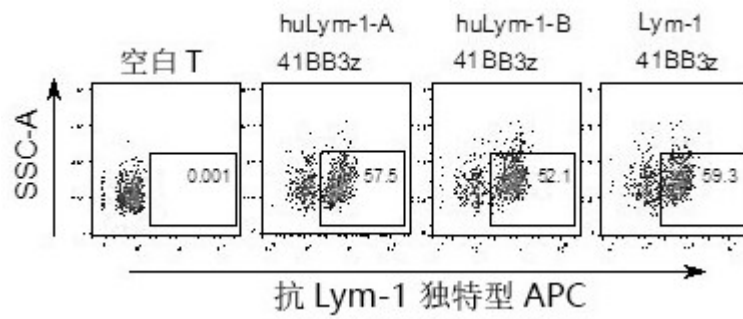


图2

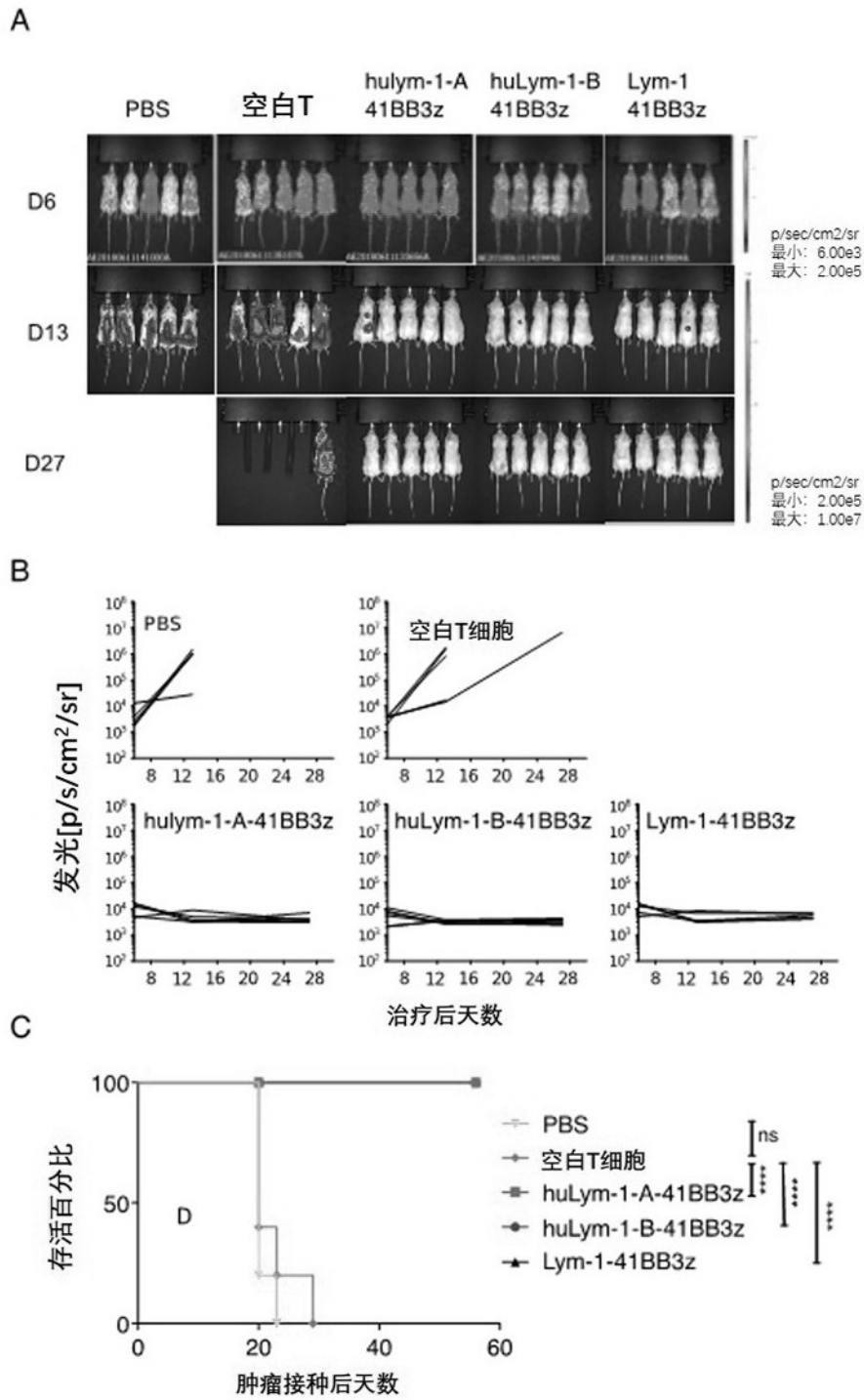


图3A-3C

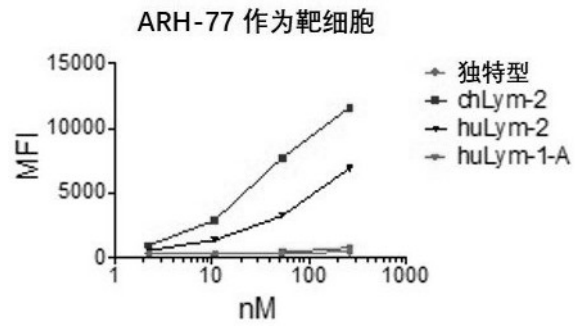


图4

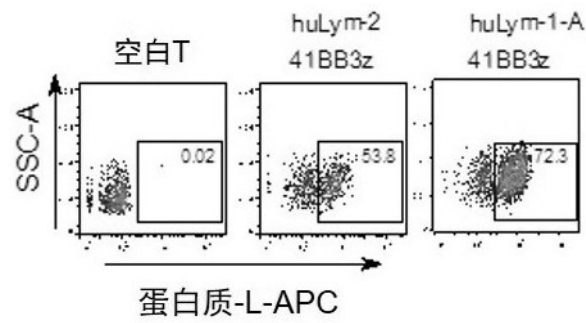


图5

ARH-77 eGFP/Luc 作为靶细胞

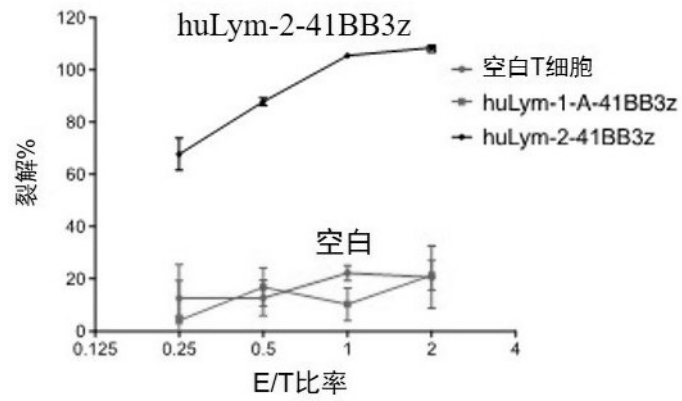


图6

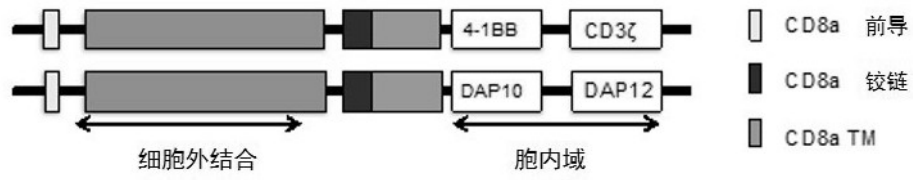


图7

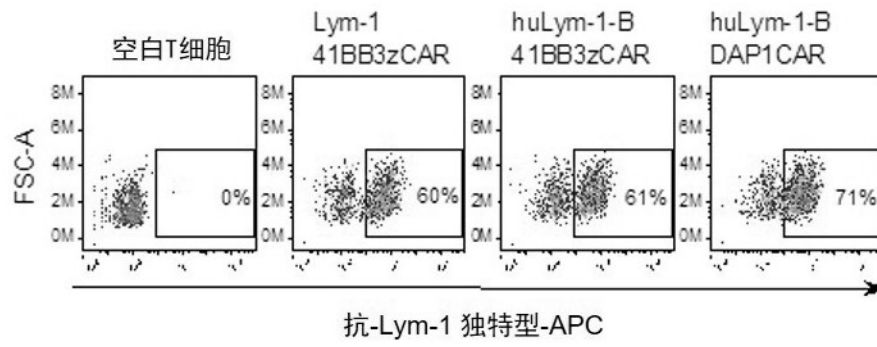
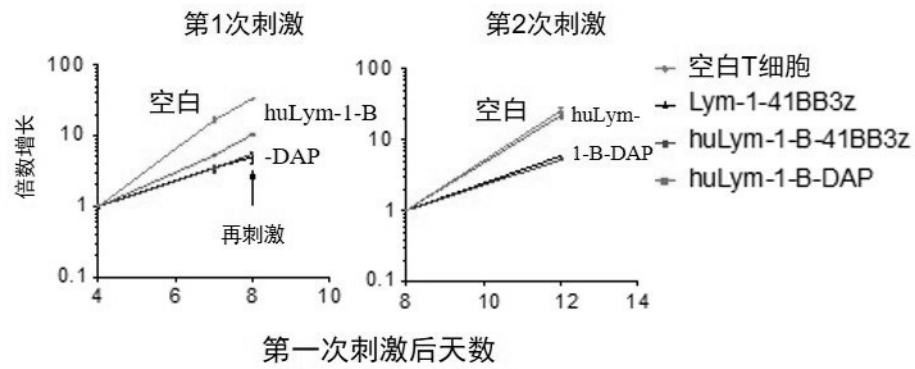


图8

A



B

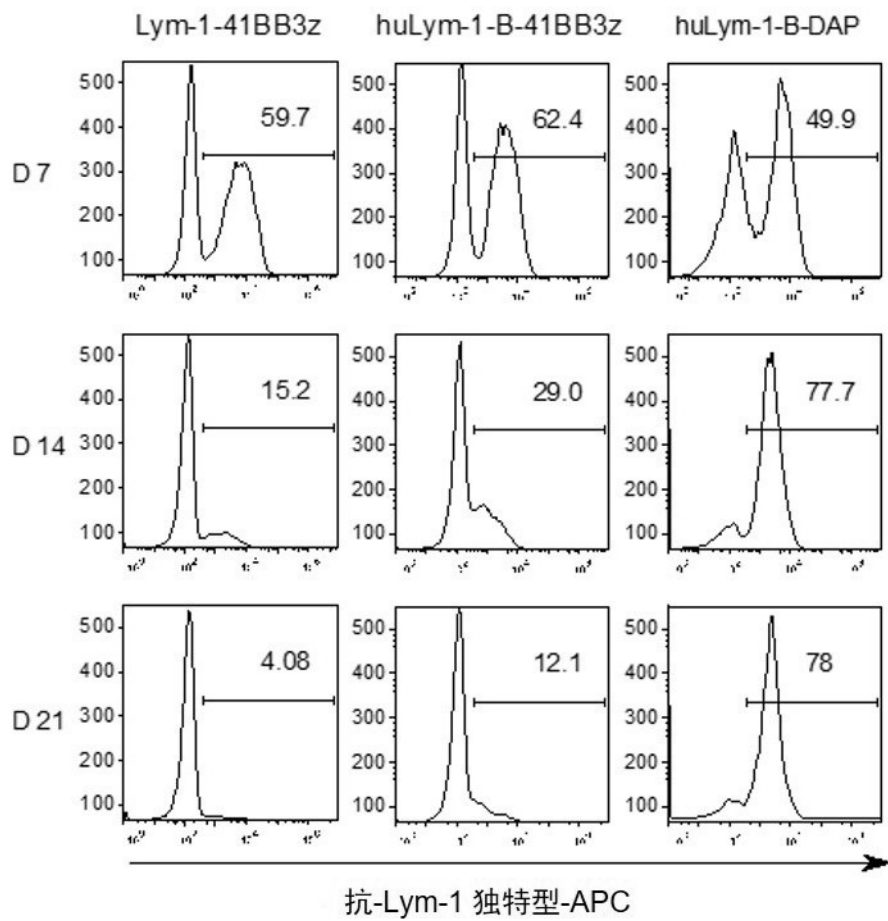


图9A-9B

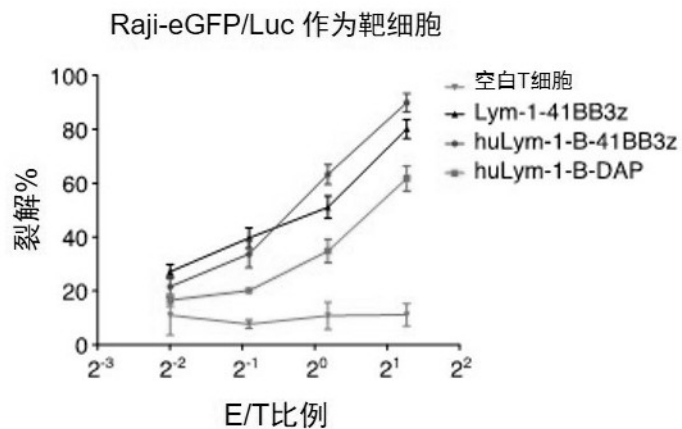


图10

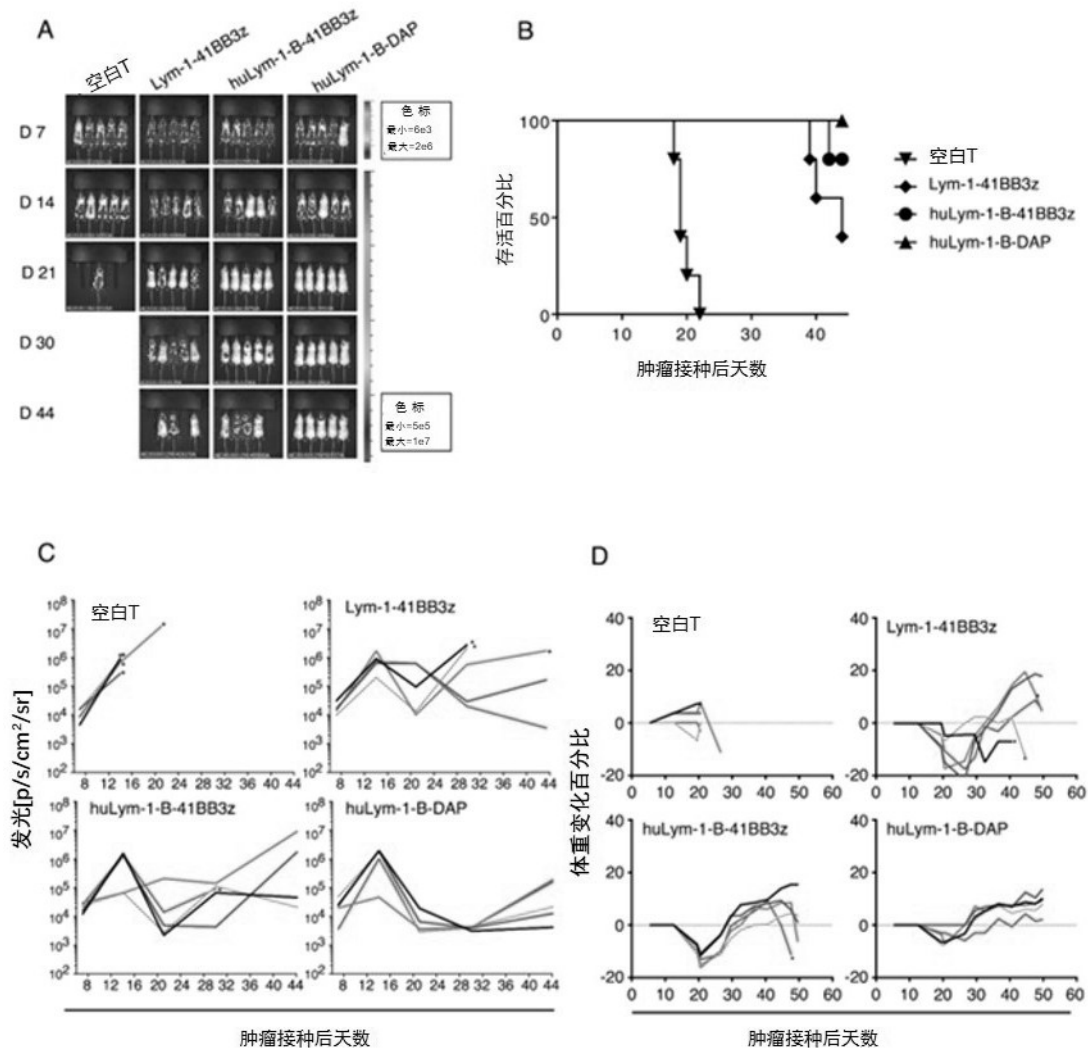


图11A-11D

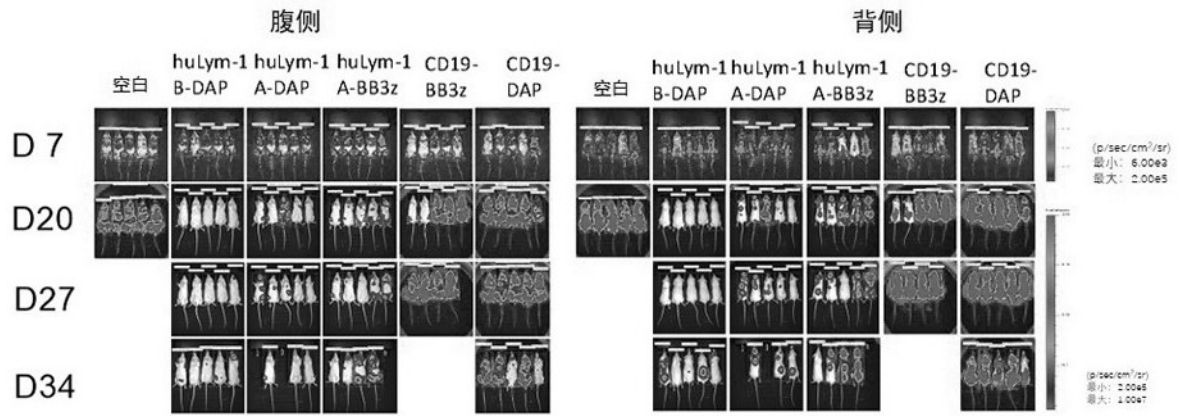


图12

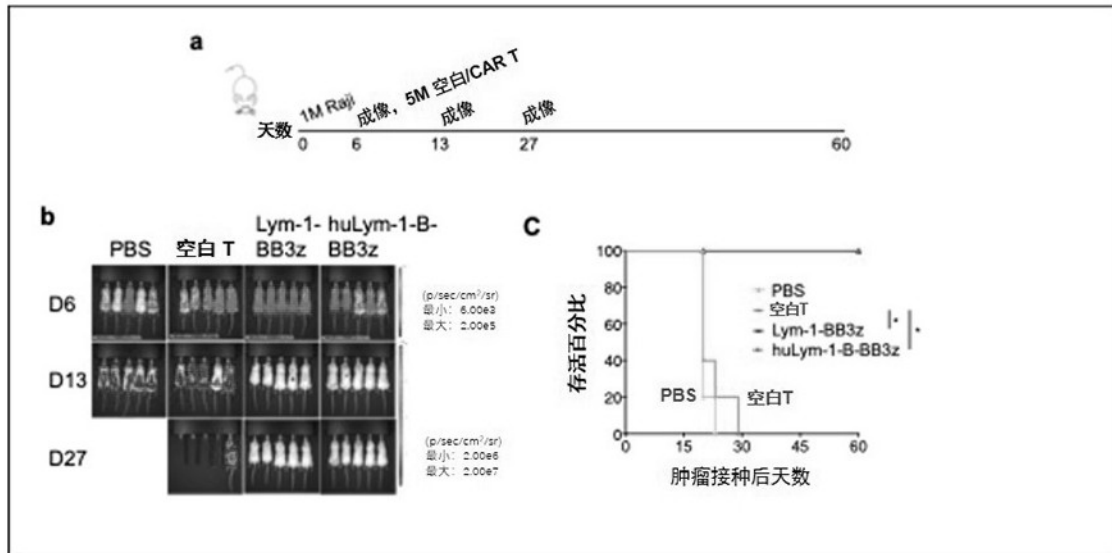


图13A-13C

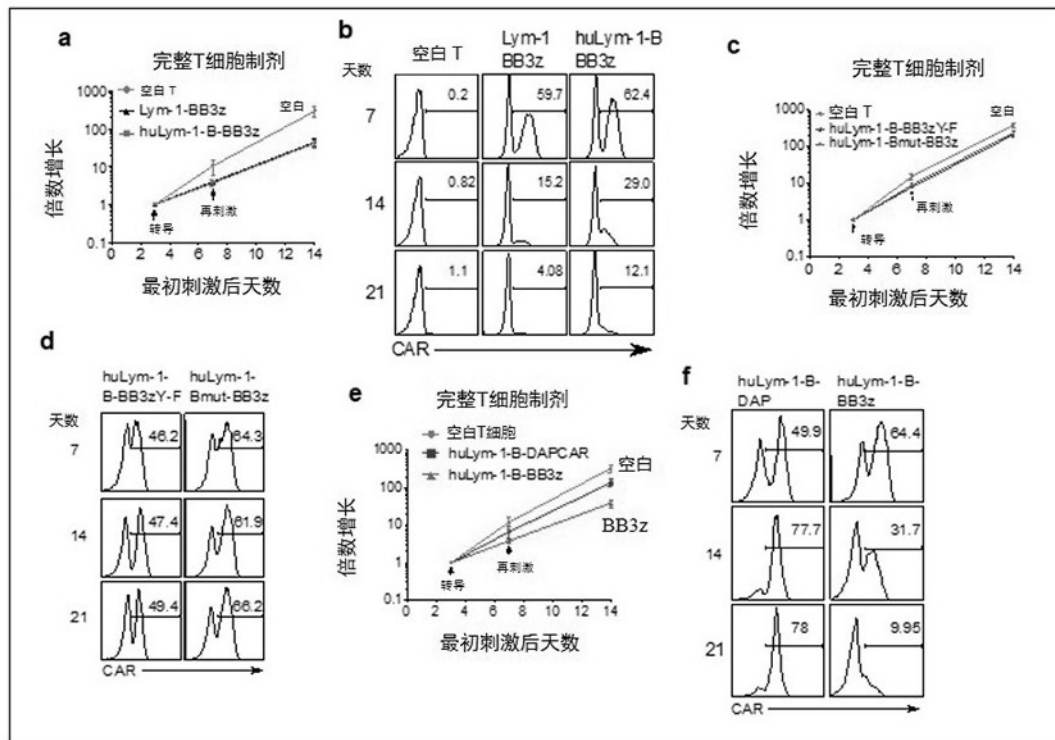


图14A-14F

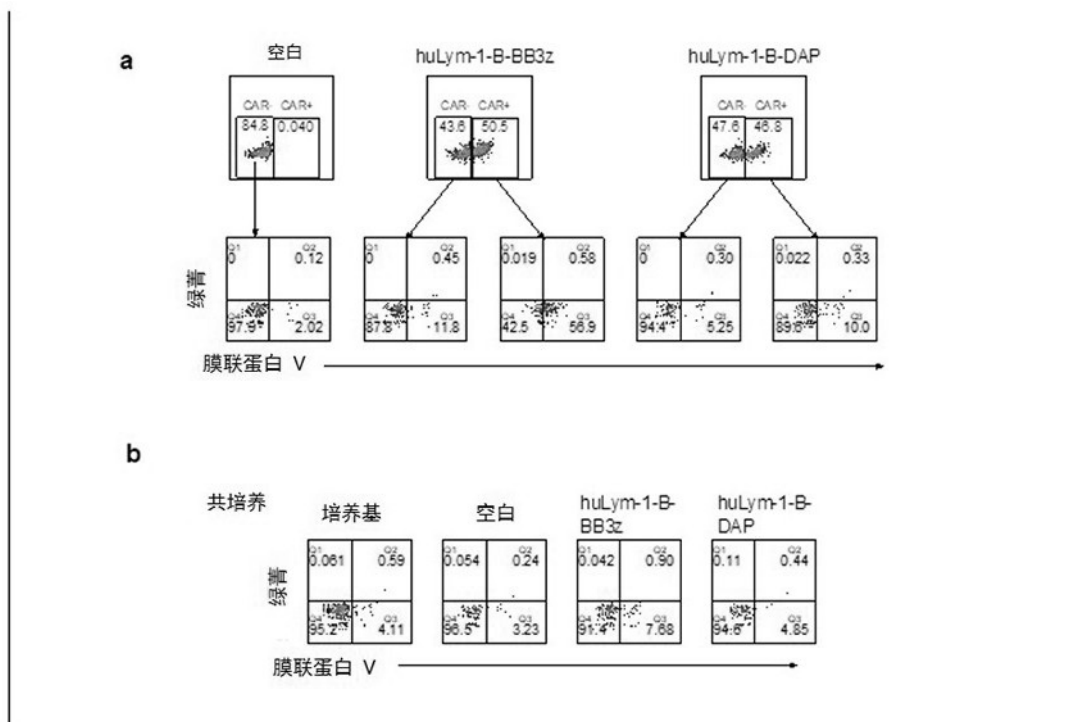


图15A-15B

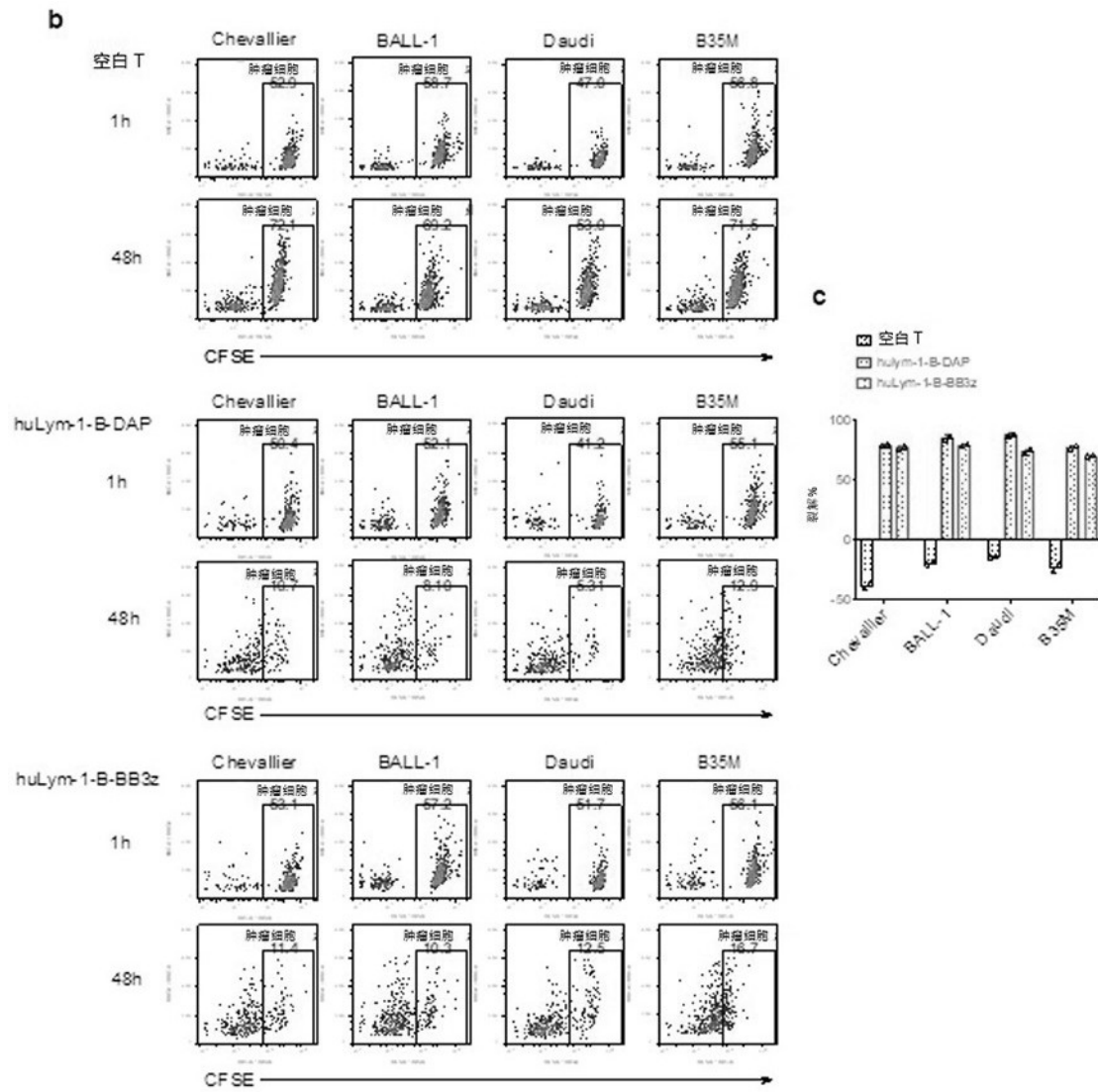


图17B-17C

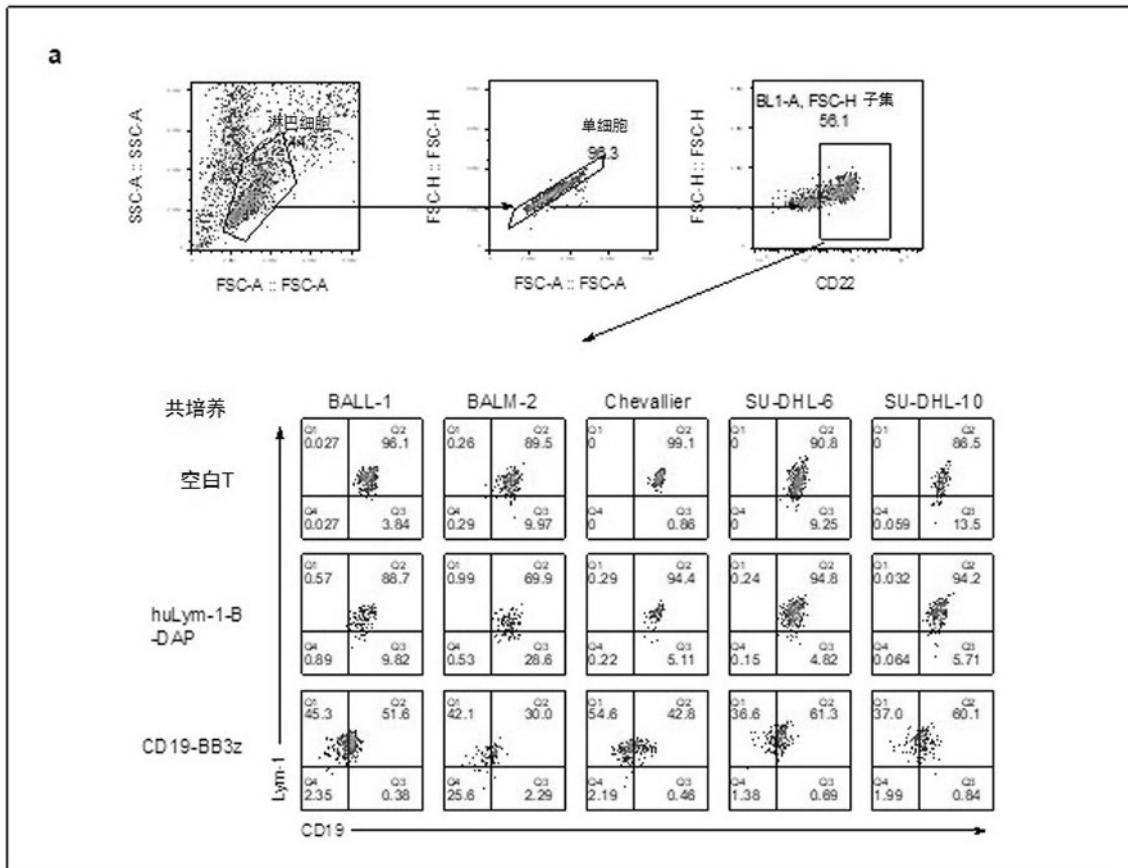


图18A-18B

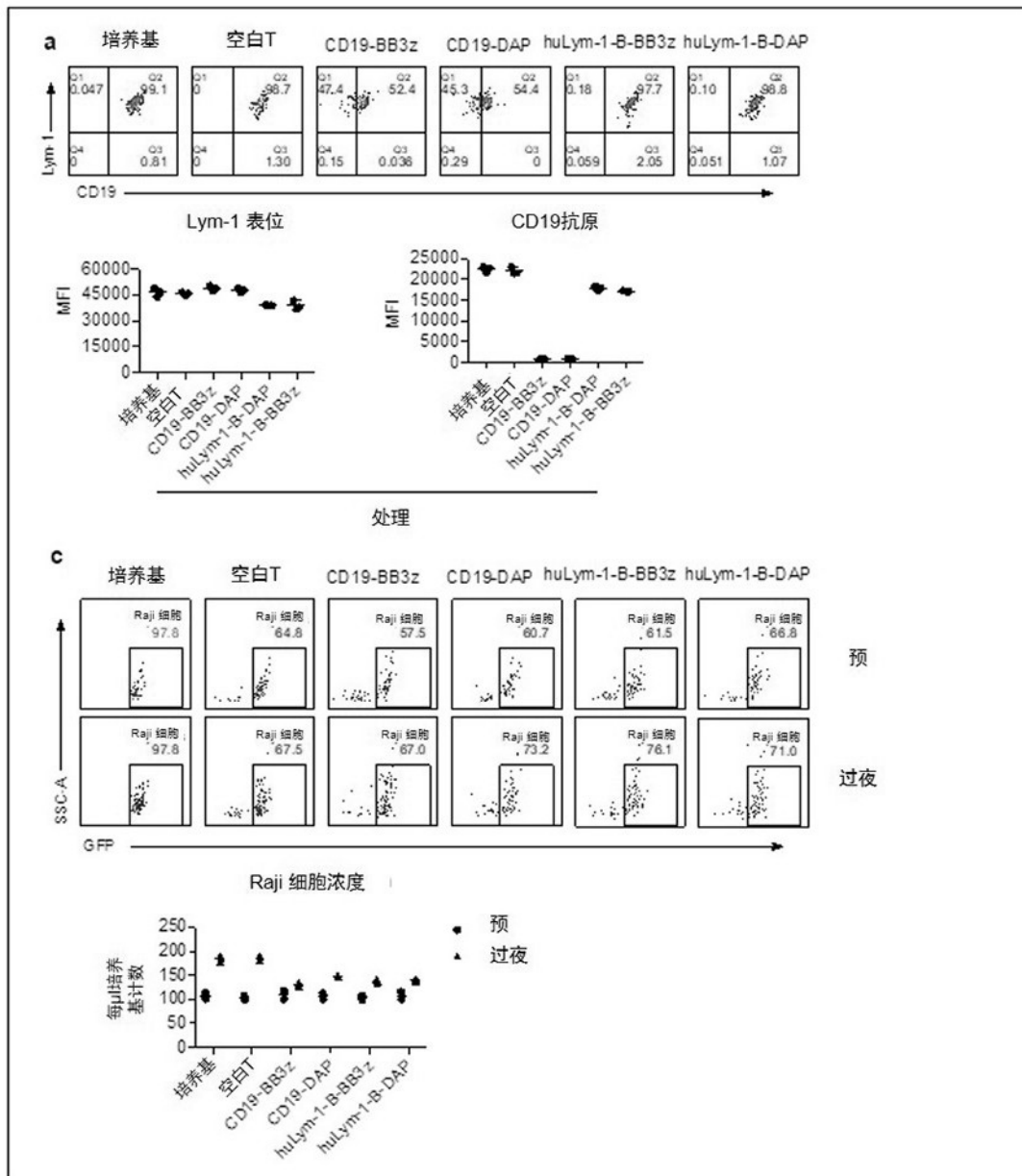


图19A-19D

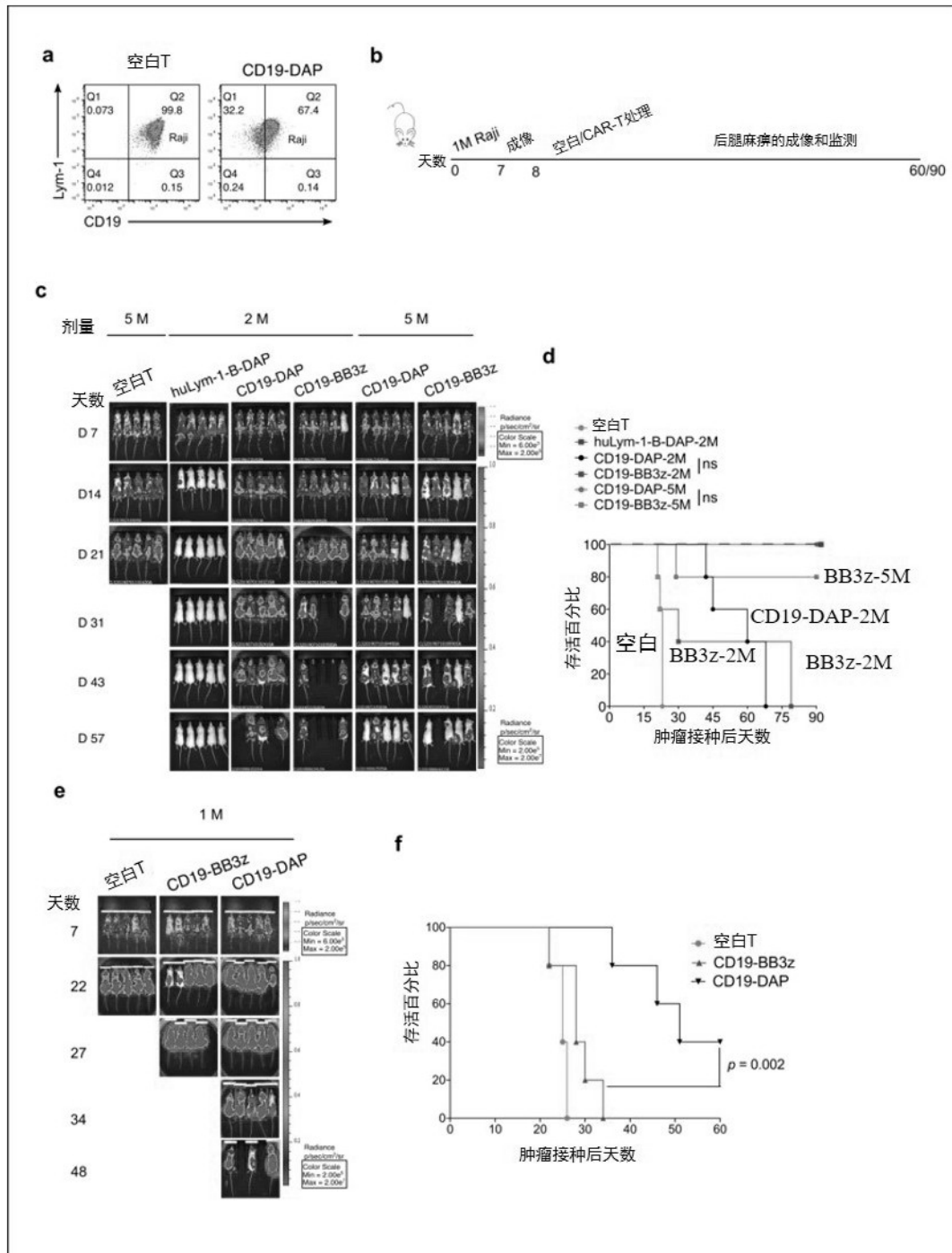


图20A-20F

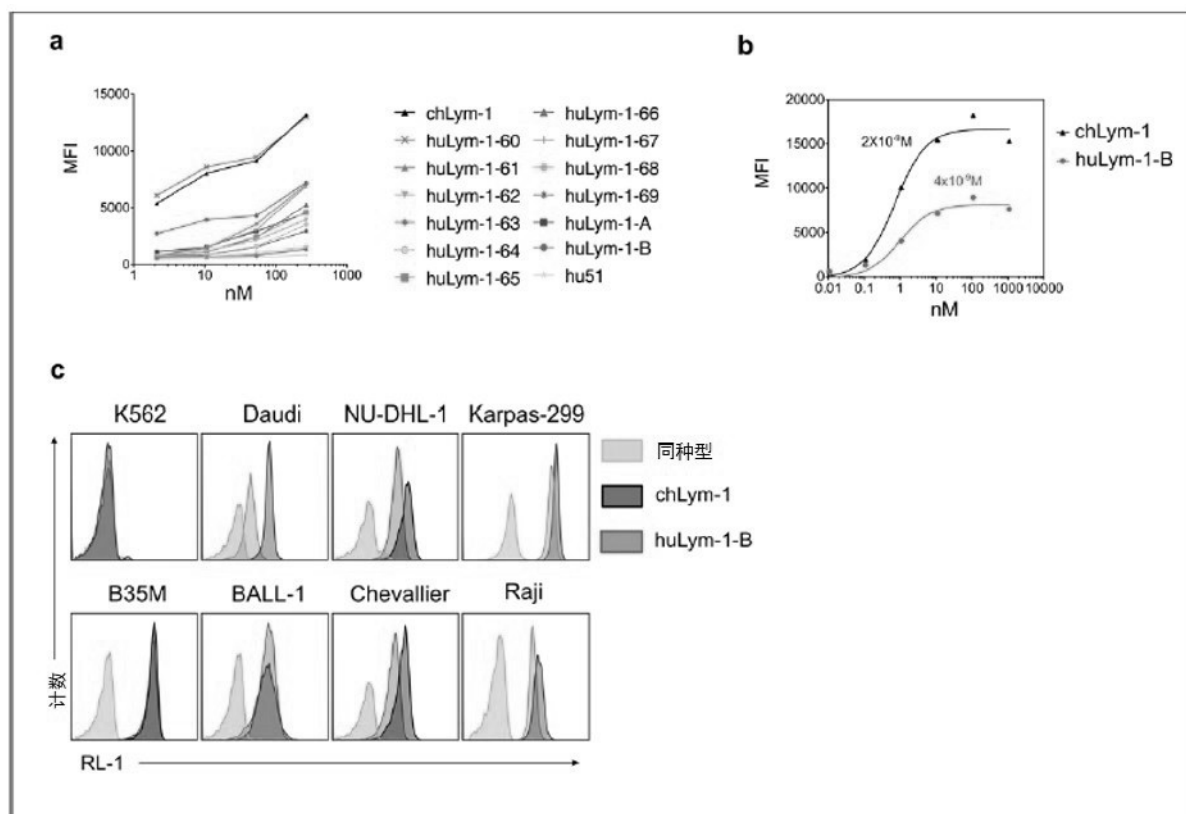


图21A-21C

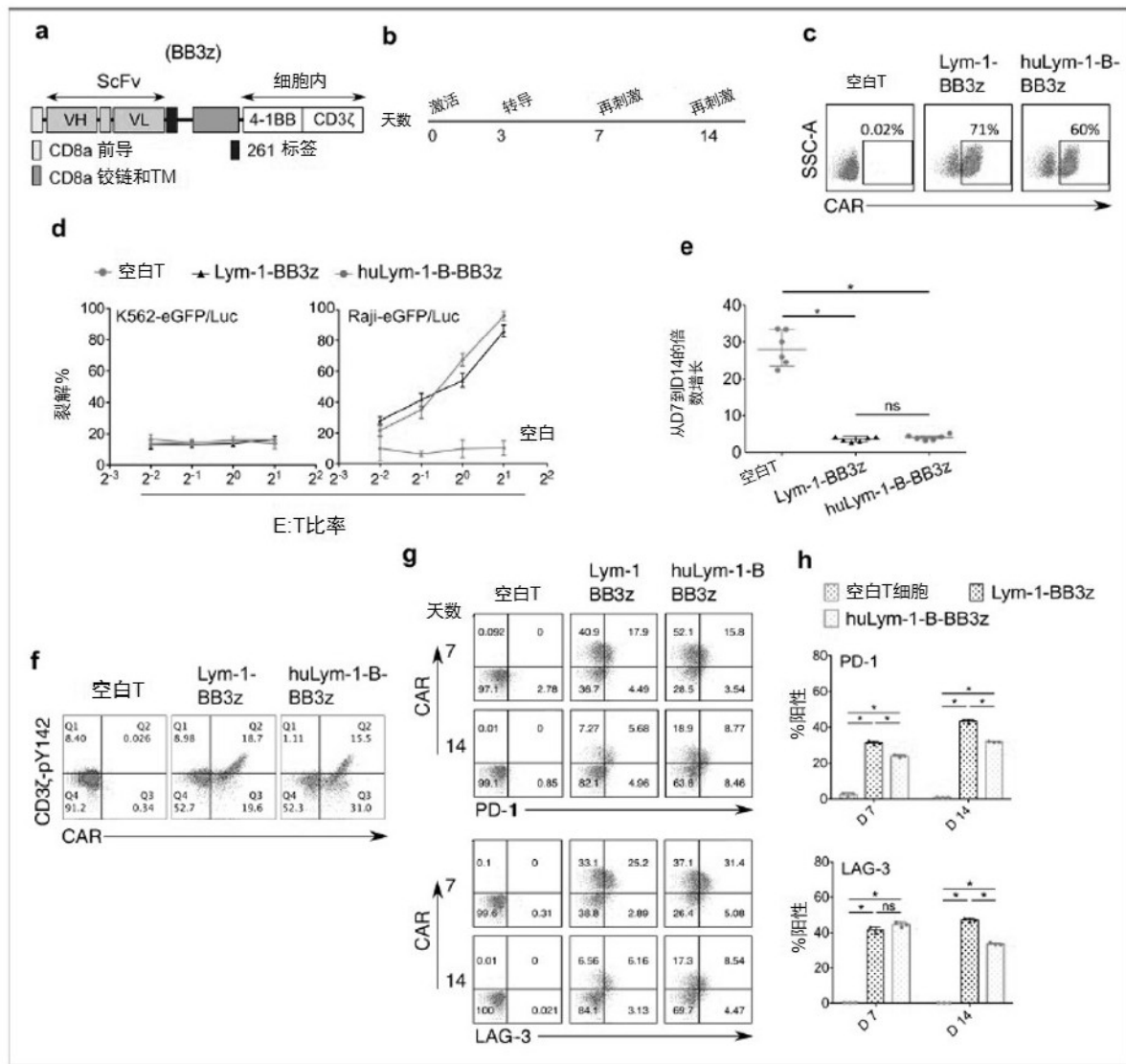


图22A-22H

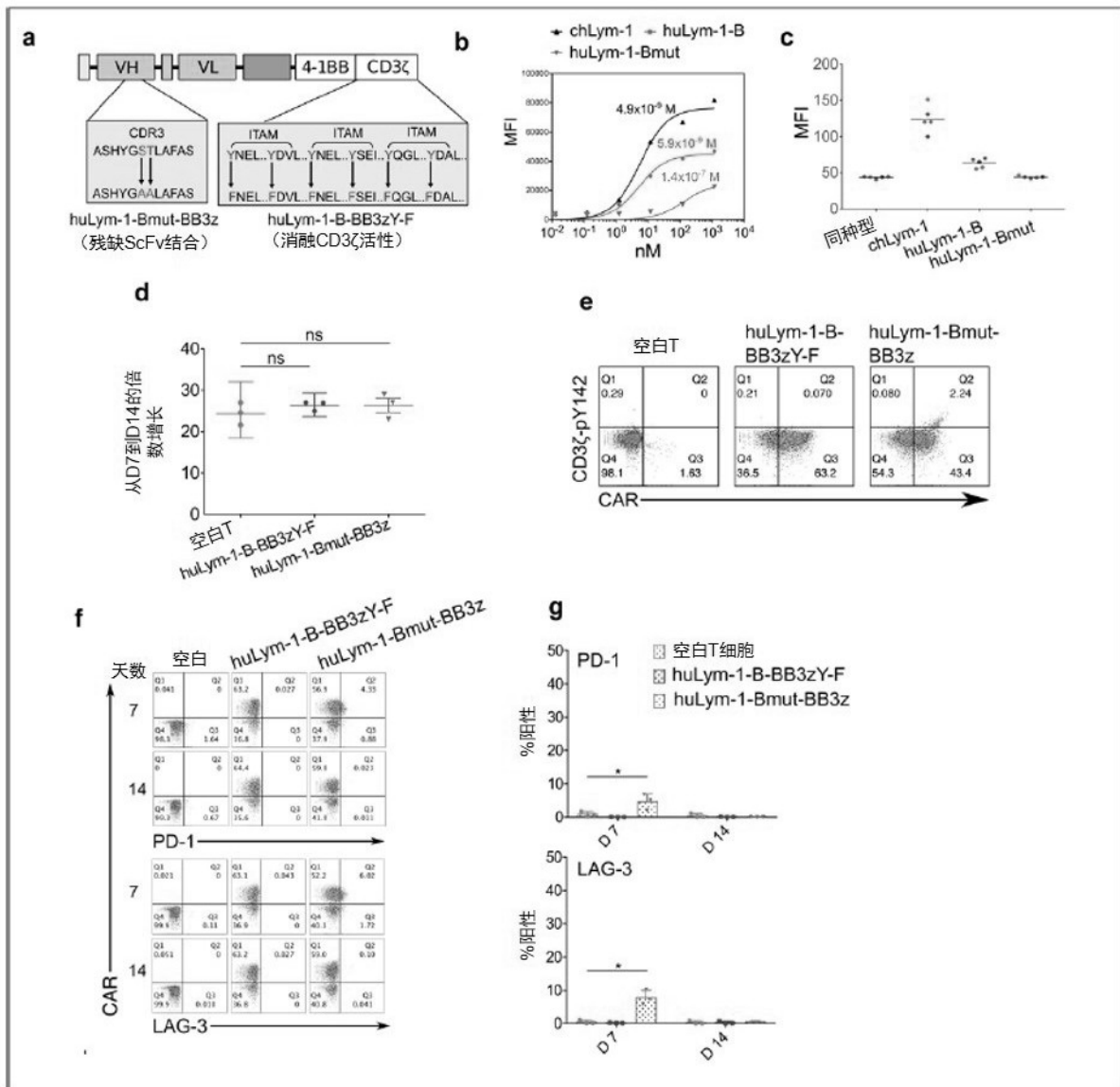


图23A-23G

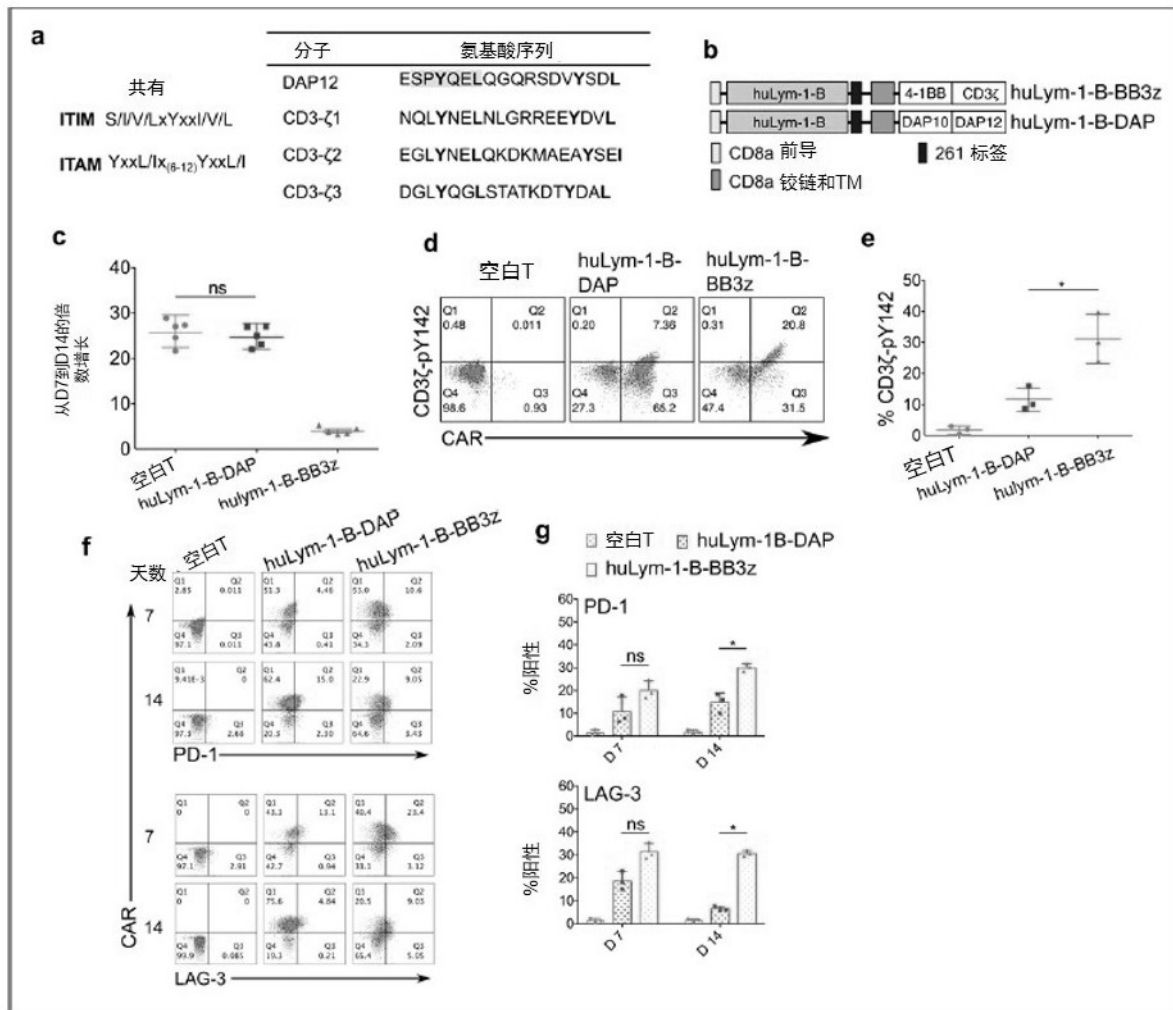


图24A-24G

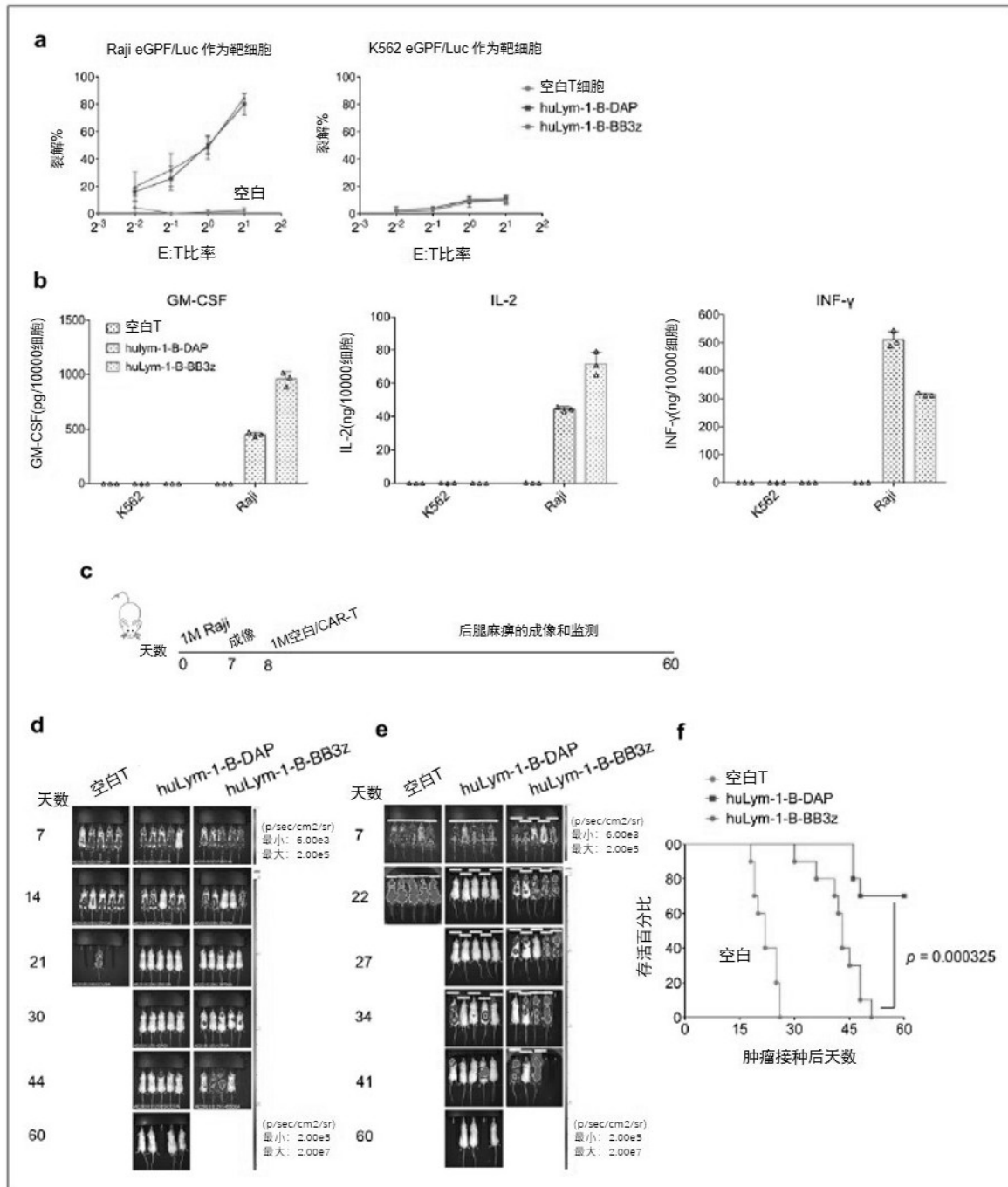


图25A-25F

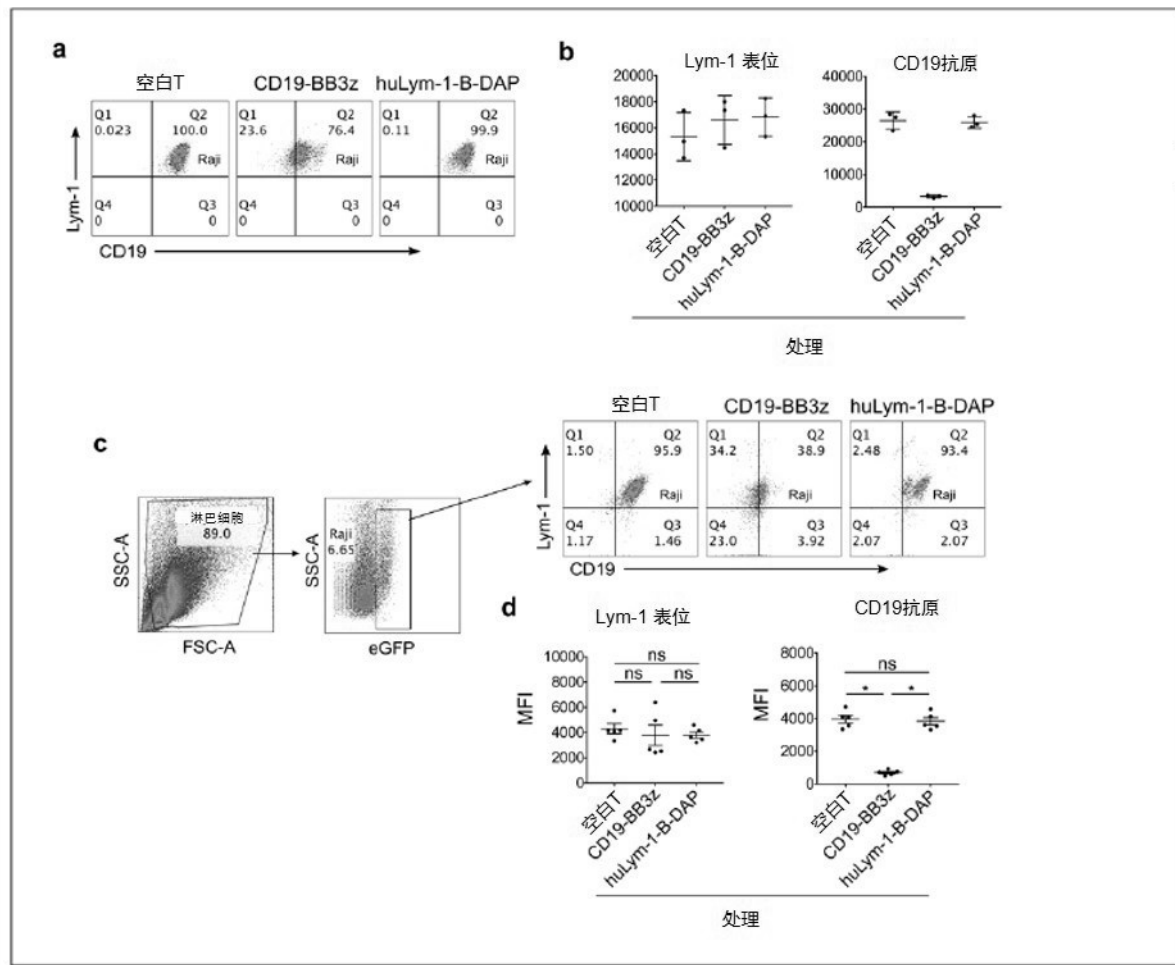


图26A-26D