



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115210254 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 18

(21) 申请号	202080093100.7	(74) 专利代理机构	北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
(22) 申请日	2020.12.03	专利代理师	龙淳
(30) 优先权数据	62/943,032 2019.12.03 US	(51) Int.Cl.	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	2022.07.14		C07K 14/82 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	PCT/US2020/062992 2020.12.03		C07K 16/28 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	W02021/113432 EN 2021.06.10		A61K 39/395 (2006.01)
(71) 申请人	纪念斯隆-凯特琳癌症中心		C07K 19/00 (2006.01)
地址	美国纽约州		A61P 35/00 (2006.01)
申请人	斯隆-凯特琳癌症研究协会		
	癌症与相关疾病纪念医院		
(72) 发明人	P·S·阿杜苏米利 Y·熊		

(54) 发明名称
表达C-KIT突变的细胞及其用途

(57) 摘要
本公开提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。本公开的主题提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。它涉及包含c-Kit突变体例如包含激活突变的c-Kit突变体的细胞。该细胞还可以包含抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))。本公开的主题涉及使用细胞进行治疗,例如治疗癌症。



1. 一种细胞,其包含:
 - (a) 与抗原结合的抗原识别受体,和
 - (b) 包含激活突变的c-Kit突变体。
2. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述c-Kit是人c-Kit。
3. 根据权利要求2所述的细胞,其中所述激活突变在人c-Kit的细胞内区域内。
4. 根据权利要求3所述的细胞,其中所述细胞内区域包含人c-Kit的氨基酸544至977。
5. 根据权利要求2-4中任一项所述的细胞,其中所述激活突变在人c-Kit的氨基酸816至826内。
6. 根据权利要求2-5中任一项所述的细胞,其中所述激活突变在氨基酸位置816或氨基酸位置822处。
7. 根据权利要求2-4中任一项所述的细胞,其中所述激活突变在人c-Kit的氨基酸550至570内。
8. 根据权利要求2-4和7中任一项所述的细胞,其中所述激活突变在人c-Kit的氨基酸位置560处。
9. 根据权利要求2-4所述的细胞,其中所述激活突变选自D816V、D816Y、D816H、D816F、N822K、V560G、或其组合。
10. 根据权利要求2-4和9中任一项所述的细胞,其中所述激活突变包含D816V或由D816V组成。
11. 根据权利要求2-10中任一项所述的细胞,其中所述人c-Kit包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的细胞,其中所述突变体包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或其部分或由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或其部分组成。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的细胞,其中所述突变体由SEQ ID NO:2的氨基酸543至976组成。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的细胞,其中所述c-Kit突变体与诱导型启动子可操作地连接。
15. 根据权利要求14所述的细胞,其中所述诱导型启动子选自活化T细胞核因子(NFAT)、转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的细胞,其中所述c-Kit突变体增强所述细胞的细胞持久性。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的细胞,其中所述c-Kit突变体减少所述细胞的细胞凋亡或无反应性。
18. 根据权利要求1-17中任一项所述的细胞,其中所述抗原识别受体是外源性的或内源性的。
19. 根据权利要求1-18中任一项所述的细胞,其中所述抗原识别受体是重组表达的。
20. 根据权利要求1-19中任一项所述的细胞,其中所述抗原识别受体由载体表达。
21. 根据权利要求1-20中任一项所述的细胞,其中所述c-Kit突变体由载体表达。
22. 根据权利要求1-21中任一项所述的细胞,其中所述细胞是免疫应答细胞。
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的细胞,其中所述细胞是淋巴谱系的细胞或骨髓

谱系的细胞。

24. 根据权利要求23所述的细胞,其中所述淋巴谱系的细胞选自T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

26. 根据权利要求24或25所述的细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、 $\gamma\delta$ T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、调节性T细胞或自然杀伤T(NKT)细胞。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的细胞,其中所述抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的细胞,其中所述抗原是肿瘤抗原。

29. 根据权利要求28所述的细胞,其中所述肿瘤抗原选自间皮素、CD19、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B2、erb-B3、Erb-B4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、ERBB2、MAGEA3、CT83(也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、存活素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胎儿抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白、HPV E7癌蛋白和ERBB。

30. 根据权利要求29所述的细胞,其中所述抗原是间皮素。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的细胞,其中所述抗原识别受体选自T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)和TCR样融合分子。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的细胞,其中所述抗原识别受体是CAR。

33. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述CAR包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导区。

34. 根据权利要求33所述的细胞,其中所述CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导区。

35. 根据权利要求34所述的细胞,其中所述至少一个共刺激信号传导区包含CD28多肽。

36. 根据权利要求33所述的细胞,其中所述CAR不包含共刺激信号传导区。

37. 一种用于产生抗原特异性免疫应答细胞的方法,所述方法包括将(a)编码与抗原结合的抗原识别受体的第一核酸序列;和(b)编码包含激活突变的c-Kit突变体的第二核酸序列引入细胞。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述第一核酸序列与第一启动子可操作地连接。

39. 根据权利要求37或38所述的方法,其中所述第二核酸序列与第二启动子可操作地连接。

40. 根据权利要求37-39中任一项所述的方法,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列中的一个或两个包含在载体中。

41. 根据权利要求341所述的方法,其中所述载体是逆转录病毒载体。

42. 一种组合物,其包含:a)包含激活突变的人c-Kit的突变体;b)与抗原结合的抗原识别受体。

43. 根据权利要求42所述的组合物,其中所述c-Kit突变体与第一启动子可操作地连接。

44. 根据权利要求42或43所述的组合物,其中所述抗原识别受体与第二启动子可操作

地连接。

45. 根据权利要求43或44所述的组合物,其中所述第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。

46. 根据权利要求45所述的组合物,其中所述诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

47. 一种核酸组合物,其包含(a)编码抗原识别受体的第一多核苷酸和(b)编码包含激活突变的人c-Kit突变体的第二多核苷酸。

48. 根据权利要求47所述的核酸组合物,还包含与所述c-Kit突变体可操作地连接的第一启动子。

49. 根据权利要求47或48所述的核酸组合物,还包含与所述抗原识别受体可操作地连接的第二启动子。

50. 根据权利要求48或49所述的核酸组合物,其中所述第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。

51. 根据权利要求50所述的核酸组合物,其中所述诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

52. 根据权利要求47-51中任一项所述的核酸组合物,其中所述第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在载体中。

53. 根据权利要求52所述的核酸组合物,其中所述载体是逆转录病毒载体。

54. 一种载体,其包含根据权利要求47-53中任一项所述的核酸组合物。

55. 一种细胞,其包含根据权利要求42-46中任一项所述的组合物,或根据权利要求47-53中任一项所述的核酸组合物,或根据权利要求54所述的载体。

56. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-36和55中任一项所述的细胞,以及药学上可接受的赋形剂。

57. 根据权利要求56所述的药物组合物,还包含c-Kit抑制剂。

58. 根据权利要求57所述的药物组合物,其中所述c-Kit抑制剂选自达沙替尼(BMS-354825)、米哚妥林(PKC412)、普纳替尼、伊马替尼、及其组合。

59. 根据权利要求56-58中任一项所述的药物组合物,其用于治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染或传染病。

60. 一种减少受试者肿瘤负荷的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-36和55中任一项所述的细胞或根据权利要求56-59中任一项所述的药物组合物。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述方法在所述受试者中减少肿瘤细胞的数量,减小肿瘤大小,和/或根除所述肿瘤。

62. 一种治疗和/或预防赘生物的方法,所述方法包括向受试者施用根据权利要求1-36和55中任一项所述的细胞或根据权利要求56-59中任一项所述的药物组合物。

63. 一种延长患有赘生物的受试者的存活的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-36和55中任一项所述的细胞或根据权利要求56-59中任一项所述的药物组合物。

64. 根据权利要求60-63中任一项所述的方法,其中所述肿瘤或赘生物是实体瘤。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述实体瘤选自间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、

乳腺癌、结肠癌、胸膜瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌(gastric cancer)、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃癌(stomach cancer)、胆管癌、及其组合。

66. 根据权利要求64或65所述的方法,其中所述实体瘤是间皮瘤。

67. 根据权利要求64或65所述的方法,其中所述实体瘤是肺癌。

68. 根据权利要求50-67中任一项所述的方法,还包括施用c-Kit抑制剂。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述c-Kit抑制剂选自达沙替尼(BMS-354825)、米哚妥林(PKC412)、普纳替尼、伊马替尼、及其组合。

70. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1-36和55中任一项所述的细胞、根据权利要求42-46中任一项所述的组合物、根据权利要求47-53中任一项所述的核酸组合物或根据权利要求54所述的载体。

71. 根据权利要求70所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染或传染病的书面说明书。

表达C-KIT突变的细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年12月3日提交的美国临时申请第62/943,032号的优先权,将其全部内容并入本文以供参考,并要求其优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且全部并入本文以供参考。所述ASCII副本创建于2020年12月3日,命名为0727341174_ST25,大小为57,790字节。

技术领域

[0005] 本公开的主题提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。它涉及包含c-Kit突变体例如包含激活突变的c-Kit突变体的细胞。该细胞还可以包含抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))。本公开的主题涉及使用细胞进行治疗,例如治疗癌症。

背景技术

[0006] 基于细胞的免疫疗法是一种具有治愈潜力的癌症治疗方法。通过引入编码天然或修饰的T细胞受体(TCR)或对于所选抗原具有特异性的称为嵌合抗原受体(CAR)的抗原的合成受体的遗传物质,可以修饰T细胞和其它免疫细胞以靶向肿瘤抗原。患者工程化的CAR T细胞已显示出对一系列液体和固体恶性肿瘤疗效显著。

[0007] 处于临床和临床前开发阶段的CAR主要使用共刺激结构域比如CD28或4-1BB。这些CAR的持久性,尤其是功能持久性已被证明与更好的收益有关。与现有的CAR相比,存在对于具有增强的增殖和持久性而没有共刺激结构域和/或具有改进的效率和活性的改进的CAR的未满足需求。

发明内容

[0008] 本公开的主题提供细胞,其包含:(a)与抗原结合的抗原识别受体,和(b)人c-Kit的突变体。在某些实施方式中,c-Kit突变体包含激活突变。

[0009] 在某些实施方式中,c-Kit是人c-Kit。在某些实施方式中,激活突变在人c-Kit的细胞内区域内。在某些实施方式中,细胞内区域包含人c-Kit的氨基酸544至977。

[0010] 在某些实施方式中,激活突变在人c-Kit的氨基酸816至826内。在某些实施方式中,激活突变在氨基酸位置816或氨基酸位置822处。

[0011] 在某些实施方式中,激活突变在人c-Kit的氨基酸550至570内。在某些实施方式中,激活突变在人c-Kit的氨基酸位置560处。

[0012] 在某些实施方式中,激活突变选自D816V、D816Y、D816H、D816F、N822K、V560G、或其组合。在某些实施方式中,激活突变包含D816V或由D816V组成。

[0013] 在某些实施方式中,人c-Kit包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:

1所示的氨基酸序列组成。

[0014] 在某些实施方式中,突变体包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或其部分或由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或其部分组成。在某些实施方式中,突变体由SEQ ID NO:2的氨基酸543至976组成。

[0015] 在某些实施方式中,c-Kit突变体与诱导型启动子可操作地连接。在某些实施方式中,诱导型启动子选自活化T细胞核因子(NFAT)、转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0016] 在某些实施方式中,c-Kit突变体增强细胞的细胞持久性。在某些实施方式中,c-Kit突变体减少细胞的凋亡或无反应性。

[0017] 在某些实施方式中,抗原识别受体是外源的或内源的。在某些实施方式中,抗原识别受体是重组表达的。在某些实施方式中,抗原识别受体由载体表达。在某些实施方式中,c-Kit突变体由载体表达。

[0018] 在某些实施方式中,细胞是免疫应答细胞。在某些实施方式中,细胞是淋巴谱系的细胞或骨髓谱系的细胞。在某些实施方式中,淋巴谱系的细胞选自T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞。在某些实施方式中,细胞是T细胞。在某些实施方式中,T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、 $\gamma\delta$ T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、调节性T细胞或自然杀伤T(NKT)细胞。

[0019] 在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原选自间皮素、CD19、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- α 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、 κ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、ERBB2、MAGEA3、CT83(也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、存活素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胎儿抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII和CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白、HPV E7癌蛋白和ERBB。在某些实施方式中,抗原是间皮素。

[0020] 在某些实施方式中,抗原识别受体选自T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)和TCR样融合分子。在某些实施方式中,抗原识别受体是CAR。在某些实施方式中,CAR包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导区。在某些实施方式中,至少一个共刺激信号传导区包含CD28多肽。在某些实施方式中,CAR不包含共刺激信号传导区。

[0021] 此外,本公开提供用于产生抗原特异性细胞的方法。在某些实施方式中,该方法包括将(a)编码与抗原结合的抗原识别受体的第一核酸序列;和(b)编码包含激活突变的c-Kit突变体的第二核酸序列引入细胞。在某些实施方式中,第一核酸序列与第一启动子可操作地连接。在某些实施方式中,第二核酸序列与第二启动子可操作地连接。在某些实施方式中,第一和第二核酸序列中的一个或两个包含在载体中。在某些实施方式中,载体是逆转录病毒载体。

[0022] 此外,本公开提供组合物,其包含:a)包含激活突变的人c-Kit的突变体;和b)与抗原结合的抗原识别受体。在某些实施方式中,c-Kit突变体与第一启动子可操作地连接。在某

些实施方式中,抗原识别受体与第二启动子可操作地连接。在某些实施方式中,第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。本公开还提供包含本文公开的组合物细胞的细胞。

[0023] 此外,本公开提供核酸组合物,其包含(a)编码与抗原结合的抗原识别受体的第一多核苷酸;和(b)编码包含激活突变的人c-Kit突变体的第二多核苷酸。在某些实施方式中,核酸组合物还包含与c-Kit突变体可操作地连接的第一启动子。在某些实施方式中,核酸组合物还包含与抗原识别受体可操作地连接的第二启动子。在某些实施方式中,第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。在某些实施方式中,第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在载体中。在某些实施方式中,载体是逆转录病毒载体。本公开还提供包含本文公开的核酸组合物的细胞。

[0024] 本公开还提供载体,其包含本文公开的核酸组合物。本公开还提供细胞,其包含本文公开的载体。

[0025] 本公开还提供包含本文公开的细胞和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方式中,所述组合物还包含c-Kit抑制剂。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂选自达沙替尼(BMS-354825)、米喹妥林(PKC412)、普纳替尼、伊马替尼、及其组合。在某些实施方式中,所述药物组合物用于治疗和/或预防赘生物、病原体感染或传染病。

[0026] 本公开还提供减少受试者的肿瘤负荷的方法。本公开还提供,所述方法包括向受试者施用本文公开的细胞或本文公开的药物组合物。在某些实施方式中,所述方法在受试者中减少肿瘤细胞的数量,减小肿瘤大小,和/或根除肿瘤。

[0027] 本公开还提供治疗和/或预防赘生物的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本文公开的细胞或本文公开的药物组合物。

[0028] 本公开还提供延长患有瘤形成的受试者的存活的方法。在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用本文公开的细胞或本文公开的药物组合物。

[0029] 在某些实施方式中,肿瘤或赘生物是实体瘤。在某些实施方式中,实体瘤选自间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌(gastric cancer)、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃癌(stomach cancer)、胆管癌、及其组合。在某些实施方式中,实体瘤是间皮瘤。在某些实施方式中,实体瘤是肺癌。

[0030] 在某些实施方式中,所述方法还包括施用c-Kit抑制剂。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂选自达沙替尼(BMS-354825)、米喹妥林(PKC412)、普纳替尼、伊马替尼、及其组合。

[0031] 此外,本公开提供包含本文公开的细胞、本文公开的组合物、本文公开的核酸组合物或本文公开的载体的试剂盒。在某些实施方式中,所述试剂盒还包含用于治疗和/或预防赘生物、病原体感染或传染病的书面说明书。

附图说明

[0032] 以下详细描述可以结合附图来理解,其以实例的方式给出,但不旨在将本公开的主题限制于所描述的特定实施方式。

[0033] 图1A和1B描述根据本公开主题的某些实施方式的组成。图1A中所示的组成,即

“M28z-KITv” (也称为M28z-KITm) 包含c-Kit突变体D816V和第二代CAR, 该第二代CAR包含抗间皮素 (MSLN) scFv、CD28跨膜结构域、CD28细胞质信号传导结构域、CD3 ζ 信号传导结构域。图1B中所示的组成, 即“Mz-KITv” 包含c-Kit突变体D816V和第一代CAR, 该第一代CAR包含抗间皮素 (MSLN) scFv、CD28跨膜结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。LTR代表长末端重复。

[0034] 图2描述各种构建体对T细胞的转导效率。

[0035] 图3A和3B描述M28z-KITv CAR-T组成性地表现出激活的pKIT信号传导。图3A描述蛋白质印迹结果, 显示M28z-KITv CAR-T在没有SCF的情况下表现出p-KIT活性, 而M28z不表达KIT蛋白。图3B描述M28z-KITv CAR-T表现出比M28z-KITwt对照更高的p-STAT3和p-STAT5活性

[0036] 图4描述连续共培养过程中CAR-T细胞的累积扩增。箭头表示用A549GM肿瘤细胞重复刺激T细胞的时间点 (E:T=3:1)。

[0037] 图5描述M28z CAR T细胞和M28z-KITm CAR T细胞的增强增殖。远红细胞追踪7天第一次抗原刺激 (E:T=2:1)。靶细胞是A549GM细胞。

[0038] 图6描述M28z CAR T细胞和M28z-KITm CAR T细胞的增殖。远红细胞追踪7天第一次抗原刺激 (E:T=2:1)。靶细胞是A549GM细胞。

[0039] 图7A和7B描述供体1中Mz CAR T细胞、M28z CAR T细胞、P28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞的溶细胞活性。图7A显示4小时的溶细胞活性。图7B显示18小时的溶细胞活性。靶细胞是高MSLN A549M细胞。

[0040] 图8A和8B描述每4天用靶细胞 (高MSLN A549GM细胞) 两次刺激 (E:T=3:1) 后, 供体2中的Mz CAR T细胞、M28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞的溶细胞活性。图8A显示第二次抗原刺激后4小时的溶细胞活性。图8B显示第二次抗原刺激后18小时的溶细胞活性。

[0041] 图9描述Mz CAR T细胞、M28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞的溶细胞活性。靶细胞是低MSLN A549G细胞。

[0042] 图10A和10B描述用A549GM细胞进行抗原刺激后M28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞的PD1表达。图10A显示CD4⁺ T细胞。图10B显示CD8⁺ T细胞。

[0043] 图11A和11B描述抗原刺激后的KITv CAR T细胞表型。图11A描述每4天用A546GM细胞刺激后M28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞的干细胞样记忆T细胞 (T_{SCM}) 细胞的表现 (E:T=3:1)。图11B描述在CAR T细胞与MSLN⁺细胞 (E:T=3:1) 共培养18小时后通过Luminex测定所评估的释放的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2。

[0044] 图12A-12D描述M28z CAR T细胞、Mz-KITv CAR T细胞或M28z-KITv CAR T细胞对低MSLN肺肿瘤的体内功效。已建立低MSLN A549G肺肿瘤的小鼠用包含M28z、Mz-KITv或M28z-KITv的单剂量 1×10^5 个T细胞治疗。UT代表未治疗的对照。图12A显示UT的结果。图12B显示M28z CAR T细胞的结果。图12C显示M28z-KITv CAR T细胞的结果。图12D显示Mz-KITv CAR T细胞的结果。

[0045] 图13A-13D描述包含M28z、Mz-KITv或M28z-KITv的T细胞对高MSLN肺肿瘤的体内功效。已建立高MSLN A549GM肺肿瘤的小鼠用包含M28z、Mz-KITv或M28z-KITv的单剂量 1×10^5 个T细胞治疗。UT代表未治疗的对照。图13A显示UT的结果。图13B显示M28z CAR T细胞的结果。图13C显示M28z-KITv CAR T细胞的结果。图13D显示Mz-KITv CAR T细胞的结果。

[0046] 图14A-14C描述图12A-12D和13A-13D中描述的体内治疗的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线。图14A描述已建立低抗原(间皮素)表达肺肿瘤的小鼠的存活曲线。图14B描述已建立高抗原(间皮素)表达肺肿瘤的小鼠的存活曲线。图14C描述低间皮素表达肺癌(A549G)和高间皮素表达肺癌(A549GM)中的间皮素表达水平的FACS测量。

[0047] 图15描述M28z CAR T细胞和M28z-KITv CAR T细胞对临床酪氨酸激酶抑制剂的敏感性。

[0048] 图16A-16C描述M28z、Mz-KITv或M28z-KITv CAR T细胞对高表达MSLN肺肿瘤的抗肿瘤活性。已建立高MSLN A549GM肺肿瘤的NSG小鼠用单剂量的 1×10^5 个M28z、M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞治疗。UT:未治疗的对照。图16A描述使用生物发光成像(BLI)在小鼠体内监测肿瘤负荷的结果。图16B和16C描述小鼠的Kaplan-Meier存活分析,表明不同CAR T细胞静脉注射给药的体内功效。*, $P < 0.05$ 。***, $P < 0.001$ 。

[0049] 图17A-17C描述M28z、Mz-KITv和M28z-KITv CAR T细胞对低表达MSLN肺肿瘤的抗肿瘤活性。已建立低MSLN A549G肺肿瘤的NSG小鼠用单剂量的 1×10^5 个M28z、M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞治疗。UT:未治疗的对照。图17A描述使用生物发光成像(BLI)在小鼠体内监测肿瘤负荷的结果。图17B和17C描述小鼠的Kaplan-Meier存活分析,表明不同CAR T细胞静脉注射给药的体内功效。**, $P < 0.01$ 。

[0050] 图18A和18B描述在胸膜间皮瘤模型中比较M28z、Mz-KITv或M28z-KITv CAR T细胞的胸膜内给药的体内功效的Kaplan-Meier存活分析。已建立高MSLN MGM间皮瘤的NSG小鼠用单剂量的 5×10^4 个P28z、Mz、M28z、M28z-KITv和Mz-KITv CAR T细胞治疗。*, $P < 0.05$ 。图18A描述所有组之间的比较。图18B描述M28z和M28z-KITv之间以及Mz和Mz-KITv组之间的比较。

[0051] 图19A和19B描述M28z、Mz-KITv和M28z-KITv CAR T细胞对低MSLN表达间皮瘤的抗肿瘤活性。图19A描述在MST0细胞中的低或高MSLN蛋白表达以分别产生MG-LM和MGM细胞。图19B描述已建立低MSLN间皮瘤(MG-LM)的NSG小鼠用单剂量的 5×10^4 个P28z、M28z、M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞治疗。Kaplan-Meier存活分析比较了不同CAR T细胞的胸膜内给药的体内功效。*, $P < 0.05$ 。**, $P < 0.01$ 。

[0052] 图20描述抗原刺激后CAR T细胞的p-ERK信号。与MGM细胞(E:T=1:2)共培养5分钟后,通过FACS测量CD4⁺和CD8⁺CAR T细胞的p-ERK水平。M28z-KITv和Mz-KITv的CAR T细胞的CD4和CD8均具有比M28z更强的p-ERK活性。

[0053] 图21A和21B描述从小鼠获得的CAR T细胞暴露于高间皮素表达的间皮瘤细胞并分析PD1表达。图21A描述不同E:T比下PD1表达的定量。图21B描述在不同E:T比下测量PD1表达的流式细胞术图。

[0054] 图22A和22B描述与M28z-KITv CAR T细胞中的表型和功能性T细胞特征相关的富集基因集。与MSLN⁺肿瘤细胞共培养24小时后,收集M28z和M28z-KITv的CD8 CAR T细胞,通过Nano String分析CAR T组的基因,每组n=3。图22A描述780个检测到的基因中有87个具有显著的倍数变化。图22B描述通路(Pathway)评分的热图,显示与M28z-KITv CAR T细胞中的表型和功能性T细胞特征相关的富集基因集。图22C提供在KIT CAR T细胞中上调的基因通路。

[0055] 图23A-23B描述与M28z CAR T细胞相比,M28z-KITv CAR T细胞中干扰素信号基因

的显著上调。与MSLN⁺癌细胞共培养24小时后,收集M28z和M28z-KITv的CD8 CAR T细胞,通过NanoString分析CAR T组的基因,每组n=3。I型干扰素信号传导基因(图23A)和II型干扰素信号传导基因(图23B)的表达在M28z-KITv CAR T细胞中显著增加。

具体实施方式

[0056] 本公开的主题提供包含c-Kit突变体的细胞,其中c-Kit突变体包含激活突变。细胞可以是基因修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞),细胞包含抗原识别受体(例如,T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))。本公开的主题还提供使用这种细胞用于诱导和/或增强对靶抗原的免疫应答,和/或用于治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染或其他疾病/病症(例如,需要增加抗原特异性免疫应答的疾病/病症)。本公开的主题至少部分基于以下发现:c-Kit突变体(例如,c-KitD816V)可以增强包含抗原识别受体(例如,CAR)的细胞(例如,T细胞)的细胞增殖。

[0057] 本公开的非限制性实施方式通过本说明书和实施例进行描述。

[0058] 出于使本公开清楚的目的,而不是通过限制的方式,将详细描述分为以下小节:

[0059] 5.1.定义;

[0060] 5.2.c-Kit突变体;

[0061] 5.3.细胞;

[0062] 5.4.抗原识别受体;

[0063] 5.5.显性失活形式的程序性死亡受体1(PD-1 DN)

[0064] 5.6.组合物和载体;

[0065] 5.7.多肽和类似物;

[0066] 5.8.给药;

[0067] 5.9.剂型;

[0068] 5.10.治疗方法;和

[0069] 5.11.试剂盒

[0070] 5.1.定义

[0071] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献为本领域技术人员提供本公开的主题中使用的许多术语的一般定义: Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第二版,1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编,1988);The Glossary of Genetics,第五版,R.Rieger等(编),Springer Verlag(1991);和Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。除非另有说明,本文使用的以下术语具有下文给出的含义。

[0072] 本文使用的术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,根据本领域的惯例,“约”可以指在3个或多于3个标准偏差内。或者,“约”可以表示给定值的至多20%,例如至多10%、至多5%、或至多1%的范围。或者,特别是关于生物系统或过程,该术语可以表示在数值的一个数量级内,例如在5倍以内、或在2倍以内。

[0073] “免疫应答细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞或其祖细胞或其后代。

[0074] “激活免疫应答细胞”是指信号转导的诱导或细胞中蛋白质表达的变化,导致免疫应答的启动。例如,当CD3链响应于配体结合和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITAM)聚集时,就会产生信号转导级联反应。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,其包括在结合受体(例如,CD4或CD8,CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近的许多分子的聚集。膜结合信号传导分子的这种聚集使CD3链中包含的ITAM基序磷酸化。该磷酸化反过来启动了T细胞激活通路,最终激活转录因子,例如NF- κ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的整体基因表达,从而增加IL-2的产生,促进主调节T细胞蛋白的增殖和表达,进而启动T细胞介导的免疫应答。

[0075] “刺激免疫应答细胞”是指导致强烈和持续的免疫应答的信号。在各种实施方式中,这发生在免疫细胞(例如,T细胞)激活之后或通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体同时介导。接收多种刺激信号对于建立强烈且长期的T细胞介导的免疫应答可能很重要。T细胞可以迅速被抑制并且对抗原无应答。尽管这些共刺激信号的作用可能有所不同,但它们通常会导致基因表达增加,从而产生长寿、增殖性和抗凋亡性T细胞,其对抗原应答强烈,可彻底和持续根除。

[0076] 如本文所用,术语“抗原识别受体”是指能够在应答其与抗原结合时能够激活免疫或免疫应答细胞(例如,T细胞)。

[0077] 本文使用的术语“抗体”不仅指完整的抗体分子,而且指保留免疫原结合能力的抗体分子片段。此类片段在本领域中也是众所周知的,并且在体外和体内常规使用。因此,本文使用的术语“抗体”不仅指完整的免疫球蛋白分子,而且指众所周知的活性片段F(ab')₂和Fab。F(ab')₂和缺少完整抗体的Fc片段的Fab片段,更快地从循环中清除,并且可能具有更少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等,J Nucl Med(1983);24:316-325)。如本文所用,抗体包括完整天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链可变片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。在某些实施方式中,抗体是糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文中简称为V_H)和重链恒定(C_H)区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中简称为V_L)和轻链恒定C_L区组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。V_H区和V_L区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布有更保守的区,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0078] 如本文所用,“CDR”定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,美国国立卫生研究院卫生与公共服务部(1987)。通常,抗体在可变区中包含三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR提供大多数接触残基,以使抗体与抗原或表位结合。在某些实施方式中,使用Kabat系统(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services(1991);NIH公开号91-3242)标注CDR区域。

[0079] 本文使用的术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的

可变区的融合蛋白,其共价连接形成 V_H : V_L 异源二聚体。 V_H 和 V_L 直接连接或通过肽编码接头(例如,10、15、20、25个氨基酸)连接,其将 V_H 的N末端与 V_L 的C-末端连接或将 V_H 的C末端与 V_L 的N末端连接。接头通常富含甘氨酸以提高灵活性,以及丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度。本文使用的“接头”应指共价连接两个或多个多肽或核酸以使它们彼此连接的官能团(例如,化学物质或多肽)。本文使用的“肽接头”是指用于将两种蛋白质偶联在一起(例如,偶联 V_H 和 V_L 结构域)的一个或多个氨基酸。在某些实施方式中,接头包含SEQ ID NO:16所示的序列,其在下文提供:

[0080] GGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 16]。

[0081] 在某些实施方式中,编码SEQ ID NO:16的氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示,其在下文提供:

[0082] GGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCA [SEQ ID NO: 17]。

[0083] 在某些实施方式中,编码SEQ ID NO:16的氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示,其在下文提供:

[0084] GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCA [SEQ ID NO: 18]。

[0085] 尽管去除了恒定区并引入了接头,scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由如Huston等,Proc Nat Acad Sci USA, (1988);85:5879-5883;美国专利第5,091,513号、第5,132,405号和第4,956,778号以及美国专利公开号20050196754和20050196754所述的包括 V_H 和 V_L 编码序列的核酸表达。已经描述具有抑制活性的拮抗性scFv (Zhao等,Hybridoma (Larchmt) 2008;27 (6):455-51;Peter等,J Cachexia Sarcopenia Muscle (2013);4 (1):79-86;Shieh等,J Immunol (2009);183 (4):2277-85;Giomarelli等,Thromb Haemost (2007);97 (6):955-63;Fife等,J C I (2006);116 (8):2252-61;Brocks等,Immunotechnology (1997);3 (3):173-84;Moosmayer等,Ther Immunol (1995);2 (10):31-40)。已经描述具有刺激活性的激动性scFv (Peter等,J Biol Chem (2003);25278 (38):36740-7;Xie等,Nat Biotech (1997);15 (8):768-71;Ledbetter等,Crit Rev Immunol (1997);17 (5-6):427-55;Ho等,BioChem Biophys Acta (2003);1638 (3):257-66)。

[0086] 如本文所用,术语“亲和力”是指结合强度的量度。亲和力可以取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学拟合的紧密程度、它们之间的接触面积的大小和/或带电基团和疏水基团的分布。如本文所用,术语“亲和力”还包括“亲合力”,其是指形成可逆复合物后抗原-抗体键的强度。用于计算抗体对抗原的亲合力的方法是本领域已知的,包括但不限于各种抗原结合实验,例如功能性测定(例如流式细胞术测定)。

[0087] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包含与能够激活或刺激免疫应答细胞的细胞内信号传导结构域融合的细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域的分子。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含scFv。scFv可以源自融合抗体的可变重和轻区。替代地或另外,scFv可以衍生自Fab's (而不是抗体,例如获自Fab文库)。在某些实施方式中,将scFv融合至跨膜结构域,然后融合至细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,选择CAR以对抗原具有高结合亲和力或亲合力。

[0088] 如本文所用,术语“核酸分子”包括编码目的多肽的任何核酸分子。这种核酸分子不需要与内源性核酸序列具有100%同源性或同一性,但可以表现出实质同一性。

[0089] 与内源性序列具有“实质同一性”或“实质同源性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在各种严格条件下在互补多核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间形成双链分子的配对。(Wahl等,Methods Enzymol (1987);152:399;Kimmel,Methods Enzymol (1987);152:507)。

[0090] 例如,严格的盐浓度通常将小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,例如小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。在没有有机溶剂例如甲酰胺的情况下可以获得低严格度的杂交,而在至少约35%的甲酰胺,例如至少约50%的甲酰胺的存在下可以获得高严格度的杂交。严格的温度条件通常将包括至少约30℃,至少约37℃,或至少约42℃的温度。改变其它参数,例如杂交时间、去污剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度、以及包含或排除载体DNA是本领域技术人员众所周知的。通过根据需要组合这些各种条件来实现各种严格度。在某些实施方式中,杂交将在30℃下750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中进行。在某些实施方式中,杂交将在37℃下500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%SDS、35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中进行。在某些实施方式中,杂交将在42℃下250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中进行。在这些条件下有用的变化对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0091] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤的严格度也会有所不同。洗涤严格条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上所述,可以通过降低盐浓度或通过提高温度来提高洗涤严格度。例如,洗涤步骤的严格盐浓度可以小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,例如,小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常将包括至少约25℃,至少约42℃或至少约68℃的温度。在某些实施方式中,洗涤步骤将在25℃下30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中,洗涤步骤将在42℃下15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中,洗涤步骤将在68℃下15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。这些条件的其它变化对于本领域技术人员将是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员众所周知的,并且进行了描述(Benton等,Science (1977);196:180;Grunstein等,Proc Natl Acad Sci,USA (1975);72:3961;Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology (2001);Wiley Interscience,New York;Berger等,Guide to Molecular Cloning Techniques (1987);Academic Press,New York)和Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(1987);Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York)。

[0092] “基本同一性”或“基本同源性”是指与参考氨基酸序列(例如,本文所述的氨基酸序列中任一个)或核酸序列(例如,本文所述的核酸序列中任一个)表现出至少约50%同源性或同一性的多肽或核酸分子。在某些实施方式中,这样的序列与用于比较的氨基酸或核酸的序列具有至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性。

[0093] 序列同一性可以通过使用序列分析软件(例如,威斯康星大学生物技术中心遗传学计算机组的序列分析软件包,威斯康星州麦迪逊市53705大学大道1710号,BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)进行测量。这样的软件通过将同源性程度赋予各种取代、缺失和/或其它修饰来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨

酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中，可以使用BLAST程序，其中e-3和e-100之间的概率得分指示密切相关的序列。

[0094] “类似物”是指具有参考多肽或核酸分子功能的结构相关的多肽或核酸分子。

[0095] 如本文所用，术语“配体”是指与受体结合的分子。在某些实施方式中，配体与另一细胞上的受体结合，从而允许细胞间识别和/或相互作用。

[0096] 如本文所用，术语“组成型表达”或“组成型表达的”是指在所有生理条件下表达或表达的。

[0097] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何状况、疾病或病症，例如瘤形成和细胞的病原体感染。

[0098] “有效量”是指足以具有治疗作用的量。在某些实施方式中，“有效量”是足以阻止、改善或抑制瘤形成的持续增殖、生长或转移（例如，侵袭或迁移）的量。

[0099] “增强耐受性”是指阻止靶向移植器官或组织的自反应性细胞或免疫应答性细胞的活性。

[0100] “内源性”是指通常在细胞或组织中表达的核酸分子或多肽。

[0101] “外源性”是指不是内源性存在于细胞中的核酸分子或多肽。因此，术语“外源性”将涵盖在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽，例如外源、异源和过表达的核酸分子和多肽。“外源性”核酸是指天然野生型细胞中不存在的核酸。例如，外源性核酸可通过序列、位置/定位或两者而不同于内源性对应物。为了清楚起见，外源性核酸相对于其天然内源性对应物可以具有相同或不同的序列。可以通过遗传工程将其引入细胞本身或其祖细胞，并且可以任选地将其连接至替代控制序列，例如非天然启动子或分泌序列。

[0102] “异源核酸分子或多肽”是指通常不存在于细胞或得自细胞的样品中的核酸分子（例如cDNA、DNA或RNA分子）或多肽。该核酸可以来自另一个生物，或者可以是例如通常不在细胞或样品中表达的mRNA分子。

[0103] “调节”是指正或负改变。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0104] “增加”是指正改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0105] “减少”是指负改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0106] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯净的”是指物质在不同程度上不含在其原始状态下通常与其伴随的组分。“分离”表示与原始来源或环境的分离度。“纯化”表示高于分离的分离度。“纯化的”或“生物纯净的”蛋白质基本不含其它物质，以使任何杂质均不会实质性地影响蛋白质的生物学特性或引起其它不利后果。也就是说，如果核酸或肽通过重组DNA技术生产而基本不含细胞材料、病毒材料或培养基，或者通过化学合成而基本不含化学前体或其它化学品，则其是纯化的。纯度和均质性通常使用分析化学技术确定，例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。对于可以进行修饰（例如磷酸化或糖基化）的蛋白质，不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质，可以将其分别纯化。

[0107] “分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0108] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合细胞上存在的特定抗原决定簇或抗原决定簇组的结构域。

[0109] “赘生物”是指以细胞或组织的病理性增生及其随后向其它组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。肿瘤的生长通常是不受控制的和进行性的,并且在不引起正常细胞增殖或者导致正常细胞增殖停止的条件下发生。赘生物可影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自以下的器官:膀胱、骨骼、大脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道,子宫和阴道、或其组织或细胞类型。瘤形成包括癌症,例如肉瘤、肿瘤或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。在某些实施方式中,赘生物是癌症。在某些实施方式中,赘生物是实体瘤。

[0110] “受体”是指存在于细胞膜上的选择性地结合一个或多个配体的多肽或其一部分。

[0111] “识别”是指选择性地结合靶标。识别肿瘤的T细胞可以表达与肿瘤抗原结合的受体(例如TCR或CAR)。

[0112] “参考”或“对照”是指比较的标准。例如,可以将表达CAR和scFv的细胞的scFv-抗原结合水平与仅表达CAR的相应细胞的scFv-抗原结合水平进行比较。

[0113] “分泌的”是指多肽通过分泌通路通过内质网、高尔基体、以及作为在细胞质膜上瞬时融合从而将蛋白质释放到细胞外的囊泡而从细胞释放。

[0114] “信号序列”或“前导序列”是指存在于新合成的蛋白质的N-末端,指导它们进入分泌通路的肽序列(例如5、10、15、20、25或30个氨基酸)。示例性前导序列包括但不限于IL-2信号序列:MYRMQLLSICIALSLALVTNS[SEQ ID NO:43](人)、MYSMQLASCVTLTLLVLLVNS[SEQ ID NO:44](小鼠);κ前导序列:METPAQLLFLLLLWLPDTTG[SEQ ID NO:45](人)、METDTLLLWVLLLWVPGSTG[SEQ ID NO:46](小鼠);CD8前导序列:MALPVTALLPLALLLHAARP[SEQ ID NO:47](人);截短的人CD8信号肽:MALPVTALLPLALLLHA[SEQ ID NO:48](人);白蛋白信号序列:MKWVTFISLLFSSAYS[SEQ ID NO:49](人);和催乳素信号序列:MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNNLLCQGVVS[SEQ ID NO:20](人)。“可溶的”是指在水性环境中可自由扩散的多肽(例如,不是膜结合的)。

[0115] “特异性结合”是指多肽或其片段识别并结合目的生物分子(例如多肽)但基本上不识别并结合样品(例如生物样品,其自然包括本公开的多肽)中其它分子。

[0116] 术语“包含”,“包括”旨在具有美国专利法中赋予它们的广义含义,并且可以表示“含有”,“包含”等。

[0117] 如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的治疗作用包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态、和缓解或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗不仅可以预防在受影响或诊断的受试者或怀疑患有该病症的受试者中由于病症引起的恶化,而且治疗可以在有患病症或怀疑患有该病症风险的受试者中预防该病症的发作或该病症的症状。

[0118] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、灵长类动物、农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。非人动物受试者

的非限制性实例包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;牛;马;和非人灵长类动物,例如猿和猴子。如本文所用,术语“免疫受损的”是指具有免疫缺陷的受试者。该受试者非常容易遭受机会性感染,这种感染是由通常不会在免疫系统健康的人中引起疾病的生物体引起的,但是会影响免疫系统功能差或免疫系统受抑制的人。

[0119] 在以下公开中描述本发明公开主题的其它方面,并且在本发明公开主题的范围

内。

[0120] 5.2.c-Kit突变体

[0121] 原癌基因KIT是一种受体酪氨酸激酶蛋白质,也称为CD117;KIT;PBT;干细胞生长因子受体(SCFR);MASTC。GenBank ID:3815(人)、16590(小鼠)。KIT的蛋白质产物包括但不限于NCBI参考序列NP_000213(人同工型1)、NP_001122733(小鼠同工型1)。

[0122] c-Kit,称为CD117,是一种细胞因子受体,表达于造血干细胞以及其它细胞类型的表面。通过c-Kit的信号传导在细胞存活、增殖和分化中起作用(Ceredig等,Nat Rev Immunol (2002);2(11):888-97)。

[0123] c-Kit与干细胞因子(SCF)结合。结合后,c-Kit和SCF形成二聚体,激活其内在的酪氨酸激酶活性,进而磷酸化和激活在细胞中传递信号的信号转导分子。本公开的c-Kit激活突变(例如,D816V突变)导致不存在SCF的组成型激活,例如,不形成cKit/SCF二聚体(Hirota等,Science (1998);279(5350):577-80;Kitamura等,Mut Res (2001):165-71)。

[0124] 在某些实施方式中,c-Ki突变体是人c-Kit突变体。在某些实施方式中,人c-Kit蛋白质包含具有NCBI参考号NP_000213(SEQ ID NO:1)的序列或由具有NCBI参考号NP_000213(SEQ ID NO:1)的序列组成。SEQ ID NO:1在下文提供。

[0125]

```
1 MRGARGAWDF LCVLLLLLRV QTGSSQPSVS PGEPSPPSIH PGKSDLIVRV GDEIRLLCTD
61 PGFVKWTFEI LDETENENQN EWITEKAEAT NTGKYTCTNK HGLSNSIYVF VRDPAKLFLV
121 DRSLYGKEDN DTLVRCPLTD PEVTNYSKLG CQGKPLPKDL RFIPDPKAGI MIKSVKRAYH
181 RLCLHCSVDQ EGKSVLSEKF ILKVRPAFKA VPVVSVSKAS YLLREGEEFT VTCTIKDVSS
241 SVYSTWKREN SQTKLQEKYN SWHHGDFNYE RQATLTISA RVNDSGVFMC YANNTFGSAN
301 VTTTLEVVVDK GFINIFPMIN TTVFVNDGEN VDLIVEYEAF PKPEHQWYIY MNRTFTDKWE
361 DYPKSENESEN IRYVSELHLT RLKGTEGGTY TFLVSNSDVN AAI AFNVYVN TKPEILTYDR
421 LVNGMLQCVA AGFPEPTIDW YFCPGTEQRC SASVLPVDVQ TLNSSGPPFG KLVVQSSIDS
481 SAFKHNGTVE CKAYNDVGKT SAYFNFAFKG NNKEQIHPHT LFTPLLIGFV IVAGMMCIIIV
541 MILTYKYLQK PMYEVQWKVV EEINGNNYVY IDPTQLPYDH KWEFPRNRLS FGKTLGAGAF
601 GKVVEATAYG LIKSDAAMTV AVKMLKPSAH LTEREALMSE LKVLSYLG NH MNIVNLLGAC
661 TIGGPTLVIT EYCCYGDLLN FLRRKRDSFI CSKQEDHAEA ALYKNLLHSK ESSCSDSTNE
721 YMDMKPGVSY VVPTKADKRR SVRIGSYIER DVT PAIMEDD ELALDLEDLL SFSYQVAKGM
781 AFLASKNCIH RDLAARNILL THGRITKICD FGLARDIKND SNYVVKGNAR LPVKWMAPE
841 IFNCVYTFES DVWSYGIFLW ELFSLGSSPY PGMPVDSKFY KMIKEGFRML SPEHAPAEMY
901 DIMKTCWDAD PLKRPTFKQI VQLIEKQISE STNHIYSNLA NCSPNRQKPV VDHSVRINSV
961 GSTASSSQPL LVHDDV [SEQ ID NO: 1]
```

[0126] 本公开的主题的细胞包含c-Kit突变体。在某些实施方式中,c-Kit突变体包含激活突变。

[0127] 在某些实施方式中,激活突变是功能获得性突变。在某些实施方式中,激活突变是其基因产物与没有这种突变的基因产物(例如,野生型蛋白质)相比由增强的作用组成的突变。

[0128] 在某些实施方式中,激活突变(例如,D816V突变)存在于造血细胞的早期谱系中,并且在成熟过程中丢失。在某些实施方式中,c-Kit的激活突变导致c-Kit激活独立于c-Kit与其配体(例如,SCF)的相互作用。在某些实施方式中,c-Kit的激活突变导致在不

Kit配体例如SCF情况下的c-Kit激活。在某些实施方式中,c-Kit的激活突变导致c-Kit的组成型激活。在某些实施方式中,c-Kit的激活突变导致c-Kit激活独立于酪氨酸磷酸酶-1 (SHP-1) 和/或酪氨酸磷酸酶-2 (SHP-2) 的抑制。在某些实施方式中,c-Kit的激活突变导致在SHP-1和/或SHP-2抑制存在下c-Kit激活。

[0129] c-Kit的激活突变促进包含c-Kit突变体的细胞的增殖和抗凋亡。c-Kit的激活突变使包含c-Kit突变体的细胞对PD-L1/2-PD-1抑制具有抗性。

[0130] 在某些实施方式中,激活突变在人cKIT例如由SEQ ID NO:1所示氨基酸序列组成的人cKIT的细胞内区域内。在某些实施方式中,人cKIT的细胞内区域包含SEQ ID NO:1的氨基酸544至977。在某些实施方式中,激活突变在人cKIT例如由SEQ ID NO:1所示氨基酸序列组成的人cKIT的氨基酸816至826内。在某些实施方式中,激活突变在氨基酸位置816或氨基酸位置822处。在某些实施方式中,激活突变在人cKIT例如由SEQ ID NO:1所示氨基酸序列组成的人cKIT的氨基酸550至570内。在某些实施方式中,激活突变在氨基酸位置560处。c-Kit激活突变的非限制性实例包括D816V、D816Y、D816H、D816F、N822K、V560G、或其组合。在某些实施方式中,激活突变是D816V。

[0131] c-Kit突变体可以与启动子可操作地连接。启动子可以是内源性的或外源性的。外源性启动子的非限制性实例包括延伸因子 (EF) -1启动子、巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV) 启动子、猿病毒40早期启动子 (SV40) 启动子、磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子和金属硫蛋白启动子。在某些实施方式中,启动子是诱导型启动子。诱导型启动子的非限制性实例选自NFAT转录应答元件 (TRE) 启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。诱导型启动子可以控制c-Kit的激活,例如,在诱导型启动子的控制下,c-Kit仅在包含c-Kit突变体的细胞(例如,T细胞或CAR-T细胞)被激活时才被激活。

[0132] 在某些实施方式中,c-Kit突变体包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同一性的氨基酸序列或其部分,或由其组成。在某些实施方式中,c-Kit突变体包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或其部分,或由其组成。在某些实施方式中,c-Kit突变体包含SEQ ID NO:2的连续部分的氨基酸序列或由其组成,该SEQ ID NO:2的连续部分的长度为至少50、或至少100、或至少150、或至少200、或至少250、或至少300、或至少350、或至少400、或至少450、或至少500、或至少550、或至少600、或至少650、或至少700、或至少750、或至少800、或至少850、或至少900、或至少950且至多976个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,c-Kit突变体包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至976、1至200、400至976、500至976或543至976的氨基酸序列,或由其组成。在某些实施方式中,c-Kit突变体包含SEQ ID NO:2的氨基酸543至976,或由其组成。

[0133] SEQ ID NO:2在下文提供。

1 MRGARGAWDF LCVLLLLLRV QTGSSQPSVS PGEPSPPSIH PGKSDLIVRV GDEIRLLCTD
 61 PGFVKWTFEI LDETENENKQN EWITEKAEAT NTGKYTCTNK HGLSNSIYVF VRDPAKLFLV
 121 DRSLYGKEDN DTLVRCPLTD PEVTNYSKLG CQGKPLPKDL RFIPDPKAGI MIKSVKRAYH
 181 RLCLHCSVDQ EGKSVLSEKF ILKVRPAFKA VPVVSVSKAS YLLREGEEFT VTCTIKDVSS
 241 SVYSTWKREN SQTQLQEKYN SWHHGDFNYE RQATLTISSA RVNDSGVPMC YANNTFGSAN
 301 VTTTLEVVVDK GFINIFPMIN TTVFVNDGEN VDLIVEYEAF PKPEHQQWIY MNRTFTDKWE
 361 DYPKSENESEN IRYVSELHLT RLKGTEGGTY TFLVNSSDVN AAIAFNVYVN TKPEILTYDR
 421 LVNGMLQCVA AGFPEPTIDW YFCPGTEQRC SASVLPVDVQ TLNSSGPPFG KLVVQSSIDS
 [0134] 481 SAFKHNGTVE CKAYNDVGKT SAYFNFAFKG NNKEQIHPHT LFTPLLIGFV IVAGMMCIIV
 541 MILTYKYLQK PMYEVQWKVV EEINGNNYVY IDPTQLPYDH KWEFPRNRLS FGKTLGAGAF
 601 GKVVEATAYG LIKSDAAMTV AVKMLKPSAH LTEREALMSE LKVLSYLG NH MNIVNLLGAC
 661 TIGGPTLVIT EYCCYGDLLN FLRRKRDSFI CSKQEDHAEA ALYKNLLHSK ESSCSDSTNE
 721 YMDMPGVSY VVPTKADKRR SVRIGSYIER DVTFAIMEDD ELALDLEDLL SFSYQVAKGM
 781 AFLASKNCIH RDLAARNILL THGRITKICD FGLARVIKND SNYVVKGNAR LPVKWMAPE
 841 IFNCVYTFES DVWSYGIFLW ELFSLGSSPY PGMPVDSKFY KMIKEGFRML SPEHAPAEMY
 901 DIMKTCWDAD PLKRPTFKQI VQLIEKQISE STNHIYSNLA NCSPNRQKPV VDHSVRINSV
 961 GSTASSSQPL LVHDDV [SEQ ID NO: 2]

[0135] 5.3. 细胞

[0136] 本公开的主题提供包含本文公开的c-Kit突变体的细胞(例如,第5.2节中公开的一种)。在某些实施方式中,c-Kit突变体是外源性c-Kit突变体。

[0137] 在某些实施方式中,细胞选自淋巴谱系细胞和骨髓谱系细胞。在某些实施方式中,细胞是免疫应答细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是淋巴谱系的细胞。

[0138] 在某些实施方式中,细胞是淋巴谱系的细胞。淋巴谱系的细胞可以提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外来物质的检测、宿主外来细胞的检测等。淋巴谱系细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、树突状细胞、可分化成淋巴样细胞的干细胞。在某些实施方式中,干细胞是多能干细胞(例如,胚胎干细胞)。

[0139] 在某些实施方式中,细胞是T细胞。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。本发明公开主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞)、和两种效应记忆T细胞:例如 T_{EM} 细胞和 T_{EMRA} 细胞)、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤性T细胞、粘膜相关性不变T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导被感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞的一个子集。患者自身的T细胞可以被基因改造以通过抗原识别受体(例如CAR或TCR)的引入靶向特定的抗原。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。T细胞可以是 $CD4^+$ T细胞或 $CD8^+$ T细胞。在某些实施方式中,T细胞是 $CD8^+$ T细胞。

[0140] 在某些实施方式中,细胞是NK细胞。自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,它是细胞介导的免疫力的一部分,并在先天免疫应答中起作用。NK细胞不需要事先激活即可对靶细胞执行细胞毒作用。

[0141] 本发明公开主题的人淋巴细胞的类型包括但不限于外周供体淋巴细胞,例如在Sadelain等,Nat Rev Cancer(2003);3:35-45(公开了经遗传修饰以表达CAR的外周供体淋巴细胞),在Morgan,R.A.等,2006 Science 314:126-129(公开了经遗传修饰以表达包含 α 和 β 异二聚体的全长肿瘤抗原识别性T细胞受体复合物的外周供体淋巴细胞),在Panelli,等.J Immunol(2000);164:495-504;Panelli,等.J Immunol(2000);164:4382-4392(公开了在肿瘤活组织检查中衍生自肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物)和在Dupont,等.Cancer Res(2005):65:5417-5427;Papanicolaou,等.Blood(2003):102:2498-2505(选

择性地公开了使用人工抗原呈递细胞 (AAPC) 或脉冲树突状细胞在体外扩增的抗原特异性外周血白细胞) 中公开的那些。

[0142] 细胞 (例如, T细胞) 可以是自体的、非自体的 (例如, 同种异体的)、或者是体外从工程化的祖细胞或干细胞衍生的。在某些实施方式中, 细胞是同种异体的。

[0143] 本公开主题的细胞可以是骨髓谱系的细胞。骨髓谱系细胞的非限制性实例包括单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、肥大细胞、红细胞、血小板和可分化成骨髓细胞的干细胞。

[0144] 在某些实施方式中, 干细胞是多能干细胞 (例如, 胚胎干细胞或诱导的多能干细胞)。

[0145] 在某些实施方式中, 本公开的细胞能够调节肿瘤微环境。肿瘤具有对宿主免疫应答不利的微环境, 该微环境涉及恶性细胞保护自身免受免疫识别和消除的一系列机制。这种“不利的肿瘤微环境”包含多种免疫抑制因子, 其包括浸润性调节性CD4⁺ T细胞 (Tregs)、髓样衍生抑制细胞 (MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)、包括TGF- β 在内的免疫抑制细胞因子、以及靶向由活化的T细胞表达的免疫抑制受体 (CTLA-4和PD-1) 的配体的表达。这些免疫抑制机制在维持耐受性和抑制不适当的免疫应答中起作用, 但是在肿瘤微环境内, 这些机制阻止了有效的抗肿瘤免疫应答。这些免疫抑制因子在遇到目标肿瘤细胞后, 可以共同诱导过继转移的CAR修饰的T细胞明显的无反应性或凋亡。

[0146] 在某些实施方式中, 本公开的细胞具有增加的细胞增殖和/或细胞持久性。在某些实施方式中, 本公开的免疫应答细胞具有降低的细胞凋亡和/或无反应性。

[0147] 在某些实施方式中, 细胞还包含与抗原结合的抗原识别受体 (例如, CAR或TCR)。细胞可以用抗原识别受体和c-Kit突变体外源性激活转导, 使得细胞共表达抗原识别受体和c-Kit突变体。

[0148] c-Kit突变体可以与第一启动子可操作地连接。抗原识别受体可以与第二启动子可操作地连接。第一启动子可以与第二启动子相同。或者, 第一启动子与第二启动子不同。第一和第二启动子可以是内源性或外源性的。外源性启动子的非限制性实例包括延伸因子 (EF) -1启动子、巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV) 启动子、猿病毒40早期启动子 (SV40) 启动子、磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子和金属硫蛋白启动子。在某些实施方式中, 第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。诱导型启动子的非限制性实例选自NFAT转录应答元件 (TRE) 启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0149] 5.4抗原识别受体

[0150] 在某些实施方式中, 本公开的细胞还包含抗原识别受体。在某些实施方式中, 抗原识别受体与抗原结合。在某些实施方式中, 抗原识别受体是嵌合抗原受体 (CAR)。在某些实施方式中, 抗原识别受体是T细胞受体 (TCR)。在某些实施方式中, 抗原识别受体是TCR样融合分子。

[0151] 5.4.1. 抗原

[0152] 抗原识别受体可以与肿瘤抗原或病原体抗原结合。

[0153] 在某些实施方式中, 抗原识别受体与肿瘤抗原结合。任何肿瘤抗原 (抗原性肽) 均可用于本文所述的肿瘤相关实施方式中。抗原来源包括但不限于癌蛋白。抗原可以表达为肽或完整蛋白质或其部分。完整蛋白质或其部分可以是天然的或诱变的。在某些实施方式

中,抗原在肿瘤组织中表达。在某些实施方式中,肿瘤抗原的非限制性实例包括间皮素、CD19、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- α 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R- α 2、 κ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、ERBB2、MAGEA3、CT83(也称为KK-LC-1)、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、存活素、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胎儿抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII和CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6癌蛋白、HPV E7癌蛋白和ERBB。在某些实施方式中,肿瘤抗原是间皮素。

[0154] 在某些实施方式中,抗原识别受体与间皮素结合。在某些实施方式中,抗原识别受体与由具有NCBI参考号:AAV87530.1(SEQ ID NO:3)的序列组成的人间皮素或其片段结合。SEQ ID NO:3在下文提供:

[0155] MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGFP
CAEVSGSLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTHF
FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLSEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS
CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGPPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS
WRQPRTILR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD
VLKHKLDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ VATLIDRFVK
GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVFPSSIWAV RPQDLDTCDP RQLDVLYPKA RLAFQNMNGS
EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSMDL ATFMKLRTDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR
DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSVQEALSGT PCLLGPGPVL TVLALLLAST LA [SEQ ID
NO:3]

[0156] 在某些实施方式中,抗原识别受体与病原体抗原结合,例如用于治疗 and/或预防病原体感染或其他传染病,例如在免疫功能低下的受试者中。病原体的非限制性实例包括能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫和原生动物。

[0157] 病毒的非限制性实例包括逆转录病毒科(Retroviridae)(例如,人免疫缺陷病毒,例如HIV-1(也称为HDTV-III、LAVE或HTLV-III/LAV或HIV-III;以及其它分离株,例如HIV-LP);小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)(例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);杯状病毒科(Calciviridae)(例如引起肠胃炎的菌株);披膜病毒科(Togaviridae)(例如马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(Flaviridae)(例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒);冠状病毒科(Coronaviridae)(例如冠状病毒);弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如水疱性口炎病毒、狂犬病病毒);丝状病毒科(Filoviridae)(例如埃博拉病毒);副粘病毒科(Paramyxoviridae)(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒);正粘病毒科(Orthomyxoviridae)(例如流行性感感冒病毒);布尼亚病毒科(Bunyaviridae)(例如汉坦病毒、bunga病毒、静脉病毒和奈拉病毒);沙粒病毒科(Arenaviridae)(出血热病毒);呼肠病毒科(Reoviridae)(例如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒);双RNA病毒科(Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)(乙型肝炎病毒);细小病毒科(Parvoviridae)(细小病毒);乳多空病毒科(Papovaviridae)(乳头瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒科(Adenoviridae)(大多数腺病毒);疱疹病毒科(Herpesviridae)(单纯疱疹病毒(HSV)1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒);痘病毒科(Poxviridae)(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒);和虹膜病毒科(Iridoviridae)(例如非洲猪瘟病毒);以及未分类的病毒(例如,丁型肝炎的病原体(被认为是乙肝病毒的缺陷卫星),非甲、非乙型肝炎的病原体(类1=内部传播;类2=经肠胃外传播(即,丙型肝炎);诺沃克和相关病毒,以及

星状病毒),人乳头瘤病毒(即HPV)、JC病毒、EB(Epstein Bar)病毒、Merkel细胞多瘤病毒。

[0158] 细菌的非限制性实例包括葡萄球菌(*Staphylococci*)、链球菌(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌属(*Pseudomonas species*)和沙门氏菌属(*Salmonella species*)。感染性细菌的具体实例包括但不限于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria sp.*) (例如结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M.avium*)、胞内分枝杆菌(*M.intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M.kansaii*)、戈登分枝杆菌(*M.gordoniae*))、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、奈瑟氏菌淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌(草绿色组)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌(厌氧属)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属(*pathogenic Campylobacter sp.*)、肠球菌属(*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、无水芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium sp.*)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属(*Bacteroides sp.*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、密螺旋体(*Treponema pallidum*)、雅司螺旋体(*Treponema pertenue*)、钩端螺旋体(*Leptospira*)、立克次氏体(*Rickettsia*)、艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*)和衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*)。

[0159] 在某些实施方式中,病原体抗原是存在于巨细胞病毒(CMV)中的病毒抗原,存在于EB病毒(EBV)中的病毒抗原,存在于人类免疫缺陷病毒(HIV)中的病毒抗原、或存在于流感病毒中的病毒抗原。

[0160] 5.4.2.T细胞受体(TCR)

[0161] 在某些实施方式中,抗原识别受体是TCR。TCR是二硫键连接的异二聚体蛋白,其由两条可变链组成,这些可变链表达为与不变CD3链分子复合物的一部分。TCR在T细胞的表面上发现,并负责将抗原识别为与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽。在某些实施方式中,TCR包含 α 链和 β 链(分别由TRA和TRB编码)。在某些实施方式中,TCR包括 γ 链和 δ 链(分别由TRG和TRD编码)。

[0162] TCR的每条链均由两个细胞外结构域组成:可变(V)区和恒定(C)区。恒定区靠近细胞膜,其后是跨膜区和短的胞质尾区。可变区结合肽/MHC复合物。两条链的可变结构域均由三个互补决定区(CDR)组成。

[0163] 在某些实施方式中,TCR可以与三个二聚体信号传导模块CD3 δ/ϵ 、CD3 γ/ϵ 和CD247 ζ/ζ 或 ζ/η 形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC(肽/MHC)结合时,表达TCR复合物的T细胞被激活。

[0164] 在某些实施方式中,TCR是内源性TCR。在某些实施方式中,抗原识别受体是天然存

在的TCR。

[0165] 在某些实施方式中,抗原识别受体是外源性TCR。在某些实施方式中,抗原识别受体是重组TCR。在某些实施方式中,抗原识别受体是非天然存在的TCR。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR的区别在于至少一个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR相差至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR由天然存在的TCR通过至少一个氨基酸残基修饰获得。在某些实施方式中,非天然存在的TCR由天然存在的TCR通过至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基修饰获得。

[0166] 5.4.3. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0167] 在某些实施方式中,抗原识别受体是CAR。CAR是工程改造受体,其将目的特异性移植或赋予免疫效应细胞。CAR可用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上;通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0168] 共有三代CAR。“第一代”CAR通常由胞外抗原结合结构域(例如scFv)组成,该结构域与跨膜结构域融合,而跨膜结构域与细胞质/细胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别,并通过单个融合分子中的CD3 ζ 链信号传导结构域激活CD4⁺和CD8⁺T细胞,而与HLA介导的抗原呈递无关。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的细胞内信号传导结构域添加到CAR的胞质尾区,以向T细胞提供其它信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如CD28或4-1BB)和激活(CD3 ζ)的CAR。“第三代”CAR包括提供多重共刺激(例如,CD28和4-1BB)和激活(CD3 ζ)的那些。在某些实施方式中,抗原识别受体是第一代CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是不包含共刺激分子或其片段的细胞内信号传导结构域的CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是第二代CAR。

[0169] 在某些实施方式中,CAR可以包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中细胞外抗原结合结构域与抗原特异性地结合,该抗原可以是肿瘤抗原或病原体抗原。

[0170] 5.4.3.1. CAR的细胞外抗原结合结构域

[0171] 在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域与抗原特异性地结合。在某些实施方式中,抗原是间皮素。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是scFv。在某些实施方式中,scFv是人scFv。在某些实施方式中,scFv是人源化scFv。在某些实施方式中,scFv是鼠scFv。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是Fab,其是任选交联的。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。在某些实施方式中,任何前述分子可以包含在具有异源序列的融合蛋白中以形成细胞外抗原结合结构域。在某些实施方式中,scFv通过用抗原-Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定。

[0172] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,体现为scFv或其类似物)以约 2×10^{-7} M或更小的解离常数(K_d)与抗原结合。在某些实施方式中, K_d 为约 2×10^{-7} M或更小、约 1×10^{-7} M或更小、约 9×10^{-8} M或更小、约 1×10^{-8} M或更小、约 9×10^{-9} M或更小、约 5×10^{-9} M或更小、约 4×10^{-9} M或更小、约 3×10^{-9} 或更小、约 2×10^{-9} M或更小、或约 1×10^{-9} M或更小。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 3×10^{-9} M或更小。在某些非限制性实施方式中,

K_d 为约 1×10^{-9} M至约 3×10^{-7} M。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 1.5×10^{-9} M至约 3×10^{-7} M。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 1.5×10^{-9} M至约 2.7×10^{-7} M。

[0173] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域对人间皮素具有高结合特异性和高结合亲和力。例如,在这样的实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,体现为scFv)以约1nM至约25nM的EC50值与人间皮素结合,如通过酶联免疫吸附测定(ELISA)所测量。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域具有通过ELISA测量的约20nM的EC50值。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含美国专利第8,357,783号中描述的抗间皮素抗体或其抗原结合部分,该专利全部内容并入本文以供参考。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域源自与人间皮素结合的抗体的重链可变区和轻链可变区,例如Feng等,Mol.Cancer Therapy (2009);8(5):1113-1118,其全部内容并入本文以供参考。抗体m912通过针对重组间皮素淘选从人Fab文库中分离。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域源自Fab(例如,来自人或小鼠Fab文库)。

[0174] CAR的细胞外抗原结合结构域(例如,体现为scFv)的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、FACS分析法、生物测定法(例如生长抑制)、或Western Blot测定法来测定。这些测定法中的每一种通常通过采用对目标复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体或scFv)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记并用于放射免疫测定法(RIA)(参见,例如,Weintraub,B.,放射免疫测定的原理,放射配体测定技术的第七培训课程,内分泌学会,1986年3月,并入本文以供参考)。放射性同位素可通过诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方法或通过放射自显影来检测。在某些实施方式中,靶向间皮素的细胞外抗原结合结构域用荧光标志物标记。荧光标志物的非限制性示例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Azurite和mKalamal)、青色荧光蛋白(例如ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus和YPet)。在一个实施方式中,靶向间皮素的人scFv用GFP标记。

[0175] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域识别或结合间皮素水平为约1,000个或更多个间皮素结合位点/细胞的人间皮素。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域识别或结合间皮素水平为约1,000个至约50,000个间皮素结合位点/细胞的人间皮素。在一些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域不识别或结合间皮素表达水平小于1,000个间皮素结合位点/细胞的人间皮素,例如在正常组织例如正常胸膜、心包膜和腹膜组织中表达的人间皮素。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域不识别或结合间皮素表达水平大于50,000个间皮素结合位点/细胞的人间皮素。在某些实施方式中,包含在CAR中的人scFv识别或结合间皮素表达水平为约1,000个至约50,000个间皮素结合位点/细胞的人间皮素。在某些实施方式中,包含在CAR中的人scFv不识别或结合间皮素表达水平大于50,000个或小于1,000个间皮素结合位点/细胞的人间皮素。

[0176] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)包含: V_H CDR1,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或其保守修饰; V_H CDR2,其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或其保守修饰;和 V_H CDR3,其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列、其保守修饰。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)包含: V_H CDR1,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列; V_H CDR2,其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;和 V_H CDR3,其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如

scFv) 包含: V_L CDR1, 其包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或其保守修饰; V_L CDR2, 其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或其保守修饰; 和 V_L CDR3, 其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其保守修饰。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_L CDR1, 其包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列; V_L CDR2, 其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列; 和 V_L CDR3, 其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

[0177] 在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H CDR1, 其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或其保守修饰; V_H CDR2, 其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或其保守修饰; V_H CDR3, 其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列、其保守修饰; V_L CDR1, 其包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或其保守修饰; V_L CDR2, 其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或其保守修饰; 和 V_L CDR3, 其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其保守修饰。在某些实施方式中, 细胞外抗原结合结构域包含: V_H CDR1, 其包含具有SEQ ID NO:4所示序列的氨基酸; V_H CDR2, 其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列; V_H CDR3, 其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列; V_L CDR1, 其包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列; V_L CDR2, 其包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列; 和 V_L CDR3, 其包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, CDR根据Kabat编码系统来鉴定。

[0178] 在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: 重链可变区(V_H), 其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: 轻链可变区(V_L), 其包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H , 其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列; 和 V_L , 其包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列; 任选地在 V_H 和 V_L 之间具有(iii) 接头序列, 例如接头肽。在某些实施方式中, 接头包含由SEQ ID NO:16所示氨基酸序列组成的氨基酸。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H , 其包含与SEQ ID NO:10具有至少约80% (例如至少约85%、至少约90%、或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列。例如, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H , 其包含与SEQ ID NO:10具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中, 细胞外抗原结合结构域包含: V_H , 其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_L , 其包含与SEQ ID NO:11具有至少约80% (例如至少约85%、至少约90%、或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列。例如, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_L , 其包含与SEQ ID NO:11具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_L , 其包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H , 其包含与SEQ ID NO:10具有至少约80% (例如至少约85%、至少约90%、或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列; 和 V_L , 其包含与SEQ ID NO:11具有至少约80% (例如至少约85%、至少约90%、或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv) 包含: V_H , 其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列; 和 V_L , 其包含

SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

[0179] 编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0180] 编码SEQ ID NO:11的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:13所示。

[0181] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)包含与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%)同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)特异性地结合人间皮素多肽(例如,包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的人间皮素多肽)。

[0182] 在某些实施方式中,编码SEQ ID NO:14的氨基酸序列的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:15所示。

[0183] 在某些实施方式中,scFv是人scFv。

[0184] SEQ ID No:4至SEQ ID No:15在下文提供:

GGSVSSGSYY [SEQ ID NO: 4]

[0185] IYYSGST [SEQ ID NO: 5]

AREGKNGAFDIW [SEQ ID NO: 6]

QSISSY [SEQ ID NO: 7]

AASS [SEQ ID NO: 8]

QQSYSTPLTF [SEQ ID NO: 9]

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO: 10]

RHQMTPSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRT [SEQ ID NO: 11]

CAGGTTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGACACAGT
TTCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCTCTGGATTTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGG
AGTGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACATATC
AGTGTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCTACTCAAAGTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTA
TTATTGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTGATATTTGGGGTCAGGGCACAAATGGTGACAGTCAGCT
CT [SEQ ID NO: 12]

[0186]

CGCCATCAGATGACTCAGTCCCCCTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAG
AGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCAAATTGCTGA
TTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTT
ACATTGACAATCAGTCCCTCCAACCTGAAGATTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCAGGCC
CCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAAGGTAGAGATCAAGAGGACT [SEQ ID NO: 13]

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSRHQMTPSP
SSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRT [SEQ ID NO: 14]

CAGGTTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGACTCTCAGCTTGACTTGACACAGT
TTCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCTCTGGATTTCGGCAGCCCCCTGGGAAAGGCCTGG
AGTGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCCATCCCTGAAGTCTCGAGTAACATATC
AGTGTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCTACTCAAAGTGTCTTCTGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTA
TTATTGTGCCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTGATATTTGGGGTCAGGGCACAAATGGTGACAGTCAGCT
CTGGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCC
TCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCATCACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTA
TCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGA
GTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAGTGGGACAGATTTACATTGACAATCAGTCCCTCCAA
CCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAATCCTACAGCACGCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAA
GGTAGAGATCAAGAGGACT [SEQ ID NO: 15]

[0187] 如本文所用,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变本公开的包含氨基酸序列的间皮素-靶向CAR(例如,CAR的细胞外抗原结合结构域)的结合特征的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本公开的CAR的细胞外抗原结合结构域中。氨基酸可根据其理化性质(例如电荷和极性)分为几组。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被相同组内的氨基酸取代的氨基酸取代。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸,中性电荷氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸,异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。另外,氨基酸可以按极性分类:极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸

酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或更多个氨基酸残基可以被来自相同组的其它氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的功能测定法测试改变的抗体的保留功能(即,上述(c)至(1)中列出的功能)。在某些实施方式中,在指定序列或CDR区内不超过一个、不超过两个、不超过三个、不超过四个、不超过五个残基被改变。

[0188] 相对于指定序列,包含与指定序列(例如,SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11)具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的 V_H 和/或 V_L 氨基酸序列可以包含取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但保留结合靶抗原(例如,间皮素)的能力。在某些实施方式中,在指定序列(例如,SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11)中,总共1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方式中,取代、插入或缺失发生在细胞外抗原结合结构域的CDR之外的区(例如,在FR中)。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包含: V_H ,其包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;和 V_L ,其包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,包括这些序列(SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11)的翻译后修饰。

[0189] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的同源性百分比等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是该序列共享的相同位置数的函数(即, $\%同源性 = \text{相同位置数} / \text{位置总数} \times 100$),其中考虑了空位数和每个空位的长度,需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。

[0190] 可以使用E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))的算法确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比,该算法已合并到ALIGN程序(2.0版)中),使用PAM120重量残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))算法来确定,该算法已被整合到GCG软件包(可从www.gcg.com获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,并且空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0191] 另外或可替代地,本公开的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索以例如识别相关序列。可以使用Altschul等((1990)J.Mol.Biol.215:403-10)的XBLAST程序(2.0版)执行此类搜索。可以使用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的指定序列(例如,scFv m903,m904,m905,m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0192] 5.4.3.2.CAR的跨膜结构域

[0193] 在某些非限制性实施方式中,CAR的跨膜结构域包含跨越膜的至少一部分的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚集并将信号传递给细胞。根据本公开的主题,CAR的跨膜结构域可以包含CD8、CD28、CD3 ζ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40、NKGD2、合成肽(不基于与免疫应

答相关的蛋白质)的天然或修饰的跨膜结构域、或其组合。

[0194] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽(例如,CD8的跨膜结构域)。

[0195] 在某些实施方式中,CD8多肽包含与在下文提供的具有NCBI参考号:NP_001139345.1 (SEQ ID NO:19) (本文的同源性可以使用标准软件如BLAST或FASTA进行测定)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD8多肽包含作为SEQ ID NO:19的连续部分的氨基酸序列或由其组成,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多235个氨基酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包含SEQ ID NO:19的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200、137至209或200至235的氨基酸序列,或由其组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,其包含或具有SEQ ID NO:19的氨基酸137至209。

[0196] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLL
YLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR
VCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV [SEQ ID NO: 19]

[0197] 在某些实施方式中,CD8多肽包含与在下文提供的具有NCBI参考号:AAA92533.1 (SEQ ID NO:20) (本文的同源性可以使用标准软件如BLAST或FASTA进行测定)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD8多肽包含作为SEQ ID NO:20的连续部分的氨基酸序列或由其组成,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50、或至少60、或至少70、或至少100、或至少200且至多247个氨基酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219、或200至247的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,其包含或具有SEQ ID NO:20的氨基酸151至219。

[0198] 1 MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFSVRDNTN KYVLTLNKF
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLR PTPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCCKP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 20]

[0199] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,其包含或具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,其在下文提供:

[0200] STTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICY
[SEQ ID NO: 21]

[0201] 根据本公开的主题,“CD8核酸分子”是指编码CD8多肽的多核苷酸。

[0202] 在某些实施方式中,编码由SEQ ID NO:21所示氨基酸序列组成的CD8多肽的示例性CD8核酸分子如SEQ ID NO:22所示,其在下文提供。

[0203] TCTACTACTACCAAGCCAGTGCTGCGAACTCCCTCACCTGTGCACCCTACCGGGACATCTCAGCCCCAGAG
ACCAGAAGATTGTGCGCCCCGTGGCTCAGTGAAGGGGACCGGATTGGACTTCGCCTGTGATATTTACATCT
GGGCACCCTTGCCGGAATCTGCGTGGCCCTTCTGCTGTCCTTGATCATCACTCTCATCTGCTAC [SEQ ID
NO: 22]

[0204] 在某些实施方式中,本公开的CAR的跨膜结构域包含CD28多肽(例如,CD28的跨膜

结构域)。

[0205] CD28多肽可以由与具有NCBI参考号:P10747或NP_006130 (SEQ ID NO:2)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段组成,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD28多肽包含作为SEQ ID NO:23的连续部分的氨基酸序列或由其组成,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸长度。在非限制性的各种实施方式中,CD28多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、153至179或200至220的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸153至179或由其组成。SEQ ID NO:23提供如下:

[0206] 1 MLRLLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61 SAVEVCVVYV NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRL LHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 23]

[0207] 根据本公开的主题,“CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。

[0208] 在某些实施方式中,编码由SEQ ID NO:23的氨基酸153至179组成的CD28多肽的示例性CD28核酸分子如SEQ ID NO:24所示,其在下文提供。

[0209] ttttgggtgctggtggtggtggtggtgagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattat
tttctgggtg [SEQ ID NO: 24]

[0210] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,其包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:25在下文提供:

[0211] FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV [SEQ ID NO: 25]

[0212] 编码SEQ ID NO:25的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:26所示,其在下文提供。

[0213] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT
TTTCTGGGTG [SEQ ID NO: 26]

[0214] 在某些非限制性实施方式中,CAR还可以包含将细胞外抗原结合结构域连接至跨膜结构域的间隔区。间隔区可以足够柔韧性以允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进抗原识别。

[0215] 在某些非限制性实施方式中,CAR的铰链/间隔区包含CD8、CD28、CD3 ζ 、CD40、4-1BB、OX40、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40、NKGD2、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)的天然或修饰的铰链区、或其组合。铰链/间隔区可以是来自IgG1的铰链区、或者是免疫球蛋白的CH₂CH₃区和CD3的一部分、CD28多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:23的一部分)、CD8多肽的一部分(例如SEQ ID NO:19的一部分或SEQ ID NO:20的一部分)、前述任一项的变体,该变体与其具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%的同源性或同一性、或合成的间隔序列。

[0216] 5.4.3.3.CAR的细胞内信号传导结构域

[0217] 在某些非限制性实施方式中,CAR包含细胞内信号传导结构域。在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 多肽,CD3 ζ 可以激活或刺激细胞(例如淋巴谱系的细胞,例如T细胞)。野生型(“天然”)CD3 ζ 包含三个基于功能性免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)、三个功能性富碱性拉伸(BRS)区域(BRS1、BRS2和BRS3)。CD3 ζ 在抗原结合

后将激活信号传递至细胞(例如,淋巴谱系的细胞,例如T细胞)。CD3 ζ -链的细胞内信号传导结构域是来自内源性TCR的信号的主要传递者。

[0218] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含天然CD3 ζ 。在某些实施方式中,CD3 ζ 多肽包含与具有NCBI参考号:NP_932170(SEQ ID NO:27)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些非限制性实施方式中,CD3 ζ 多肽包含作为SEQ ID NO:27的连续部分的氨基酸序列或由其组成,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多164个氨基酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD3 ζ 多肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸1至164、1至50、50至100、52至164、100至150、或150至164的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 多肽,其包含或具有SEQ ID NO:27的氨基酸52至164。SEQ ID NO:27在下文提供:

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
[0219] 61 APAYQQGQNQ LYNELNLGR R EEYDVLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEG L YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 27]
```

[0220] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含修饰的CD3 ζ 多肽。在某些实施方式中,修饰的CD3 ζ 多肽是国际专利公开号W02019/133969中公开的一种多肽,其全文并入本文。

[0221] 在某些实施方式中,修饰的CD3 ζ 多肽包含与SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段,或由其组成,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。SEQ ID NO:28在下文提供:

```
RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGFLN
[0222] ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGHDGLF QGLSTATKDT FDALHMQALP PR [SEQ ID NO:
28]
```

[0223] 编码SEQ ID NO:28的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:29所示,其在下文提供。

```
agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagct
caatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaa
[0224] agccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtTcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctTc
agtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggacgatggcctttTccaggggctcagtac
agccaccaaggacacctTcgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc [SEQ ID NO: 29]
```

[0225] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激性信号传导区。在某些实施方式中,共刺激区包含至少一种共刺激分子或其部分。在某些实施方式中,共刺激信号传导区包含至少一种共刺激分子或其部分的胞内结构域。

[0226] 如本文所用,“共刺激分子”是指除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子,其可以提供淋巴细胞对抗原的有效应答。在某些实施方式中,共刺激分子可以提供最佳的淋巴细胞活化。共刺激分子的非限制性实例包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、

NKGD2、CD2、及其组合。共刺激分子可以与共刺激配体结合，该配体是一种在细胞表面表达的蛋白质，在与其受体结合后会产生共刺激应答，即当抗原识别受体（例如嵌合抗原受体（CAR））与其靶抗原结合时影响所提供刺激的细胞内应答。作为一个实例，4-1BB配体（即，4-1BBL）可以结合4-1BB以提供细胞内信号，其与CAR信号组合诱导CAR⁺ T细胞的效应细胞功能。

[0227] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包含含有CD28多肽例如CD28的细胞内结构域或其部分的共刺激信号传导区。在某些实施方式中，CD28多肽包含与SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，或由其组成，和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中，CD28多肽包含作为SEQ ID NO:23的连续部分的氨基酸序列或由其组成，其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸长度。可替代地或另外地，在非限制性的各种实施方式中，CD28多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、180至220或200至220的氨基酸序列，或由其组成。在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区，其包含CD28多肽，该CD28多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸180至220的氨基酸序列或由其组成。

[0228] 编码SEQ ID NO:23的氨基酸180至220的示例性核酸序列如SEQ ID NO:30所示，其在下文提供。

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCC

[0229] CACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC [SEQ ID NO: 30]

[0230] 在某些实施方式中，CD28多肽包含与具有NCBI参考号NP_031668.3 (SEQ ID NO: 31) 的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列或其片段，或由其组成，和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中，CD28多肽包含作为SEQ ID NO:31的连续部分的氨基酸序列或由其组成，其为至少约20、或至少约30、或至少约40、或至少约50且至多218个氨基酸长度。可替代地或另外地，在非限制性的各种实施方式中，CD28多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸1至218、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、178至218、或200至220的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中，本公开的CAR的共刺激信号传导区包含CD28多肽，该CD28多肽包含SEQ ID NO:31的氨基酸178至218或由其组成。SEQ ID NO:31在下文提供：

1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSL S CRYSYNLLAK EFRASLYKGV

[0231] 61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDDG FDNETVTFR L WNLHVNHDTI YFCKIEFMYP
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA R DFAAYRP [SEQ ID NO: 31]

[0232] 编码SEQ ID NO:31的氨基酸178至218的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:32所示，其在下文提供。

aat agtagaagga acagactcct tcaaagtgcac tacatgaaca tgactccccg gaggcctggg
[0233] ctcactcgaa agccttacca gccctacgcc cctgccagag actttgcagc gtaccgcccc [SEQ
ID NO: 32]

[0234] 在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区, 该共刺激信号传导区包含两种共刺激分子或其部分 (例如共刺激分子的细胞内结构域) 例如, CD28和4-1BB的细胞内结构域, 或CD28和OX40的细胞内结构域。

[0235] 在某些非限制性实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域不包含共刺激信号传导区, 即CAR是第一代CAR。例如, CAR的细胞内信号传导结构域不包含共刺激分子例如4-1BB、CD28等的细胞内信号传导结构域。CAR中包含的共刺激信号传导结构域可以导致不受控的增殖。细胞中包含的c-Kit的激活可以被控制。例如, 如第5.2节中公开的, c-Kit突变体可以与启动子例如诱导型启动子可操作地连接, 诱导型启动子可以控制c-Kit的激活, 例如, 在诱导型启动子的控制下, c-Kit仅在激活包含c-Kit突变体的细胞 (例如, T细胞或CAR-T细胞) 时才被激活。

[0236] 5.4.3.4. 示例性CAR

[0237] 在某些实施方式中, CAR是靶向间皮素的CAR。在某些实施方式中, CAR包含 (a) 细胞外抗原结合结构域, 其包含: 具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的V_H CDR1; 具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V_H CDR2; 具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V_H CDR3; 具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的V_L CDR1; 具有SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的V_L CDR2; 和具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V_L CDR3; (b) 跨膜结构域, 其包含CD28的跨膜结构域, 和 (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含 (i) CD3 ζ 多肽, 和 (ii) 包含CD28多肽 (例如, CD28的细胞内结构域) 的共刺激细胞信号传导区。

[0238] 在某些实施方式中, CAR是靶向间皮素的CAR。在某些实施方式中, CAR包含 (a) 细胞外抗原结合结构域, 其包含: 由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列组成的V_H CDR1; 由SEQ ID NO:5所示氨基酸序列组成的V_H CDR2; 由SEQ ID NO:6所示氨基酸序列组成的V_H CDR3; 由SEQ ID NO:7所示氨基酸序列组成的V_L CDR1; 由SEQ ID NO:8所示氨基酸序列组成的V_L CDR2; 和由SEQ ID NO:9所示氨基酸序列组成的V_L CDR3; (b) 跨膜结构域, 其包含CD8的跨膜结构域, 和 (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含CD3 ζ 多肽, 并且不包含共刺激信号传导区。

[0239] 在某些实施方式中, 本公开的CAR还包含诱导型启动子, 用于在人细胞中表达核酸序列。用于表达CAR基因的启动子可以是组成型启动子, 例如泛素C (UbiC) 启动子。

[0240] 5.4.4. TCR样融合分子

[0241] 在某些实施方式中, 抗原识别受体是TCR样融合分子。TCR融合分子的非限制性实施例包括不依赖HLA的基于TCR的嵌合抗原受体 (也称为“HIT-CAR”, 例如国际专利申请号PCT/US19/017525中公开的那些, 将其全部并入以供参考) 和T细胞受体融合构建体 (TRuC) (例如, 在Baeuerle等, “Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response,” Nature Communications第10卷, 文章编号: 2087 (2019) 中公开的那些, 将其全部并入以供参考)。

[0242] 本公开的主题提供多肽组合物, 其包含靶向间皮素的嵌合抗原受体 (CAR) 和显性失活形式的程序性死亡受体1 (PD-1 DN)。

[0243] 5.5. 显性失活形式的程序性死亡受体1 (PD-1 DN)

[0244] 在某些实施方式中,本公开主题的细胞还包含显性失活形式的程序性死亡受体1(称为“PD-1 DN”)。

[0245] PD-1 DN可以增强包含CAR的免疫应答细胞的治疗功效。在某些实施方式中,PD-1 DN包含(a)程序性死亡受体1(PD-1)的细胞外结构域的至少一部分,其包含配体结合区,和(b)跨膜结构域。

[0246] 在某些实施方式中,细胞比如T细胞被工程化以表达显性失活形式(DN形式)的PD-1。

[0247] 恶性细胞适应产生免疫抑制微环境,保护细胞免于免疫识别和消除(Sharpe et al., Dis. Model Mech. 8:337-350 (2015))。免疫抑制微环境限制免疫治疗方法。DN形式的细胞介导的免疫应答抑制剂的细节公开于W02017/040945和W02017/100428,其各自的全部内容并入本文。

[0248] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是活化T细胞在与其相应配体PD-L1和PD-L2结合后的负免疫调节剂,在内源性巨噬细胞和树突状细胞上表达。PD-1是一种由268个氨基酸组成的I型膜蛋白。PD-1由两个配体PD-L1和PD-L2组成,它们是B7家族的成员。该蛋白质的结构包括细胞外IgV结构域,接着是跨膜区和细胞内尾部。细胞内尾部包含两个磷酸化位点,位于基于免疫受体酪氨酸的抑制基序和基于免疫受体酪氨酸的开关基序中。PD-1负向调节TCR信号。SHP-1和SHP-2磷酸酶在配体结合后与PD-1的细胞质尾部结合。PD-L1的上调是肿瘤细胞用来逃避宿主免疫系统的一种机制。在临床前和临床试验中,拮抗性抗体阻断PD-1可诱导通过宿主内源性免疫系统介导的抗肿瘤应答。

[0249] 在某些实施方式中,PD-1多肽由具有GenBank号NP_005009.2(SEQ ID NO:33)的氨基酸或其片段组成。在某些实施方式中,SEQ ID NO:33的氨基酸1至20是PD-1的信号肽(或肽信号)。在某些实施方式中,SEQ ID NO:33的氨基酸21至170是PD-1的细胞外结构域。在某些实施方式中,SEQ ID NO:33的氨基酸171至191是PD-1的跨膜结构域。在某些实施方式中,SEQ ID NO:33的氨基酸192至288是PD-1的细胞内结构域。SEQ ID NO:33在下文提供:

[0250] MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS
ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS
LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL [SEQ ID NO: 33]

[0251] 在某些实施方式中,PD-1的细胞外结构域包含配体结合结构域(称为“细胞外配体结合结构域”)。在某些实施方式中,PD-1的细胞外配体结合结构域与一种或多种异源多肽序列融合,即PD-1 DN是嵌合序列。例如,PD-1的细胞外配体结合结构域可以在其N末端融合至信号肽,该信号肽任选地是异源信号肽,包括本文所述的各种信号肽。此外,PD-1 DN可以包含跨膜结构域,其任选地是异源跨膜结构域,包括本文所述的各种跨膜结构域中的任一种。

[0252] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1多肽的细胞外结构域(例如,SEQ ID NO:33的氨基酸21至170)或其配体结合部分(例如,SEQ ID NO:33的氨基酸21至165)。表达这种PD-1 DN的细胞可能缺乏或降低了在PD-1免疫检查点通路中发出信号的能力。在某些实施方式中,PD-1 DN是具有细胞内结构域缺失的缺失突变体(例如,PD-1 DN缺少SEQ ID NO:33的氨基酸192至288)或其部分。具有细胞内结构域缺失的PD-1可能具有减少的或抑制的PD-

1介导的免疫检查点通路。

[0253] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1的细胞外配体结合结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含PD-1多肽的细胞外配体结合结构域和PD-1多肽的跨膜结构域。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸21至165或由其组成。

[0254] 编码SEQ ID NO:33的氨基酸21至165的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:34所示,其在下文提供。

[0255] CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGT
GACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGT
ACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCGCGCCAG
GACTGCCGCTTCCGTGTACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCG
CAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGC
[0256] GGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCAGCCCCTCACCAGGCCA
GCCGGCCAG [SEQ ID NO: 34]

[0257] 在某些实施方式中,PD-1 DN还包含信号肽,例如,PD-1 DN包含PD-1多肽的细胞外配体结合结构域、PD-1多肽的跨膜结构域和PD-1多肽的信号肽。在某些实施方式中,信号肽包含SEQ ID NO:33的氨基酸1-20或由其组成。编码SEQ ID NO:33的氨基酸1-20的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:35所示,其在下文提供。

[0258] ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGGGCTGGCGG [SEQ ID
NO: 35]

[0259] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸1至165或由其组成。

[0260] 编码SEQ ID NO:33的氨基酸1-165的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:36所示,其在下文提供。

[0261] ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTT
CTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGG
ACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATGAGC
CCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTT
CCGTGTACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGCTCAGGGCCCGCGCAATGACAGCG
GCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTC
AGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCAGCCCCTCACCAGGCCAGCCGCGCCAG
[SEQ ID NO: 36]

[0262] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸21至151或由其组成。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸1至151或由其组成。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸21至151或由其组成。在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:33的氨基酸21处开始至SEQ ID NO:33的氨基酸151至165之间的一个氨基酸的氨基酸序列或由其组成。

[0263] 在某些实施方式中,PD-1 DN还包含CD8多肽。在某些实施方式中,PD-1 DN包含与CD8的跨膜结构域和/或铰链结构域融合的PD-1的细胞外结构域或其部分(例如,细胞外配体结合结构域)。在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸183至203)。这种实施方式代表嵌合DN形式,其包含来自不同(异源)多肽的跨膜结构域。如上所述,包含异源结构域比如跨膜结构域的PD-1 DN可以任选地包括来自异源多肽的额外序列。在某些实施方式中,PD-1 DN包含来自跨膜结构域的异源多肽N端的额外序列。在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8的铰链结构域。在某些实施方式中,异源序列包含CD8多肽的额外N端序列(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸137至182(或任选地从氨基酸138或139开始))。在某些实施方式中,PD-1 DN包含来自CD8跨膜结构域的异源多肽C端的额外序列。在

某些实施方式中,额外的C端序列是SEQ ID NO:19的氨基酸204至209。

[0264] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8多肽的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸183至203)、CD8多肽的铰链结构域(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸137至182)、以及CD8多肽的额外C端序列(例如SEQ ID NO:19的氨基酸204至207)。在某些实施方式中,PD-1 DN包含由SEQ ID NO:19的氨基酸137至207组成的CD8多肽。

[0265] 编码SEQ ID NO:19的氨基酸137-207的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:37所示,其在下文提供:

[0266] CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCT
ACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAC
[SEQ ID NO: 37]

[0267] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含CD8多肽的跨膜结构域(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸183至203)、CD8多肽的铰链结构域(例如,SEQ ID NO:19的氨基酸137至182)、以及CD8多肽的额外C端序列(例如SEQ ID NO:19的氨基酸204至209)。在某些实施方式中,PD-1 DN包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸137至209的CD8多肽。

[0268] 编码SEQ ID NO:19的氨基酸137-209的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:38所示,其在下文提供:

[0269] CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCT
ACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAC
CACAGG [SEQ ID NO: 38]

[0270] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列,其在下文提供。

[0271] MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSRPAGQAAAPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN [SEQ ID NO: 39]

[0272] 编码SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:40所示,其在下文提供:

[0273] ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTT
CTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGG
ACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGC
CCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTT
CCGTGTCACAACTGCCAACGGGCGTGACTTCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCG
GCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTTCGGGCAGAGCTC
AGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGC
GGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGT
CCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT
GATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTA
CTGCAAC [SEQ ID NO: 40]

[0274] 在某些实施方式中,PD-1 DN包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,其在下文提供。

[0275] MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNA
TFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQL
PNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE
VPTAHPSPSRPAGQAAAPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR [SEQ ID NO: 41]

[0276] 编码SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:42所示,其在下文提供:

[0277] ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGC CCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCTTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTT CCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCG GCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTC AGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGGC GGCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCTGT CCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT GATATCTACATCTGGGCGCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTA CTGCAACCACAGG [SEQ ID NO: 42]

[0278] 在某些非限制性实施方式中,PD-1 DN的跨膜结构域包含跨越至少一部分膜的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。根据本公开的主题,PD-1 DN的跨膜结构域可以包含本文公开的任何多肽的天然或修饰的跨膜结构域,例如可以包含在嵌合抗原受体中的任何跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域是CD8多肽、CD28多肽、CD3 ζ 多肽、CD40多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、CD84多肽、CD166多肽、CD8a多肽、CD8b多肽、ICOS多肽、ICAM-1多肽、CTLA-4多肽、CD27多肽、CD40/My88肽、NKGD2肽、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)、或其组合。在某些实施方式中,跨膜结构域是CD8多肽。这些跨膜结构域的细节在第5.4节中描述。

[0279] 5.6. 组合物和载体

[0280] 本公开的主题提供包含(a) 本文公开(例如,在第5.2节中公开)的c-Kit突变体和本文公开(例如,在第5.4节中公开)的抗原识别受体的组合物。还提供包含这种组合物的细胞。

[0281] 在某些实施方式中,c-Kit突变体与第一启动子可操作地连接。在某些实施方式中,抗原识别受体与第二启动子可操作地连接。

[0282] 此外,本公开的主题提供核酸组合物,其包含编码本文公开(例如,在第5.2节中公开)的c-Kit突变体的第一多核苷酸和编码本文公开(例如,在第5.4节中公开)的抗原识别受体的第二多核苷酸。还提供包含这种核酸组合物的细胞。

[0283] 在某些实施方式中,核酸组合物还包含与c-Kit突变体可操作地连接的第一启动子。在某些实施方式中,核酸组合物还包含与抗原识别受体可操作地连接的第二启动子。

[0284] 在某些实施方式中,第一和第二启动子中的一个或两个是内源性的或外源性的。在某些实施方式中,外源启动子选自延伸因子(EF)-1启动子、CMV启动子、SV40启动子、PGK启动子、和金属硫蛋白启动子。在某些实施方式中,第一和第二启动子中的一个或两个是诱导型启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0285] 组合物和核酸组合物可以通过本领域已知的方法或如本文所述的方法施用于受试者或和/或递送到细胞中。细胞(例如,T细胞或NK细胞)的遗传修饰可以通过用重组DNA构建体转导基本上均质的细胞组合物来完成。在某些实施方式中,逆转录病毒载体(例如 γ -逆转录病毒载体或慢病毒载体)用于将DNA构建体引入细胞。例如,可以将编码抗原识别受体的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,并且可以从其内源启动子、逆转录病毒长末端重复序列或对目的靶细胞类型特异性的启动子驱动表达。也可以使用非病毒载体。

[0286] 对于细胞的初始遗传修饰以包括抗原识别受体(例如,CAR或TCR),逆转录病毒载体通常用于转导,然而可以使用任何其它合适的病毒载体或非病毒递送系统。可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中构建抗原识别受体和c-Kit突变体。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括但不限于各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如,FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- κ B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎IRES、丙型肝炎IRES、瘟病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、小核糖核酸病毒IRES、脊髓灰质炎病毒IRES和脑心肌炎病毒IRES)和可裂解的接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。逆转录病毒载体和合适的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知各种产生两性病毒的细胞系,包括但不限于PA12(Miller等,(1985)Mol Cell Biol(1985);5:431-437);PA317(Miller等,Mol Cell Biol(1986);6:2895-2902);和CRIP(Danos等,Proc Natl Acad Sci USA(1988);85:6460-6464)。非两性粒子也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包膜和本领域已知的任何其它假型化的粒子。

[0287] 可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养(Bregni等.Blood(1992);80:1418-1422),或单独用病毒上清液或含有或不含有适当生长因子和聚阳离子的浓缩载体原液培养(Xu,等.Exp.Hemat.(1994);22:223-230);和Hughes,等.J.Clin.Invest.(1992);89:1817)。

[0288] 其它转导病毒载体可用于修饰免疫应答细胞。在某些实施方式中,所选择的载体表现出高的感染效率和稳定的整合和表达(参见,例如,Cayouette等,Human Gene Therapy 8:423-430,1997;Kido等,Current Eye Research 15:833-844,1996;Bloomer等,Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等,Science 272:263-267,1996;和Miyoshi等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:10319,1997)。可以使用的其它病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒和与腺相关的病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如EB病毒(也参见例如Miller,Human Gene Therapy 15-14,1990;Friedman,Science 244:1275-1281,1989;Eglitis等,BioTechniques 6:608-614,1988;Tolstoshev等,Current Opinion in Biotechnology 1:55-61,1990;Sharp,The Lancet 337:1277-1278,1991;Cornetta等,Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322,1987;Anderson,Science 226:401-409,1984;Moen,Blood Cells 17:407-416,1991;Miller等,Biotechnology 7:980-990,1989;LeGal La Salle等,Science 259:988-990,1993;和Johnson,Chest 107:77S-83S,1995的载体)。逆转录病毒载体发展地特别好,并已用于临床(Rosenberg等,N.Engl.J.Med 323:370,1990;Anderson等,美国专利第5,399,346号)。

[0289] 非病毒方法也可以用于免疫应答细胞的遗传修饰。例如,可以通过在脂质转染(Feigner等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84:7413,1987;Ono等,Neuroscience Letters 17:259,1990;Brigham等,Am.J.Med.Sci.298:278,1989;Staubinger等,Methods in Enzymology 101:512,1983),脱唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸偶联(Wu等,Journal of Biological Chemistry 263:14621,1988;Wu等,Journal of Biological Chemistry 264:16985,1989),或手术条件下的微注射(Wolff等,Science 247:1465,1990)的情况下施用核酸来将核酸分子引入免疫应答细胞中。其它非病毒的基因转移方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合的体外转染。脂质体也可能对将DNA递送到细胞中有益。也可以通过将正常核酸转移到可离体培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)

中来完成将正常基因移植到受试者的受影响组织中,之后,将细胞(或其后代)注射到目标组织中或全身注射。重组受体也可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得。瞬时表达可通过RNA电穿孔获得。

[0290] 任何靶向基因组编辑方法也可用于将本文公开的c-Kit突变体和/或抗原识别受体递送至细胞或受试者。在某些实施方式中,CRISPR系统用于递送本文公开的c-Kit突变体和/或抗原识别受体。在某些实施方式中,锌指核酸酶用于递送本文公开的c-Kit突变体和/或抗原识别受体。在某些实施方式中,TALEN系统用于递送本文公开的c-Kit突变体和/或抗原识别受体。

[0291] 成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,该系统包括Cas9(一种能够使用crRNA作为其向导来修饰DNA的蛋白质),CRISPR RNA(crRNA,包含Cas9用来引导其到达宿主DNA正确片段的RNA,以及

[0292] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工限制性酶,通过将锌指DNA结合结构域与DNA裂解结构域结合而产生。锌指结构域可以被工程化以靶向特定的DNA序列,其允许锌指核酸酶靶向基因组内的期望序列。各个ZFN的DNA结合结构域通常包含多个独立的锌指重复序列,并且每个都可以识别多个碱基对。产生新的锌指结构域的最常见方法是结合已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的裂解结构域是来自II型限制性核酸内切酶FokI的非特异性裂解结构域。使用内源性同源重组(HR)机制和带有CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可以用于将CAR表达盒插入基因组。当靶序列被ZFN酶切后,HR机制搜索受损染色体与同源DNA模板之间的同源性,然后在染色体的两个断裂末端之间复制模板的序列,从而将同源DNA模板整合到基因组。

[0293] 转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)是限制性酶,可以工程化以切割DNA的特定序列。TALEN系统的工作原理几乎与ZFN相同。它们是通过将转录激活因子样效应物DNA结合结构域与DNA裂解结构域结合而产生的。转录激活因子样效应物(TALE)由具有两个可变位置的33-34个氨基酸重复基序组成,这些位置对特定核苷酸有很强的识别能力。通过组装这些TALE的阵列,可以对TALE DNA结合结构域进行工程化以结合所需的DNA序列,从而指导核酸酶切割基因组中的特定位置。用于多核苷酸疗法的cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)中进行指导,并由任何适当的哺乳动物调节元件或内含子(例如延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调控。例如,如果需要的话,已知优先在特定细胞类型中指导基因表达的增强子可以用于指导核酸的表达。所使用的增强剂可以包括但不限于被表征为组织或细胞特异性增强子的那些。或者,如果将基因组克隆用作治疗构建体,则可以通过同源调控序列或,如果需要,通过衍生自包括上述任何启动子或调控元件的异源的调控序列来介导调控。

[0294] 用于递送基因组编辑剂/系统的方法可以根据需要而变化。在某些实施方式中,选择的基因组编辑方法的组分作为DNA构建体在一个或多个质粒中递送。在某些实施方式中,通过病毒载体递送组分。常见的递送方法包括但不限于电穿孔、显微注射、基因枪、刺穿转染、流体静压力、连续输注、超声处理、磁转染、腺相关病毒、病毒载体的包膜蛋白假型、可复制的载体顺式和反式元件、单纯疱疹病毒和化学媒介物(例如寡核苷酸、脂复合物、聚合物小体、多复合物、树状聚合物、无机纳米颗粒和穿透细胞的肽)。

[0295] 5.7. 多肽和类似物

[0296] 本公开的主题还包括间皮素、CD28、CD8、CD3 ζ 和c-Kit多肽或其片段,当在免疫应答细胞中表达时,它们被修饰以增强它们的抗肿瘤活性。本公开的主题提供通过产生序列改变来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。这样的改变可以包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本公开的主题还包括本文公开的任何天然存在的多肽(包括但不限于间皮素、CD8、CD28、CD3 ζ 和c-Kit)的类似物。类似物可以通过氨基酸序列差异、通过翻译后修饰或通过两者与本文公开的天然存在的多肽不同。类似物可表现出与本公开主题的全部或部分天然存在的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的同源性。序列差异的长度是至少5、10、15或20个氨基酸残基,例如至少25、50或75个氨基酸残基,或超过100个氨基酸残基。同样,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其概率得分在 e^{-3} 和 e^{-100} 之间,指示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生,例如乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化;这样的修饰可以在多肽合成或加工过程中或在用分离的修饰酶处理之后发生。类似物也可以通过天然序列的改变而不同于天然存在的多肽。这些包括天然和诱导的遗传变异(例如,如Sambrook, Fritsch和Maniatis,《分子克隆:实验室手册》(第2版), CSH出版社,1989,或Ausubel等,同上,中所述,是由于通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐中的随机诱变或通过位点特异性诱变而产生的)。还包括环化的肽、分子和类似物,其含有除L-氨基酸以外的残基,例如D-氨基酸或非天然存在的或合成的氨基酸,例如 β 或 γ 氨基酸。

[0297] 除了全长多肽,本公开主题还提供本文公开的多肽或肽结构域中的任一个的片段。如本文所用,术语“片段”是指至少5、10、13或15个氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少60至80、100、200、300或更多个连续氨基酸。片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生,或者可以由正常的蛋白质加工产生(例如,从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸,或者通过替代性的mRNA剪接或替代性蛋白质加工事件去除氨基酸)。

[0298] 非蛋白质类似物具有设计为模仿本文公开的蛋白质(例如,c-Kit突变体)的功能活性的化学结构。这样的类似物可能超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法在本领域中是众所周知的,并且可以根据这样的方法通过修饰化学结构来进行类似物的合成,以使所得的类似物在免疫应答细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括但不限于取代可替代的R基团和改变参考多肽的特定碳原子处的饱和度。在某些实施方式中,蛋白质类似物对体内降解具有相对抗性,从而在给药后导致更长的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括但不限于以下实施例中描述的那些。

[0299] 5.8. 给药

[0300] 本公开的主题还提供包含本公开的细胞的组合物。

[0301] 可以将包含本公开的细胞的组合物系统地或直接提供给受试者,以诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防赘生物、病原体感染或传染病。在某些实施方式中,将本公开的细胞或包含其的组合物直接注射到目的器官(例如,受瘤形成影响的器官)中。或者,例如通过向循环系统(例如,肿瘤脉管系统)给药,将本公开的细胞或包含其的组合物间接地提供给目的器官。可以在施用细胞或组合物之前,之中或之后提供扩增和分化剂,以增加体外或体内T细胞或NK细胞的产生。

[0302] 本公开的细胞可以在任何生理上可接受的载体中通常在血管内施用,然而它们也可以被引入骨骼或其它方便的部位,在这些部位细胞可以找到合适的再生和分化部位(例如胸腺)。通常,将施用至少约 1×10^5 个细胞,最终达到约 1×10^{10} 个或更多。本公开的细胞可以包含纯化的细胞群体。本领域技术人员可以使用各种众所周知的方法,例如荧光激活细胞分选(FACS),容易地确定群体中本公开的细胞的百分比。在包含本公开的免疫应答细胞的群体中,纯度的合适范围是约50%至约55%、约5%至约60%、以及约65%至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%、以及约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调整(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。可以通过注射、导管等引入细胞。

[0303] 本公开的组合物可以是包含本公开的细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。给药可以是自体的或异体的。例如,可以从一个受试者获得细胞,并将其施用于相同受试者或不同的相容受试者。外周血来源的细胞或其后代(例如,体内、离体或体外来来源)可通过局部注射施用,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。当施用本公开的组合物(例如,包含本公开的细胞的药物组合物)时,可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液剂、悬浮剂、乳剂)。

[0304] 在某些实施方式中,组合物还包含c-Kit抑制剂(称为“c-Kit抑制剂”)。c-Kit抑制剂可以抑制c-Kit的活性(例如激酶活性)。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂特异性地抑制c-Kit突变体,例如c-Kit D816V。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂是多酪氨酸激酶抑制剂。c-Kit抑制剂的非限制性实例包括达沙替尼、米哚妥林、普纳替尼、伊马替尼。

[0305] 5.9. 剂型

[0306] 包含本公开的细胞的组合物可以方便地以无菌液体制剂的形式提供,例如等渗水溶液剂、悬浮液、乳剂,分散剂或粘性组合物,其可以缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物在某种程度上更方便施用,尤其是通过注射。另一方面,可以在适当的粘度范围内配制粘性组合物以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、及其合适的混合物。

[0307] 可以通过将遗传修饰的细胞掺入所需量的适当溶剂中,并根据需要掺入不同量的其它成分来制备无菌注射溶液。这样的组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物也可以冻干。所述组合物可包含辅助物质,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或增粘剂、防腐剂、矫味剂、颜料等,这取决于给药途径和所需制剂。可以参考标准文本,例如“REMINGTON'S

PHARMACEUTICAL SCIENCE”，1985年第17版，以引用方式并入本文，以制备合适的制剂，而无需进行过多的实验。

[0308] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂，包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。可通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。然而，根据本公开的主题，所使用的任何媒介物、稀释剂或添加剂将必须与遗传修饰的细胞相容。

[0309] 所述组合物可以是等渗的，即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。组合物的所需等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的试剂例如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现。氯化钠可以是特别适用于含有钠离子的缓冲剂。

[0310] 如果需要，可使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度保持在选定水平。例如，甲基纤维素可容易且经济地获得并且易于使用。其它合适的增稠剂包括，例如，黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可以取决于选择的试剂。重要的是要使用能够达到所选粘度的用量。显然，合适载体和其它添加剂的选择将取决于确切的给药途径和特定剂型的性质，例如液体剂型（例如，是否将组合物配制成溶液剂、悬浮液、凝胶剂或其它液体形式，例如定时释放形式或液体填充形式）。

[0311] 对于所治疗的受试者，要施用的细胞数量将有所不同。在一个实施方式中，向人受试者施用的本公开的细胞为约 10^4 至约 10^{10} 个之间、约 10^4 至约 10^6 个之间、约 10^5 至约 10^9 个之间、或约 10^6 至约 10^8 个之间。更有效的细胞可以以更少的数量施用。在某些实施方式中，向人受试者施用的本公开的细胞为至少约 1×10^5 个、约 2×10^5 个、约 3×10^5 个、约 4×10^5 个或约 5×10^5 个。可以根据每个受试者的个体因素，包括其大小、年龄、性别、体重和具体受试者的状况，来确定有效剂量的精确确定。本领域技术人员从本公开和本领域知识中可以容易地确定剂量。

[0312] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中和在方法中施用的细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常，任何添加剂（除一种或多种活性细胞和/或一种或多种试剂外）在磷酸盐缓冲盐水中的存在量为0.001%至50%（重量）溶液，并且活性成分按微克至毫克的顺序存在，例如约0.0001wt%至约5wt%、约0.0001wt%至约1wt%、约0.0001wt%至约0.05wt%或约0.001wt%至约20wt%、约0.01wt%至约10wt%或约0.05wt%至约5wt%。对于要施用于动物或人的任何组合物，可以确定以下结果：毒性，例如通过在合适的动物模型例如啮齿类动物如小鼠中确定致死剂量（LD）和LD50；引起适当反应的组合物的剂量，其中的组分浓度和施用组合物的时间。根据技术人员，本公开和本文引用的文献的知识，这种确定不需要过度的实验。并且，可以确定连续给药的时间而无需过多的实验。

[0313] 5.10. 治疗方法

[0314] 本公开主题的细胞和包含其的组合物可用于治疗和/或预防瘤形成、病原体感染、传染病、炎性疾病或移植排斥。可以将这种细胞施用于有需要的受试者（例如人受试者）以治疗或预防实体瘤（例如间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、胶质母细胞瘤、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃癌和/或胆管癌）。在某些实施方式中，细胞是T细胞。T细胞可以是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在某些实施方式中，T细胞是CD4⁺ T细胞。

[0315] 在某些实施方式中, 赘生物或肿瘤的细胞具有高表达水平的间皮素(称为“高MSLN表达细胞”)。在某些实施方式中, 高MSLN表达细胞是与正常细胞的间皮素表达水平相比以约50倍或更多、约50倍或更多、约60倍或更多、约70倍或更多、约80倍或更多、约90倍或更多、约100倍或更多、约150倍或更多、约200倍或更多、约300倍或更多、约400倍或更多、或约500倍或更多的表达水平表达间皮素的细胞。

[0316] 在某些实施方式中, 赘生物或肿瘤的细胞具有低表达水平的间皮素(称为“低MSLN表达细胞”)。在某些实施方式中, 低MSLN表达细胞是与正常细胞的间皮素表达水平相比以约50倍或更少、约40倍或更少、约30倍或更少、约20倍或更少、约10倍或更少、约5倍或更少、约4倍或更少、约3倍或更少、或约2倍或更少的表达水平表达间皮素的细胞。

[0317] 在某些实施方式中, 实体瘤是肺癌。

[0318] 在某些实施方式中, 实体瘤是间皮瘤。在某些实施方式中, 间皮瘤细胞是高MSLN表达细胞。在某些实施方式中, 用于治疗高MSLN表达间皮瘤细胞的细胞包含不含有共刺激信号传导区的CAR(例如, 第一代CAR)。

[0319] 本公开的主题提供用于在有需要的受试者中诱导和/或增加免疫应答的方法。本公开的细胞和包含其的组合物可用于疗法或药物。本公开的细胞和包含其的组合物可用于治疗和/或预防受试者的瘤形成。本公开的细胞和包含其的组合物可用于延长患有瘤形成的受试者的存活。本公开的细胞和包含其的组合物也可用于治疗 and/或预防受试者比如免疫功能低下的人受试者的病原体感染或其他传染病。这种方法包括施用本文公开的细胞或包含其的组合物(例如, 药物组合物)以实现期望的效果, 无论是缓解现有病症还是预防复发。为了治疗, 施用的量是有效产生所需效果的量。可以一次或多次给药来提供有效量。可以推注或通过连续灌注来提供有效量。

[0320] “有效量”(或“治疗有效量”)是足以在治疗后产生有益或期望的临床结果的量。可以以一剂或多剂剂量将有效量施用于受试者。就治疗而言, 有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其它方式减少疾病病理后果的量。有效量通常由医师根据具体情况确定, 并且在本领域技术人员的能力范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时, 通常要考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、疾病的严重程度以及所施用的细胞的形式和有效浓度。

[0321] 对于使用抗原特异性T细胞的过继免疫疗法, 通常输注约 10^6 - 10^{10} 个(例如约 10^9 个)范围内的细胞剂量。在将本公开的细胞施用于宿主并随后分化后, 诱导特异性针对特定抗原的T细胞。修饰的细胞可以通过本领域已知的任何方法施用, 包括但不限于胸膜施用、静脉内施用、皮下施用、结内施用、肿瘤内施用、鞘内施用、胸膜内施用、腹膜内施用和直接施用于胸腺。在某些实施方式中, 免疫应答细胞和包含它的组合物经胸膜施用于需要的受试者。本公开的主题提供使用细胞(例如, T细胞)或包含其的组合物各种方法。例如, 本公开的主题提供减少受试者中的肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中, 减少肿瘤负荷的方法包括将本公开的细胞或包含其的组合物施用于受试者。本公开的细胞可以减少受试者的肿瘤细胞数量、减小肿瘤大小和/或根除肿瘤。所述肿瘤可以是实体瘤。实体瘤的非限制性实例包括间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜瘤、成胶质细胞瘤、食管癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺瘤、子宫内膜癌、胃癌和胆管癌。

[0322] 本公开的主题还提供增加或延长患有赘生物的受试者的存活的方法。在某些实施

方式中,增加或延长患有赘生物的受试者的存活的方法包括向受试者施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包含其的组合物。该方法可以减少或根除受试者的肿瘤负担。此外,本公开的主题提供增加受试者的免疫应答的方法,包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。本公开的主题还提供用于治疗和/或预防受试者的瘤形成的方法,其包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。

[0323] 本文使用的术语“赘生物”是指以细胞或组织的病理增殖及其随后向其它组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。赘生物生长通常是不受控制的和进行性的,并且在不会引起或将导致正常细胞增殖停止的条件下发生。赘生物可以影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自膀胱、结肠、骨、脑、乳腺、软骨、神经胶质、食管、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胸膜、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫、和阴道的器官,或其组织或细胞类型。赘生物包括癌症,例如肉瘤(sarcomas)、癌(carcinoma)或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。在一个实施方式中,赘生物是实体瘤。赘生物可以是原发性肿瘤或原发性癌症。此外,赘生物可以是转移性状态。

[0324] 可使用本发明公开主题的免疫应答细胞抑制其生长的癌症包括通常对免疫治疗应答的癌症。治疗的癌症的非限制性实例包括间皮瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌(例如转移性乳腺癌、转移性三阴性乳腺癌)、结肠癌、胸膜瘤、成胶质细胞瘤、食管癌、胃癌(gastric cancer)、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃癌(stomach cancer)、胆管癌、宫颈癌和唾液腺癌。另外,本发明公开的主题包括其生长可使用本发明公开的主题的免疫应答细胞来抑制的难治性或复发性恶性肿瘤。

[0325] 可以使用本发明公开的主题的方法治疗的其它赘生物或癌症的实例包括骨癌、肠癌、肝癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤(皮肤或眼内恶性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、喉癌、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、血癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、子宫癌、直肠癌、肛区癌、膀胱癌、脑癌、胃癌(stomach cancer)、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、白血病(例如急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、急性成髓细胞白血病、急性早幼粒细胞性白血病、急性骨髓单核细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病、非霍奇金病)、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症包括由石棉诱导的癌症、包括瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病和实体瘤比如肉瘤和癌(carcinoma)(例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤(lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤(Wilm's tumor)、子宫颈癌、唾液腺癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成

血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、许旺氏细胞瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0326] 受试者可以患有疾病的晚期形式,在这种情况下,治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展和/或减轻副作用。受试者可以具有已经对其进行过治疗的病史,在这种情况下,治疗目标通常包括降低或延迟复发风险。

[0327] 进行治疗的合适的人受试者通常包括可以通过临床标准区分的两个治疗组。具有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是具有临床可测量的肿瘤的受试者。临床可测量的肿瘤是可以基于肿瘤块检测的(例如通过触诊、CAT扫描、声波图、乳房X线照片或X射线;阳性生物化学或组织病理学标记本身不足以鉴定该群体)的肿瘤。将药物组合物施用于这些受试者以引起抗肿瘤应答,目的是减轻他们的病症。理想地,结果是发生肿瘤块的减少,但是任何临床改善均构成益处。临床改善包括降低的肿瘤的风险或进展速率或病理学后果的减少。

[0328] 第二组合适的受试者在本领域中称为“辅助组”。他们是具有赘生物史但已对另一种治疗方式应答的个体。先前的治疗可以包括但不限于手术切除、放射治疗和传统化疗。结果,这些个体没有临床可测量的肿瘤。然而,他们被怀疑在原始肿瘤位点附近或通过转移而处于疾病进展的风险中。该组可以进一步细分为高风险和低风险个体。根据在初始治疗之前或之后观察到的特征进行细分。这些特征在临床领域中是已知的,并且针对每种不同的瘤形成被适当地定义。通常的高风险亚组的特征是其中肿瘤侵入邻近组织或显示累及淋巴结的那些。

[0329] 另一组具有瘤形成的遗传易感性,但尚未证实瘤形成的临床表现。例如,对于仍然处于育龄期但在与乳腺癌相关的遗传突变的测试为阳性的妇女,希望预防性地接受本文所述的一种或多种免疫应答细胞以预防性地防止瘤形成的发生,直到适合于进行预防性手术。

[0330] 作为与肿瘤抗原结合的抗原识别受体和增强免疫应答细胞的抗肿瘤效果的c-Kit突变体的表面表达的结果,过继转移细胞T细胞或NK细胞在肿瘤部位被赋予增强的和选择性的溶细胞活性。此外,在其定位于肿瘤或病毒感染及其增殖之后,T细胞将肿瘤或病毒感染位点转变成高传导性环境,以用于涉及生理抗肿瘤或抗病毒应答的多种免疫细胞(肿瘤浸润淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞、树突状细胞和巨噬细胞)。

[0331] 另外,本公开的主题提供用于在例如免疫受损的受试者中治疗和/或预防病原体感染(例如病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动物感染)的方法。该方法可以包括向患有病原体感染的受试者施用有效量的本公开的细胞、或包含其的组合物。易于治疗的示例性病毒感染包括但不限于巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和流感病毒感染。

[0332] 可以对本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞)进行进一步修饰,以避免或最小化免疫并发症(称为“恶性T细胞转化”),例如移植物抗宿主病(GvHD),或当健康组织表达与肿瘤细胞相同的靶抗原时,会导致类似于GvHD的结果的风险。该问题的潜在解决方案是将自杀基因工程化到本公开的免疫应答细胞中。合适的自杀基因包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型Caspase 9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可通过施用抗EGFR单

克隆抗体(例如西妥昔单抗)来使T细胞消除。EGFRt可以共价连接至本公开的CAR的抗原识别受体的上游。自杀基因可以包含在包含编码本公开的CAR的核酸的载体内。以此方式,在恶性T细胞转化(例如,GVHD)过程中施用旨在激活自杀基因的前药(例如,前药(例如,可以激活iCasp-9的AP1903)),可以触发由自杀基因激活的表达CAR的T细胞的凋亡。将自杀基因掺入本公开的CAR中可提高安全性,能够在很短的时间内消除大部分CAR T细胞。可以在CAR T细胞输注后的给定时间点抢先消除掺入了自杀基因的本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞),或在毒性的最早迹象时将其消除。

[0333] 此外,本公开的主题提供预防和/或治疗受试者的炎性疾病的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。在某些实施方式中,细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在一个实施方式中,炎性疾病是胰腺炎。在某些实施方式中,受试者是人。在某些实施方式中,受试者是器官移植的接受者,例如胰腺移植的接受者。

[0334] 此外,本公开的主题提供在作为器官移植接受者的受试者中预防移植排斥的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用本公开的细胞或包含其的组合物。在某些实施方式中,细胞是免疫抑制细胞。在某些实施方式中,免疫抑制细胞是调节性T细胞。在某些实施方式中,受试者是人。在进一步的实施方式中,受试者是胰腺移植的接受者。

[0335] 在某些实施方式中,本文公开的方法还包括向受试者施用c-Kit抑制剂(例如,第5.8节中公开的一种)。c-Kit抑制剂可以抑制c-Kit的活性(例如激酶活性)。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂特异性抑制c-Kit突变体,例如c-Kit D816V。在某些实施方式中,c-Kit抑制剂是多酪氨酸激酶抑制剂。c-Kit抑制剂的非限制性实例包括达沙替尼、米哚妥林、普纳替尼、伊马替尼。

[0336] 5.11. 试剂盒

[0337] 本公开的主题提供用于在受试者中诱导和/或增强免疫应答、和/或治疗和/或预防瘤形成或病原体感染、或免疫疾病的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包含本公开的细胞或包含其的组合物。在某些实施方式中,试剂盒包括无菌容器;这样的容器可以是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适合于容纳药物的材料制成。在某些非限制性实施方式中,试剂盒包含编码针对目的抗原的抗原识别受体(例如,CAR或TCR)的分离的核酸分子,以及编码可表达形式的c-Kit突变体的分离的核酸分子,其可以任选地包含在相同或不同的载体中。

[0338] 如果需要,将细胞和/或核酸分子与将细胞或核酸分子施用于患有瘤形成或病原体或免疫疾病或有发展成瘤形成或病原体或免疫疾病风险的受试者的说明书一起提供。说明书通常包括有关组合物用于治疗 and/或预防瘤形成或病原体感染的信息。在某些实施方式中,说明书包括以下至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防瘤形成、病原体感染或免疫疾病或其症状的剂量表和给药;注意事项;警告;适应症;不适应症;用药信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。这些说明书可以直接打印在容器上(如果有的话),或者作为粘贴在容器上的标签,或者作为单独的纸页、小册子、卡片或文件夹提供在容器内或与容器一起。

[0339] 实施例

[0340] 除非另有说明,否则本公开的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在技术人员的能力范围内。在诸如“分子克隆:实验室手册”,第二版(Sambrook,1989);“寡核苷酸合成”(Gait,1984);“动物细胞培养”(Freshney,1987);“酶学方法”“实验免疫学手册”(Weir,1996);“哺乳动物细胞的基因转移载体”(Miller和Calos,1987年);“分子生物学的当前方法”(Ausubel,1987年);“PCR:聚合酶链反应”,(Mullis,1994年);“免疫学的当前方法”(Coligan,1991年)中充分地解释了这些技术。这些技术适用于本文公开的多核苷酸和多肽的产生,并且因此可以在制备和实施本文公开的主题中考虑。在以下部分中将讨论用于具体实施例的特别有用的技术。

[0341] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供有关如何制备和使用本公开的细胞和组合物的完整公开和描述,而不旨在限制发明人视为其发明的范围。

[0342] 实施例1-构建体的生成

[0343] 生成了本公开主题的两种构建体。一种构建体指定为“M28z-KITv”(也称为“M28z-KITm”)。M28z-KITv的结构在图1A中示出。如图1A所示,M28z-KITv包含c-Kit突变体(例如,c-Kit D816V)和第二代CAR,该第二代CAR包含抗-MSKN scFv、包含CD28多肽(例如,CD28跨膜结构域或其部分)的跨膜结构域、包含CD3 ζ 和CD28多肽(例如,CD28的细胞内结构域)的细胞内结构域。另一种构建体设计为“Mz-KITv”。Mz-KITv的结构在图1B中示出。如图1B所示,Mz-KITv包含c-Kit突变体(例如,c-Kit D816V)和第一代CAR,该第一代CAR包含抗-MSKN scFv、包含CD28多肽(例如,CD28跨膜结构域或其部分)的跨膜结构域、包含CD3 ζ 的细胞内结构域。

[0344] 实施例2-构建体的转导、pKIT信号传导的激活、扩增和增殖

[0345] 测试了M28z-KITv和Mz-KITv的转导、pKIT信号传导的激活、扩增和增殖。M28z包含与M28z-KITv相同的CAR构建体,但不包含Kit突变体。转导结果在图2中示出。如图2所示,M28z-KITv和Mz-KITv均具有良好的转导。包含M28z的T细胞的MFI值高于包含M28z-KITv的T细胞(称为“M28z-KITv CAR T细胞”)或包含Mz-KITv的T细胞(称为“Mz-KITv CAR T细胞”)。

[0346] 构建体激活pKIT信号传导能力的结果在图3A和3B中示出。如图3A和3B所示,M28z-KITv CAR T细胞组成性地表现出激活的pKIT信号传导。如图3A所示,M28z-KITv CAR T细胞在没有SCF的情况下表现出pKIT活性,而M28z CAR T细胞不表达KIT蛋白。如图3B所示,M28z-KITv CAR T细胞表现出比M28z-KITwt CAR T细胞对照更高的p-STAT3和p-STAT5活性。

[0347] CAR T细胞扩增结果在图4中示出。图4显示连续共培养过程中CAR T细胞的累积扩增。将T细胞用A549GM肿瘤细胞(E:T=3:1)重新刺激。如图4所示,M28z-KITv CAR T细胞和M28z CAR T细胞表现出相似的扩增水平,而Mz-KITv CAR T细胞表现出较少的扩增。A549GM是过表达GFP-荧光素酶和间皮素的非小细胞肺癌细胞系。

[0348] 增殖结果在图5和6中示出。在第一次抗原刺激(E:T=2:1)7天后测量CAR T细胞的远红细胞追踪染色。靶细胞是A549GM。如图5和6所示,与M28z CAR T细胞相比,M28z-KITm CAR T细胞表现出更高的增殖。

[0349] 因此,cKIT共刺激构建体证明了成功的转导、抗原特异性激活和增殖。

[0350] 实施例3-本公开的构建体的体外溶细胞活性

[0351] 评估了M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞对高MSLN表达细胞和低MSLN

表达细胞的体外溶细胞活性。结果在图7A-7B、8A-8B和9中示出。如图7A-7B和8A-8B所示，M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞比M28z CAR T细胞和Mz CAR T细胞更快地杀伤高MSLN肿瘤细胞，例如，在4小时时，M28z-KITv CAR T细胞比M28z CAR T细胞杀伤更多的肿瘤细胞，并且Mz-KITv CAR T细胞比Mz CAR T细胞杀伤更多的肿瘤细胞（参见图7A和8A），而在18小时时没有观察到显著差异（参见图7B和8B）。

[0352] 然而，对于低MSLN表达的肿瘤细胞，即A549G细胞，M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞表现出增强的杀伤能力。在18小时，M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞比M28z CAR T细胞杀伤更多的低MSLN A549G肿瘤细胞。

[0353] 实施例4-抗原刺激后构建体的PD1表达和T细胞状态

[0354] 评估抗原刺激后的PD1表达。每4天用A549GM细胞刺激(E:T=3:1)后，测量FACS。PD1表达的结果在图10A和10B中示出。如图10A和10B所示，与M28z CAR T细胞相比，M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞在抗原刺激后在CD4⁺ T细胞（参见图10A）和CD8⁺ T细胞（参见图10B）中均显示较少的PD1+表达。T细胞状态的结果在图11A中示出。如图11A所示，M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞在抗原刺激后显示更多的干细胞样记忆T细胞(T_{SCM}细胞)。T_{SCM}细胞具有更高的杀伤肿瘤细胞的潜力。M28z-KITv CAR T细胞和Mz-KITv CAR T细胞比M28z和Mz CAR T细胞分泌更高的IFN- γ 和TNF- α ，尽管IL-2更少（图11B）。因此，cKIT共刺激构建体证明了成功的效应细胞因子分泌。

[0355] 还检测了抗原刺激后CAR T细胞的P-ERK信号。与MGM细胞(E:T=1:2)共培养5分钟后，通过FACS测量CD4⁺和CD8⁺CAR T细胞的p-ERK水平。M28z-KITv和Mz-KITv的CD4和CD8 CAR T细胞都具有比M28z更强的p-ERK活性（图20）。

[0356] 实施例5-本公开的构建体的体内活性

[0357] 低间皮素表达肺癌细胞(A549G)和高间皮素表达肺癌细胞(A549GM)用于在NSG小鼠中建立肺肿瘤（图14C）。已建立低MSLN A549G肺肿瘤的小鼠用单剂量的 1×10^5 个M28z、M28z-KITv和Mz-KITv CAR T细胞治疗。体内BLI用于监测NSG小鼠的肿瘤负荷。结果在图12A-12D中示出。如图12A-12D所示，在治疗由具有低抗原（间皮素）表达的癌细胞引起的肿瘤负荷的小鼠时，与用M28z CAR T细胞或Mz-KITv CAR T细胞或未转导的T细胞(UT)治疗的小鼠相比，经M28z-KITv CAR T细胞治疗的小鼠表现出更好和更持久的肿瘤消退。小鼠存活数据以图14A中的Kaplan-meier存活曲线呈现。如图14A所示，在用表达低抗原（间皮素）的肿瘤治疗小鼠时，用单剂量M28z-KITv CAR T细胞治疗的小鼠获得了最佳存活，例如与用M28z CAR T细胞治疗的小鼠相比，用M28z-KITv CAR T细胞治疗的小鼠显示更长的存活。

[0358] 已建立高MSLN A549GM肺肿瘤的小鼠用单剂量的 1×10^5 个M28z、M28z-KITv和Mz-KITv CAR T细胞治疗。体内BLI用于监测NSG小鼠的肿瘤负荷。结果在图13A-13D中示出。如图13A-13D所示，在治疗具有高抗原（间皮素）表达的癌细胞引起的肿瘤负荷的小鼠时，M28z-KITv CAR T细胞治疗的小鼠表现出更好和持久的肿瘤根除。此外，经Mz-KITv CAR T细胞治疗的小鼠表现出与经M28z CAR T细胞治疗的小鼠相当的持久肿瘤消退。与用未转导(UT) T细胞治疗的小鼠相比，用任何间皮素CAR T细胞治疗的小鼠表现出令人印象深刻的肿瘤消退。小鼠存活数据以图14B中的Kaplan-meier存活曲线呈现。如图14B所示，在用高抗原（间皮素）表达的肿瘤治疗小鼠时，与用M28z CAR T细胞治疗的小鼠相比，用单剂量M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞治疗的小鼠获得最佳存活。在所有3组小鼠中，与用未转导(UT) T

细胞治疗的小鼠相比,未达到中位存活。

[0359] 实施例6-构建体对酪氨酸激酶抑制剂的敏感性

[0360] 用A549GM细胞(E:T=3:1)刺激7天后,用500nM或5 μ M的达沙替尼(Dasa)、500nM或5 μ M的普纳替尼(Pona)或100nM或1 μ M的PKC412处理CAR T 72小时,然后通过FACS测量活细胞。如图15所示,M28z-KITv CAR T对酪氨酸激酶抑制剂的敏感性高于M28z CAR T细胞。

[0361] 实施例7-本公开的构建体的体内活性

[0362] 使用具有高表达水平的间皮素(MSLN)的A549GM肿瘤细胞或具有低表达水平的间皮素(MSLN)的A549G肿瘤细胞在NSG小鼠中建立肺肿瘤。然后用单剂量的 1×10^5 个M28z、M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞治疗小鼠。Mz-KITv和M28z-KITv CAR T细胞对高间皮素表达的肺癌细胞都具有比M28z CAR T细胞更高的抗肿瘤功效(图16A-16C)。在低MSLN A549G肺癌中,与M28z CAR T细胞相比,M28z-KITv CAR T细胞具有增强的抗肿瘤活性,尽管Mz-KITv CAR T细胞的抗肿瘤活性低于M28z CAR T细胞(图17A-17C)。

[0363] MST0细胞分别过表达低MSLN蛋白和高MSLN蛋白以产生MG-LM和MGM细胞(图19A)。在胸膜间皮瘤肿瘤模型中,通过胸膜注射高表达MSLN的间皮瘤(MGM)肿瘤细胞或低表达MSLN的间皮瘤(MG-LM)肿瘤细胞在NSG小鼠中建立间皮瘤。然后将这些小鼠胸膜内施用单剂量的 5×10^4 个P28z、Mz、M28z、M28z-KITv或Mz-KITv CAR T细胞。在高MSLN表达的间皮瘤中,Mz-KITv CAR T细胞比Mz CAR T细胞具有增加的抗肿瘤活性,尽管未检测到M28z-KITv和M28z CAR T细胞之间的显著差异(图18A和18B)。有目的地减少CAR T细胞剂量以模拟临床中看到的低E:T比。减少的cKIT CAR T细胞剂量产生了与CD28 CAR T细胞相比相当的抗肿瘤功效。这可能是由于E:T比非常低时PDL1/PD1通路相关的耗尽。M28z-KITv CAR T细胞对低MSLN表达的间皮瘤也具有增强的抗肿瘤活性(图19B)。

[0364] 从小鼠获得的CAR T细胞暴露于高间皮素表达的间皮瘤细胞中,并分析PD1表达。PD1上调在高E:T比较低,但在低E:T比时相似(图21A和21B)。

[0365] 实施例8:体外Nano String分析

[0366] 与MSLN⁺肿瘤细胞共培养24小时后,收集CD8⁺M28z和M28z-KITv CAR T细胞用于CAR T组基因的Nano String分析。780个检测到的基因中有87个具有显著的倍数变化(图22A)。通路评分的热图显示M28z-KITv CAR T细胞中与表型和功能性T细胞特征相关的丰富基因组(图22B)。M28z-KITv CAR T细胞中上调的基因通路在图22C中列出。I型干扰素信号传导基因(图23A)和II型干扰素信号传导基因(图23B)的表达在M28z-KITv CAR T细胞中显著增加。

[0367] 本公开的主题的实施方式

[0368] 从前面的描述中,将显而易见的是,可以对本公开的主题进行变型和修改以将其应用于各种用途和条件。这样的实施方式也在所附权利要求的范围内。

[0369] 本文所述变量定义中的元素列表包括将变量定义为列出的元素的任何单个元素或组合(或子组合)。本文所述实施方式包括将该实施方式作为任何单一实施方式或与其它实施方式或其部分相结合。

[0370] 本说明书中提到的所有专利和出版物都以相同的程度并入本文以供参考,就如同每个独立的专利和出版物都被具体地和单独地指出以并入而供参考一样。

序列表

<110> 纪念斯隆-凯瑟琳癌症中心

<120> 表达C-KIT突变的细胞及其用途

<130> 072734.1174

<150> US 62/943,032

<151> 2019-12-03

<160> 52

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 976

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

195	200	205
Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg		
210	215	220
Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser		
225	230	235
Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln		
245	250	255
Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln		
260	265	270
Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe		
275	280	285
Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr		
290	295	300
Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn		
305	310	315
Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu		
325	330	335
Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn		
340	345	350
Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu		
355	360	365
Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly		
370	375	380
Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn		
385	390	395
Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu		
405	410	415
Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly		
420	425	430
Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln		
435	440	445
Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser		
450	455	460
Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser		
465	470	475
Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp		
485	490	495
Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn		
500	505	510

Lys	Glu	Gln	Ile	His	Pro	His	Thr	Leu	Phe	Thr	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly
515				520				525							
Phe	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Met	Met	Cys	Ile	Ile	Val	Met	Ile	Leu	Thr
530				535				540							
Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Met	Tyr	Glu	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Val
545				550				555				560			
Glu	Glu	Ile	Asn	Gly	Asn	Asn	Tyr	Val	Tyr	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu
565				570				575							
Pro	Tyr	Asp	His	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asn	Arg	Leu	Ser	Phe	Gly
580				585				590							
Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Ala
595				600				605							
Tyr	Gly	Leu	Ile	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Met	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met
610				615				620							
Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	His	Leu	Thr	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu
625				630				635				640			
Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gly	Asn	His	Met	Asn	Ile	Val	Asn	Leu
645				650				655							
Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Glu	Tyr
660				665				670							
Cys	Cys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Phe	Leu	Arg	Arg	Lys	Arg	Asp	Ser
675				680				685							
Phe	Ile	Cys	Ser	Lys	Gln	Glu	Asp	His	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Tyr	Lys
690				695				700							
Asn	Leu	Leu	His	Ser	Lys	Glu	Ser	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Thr	Asn	Glu
705				710				715				720			
Tyr	Met	Asp	Met	Lys	Pro	Gly	Val	Ser	Tyr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Ala
725				730				735							
Asp	Lys	Arg	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Arg	Asp	Val
740				745				750							
Thr	Pro	Ala	Ile	Met	Glu	Asp	Asp	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Leu	Glu	Asp
755				760				765							
Leu	Leu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Gln	Val	Ala	Lys	Gly	Met	Ala	Phe	Leu	Ala
770				775				780							
Ser	Lys	Asn	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Leu
785				790				795				800			
Thr	His	Gly	Arg	Ile	Thr	Lys	Ile	Cys	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp
805				810				815							
Ile	Lys	Asn	Asp	Ser	Asn	Tyr	Val	Val	Lys	Gly	Asn	Ala	Arg	Leu	Pro

820	825	830
Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe		
835	840	845
Glu Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser		
850	855	860
Leu Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr		
865	870	875
Lys Met Ile Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro		
885	890	895
Ala Glu Met Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu		
900	905	910
Lys Arg Pro Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile		
915	920	925
Ser Glu Ser Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro		
930	935	940
Asn Arg Gln Lys Pro Val Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val		
945	950	955
Gly Ser Thr Ala Ser Ser Ser Gln Pro Leu Leu Val His Asp Asp Val		
965	970	975
<210> 2		
<211> 976		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Met Arg Gly Ala Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Cys Val Leu Leu Leu		
1 5 10 15		
Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly		
20 25 30		
Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val		
35 40 45		
Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val		
50 55 60		
Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn		
65 70 75 80		
Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr		
85 90 95		
Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg		
100 105 110		
Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu		

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

Phe	Pro	Glu	Pro	Thr	Ile	Asp	Trp	Tyr	Phe	Cys	Pro	Gly	Thr	Glu	Gln	
435						440						445				
Arg	Cys	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Asp	Val	Gln	Thr	Leu	Asn	Ser	
450						455						460				
Ser	Gly	Pro	Pro	Phe	Gly	Lys	Leu	Val	Val	Gln	Ser	Ser	Ile	Asp	Ser	
465						470						475			480	
Ser	Ala	Phe	Lys	His	Asn	Gly	Thr	Val	Glu	Cys	Lys	Ala	Tyr	Asn	Asp	
			485						490						495	
Val	Gly	Lys	Thr	Ser	Ala	Tyr	Phe	Asn	Phe	Ala	Phe	Lys	Gly	Asn	Asn	
			500						505						510	
Lys	Glu	Gln	Ile	His	Pro	His	Thr	Leu	Phe	Thr	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	
515						520						525				
Phe	Val	Ile	Val	Ala	Gly	Met	Met	Cys	Ile	Ile	Val	Met	Ile	Leu	Thr	
530						535						540				
Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Met	Tyr	Glu	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Val	
545						550						555			560	
Glu	Glu	Ile	Asn	Gly	Asn	Asn	Tyr	Val	Tyr	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	
			565						570						575	
Pro	Tyr	Asp	His	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Asn	Arg	Leu	Ser	Phe	Gly	
			580						585						590	
Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	
595						600						605				
Tyr	Gly	Leu	Ile	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Met	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	
610						615						620				
Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	His	Leu	Thr	Glu	Arg	Glu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	
625						630						635			640	
Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Tyr	Leu	Gly	Asn	His	Met	Asn	Ile	Val	Asn	Leu	
			645						650						655	
Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Ile	Thr	Glu	Tyr	
			660						665						670	
Cys	Cys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Phe	Leu	Arg	Arg	Lys	Arg	Asp	Ser	
675						680						685				
Phe	Ile	Cys	Ser	Lys	Gln	Glu	Asp	His	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Tyr	Lys	
690						695						700				
Asn	Leu	Leu	His	Ser	Lys	Glu	Ser	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Thr	Asn	Glu	
705						710						715			720	
Tyr	Met	Asp	Met	Lys	Pro	Gly	Val	Ser	Tyr	Val	Val	Pro	Thr	Lys	Ala	
			725						730						735	
Asp	Lys	Arg	Arg	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ile	Glu	Arg	Asp	Val	

740	745	750
Thr Pro Ala Ile Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp		
755	760	765
Leu Leu Ser Phe Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala		
770	775	780
Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu		
785	790	795
Thr His Gly Arg Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val		
805	810	815
Ile Lys Asn Asp Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro		
820	825	830
Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe		
835	840	845
Glu Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser		
850	855	860
Leu Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr		
865	870	875
Lys Met Ile Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro		
885	890	895
Ala Glu Met Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu		
900	905	910
Lys Arg Pro Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile		
915	920	925
Ser Glu Ser Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro		
930	935	940
Asn Arg Gln Lys Pro Val Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val		
945	950	955
Gly Ser Thr Ala Ser Ser Ser Gln Pro Leu Leu Val His Asp Asp Val		
965	970	975

<210> 3

<211> 622

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro		
1	5	10
Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln		
20	25	30
Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu		

35	40	45
Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro	Pro Asn Ile Ser Ser	Leu Ser Pro Arg
50	55	60
Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys	Ala Glu Val Ser Gly	Leu Ser Thr Glu
65	70	75
Arg Val Arg Glu Leu Ala Val	Ala Leu Ala Gln Lys	Asn Val Lys Leu
85	90	95
Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys	Leu Ala His Arg Leu	Ser Glu Pro Pro
100	105	110
Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro	Leu Asp Leu Leu Leu	Phe Leu Asn Pro
115	120	125
Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln	Ala Cys Thr His Phe	Phe Ser Arg Ile
130	135	140
Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu	Leu Pro Arg Gly Ala	Pro Glu Arg Gln
145	150	155
Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu	Ala Cys Trp Gly Val	Arg Gly Ser Leu
165	170	175
Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg	Ala Leu Gly Gly Leu	Ala Cys Asp Leu
180	185	190
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu	Ser Ala Glu Val Leu	Leu Pro Arg Leu
195	200	205
Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu	Asp Gln Asp Gln Gln	Glu Ala Ala Arg
210	215	220
Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly	Pro Pro Tyr Gly Pro	Pro Ser Thr Trp
225	230	235
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala	Leu Arg Gly Leu Leu	Pro Val Leu Gly
245	250	255
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile	Pro Gln Gly Ile Val	Ala Ala Trp Arg
260	265	270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro	Ser Trp Arg Gln Pro	Glu Arg Thr Ile
275	280	285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg	Glu Val Glu Lys Thr	Ala Cys Pro Ser
290	295	300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile	Asp Glu Ser Leu Ile	Phe Tyr Lys Lys
305	310	315
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val	Asp Ala Ala Leu Leu	Ala Thr Gln Met
325	330	335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro	Phe Thr Tyr Glu Gln	Leu Asp Val Leu
340	345	350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val		
355	360	365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile		
370	375	380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu		
385	390	395
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp		
	405	410
Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr		
	420	425
Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu		
	435	440
Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp		
	450	455
Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala		
465	470	475
Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile		
	485	490
Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser		
	500	505
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr		
	515	520
Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly		
	530	535
Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg		
545	550	555
Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu		
	565	570
Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser		
	580	585
Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro		
	595	600
Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala		
	610	615
		620

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp

1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 7

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

Ala Ala Ser Ser

1

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 11

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

<210> 12

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 12

caggttcagc ttcaggagag tggcccaggc ctggtgaagc caagtgagac tctcagcttg 60
 acttgcacag tttctggagg cagtgtctcc tcaggcagct attattggtc ctggattcgg 120
 cagccccctg ggaaaggcct ggagtggatt gggtacatat attacagtgg cagcaciaaat 180
 tacaatccat ccctgaagtc tcgagtaact atcagtgtgg acacaagcaa gaatcagttt 240
 tcaactcaaac tgtcttctgt gactgctgct gacactgctg tttattattg tgccagggag 300
 gggaaaaatg gggcatttga tatttggggg cagggcaciaa tggtgacagt cagctct 357

<210> 13

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 13

cgccatcaga tgactcagtc cccctccagt ctttctgcct cagttgggga tagagtgacc 60
 atcacatgca gagcaagtca gagcatatca tcctatctga actggtacca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ccaaattgct gatttatgca gcctcaagtc tccagagtgg ggtgccaagc 180
 aggttctcag gcagtggcag tgggacagat ttcacattga caatcagctc cctccaacct 240

gaagattttg ccacctacta ttgccagcaa tcctacagca cgcccctgac ttttgaggt 300
 ggcacaaagg tagagatcaa gaggact 327
 <210> 14
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Lys Asn Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg His Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 130 135 140
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 165 170 175
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 180 185 190
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 195 200 205
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 210 215 220
 Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 225 230 235 240

Lys Arg Thr

<210> 15

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 15

```
cagggttcagc ttcaggagag tggcccaggc ctggtgaagc caagtgagac tctcagcttg 60
acttgcacag tttctggagg cagtgtctcc tcaggcagct attattggtc ctggattcgg 120
cagccccctg ggaaaggcct ggagtggatt gggtacatat attacagtgg cagcacaaat 180
tacaatccat ccctgaagtc tcgagtaact atcagtgtgg acacaagcaa gaatcagttt 240
tcaactcaaac tgtcttctgt gactgtctgt gacactgtctg tttattattg tgccaggagg 300
gggaaaaatg gggcatttga tatttgggggt cagggcaciaa tggtgacagt cagctctgga 360
ggtggagggt caggaggagg aggcagtgga ggtggtgggt cacgccatca gatgactcag 420
tccccctcca gtctttctgc ctgagttggg gatagagtga ccatcacatg cagagcaagt 480
cagagcatat catcctatct gaactggtac cagcagaagc cagggaagc ccccaaattg 540
ctgatttatg cagcctcaag tctccagagt ggggtgccaa gcaggttctc aggcagtggc 600
agtgggacag atttcacatt gacaatcagc tccctccaac ctgaagattt tgccacctac 660
tattgccagc aatcctacag cacgcccctg acttttggag gtggcacaaa ggtagagatc 720
aagaggact 729
```

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 19

ggaggtggag gctcaggagg aggaggcagt ggaggtggtg ggtca 45

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 20

ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatca 45

<210> 21

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala

50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala

65	70	75	80
Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp			
	85	90	95
Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr			
100	105	110	
Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe			
115	120	125	
Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg			
130	135	140	
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg			
145	150	155	160
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly			
	165	170	175
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr			
180	185	190	
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His			
195	200	205	
Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser			
210	215	220	
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val			
225	230	235	
<210> 22			
<211> 247			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 22			
Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met			
1	5	10	15
Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Lys Pro Gln Ala Pro			
20	25	30	
Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys			
35	40	45	
Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser			
50	55	60	
Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val			
65	70	75	80
Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu			
	85	90	95
Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr			

<400> 24

81

<212> DNA

<213> 智人

<400> 26

ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
gccttttatta ttttctgggt g 81

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 28

<211> 81

<212> DNA

<213> 智人

<400> 28

ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
gccttttatta ttttctgggt g 81

<210> 29

<211> 164

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

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

100	105	110
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
115	120	125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
130	135	140
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
145	150	155
Leu Pro Pro Arg		

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

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

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> 智人

<400> 31

```

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgttcaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc ttcagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggagggggca aggggcacga tggccttttc caggggctca gtacagccac caaggacacc 300
ttcgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

```

<210> 32

<211> 123

<212> DNA

<213> 智人

<400> 32

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
gggcccacccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
tcc 123

<210> 33

<211> 218

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 33

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

210 215
 <210> 34
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 小鼠
 <400> 34
 aatagtagaa ggaacagact cttcaaagt gactacatga acatgactcc ccggaggcct 60
 ggg 63
 <210> 35
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 36

<211> 435

<212> DNA

<213> 智人

<400> 36

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 60
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180
 gctttccccc aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gtttccgtgt cacacaactg 240
 cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 300
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 360
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc 420
 aggccagccg gccag 435

<210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> 智人

<400> 37

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

<210> 38

<211> 495

<212> DNA

<213> 智人

<400> 38

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
 ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
 gctttccccc aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gtttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480
 aggccagccg gccag 495

<210> 39

<211> 213

<212> DNA

<213> 智人

<400> 39

cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60
 ctgtccctgc gccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgc cagcaggggg 120
 ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180
 ctctgtcac tggttatcac cctttactgc aac 213

<210> 40

<211> 219

<212> DNA

<213> 智人

<400> 40

cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60
 ctgtccctgc gccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgc cagcaggggg 120
 ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180
 ctctgtcac tggttatcac cctttactgc aaccacagg 219

<210> 41

<211> 239

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg		
100	105	110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu		
115	120	125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val		
130	135	140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro		
145	150	155
Arg Pro Ala Gly Gln Ala Ala Ala Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
165	170	175
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
180	185	190
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
195	200	205
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
210	215	220
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn		
225	230	235

<210> 42

<211> 717

<212> DNA

<213> 智人

<400> 42

```

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggg tcttagactc cccagacagg ccctggaacc ccccccacctt ctccccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gctttccccc aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc 480
aggccagccg gccaggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccgcc 540
gcgcccacga tcgcgtcgca gccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 600
gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 660
ctggccggga cttgtggggg cttctctctg tcaactgtta tcacccttta ctgcaac 717

```

<210> 43

<211> 241

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

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

<210> 44

<211> 723

<212> DNA

<213> 智人

<400> 44

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
 ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gctttccccc aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc 480
aggccagccg gccaggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccgcc 540
gcgcccacga tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 600
gggggcgcag tgacacagag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 660
ctggccggga cttgtgggt cttctctctg tcaactggta tcacccttta ctgcaaccac 720

agg 723

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 46

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu

1 5 10 15

Leu Val Asn Ser

20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 49

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser

1 5 10 15

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu	Val	Val	Ser	Asn	Leu	Leu	Leu	Cys	Gln	Gly	Val	Val	Ser
			20					25					30

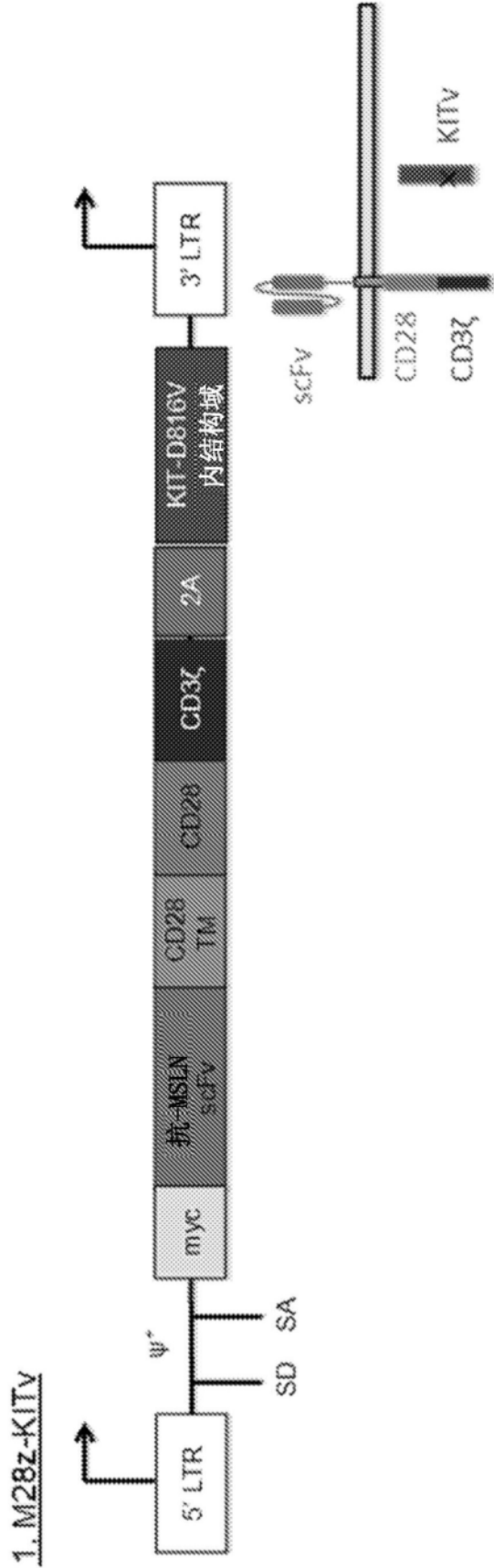


图1A

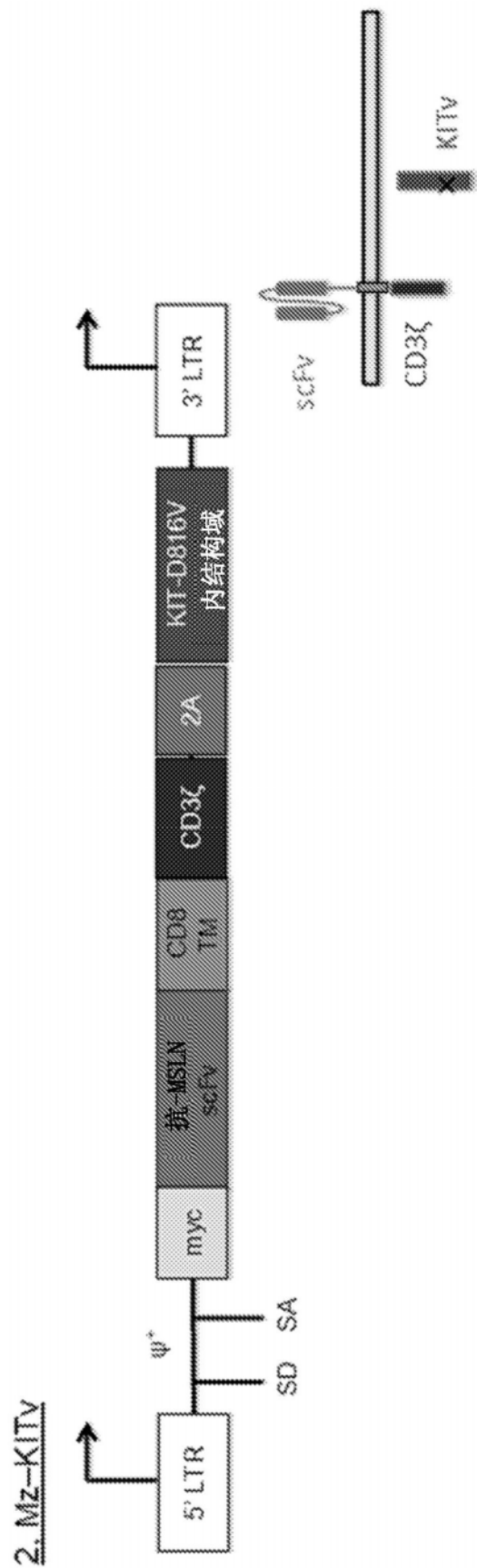


图1B

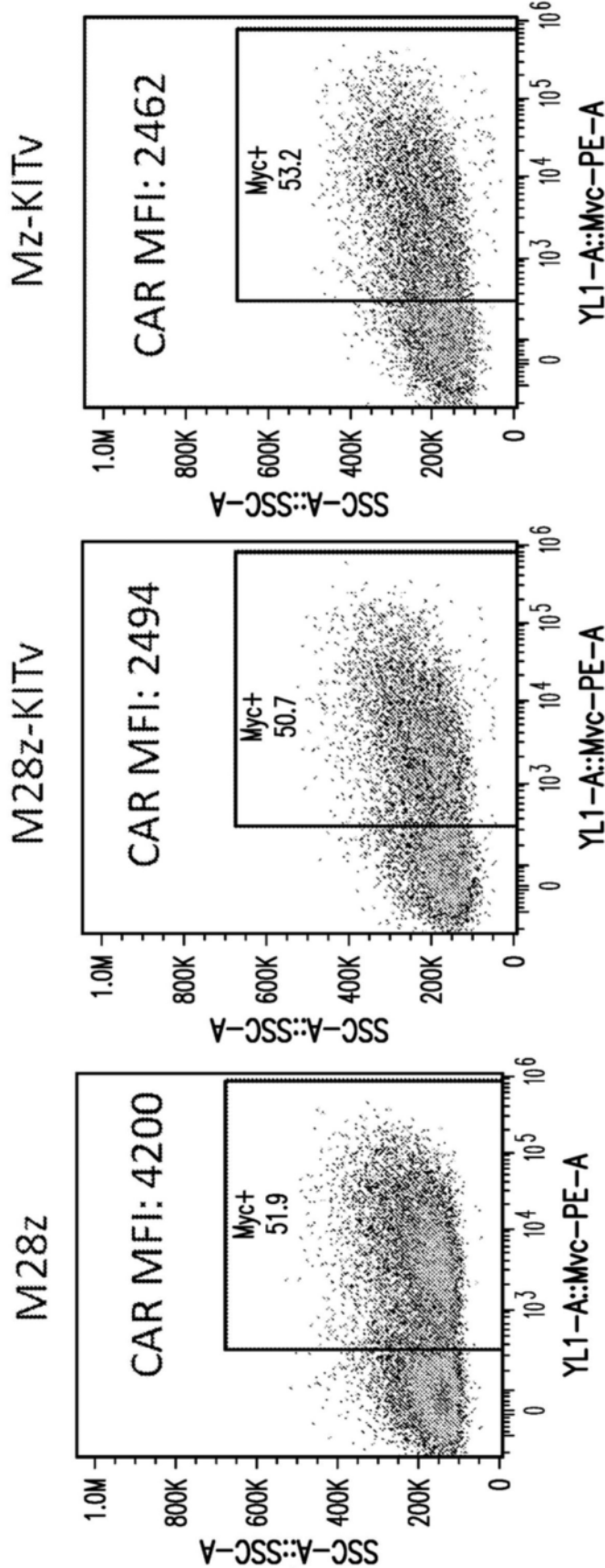
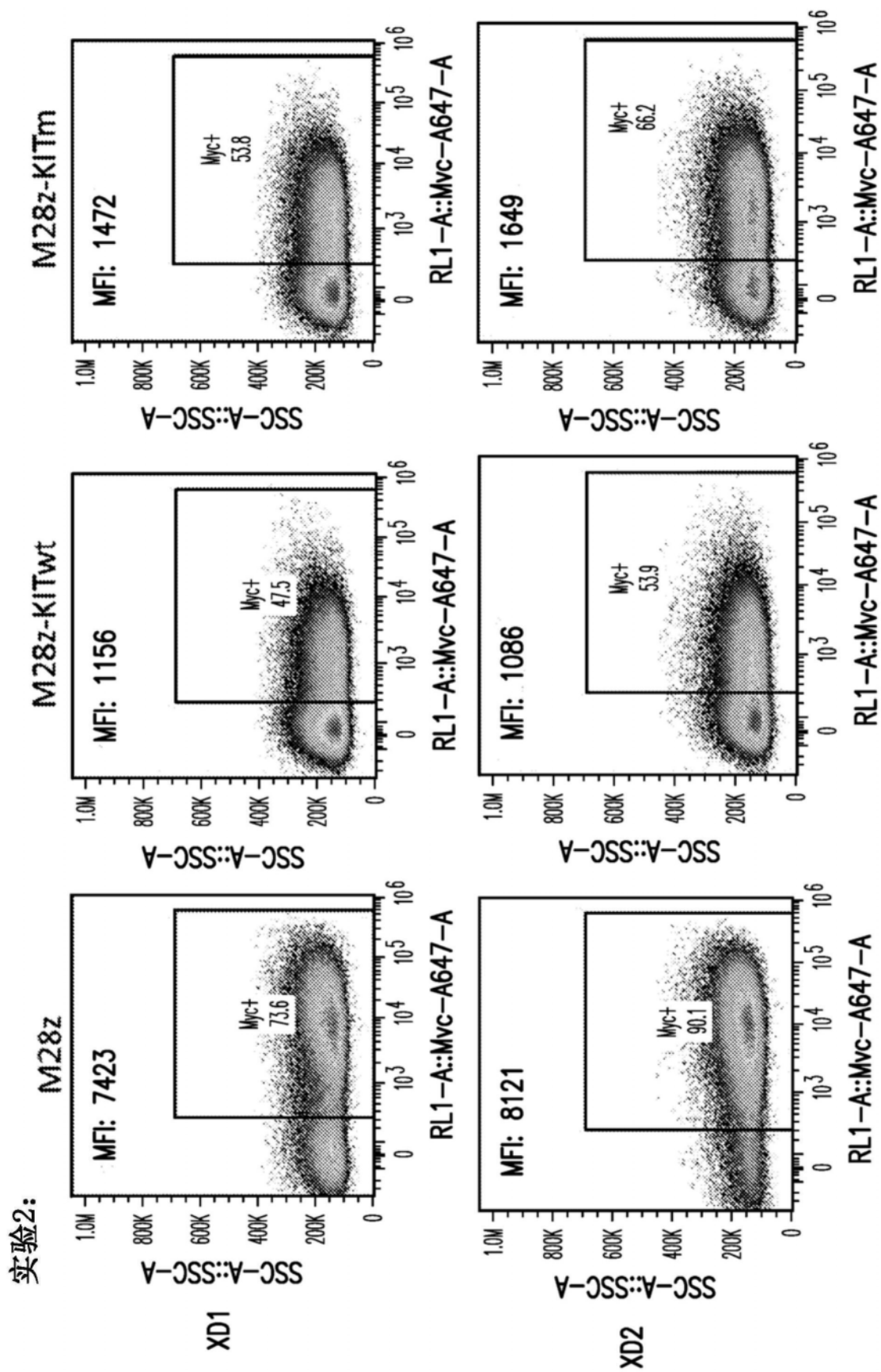


图2



M28z的MFI比其它CAR-T高得多

图2续

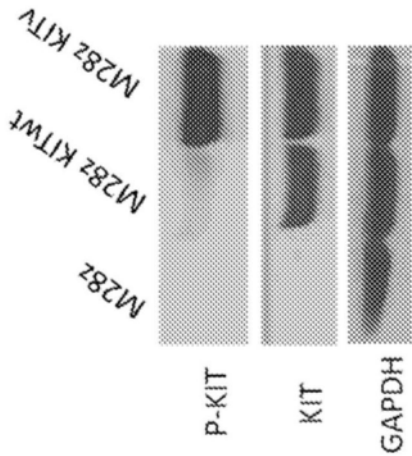


图3A

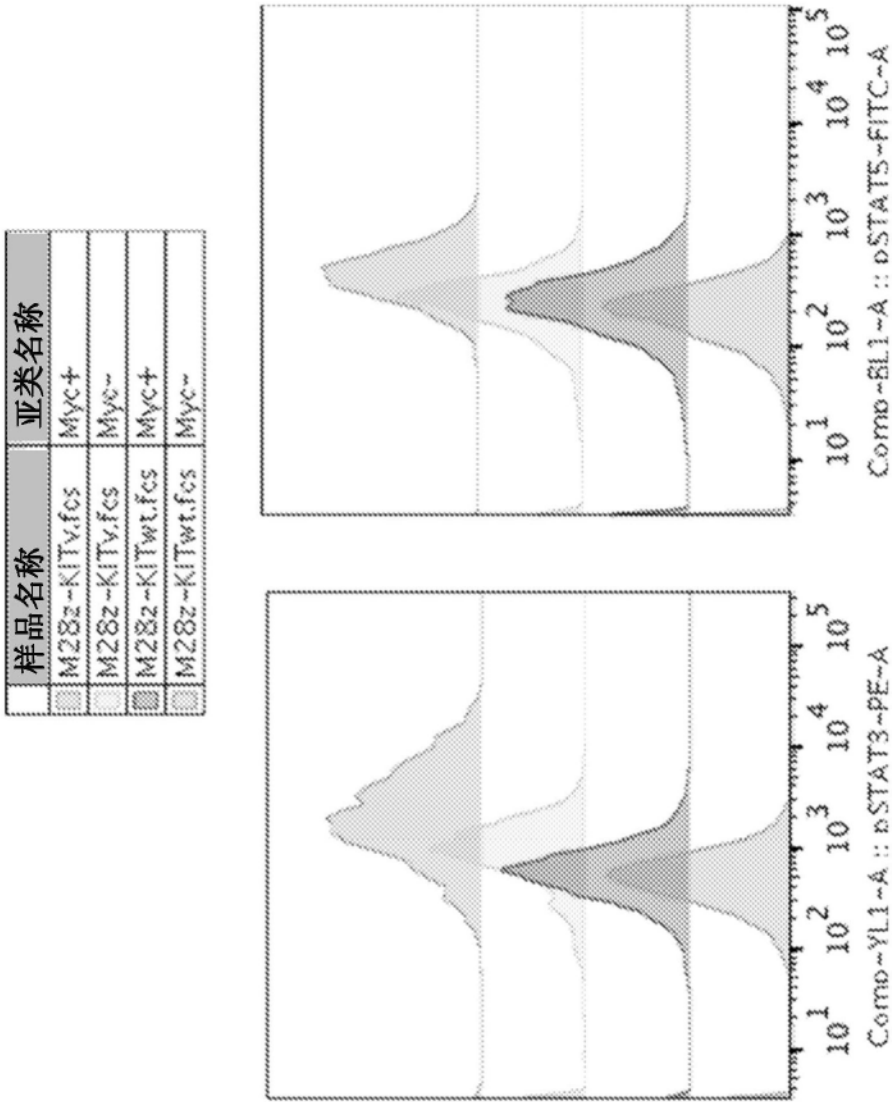


图3B

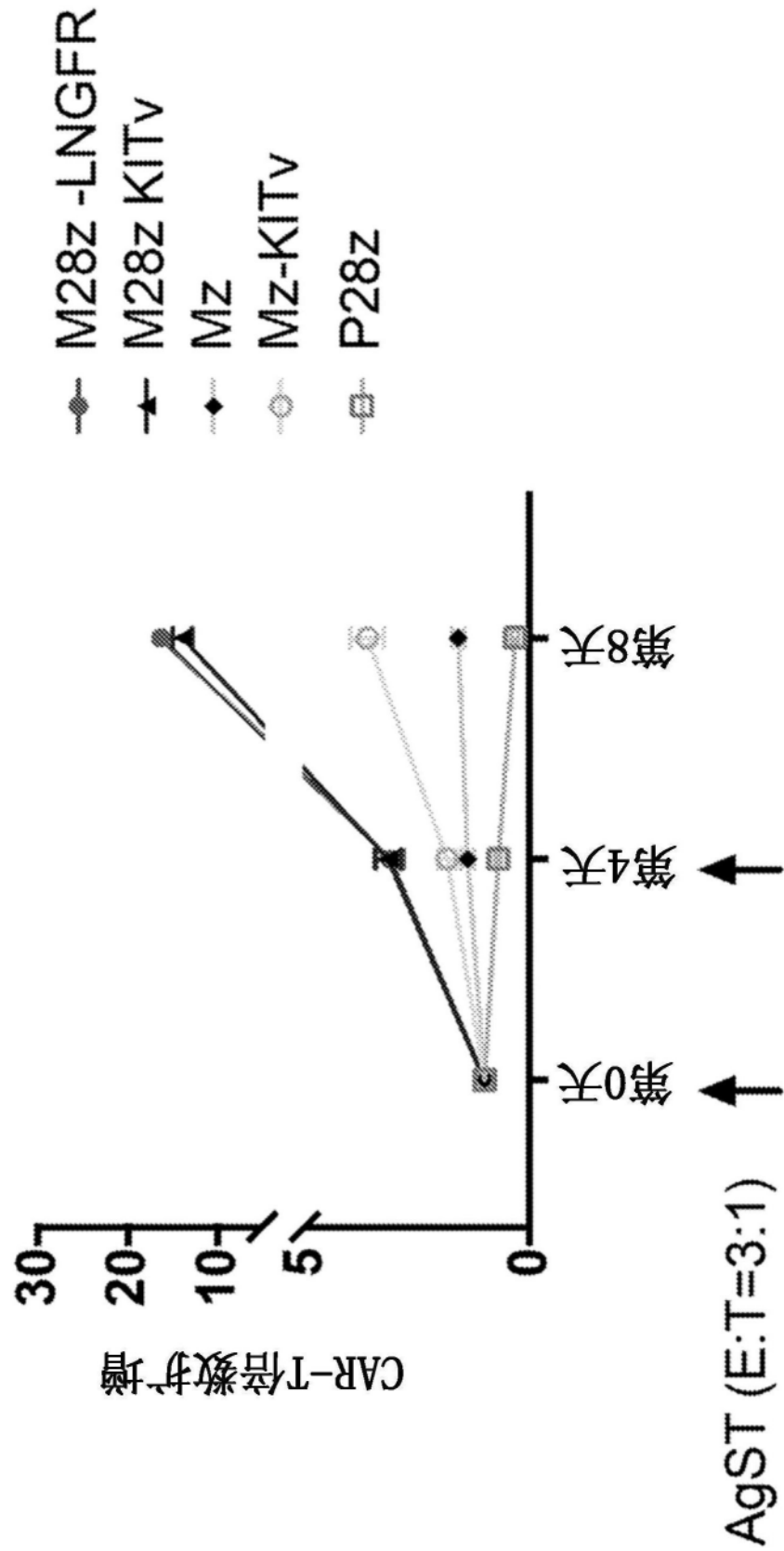


图4

远红细胞追踪7天第一次抗原刺激 (E:T=2:1) 靶细胞: A549GM

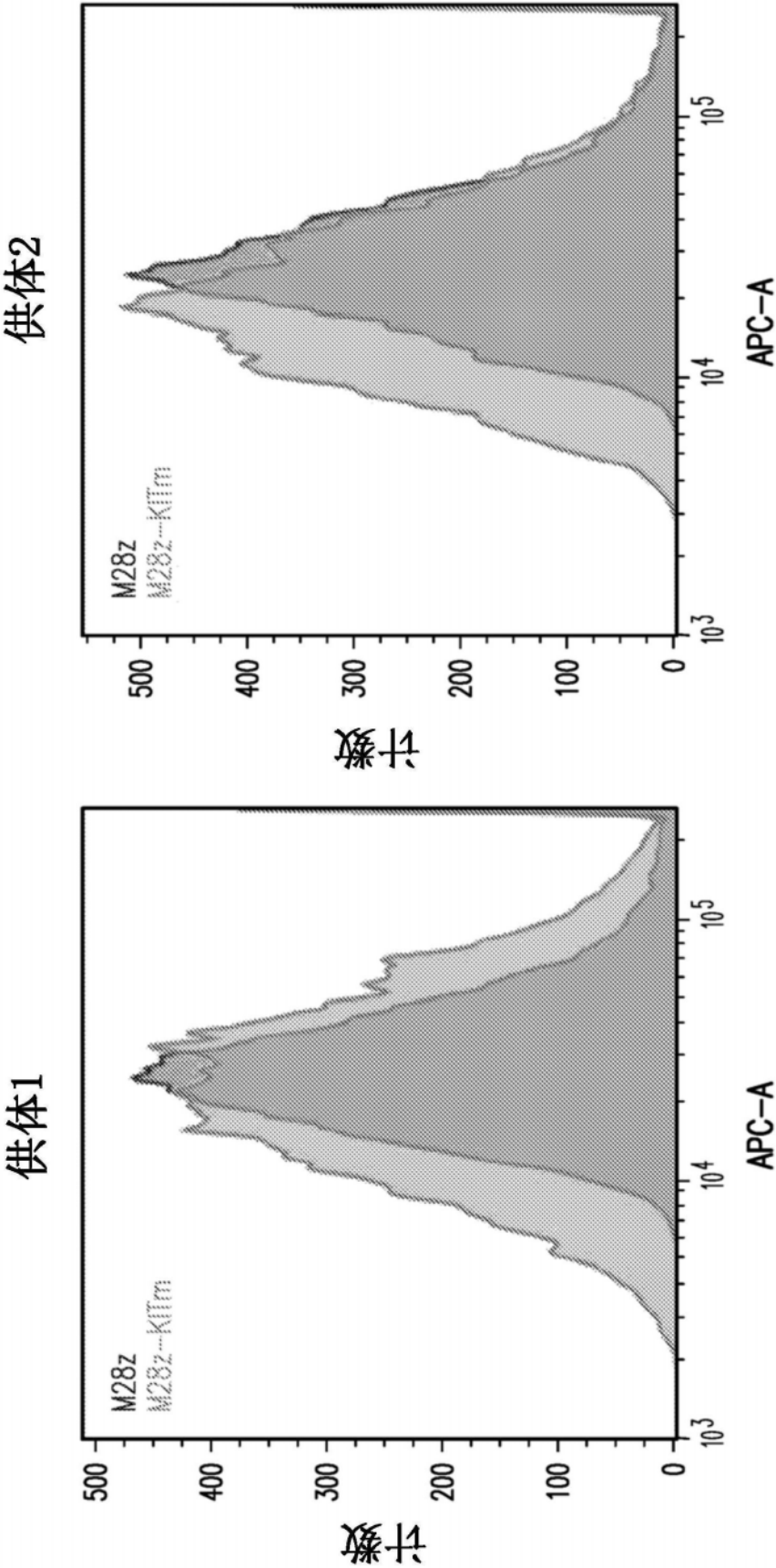


图5

远红细胞追踪7天第一次抗原刺激 (E:T=2:1) 靶细胞: A549GM

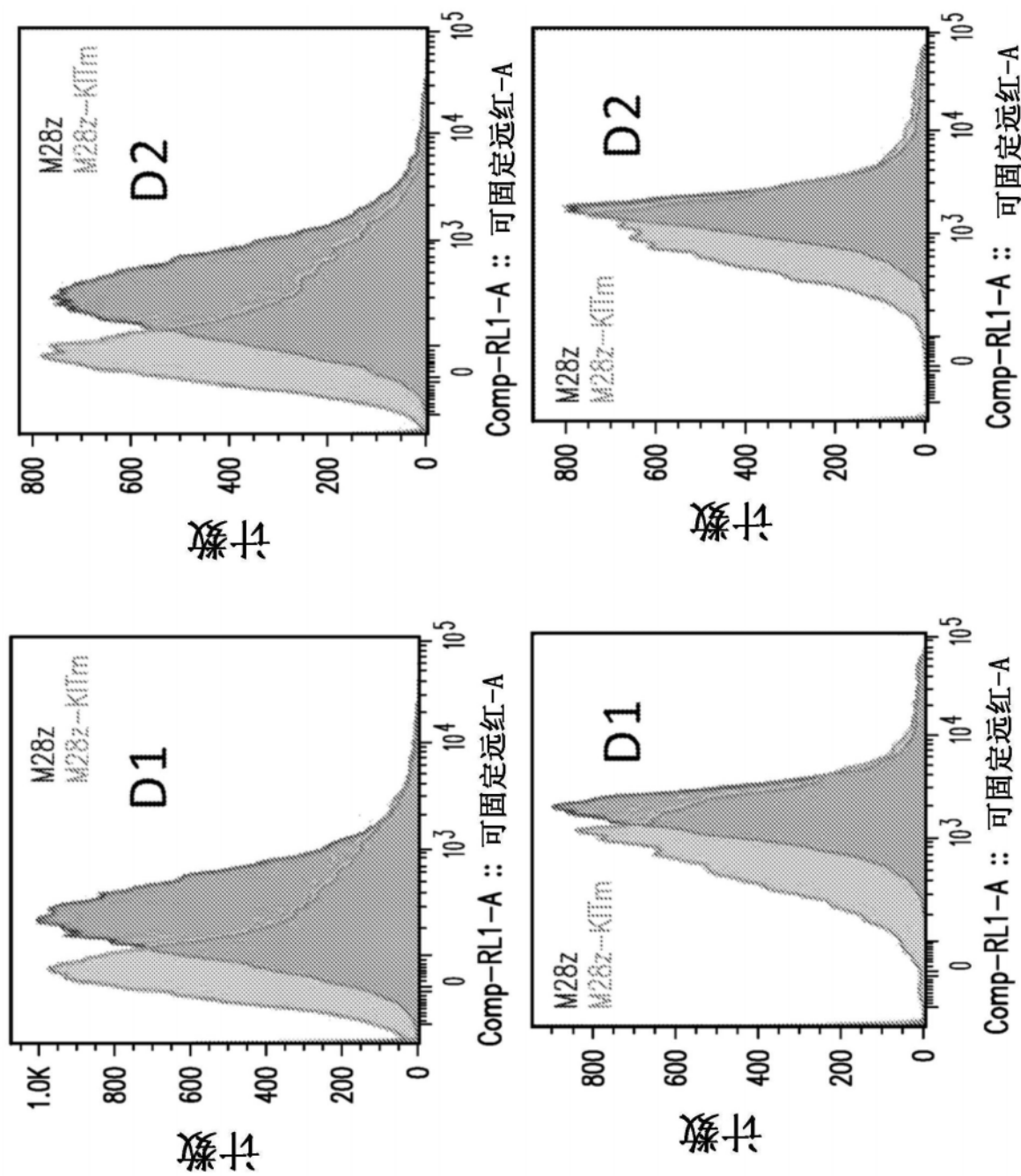


图6

供体1

4小时CTL

18小时CTL

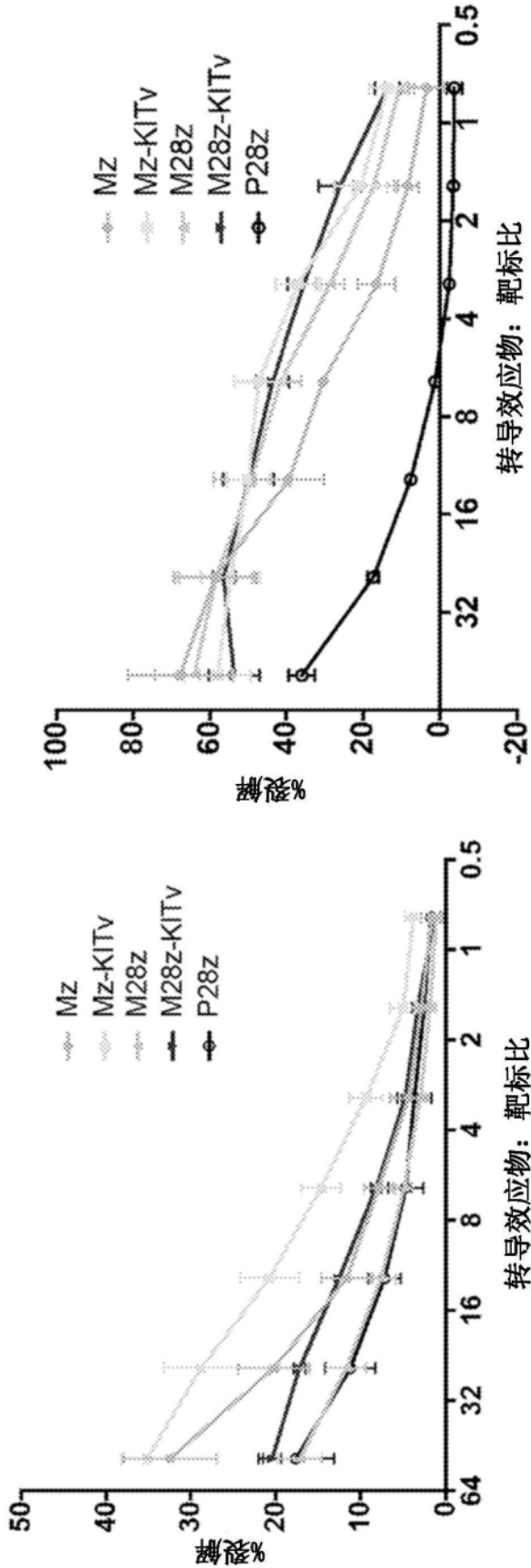


图7A

图7B

供体2

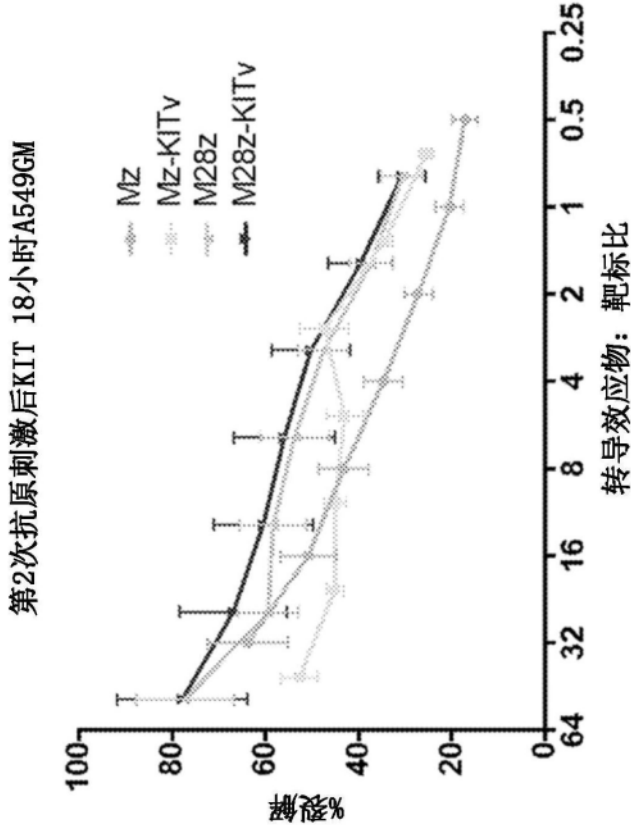


图8B

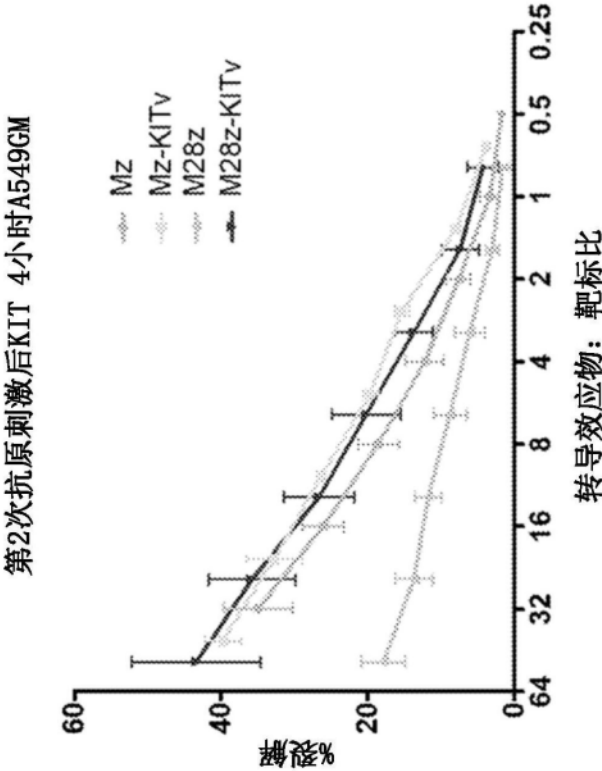


图8A

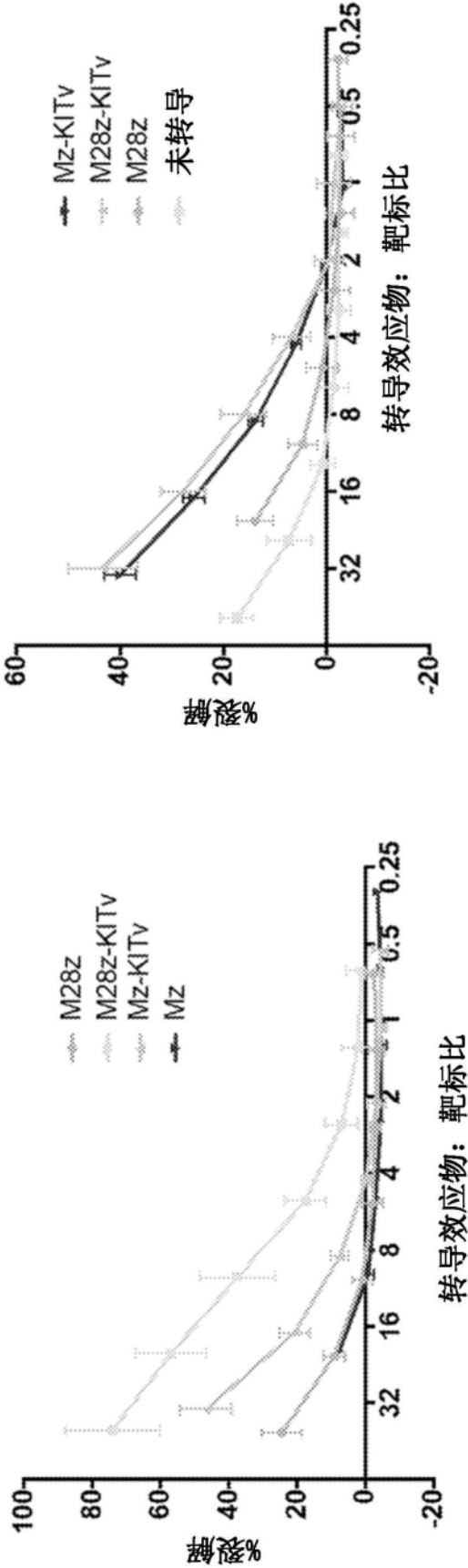


图9

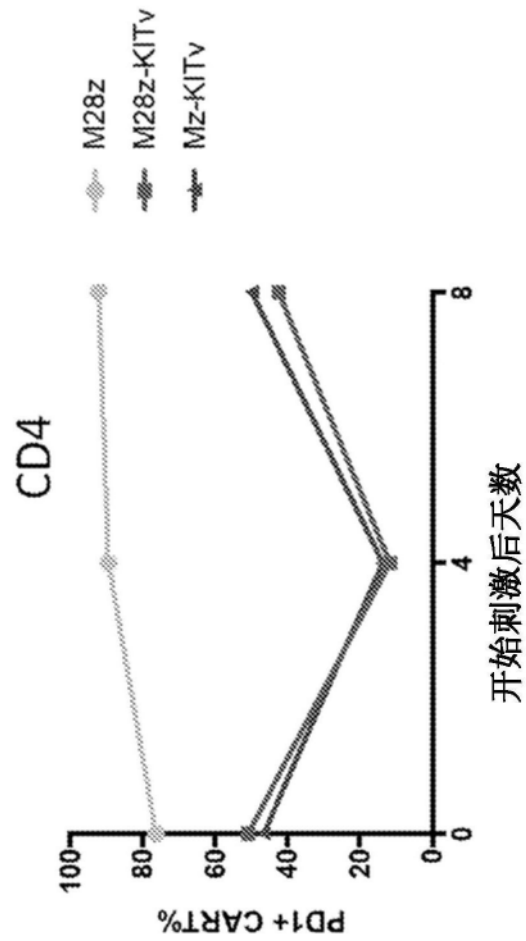


图10A

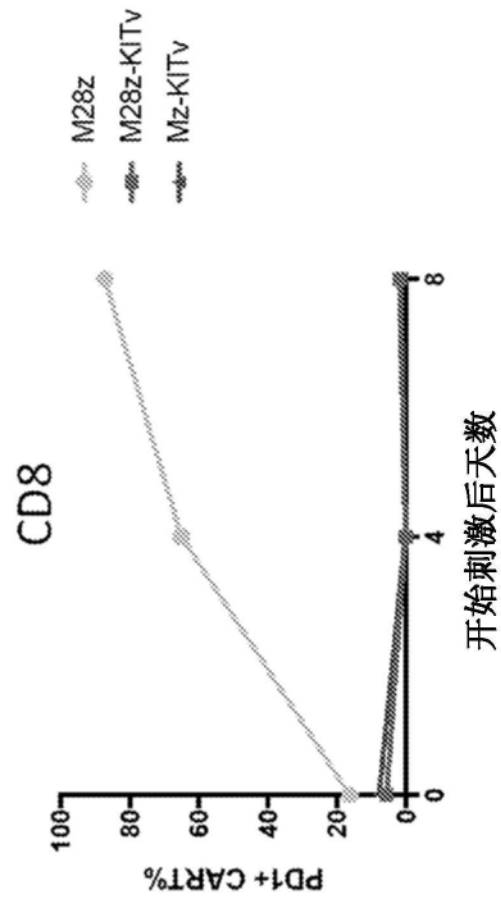


图10B

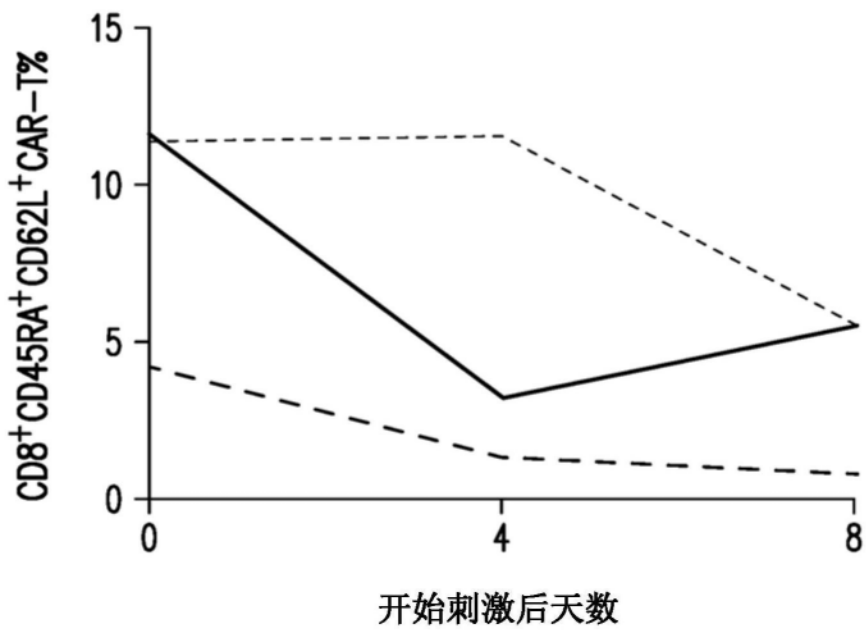
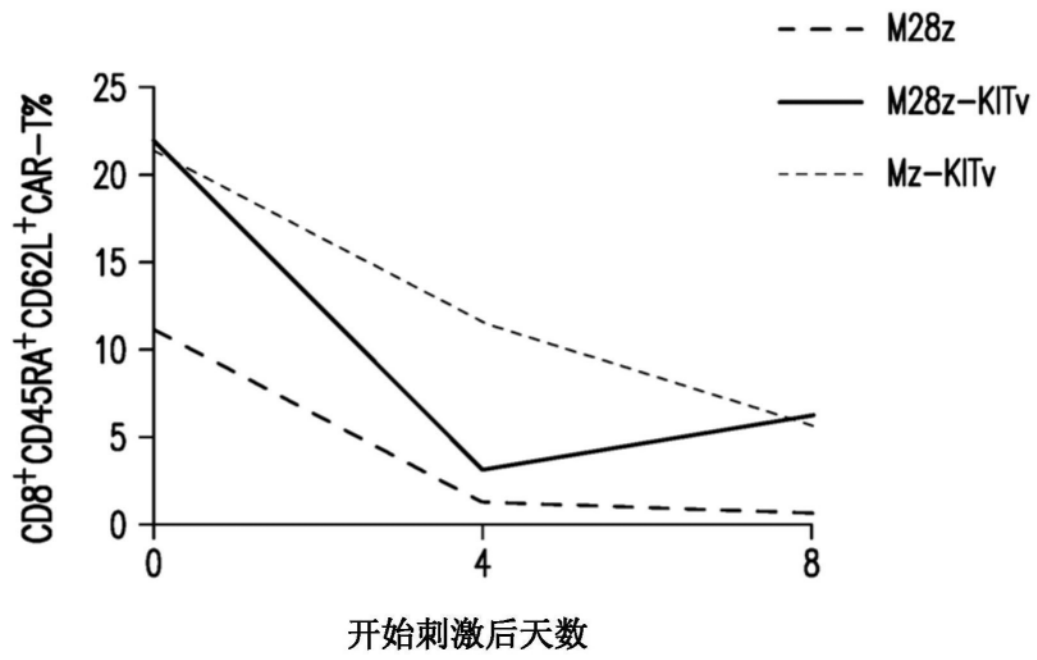


图11A

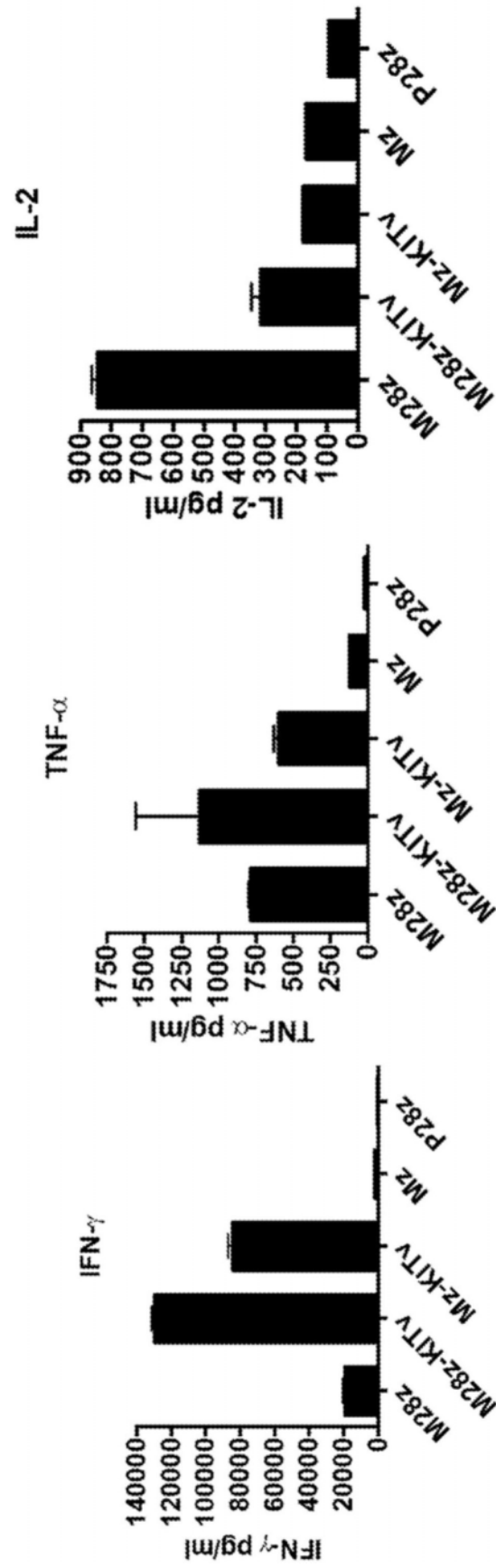
抗原刺激后KITv⁺ CAR-T释放更多IFN- γ 

图11B

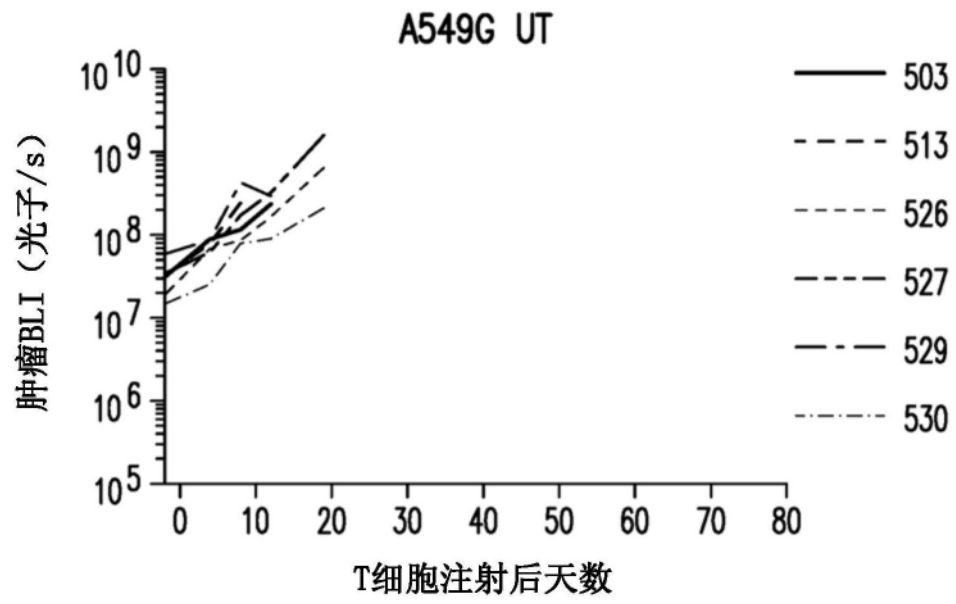


图12A

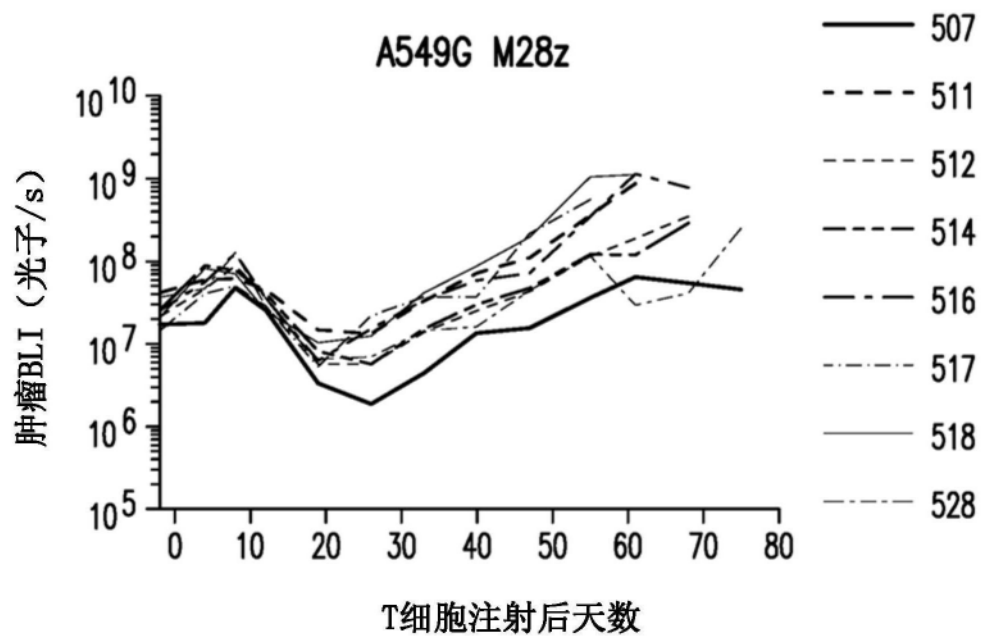


图12B

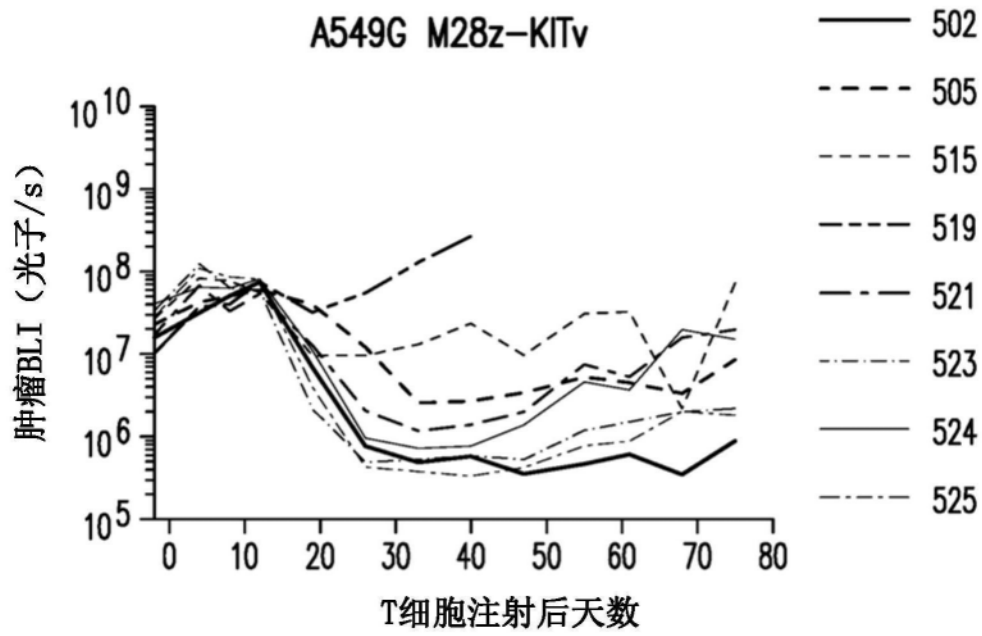


图12C

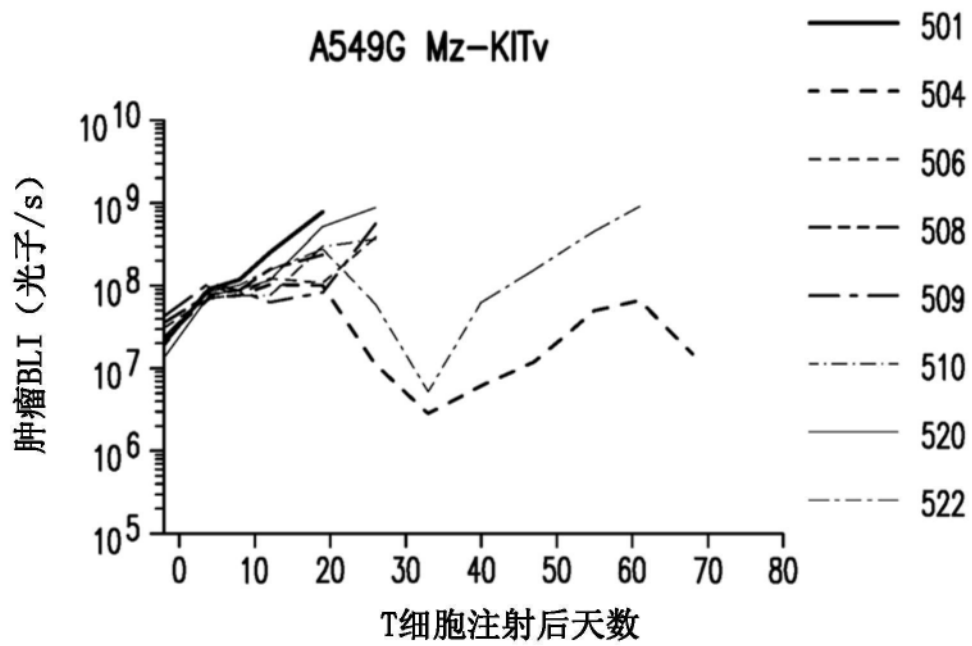


图12D

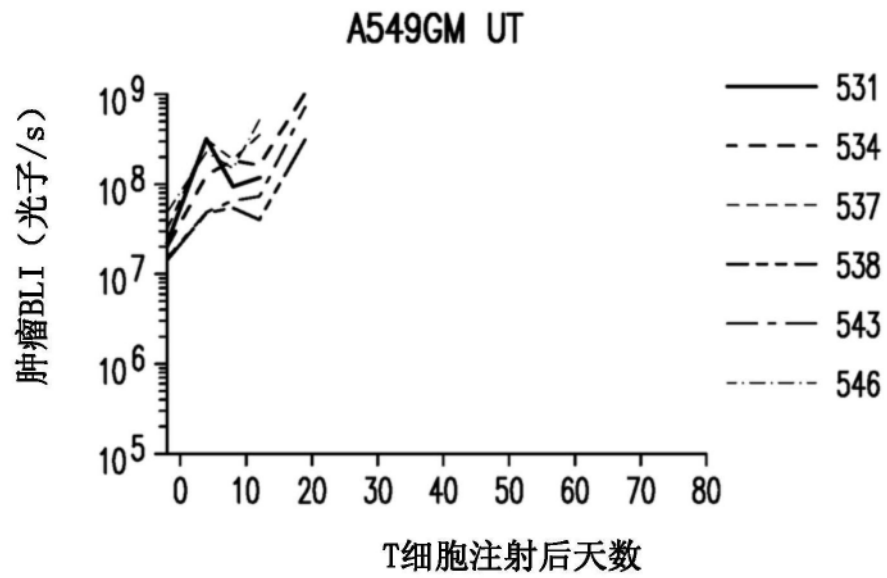


图13A

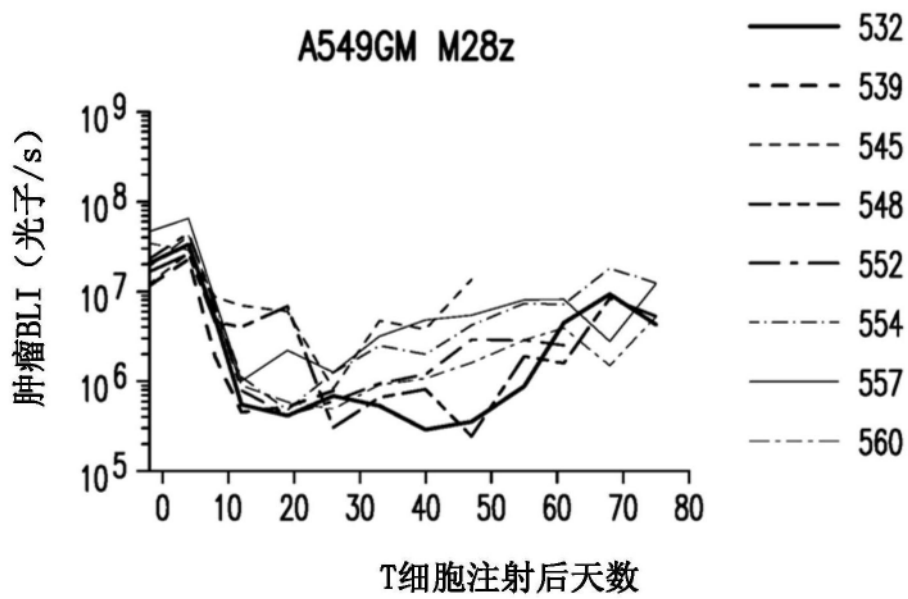


图13B

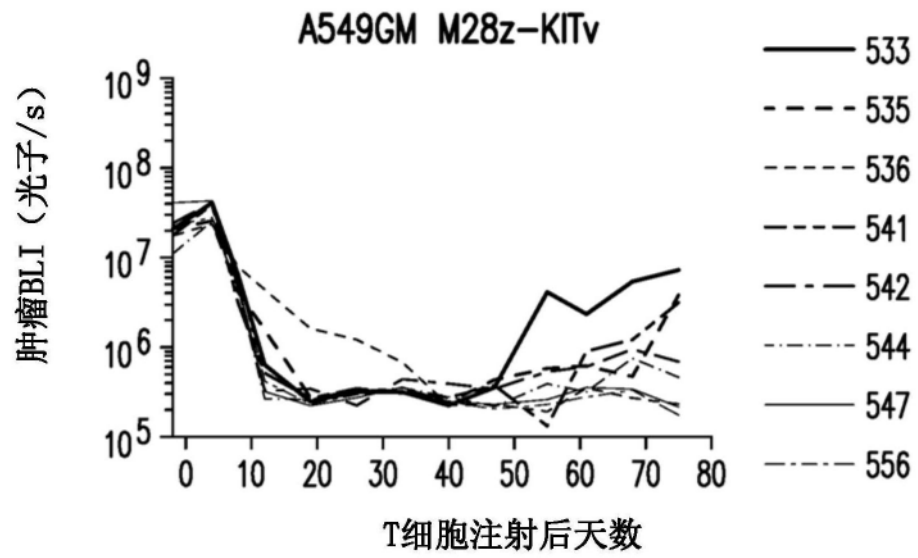


图13C

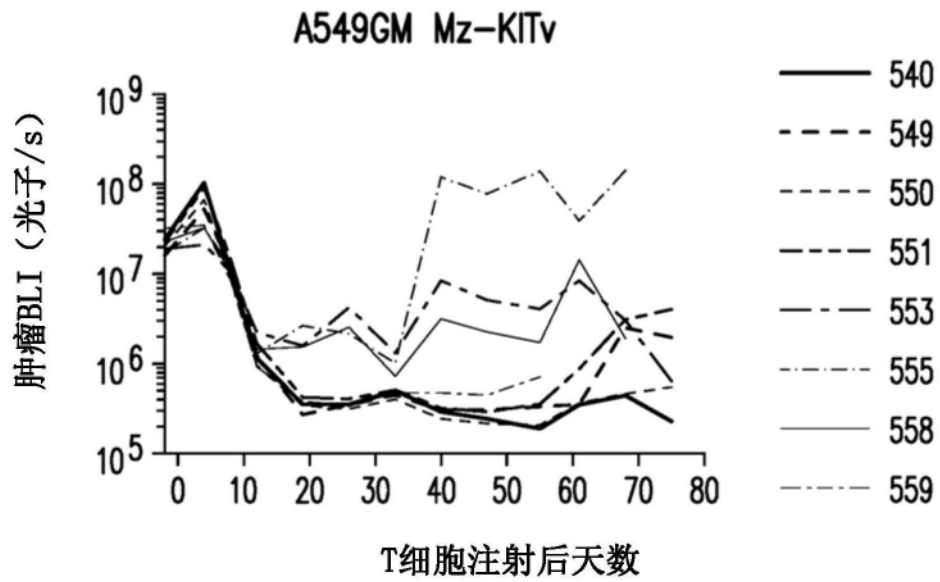


图13D

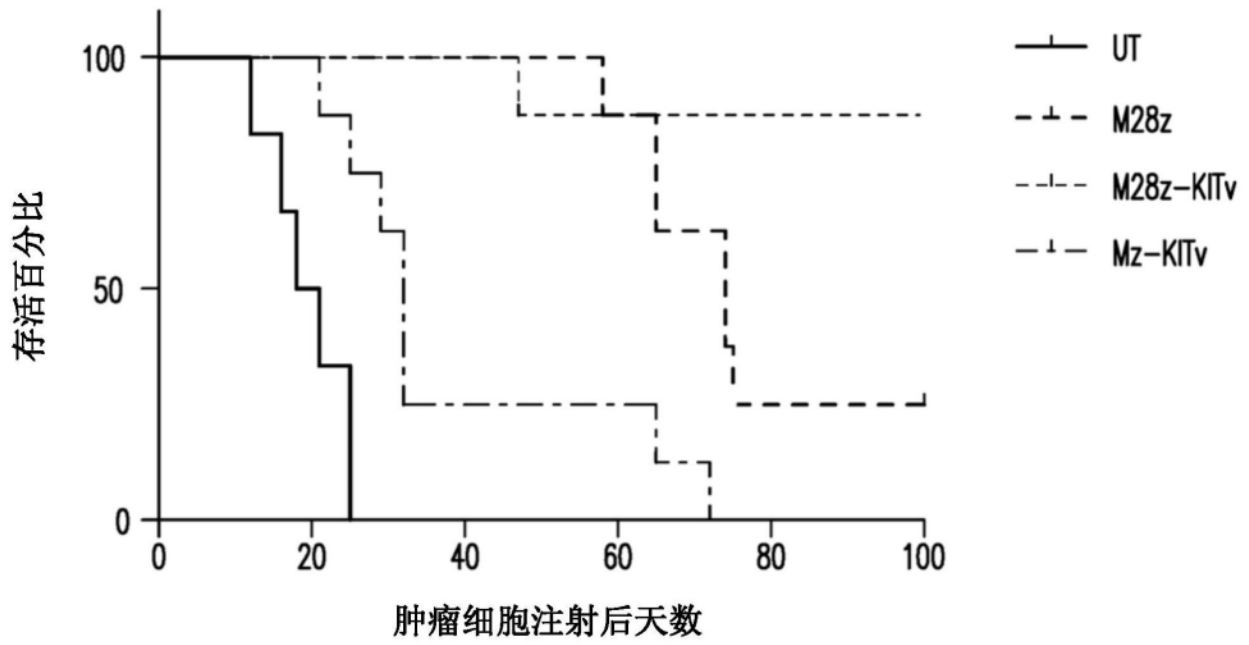


图14A

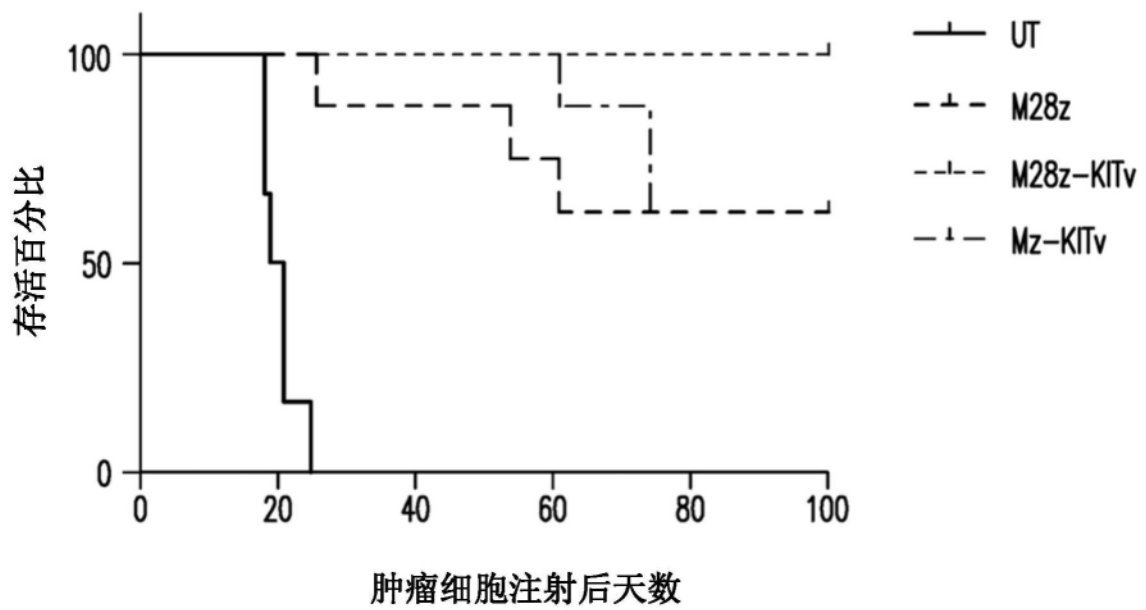
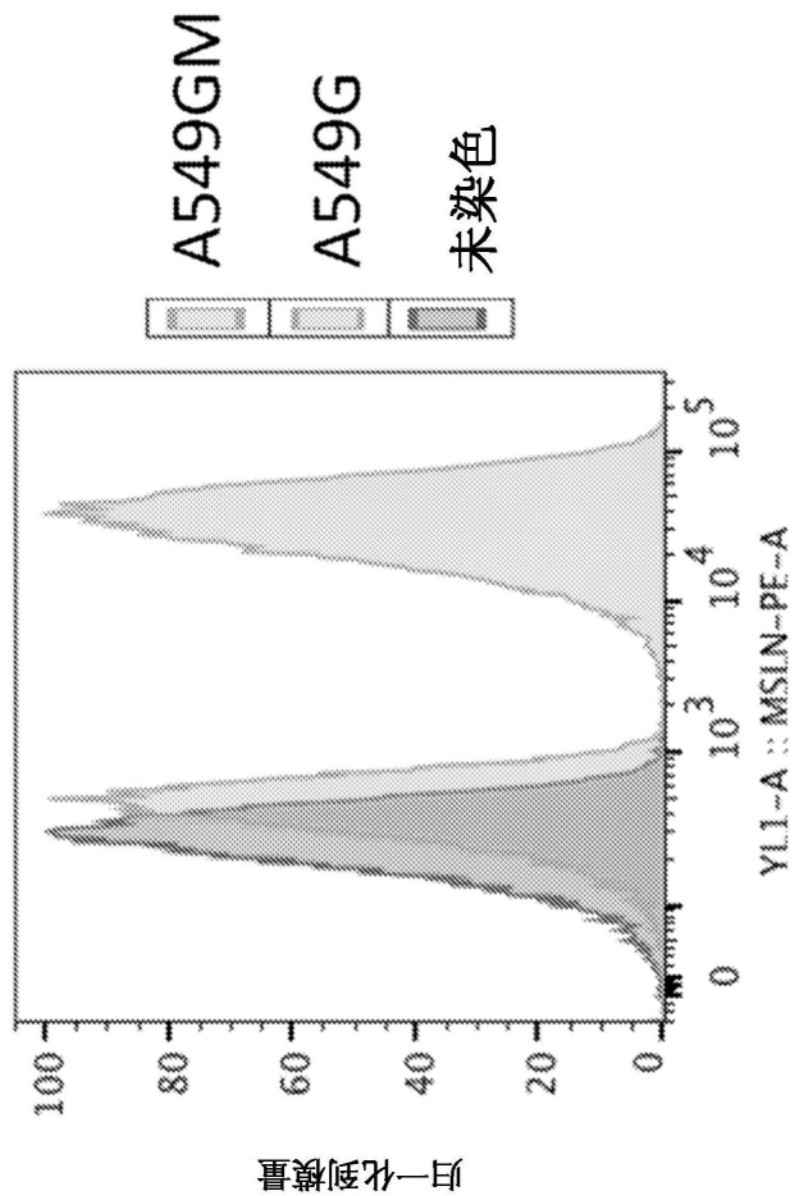


图14B



	MFI
未染色	280
A549G	439
A549GM	33708

图14C

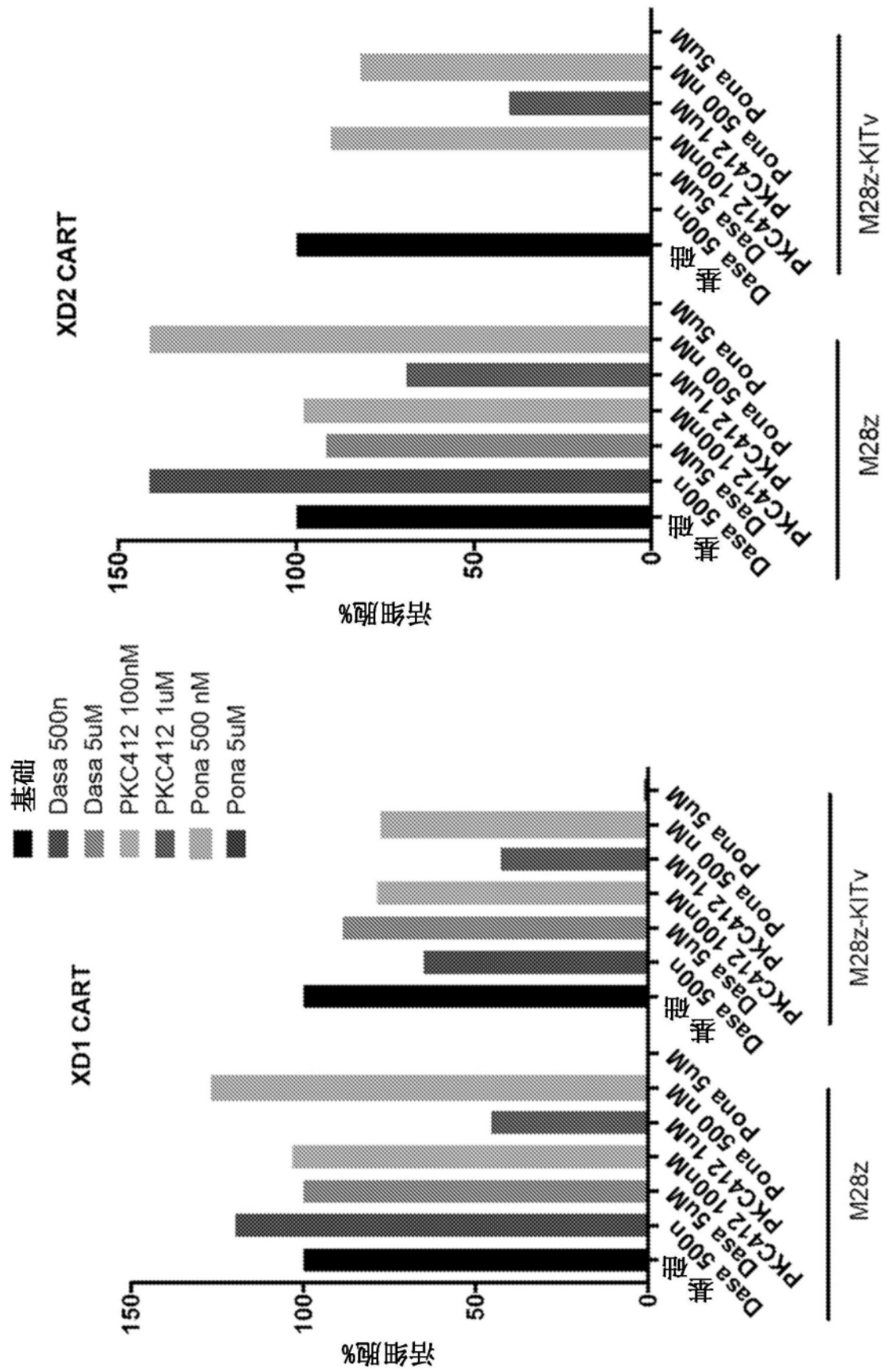


图15

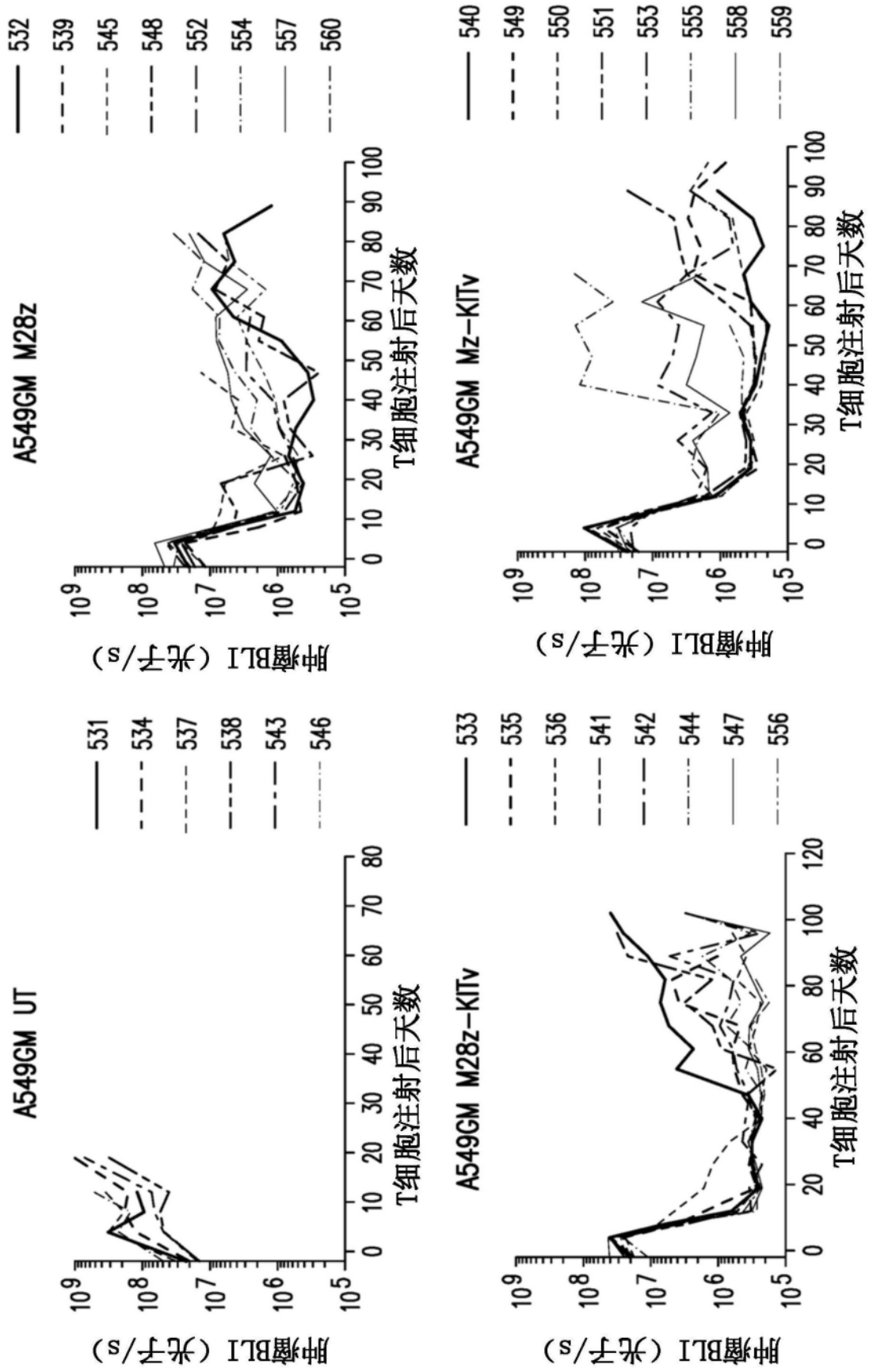


图16A

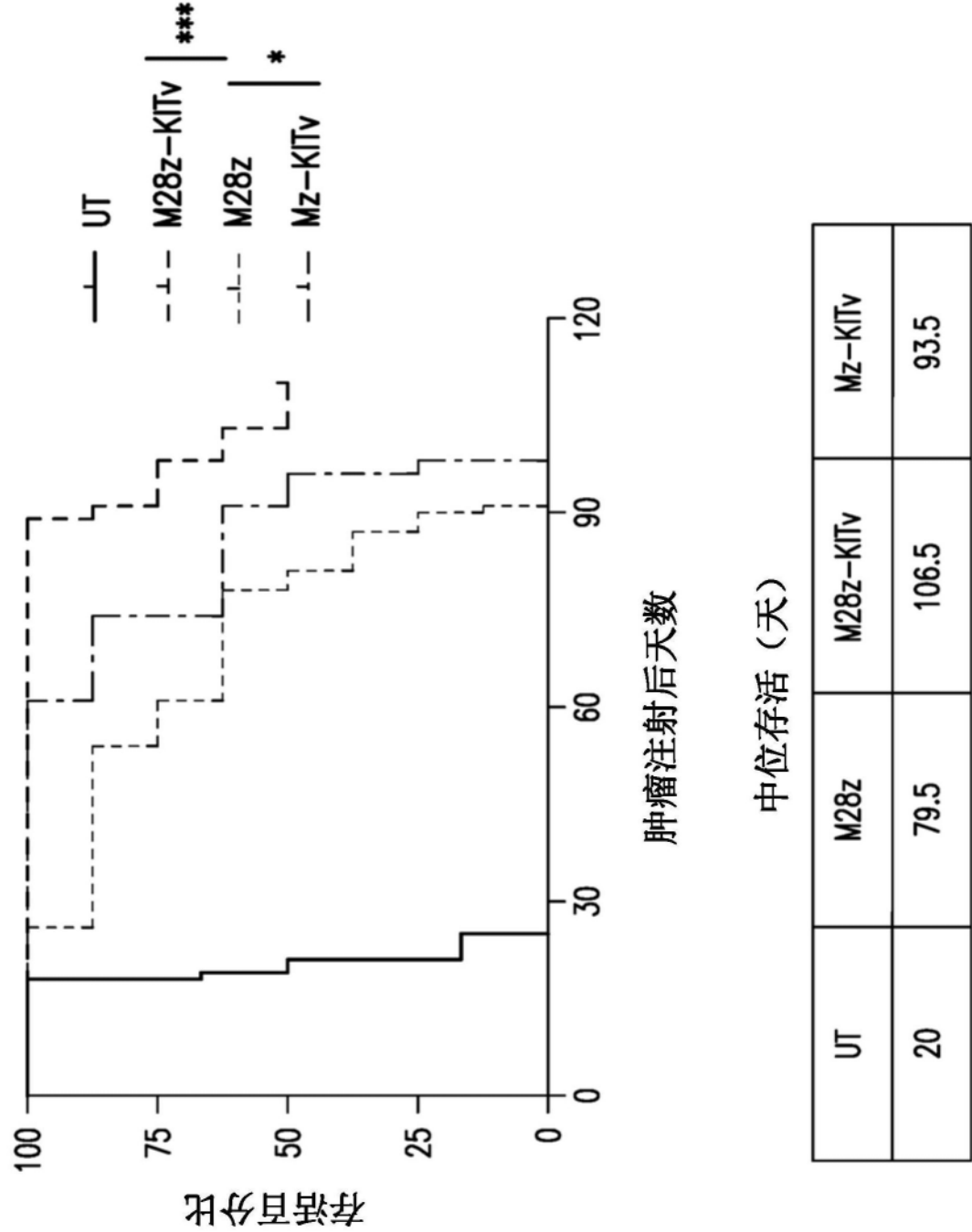


图16B

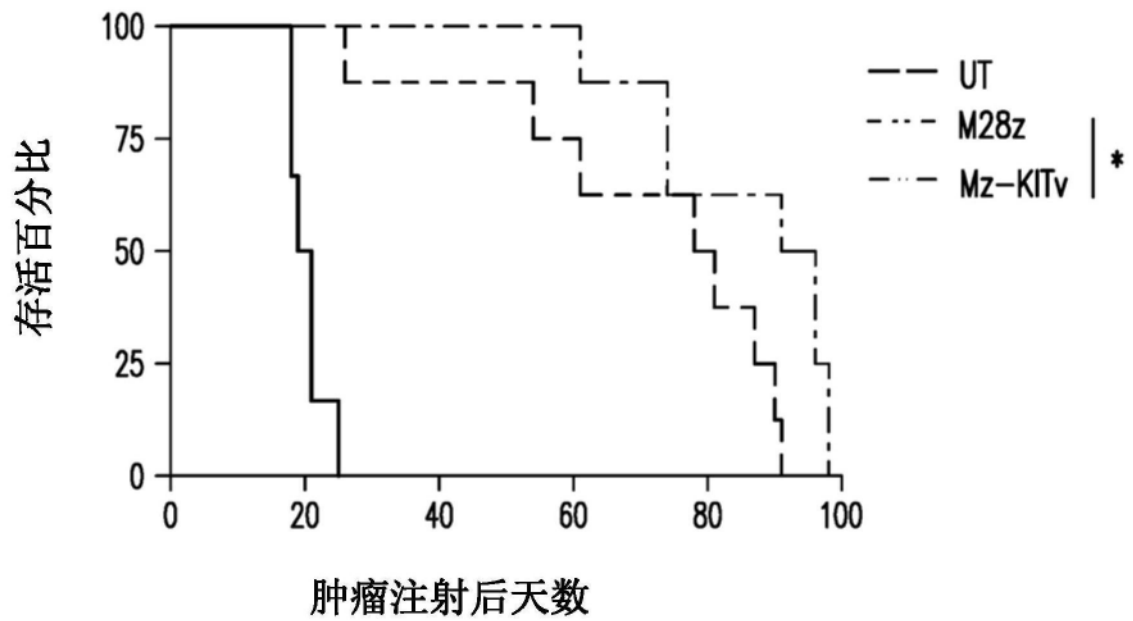
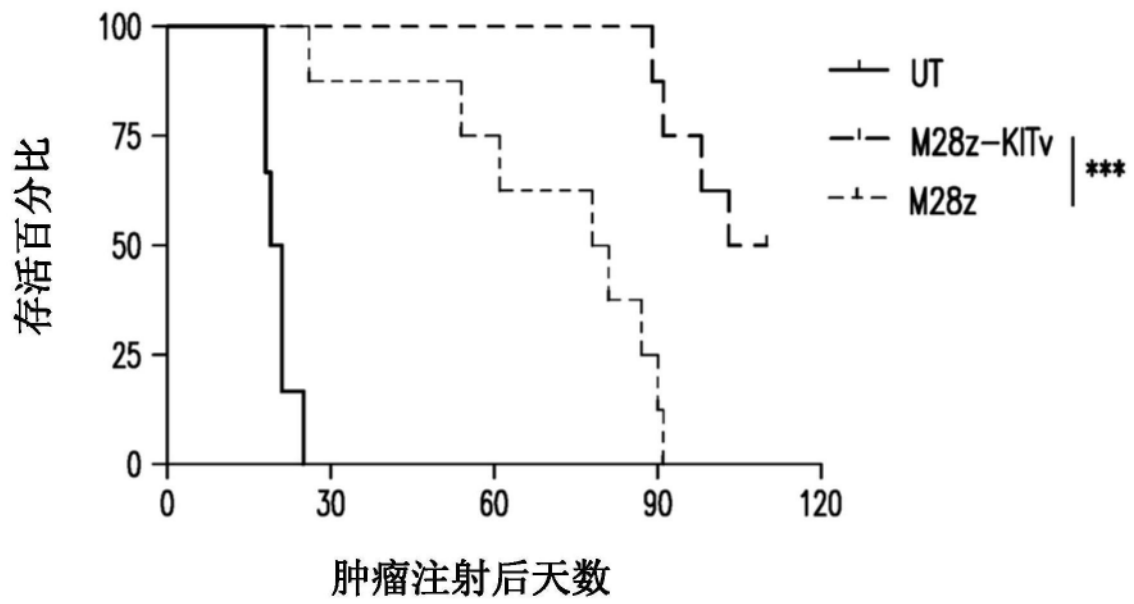


图16C

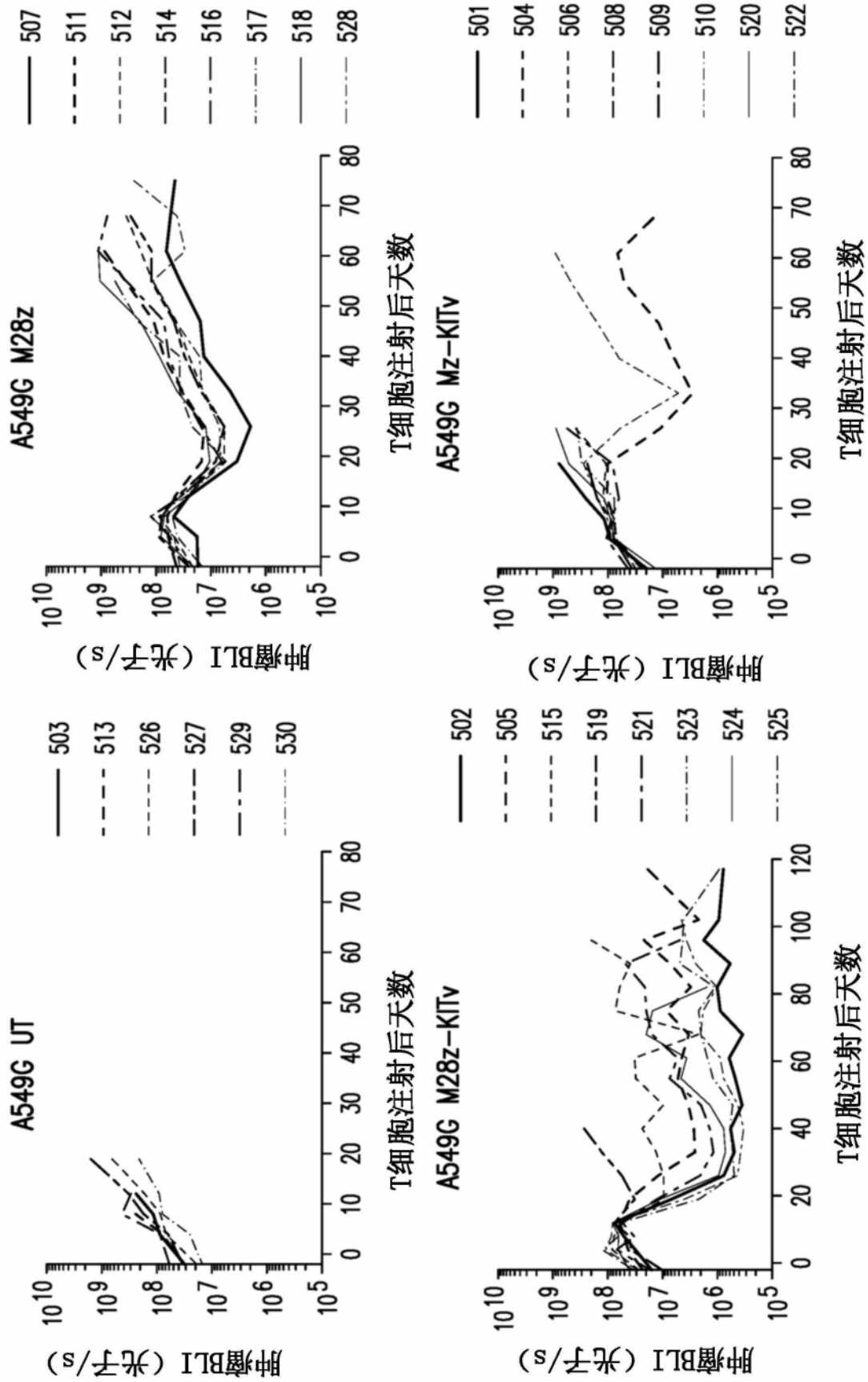
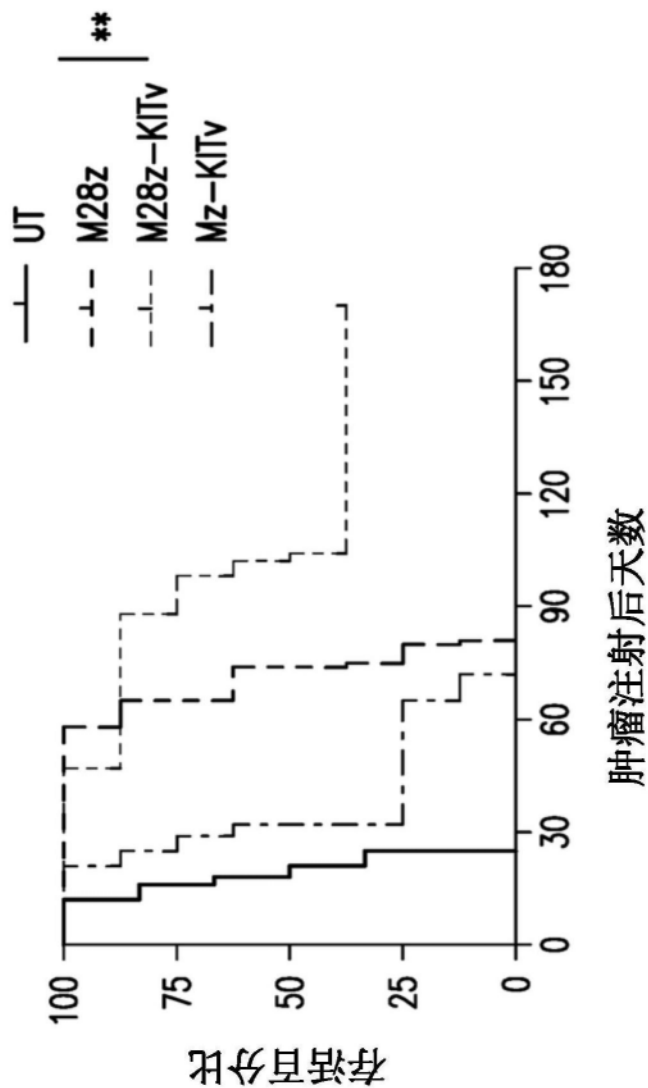


图17A



中位存活 (天)

UT	M28z	M28z-KITv	Mz-KITv
19.5	74	103	32

图17B

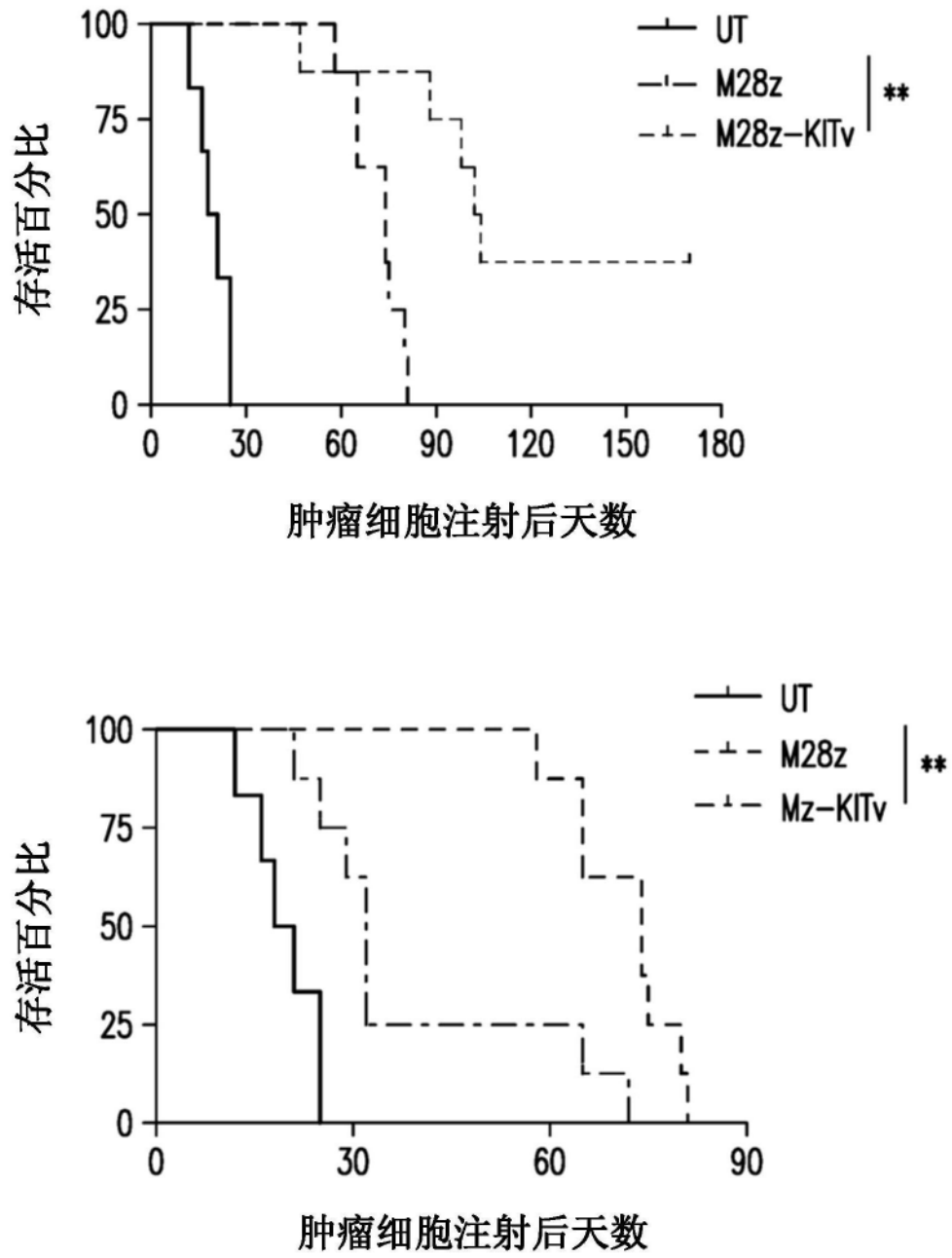


图17C

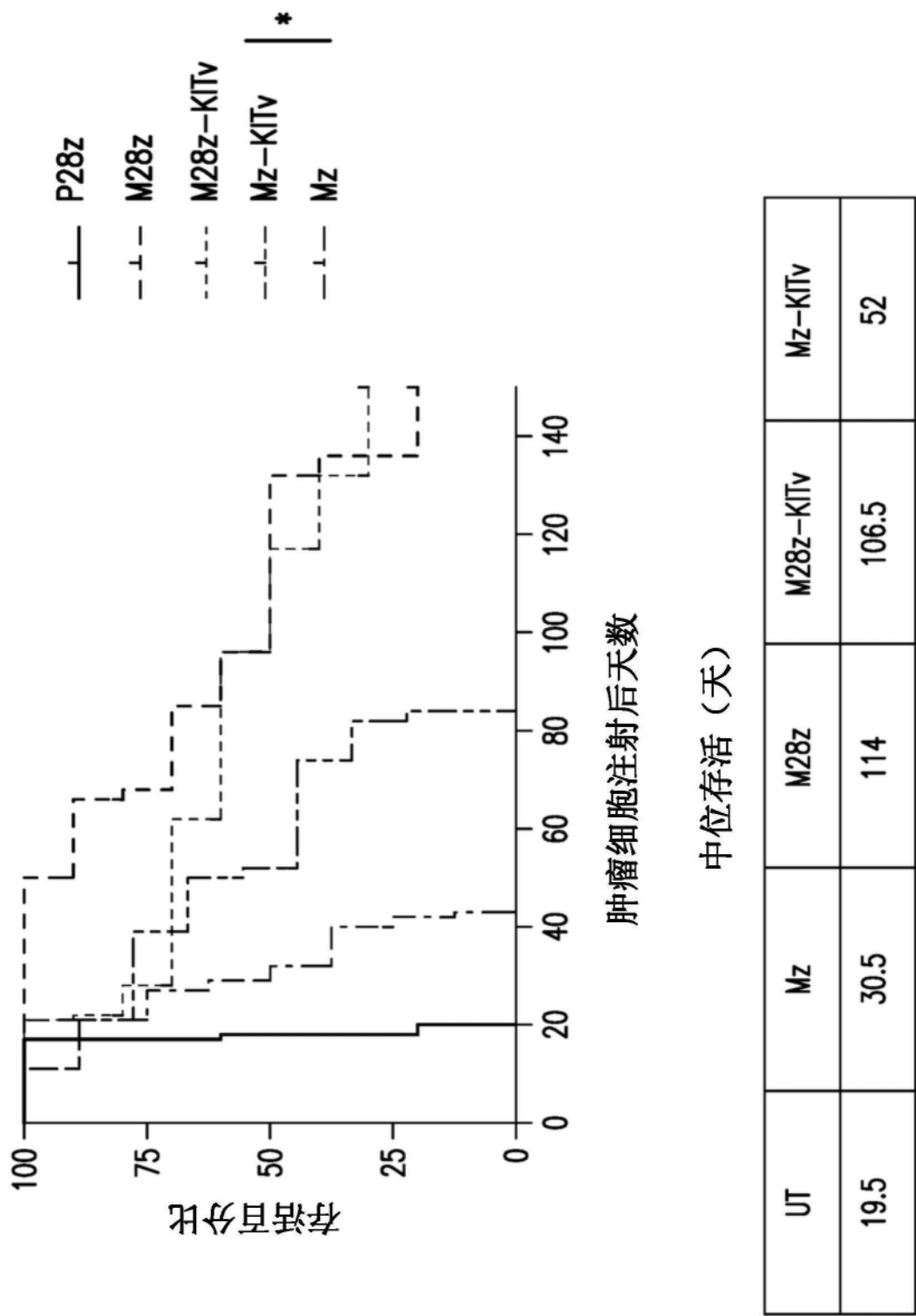


图18A

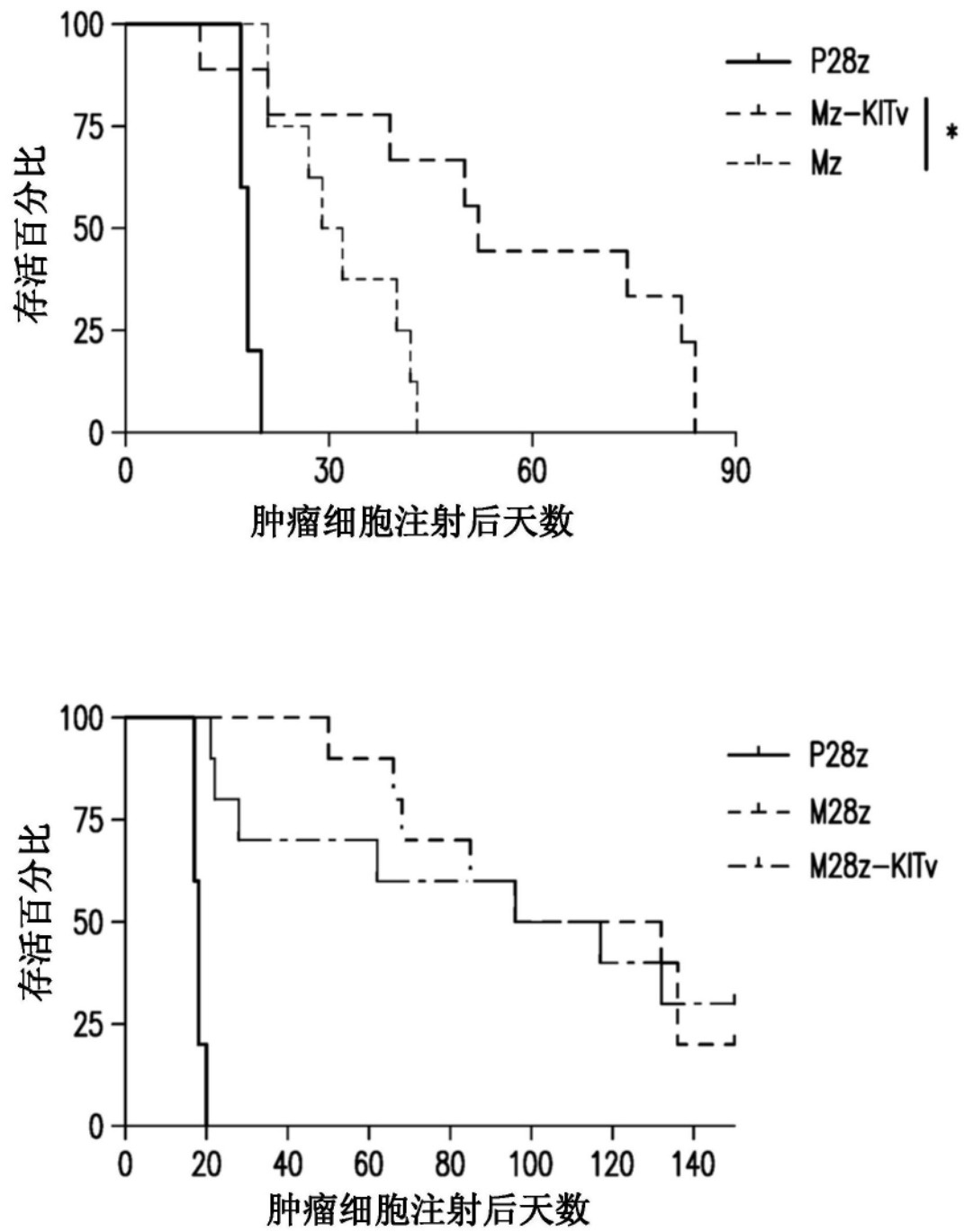


图18B

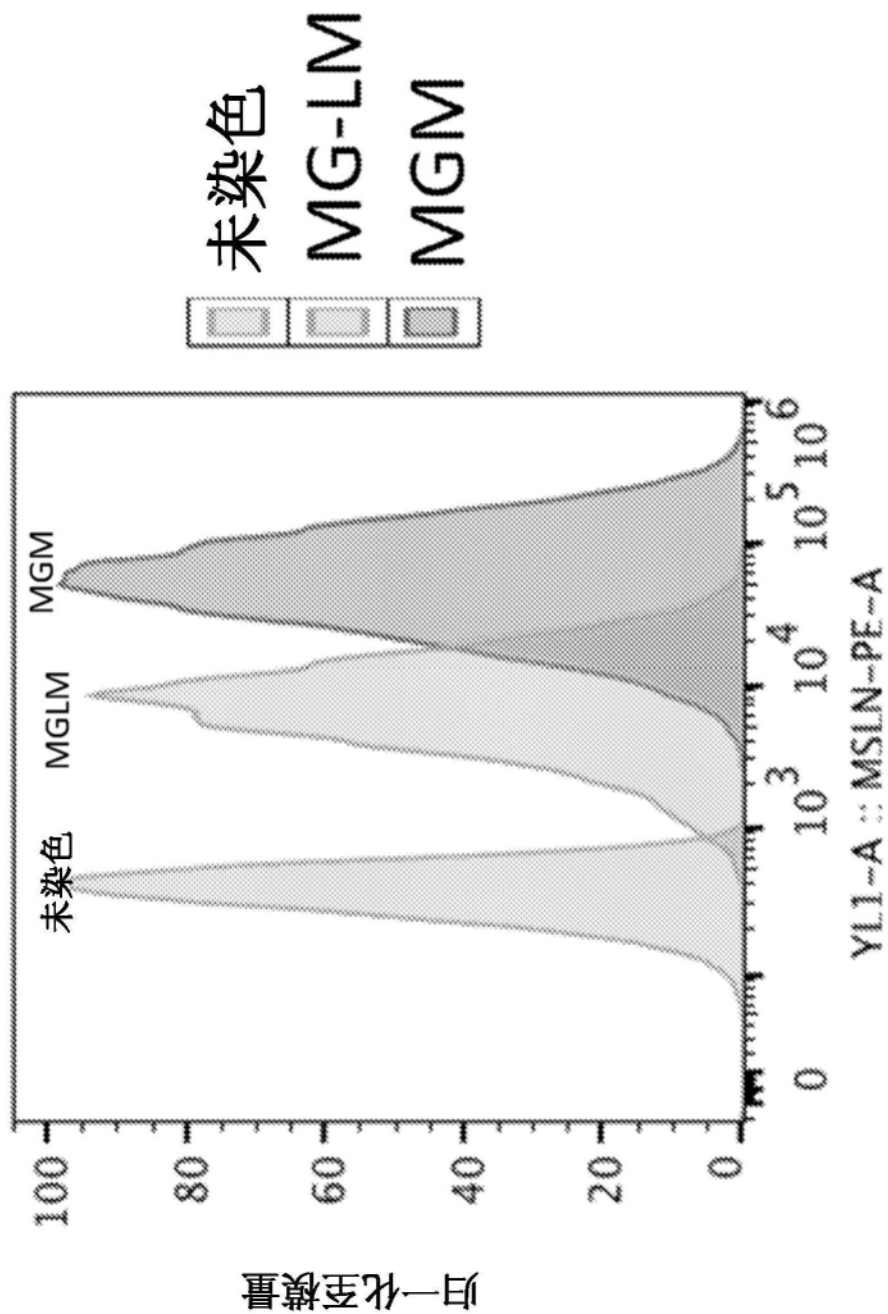


图19A

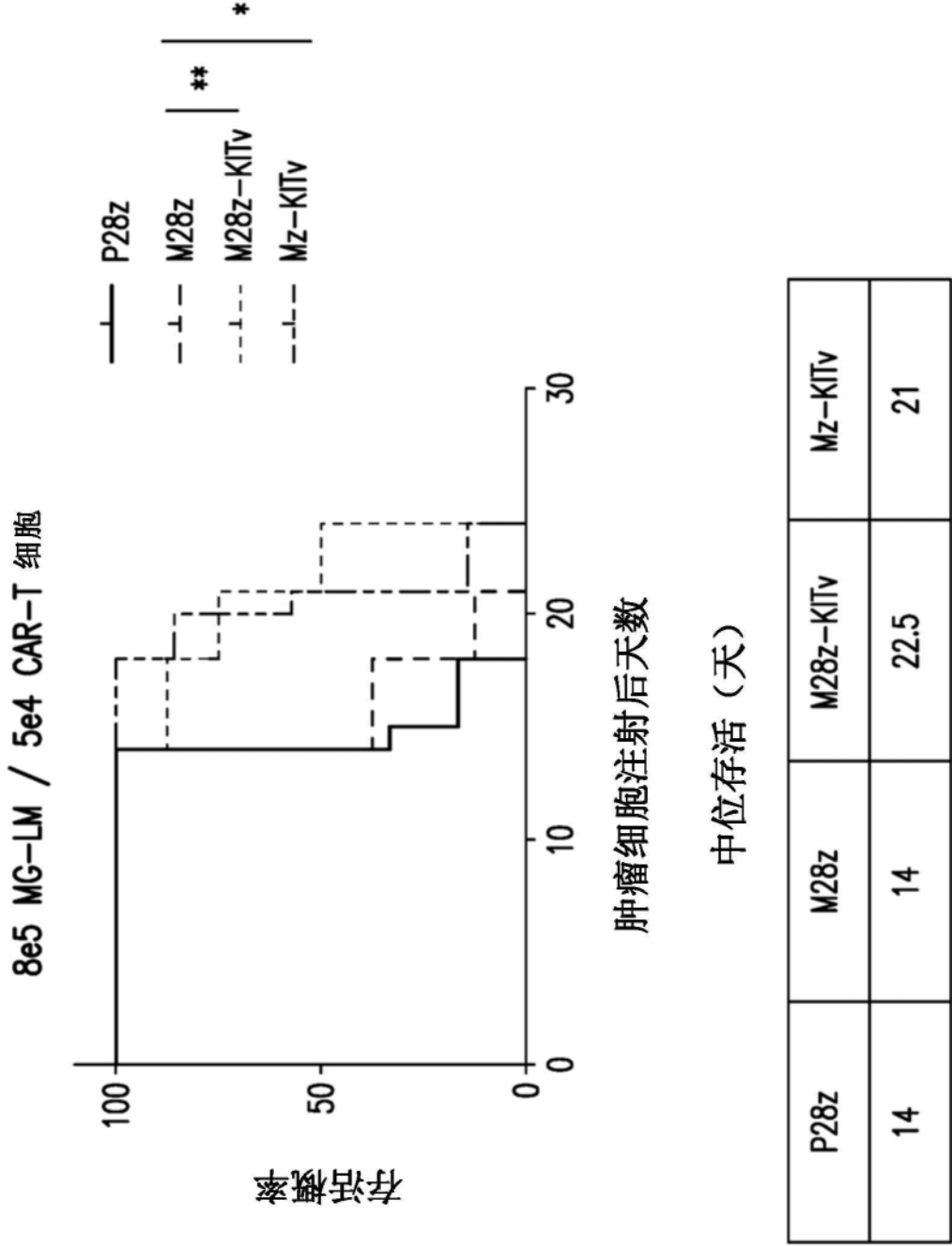


图19B

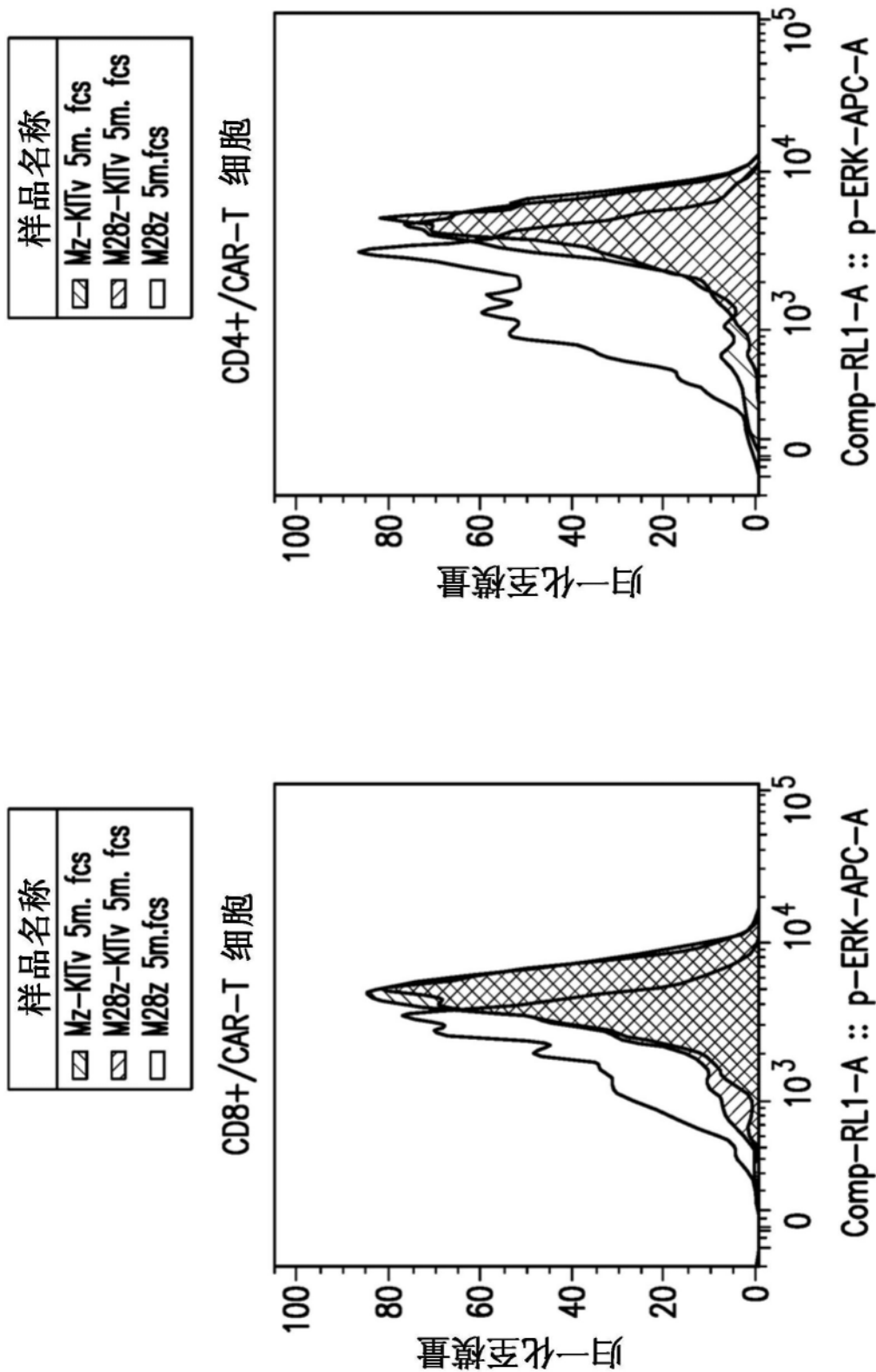


图20

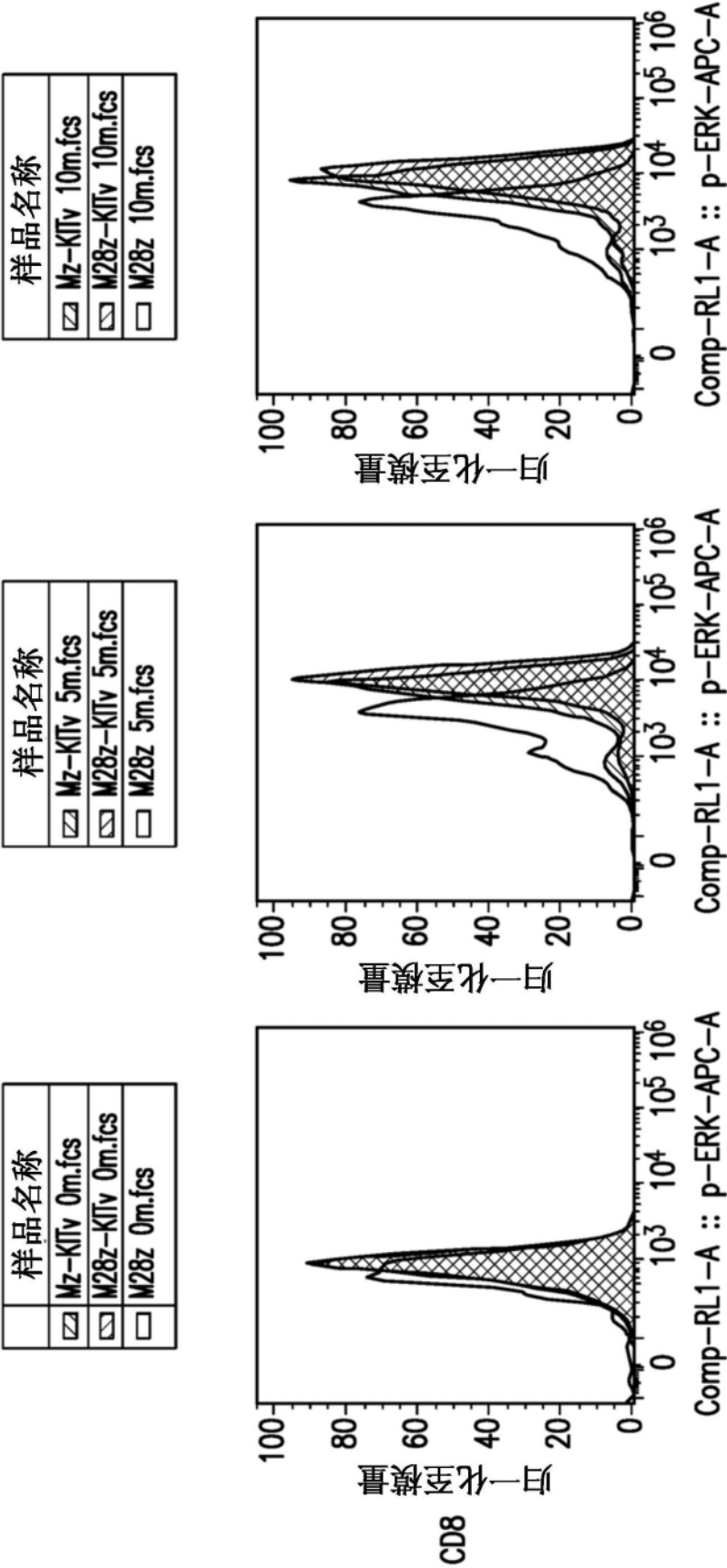


图20续

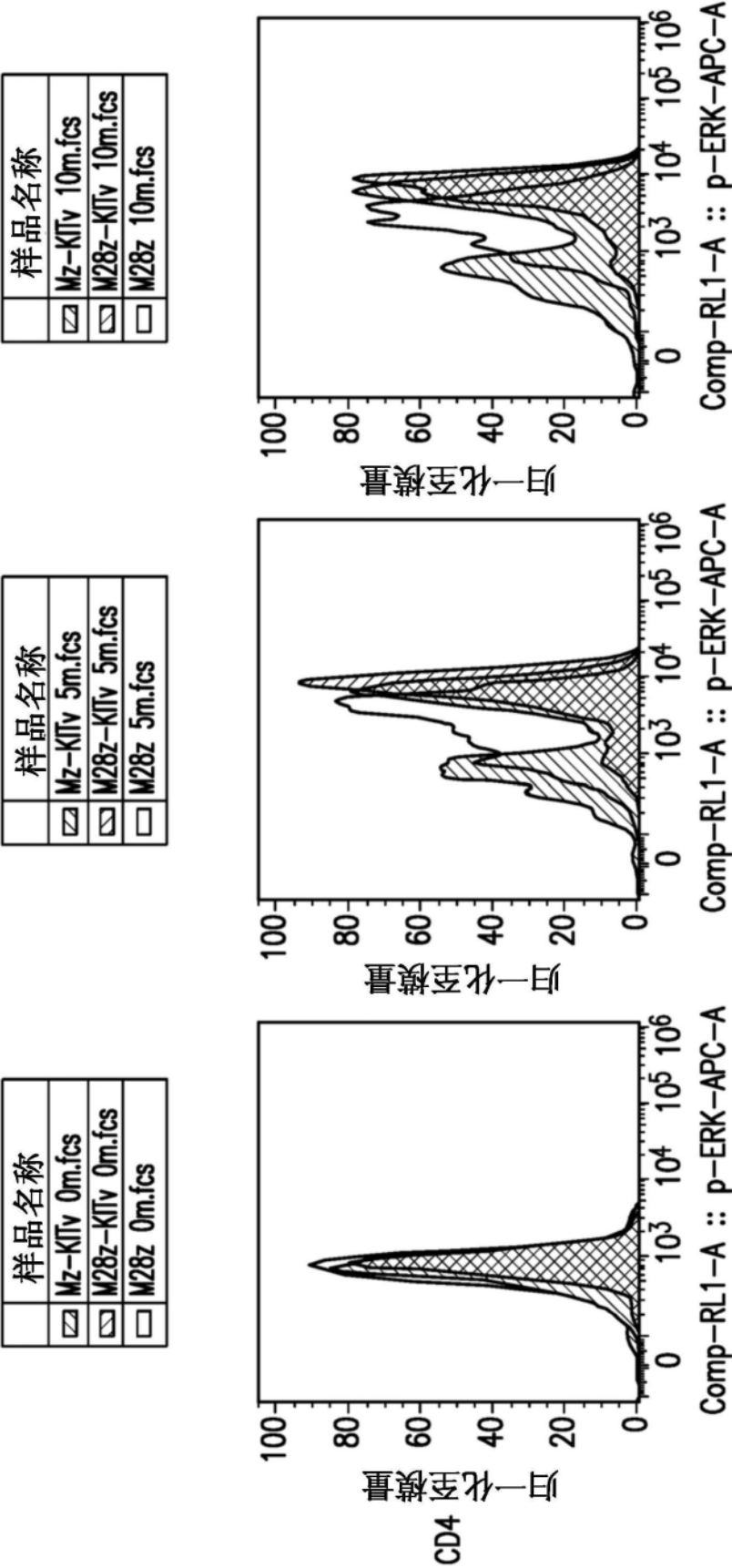


图20续

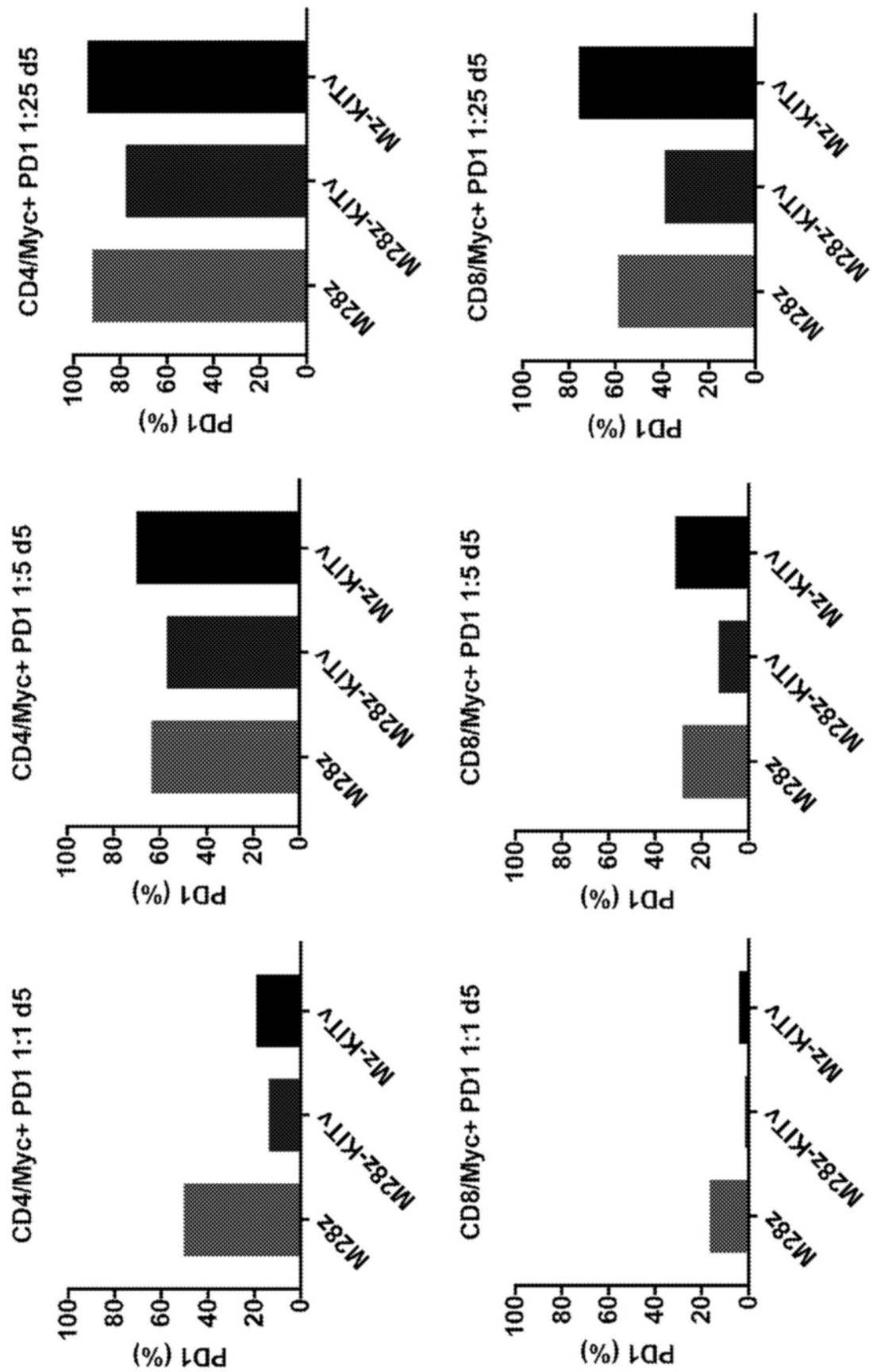


图21A

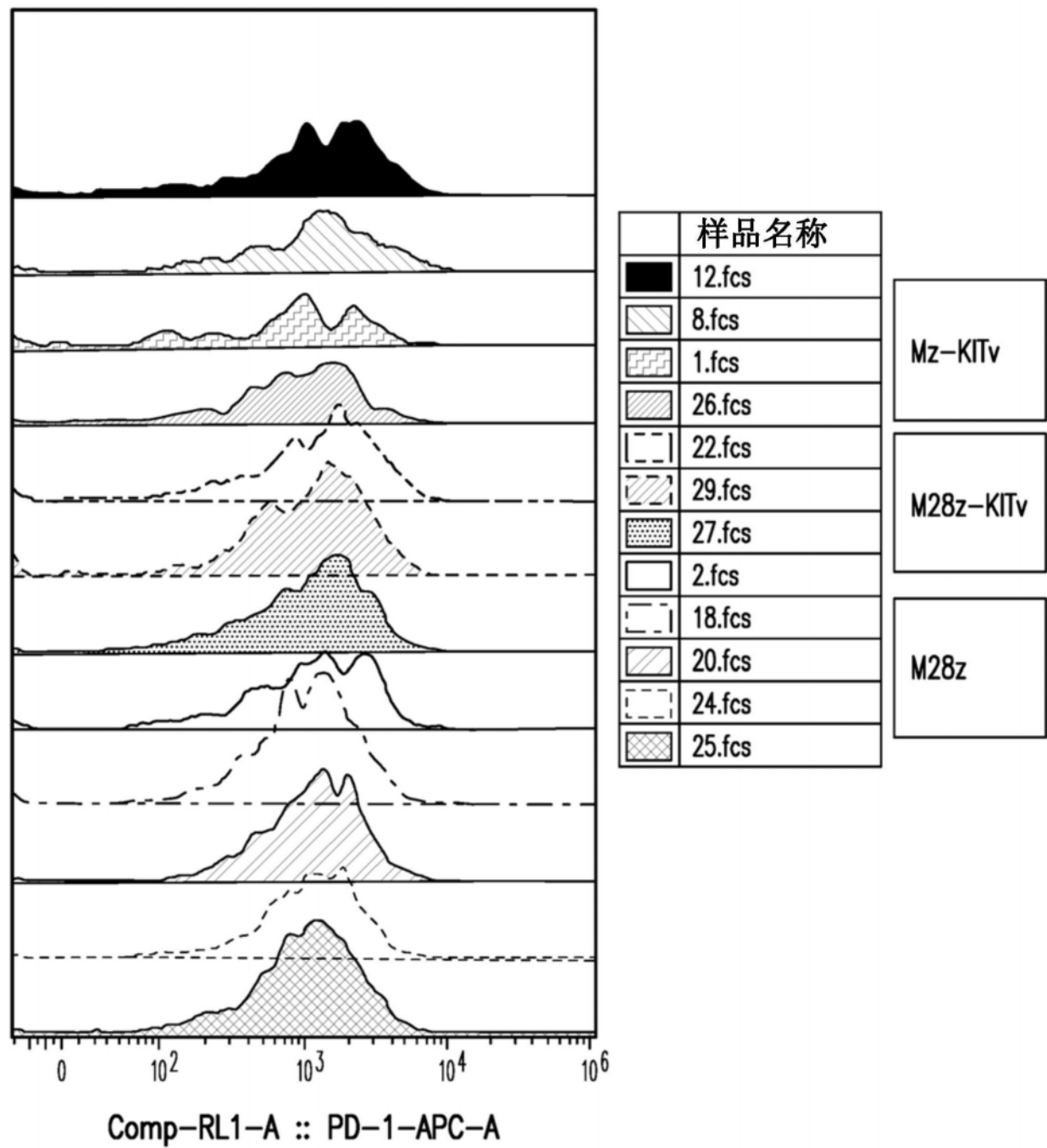


图21B

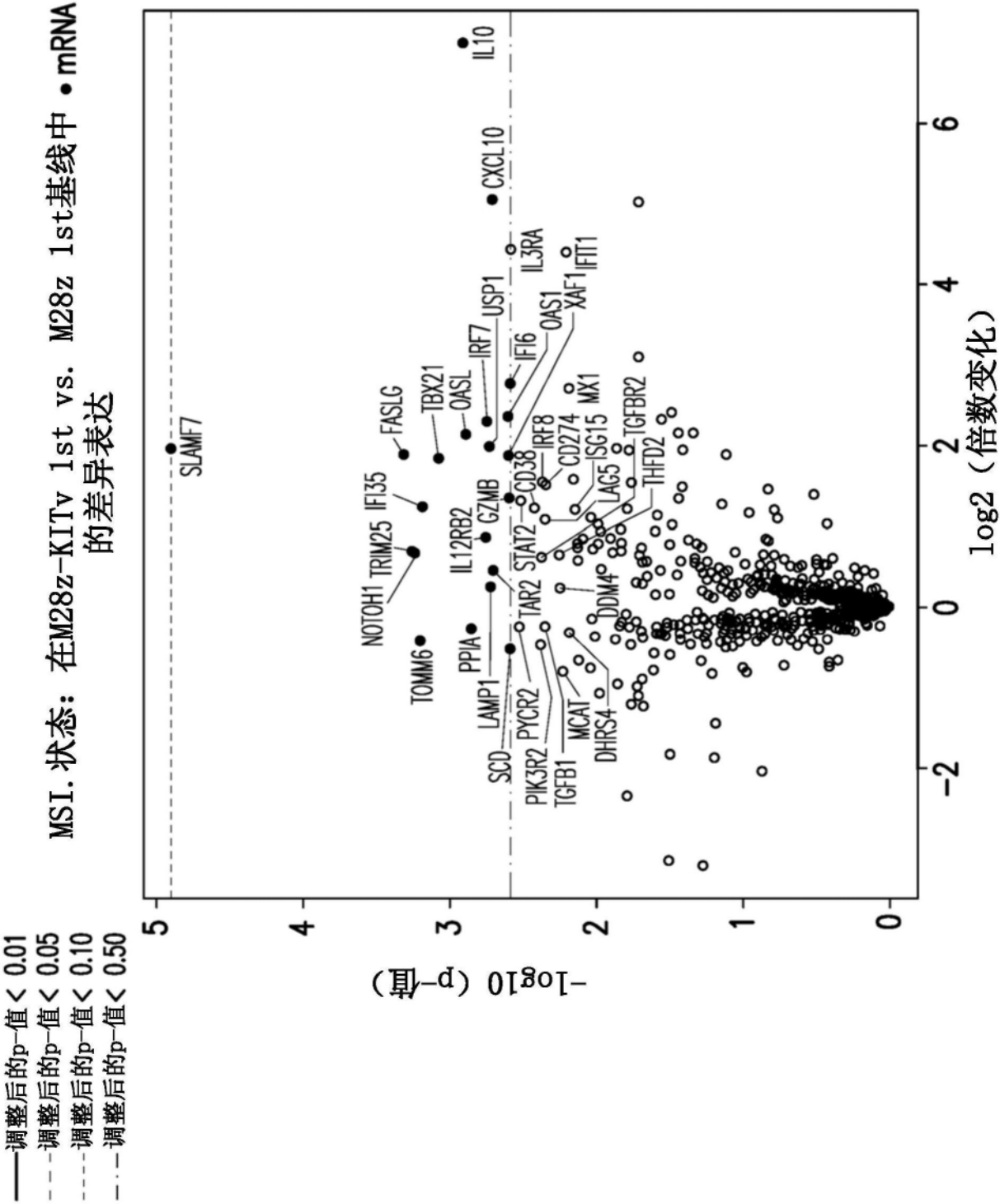


图22A

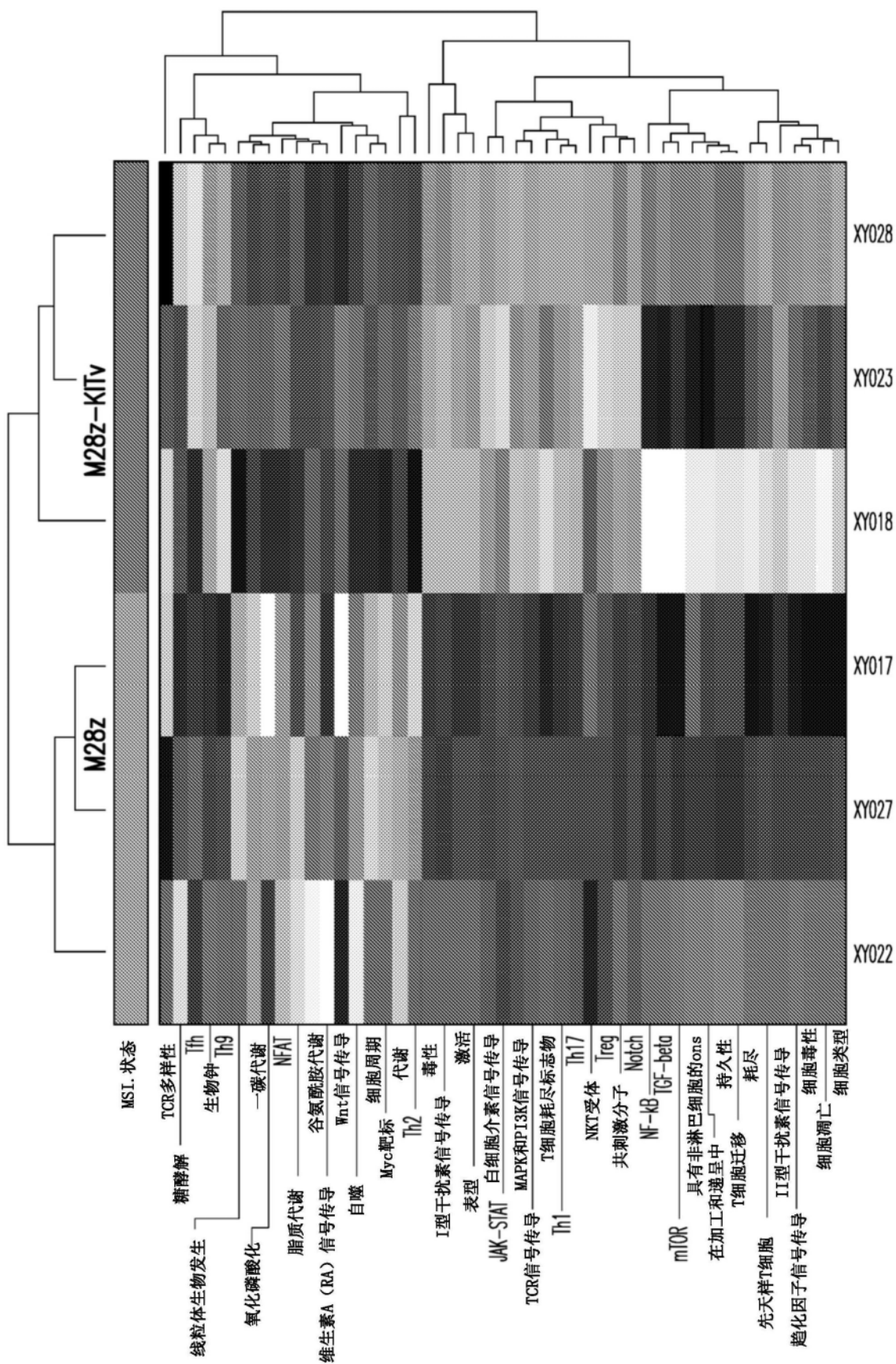


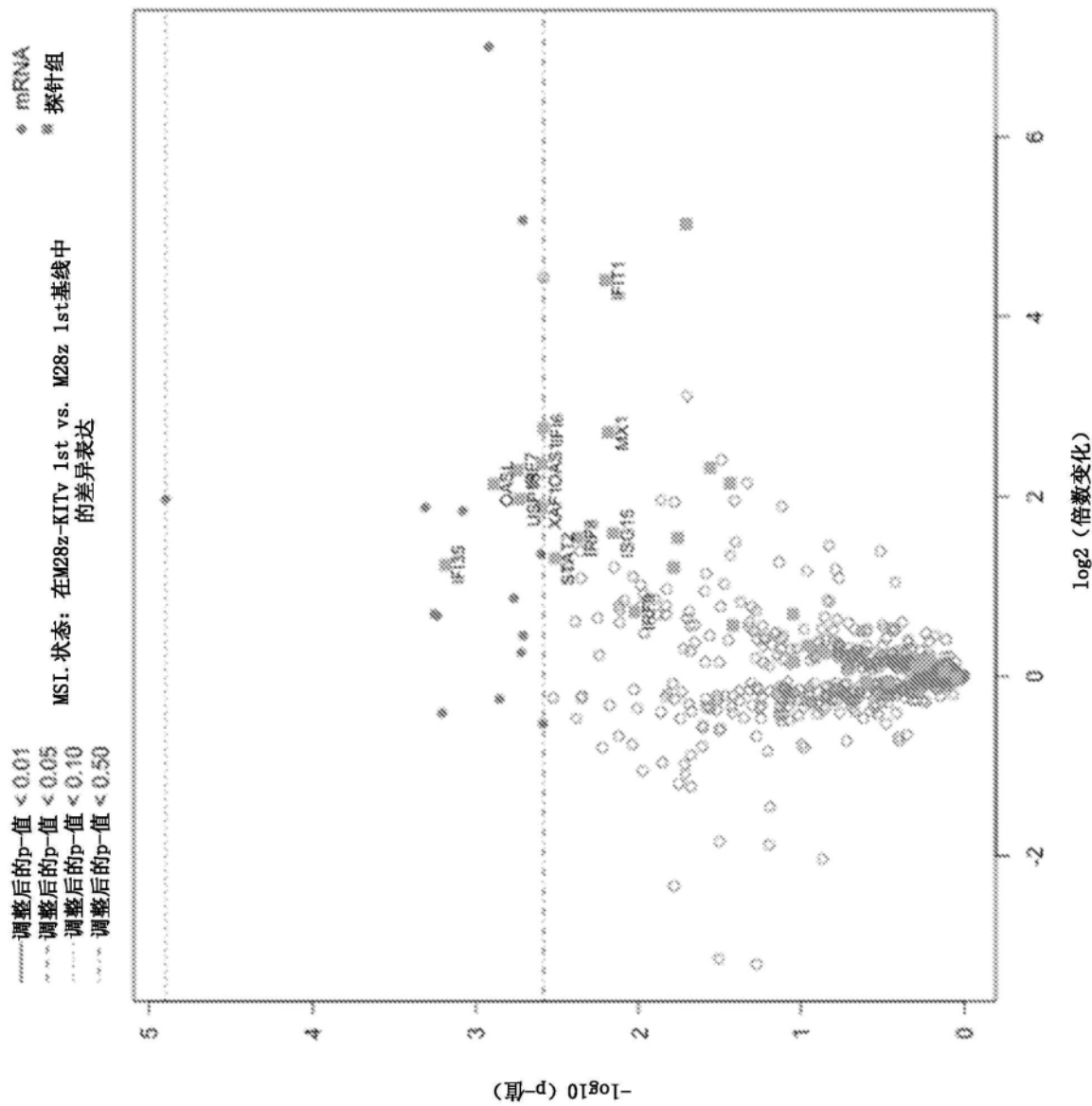
图22B

在KIT CAR T细胞中
上调的基因通路



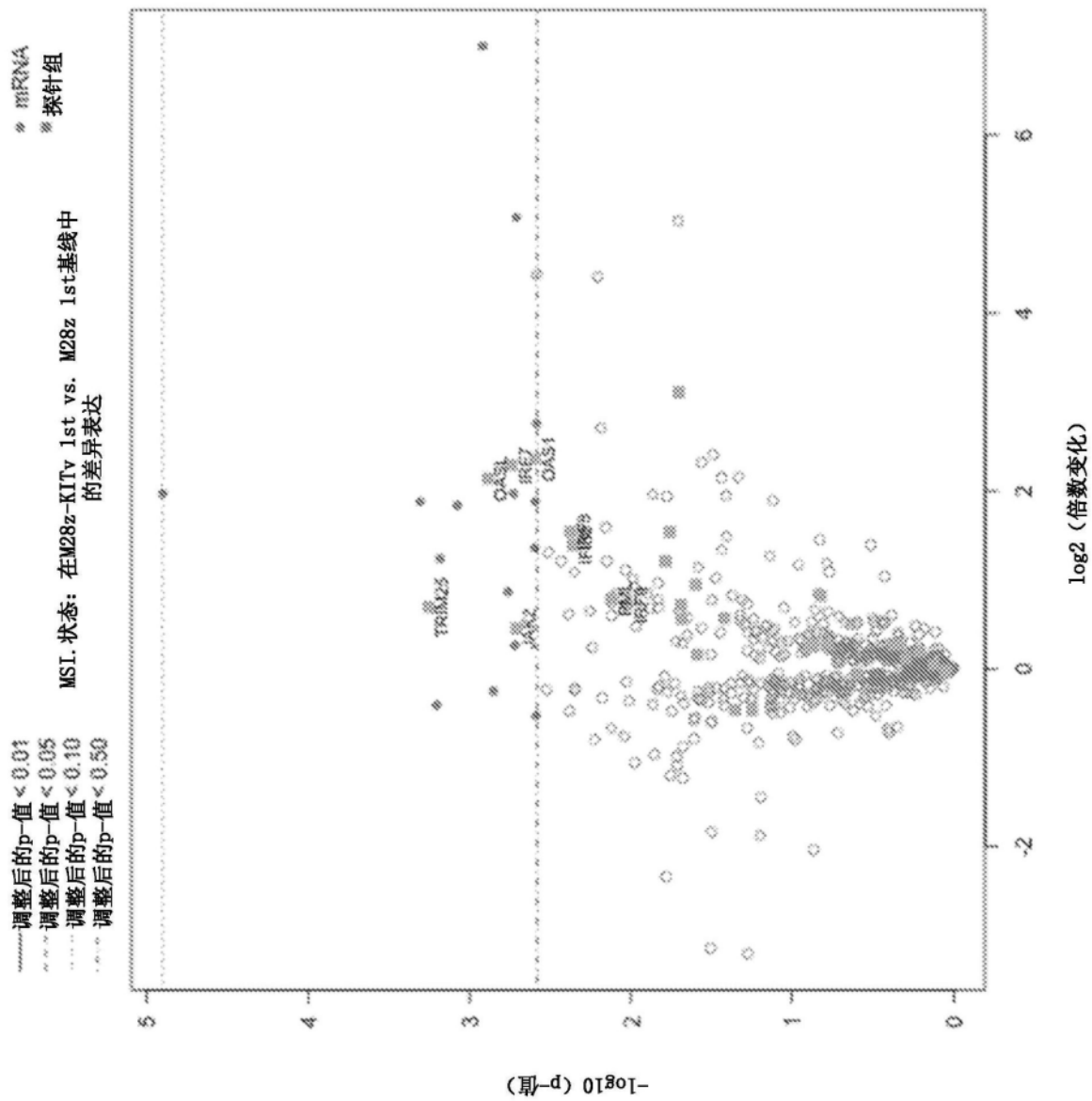
I型干扰素信号传导
激活
表型
白细胞介素信号传导
JAK-STAT
MAPK和PI3K信号传导
TCR信号传导
T细胞耗尽标志物
Th1
Th17
NKT受体
Treg
共刺激分子
Notch
NF- κ B
TGF- β 1
mTOR
具有非淋巴细胞的ons
在加工和递呈中
持久性
T细胞迁移
耗尽
先天样T细胞
II型干扰素信号传导
趋化因子信号传导
细胞毒性
细胞凋亡

图22C



I型干扰素信号传导基因

图23A



II型干扰素信号传导基因

图23B