



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109310744 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201680065509.1

(22)申请日 2016.09.23

(30)优先权数据

62/222,695 2015.09.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/053577 2016.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/053889 EN 2017.03.30

(71)申请人 赛通免疫有限责任公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 余建华 迈克尔·卡里居里

史蒂文·迪瓦恩

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 沈敬亭 李海霞

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

权利要求书3页 说明书47页 附图12页

(54)发明名称

用于免疫治疗的FLT3定向CAR细胞

(57)摘要

将靶向肿瘤坏死治疗相关抗原的CAR细胞描述为癌症治疗的新方法。提出FLT3 CAR细胞在患者中安全有效,并且可用于治疗人类肿瘤和癌症。



LTR: 长末端重复

SP: 信号肽

VH: 可变 H 链

L: 接头

VL: 可变 L 链

iCasp: 诱导型 - 半胱天冬酶 9

P: 启动子

1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: (a) FLT3 抗体的抗原结合结构域; (b) 铰链结构域; (c) 跨膜结构域; (d) 和细胞内结构域。

2. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: (a) FLT3 抗体的抗原结合结构域; (b) 铰链结构域; (c) CD28 跨膜结构域; (d) 选自 CD28 共刺激信号传导区域、4-1BB 共刺激信号传导区域、ICOS 共刺激信号传导区域和 OX40 共刺激区域的一个或多个共刺激区域; 和 (e) CD3 $\zeta$  信号传导结构域。

3. 如权利要求1或2所述的 CAR, 其中所述 FLT3 抗体的抗原结合结构域包含 FLT3 重链可变区和 FLT3 轻链可变区。

4. 如权利要求3所述的 CAR, 其进一步包含位于 FLT3 重链可变区和 FLT3 轻链可变区之间的接头多肽。

5. 如权利要求4所述的 CAR, 其中所述 FLT3 重链可变区包含由 SEQ ID NO: 21 至 23、SEQ ID NO: 29 至 31 或其等效物中的任一种编码的氨基酸序列。

6. 如权利要求3至5中任一项所述的 CAR, 其中所述 FLT3 轻链可变区 CDR 区包含由 SEQ ID NO: 24 至 26、SEQ ID NO: 32 至 34 或其等效物中的任一种编码的氨基酸序列。

7. 如权利要求4至6中任一项所述的 CAR, 其中所述接头多肽包含含有序列 (GGGGS) $n$  的多肽, 其中  $n$  是 1 至 6 的整数。

8. 如前述权利要求中任一项所述的 CAR, 其还包括附接至所述 CAR 的可检测标记或纯化标记。

9. 如权利要求5至8中任一项所述的 CAR, 其中等效物包括与由多核苷酸编码的 CAR 或多肽具有至少 80% 氨基酸同一性的多肽, 所述多核苷酸在高严格性条件下与编码所述 CAR 的多核苷酸的补体杂交, 其中高严格性条件包括约 55°C 至约 68°C 的培育温度; 约 1 $\times$  SSC 至约 0.1 $\times$  SSC 的缓冲液浓度; 约 55% 至约 75% 的甲酰胺浓度; 以及约 1 $\times$  SSC、0.1 $\times$  SSC 的洗涤溶液或去离子水。

10. 一种编码如权利要求1至9中任一项所述的 CAR 的分离的核酸序列或其补体或其各自的等效物, 其中等效物具有与多核苷酸或其补体、或在高严格性条件下与编码所述 CAR 的分离核酸的多核苷酸或补体杂交的多核苷酸至少 80% 序列同一性, 其中高严格性条件包括约 55°C 至约 68°C 的培育温度; 约 1 $\times$  SSC 至约 0.1 $\times$  SSC 的缓冲液浓度; 约 55% 至约 75% 的甲酰胺浓度; 以及约 1 $\times$  SSC、0.1 $\times$  SSC 的洗涤溶液或去离子水。

11. 如权利要求10所述的分离的核酸, 其还包含位于编码所述 FLT3 抗体的抗原结合结构域的多核苷酸上游的编码启动子的多核苷酸序列。

12. 如权利要求11所述的分离的核酸, 其中所述编码启动子的多核苷酸序列选自 CMV 启动子、MND 启动子或 EF1 $\alpha$  启动子。

13. 如权利要求10至12中任一项所述的分离的核酸, 其还包含位于编码所述 FLT3 抗体的抗原结合结构域的多核苷酸上游或下游的编码 iCasp 的多核苷酸序列。

14. 如权利要求13所述的分离的核酸, 其中所述编码 iCasp 的多核苷酸序列是 SEQ ID NO: 40。

15. 如权利要求10至14中任一项所述的分离的核酸, 其还包含位于编码所述 FLT3 抗体的抗原结合结构域的多核苷酸上游的编码 2A 肽 (T2A) 的多核苷酸序列。

16. 如权利要求15所述的分离的核酸, 其中所述编码 2A 肽的多核苷酸序列是 SEQ ID

NO:41。

17. 如权利要求10至16中任一项所述的分离的核酸,其还包含位于编码所述FLT3抗体的抗原结合结构域的多核苷酸上游的编码信号肽的多核苷酸序列。

18. 如权利要求17所述的分离的核酸,其中所述编码信号肽的多核苷酸序列选自SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44。

19. 一种载体或mRNA,其包含权利要求10至18中任一项所述的分离的核酸序列。

20. 如权利要求19所述的载体或mRNA,其中所述载体或mRNA是质粒。

21. 如权利要求19所述的载体或mRNA,其中所述载体或mRNA是选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体的组的病毒载体。

22. 一种分离的细胞,其包含权利要求1至9中任一项所述的CAR;和/或权利要求10至18中任一项所述的分离的核酸;和/或权利要求19至21中任一项所述的载体或mRNA。

23. 如权利要求22所述的分离的细胞,其还包含编码与所述分离的核酸结合的可检测标记的多核苷酸。

24. 如权利要求22至23中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞是原核细胞或真核细胞。

25. 如权利要求22至24中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞是真核细胞。

26. 如权利要求25所述的分离的,其中所述真核细胞选自动物细胞、哺乳动物细胞、牛细胞、猫细胞、犬细胞、鼠细胞、马细胞或人细胞。

27. 如权利要求25所述的分离的细胞,其中所述真核细胞是T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞或骨髓细胞。

28. 一种组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述的CAR;和/或权利要求10至18中任一项所述的分离的核酸;和/或权利要求19至21中任一项所述的载体或mRNA;和/或权利要求22至27中任一项所述的分离的细胞。

29. 一种包含分离的细胞的分离的复合物,所述分离的细胞包含与表达FLT3抗原的细胞结合的权利要求1至9中任一项所述的CAR。

30. 一种生产FLT3CAR表达细胞的方法,其包括使用权利要求10至18中任一项所述的分离的核酸序列和/或权利要求19至21中任一项所述的载体或mRNA转导分离的细胞。

31. 一种在需要其的受试者中治疗表达FLT3的癌症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求22至27中任一项所述的分离的细胞。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述分离的细胞对于被治疗的受试者是自体的。

33. 如权利要求31至32中任一项所述的方法,其中所述癌症是影响血液和/或骨髓的癌症。

34. 如权利要求31至32中任一项所述的方法,其中所述癌症是急性髓系白血病。

35. 如权利要求31至34中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类患者。

36. 如权利要求31至35中任一项所述的方法,其中权利要求22至27中任一项所述的分离的细胞包含权利要求13和14中任一项所述的分离的核酸,所述方法还包括诱导表达iCasp的多核苷酸的表达。

37. 一种用于确定患者对于FLT3CAR治疗可能响应或者不可能响应的方法,其包括使从所述患者分离的肿瘤样品与有效量的抗FLT3抗体接触并检测与所述肿瘤样品结合的任何

抗体的存在,其中与所述肿瘤样品结合的抗体的存在表明所述患者可能对所述FLT3CAR治疗响应,而与所述肿瘤样品结合的抗体的不存在则表明所述患者不可能对所述FLT3CAR治疗响应。

38.如权利要求37所述的方法,其还包括将有效量的FLT3CAR表达细胞施用给被确定可能对所述FLT3CAR治疗响应的患者。

39.一种包含本文公开的组合物和任选的使用说明书的试剂盒。

40.如权利要求39所述的试剂盒,其还包含FLT3抗原结合结构域和任选的使用说明书。

## 用于免疫治疗的FLT3定向CAR细胞

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请依据35 U.S.C.§119(e) 要求2015年9月23日提交的美国临时申请号62/222,695的优先权,其内容通过引用全部并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本公开一般地涉及人类免疫学领域,具体地为免疫治疗领域。

### 背景技术

[0004] 仅提供以下对本发明背景的讨论来帮助(了解)本发明的技术。

[0005] 2016年在美国将有60,140例新发白血病病例(占有新癌症病例的3.5%),并且估计24,400人(占有癌症死亡人数的4.1%)将死于该疾病。白血病是早期血液形成细胞的综合性癌症,其从包括白细胞的许多类型的细胞开始。因此,白血病包括许多种类:急性或慢性;髓性或淋巴性(2016)。不同类型的白血病有不同的治疗和展望。化疗和同种异体造血干细胞移植(HSCT)已成功应用于白血病。然而,HSCT受移植相关的发病率和死亡率限制,这归因于免疫排斥、感染和移植物抗宿主病(GVHD)。Kenderian等人,(2016) Biol Blood Marrow Transplant pii:S1083-8791(16)30328-7, ePub (doi:10.1016/j.bbmt.2016.09.002)。化疗也会导致难治性癌症。因此,迫切需要开发新颖和有效的治疗方法。

[0006] 急性髓系白血病(AML)是源自造血干细胞(HSC)或谱系特异性祖细胞的异质性克隆性疾病。据估计2013年美国有14,590人被诊断为AML,且10,370人死于AML。参见Siegel等人,(2013) CA Cancer J Clin.63(1):11-30。AML的发病率随年龄而增加,且老年患者( $\geq 65$ 岁)的5年存活率低于10%。参见Dores等人,(2012) Blood 119(1):34-43。尽管对这种疾病的分子和遗传复杂性有广泛的理解,但只有同种异体造血干细胞移植(HSCT)在AML患者的临床结果中提供了显著改善。然而,老年患者可能不符合接受HSCT的条件,并且这种方法也与可能导致显著发病率和死亡率的并发症,如移植物抗宿主病(GVHD)有关。此外,具有FLT3内部串联重复(ITD)突变的患者预后特别不良并且复发的可能性很高。因此,治疗AML的新方法代表了未满足的治疗需求。

[0007] 最近,对恶性血液病的细胞疗法已经有了显著的改善。一种有趣的治疗恶性血液病的新方法涉及用直接靶向肿瘤相关抗原的嵌合抗原受体(CAR)对免疫细胞进行基因修饰。CAR T细胞已被证明在临床中成功地用于在急性淋巴细胞白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)中靶向CD19。参见例如,Porter等人,(2011) NJEM 365(8):725-733;Grupp等人,(2013) NJEM 368(16):1509-1518;Brentjens等人,(2013) Sci Transl Med.5(177):177ra38;和Papapetrou等人,(2011) Nature Biotechnol.29(1):73-78。然而,鉴定用于治疗CD19<sup>-</sup>恶性血液病如多发性骨髓瘤(MM)和AML的可由CAR免疫细胞靶向的肿瘤相关表面抗原已被证明非常具有挑战性。

[0008] 关于白血病的嵌合抗原受体(CAR) T细胞的报道揭示了在化学治疗和HSCT后复发

和难治的疾病。通过将从单克隆抗体获得的单链可变片段(scFv)整合到来自免疫细胞受体的细胞内结构域中来开发CAR。CAR工程化T细胞移植具有细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的特异性抗肿瘤活性的单克隆抗体的特异性以获得识别肿瘤表面抗原的活性,并且一旦基因修饰的T细胞被共刺激分子和基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的协同效应激活时杀死特异性恶性肿瘤。Grada等人,(2013) *Molecular Therapy Nucleic Acids* 2:e105。然而,白血病患者CAR T细胞治疗可导致细胞因子风暴。Morgan等人(2010) *Mol Ther* 18:843-851; Porter等人,(2011) *NJEM* 365:725-733。与CAR T细胞相比,CAR自然杀伤(NK)细胞在患者中的同种异体状态下可能由于CAR NK细胞缺乏克隆扩增而具有较低的诱导细胞因子风暴、肿瘤溶解综合征以及移植物抗宿主病(GVHD)的风险。Han等人,(2015) *Scientific Reports* 5:11483; Uherek等人,(2002) *Blood* 100:1265-1273。成功应用CAR NK细胞的关键挑战是找到用来靶向的适合的细胞表面抗原。FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)是白血病中高度表达的蛋白,尤其是在急性髓性白血病(AML)中,而其通常保持在低水平,因为其突变引起受体的配体非依赖性激活并在白血病发展期间激活下游信号传导通路。Lagunas-Rangel等人,(2016) *Hematol Oncol*.ePub (doi:10.1002/hon.2330)。

[0009] CD19-CAR不能用于治疗AML,因为AML细胞不具有CD19的表面表达。已经提出CD33、CD44v6、LeY和CD123是用于AML治疗的待由CAR T细胞靶向的AML相关抗原。参见例如,Dinndorf等人,(1986) *Blood* 67(4):1048-1053; Griffin等人,(1984) *Leuk Res* 8(4):521-534; Casucci等人,(2013) *Blood* 122(20):3461-3472; Peinert等人,(2010) *Gene Therapy* 17(5):678-686。然而,临床前或临床研究显示,由于这些标志物在正常细胞如造血干/祖细胞、骨髓细胞和其他成熟细胞上的广泛表达,因此它们或者对于肿瘤根除无效或者由于破坏正常细胞而具有严重毒性。参见例如,Hernandez-Caselles等人,(2006) *J. Leukocyte Biol* 79(1):46-58; Ritchie等人,(2013) *Molecular Therapy* 21(11):2122-2129; Gill等人,(2014) *Blood* 123(15):2343-2354。特别地,CD33(SIGLEC-3)在85%至90%的AML患者中在白血病原始细胞上表达。参见例如,Dinndorf等人,(1986)和Griffin等人,(1984)。然而,CD33在T细胞和NK细胞的亚群上表达,并在骨髓细胞和长期正常的HSC上广泛表达。参见Hernandez-Caselles等人,(2006)。

[0010] 在HSC中不存在的CD44v6也已被CAR T细胞靶向;然而,它在激活的T细胞、单核细胞和角化细胞上有表达,并且输注CD44v6导致单核细胞减少症。参见Casucci等人,(2013)。LeY也被CAR T细胞靶向,用于AML治疗,但临床数据没有显示出有前景的结果。参见例如,Peinert等人,(2010)和Ritchie等人,(2013)。最近,来自几个组的临床前研究证明CD123-CAR T细胞有效根除AML,但这些CAR T细胞也引起骨髓细胞清除,并且最近的临床数据表明它们是高毒性的,这可能是由于CD123由正常HSC、各种成熟的免疫细胞且甚至是内皮细胞表达的事实。参见例如,Gill等人,(2014); Tettamanti等人,*Oncoimmunol* 3:e28835(2014); Pizzitola等人(2014) *Leukemia* 28(8):1596-1605; Mardiros等人,(2013) *Blood* 122(18):3138-3148; Tettamanti等人(2013) *British Journal of Haematol* 161(3):389-401; Ehninger等人(2014) *Blood Cancer Journal* 4:e218; Gilliet等人,(2004) *Archives of Dermatol* 140(12):1490-1495。

[0011] 这些研究表明,AML中由CAR免疫细胞安全靶向的理想肿瘤抗原尚未识别。靶向AML肿瘤相关抗原以治疗AML的新型CAR方法具有提高患者存活率和预防AML复发的潜能。

## 发明内容

[0012] 本公开的方面涉及嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: (a) FLT3 抗体的抗原结合结构域; (b) 铰链结构域; (c) 跨膜结构域; 和 (d) 细胞内结构域。本公开的另外方面涉及嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: (a) FLT3 抗体的抗原结合结构域; (b) 铰链结构域; (c) CD28 跨膜结构域; (d) 选自 CD28 共刺激信号传导区域、4-1BB 共刺激信号传导区域、ICOS 共刺激信号传导区域和 OX40 共刺激区域的一个或多个共刺激区域; 和 (e) CD3 $\zeta$  信号传导结构域。

[0013] 在某些实施方案中, FLT3 抗体的抗原结合结构域包含 FLT3 重链可变区和 FLT3 轻链可变区, 或可替换地基本上由其组成, 或进一步包含其。

[0014] 在一些实施方案中, FLT3 重链可变区包含含有 SEQ ID NO: 21-23、SEQ ID NO: 29-31 或其各自的等效物中的任一种的 CDR 区, 或可替换地基本上由其组成, 或进一步包含其。在一些实施方案中, FLT3 重链可变区包含由 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 27 或其各自的等效物中的任一种编码的氨基酸序列, 或可替换地基本上由其组成, 或进一步包含其。

[0015] 在一些实施方案中, FLT3 轻链可变区包含含有 SEQ ID NO: 24-26、SEQ ID NO: 32-34 或其各自的等效物中的任一种的 CDR 区。在一些实施方案中, FLT3 轻链可变区包含由 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 28 或其各自的等效物中的任一种编码的氨基酸序列, 或可替换地基本上由其组成, 或进一步包含其。

[0016] 在某些实施方案中, CAR 进一步包含位于 FLT3 重链可变区和 FLT3 轻链可变区之间的接头多肽, 或可替换地进一步地由其组成。在某些实施方案中, 接头是甘氨酸-丝氨酸接头。在另外的实施方案中, 接头多肽包含甘氨酸和丝氨酸的序列, 或者可替换地基本上由其组成, 或者进一步包含其, 例如 (GGGS) $n$ , 还称为 (G4S) $n$ , 其中  $n$  是 1 至 6 的整数, 例如 1、2、3、4、5 或 6。

[0017] 在某些实施方案中, CAR 进一步包含附接于 CAR 的可检测标记或纯化标记, 或者可替换地进一步由其组成。

[0018] 本公开的附加方面涉及编码如上所述的 CAR 的分离的核酸序列或其补体或其各自的等效物。

[0019] 在某些实施方案中, 分离的核酸序列进一步包含位于编码 FLT3 抗体的 FLT3 抗原结合结构域的多核苷酸上游的多核苷酸启动子序列, 或基本上进一步由其组成, 或还进一步由其组成。

[0020] 在某些实施方案中, 分离的核酸序列进一步包含编码诱导型半胱天冬酶 (“iCasp”) 或其他 “自杀基因” 的多核苷酸序列, 或基本上进一步由其组成, 或还进一步由其组成, 所述多核苷酸序列位于编码 FLT3 抗体的 FLT3 抗原结合结构域的多核苷酸上游或下游。

[0021] 在某些实施方案中, 分离的核酸序列进一步包含编码 2A 肽 (T2A) 的多核苷酸序列, 或基本上进一步由其组成, 或还进一步由其组成, 所述多核苷酸序列位于编码 FLT3 抗体的 FLT3 抗原结合结构域的多核苷酸上游或下游。

[0022] 在某些实施方案中, 分离的核酸序列进一步包含编码信号肽的多核苷酸序列, 或基本上进一步由其组成, 或还进一步由其组成, 所述多核苷酸序列位于编码 FLT3 抗体的 FLT3 抗原结合结构域的多核苷酸上游。

[0023] 在某些方面中, 分离的核酸进一步包含编码与分离的核酸可操作地结合的抗生素

抗性多肽的多核苷酸,或可替换地基本上由其组成,或者进一步包含其。

[0024] 本公开的方面涉及包含一种或多种上述分离的核酸的载体。在某些实施方案中,载体是质粒或选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体的组的病毒载体。分离的核酸和含有它们的载体可用于制备如本文所述CAR。

[0025] 本公开的另外方面涉及分离的细胞,其包含一种或多种上述组分:FLT3CAR、编码CAR的分离的核酸或其补体、或含有分离的核酸的载体,或可替换地基本上由其组成或者进一步包含其。在某些实施方案中,分离的细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞,例如大肠杆菌(E.coli)或真核细胞。在一些实施方案中,分离的真核细胞选自动物细胞、哺乳动物细胞、牛细胞、猫细胞、犬细胞、鼠细胞、马细胞或人细胞。在另外的实施方案中,分离的细胞是免疫细胞。在更另外的实施方案中,分离的免疫细胞是T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、骨髓细胞或任何其他免疫细胞。

[0026] 本公开的方面涉及一种组合物,其包含一种或多种上述组分,例如CAR、分离的核酸、细胞、或载体以及运载体(carrier),或可替换地基本上由其组成或进一步包含其。

[0027] 本公开的方面涉及包含CAR或包含与FLT3结合的CAR或其片段的细胞和/或表达FLT3相关抗原的细胞的分离的复合物。一方面,抗原结合结构域在细胞表面上表达。另一方面,FLT3相关抗原在癌症/肿瘤中表达。癌症的非限制性实例是急性髓系白血病。一方面,含有或表达FLT3CAR的细胞是免疫细胞。在另外的方面,含有或表达FLT3CAR的免疫细胞是NK细胞、B细胞、T细胞、树突细胞、骨髓细胞或任何其他免疫细胞。在一些实施方案中,细胞可以是基因修饰的或以其他方式修饰的。例如,T细胞可包含经修饰用作患者的同种异体T细胞的T细胞受体(TCR)。

[0028] 本公开内容的一些方面涉及生产FLT3CAR表达细胞的方法,所述方法包括用编码本文所述的CAR的核酸序列转导分离的细胞,或者可替换地基本上由其组成,或者还进一步由其组成。

[0029] 在另外的方面,该方法还包括选择和分离表达CAR的细胞。在另外的方面,细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞,例如人类细胞,如免疫细胞-非限制性实例包括NK细胞、B细胞、T细胞、树突细胞、骨髓细胞或任何其他免疫细胞。细胞可以使用本文所述的病毒载体,或者可替换地使用Riet等人,(2013) Meth.Mol.Biol.969:187-201的标题为“非病毒RNA转染以使用嵌合抗原受体瞬时修饰T细胞用于过继性治疗(Nonviral RNA transfection to transiently modify T cell with chimeric antigen receptors for adoptive therapy)”中描述的技术转导。

[0030] 在某些实施方案中,产生FLT3CAR表达细胞的方法进一步包括激活和扩增FLT3CAR表达细胞的群体,或者可替换地基本上由其组成或者还进一步由其组成。本公开的某些方面涉及分离的、激活的细胞群体,其包含FLT3CAR,或者可替换地基本上由其组成或者还进一步由其组成。在某些实施方案中,细胞是免疫细胞。在另外的实施方案中,免疫细胞是NK细胞、B细胞、T细胞、树突细胞、骨髓细胞或任何其他免疫细胞中的一种或多种。

[0031] 本公开的方面涉及通过使肿瘤/癌症与有效量的上述公开的分离的细胞或组分(组合物,compositions)接触来抑制表达FLT3的肿瘤/癌症生长的方法。接触可以是体外或体内的。当接触在体外时,该方法可用于测试针对患者的肿瘤/癌症的个性化疗法或测定联合疗法。当接触在体内时,该方法可用于抑制有需要的受试者中肿瘤/癌症的生长,并且患



者接受有效量的细胞。在某些实施方案中,靶向的肿瘤/癌症是影响血液和/或骨髓的癌症。在某些实施方案中,分离的细胞对于正在治疗的受试者是自体的。在另一方面,所述方法进一步包括给予所述受试者有效量的细胞减灭疗法,或基本上由其组成或者还进一步由其组成,例如化学疗法、放射疗法和/或溶瘤病毒疗法。在另外的方面,所述方法还包括以下步骤:分离待施用给受试者的细胞,用有效量的编码如本文所述的CAR的分离的核酸转导细胞,培养细胞以获得任选地被扩增并激活的CAR编码细胞的群体,然后将细胞施用于患者。

[0032] 本文还公开了包含一种或多种上述组分以及它们在本文公开的方法中的使用说明的试剂盒。

## 附图说明

[0033] 图1是非限制性示例性CAR载体构建体的示意图。

[0034] 图2A-2F显示用于细胞表面FLT3表达的急性髓性白血病细胞系的流式细胞术分析;对于所有图,x轴表示基于结合抗体对FLT3的荧光强度的FLT3表面表达,并且y轴表示细胞计数。图2A-2D对于增强的FLT3表面表达是正确的(阳性的);而图2E-2F不表现出比同种型对照更高的FLT3表达。

[0035] 图3描绘了用于AML MOLM-13细胞的裂解的标准4小时铬释放测定的结果;空载体对照和CD19CAR T细胞不导致AML细胞的裂解,而用FLT3-1 (CAR1) 和FLT3 (CAR2) 产生的FLT3CAR T细胞似乎显著增强AML细胞的根除。

[0036] 图4A-4C描述了表达FLT3-CAR的T细胞的生成。(图4A) FLT3CAR慢病毒构建体的示意图。iCasp9,诱导型半胱天冬酶9;T2A,一种自切割2A基因;SP,信号肽;VH,可变H链;L,接头;VL,可变L链。MyC,MyC基因序列;铰链,铰链链;CD28,CD3 $\zeta$ ,共刺激结构域。(图4B) 在用生物素标记的山羊抗小鼠Fab特异性或IgG对照染色细胞后,通过流式细胞术分析原代T、原代T-EV、原代T-FLT3细胞。(图4C) 用抗CD3 $\zeta$ 的免疫印迹展示在用FLT3-CAR构建体(原代T-FLT3) 或空载体构建体(EV) 转导的原代T和原代T细胞表面上表达嵌合FLT3scFv。

[0037] 图5A-5C显示FLT3<sup>+</sup>白血病细胞的识别诱导比来自对照T细胞的应答强的来自FLT3-CAR T细胞的应答。(图5A) 用抗FLT3染色细胞后,白血病细胞系表面上的FLT3表达的流式细胞术分析。(图5B) 间接ELISA测定分析在MOLM-13、EOL-1或U937存在或不存在下用FLT3-CAR构建体(T-FLT3) 或空载体构建体(T-EV) 转导的原代T、原代T细胞的IFN- $\gamma$  分泌。(图5C) 实时PCR显示在MOLM-13和U937存在下,原代T、原代T-EV和原代T-FLT3的IFN- $\gamma$  释放。对照意味着不与靶细胞共培养。

[0038] 图6A-6B证明FLT3-CAR T细胞增强了患者原发性人白血病细胞的根除。(图6A) 间接ELISA测定法分析与从患者和正常对照中分离的PBMC(外周血单核细胞) 共培养后,用FLT3-CAR构建体(T-FLT3) 或空载体构建体(T-EV) 转导的原代T、原代T细胞的IFN- $\gamma$  和IL-2分泌。在FLT3<sup>+</sup>患者白血病细胞存在下,T-FLT3诱导强应答。(图6B) 在从T细胞和靶PBMC共培养提取总RNA并进行逆转录后进行Q-PCR,以显示在来自患者和正常人的PBMC存在下,原代T、原代T-EV和原代T-FLT3的IFN- $\gamma$  释放。对照意味着不与靶PBMC共培养。

[0039] 图7A-7B证明FLT3-CAR T细胞抑制体内生长的白血病,延长携带白血病的小鼠的存活。(图7A) 携带白血病小鼠的腹侧和背侧生物发光成像。NSG小鼠通过尾静脉注射(第0天) 接种表达萤光素酶的白血病细胞。接种后第9天和第16天,将小鼠尾静脉输注一次空载

体转导的T细胞(模拟T细胞,PCDH载体)、FLT3-CAR转导的原代T细胞(T-FLT3-CAR)或PBS。(图7B)如通过Kaplan-Meier存活曲线(每组n=5)所确定的,与用原代T细胞或原代T-PCDH处理的小鼠相比,用T-FLT3-CAR细胞处理的携带白血病的小鼠显示显著增加的总体存活(\*\*p<0.01)。

[0040] 图8A-8C描述了FLT3-CAR的产生和其在CAR转导的NK细胞上的表达的测试。(图8A) FLT3CAR慢病毒构建体的示意图。iCasp9,诱导型半胱天冬酶9;T2A,一种自切割2A基因;SP,信号肽;VH,可变H链;L,接头;VL,可变L链。MyC,MyC基因序列;铰链,铰链链;CD28,CD3 $\zeta$ ,共刺激结构域。(图8B)用FLT3-CAR构建体(NK-92-FLT3-CAR)或空载体构建体(EV)转导的NK-92和NK-92细胞表面上的嵌合FLT3scFv的表达。(图8C)在用生物素标记的山羊抗小鼠Fab特异性或IgG对照染色细胞后,通过流式细胞术分析NK-92、NK-92-EV、NK-92-FLT3细胞。

[0041] 图9A-9D证明FLT3-CAR-NK-92细胞识别并促进杀死FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系。(图9A)白血病细胞系表面上的FLT3表达的流式细胞术分析。(图9B)使用铬-51释放测定,空载体(EV)-转导的或FLT3-CAR-转导的NK-92细胞针对MOLM-13、EOL-1或U937细胞的细胞毒活性。(图9C)ELISA测定分析在MOLM-13、EOL-1或U937存在或不存在下用FLT3-CAR构建体(NK-92-FLT3-CAR)或空载体构建体(EV)转导的NK-92、NK-92细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。(图9D)Q-PCR显示在MOLM-13、U937和对照存在下,NK-92、NK92-EV和NK92-FLT3的IFN- $\gamma$ 释放。

[0042] 图10A-10C证明FLT3-CAR-NK-92细胞增强了患者原发性人白血病细胞的杀死。(图10A)使用铬-51释放测定的空载体(EV)转导的或FLT3-CAR转导的NK-92细胞对患者的白血病细胞的细胞毒活性。(图10B)ELISA测定分析在患者白血病细胞或正常对照的PBMC中,用FLT3-CAR构建体(NK-92-FLT3-CAR)或空载体构建体(EV)转导的NK-92、NK-92细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。(图10C)Q-PCR显示在患者白血病细胞和对照存在下,NK-92、NK92-EV和NK92-FLT3的IFN- $\gamma$ 释放。

[0043] 图11A-11B证明用FLT3-CAR转导的原代NK可有效增强杀死患者的白血病细胞系和肿瘤细胞。(图11A)原代NK-FLT3CAR细胞体外杀死FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系MOLM13。(图11B)原代NK-FLT3CAR细胞杀死患者的肿瘤细胞。

[0044] 图12A-12D显示AP1903(药物)能够有效诱导iCasp9对NK92-FLT3的细胞凋亡。(图12A)iCasp9在NK-92-FLT3转导的细胞中表达。(图12B)诱导48小时后,AP1903处理诱导NK-92-FLT3的细胞死亡。(图12C)流式细胞术膜联蛋白V分析显示AP1903处理后NK92-FLT3的显著细胞凋亡。(图12D)免疫印迹分析显示AP1903(药物)处理后NK-92-FLT3的切割的半胱天冬酶-3的增加。

[0045] 图13证明NK-92-FLT3-CAR细胞抑制体内生长白血病,延长携带白血病的小鼠的存活。携带白血病的小鼠的脑生物发光成像。NSG小鼠通过尾静脉注射(第0天)接种表达萤光素酶的白血病细胞。接种7天后,将小鼠尾静脉输注一次空载体转导的NK-92细胞(NK-92-EV)、FLT3-CAR转导的NK-92细胞(NK-92-FLT3)或NK-92细胞。

[0046] 图14显示从患者中分离的AML细胞表面上的FLT3表达的流式细胞术分析。

## 具体实施方式

[0047] 应当理解,本公开不限于所描述的特定方面,因此当然可以变化。还应该理解的是,本文使用的术语仅仅是为了描述特定方面的目的,而不意图是限制性的,因为本公开的

范围将仅由所附权利要求来限定。

[0048] 除非另外定义,否则在此使用的所有技术和科学术语具有与由本技术所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些相似或等同的任何方法和材料可用于本技术的实践或测试,但现在描述优选的方法、装置和材料。本文引用的所有技术和专利出版物均通过引用其全部内容并入本文。本文中的任何内容都不应被解释为承认本技术由于在先发明而先于这样的公开。

[0049] 除非另有说明,本公开的实施采用在本领域技术范围内的组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术。参见例如,Green和Sambrook编辑,(2012)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版;the series Ausubel等人编辑,(2015)Current Protocols in Molecular Biology;the series Methods in Enzymology (Academic Press,Inc.,N.Y.);MacPherson等人,(2015)PCR 1:A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press);MacPherson等人,(1995)PCR 2:A Practical Approach;McPherson等人,(2006)PCR:The Basics (Garland Science);Harlow和Lane编辑,(1999)Antibodies,A Laboratory Manual;Greenfield编辑(2014)Antibodies,A Laboratory Manual;Freshney(2010)Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,第6版;Gait编辑(1984)Oligonucleotide Synthesis;美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编辑(1984)Nucleic Acid Hybridization;Anderson(1999)Nucleic Acid Hybridization;Herdewijn编辑(2005)Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications;Hames和Higgins编辑(1984)Transcription and Translation;Buzdin and Lukyanov编辑(2007)Nucleic Acids Hybridization:Modern Applications;Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press(1986));Grandi编辑(2007)In Vitro Transcription and Translation Protocols,第2版;Guisan编辑(2006)Immobilization of Enzymes and Cells;Perbal(1988)A Practical Guide to Molecular Cloning,第2版;Miller和Calos编辑,(1987)Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory);Makrides编辑(2003)Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells;Mayer和Walker编辑(1987)Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press,London);Lundblad and Macdonald编辑(2010)Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,第4版;和Herzenberg等人编辑(1996)Weir's Handbook of Experimental Immunology,第5版。

[0050] 所有数字标记,例如pH、温度、时间、浓度和分子量,包括范围,都是近似值,在适当情况下,其变化(+)或(-)1.0或0.1的增量,或者可替换地变化 $\pm 15\%$ ,或者可替换地 $10\%$ ,或者可替换地 $5\%$ ,或者可替换地 $2\%$ 。应该理解,虽然并非总是明确指出,但所有数字标记之前都有术语“约”。还应该理解,虽然并非总是明确指出,但本文描述的试剂仅仅是示例性的,并且这种的等效物是本领域中已知的。

[0051] 在没有明确叙述的情况下并且除非另有意图,否则可以推断当本技术涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,这种的等效物或生物等效物意图在本技术的范围内。

[0052] 定义

[0053] 如说明书和权利要求书中所用,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合

物。

[0054] 如本文所用,术语“动物”是指活的多细胞脊椎动物生物体,该类别包括例如哺乳动物和鸟类。术语“哺乳动物”包括人类和非人类哺乳动物。

[0055] 术语“受试者”、“宿主”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用以指代人和兽医受试者,例如人类、动物、非人类灵长动物、狗、猫、绵羊、小鼠、马和牛。在一些实施方案中,受试者是人类。

[0056] 如本文所用,术语“抗体”总体上指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括举例来说但不限于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其组合以及在任何脊椎动物中的免疫应答期间产生的类似分子,例如在哺乳动物如人类、山羊、兔和小鼠以及非哺乳动物物种中,如鲨鱼免疫球蛋白。除非另外特别指出,否则术语“抗体”包括特异性结合至感兴趣的分子(或一组高度相似的感兴趣的分子)的完整免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”,以基本上排除结合至其他分子(例如,对于感兴趣的分子具有的结合常数比对于生物样品中的其他分子的结合常数大至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的抗体和抗体片段)。术语“抗体”还包括基因工程形式,例如嵌合抗体(例如,鼠或人源化非灵长类抗体)、异源结合抗体(例如,双特异性抗体)。也参见,Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.);Owen等人,Kuby Immunology,第7版,W.H.Freeman&Co.,2013;Murphy, Janeway's Immunobiology,第8版,Garland Science,2014;Male等人,Immunology (Roitt),第8版,Saunders,2012;Parham,The Immune System,第4版,Garland Science, 2014.

[0057] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指由B淋巴细胞的单一克隆产生的抗体或由单个抗体的轻链和重链基因已被转染进其中的细胞产生的抗体。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生,例如通过由骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合产生杂交抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0058] 就抗体结构而言,免疫球蛋白具有通过二硫键相互连接的重链(H)和轻链(L)。有两种类型的轻链, $\lambda$ ( $\lambda$ )和 $\kappa$ ( $\kappa$ )。有五种主要的重链类别(或同种型),其决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每个重链和轻链包含恒定区和可变区,(这些区域也被称为“结构域”)。组合时,重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有被三个高变区(也称为“互补决定区”或“CDR”)中断的“框架”区。已经定义了框架区和CDR的范围(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,其通过引用结合在此)。Kabat数据库现在在线维护。不同轻链或重链框架区的序列在一个物种内相对保守。抗体的框架区,即组分轻链和重链的组合框架区在很大程度上采用 $\beta$ -片层构象( $\beta$ -折叠构象),并且CDR形成连接 $\beta$ -片层结构的环,并且在一些情况下形成 $\beta$ -片层结构的一部分。因此,框架区起到形成支架的作用,所述支架通过链间非共价相互作用将CDR定位在正确方向。

[0059] CDR主要负责与抗原的表位结合。每个链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N端开始顺序编号,并且还通常由其中特定CDR所位于的链识别(重链区标记为CDHR且轻链区标记为CDLR)。因此,CDHR3是来自其中它被发现的抗体重链可变结构域的CDR3,而CDLR1是来自其中它被发现的抗体轻链可变结构域的CDR1。FLT3抗体将具有FLT3相关抗原特有的特异性 $V_H$ 区和 $V_L$ 区序列,因此具有特异性CDR序列。具有不同特异性的抗体(即,不同抗原的不

同组合位点) 具有不同的CDR。尽管CDR在抗体之间变化, 但CDR内仅有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。CDR内的这些位置被称为特异性决定残基 (SDR)。

[0060] 如本文所用, 术语“抗原”是指可被特异性体液或细胞免疫的产物特异性结合的化合物、组合物或物质, 例如抗体分子或T细胞受体。抗原可以是任何类型的分子, 包括例如半抗原、简单的中间代谢物, 糖 (例如, 低聚糖)、脂质和激素以及大分子如复合碳水化合物 (例如, 多糖)、磷脂和蛋白质。常见类别的抗原包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物的其他寄生抗原、肿瘤抗原、参与自身免疫性疾病、变态反应和移植物排斥的抗原、毒素和其他各种抗原。

[0061] 如本文所用, 术语“抗原结合结构域”是指可以特异性结合抗原靶标的任何蛋白或多肽结构域。

[0062] 如本文所用, 关于细胞的术语“自体”是指分离并输注返回到相同受试者 (受者或宿主) 中的细胞。“同种异体”是指非自体细胞。

[0063] 如本文所用, 术语“B细胞”是指适应性免疫系统的体液免疫中的一类淋巴细胞。B细胞主要用于制备抗体, 用作抗原呈递细胞、释放细胞因子, 并且在通过抗原相互作用激活后形成记忆B细胞。由于细胞表面存在B细胞受体, 将B细胞与其他淋巴细胞如T细胞区别开。B细胞可以分离或从商业上可获得的来源获得。可商购B细胞系的非限制性实例包括系AHH-1 (ATCC® CRL-8146™)、BC-1 (ATCC® CRL-2230™)、BC-2 (ATCC® CRL-2231™)、BC-3 (ATCC® CRL-2277™)、CA46 (ATCC® CRL-1648™)、DG-75 [D.G.-75] (ATCC® CRL-2625™)、DS-1 (ATCC® CRL-11102™)、EB-3 [EB3] (ATCC® CCL-85™)、Z-138 (ATCC® CRL-3001)、DB (ATCC CRL-2289)、Toledo (ATCC CRL-2631)、Pfiffer (ATCC CRL-2632)、SR (ATCC CRL-2262)、JM-1 (ATCC CRL-10421)、NFS-5C-1 (ATCC CRL-1693)、NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694)、NFS-25C-3 (ATCC CRL-1695)、AND SUP-B15 (ATCC CRL-1929)。其他实例包括但不限于源自间变性大细胞淋巴瘤的细胞系, 例如, DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas299、Ki-JK、Mac-2A Ply1、SR-786、SU-DHL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10和-16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL; 霍奇金淋巴瘤, 例如DEV、HD-70、HDL-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L 428、L 540、L1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1。这种可商购细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心或ATCC ([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0064] 如本文所用, “癌症”是一种疾病状态, 其特征是在受试者中存在表明异常不受控制的复制的细胞。在一些实施方案中, 癌症是白血病。在某些实施方案中, 癌症是急性髓系白血病。如本文所用, “白血病”是以未成熟的白细胞的异常增加为特征的血液或骨髓的癌症。急性髓系白血病 (AML) 的特殊情况-也称为急性骨髓性白血病或急性粒细胞性白血病-是髓系起源血细胞的癌症, 其特征是在骨髓中积聚并干扰正常血细胞的生产的异常髓系细胞的快速生长。

[0065] 如本文所用, 术语“嵌合抗原受体 (CAR)”是指融合蛋白, 其包含能够结合抗原的胞外结构域, 衍生自与其衍生胞外结构域的多肽不同的多肽的跨膜结构域, 和至少一个胞内结构域。“嵌合抗原受体 (CAR)”有时被称为“嵌合受体”、“T体”或“嵌合免疫受体 (CIR)”。“能够结合抗原的胞外结构域”是指可以结合某种抗原的任何寡肽或多肽。“胞内结构域”或“胞内信号传导结构域”是指已知充当传输信号以引起细胞中的生物过程的激活或抑制的

结构域的任何寡肽或多肽。在某些实施方案中,除了主要信号传导结构域之外,胞内结构域可以包含一个或多个共刺激信号传导结构域,可替换地基本上由其组成,或还进一步包含其。“跨膜结构域”是指已知跨越细胞膜并可用以连接细胞外和信号传导结构域的任何寡肽或多肽。嵌合抗原受体可以任选地包含充当胞外和跨膜结构域之间的接头的“铰链结构域”。编码每个结构域组分的非限制性示例性多核苷酸序列在本文中公开,例如:

[0066] 铰链结构域:IgG1重链铰链序列,SEQ.ID NO:1:

[0067] CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCG

[0068] 跨膜结构域:CD28跨膜区SEQ.ID NO:2:

[0069] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  
ATTTTCTGGGTG

[0070] 细胞内结构域:4-1BB共刺激信号传导区,SEQ.ID NO:3:

[0071] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA  
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0072] 细胞内结构域:CD28共刺激信号传导区,SEQ.ID NO:4:

[0073] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACC  
CGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

[0074] 细胞内结构域:CD3 $\zeta$ 信号传导区,SEQ.ID NO:5:

[0075] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG  
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCC  
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG  
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC  
TACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0076] 每个示例性结构域组分的另外的实施方案包括具有类似生物功能的其它蛋白质,其与由上述公开的核酸序列编码的蛋白质共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。此外,本文提供了这样的结构域的非限制性实例。

[0077] 如本文所用,术语“CD8 $\alpha$ 铰链结构域”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的CD8 $\alpha$ 铰链结构域序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。人类、小鼠和其他物种的CD8 $\alpha$ 铰链结构域的示例性序列在Pinto,R.D.等人,(2006) Vet.Immunol.Immunopathol.110:169-177中提供。与CD8 $\alpha$ 铰链结构域相关的序列在Pinto,R.D.等人,(2006) Vet.Immunol.Immunopathol.110:169-177中提供。这种的非限制性实例包括:

[0078] 人类CD8 $\alpha$ 铰链结构域,SEQ.ID NO:6:

[0079] PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY

[0080] 小鼠CD8 $\alpha$ 铰链结构域,SEQ.ID NO:7:

[0081] KVNSTTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

[0082] 猫CD8 $\alpha$ 铰链结构域,SEQ.ID NO:8:

[0083] PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY

[0084] 如本文所用,术语“CD8 $\alpha$ 跨膜结构域”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的CD8 $\alpha$ 跨膜结构域序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。与人类T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的氨基酸位置183-203 (GenBank登录号:NP\_001759.3),或小鼠T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的氨基酸位置197-217 (GenBank登录号:NP\_001074579.1),和大鼠T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的氨基酸位置190-210 (GenBank登录号:NP\_113726.1)相关的片段序列提供了CD8 $\alpha$ 跨膜结构域的另外的示例性序列。与每个列出的登录号相关的序列提供如下:

[0085] 人类CD8 $\alpha$ 跨膜结构域,SEQ.ID NO:9:

[0086] IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT

[0087] 小鼠CD8 $\alpha$ 跨膜结构域,SEQ.ID NO:10:

[0088] IWAPLAGICVALLSLIITLI

[0089] 大鼠CD8 $\alpha$ 跨膜结构域,SEQ.ID NO:11:

[0090] IWAPLAGICAVLLSLVITLI

[0091] 如本文所用,术语“4-1BB共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的4-1BB共刺激信号传导区序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。4-1BB共刺激信号传导区的非限制性示例性序列在美国公开案20130266551A1(以美国申请号13/826,258提交)中提供,例如下面提供的示例性序列和由SEQ ID NO:3编码的序列:

[0092] 4-1BB共刺激信号传导区,SEQ ID NO:12:

[0093] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL。

[0094] 如本文所用,术语“ICOS共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的ICOS共刺激信号传导区序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。ICOS共刺激信号传导区的非限制性示例性序列在美国专利申请公开号2015/0017141A1中提供,下面提供示例性多核苷酸序列。

[0095] ICOS共刺激信号传导区,SEQ ID NO:13:

[0096]

ACAAAAAAGA AGTATTCATC CAGTGTGCAC GACCCTAACG  
GTGAATACAT GTTCATGAGA GCAGTGAACA CAGCCAAAAA  
ATCCAGACTC ACAGATGTGA CCCTA

[0097] 如本文所用,术语“OX40共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的OX40共刺激信号传导区序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,或者可替换地90%序列同一性,或者可替换地至少95%序列同一性。OX40共刺激信号传导区的非限制性示例性序列在美国专利申请公开号2012/20148552A1中提供,并且包括下面提供的示例性序列。

[0098] OX40共刺激信号传导区,SEQ ID NO:14:

[0099]

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT  
GGGGGAGGCA GTTTCGGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG  
CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATC

[0100] 如本文所用,术语“CD28跨膜结构域”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的CD28跨膜结构域序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,至少90%序列同一性,或者可替换地至少95%序列同一性。与GenBank登录号:XM\_006712862.2和XM\_009444056.1相关的片段序列提供CD28跨膜结构域的另外的非限制性的示例性序列。与每个列出的登录号相关的序列提供如下,由SEQ ID NO:2编码的序列。

[0101] 如本文所用,术语“CD28共刺激信号传导区”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的CD28共刺激信号传导区序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,或者可替换地90%序列同一性,或者可替换地至少95%序列同一性。示例性序列CD28共刺激信号传导结构域在以下中提供:美国专利号5,686,281;Geiger,T.L.等人,(2001)Blood 98:2364-2371;Hombach,A.等人,(2001)J Immunol 167:6123-6131;Maher,J.等人,(2002)Nat Biotechnol 20:70-75;Haynes,N.M.等人,(2002)J Immunol 169:5780-5786(2002);Haynes,N.M.等人,(2002)Blood 100:3155-3163。非限制性实例包括以下的残基114-220和由SEQ ID NO:4编码的序列:

[0102] CD28序列:MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV  
AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG  
NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY  
FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS  
KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSD  
YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS (SEQ ID NO:15),及其等效物。

[0103] 如本文所用,术语“CD3 $\zeta$ 信号传导结构域”是指与该名称相关的特定蛋白片段和具有类似生物功能的任何其他分子,其与本文所示的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域序列共享至少70%,或者可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,或者可替换地90%序列同一性,或者可替换地至少95%序列同一性。CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的非限制性示例性序列在美国申请号13/826,258中提供,例如:

[0104] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA  
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:16) 和由SEQ ID NO:5编码的序列。

[0105] “组合物”通常意指活性剂(例如,化合物或组合物)与天然存在或非天然存在的载体,惰性(例如,可检测试剂或标记)或活性的,如佐剂、稀释剂、粘结剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等的组合,并且包括药学上可接受的载体。载体还包括药物赋形剂和添加剂蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如,糖,包括单糖,二-、三-、四-寡糖和寡聚糖;衍生糖如糖醇、醛糖酸(alonic acid)、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物),其可以单独地或以组合形式存在,单独地或以组合形式包含1-99.99(以重量或体积计)。示例性



蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。还可以起缓冲作用的代表性氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜(阿司帕坦,aspartame)等。碳水化合物赋形剂也旨在本技术的范围内,其实例包括但不限于单糖如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;和糖醇如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇(葡萄糖醇)和肌醇。

[0106] 如本文所用,术语“包含”旨在表示组合物和方法包括所列举的要素,但不排除其他。当用于定义组合物和方法时,“基本上由…组成”应意指排除对于预期用途的组合具有任何本质意义的其他元素。例如,基本上由本文定义的元素组成的组合物不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体,例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。“由…组成”应意指排除多于痕量元素的其他成分和用于施用本文公开的组合物实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个定义的方面都在本公开的范围內。

[0107] 如本文所用,术语“共有序列”是指通过比对一系列多序列确定的氨基酸或核酸序列,并且其限定表示在多序列的每个对应位置处的氨基酸或碱基的主要选择(选项)的理想化序列。取决于一系列多序列的序列,该系列的共有序列可以与每个序列相差零个、一个、几个或多个替换。而且,取决于一系列多序列的序列,可以为该系列确定多于一个共有序列。共有序列的产生已被进行严密的数学分析。可以使用各种软件程序来确定共有序列。

[0108] 如本文所用,“细胞减灭疗法”包括但不限于化学疗法、冷冻疗法和放射疗法。起作用以减少细胞增殖的试剂是本领域已知的并且被广泛使用。仅在它们分裂时才杀死癌细胞的化疗药物被称为细胞周期特异性的。这些药物包括作用于S期的药剂,包括拓扑异构酶抑制剂和抗代谢药。

[0109] 拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶(拓扑异构酶I和II)的作用的药物。在化疗过程期间,拓扑异构酶控制复制所需的DNA结构的操作,因此是细胞周期特异性的。拓扑异构酶I抑制剂的实例包括上面列出的喜树碱类似物、伊立替康和托泊替康(topotecan)。拓扑异构酶II抑制剂的实例包括安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷和替尼泊苷。

[0110] 抗代谢药通常是正常代谢底物的类似物,通常会干扰参与染色体复制的过程。它们攻击处于周期中非常特定阶段的细胞。抗代谢药包括叶酸拮抗剂,例如甲氨蝶呤;嘧啶拮抗剂,例如5-氟尿嘧啶、氟尿苷(foxuridine)、阿糖胞苷、卡培他滨和吉西他滨;嘌呤拮抗剂,例如6-巯基嘌呤和6-硫鸟嘌呤;腺苷脱氨酶抑制剂,例如克拉屈滨、氟达拉滨、奈拉滨和喷司他丁等。

[0111] 植物生物碱来源于某些类型的植物。长春花生物碱由长春花植物(长春花(*Catharanthus rosea*))制成。紫杉烷由太平洋紫杉树(紫杉)的树皮制成。长春花生物碱和紫杉烷也被称为抗微管剂。鬼臼毒素来源于鬼臼植物。喜树碱类似物来源于亚洲的“喜树”(喜树(*Camptotheca acuminata*))。鬼臼毒素和喜树碱类似物也被分类为拓扑异构酶抑制剂。植物生物碱通常是细胞周期特异性的。

[0112] 这些药剂的实例包括长春花生物碱,例如长春新碱、长春碱和长春瑞滨;紫杉烷,例如紫杉醇和多西他赛;鬼臼毒素,例如依托泊苷和替尼泊苷(tenisopide);以及喜树碱类似物,例如伊立替康和拓扑替康。

[0113] 冷冻疗法包括但不限于涉及降低温度的疗法,例如低温疗法。

[0114] 如本领域已知的,放射治疗包括但不限于暴露于辐射,例如电离辐射、UV辐射。示例性剂量包括但不限于至少约2Gy至不超过约10Gy范围内的电离辐射剂量和/或至少约5J/m<sup>2</sup>至不超过约50J/m<sup>2</sup>,通常为约10J/m<sup>2</sup>范围内的紫外线辐射剂量。

[0115] 如本文所用,术语“可检测标记”是指至少一个能够直接或间接产生可检测信号的标记。该标记的非穷尽列表包括:产生可检测信号的酶,例如通过比色法、荧光、发光,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;发色团,如荧光、发光染料;具有电子密度的基团,通过电子显微镜或通过它们的电学性质如电导率、电流分析、伏安法、阻抗检测;可检测基团(例如其分子的尺寸足以在其物理和/或化学性质上引起可检测的改变),这种检测可以通过光学方法如衍射、表面等离子体共振、表面变化、接触角改变或物理方法如原子力光谱学、隧道效应来完成;或放射性分子如<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S或<sup>125</sup>I。在一个方面中,可检测标记不包括自然荧光多核苷酸。

[0116] “有效量(effective amount)”或“起效量(efficacious amount)”是指当为了治疗哺乳动物或其他受试者而施用足以实现疾病的这种治疗的药剂的量或两种或更多种药剂的组合物。“有效量”将根据(一种或多种)药剂、待治疗的受试者的疾病及其严重程度和年龄、体重等而变化。

[0117] 术语“编码”当应用于核酸序列时是指被称为“编码”多肽的多核苷酸,如果处于其天然状态或当通过本领域技术人员公知的方法操作时可被转录和/或翻译以产生用于多肽和/或其片段的mRNA。反义链是这种核酸的补体,并且可以从中推导出编码序列。

[0118] 如本文所用,如本文所用的术语“增强子”表示增加、改善或减轻核酸序列的转录的序列元件,而不管其相对于待表达的核酸序列的位置和取向。增强子可以增强来自单个启动子或同时来自多于一个启动子的转录。只要这种改善转录的功能性被保留或基本保留(例如至少70%,至少80%,至少90%或至少95%的野生型活性,即全长序列的活性),则野生型增强子序列的任何截短的、突变的或以其他方式修饰的变体也在上述定义内。

[0119] 在一个方面,抗体的术语“等效物”或“生物等效物”是指如通过ELISA或其他合适方法所测量的,抗体选择性结合其表位蛋白或其片段的能力。生物等效物抗体包括但不限于与参考抗体的相同表位结合的那些抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。

[0120] 在没有明确叙述的情况下并且除非另有意图,否则可以推断当本公开涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,这种的等效物或生物等效物意图涵盖在本公开的范围。如本文所用,当提及参考蛋白质、抗体、多肽或核酸时,术语“其生物等效物”意图与“其等效物”同义,意指具有最低同源性同时仍保持期望的结构或功能性的那些。除非在本文具体列举,否则预期本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白质还包括其等效物。例如,等效物意指至少约70%同源性或同一性,或至少80%同源性或同一性,以及可替换地,或者至少约85%,或可替换地至少约90%,或可替换地至少约95%,或者可替换地98%同源性或同一性,并显示出与参考蛋白、多肽或核酸基本上等效的生物活性。可替换地,当提及多核苷酸时,其等效物是在严格条件下与参考多核苷酸或其补体杂交的多核苷酸。

[0121] 与另一序列具有一定百分比(例如,80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)意味着,当比对时,碱基(或氨基酸)的百分比在比

较两个序列时是相同的。比对和百分比同源性或序列同一性可以使用本领域已知的软件程序来确定,例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑1987)增补30,部分7.7.18,表7.7.1中描述的那些。优选地,默认参数用于比对。优选的比对程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤=无;链=两个;截止=60;预期=10;矩阵(Matrix)=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在以下互联网地址获悉:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0122] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸来源于基因组DNA,则表达可包括真核细胞中的mRNA的剪接。基因的表达水平可以通过测量细胞或组织样品中的mRNA或蛋白质的量来确定。在一个方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平直接与来自对照或参照样品的该基因的表达水平进行比较。另一方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平直接与来自施用化合物后的同一样品的该基因的表达水平进行比较。

[0123] 术语“FKBP”或FK506结合蛋白是指具有脯氨酰异构酶活性并且在功能上与亲环蛋白(亲环素)相关的蛋白质家族。已在从酵母到人类的许多真核生物中鉴定出FKBP,并且用作含有脯氨酸残基的蛋白质的蛋白质折叠分子伴侣(protein folding chaperone)。与亲环蛋白一起,FKBP属于亲免疫素(immunophilin)家族。非限制性的示例性FKBP是人FKBP12(也称为FKBP1A)、UniProt参考号P62942。FKBP的另外非限制性实例包括由GenBank登录号AH002818、BC119732.1、NM\_001199786.1和NM\_054014.3提供的那些。

[0124] 短语“一线”或“二线”或“三线”是指患者接受的治疗顺序。一线治疗方案是首先给予的治疗,而二线或三线治疗分别在一线治疗后或在二线治疗后给予。美国国家癌症研究所将一线治疗定义为“疾病或病况的首次治疗”。在患有癌症的患者中,一级治疗可以是手术、化学疗法、放射疗法或这些疗法的组合。一线治疗也被本领域技术人员称为“一级疗法和一级治疗”。参见国家癌症研究所网站www.cancer.gov,上次访问于2008年5月1日。通常,患者接受后续化疗方案,因为患者对一线治疗没有显示阳性临床或亚临床反应,或者一线治疗已经停止。

[0125] 如本文所用,术语“FLT3”是指与该名称相关的受体型酪氨酸蛋白激酶FLT3,任何其替代名称(Fms相关酪氨酸激酶、干细胞酪氨酸激酶、Fms样酪氨酸激酶、FL细胞因子受体、CD135抗原、EC 2.7.10.1、CD135、FLK-2、STK1、FLK2、生长因子受体酪氨酸激酶III型、受体型酪氨酸蛋白激酶FLT3、胎肝激酶2、胎肝激酶-2、EC 2.7.10、FLT-3、STK-1)或UniProt登录号P36888以及FLT3及其任何变体或同种型(isoform)共享至少80%氨基酸序列同一性,优选为90%序列同一性,或可替换地至少95%序列同一性的具有类似生物功能的任何其他分子。FLT3的非限制性实例包括:

[0126] 人类FLT3同种型1,SEQ ID NO:17:

[0127] MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNDSSVGKSSSYPMVSESP

[0128] EDLGCALRPQSSGTVYEAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMV  
ILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESC  
KEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLFKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGFL

TWELNKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYITCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSSEDYE  
IDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNKHQPGEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRR  
KPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKC  
CAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFY  
VDFREYEDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMMTQL  
GSHENIVNLLGACTLSGPIYLI FEYCCYGDLLNYLRSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQI  
HPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHG  
KVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFY  
KLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLGCQLADAEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRPFPS  
REMDLGLLSPQAQVEDS

[0129] 人类FLT3同种型2,SEQ ID NO:18:

[0130] MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNDSSVGKSSSYPMVSESP

[0131] EDLGCALRPQSSGTVYEA-AAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMV  
ILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESC  
KEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLKVGEPWLWIRCKAVHVNHGFL  
TWELNKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYITCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSSEDYE  
IDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNKHQPGEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRR  
KPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKC  
CAYNSLGTSCETILLNSPGPFPIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFY  
VDFREYEDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMMTQL  
GSHENIVNLLGACTLSGPIYLI FEYCCYGDLLNYLRSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQI  
HPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSARLPVKWMAPESLFEG  
IYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTS  
SFLGCQLADAEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRPFPSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0132] 如本文所用,术语FLT3-1是指包含具有CDR的氨基酸序列的抗体,所述CDR与下面  
本文公开的重链和轻链多核苷酸序列中编码的任何一个CDR,优选为下面公开的至少一个  
CDR3区,最优选为两个CDR3区共享至少70%,或可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优  
选为90%的序列同一性,更优选至少95%序列同一性。所述CDR区的氨基酸序列也在本文以  
下公开。

[0133] FLT3-1重链可变区序列,SEQ ID NO:19:

[0134] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAAGCTGTCCTGCAAG  
TCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGG  
AGAGATTGATCCTTCTGACAGTTATAAAGACTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGAT  
CCTCCAACACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGCGATT  
ACGACGACCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0135] FLT3-1轻链可变区序列,SEQ ID NO:20:

[0136] GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTCTCTGC  
AGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAA  
GTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTA

TCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCGTACACGTTCCGAGGG  
GGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

[0137] FLT3-1CDHR1, SEQ ID NO:21:

[0138] SYWMH

[0139] FLT3-1CDHR2, SEQ ID NO:22:

[0140] EIDPSDSYKDYNQKFKD

[0141] FLT3-1CDHR3, SEQ ID NO:23:

[0142] AITTTPFDF

[0143] FLT3-1CDLR1, SEQ ID NO:24:

[0144] RASQSISNNLH

[0145] FLT3-1CDLR2, SEQ ID NO:25:

[0146] YASQSIS

[0147] FLT3-1CDLR3, SEQ ID NO:26:

[0148] QQSNTWPYT

[0149] 如本文所用,术语FLT3-2是指包含具有CDR的氨基酸序列的抗体,所述CDR与下面  
本文公开的重链和轻链多核苷酸序列中编码的任何一个CDR,优选为下面公开的至少一个  
CDR3区,最优选为两个CDR3区共享至少70%,或可替换地至少80%的氨基酸序列同一性,优  
选为90%的序列同一性,更优选为至少95%序列同一性。所述CDR区的氨基酸序列也在本文  
以下公开。

[0150] FLT3-2重链可变区序列, SEQ ID NO:27:

[0151] CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA  
GTCTCTGGTTTCTCATTAATACTATGGTTTACACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGG  
AGTGATATGGAGTGGTGGAAAGCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCA  
AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAAAGGAGGG  
ATCTACTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0152] FLT3-2轻链可变区序列, SEQ ID NO:28:

[0153] GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACCTATGAGCTGC  
AAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTATATGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCC  
TCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAA  
CCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTAT  
CCGCTCACGTTCCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

[0154] FLT3-2CDHR1, SEQ ID NO:29:

[0155] NYGLH

[0156] FLT3-2CDHR2, SEQ ID NO:30:

[0157] VIWSGGSTDYNAAFIS

[0158] FLT3-2CDHR3, SEQ ID NO:31:

[0159] GGIYYANHYYAMDY

[0160] FLT3-2CDLR1, SEQ ID NO:32:

[0161] KSSQSLLNSGNQKNYM

[0162] FLT3-2CDLR2,SEQ ID NO:33:

[0163] GASTRES

[0164] FLT3-2CDLR3,SEQ ID NO:34:

[0165] QNDHSYPLT

[0166] 如本文所用,当在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中使用时,“同源性”或“同一性”、百分比“同一性”或“相似性”是指相同的或具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,例如在特定区域上至少60%同一性,优选为至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性(例如,编码本文描述的抗体的核苷酸序列或本文描述的抗体的氨基酸序列)。为了比较目的,可以通过比较可以比对的每个序列中的位置来确定同源性。当比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么分子在该位置是同源的。序列之间的同源程度是序列共有的匹配或同源位置的数目的函数。比对和百分比同源性或序列同一性可以使用本领域已知的软件程序来确定,例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑1987)增补30,部分7.7.18,表7.7.1中描述的那些。优选地,默认参数用于比对。优选的比对程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤=无;链=两个;截止=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在以下互联网地址获悉:[ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。术语“同源性”或“同一性”、百分比“同一性”或“相似性”也是指测试序列的补体或可以应用于测试序列的补体。术语还包括具有删除和/或添加的序列,以及具有替换的那些。如本文所述,优选的算法可以对缺口等做出解释。优选地,同一性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或更优选地在长度为至少50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。“不相关”或“非同源”序列与本文公开的序列之一共享小于40%的同一性,或可替换地小于25%的同一性。

[0167] “杂交”是指其中一个或多个多核苷酸反应以形成通过核苷酸残基的碱基之间的氢键稳定的复合物的反应。氢键可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen结合或任何其他序列特异性方式发生。该复合物可以包含形成双链体结构的两条链,形成多链复合物的三条或更多条链,单一自我杂交链或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛的过程的步骤,例如PCR反应的启动或核酶对多核苷酸的酶切割。

[0168] 严格的杂交条件的实例包括:约25℃至约37℃的培育温度;约6×SSC至约10×SSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;以及约4×SSC至约8×SSC的洗涤溶液。中等的(温和的,moderate)杂交条件的实例包括:约40℃至约50℃的培育温度;约9×SSC至约2×SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;以及约5×SSC至约2×SSC的洗涤溶液。高严格条件的实例包括:约55℃至约68℃的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC、0.1×SSC或去离子水的洗涤溶液。通常,杂交培育时间为5分钟至24小时,具有1、2或更多洗涤步骤,并且洗涤培育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15M的NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应该理解,可以采用使用其他缓冲体系的SSC的等效物。

[0169] 如本文所用,术语“分离的”是指基本上不含其他物质的分子或生物制品或细胞物

质。在一个方面,术语“分离的”是指与分别存在于天然来源中的其他DNA或RNA、或蛋白质或多肽、或细胞或细胞器、或组织或器官分离的核酸如DNA或RNA、或蛋白质或多肽(例如,抗体或其衍生物)、或细胞或细胞器、或组织或器官。术语“分离的”还指基本上不含细胞物质、病毒物质或培养基(当通过重组DNA技术产生时)或化学前体或其他化学品(当化学合成时)的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意指包括不是天然存在的片段形式的核酸片段,并且不会以天然状态发现。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白质中分离出来的多肽,并且意指包括纯化和重组多肽二者。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞或组织分离的细胞或组织,并且意指包括培养的和工程化的细胞或组织。

[0170] 如本文所用,术语“分离的细胞”通常是指基本上与组织的其他细胞分离的细胞。

[0171] “免疫细胞”包括例如,源自骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白细胞(白细胞(leukocytes))、淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和源自骨髓的细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)。

[0172] 如本文所用,术语“接头序列”涉及任何氨基酸序列,其包含1至10个,或可替换地8个氨基酸,或可替换地6个氨基酸,或可替换地5个氨基酸,它们可以重复1至10次、或可替换地至约8次,或可替换地至约6次,或可替换地约5次,或4次或者可替换地3次,或者可替换地2次。例如,接头可以包含多达15个氨基酸残基,由重复三次的五肽组成。在一个方面,接头序列是包含gly-gly-gly-gly-ser的三个拷贝的(甘氨酸4丝氨酸)3柔性多肽接头-以单字母序列符号表示为GGGGS。

[0173] “对应于癌组织类型的正常细胞”是指来自与癌组织相同组织类型的正常细胞。一个非限制性实例是来自患者的正常白细胞。

[0174] 如本文所用,术语“NK细胞”,也称为自然杀伤细胞,是指一种起源于骨髓并在先天免疫系统中起关键作用的淋巴细胞。即使在细胞表面上没有抗体和主要组织相容性复合物的情况下,NK细胞也提供针对病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫应答。NK细胞可以分离或从商业上可获得的来源获得。商业NK细胞系的非限制性实例包括系NK-92 ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI(ATCC® CRL-2408™)。其他实例包括但不限于NK系HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90和YT。这种可商购细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心或ATCC(<http://www.atcc.org/>)和德国微生物和细胞培养物保藏中心(<https://www.dsmz.de/>)。

[0175] 如本文中关于调控多核苷酸所使用的,术语“可操作地连接”是指调控多核苷酸与其所连接的多核苷酸序列之间的关联,使得当特异性蛋白质与调控多核苷酸结合时,所连接的多核苷酸被转录。

[0176] 如本文所用,关于细胞、组织或器官的术语“过表达”表示表达蛋白质的量大于在对照细胞、对照组织或器官中产生的量。过表达的蛋白质可能是宿主细胞内源性的或宿主细胞外源性的。

[0177] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且指任何长度的核苷酸的聚合形式,无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、RNAi、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸(branched polynucleotide)、质粒、载体、

任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在组装多核苷酸之前或之后赋予核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸组分间断。聚合后可以进一步修饰多核苷酸,例如通过与标记组分接合。该术语也指双链和单链分子二者。除非另有说明或要求,否则本技术的任何多核苷酸的方面都包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种。

[0178] 如本文所用,术语“核酸序列”和“多核苷酸”可互换使用以指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA,基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。

[0179] 如本文所用,术语“启动子”是指调节编码序列例如基因的表的任何序列。例如,启动子可以是组成型、诱导型、抑制型或组织特异性的。“启动子”是控制序列,其是多核苷酸序列区域,在该区域控制转录的起始和速率。它可能含有遗传元件,调控蛋白和分子可在此处结合,如RNA聚合酶和其他转录因子。

[0180] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用,并且在其最广义上是指两种或更多种亚氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽的化合物(compound)。亚基可以通过肽键连接。在另一方面,亚基可以通过其他键如酯、醚等连接。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以构成蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L光学异构体、氨基酸类似物和模拟肽。

[0181] 如本文所用,术语“纯化的”不需要绝对纯度;相反,其意图作为相对术语。因此,例如,纯化的核酸、肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物是全部或部分地从蛋白质或其他污染物分离的。通常,在用于治疗性给药的完整药物制剂中,在与药物载体、赋形剂、缓冲剂、吸收增强剂、稳定剂、防腐剂、佐剂或其他辅助成分一起混合或配制肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物之前,用于本公开中用途的基本上纯化的肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物构成大于80%的在制剂中存在的所有大分子物质。更通常,在与其他制剂成分混合之前,将肽、蛋白质、生物复合物或其他活性化合物纯化以表示大于90%,通常大于95%的纯化制剂中存在的所有大分子物质。在其他情况下,纯化的制剂可以基本上均匀,其中其他大分子物质通过常规技术检测不到。

[0182] 如本文所用,术语“纯化标记”是指用于纯化或识别的至少一个标记。该标记的非详尽列表包括His、lacZ、GST、麦芽糖结合蛋白、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、cherry、硫氧还蛋白、聚(NANP)、V5、Snap、HA、几丁质结合蛋白、Softag 1、Softag 3、Strep或S-蛋白。合适的直接或间接荧光标记包括FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、cherry、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、DNP、AMCA、生物素、地高辛、Tamra、德克萨斯红、罗丹明、Alexa荧光素、FITC、TRITC或任何其他荧光染料或半抗原。

[0183] 如本文所用,术语“重组蛋白质”是指通过重组DNA技术产生的多肽,其中通常将编码多肽的DNA插入到合适的表达载体中,其转而被用于转化宿主细胞以产生外源蛋白。

[0184] 如本文所用,术语“信号肽”是指引导蛋白质在细胞内转运和定位,例如到某些细胞器(例如内质网)和/或细胞表面的肽序列。本文公开了信号肽的非限制性实例,例如由以



下核酸序列编码的肽：

[0185] 如本文所用，术语“特异性结合”是指抗体与抗原之间的接触具有至少 $10^{-6}$ M的结合亲和力。在某些方面，抗体以至少约 $10^{-7}$ M，且优选 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M或 $10^{-12}$ M的亲和力结合。

[0186] “实体瘤”是通常不包含囊肿或液体区域的组织的异常肿块。实体瘤可以是良性或恶性的、转移性的或非转移性的。不同类型的实体瘤针对形成它们的细胞类型命名。实体瘤的实例包括肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0187] 如本文所用，术语“自杀基因”是能够诱导细胞凋亡的基因；非限制性实例包括HSV-TK（单纯疱疹病毒胸苷激酶）、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、羧酸酯酶、细胞色素P450或PNP（嘌呤核苷磷酸化酶）、截短型EGFR或诱导型半胱天冬酶（“iCasp”）。自杀基因可以沿着多种途径起作用，并且在一些情况下，可以被诱导剂如小分子诱导。例如，iCasp自杀基因包含与优化为结合诱导剂的蛋白质可操作地连接的半胱天冬酶蛋白质的一部分；将诱导剂引入到包含自杀基因的细胞中导致半胱天冬酶的激活和所述细胞随后的细胞凋亡。

[0188] 如本文所用，术语“T2A”和“2A肽”可互换使用，指任何2A肽或其片段、任何2A样肽或其片段、或包含相对短的肽序列（取决于来源病毒长度为约20个氨基酸）中的必需氨基酸的人工肽，含有共有多肽基序D-V/I-E-X-N-P-G-P（SEQ ID NO:35），其中X是指通常被认为是自切割的任何氨基酸。

[0189] 如本文所用，术语“T细胞”是指在胸腺中成熟的一种类型的淋巴细胞。T细胞在细胞介导的免疫中发挥重要作用，并且通过细胞表面上T细胞受体的存在，与其他淋巴细胞如B细胞相区别。T-细胞可以分离或从商业上可获得的来源获得。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞，包括T辅助细胞（CD4+细胞）、细胞毒T细胞（CD8+细胞）、天然杀伤T细胞、T调节细胞（Treg）和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+T细胞、天然杀伤（NK）细胞和嗜中性粒细胞，所述细胞能够介导细胞毒性反应。可商购T细胞系的非限制性实例包括系BCL2（AAA）Jurkat（ATCC®CRL-2902™）、BCL2（S70A）Jurkat（ATCC®CRL-2900™）、BCL2（S87A）Jurkat（ATCC®CRL-2901™）、BCL2Jurkat（ATCC®CRL-2899™）、Neo Jurkat（ATCC®CRL-2898™）、TALL-104细胞毒性人T细胞系（ATCC#CRL-11386）。其他实例包括但不限于成熟T细胞系，例如，Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1和T34；以及不成熟T-细胞系，例如ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1至T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3和-4、CCRF-HSB-2（CCL-120.1）、J.RT3-T3.5（ATCC TIB-153）、J45.01（ATCC CRL-1990）、J.CaM1.6（ATCC CRL-2063）、RS4;11（ATCC CRL-1873）、CCRF-CEM（ATCC CRM-CCL-119）；和皮肤T细胞淋巴瘤系，例如HuT78（ATCC CRM-TIB-161）、MJ[G11]（ATCC CRL-8294）、HuT102（ATCC TIB-162）。包括但不限于REH、NALL-1、KM-3、L92-221的裸白血病细胞系是免疫细胞的另一种商业上可获得的来源，如衍生自其他白血病和淋巴瘤的细胞系，例如K562红白血病、THP-1单核细胞白血病、U937淋巴瘤、HEL红白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髓瘤。这种可商购细胞系的非限制性示例性来源包括

美国典型培养物保藏中心或ATCC (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0190] 当它应用于嵌合抗原受体细胞产生时,术语“转导(transduce)”或“转导(transduction)”是指将外源核苷酸序列引入到细胞中的过程。在一些实施方案中,该转导通过载体完成。

[0191] 如本文所用,受试者中的疾病的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指(1)预防在易患或尚未显示疾病症状的受试者中出现症状或疾病;(2)抑制疾病或阻止其发展;或(3)改善疾病或疾病症状或导致疾病或疾病症状的消退。如本领域所理解的,“治疗”是用于获得有益或期望的结果,包括临床结果的方法。为了本技术的目的,有益的或期望的结果可以包括一种或多种,但不限于减轻或改善一种或多种症状,降低病况(包括疾病)程度,病况(包括疾病)的状态稳定(即,不恶化),病况(包括疾病)的延迟或减缓,疾况(包括疾病)的进展、改善或减轻,状态和缓解(无论是局部的还是完全的),无论是可检测的还是不可检测的。包含所公开的组合物和方法的治疗可以是一线、二线、三线、四线、五线疗法并且旨在用作单一疗法或与其他适当疗法组合。

[0192] 如本文所用,术语“载体”是指设计用于在不同宿主之间转移的核酸构建体,包括但不限于质粒、病毒、粘粒、噬菌体、BAC、YAC等。在一些实施方案中,质粒载体可以从可商购载体制备。在其他实施方案中,根据本领域已知的技术,病毒载体可以由杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒、AAV等产生。在一个实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。

[0193] 与以上列出的GenBank登录号、UniProt参考号和参考文献中的每一个相关的序列通过引用并入本文。

[0194] 缩略语列表

[0195] AML:急性髓系白血病

[0196] CAR:嵌合抗原受体

[0197] iCasp:诱导型半胱天冬酶

[0198] 本发明的实施方式

[0199] 由于最近在B细胞淋巴瘤和白血病中获得史无前例的结果(使用基因工程嵌合抗原受体(CAR)T-细胞自体治疗)(Maude,S.L.等人,(2014) *New Engl.J.Med.* 371:1507-1517; Porter,D.L.等人,(2011) *New Engl.J.Med.* 365:725-733),许多实验室已开始将此方法应用于实体瘤,包括卵巢癌、前列腺癌和胰腺肿瘤。CAR修饰的T细胞将单克隆抗体的HLA非依赖性靶向特异性与激活的T细胞的细胞溶解活性、增殖和归巢特性组合,但不响应检查点抑制。由于CAR T细胞能够直接杀死表达抗原的靶点,因此CAR T细胞对任何抗原阳性细胞或组织都具有高度毒性,使得需要用高度肿瘤特异性抗体构建CAR。迄今为止,已经针对 $\alpha$ -叶酸受体、间皮素和MUC-CD、PSMA以及其他靶标构建了针对人类实体瘤的CAR修饰的T细胞,但大部分在正常组织中具有一些抗原的脱靶表达。这些构建体在强调需要额外研究以确定可用于抗实体瘤的CAR T细胞构建的新靶标和方法的患者中并未显示出相同的优异结果。

[0200] 因此,本公开提供了包含对FLT3特异的结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),在一些方面,其是FLT3抗体的抗原结合结构域,以及涉及其使用和生产的方法和组合物。

[0201] 嵌合抗原受体及其用途

[0202] I. 组分

[0203] 本公开提供了与FLT3结合的嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含含有胞外、跨膜和胞内结构域的细胞激活部分,或基本上由其组成,或由其组成。胞外结构域包含另外称为抗原结合结构域的靶特异性结合元件。胞内结构域或胞质结构域包含共刺激信号传导区和 $\zeta$ 链部分。CAR可任选地还包含多达(至多达)300个氨基酸,优选为10至100个氨基酸,更优选为25至50个氨基酸的间隔区结构域。

[0204] 间隔区结构域。CAR可任选地还包含多达(至多达)300个氨基酸,优选为10至100个氨基酸,更优选为25至50个氨基酸的间隔区结构域。例如,间隔区可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。间隔区结构域可包含例如,人类Fc结构域的部分、CH3结构域或任何免疫球蛋白的铰链区,例如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM或其变体。例如,一些实施方案可以包含具有或不具有S228P、L235E和/或N297Q突变(根据Kabat编号)的IgG4铰链。额外的间隔区包括但不限于CD4、CD8和CD28铰链区。

[0205] 抗原结合结构域。在某些方面,本公开提供了CAR,其包含FLT3特异性的抗原结合结构域,或者可替换地基本上由其组成,或者还进一步由其组成。

[0206] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含FLT3抗体或结合FLT3的抗体的抗原结合结构域,或者可替换地基本上由其组成,或者还由其组成。特异性结合此抗原的单克隆抗体可从例如Becton Dickinson Biosciences和其他商业来源,如在[www.biocompare.com/Search-Antibodies/?search=FLT3&said=0](http://www.biocompare.com/Search-Antibodies/?search=FLT3&said=0)列举的那些商业上获得。

[0207] 在一个方面,抗原结合结构域包含FLT3抗体的重链可变区和轻链可变区。在非限制性实施方案中,FLT3抗体的重链可变区和轻链可变区包含FLT3抗体的抗原结合结构域,或者可替换地基本上由其组成,或还由其组成。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含靶特异性抗体(即,抗FLT3抗体)的片段,由其组成或基本上由其组成,例如scFv。scFv区域可包含免疫球蛋白的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )的可变区,其与短接头肽连接。接头肽可以是1至50个氨基酸,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。在一些实施方案中,接头是富含甘氨酸的,尽管它也可以含有丝氨酸或苏氨酸。

[0208] 在一些实施方案中,重链可变区包含由在SEQ ID NO:19:

[0209] CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCATTGAAGCTGTCCTGCAAGTCTTCCGGGTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGACAGTTATAAAGACTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAGATCCTCCAACACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAGCGATTACGACGACCCCTTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[0210] 中公开的多核苷酸序列编码的多肽、或其抗原结合片段或其各自的等效物,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0211] 在一些实施方案中,重链可变区包含由在SEQ ID NO:27:

[0212] CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATACTATGGTTTAACTGAGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGAAGCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCA

AGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAGGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAAAGGAGGG  
ATCTACTATGCTAACCATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0213] 中公开的多核苷酸序列编码的多肽、或其抗原结合片段或其各自的等效物,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0214] 在一些实施方案中,重链可变区包含CDRH1序列,其包含由SYWMH (SEQ ID NO:21)、NYGLH (SEQ ID NO:29)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0215] 在一些实施方案中,重链可变区包含CDRH2序列,其包含由EIDPSDSYKDYNQKFKD (SEQ ID NO:22)、VIWSSGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO:30)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0216] 在一些实施方案中,重链可变区包含CDRH3序列,其包含由AITTTPFDF (SEQ ID NO:23)、GGIYYANHYAMDY (SEQ ID NO:31)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成或还进一步由它们组成。

[0217] 在一些实施方案中,轻链可变区包含由在SEQ ID NO:20:

[0218] GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCCTG  
CAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATC  
AAGTATGCTTCCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCA  
GTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGGAGTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACACCTGGCCGTACACGTTCCG  
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACCGG中公开的多核苷酸序列编码的多肽、或其抗原结合片段或  
其各自的等效物,或者可替换地基本上由它们组成或还进一步由它们组成。

[0219] 在一些实施方案中,轻链可变区包含由在SEQ ID NO:28:

[0220] GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGC  
AAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTATATGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCC  
TCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAA  
CCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTAT  
CCGCTCACGTTCCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

[0221] 中公开的多核苷酸序列编码的多肽、或其抗原结合片段或其各自的等效物,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0222] 在一些实施方案中,轻链可变区包含CDRL1序列,其包含由RASQISISNNLH (SEQ ID NO:24)、KSSQSLLNSGNQKNYM (SEQ ID NO:32)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地

约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0223] 在一些实施方案中,轻链可变区包含CDRL2序列,其包含由YASQSIG (SEQ ID NO: 25)、GASTRES (SEQ ID NO: 33)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0224] 在一些实施方案中,轻链可变区包含CDRL3序列,其包含由QQSNTWPYT (SEQ ID NO: 26)、QNDHSYPLT (SEQ ID NO: 34)、或其各自的等效物开始的氨基酸序列,接着是在羧基末端的另外的50个氨基酸、或可替换地约40个氨基酸、或可替换地约30个氨基酸、或可替换地约20个氨基酸、或可替换地约10个氨基酸、或可替换地约5个氨基酸、或可替换地约4个、或3个、或2个或1个氨基酸,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0225] 在本公开的另一方面,FLT3抗体的抗原结合结构域包括以下特征中的一个或多个:

[0226] (a) 轻链免疫球蛋白可变结构域序列包含与任何公开的轻链序列的轻链可变结构域的CDR至少80%相同的一个或多个CDR;

[0227] (b) 重链免疫球蛋白可变结构域序列包含与任何公开的重链序列的重链可变结构域的CDR至少80%相同的一个或多个CDR;

[0228] (c) 轻链免疫球蛋白可变结构域序列与任何公开的轻链序列的轻链可变结构域至少80%相同;

[0229] (d) HC免疫球蛋白可变结构域序列与任何公开的轻链序列的重链可变结构域至少80%相同;以及

[0230] (e) 抗体结合与任何公开的序列结合的表位重叠的表位。

[0231] 等效物的额外实例包括与多核苷酸编码的肽或多肽具有至少85%,或可替换地至少90%,或可替换地至少95%,或可替换地至少97%的氨基酸同一性的肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码抗原结合结构域的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55°C至约68°C的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC,0.1×SSC的洗涤溶液或去离子水。

[0232] 示例性抗原结合结构域可以包含一种或多种下面提到的肽,并且一方面可以分别包含针对表1和表2中公开的特定抗原指出的HC和LC的全部三种CDR。

[0233] 表1:

[0234]

抗-FLT3 抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FLT3-1	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
FLT3-2	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34

[0235] 表2:

[0236]

抗-FLT3抗体	重链可变区	轻链可变区
FLT3-1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
FLT3-2	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28

[0237] 在一个方面,本公开提供与FLT3-1至少80%,或者可替换地85%,或者可替换地90%,或者可替换地95%,或者可替换地至少97%相同的抗体的抗原结合结构域。等效物的额外实例包括多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码抗原结合结构域的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55℃至约68℃的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC,0.1×SSC的洗涤溶液或去离子水。

[0238] 在本文提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包含FLT3-1的可变结构域序列,并且LC可变结构域序列包含FLT3-1的可变结构域序列。

[0239] 在一个方面,本公开提供了包含FLT3-1的CDR的抗体的抗原结合结构域。在一个方面,本公开提供与FLT3-1的CDR至少85%,或者可替换地80%,或者可替换地85%,或者可替换地90%,或者可替换地95%,或者可替换地至少97%相同的抗体的抗原结合结构域,或者由多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码FLT3-1的CDR的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55℃至约68℃的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC,0.1×SSC的洗涤溶液或去离子水。

[0240] 在一个方面,本公开提供与FLT3-2具有至少80%,或者可替换地85%,或者可替换地90%,或者可替换地95%,或者可替换地至少97%相同的抗体的抗原结合结构域。等效物的额外实例包括由多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码抗原结合结构域的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55℃至约68℃的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC,0.1×SSC的洗涤溶液或去离子水。

[0241] 在本文提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包含FLT3-2的可变结构域序列,并且LC可变结构域序列包含FLT3-2的可变结构域序列。

[0242] 在一个方面,本公开提供了包含FLT3-2的CDR的抗体的抗原结合结构域。在一个方面,本公开提供与FLT3-2的CDR至少85%,或者可替换地80%,或者可替换地85%,或者可替换地90%,或者可替换地95%,或者可替换地至少97%相同的抗体的抗原结合结构域,或者由多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码FLT3的CDR的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55℃至约68℃的培育温度;约1×SSC至约0.1×SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1×SSC,0.1×SSC的洗涤溶液或去离子水。

[0243] 跨膜结构域。跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。在天然来源的情况下,结构域可以来源于任何膜结合或跨膜蛋白。在本公开中特别使用的跨膜区可以来源于CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD 154、TCR。可替换地,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每个末端将发现苯丙氨酸、色氨

酸和缬氨酸的三联体。任选地,短的寡肽或多肽接头,长度优选为2-10个氨基酸,可以形成CAR的跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。

[0244] 胞质结构域。CAR的胞质结构域或胞内信号传导结构域负责其中定位CAR的免疫细胞的至少一种传统效应子功能的激活。胞内信号传导结构域是指转导效应子功能信号并指导免疫细胞执行其特定功能的蛋白质的部分。只要截短部分足以转导效应子功能信号,就可以使用整个信号传导结构域或其截短部分。TCR和辅助受体的胞质序列以及其衍生物或变体可用作用于CAR的胞内信号传导结构域。在本公开中特别使用的胞内信号传导结构域可来源于FcR、TCR、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d。在一些实施方案中,CAR的信号传导结构域可以包含CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0245] 由于通过TCR产生的信号单独不足以完全激活T细胞,因此还可能需次级或共刺激信号。因此,共刺激信号传导分子的细胞内区域(包括但不限于蛋白CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3,或与CD83特异性结合的配体的胞内结构域)也可包含在CAR的胞质结构域中。例如,除了信号传导结构域(例如,CD3 $\zeta$ 信号传导结构域)之外,CAR可以包含一个、两个或更多个共刺激结构域。

[0246] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体的细胞激活部分是T细胞信号传导结构域,包含选自以下构成的组的一种或多种蛋白质或其片段:CD8蛋白、CD28蛋白、4-1BB蛋白、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD27、LIGHT、NKG2C、B7-H3和CD3- $\zeta$ 蛋白,或者可替换地基本上由其组成,或还进一步由其组成。

[0247] 在具体的实施方案中,CAR包含FLT3抗体(例如,scFv)的抗原结合结构域、铰链结构域、CD28跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,或可替换地基本上由其组成或还进一步由其组成。在进一步的实施方案中,共刺激信号传导区包含CD28共刺激信号传导区和4-1BB共刺激信号传导区中的任一个或两者。

[0248] 开关机制。在一些实施方案中,CAR还可以包括用于控制CAR的表达和/或激活的开关机制。例如,CAR可以包含胞外、跨膜和胞内结构域,由其组成或基本上由其组成,其中胞外结构域包含结合对于除了在靶细胞上或由靶细胞表达的靶抗原之外的分子具有特异性的标记、结合结构域或标签的靶特异性结合元件。在这种实施方案中,CAR的特异性由第二构建体提供,所述第二构建体包含靶抗原结合结构域(例如,抗FLT3抗体或其片段或结合FLT3的双特异性抗体和CAR上的标记或标签)以及由CAR上的标记、结合结构域或标签所识别或与CAR上的标记、结合结构域或标签结合的结构域,由它们组成或基本上由它们组成。参见例如,WO 2013/044225、WO 2016/000304、WO 2015/057834、WO 2015/057852、WO 2016/070061、US 9,233,125、US 2016/0129109。以这种方式,可将表达CAR的T细胞施用于受试者,但其不能结合其靶抗原(即,FLT3)直至施用包含FLT3特异性结合结构域的第二组合物。

[0249] 本公开的CAR可能同样需要多聚化以激活它们的功能(参见例如,US 2015/0368342、US 2016/0175359、US 2015/0368360)和/或外源性信号如小分子药物(US 2016/0166613,Yung等人,Science,2015)以引发T细胞应答。

[0250] 此外,公开的CAR可以包含“自杀开关”(也称为“自杀基因”),从而在处理诱导CAR细胞的细胞死亡(Buddee等人,PLoS One,2013)或在与靶抗原结合之后下调CAR的表达

(WO 2016/011210)。非限制性示例性自杀开关或自杀基因是iCasp。

[0251] 在一些实施方案中,CAR可以进一步包含可检测标记或纯化标记。在另一方面,本文所述的CAR包含在组合物中,例如用于诊断或治疗的药学上可接受的载体。

[0252] II. 用于制备FLT3抗体的方法

[0253] 用于本公开的抗体可以购买或使用本领域已知的并在本文简要描述的方法制备。它们的制造和用途是众所周知的,并公开于例如,Greenfield (2014) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.。可以使用本领域已知的标准方法产生抗体。抗体的实例包括(但不限于)抗体的单克隆、单链和功能片段。

[0254] 抗体可以在一系列宿主中产生,例如山羊、兔、大鼠、小鼠、人类和其他。它们可以通过注射具有免疫原性的靶抗原或其片段或寡肽例如C-末端片段FLT3或分离的多肽来免疫。取决于宿主物种,可以添加各种佐剂并用于增加免疫应答。这种佐剂包括但不限于弗氏(Freund's)、矿物凝胶如氢氧化铝,和表面活性物质如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔戚血蓝素(钥孔戚血蓝蛋白)和二硝基苯酚。在用于人类的佐剂中,BCG(卡介苗(*Bacille Calmette-Guerin*))和短棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)特别有用。本公开还提供了分离的多肽和佐剂。

[0255] 在某些方面,本公开的抗体是多克隆的,即具有不同氨基酸序列的多种类型的FLT3抗体的混合物。在一个方面,多克隆抗体包含具有不同CDR的多种类型的FLT3抗体的混合物。如此,培养产生不同抗体的细胞的混合物,并且可以使用从所得培养物纯化的抗体(参见WO 2004/061104)。

[0256] 单克隆抗体生产。可以使用提供通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何技术来制备FLT3相关抗原的单克隆抗体。这些技术包括但不限于杂交瘤技术(参见例如,Kohler&Milstein (1975) *Nature* 256:495-497);三源杂交瘤技术;人B细胞杂交瘤技术(参见例如,Kozbor等人, (1983) *Immunol. Today* 4:72)和EBV杂交瘤技术用以产生人单克隆抗体(参见例如,Cole等人, (1985), 在: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96中)。人类单克隆抗体可以用于本技术的实践中并且可以通过使用人类杂交瘤来生产(参见例如,Cote等人, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2026-2030)或者通过用爱泼斯坦巴尔病毒体外转化人B细胞(参见例如,Cole等人, (1985), 在: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96中)。例如,可以分离编码抗体区域的核酸群体。使用来源于编码抗体保守区的序列的引物的PCR来扩增编码来自群体的抗体部分的序列,然后从扩增的序列重建编码抗体或其片段(例如可变结构域)的DNA。这样的扩增序列还可以与编码其他蛋白质(例如,噬菌体外壳或细菌细胞表面蛋白)的DNA融合,用于融合多肽在噬菌体或细菌上的表达和展示。然后,可以表达并进一步选择或分离扩增的序列,例如基于表达的抗体或其片段对存在于FLT3相关抗原多肽上的抗原或表位的亲和力。可替换地,表达FLT3单克隆抗体的杂交瘤可以通过例如,用包含FLT3相关抗原的氨基酸序列或其片段(或可替换地基本上由其组成或还进一步由其组成)的分离的多肽免疫受试者进行制备,以及然后使用常规方法从受试者的脾中分离杂交瘤。参见例如,Milstein等人, (Galfre and Milstein (1981) *Methods Enzymol* 73:3-46)。使用标准方法筛选杂交瘤将产生不同特异性(即,针对不同表位)和亲和力的单克隆抗体。具有期望特性(例如,FLT3



相关抗原结合)的选定单克隆抗体可以(i)如由杂交瘤表达的那样使用,(ii)结合诸如聚乙二醇(PEG)的分子以改变其性质,或(iii)可以各种方式分离、测序和操作编码单克隆抗体的cDNA。在一个方面,FLT3单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括从转基因非人动物如转基因小鼠获得的B细胞,具有包含与永生化细胞融合的人重链转基因和轻链转基因的基因组。杂交瘤技术包括本领域已知和在Greenfield(2014)Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.;Hammerling等人,(1981)Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas:563-681中教导的那些。

[0257] 噬菌体展示技术。如上所述,本公开的抗体可以通过应用重组DNA和噬菌体展示技术来产生。例如,FLT3抗体可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来制备。在噬菌体展示方法中,将功能抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。通过利用抗原(通常是结合或捕获到固体表面或珠上的抗原)直接选择,从储库(repertoire)或组合抗体文库(例如,人或鼠)中选择具有期望结合性质的噬菌体。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13,其中Fab、F<sub>v</sub>或二硫键稳定的F<sub>v</sub>抗体结构域重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白。此外,方法可以适用于Fab表达文库的构建(参见例如Huse等人,(1989)Science 246:1275-1281)以允许快速和有效鉴定对FLT3多肽(例如,多肽或其衍生物、片段、类似物或同系物)具有期望的特异性的单克隆Fab片段。可用于制备本公开的分离的抗体的噬菌体展示方法的其他实例包括在Huston等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:5879-5883;Chaudhary等人,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,87:1066-1070;Brinkman等人,(1995)J.Immunol.Methods 182:41-50;Ames等人,(1995)J.Immunol.Methods 184:177-186;Kettleborough等人,(1994)Eur.J.Immunol.24:952-958;Persic等人,(1997)Gene 187:9-18;Burton等人,(1994)Advances in Immunology 57:191-280;PCT/GB91/01134;WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;WO 96/06213;WO 92/01047(Medical Research Council等人);WO 97/08320(Morphosys);WO 92/01047(CAT/MRC);WO 91/17271(Affymax);和美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727和5,733,743中公开的那些。

[0258] Lohning在美国专利号6,753,136中描述了用于通过二硫键附接多肽在噬菌体颗粒表面上展示多肽的方法。如上述参考文献中所述,在噬菌体选择后,可分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生全抗体(包括人抗体),或任何其他期望的抗原结合片段,并在任何期望宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中表达。例如,也可以使用本领域已知的方法使用重组产生Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段的技术,例如在W092/22324;Mullinax等人,(1992)BioTechniques 12:864-869;Sawai等人,(1995)AJRI 34:26-34;和Better等人,(1988)Science 240:1041-1043中公开的那些。

[0259] 通常,可以针对合适的抗原选择克隆到展示载体中的杂交抗体或杂交抗体片段,以鉴定保持良好结合活性的变体,因为抗体或抗体片段将存在于噬菌体或噬菌粒颗粒的表面上。参见例如,Barbas III等人,(2001)Phage Display,A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.)。然而,其他载体形式可以用于该过程,例如将抗体片段文库克隆到裂解噬菌体载体(改良的T7或λZap系统)中用于选

择和/或筛选。

[0260] 抗体生产的替代方法。抗体也可以通过在淋巴细胞群体中诱导体内生产或通过筛选重组免疫球蛋白文库或高度特异性结合试剂组而产生 (Orlandi 等人, (1989) PNAS 86: 3833-3837; Winter, G. 等人, (1991) Nature 349: 293-299)。

[0261] 可替换地, 可以使用产生单链抗体的技术。单链抗体 (scFvs) 包含与接头肽 (通常为长度为约 5 至 25 个氨基酸) 连接的重链可变区和轻链可变区。在 scFv 中, 重链和轻链的可变区可以来源于相同的抗体或不同的抗体。可以使用重组技术合成 scFv, 例如通过在宿主生物如大肠杆菌 (*E. coli*.) 中表达编码 scFv 的载体。编码 scFv 的 DNA 可通过以下步骤获得: 使用部分 DNA (其编码选自以下的 DNA 的全部或期望的氨基酸序列: 编码上述抗体的重链或重链可变区的 DNA 和编码其轻链或轻链可变区的 DNA) 作为模板, 使用限定其两端的引物对通过 PCR 进行扩增, 并组合编码多肽接头部分的 DNA 和限定其两端的引物对进一步进行扩增, 以分别将接头的两个末端连接至重链和轻链。含有编码 scFv 的 DNA 的表达载体和由表达载体转化的宿主可根据本领域已知的常规方法获得。

[0262] 还可以产生抗原结合片段, 例如可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 F(ab')<sub>2</sub> 片段和可以通过还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键产生的 Fab 片段。可替换地, 可以构建 Fab 表达文库以允许快速且容易地鉴定具有期望的特异性的单克隆 Fab 片段 (Huse 等人, Science, 256: 1275-1281 (1989))。

[0263] 可商购抗体也可以从可商购来源购买抗体。可商购的 FLT3 抗体的实例包括但不限于由供应商生产的那些, 例如 Proteintech Group Inc., eBioscience, Abgent, Aviva Systems Biology, Becton Dickinson (Biosciences), Cell Signaling Technology, Fitzgerald Industries International, United States Biological, Biorbyt, Abbexa, Abgent, LifeSpan BioSciences, antibodies-online, Rockland Immunochemicals, Inc., OriGene Technologies, GeneTex, Raybiotech, Inc., Acris Antibodies GmbH, Sino Biological, MyBioSource.com, Bioss Inc., St. John's Laboratory, Source BioScience, Abcam, ProSci, Inc., Clinic Sciences, Novus Biologicals, Creative Diagnostics, Thermo Scientific Pierce Antibodies, PeproTech, MBL International, Miltenyi Biotec, GenWay Biotech, Inc., LifeSpan Biosciences, Bioworld Technology, EXBIO Praha, a.s., Novus Biologicals, BioVision, Bethyl Laboratories, Santa Cruz Biotechnology Inc., AbD Serotec, BioRad, BioLegend, Thermo Fisher Scientific, EMD Milipore, R&D Systems, Cell Sciences, Progen Biotechnik GmbH, Spring Bioscience, Atlas Antibodies, Abbiotec, Bostrebio, Nordic BioSite 和其他广泛知晓的抗体制造商。可商购 FLT3 抗体的非限制性实例包括来自 BV10 和 4G8 克隆及其生物学等效物或修饰变体的那些, 包括但不限于以下供应商和目录号列出的可商购的抗体: antibodies-online ABIN487499、antibodies-online ABIN487500、LifeSpan Biosciences LS-C179623-100、LifeSpan Biosciences LS-C179624-50、Acris Antibodies AM20042AF-N、Acris Antibodies AM20042FC-N、MBL International K0107-3、MBL International K0107-4、Novus Biologicals NBP1-54522-0.05mg、Novus Biologicals NBP1-54414、Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-21788、Becton Dickinson Biosciences 564708、Becton Dickinson Biosciences 563494。其他示例性的可商购抗体包括在可商购抗体的

Biocompare或其他数据库上列出为对人FLT3有反应性的所有抗体;非限制性实例包括本文公开的那些,由供应商和目录号列出:Proteintech Group Inc.21049-1-AP、Proteintech Group Inc.15827-1-AP、Proteintech Group Inc.15826-1-AP、eBioscience17-1357-41、eBioscience 12-1357-41、eBioscience 14-1357-80、eBioscience17-1357-42、eBioscience 12-1357-42、eBioscience 14-1357-82、Abgent AP7644a、Abgent AP3068a、Aviva Systems Biology OAAB17159、Aviva Systems Biology OAAF00442、Aviva Systems Biology ARP30009\_T100、Aviva Systems Biology ARP30010\_P050、Cell Signaling Technology 3462S、Cell Signaling Technology 3464S、Cell Signaling Technology 3474S、Cell Signaling Technology 3466S、Cell Signaling Technology 3461S、Cell Signaling Technology 3461L、Cell Signaling Technology 3463S、Cell Signaling Technology 4577S、Fitzgerald Industries International 20R-2351、Fitzgerald Industries International 70R-12259、Fitzgerald Industries International 70R-17325。

[0264] 抗体等效物。本公开提供了上述公开的抗体的“等效物”或“生物等效物”,其中与任何上述公开的抗体的抗原结合结构域至少80%,或者可替换地85%,或者可替换地90%,或者可替换地95%,或者可替换地至少97%相同的抗体的抗原结合结构域,使其成为上述公开的抗体的生物等效物。等效物的额外实例包括由多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在高严格性条件下与编码任何一种上述公开的抗体的抗原结合结构域的多核苷酸的补体杂交,其中高严格性条件包括约55℃至约68℃的培育温度;约 $1\times\text{SSC}$ 至约 $0.1\times\text{SSC}$ 的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约 $1\times\text{SSC}$ , $0.1\times\text{SSC}$ 的洗涤溶液或去离子水。

[0265] 抗体修饰。本公开的抗体可以多聚化以增加对抗原的亲合力。待多聚化的抗体可以是识别同一抗原的多个表位的一种类型的抗体或多种抗体。作为抗体的多聚化方法,可例举IgG CH3结构域与两个scFv分子结合、与链霉亲和素结合、引入螺旋-转角-螺旋基序(helix-turn-helix)等。

[0266] 本文公开的抗体组合物可以是在任何这些抗体与另一种试剂(免疫结合物)之间形成的结合物的形式。一方面,本文公开的抗体与放射性物质结合。在另一方面,本文公开的抗体可以与各种类型的分子如聚乙二醇(PEG)结合。

[0267] 抗体筛选。各种免疫测定可用于筛选以鉴定具有期望特异性的抗体。使用具有确定特异性的多克隆或单克隆抗体的竞争性结合或免疫放射测定的许多方案是本领域中熟知的。这种免疫测定通常涉及测量FLT3相关抗原或其任何片段或寡肽与其特异性抗体之间的复合物形成。可以使用双位点的基于单克隆的免疫测定法,其利用对两种非干扰性FLT3相关抗原表位特异性的单克隆抗体,但也可以使用竞争性结合测定法(Maddox等人,(1983) J.Exp.Med.158:1211-1216)。

[0268] 抗体纯化。可将本文公开的抗体纯化至均一。抗体的分离和纯化可以通过使用常规的蛋白质分离和纯化方法进行。

[0269] 仅作为实例,可以通过适当选择和组合使用色谱柱、过滤器、超滤、盐沉淀、透析、制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳等来分离和纯化抗体。蛋白质纯化和表征策略: A Laboratory Course Manual, Daniel R.Marshak等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David

Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

[0270] 色谱法的实例包括亲和色谱法、离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法和吸附色谱法。在一个方面,色谱法可以通过采用液相色谱法如HPLC或FPLC进行。

[0271] 在一方面,蛋白质A柱或蛋白质G柱可用于亲和色谱法。其他示例性柱包括蛋白质A柱,Hyper D,POROS,Sepharose F.F. (Pharmacia) 等。

[0272] III. 分离的核酸和制备CAR的方法

[0273] 本公开的方面涉及包含FLT3CAR的分离细胞和生产这种细胞的方法。细胞是原核或真核细胞。在一个方面,细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。真核细胞可以来自任何优选的物种,例如动物细胞、哺乳动物细胞如人、猫或犬细胞。

[0274] 在具体的实施方案中,分离的细胞包含外源CAR,或者可替换地基本上由其组成,或还进一步由其组成,该外源CAR包含:FLT3抗体的抗原结合结构域;铰链结构域;跨膜结构域-例如CD28跨膜结构域;一个或多个共刺激区-例如,选自CD28共刺激信号传导区、4-1BB共刺激信号传导区、ICOS共刺激信号传导区和OX40共刺激区;以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。在某些实施方案中,分离的细胞是T细胞,例如动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞。在某些实施方案中,分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞。

[0275] 在某些实施方案中,公开了产生FLT3CAR表达细胞的方法,所述方法包括用编码FLT3CAR的核酸序列转导分离细胞群体,或可替换地基本上由其组成或还进一步由其组成。在一些实施方案中,这通过使用编码FLT3CAR构建体的载体来实现。在一些实施方案中,这通过使用编码FLT3CAR构建体的mRNA来实现,其反过来可以通过电穿孔被引入到细胞中。参见例如,Choi等人,(2010) Biomed Microdevices 12(5):855-863。在另一方面,选择已用所述核酸序列成功转导的细胞亚群。在一些实施方案中,分离的细胞是T细胞、动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞,从而产生FLT3CAR T细胞。在某些实施方案中,分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞,从而产生FLT3CAR NK细胞。在一些实施方案中,分离的细胞是B细胞、动物B细胞、哺乳动物B细胞、猫B细胞、犬B细胞或人B细胞,从而产生FLT3CAR B细胞。

[0276] 在一些实施方案中,可以对表达所公开的CAR的T细胞进行进一步修饰以减少或消除内源性TCR的表达。内源性TCR的减少或消除可减少脱靶效应并增加T细胞的有效性。可以使用多种方法产生稳定缺乏功能性TCR表达的T细胞。T细胞作为复合物内化、分选和降解整个T细胞受体,在休眠T细胞(静止T细胞)中的半衰期为约10小时,而在刺激的T细胞中的半衰期为3小时(von Essen, M. 等人, (2004) J. Immunol. 173:384-393)。TCR复合物的适当功能需要构成TCR复合物的蛋白质的适当化学计量比。TCR功能还需要两个带有ITAM基序的功能TCR $\zeta$ 蛋白。在与其MHC-肽配体接合时TCR的激活需要在同一T细胞上接合几种TCR,其都必须适当地传导信号。因此,如果TCR复合物被不适当结合或不能最佳传导信号的蛋白质去稳定化,则T细胞不会充分激活以开始细胞应答。

[0277] 因此,在一些实施方案中,可使用RNA干扰(例如,shRNA、siRNA、miRNA等)、CRISPR或靶向编码特定TCR(例如,TCR- $\alpha$ 和TCR- $\beta$ )的核酸和/或原代T细胞中的CD3链的其他方法消除TCR表达。通过阻断这些蛋白质中的一种或多种的表达,T细胞将不再产生TCR复合物的一

种或多种关键组分,从而使TCR复合物去稳定化并防止功能性TCR的细胞表面表达。尽管当使用RNA干扰时,一些TCR复合物可被再循环到细胞表面,但RNA(例如,shRNA、siRNA、miRNA等)将阻止TCR蛋白的新生产,导致整个TCR复合物的降解和去除,导致具有功能性TCR表达的稳定缺陷的T细胞的产生。

[0278] 使用任何常规表达系统,例如慢病毒表达系统,可以实现抑制性RNA(例如,shRNA、siRNA、miRNA等)在原代T细胞中的表达。尽管慢病毒可用于靶向休眠的原代T细胞,但并非所有的T细胞都会表达shRNA。这些T细胞中的一些可能不表达足够量的RNA以允许足够抑制TCR表达来改变T细胞的功能活性。因此,可以例如通过细胞分选或分离技术去除在病毒转导后保留中等至高的TCR表达的T细胞,使得剩余的T细胞缺乏细胞表面TCR或CD3,能实现缺乏功能性TCR或CD3表达的分离的T细胞群体的扩增。

[0279] 分离细胞的来源。在本文公开的细胞的扩增和遗传修饰之前,细胞可以获自受试者-例如在涉及自体疗法的实施方案中-或商购培养物。

[0280] 细胞可从受试者中的许多来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液(胸膜积液,pleural effusion)、脾组织和肿瘤。

[0281] 分离相关细胞的方法是本领域中熟知的,并且可以容易地适用于本申请;示例性方法在下面的实施例中描述。与本公开相关使用的分离方法包括但不限于Life Technologies **Dynabeads®** system;STEMcell Technologies EasySep™、RoboSep™、RosetteSep™、SepMate™;Miltenyi Biotec MACS™细胞分离试剂盒和其他可商购的细胞分离和隔离试剂盒。可以通过使用在这种试剂盒中可利用的特异于独特细胞表面标记的珠(珠粒)或其他结合剂来分离免疫细胞的特定亚群。例如,MACS™CD4+和CD8+微珠(MicroBead)可用于分离CD4+和CD8+T细胞。

[0282] 可替换地,细胞可以通过可商购细胞培养物获得,包括但不限于,对于T细胞,系BCL2(AAA) Jurkat **ATCC®** CRL-2902™)、BCL2(S70A) Jurkat (**ATCC®** CRL-2900™)、BCL2(S87A) Jurkat (**ATCC®** CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (**ATCC®** CRL-2899™)、Neo Jurkat (**ATCC®** CRL-2898™);对于B细胞,系AHH-1 (**ATCC®** CRL-8146™)、BC-1 (**ATCC®** CRL-2230™)、BC-2 (**ATCC®** CRL-2231™)、BC-3 (**ATCC®** CRL-2277™)、CA46 (**ATCC®** CRL-1648™)、DG-75[D.G.-75] (**ATCC®** CRL-2625™)、DS-1 (**ATCC®** CRL-11102™)、EB-3[EB3] (**ATCC®** CCL-85™)、Z-138(ATCC#CRL-3001)、DB(ATCC CRL-2289)、Toledo(ATCC CRL-2631)、Pfiffer(ATCC CRL-2632)、SR(ATCC CRL-2262)、JM-1(ATCC CRL-10421)、NFS-5C-1(ATCC CRL-1693)、NFS-70 C10(ATCC CRL-1694)、NFS-25C-3(ATCC CRL-1695)和SUP-B15(ATCC CRL-1929);并且对于NK细胞,系NK-92 (**ATCC®** CRL-2407™)、NK-92MI (**ATCC®** CRL-2408™)。其他实例包括但不限于成熟T细胞系,例如,Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1和T34;不成熟的T-细胞系,例如ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1至T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、

TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3和-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119);皮肤T-细胞淋巴瘤系,例如HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162);衍生自间变性大细胞淋巴瘤的B细胞系,例如DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas 299、Ki-JK、Mac-2A Ply1、SR-786、SU-DHL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10和-16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL;霍奇金淋巴瘤,例如DEV、HD-70、HDLM-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L428、L540、L1236、SBH-1、SUP-HD1和SU/RH-HD-1;和NK系如HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90和YT。包括但不限于REH、NALL-1、KM-3、L92-221的裸白血细胞系 (null leukemia cell lines) 是免疫细胞的另一种商业上可获得的来源,如衍生自其他白血病和淋巴瘤的细胞系,例如K562红白血病、THP-1单核细胞白血病、U937淋巴瘤、HEL红白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髓瘤。这种可商购细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心或 ATCC (<http://www.atcc.org/>) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (<https://www.dsmz.de/>)。

[0283] 载体。可以使用载体来制备CAR细胞。本公开的方面涉及编码FLT3CAR或其补体或等效物的分离的核酸序列。

[0284] 在一些实施方案中,分离的核酸序列编码CAR,该CAR包含FLT3抗体的抗原结合结构域、铰链结构域、CD28跨膜结构域、一个或多个共刺激区,或可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成,所述共刺激区选自CD28共刺激信号传导区、4-1BB共刺激信号传导区、ICOS共刺激信号传导区和OX40共刺激区以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在具体的实施方案中,分离的核酸序列包含编码(a) FLT3抗体的抗原结合结构域,随后是(b) 铰链结构域;(c) CD28跨膜结构域,随后是(d) 选自CD28共刺激信号传导区域、4-1BB共刺激信号传导区域、ICOS共刺激信号传导区域和OX40共刺激区域的一个或多个共刺激区域,随后是(e) CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的序列,或可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0285] 在某些实施方案中,分离的核酸序列进一步包含位于编码FLT3抗体的FLT3抗原结合结构域的抗原结合结构域的多核苷酸上游的多核苷酸启动子序列,或基本上进一步由其组成,或还进一步由其组成。在一些实施方案中,该启动子是巨细胞病毒(CMV) 启动子序列、骨髓增殖性肉瘤病毒增强子(MND) 启动子或EF1 $\alpha$ 启动子。本文提供了所述启动子的非限制性示例性序列:

[0286] CMV启动子序列,SEQ.ID NO:36:

[0287] TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA  
AATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC  
AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATC  
ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA  
TGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTGGCAGTACAT  
CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT  
GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA  
CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTAGTGAACCGTCAG

[0288] CMV启动子序列,SEQ.ID NO:37:

[0289] GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC

[0290] MND启动子序列,SEQ.ID NO:38:

[0291] AACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAGGATC

[0292] EF1 $\alpha$ 启动子序列,SEQ.ID NO:39:

[0293] AAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCCTCCTGAAGTGCCTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTAC

[0294] 在某些实施方案中,分离的核酸序列进一步包含编码多核苷酸序列的诱导型半胱天冬酶(“iCasp”)或其他“自杀基因”,或基本上进一步由其组成,或还进一步由其组成,所述多核苷酸序列位于编码FLT3抗体的FLT3抗原结合结构域的抗原结合结构域的多核苷酸上游;本文提供了所述iCasp基因的非限制性示例性多核苷酸序列:

[0295] iCasp序列,SEQ.ID NO:40:

[0296]

ATGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACC  
TTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGC  
TTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGC  
CCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGA  
AGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGAC  
TATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATC  
ATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAC  
TCTGGCGGTGGATCCGGA

**GTCGAC**GGATTTGGTGTGTCG  
GTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCT  
GAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAAC  
TTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCG  
ACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTG  
GAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGC  
TGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGT  
GGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAG  
GGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGAT  
TGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAG  
CCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACC  
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGG  
CAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGG  
ACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTG  
ACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGG  
ACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTT  
TGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGG  
GTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATA

[0297] 在一些实施方案中，iCasp基因构建体包含可操作地连接至FKBP蛋白结构域的半胱天冬酶9的部分。在上述非限制性示例性序列中，这些元件被清楚地标出-粗体是FKBP蛋白结构域和半胱天冬酶9蛋白结构域之间的接头；**带框**是添加的限制性位点。由CASP9基因编码的半胱天冬酶9 (GenBank登录号NM001229) 是起始子半胱天冬酶的非限制性实例并且在线粒体凋亡途径中起作用；其一部分存在于上文公开的非限制性示例性序列中。上述公开的非限制性示例性序列中的FKBP蛋白质结构域被优化以结合诱导剂，特别是二聚化的化学诱导剂 (CID)。在上面公开的序列中，化学诱导剂是AP1903，它是一种在健康志愿者中已被证明安全的合成药物。设想可以使用FKBP结构域和二聚化的化学诱导物 (例如，AP1903或FKBP的修饰形式) 二者的等效物来代替列出的示例性实施方案。在一些方面，二聚化可以被已知促进半胱天冬酶9的二聚化的任何小分子诱导。该小分子的施用导致半胱天冬酶9的交联和激活，其反过来诱导表达iCasp基因的细胞的细胞凋亡。

[0298] 在某些实施方案中，分离的核酸序列进一步包含编码2A肽 (T2A) 的多核苷酸序列，或基本上进一步由其组成，或还进一步由其组成，所述多核苷酸序列位于编码FLT3抗体的FLT3抗原结合结构域的多核苷酸上游；本文提供了编码所述T2A多核苷酸的非限制性示例性序列：



[0299] T2A序列,SEQ.ID NO:41:

[0300] GCCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT

[0301] 在涉及T2A的实施方案中,T2A介导的“自切割”可以产生1:1比例的两种分离蛋白质。

[0302] 在某些实施方案中,分离的核酸序列进一步包含编码信号肽的多核苷酸序列,或基本上进一步由其组成,或还进一步由其组成,所述多核苷酸序列位于编码FLT3抗体的FLT3抗原结合结构域的抗原结合结构域的多核苷酸上游;在本文中提供编码所述信号肽的非限制性示例性多核苷酸序列:

[0303] 信号肽序列,SEQ ID NO:42:

[0304] ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC。

[0305] 信号肽序列,SEQ ID NO:43:

[0306] MGWSCIIILFLVATATGVHS

[0307] 信号肽序列,SEQ ID NO:44:

[0308] MDWIWRILFLVGAATGAHS

[0309] 在一些实施方案中,分离的核酸包含赋予抗生素抗性的可检测标记和/或多核苷酸。在一个方面,标记或多核苷酸可用于选择用分离的核酸成功转导的细胞。在某些实施方案中,该可检测标记是来源于称为“myc标签”的c-myc基因的蛋白质标签。下文公开了编码所述myc标签的非限制性示例性序列:

[0310] “myc”序列,SEQ.ID NO:45:

[0311] GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG

[0312] 在一些实施方案中,分离的核酸序列包含在载体内。在某些实施方案中,载体是质粒。在其他实施方案中,载体是病毒载体。这样的非限制性实例包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。在具体的实施方案中,载体是慢病毒载体。

[0313] 示例性载体的制备和使用所述载体产生CAR表达细胞在下面的实施例中详细讨论。总的来说,编码CAR或免疫调节分子的天然或合成核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸与启动子可操作地连接,并将该构建体并入表达载体中来实现。可以使用类似的方法构建包含编码免疫调节分子的多核苷酸的分离的核酸序列。载体可适用于复制和整合真核细胞。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域中公知的。参见例如,Sambrook等人,(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。

[0314] 在一个方面,术语“载体”意指保留感染和转导非分裂和/或缓慢分裂细胞并整合到靶细胞基因组中的能力的重组载体。在几个方面,载体来源于或基于野生型病毒。在另外的方面,载体来源于或基于野生型慢病毒。这样的实例包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)。可替换地,预期可以使用其他逆转录病毒作为载体主链的基础,如鼠白血病病毒(MLV)。显而易见的是,根据本公开的病毒载体不必限于特定病毒的组分。病毒载体可以包含源自两种或更多种不同病毒的组分,并且还可以包含合成组分。可以操纵载体组分以获得期望的特征,例如靶细胞特异性。

[0315] 本公开的重组载体源自灵长类和非灵长类。灵长类慢病毒的实例包括人类免疫缺

陷病毒(HIV)、人类获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒组包括原型“慢病毒(slow virus)”维斯纳病毒/梅迪病毒(VMV)以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和最近描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒(BIV)。现有技术的重组慢病毒载体是本领域已知的,例如参见通过引用并入本文的美国专利号6,924,123;7,056,699;7,419,829和7,442,551。

[0316] 美国专利号6,924,123公开了某些逆转录病毒序列有助于整合到靶细胞基因组中。该专利教导每个逆转录病毒基因组包含称为gag、pol和env的基因,其编码病毒粒子蛋白和酶。这些基因在两端由称为长末端重复序列(LTR)的区域侧接。LTR负责前病毒整合和转录。它们也用作增强子-启动子序列。换句话说,LTR可以控制病毒基因的表达。通过位于病毒基因组5'端的psi序列发生逆转录病毒RNA的壳体化(包装,encapsidation)。LTR本身是相同的序列,其可被分成称为U3、R和U5的三种元件。U3来源于RNA的3'末端特有的序列。R来源于在RNA两端重复的序列,并且U5来源于RNA的5'末端特有的序列。三种元件的大小在不同的逆转录病毒中可能有很大差异。对于病毒基因组,并且聚(A)加成(终止)的位点在右侧LTR中R和U5之间的边界处。U3含有大部分前病毒的转录控制元件,其包括启动子和对细胞(在一些情况下,病毒)转录激活蛋白有响应的多种增强子序列。

[0317] 关于结构基因gag、pol和env本身,gag编码病毒的内部结构蛋白。Gag蛋白被蛋白水解加工为成熟蛋白MA(基质)、CA(衣壳)和NC(核衣壳)。Pol基因编码逆转录酶(RT),其包含DNA聚合酶、相关RNA酶H和整合酶(IN),其介导基因组的复制。

[0318] 为了生产病毒载体颗粒,载体RNA基因组在宿主细胞中由编码它的DNA构建体表达。未由载体基因组编码的颗粒组分通过在宿主细胞中表达的额外核酸序列(“包装系统”,其通常包括gag/pol和env基因之一或两者)以反式形式提供。可以通过瞬时转染将产生病毒载体颗粒所需的一组序列引入到宿主细胞中,或者可将它们整合到宿主细胞基因组中,或者可以混合方式提供它们。所涉及的技术是本领域技术人员已知的。

[0319] 用于本公开的逆转录病毒载体包括但不限于Invitrogen的pLenti系列版本4、6和6.2“ViraPower”系统,由Lentigen Corp.制造;pHIV-7-GFP,由City of Hope Research Institute实验室生成并使用;“Lenti-X”慢病毒载体pLVX,由Clontech制造;pLK0.1-puro,由Sigma-Aldrich制造;pLemiR,由Open Biosystems制造;以及pLV,由CharitéMedical School, Institute of Virology (CBF), Berlin, Germany实验室生成并使用。

[0320] 不管用于将外源核酸引入到宿主细胞中或以其他方式将细胞暴露于本公开的抑制剂的方法如何,为了确认重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可以进行各种测定。这样的测定包括例如,本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定法,例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定法,例如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)或通过本文描述的测定来鉴定落入本公开范围内的试剂。

[0321] 包装载体和细胞系。可以通过使用包装载体和细胞系将分离的核酸包装到逆转录病毒包装系统中。包装载体包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。包装载体含有促进遗传物质递送到细胞中的元件和序列。例如,逆转录病毒构建体是包装载体,其包含至少一个衍生自复制缺陷型逆转录病毒基因组的逆转录病毒辅助DNA序列,所述逆转录病毒基因组反式编码包装复制缺陷型逆转录病毒载体所需的所有病毒粒子蛋白,并且用于产生能够以高效价包装复制缺陷型逆转录病毒载体的病毒粒子蛋

白,而不产生复制缺陷型辅助病毒。逆转录病毒DNA序列缺少编码病毒病毒5'LTR的天然增强子和/或启动子的区域,缺乏负责包装辅助基因组的psi功能序列和3'LTR,但编码外源多聚腺苷酸化位点(例如SV40多聚腺苷酸化位点)以及外源增强子和/或启动子(其指导在其中期望病毒产生的细胞类型中的高效转录)。逆转录病毒是白血病毒,如莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)或长臂猿白血病毒(GALV)。外源增强子和启动子可以是人巨细胞病毒(HCMV)即刻早期(IE)增强子和启动子、莫洛尼氏鼠肉瘤病毒(MMSV)的增强子和启动子(U3区)、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)的U3区、脾病灶形成病毒(SFFV)的U3区或与天然莫洛尼氏鼠白血病毒(MMLV)启动子连接的HCMV IE增强子。逆转录病毒包装载体可以由两种由基于质粒的表达载体编码的逆转录病毒辅助DNA序列组成,例如其中第一辅助序列含有编码亲嗜性MMLV或GALV的gag和pol蛋白的cDNA,且第二辅助序列含有编码env蛋白的cDNA。确定宿主范围的Env基因可以源自编码异嗜性、双嗜性、亲嗜性、多变(貂病灶形成)或10A1鼠白血病毒env蛋白或长臂猿白血病毒(GALV env蛋白、人免疫缺陷病毒env(gp160)蛋白、水疱性口炎病毒(VSV)G蛋白、人类T细胞白血病毒(HTLV)I型和II型env基因产物)的基因,来源于一种或多种前述env基因的組合的嵌合囊膜基因(chimeric envelope gene)或编码前述env基因产物的胞质和跨膜和针对期望靶细胞上的特异性表面分子的单克隆抗体的嵌合囊膜基因。

[0322] 在包装过程中,将包装载体和逆转录病毒载体瞬时共转染至能够产生病毒的第一哺乳动物细胞群体,例如人胚肾细胞,例如293细胞(ATCC No.CRL1573,ATCC,Rockville,Md.)以产生含高效价的重组逆转录病毒的上清液。在本公开的另一方法中,随后将该瞬时转染的第一细胞群与哺乳动物靶细胞如人淋巴细胞共培养以高效率地用外源基因转导靶细胞。在本发明的又一种方法中,将来自上述瞬时转染的第一细胞群的上清液与哺乳动物靶细胞如人淋巴细胞或造血干细胞一起培育以用外源基因高效转导靶细胞。

[0323] 另一方面,包装载体在能够产生病毒的第一哺乳动物细胞群如人胚肾细胞,例如293细胞中稳定表达。逆转录病毒或慢病毒载体通过与选择标记共转染或用假型病毒感染引入到细胞中。在这两种情况下,载体整合。可替换地,可将载体引入到游离维持质粒(episomally maintained plasmid)中。产生含有高效价重组逆转录病毒的上清液。

[0324] CAR细胞的激活和扩增。无论在细胞基因修饰以表达期望的CAR之前还是之后,均可以使用通常已知的方法激活和扩增细胞,例如在美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041和参考文献如Lapateva等人,(2014)Crit Rev Oncog19(1-2):121-132;Tam等人,(2003)Cytotherapy 5(3):259-272;Garcia-Marquez等人,(2014)Cytotherapy 16(11):1537-1544中描述的那些。用FLT3相关抗原离体刺激可以激活和扩增选定的CAR表达细胞亚群。可替换地,可通过与FLT3相关抗原相互作用而在体内激活细胞。

[0325] 在某些免疫细胞的情况下,可能需要额外的细胞群、可溶性配体和/或细胞因子或刺激剂来激活和扩增细胞。相关试剂是本领域中公知的,并根据已知的免疫原理进行选择。例如,可溶性CD-40配体可能有助于激活和扩增某些B细胞群;类似地,照射的饲养细胞可以用于NK细胞的激活和扩增的程序。

[0326] 激活相关细胞的方法是本领域中熟知的,并且可以容易地适用于本申请;示例性

方法在下面的实施例中描述。与本公开相关使用的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads®系统激活和扩增试剂盒;BD Biosciences Phosflow™激活试剂盒,Miltenyi Biotec MACS™激活/扩增试剂盒以及对于相关细胞的激活部分特异性的其他可商购细胞试剂盒。可以通过使用这些试剂盒中可用的珠或其他试剂来激活或扩增特定的免疫细胞亚群。例如,可使用 $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Dynabeads®以激活和扩增分离的T细胞群。

#### [0327] IV. 使用方法

[0328] 治疗应用。本公开的方法方面涉及用于抑制有需要的受试者中的肿瘤/癌症和/或用于治疗有需要的癌症患者的方法。在一些实施方案中,癌症是影响血液和/或骨髓的癌症;在一些实施方案中,癌症是急性髓系白血病。在一些实施方案中,肿瘤/癌细胞表达或过度表达FLT3。在某些实施方案中,这些方法包括给予受试者或患者有效量的分离的细胞,或者可替换地基本上由其组成或者还进一步由其组成。在另外的实施方案中,该分离的细胞包含FLT3CAR。在另外的实施方案中,分离的细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,分离的细胞对于正在治疗的受试者或患者是自体的。在另一方面,肿瘤/癌症表达FLT3,并且已经通过诊断(例如本文所述的一种)选择受试者用于治疗。受试者是动物、哺乳动物、犬科动物、猫科动物、牛、马、鼠科动物或人类患者。

[0329] 本文公开的FLT3CAR细胞可以单独或与稀释剂、已知的抗癌治疗剂和/或与其他组分例如细胞因子或其他免疫调节性的细胞群体组合施用。它们可以作为一线治疗、二线治疗、三线治疗或进一步治疗来施用。其他疗法的非限制性实例包括细胞减灭疗法,例如放射疗法、冷冻疗法或化学疗法,或生物制剂,例如造血干细胞移植。在一些实施方案中,可以在这些非限制性示例性疗法中的任何一种之前或之后,例如在造血干细胞移植之前或放疗或化疗之后,施用FLT3CAR细胞。另外的非限制性实例包括其他相关细胞类型,例如未修饰的免疫细胞、包含表达一种或多种免疫调节分子的载体的修饰的免疫细胞、或对与本文公开的那些不同的抗原特异的CAR细胞。如同本公开的CAR细胞一样,在一些实施方案中,这些细胞可以是自体的或异体的(同种异体的,allogenic)。适当的治疗方案将由治疗医师或兽医确定。

[0330] 本公开的药物组合物可以适合于待治疗或预防的疾病的方式施用。尽管通过临床试验可以确定合适的剂量,但施用的量和频率将由诸如患者的状况、患者疾病的类型和严重程度等因素决定。在一个方面,它们通过直接注射或全身性给药如静脉内注射或输注施用。

[0331] CAR表达细胞的总剂量可以根据例如以上公开的因素而变化。在一些实施方案中,剂量可为约1至 $10^{10}$ 个细胞,例如至少10,至少 $10^1$ ,至少 $10^2$ ,至少 $10^3$ ,至少 $10^4$ ,至少 $10^5$ ,至少 $10^6$ ,至少 $10^7$ ,至多 $10^8$ ,至多 $10^9$ ,至多 $10^{10}$ , $10^2$ 至 $10^{10}$ , $10^3$ 至 $10^9$ , $10^4$ 至 $10^8$ 。在一些实施方案中,剂量可以进一步受整系数(integer coefficient)限制至数量级,例如,1、2、3、4、5、6、7、8或9,导致根据以下非限制性实例列出的剂量范围: $5 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$ 。

[0332] 自杀基因。在涉及作为编码CAR的分离的核酸序列的一部分的自杀基因的实施方案中,自杀基因可用于在治疗结束时终止CAR表达细胞。在涉及包含自杀基因的CAR表达细胞的方法方面,可以通过在不再需要FLT3特异性CAR细胞应答的点引入诱导剂分子来诱导自杀基因。自杀基因的诱导导致CAR细胞的细胞凋亡。因此考虑使用包含诱导型自杀基因的

CAR构建体可以通过通过诱导的细胞凋亡除去CAR表达细胞来增强CAR细胞应用的安全性。在其中使用诱导剂(例如但不限于小分子)的实施方案中,施用以诱导自杀表达的诱导剂的剂量可以在0.001至10.0mg/kg体重之间的范围,或者可替换地0.01至1.0mg/kg,和介于两者之间的范围。

[0333] 诊断应用。本公开的方面提供了用于确定患者是否可能对FLT3 CAR治疗作出响应或不可能作出响应的示例性方法。在具体的实施方案中,该方法包括使从患者分离的生物样品与有效量的抗FLT3抗体接触并检测与肿瘤样品结合的任何抗体的存在。在另外的实施方案中,与肿瘤样品结合的抗体的存在表明患者可能对FLT3CAR治疗有响应,并且与肿瘤样品结合的抗体的缺乏表明患者不可能对FLT3CAR治疗有响应。在一些实施方案中,该方法涉及使用与肿瘤或癌症相关的诊断标志物或基因表达谱-非限制性示例是使用AML的标志物CD45<sup>dim</sup>SSC<sup>medium</sup>。在一些实施方案中,该方法包括将有效量的FLT3CAR表达细胞施用给被确定可能对FLT3CAR治疗有响应的患者的附加步骤。在一些实施方案中,患者患有和/或被诊断患有表达FLT3的癌症/肿瘤。在一些实施方案中,癌症/肿瘤是AML。

#### [0334] V. 载体

[0335] 本公开的另外方面涉及组合物,其包含载体和一种或多种产物-例如FLT3CAR、包含FLT3CAR的分离细胞、分离的核酸、载体、含有FLT3CAR和免疫调节分子和/或编码这些的核酸的分离细胞-在本文公开的实施方案中描述,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。

[0336] 简略地,本公开的药物组合物包括但不限于本文所述的要求保护的组合物中的任何一种,结合一种或多种药学或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这样的组合物可以包含缓冲液如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本公开的组合物可以配制用于口服、静脉内、局部、肠内和/或肠胃外施用。在某些实施方案中,本公开的组合物被配制用于静脉内施用。

[0337] 细胞或组合物的施用可以在整个治疗过程中连续或间歇地在一个剂量中进行。确定最有效的施用方式和剂量的方法是本领域技术人员已知的,并且将随用于治疗的一组合物、治疗目的和所治疗的受试者而变化。可以由治疗医生选择剂量水平和模式来进行单次或多次施用。本领域已知合适的剂量制剂和施用药剂的方法。在另外的方面,本公开的细胞和组合物可以与其他治疗组合施用。

[0338] 使用本领域已知的方法将细胞和细胞群施用给宿主,并且例如在PCT国际申请号PCT/US2011/064191中描述。可以进行本公开的细胞或组合物的施用以产生用于实验和筛选测定的期望的疾病、病症或病况的动物模型。

#### [0339] VI. 试剂盒

[0340] 如本文所述,本公开提供了用于生产和施用FLT3CAR细胞的方法。在一个具体的方面,本公开提供了用于执行这些方法的试剂盒以及用于实施本公开的方法的说明书,例如收集细胞和/或组织,和/或执行筛选/转导/等,和/或分析结果。

[0341] 在一个方面,试剂盒包含本文公开的分离的核酸和/或包含所述核酸的载体和/或分离的同种异体细胞中的任何一种,优选为T细胞或NK细胞,和/或从患者获得自体细胞的说明书,或者可替换地基本上由它们组成,或还进一步由它们组成。这样的试剂盒还可以包

含适合于FLT3CAR表达细胞(如本文公开的那些)的转导和/或选择和/或激活和/或扩增的介质和其他试剂,或者可替换地基本上由其组成,或还进一步由其组成。

[0342] 在一个方面,试剂盒包含分离的CAR表达细胞或其群体,或者可替换地基本上由其组成,或还进一步由其组成。在一些实施方案中,该试剂盒的细胞在施用于有需要的受试者之前可能需要激活和/或扩增。在另外的实施方案中,试剂盒可以进一步包含介质和试剂(例如,上文公开所包括的那些)以激活和/或扩增分离的CAR表达细胞,或基本上由其组成。在一些实施方案中,细胞将用于FLT3CAR治疗。在另外的实施方案中,试剂盒包括关于向需要FLT3CAR治疗的患者施用分离的细胞的说明书。

[0343] 公开的试剂盒还可以包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒可以进一步包含检测可检测标记所需的组分,例如酶或底物。试剂盒还可以含有对照样品或一系列对照样品,可以对其进行测定并与测试样品比较。可将试剂盒的每个组分都封装在单独的容器内,且所有不同的容器可放在一个包装内,并附有助于解释使用试剂盒实施测定的结果的说明。本公开的试剂盒可以在试剂盒容器之上或之中包含书写产品。书写产品描述如何使用试剂盒中包含的试剂。

[0344] 有义务地,可以本领域技术人员习惯使用的方式包装这些建议的试剂盒组分。例如,可以溶液或液体分散体等形式提供这些建议的试剂盒组分。

[0345] 以下实施例说明了在实施本公开的各种情况下可以使用的程序。

[0346] 实施例1-表达FLT3CAR的T细胞的产生

[0347] 为了产生表达FLT3CAR的T细胞,生产编码FLT3CAR的慢病毒载体。根据图1中的构建体设计每个CAR。使用CD3和CD28抗体扩增来自健康供体的原代T细胞,然后用图1的构建体转导。通过FACS Aria II分离表达CAR的T细胞。

[0348] 实施例2-表达FLT3CAR的T细胞体外靶向急性髓系白血病细胞

[0349] 为了评价FLT3特异性T细胞杀伤原代AML细胞的能力,将配对匹配的CD19-CAR和FLT3CAR表达T细胞和空载体转导的对照与MOLM-13AML细胞在标准4小时<sup>51</sup>Cr释放测定中共培养。与表达CD19-CAR的T细胞和对照相比,FLT3CAR T-细胞系强力细胞溶解测试的MOLM-13细胞;图3;这些结果是显著的, $p<0.01$ 。

[0350] 实施例3-CAR T细胞功效的体内评估

[0351] 将 $1 \times 10^7$ 个AML细胞(取自细胞系,例如MOLM-13AML或AML患者)注射到NOD SCID  $\gamma$  (NSG)小鼠中。使用诊断方法如体内成像监测小鼠的AML细胞生长。一旦在小鼠中建立AML,就将小鼠分成治疗组,并施用FLT3CAR表达细胞的剂量,单次或以多个时间间隔输注 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^8$ 个细胞。监测肿瘤抑制并收集存活数据。

[0352] 发现FLT3CAR表达细胞对AML阳性小鼠具有治疗作用。

[0353] 实施例4-表达FLT3的T细胞的产生

[0354] 材料和方法

[0355] 细胞培养:所有细胞系均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),并已使用DNA图谱(DNA profiling)验证。

[0356] 小鼠:6至8周龄的雄性NOD-scid IL-2R  $\gamma$  裸(NSG)小鼠购自The Jackson Laboratory。经常监测小鼠的白血病。所有的动物工作都得到了俄亥俄州立大学动物护理和使用委员会的批准。

[0357] 生成具有iCasp9-T2A框的FLT3特异性CAR慢病毒构建体:重链(VH)和轻链(VL)的可变区的FLT3编码结构域序列被分别扩增并使用接头通过重叠PCR反应进行重组。将VH-接头-VL片段与CD28-CD3z部分一起框内并入。然后,将整个抗-FLT3-scFv-CD28-CD3z片段连接到命名为pCDH的慢病毒载体中以产生pCDH-FLT3-CAR构建体。然后,将iCasp9-T2A框并入pCDH-FLT3-CAR中以构建完整的iCasp9-T2A-pCDH-FLT3-CAR。

[0358] T淋巴细胞的慢病毒转导:如我们先前报道中所述,从人外周血单核细胞(PBMC)中分离原代T淋巴细胞;从我们先前的报道中修改慢病毒转染和感染方案。Chu等人,(2014) *Leukemia* 28:917-927;Han等人,(2015) *Scientific Reports* 5:11483。

[0359] 流式细胞术分析:为了检测细胞表面上的FLT3-CAR表达,用洗涤缓冲液(PBS中4%牛血清白蛋白)洗涤用FLT3-CAR转导的原代T细胞,并用生物素标记的山羊抗小鼠(Fab)2多克隆抗体或正常多克隆山羊免疫球蛋白G(IgG)(Jackson ImmunoResearch)作为同种型对照染色。然后,在用别藻蓝蛋白(APC)结合的链霉亲和素(Jackson ImmunoResearch)和与V450(BD Biosciences)结合的抗CD3 $\zeta$ 抗体培育细胞后,在BD LSRII流式细胞仪上进一步施用细胞。此外,在用藻红蛋白(PE)结合的小鼠抗FLT3mAb(eBiosciences)染色肿瘤细胞后,还用BD LSRII流式仪分析白血病细胞表面上的FLT3的表达。使用FlowJo软件(Tree Star Inc.)进行分析。

[0360] 免疫印迹:按照我们实验室中修改的方案进行免疫印迹。详细地,首先在laemmli缓冲液中裂解细胞。然后,通过SDS-PAGE凝胶分离裂解物并转移至PVDF膜(Millipore)。用小鼠抗人CD3 $\zeta$ mAb(BD Pharmingen),然后用辣根过氧化物酶结合的山羊抗小鼠IgG抗体探测膜。通过使用增强的化学发光试剂(Thermo scientific Inc.)揭示抗体结合。

[0361] 细胞毒性测定:如前所述进行标准4小时<sup>51</sup>Cr释放测定。Yu等人,*Blood* 115:274-281 (2010)。简略地,用<sup>51</sup>Cr标记靶细胞,并与用FLT3-CAR转导的原代T细胞或T细胞或用模拟载体转导的T细胞以各种效应物/靶比(E/T)在96孔V底板中在37℃下共培养4小时。收获上清液并转移至含有液体闪烁混合物(Fisher Scientific)的闪烁小瓶中,并在TopCount计数器(Canberra Packard)上测量<sup>51</sup>Cr的释放。在完全培养基或1%的SDS中培育的靶细胞用于测定自发性或最大<sup>51</sup>Cr释放。使用标准式计算特异性裂解的百分比: $100 \times (\text{cpm实验释放} - \text{cpm自发释放}) / (\text{cpm最大释放} - \text{cpm自发释放})$ 。

[0362] 细胞因子释放测定:将靶细胞与等量的效应物细胞在96孔V底板中在37℃下共培养24小时。收获无细胞上清液,并使用来自R&D system的相应ELISA试剂盒按照制造商的方案通过ELISA评估IFN- $\gamma$ 和白细胞介素(IL)-2分泌。

[0363] 携带白血病的小鼠的体内治疗和生物发光成像:用表达萤火虫萤光素酶的Pinco-pGL3-luc/GFP病毒逆转录病毒转导MOLM13细胞,并使用上述方法分选GFP阳性细胞,产生MOLM13-GL3细胞。在第0天通过尾静脉向雄性NSG小鼠静脉注射400 $\mu$ L PBS中的 $8 \times 10^6$  MOLM13-GL3细胞以建立异种移植原位白血病模型。在第9天和第16天,通过尾静脉注射给小鼠静脉注射400 $\mu$ L PBS中的 $1.0 \times 10^6$ 个效应物细胞,即FLT3-CAR转导的T细胞或模拟转导的对照细胞。用白血病细胞接种5周后,将小鼠腹膜内输注D-荧光素(150mg/kg体重;Gold Biotechnology),用异氟烷麻醉,使用活体成像系统(IVIS)和Living Image软件(PerkinElmer)成像。

[0364] 统计分析:如果正态分布,则使用未配对学生t检验比较连续端点的两个独立组。

当比较三个或更多独立组时,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)。对于存活数据,绘制Kaplan-Meier曲线并使用对数秩检验进行比较。所有的测试都是双边的。使用Bonferroni方法对P值进行调整用于多重比较。小于0.05的P值被认为是统计学显著的。

[0365] 结果在图4-7中示出。

[0366] 实施例5-表达FLT3的NK细胞的产生

[0367] NK细胞被操纵以表达并入CD28-CD3 $\zeta$ 共刺激信号传导结构域的FLT3特异性CAR。为了避免副作用,iCasp9-T2A框被并入到FLT3特异性CAR中以在杀死癌症后根除CAR修饰的NK细胞。在白血病的原位异种移植小鼠模型中体外和体内评估FLT3特异性CAR工程化NK细胞的抗白血病技术。结果表明,FLT3-CAR的表达可以重定向NK细胞以特异性增强细胞因子释放和对FLT3表达的白血病细胞的体外和体内应答的细胞毒性,并且该事件是FLT3依赖性的。此外,在原位白血病小鼠模型中,FLT3导向的NK细胞显著延长小鼠存活。总之,我们的数据表明,FLT3重定向的NK细胞代表了针对复发性白血病的有前景的疗法。

[0368] 材料和方法

[0369] 细胞培养:所有细胞系均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),并已使用DNA分型验证。

[0370] 小鼠:6至8周龄的雄性NOD-scid IL-2R $\gamma$ 裸(NSG)小鼠购自The Jackson Laboratory。经常监测小鼠的白血病。所有的动物工作都得到了俄亥俄州立大学动物护理和使用委员会的批准。

[0371] 生成具有iCasp9-T2A框的FLT3特异性CAR慢病毒构建体:重链(VH)和轻链(VL)的可变区的FLT3编码结构域序列被分别扩增并使用接头通过重叠PCR反应进行重组。将VH-接头-VL片段与CD28-CD3 $\zeta$ 部分一起框内并入。然后,将整个抗-FLT3-scFv-CD28-CD3 $\zeta$ 片段连接到命名为pCDH的慢病毒载体中以产生pCDH-FLT3-CAR构建体。然后,将iCasp9-T2A盒并入pCDH-FLT3-CAR中以构建完整的iCasp9-T2A-pCDH-FLT3-CAR。

[0372] NK淋巴细胞的慢病毒转导:从我们先前的报道中修改慢病毒转染和感染方案。Chu等人,(2014)Leukemia 28:917-927;Han等人,(2015)Scientific Reports 5:11483。

[0373] 流式细胞术分析:为了检测细胞表面上的FLT3-CAR表达,用包含4%牛血清白蛋白的PBS洗涤转导的NK细胞,并用生物素标记的山羊抗小鼠(Fab)2多克隆抗体或正常多克隆山羊免疫球蛋白G(IgG)抗体(Jackson ImmunoResearch)作为同种型对照培育。然后,用别藻蓝蛋白(APC)结合的链霉亲和素(Jackson ImmunoResearch)和与V450结合的抗CD3抗体(BD Biosciences)染色细胞。为了测定白血病细胞表面上的FLT3的表达,用藻红蛋白(PE)结合的小鼠抗FLT3mAb(eBiosciences)染色细胞。用BD LSRII流式细胞仪分析抗体染色。使用FlowJo软件(Tree Star Inc.)进行数据分析。

[0374] 免疫印迹:在laemmli缓冲液中裂解细胞。通过SDS-PAGE凝胶分离裂解物并转移至PVDF膜(Millipore)。用小鼠抗人CD3 $\zeta$ mAb(BD Pharmingen),然后用辣根过氧化物酶结合的山羊抗小鼠IgG抗体探测膜。通过使用增强的化学发光试剂(Thermo scientific Inc.)揭示抗体结合。

[0375] 稳定表达FLT3的NK-92细胞产生:从我们先前的报道中修改慢病毒转染和感染方案。Chu等人,(2014)Leukemia 28:917-927;Han等人,(2015)Scientific Reports 5:11483。



[0376] 细胞毒性测定:如前所述进行标准4小时<sup>51</sup>Cr释放测定。Yu等人, Blood 115:274-281 (2010)。简略地,用<sup>51</sup>Cr标记靶细胞,并与NK细胞以各种效应物/靶比(E/T)在96孔V底板的孔中在37℃下共培养4小时。收获上清液并转移至含有液体闪烁混合物(Fisher Scientific)的闪烁小瓶中,并在TopCount计数器(Canberra Packard)上测量<sup>51</sup>Cr的释放。在完全培养基或1%的SDS中培育的靶细胞用于测定自发性或最大<sup>51</sup>Cr释放。使用标准式计算特异性裂解的百分比: $100 \times (\text{cpm实验释放} - \text{cpm自发释放}) / (\text{cpm最大释放} - \text{cpm自发释放})$ 。

[0377] 细胞因子释放测定:将靶细胞与等量的效应物细胞在96孔V底板中在37℃下共培养24小时。收获无细胞上清液,并使用来自R&D system的相应ELISA试剂盒按照制造商的方案通过ELISA评估IFN- $\gamma$ 和白细胞介素(IL)-2分泌。

[0378] 携带白血病的小鼠的体内治疗和生物发光成像:用表达萤火虫萤光素酶的Pinco-pGL3-luc/GFP病毒逆转录病毒转导MOLM13细胞,并使用上述方法分选GFP阳性细胞,产生MOLM13-GL3细胞。在第0天通过尾静脉向雄性NSG小鼠静脉注射400 $\mu$ L PBS中的 $8 \times 10^6$  MOLM13-GL3细胞以建立异种移植原位白血病模型。在第7天和第14天,通过尾静脉注射给小鼠静脉注射400 $\mu$ L PBS中的 $10 \times 10^6$ 个效应物细胞,FLT3-CAR转导的NK细胞或模拟转导的对照细胞。用白血病细胞接种5周后,将小鼠腹膜内输注D-荧光素(150mg/kg体重;Gold Biotechnology),用异氟烷麻醉,使用活体成像系统(IVIS)和Living Image软件(PerkinElmer)成像。

[0379] 统计分析:如果正态分布,则使用未配对学生t检验比较连续端点的两个独立组。当比较三个或更多独立组时,使用单因素方差分析。对于存活数据,绘制Kaplan-Meier曲线并使用对数秩检验进行比较。所有的测试都是双边的。使用Bonferroni方法对P值进行调整用于多重比较。小于0.05的P值被认为是统计学显著的。

#### [0380] 结果

[0381] FLT3-CAR的产生和其在CAR转导的NK细胞上的表达:使用PCDH慢病毒载体骨架,构建含有iCasp9-T2A框、信号肽(SP)、重链可变区(VH)、接头、轻链可变区(VL),Myc标签、铰链、CD28和CD3 $\zeta$ 的特异性FLT3-CAR构建体(图8A)。然后,用CAR构建体和对照空载体转导NK-92细胞系。此外,将转导的NK-92细胞系分选用于GFP的表达,由载体表达的荧光标记。用分选细胞和原始NK-92细胞的抗CD3 $\zeta$ 免疫印迹证实FLT3-CAR被成功导入和表达。如图8B所示,嵌合FLT3-ScFv受体在CAR转导的NK-92细胞中而不是在原始和对照载体转导的细胞中表达。此外,流式分析通过用抗小鼠Fab抗体染色原始和转导的NK-92细胞,证实了FLT3-CAR在细胞表面上的表达,其检测到ScFv在89.4%的FLT3-CAR转导的NK-92细胞上的表达,而ScFv表达在原始和模拟转导的NK-92细胞上几乎检测不到(图8C)。

[0382] 与模拟转导的NK-92细胞相比,FLT3-CAR修饰的NK-92细胞识别并更有效地杀死FLT3<sup>+</sup>白血病细胞:为了确定FLT3-CAR NK-92细胞是否比FLT3<sup>-</sup>白血病细胞更好地特异性根除FLT3<sup>+</sup>,验证了白血病细胞系MOLM13和EOL-1一致地表达FLT3,而FLT3的表达在U937的表面上仍未检测到(图9A)。然后,进行铬-51释放测定,其证实与原始和模拟转导的NK-92细胞相比,用FLT3-CAR转导的NK-92细胞显著改善其根除FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系MOLM13和EOL-1的能力。然而,杀伤白血病细胞的增强是FLT3<sup>+</sup>依赖性的。用FLT3-CAR转导的NK-92细胞在杀伤FLT3<sup>-</sup>细胞系U937的能力上未显示出可检测到的差异(图9B)。此外,与原始和模拟转导的

NK-92细胞相比,通过用CAR-FLT3转导的NK-92识别FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系诱导强烈的IFN- $\gamma$ 释放。与原始的和模拟转导的NK-92细胞相比,用CAR-FLT3转导的NK-92细胞对IFN- $\gamma$ 释放的强烈诱导没有发生在FLT3<sup>-</sup>细胞系U937中(图9C)。当将它们与对照细胞系U937和FLT3<sup>+</sup>MOLM13共培养时,原始NK-92细胞和用FLT3-CAR构建体或模拟物转导的细胞的IFN- $\gamma$  mRNA水平证实了相似的结果(图9C)。

[0383] FLT3-CAR工程化的NK-92细胞更有效地根除离体原发性白血病:为了确定用FLT3-CAR转导的NK-92细胞是否比原始和模拟转导的NK-92细胞诱导更强的抗肿瘤应答,分离来自患者的白血病细胞,并确认了这些肿瘤细胞上的FLT3的表达(图10A)。然后,将铬-51释放测定应用于从两名患者分离的FLT3<sup>+</sup>肿瘤细胞。与原始和模拟转导的NK-92细胞相比,FLT3-CAR修饰的NK-92细胞显示出更强的肿瘤细胞裂解能力和FLT3的表达(图10B)。然而,FLT3-CAR NK-92细胞仅能显示出对来自正常对照人的正常外周血单核细胞(PBMC)的略微增强的细胞溶解活性(图10B)。此外,进行细胞因子释放测定以测试通过ELISA测量的IFN- $\gamma$ 的分泌。与关于细胞溶解活性的数据一致,当将它们与来自患者的FLT3<sup>+</sup>PBMC共培养时,与原始或模拟转导的NK-92细胞相比,FLT3-CAR修饰的NK-92细胞释放更多的IFN- $\gamma$ 。此外,当与将它们与来自正常对照人的PBMC共培养时,FLT3-CAR工程化NK-92产生的细胞因子应答增强消失(图10C)。进一步的实时PCR实验验证,与原始和模拟转导的NK-92相比,在与从具有突变和高水平FLT3的患者中分离的PBMC共培养后,FLT3-CAR修饰的NK-92细胞在mRNA水平上产生更多的IFN- $\gamma$ (图10C)。通过FLT3-CAR工程化的NK-92在患者的肿瘤细胞上表达的FLT3的识别增强了NK细胞的细胞溶解活性和细胞因子释放。

[0384] 用FLT3-CAR转导的原代NK增强对FLT3<sup>+</sup>肿瘤细胞的识别和杀伤:为了确定FLT3-CAR是否可被翻译为临床,FLT3-CAR转导的原代NK细胞可以有效识别和杀死白血病细胞系,特别是FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系,并研究从白血病患者新鲜分离的肿瘤细胞。分离来自三个捐助者的指定为D1、D2和D3的原代NK。然后,引入FLT3-CAR并使用慢病毒转染并入这些原代NK中。扩增后,这些基因修饰的原代NK用于进行铬-51释放测定。细胞毒性测定表明,与模拟修饰的细胞相比,FLT3-CAR修饰的原代NK能够在E/T比等于5时有效地杀死FLT3<sup>+</sup>白血病细胞系MOLM13(图11A)。为了在更多临床相关的背景下进一步测试FLT3-CAR转导的原代NK的根除活性,还通过铬-51释放测定法测量了经基因修饰的原代NK对从患者新鲜分离的白血病细胞的细胞毒性。与上述关于用FLT3-CAR转导的NK-92的细胞溶解活性的数据一致,响应于从白血病患者新鲜分离的肿瘤细胞在FLT3-CAR修饰的原代NK中的细胞毒性比在模拟修饰的原代NK中更大程度地发生(图11B)。

[0385] AP1903干预利用iCasp9有效地根除FLT3-CAR-NK92:为了克服CAR介导的免疫疗法的缺点,将诱导型半胱天冬酶9(iCasp9)(所谓的安全开关)引入基因修饰的CAR中,并允许去除不适当激活的CAR细胞。参见Gargett等人,Front Pharmacol 5:235(2014)。此处,还将iCasp9引入到我们的FLT3-CAR中(图8A)。为了测试AP1903干预是否能够诱导CAR修饰的NK细胞的细胞凋亡,我们首先测试iCasp9在原始模拟和FLT3-CAR转导的NK-92细胞中的表达。实时PCR证明iCasp9确实在CAR修饰的NK-92中而不是在原始和模拟转导的NK-92细胞中表达(图12A)。在AP1903施用48小时后,7-AAD染色显示AP1903干预能够显著诱导CAR修饰的NK-92细胞的死亡(图12B)。进一步的膜联蛋白V和7-ADD双染色和流式分析验证了48小时的AP1903干预显著诱导了CAR-工程化NK-92细胞而不是原始细胞的细胞凋亡(图12D)。CAR修

饰的NK-92的细胞凋亡由切割半胱天冬酶3在其中而不是在原始NK-92细胞中的表达进一步证明(图12D)。数据表明AP1903干预可用于在免疫治疗期间有效去除CAR修饰的NK-92细胞。

[0386] 在原位异种移植物白血病模型中,FLT3-CAR工程化NK-92细胞抑制白血病肿瘤生长并延长荷瘤小鼠的存活:在白血病异种移植的NSG小鼠模型中评估了FLT3-CAR修饰的NK-92细胞的潜在治疗应用。将白血病细胞系基因修饰以表达萤火虫萤光素酶。然后,进行基于GFP的分选以分离基因修饰的白血病肿瘤细胞,并将分选出的细胞静脉移植到NSG小鼠中以启动肿瘤生长。然后,将这些小鼠静脉内输注FLT3-CAR修饰的NK-92细胞、模拟转导的NK-92细胞或原始的NK-92细胞。使用IVIS的生物发光成像显示与原始和模拟转导的NK-92细胞相比,FLT3-CAR转导的NK-92细胞的输注显著降低了肿瘤负荷(图13A)。此外,与输注原始和模拟转导的NK-92细胞相比,FLT3-CAR工程化NK-92细胞的治疗显著延长了荷瘤小鼠的存活(图13B)。

[0387] 实施例6-包含不同的共刺激结构域的FLT3CAR构建体的比较

[0388] 用表达包含CD28共刺激结构域的FLT3CAR的免疫细胞和表达包含4-1BB共刺激结构域的FLT3CAR的免疫细胞进行铬释放测定,以比较FLT3CAR细胞与其中使用CD28共刺激结构域的那些的抗肿瘤效力。

[0389] 等效物

[0390] 除非另外定义,否则在此使用的所有技术和科学术语具有与由本技术所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0391] 本文中说明性描述的本技术可以在没有本文未具体公开的任何一种元素或多种元素、一个限制或多个限制的情况下适当地实施。因此,例如,术语“包含(comprising)”,“包括(including)”,“含有(containing)”等应当被广义地理解并且没有限制。此外,本文使用的术语和表达被用作描述的术语而不是限制,并且不意图使用排除所示出和描述的特征的任何等效物或其部分的这种术语和表达,但是认识到在要求保护的本技术的范围内各种修改是可能的。

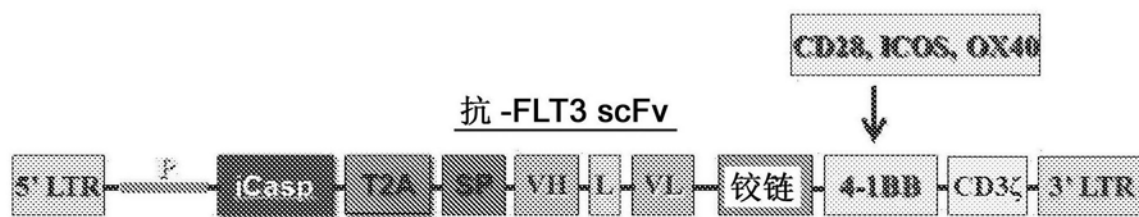
[0392] 因此,应该理解,此处提供的材料、方法和实施例是优选方面的代表,是示例性的,并且不旨在限制本技术的范围。

[0393] 本技术已经在本文被广泛地和一般地描述。落入一般公开内容中的每个较窄物种和亚属分组也构成本技术的一部分。这包括本技术的一般性描述,从该属中移除任何主题的附带条件或负面限制,而不管所删除的材料是否在本文中具体列举。

[0394] 此外,在按照马库什组描述本技术的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本技术也由此根据马库什组的任何单独成员或亚组成员进行描述。

[0395] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均明确地通过引用其整体内容并入,其程度如同每个单独地通过引用并入。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0396] 其他方面在以下权利要求中阐述。



LTR: 长末端重复

SP: 信号肽

VH: 可变 H 链

L: 接头

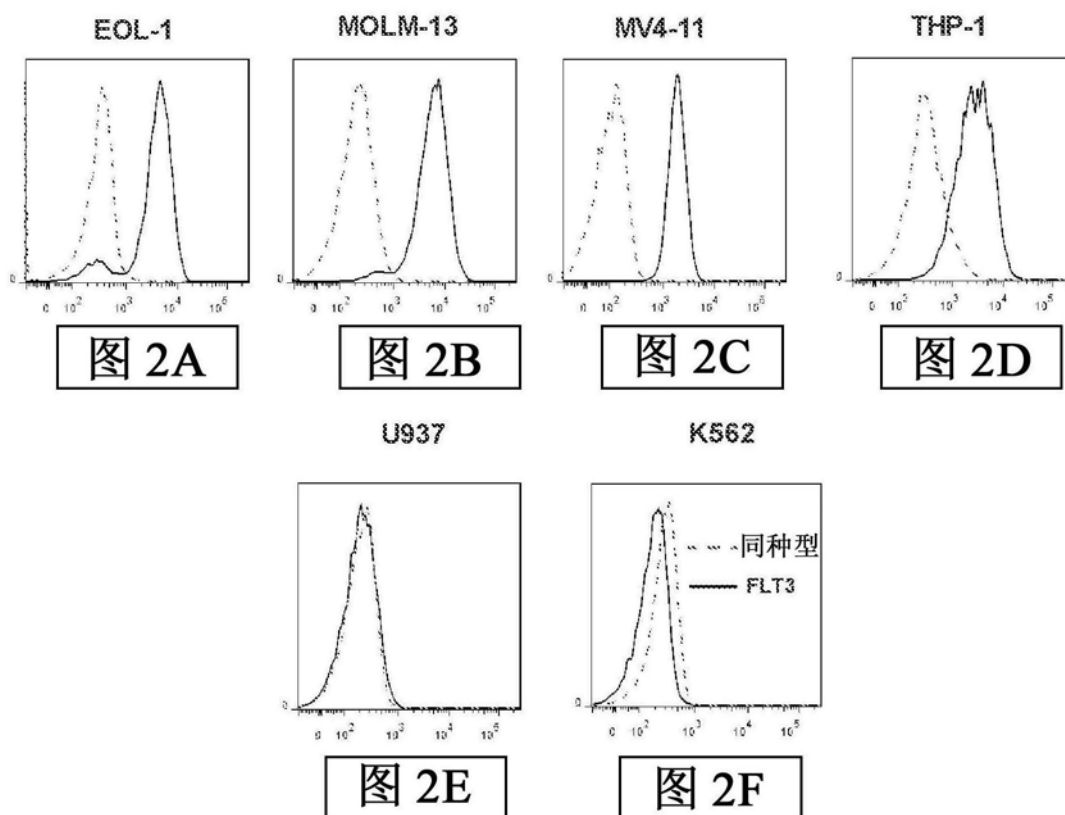
VL: 可变 L 链

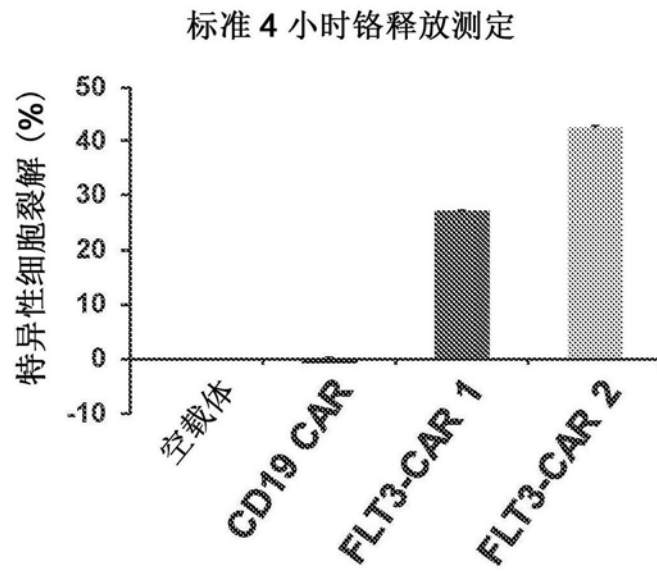
iCasp: 诱导型 - 半胱天冬酶 9

P: 启动子

图1

FLT3 在 AML 细胞上的表面表达





靶标：MOLM-13 AML

效应物 / 靶标：10:1

图3

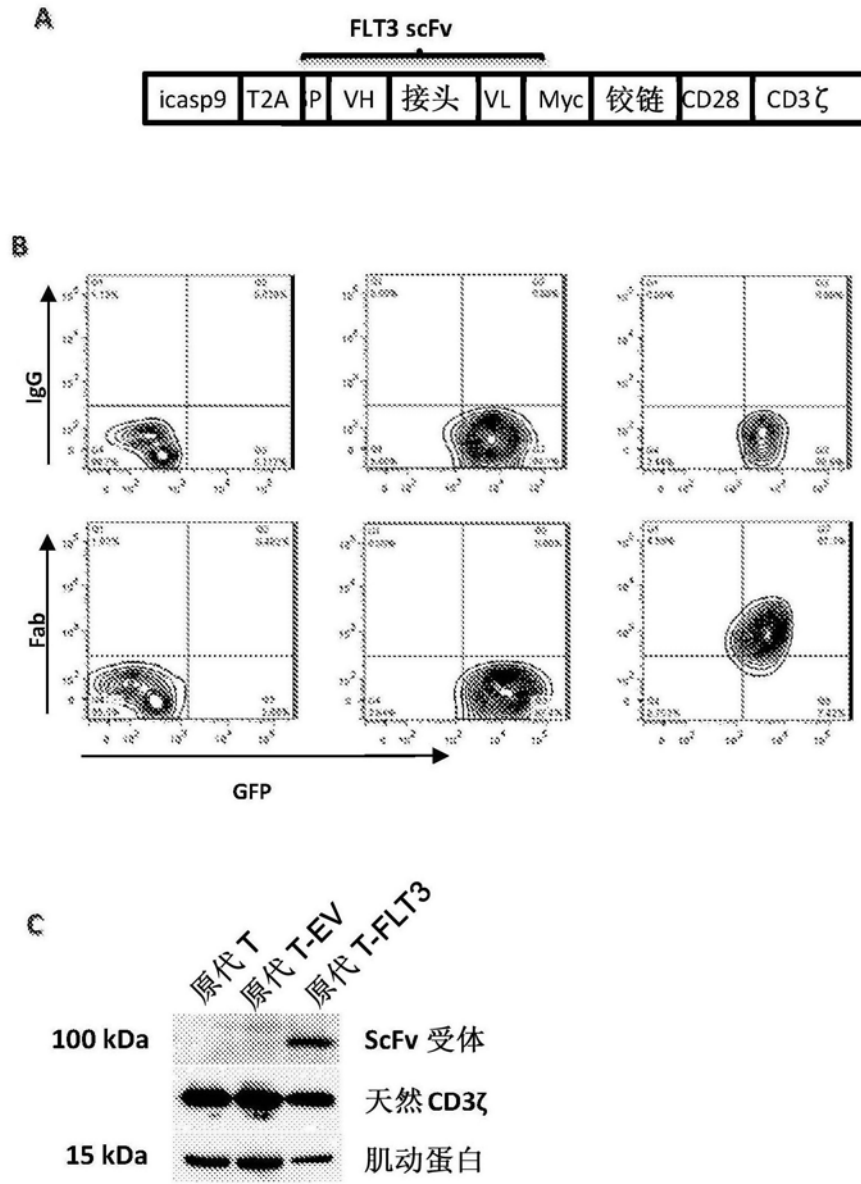


图4

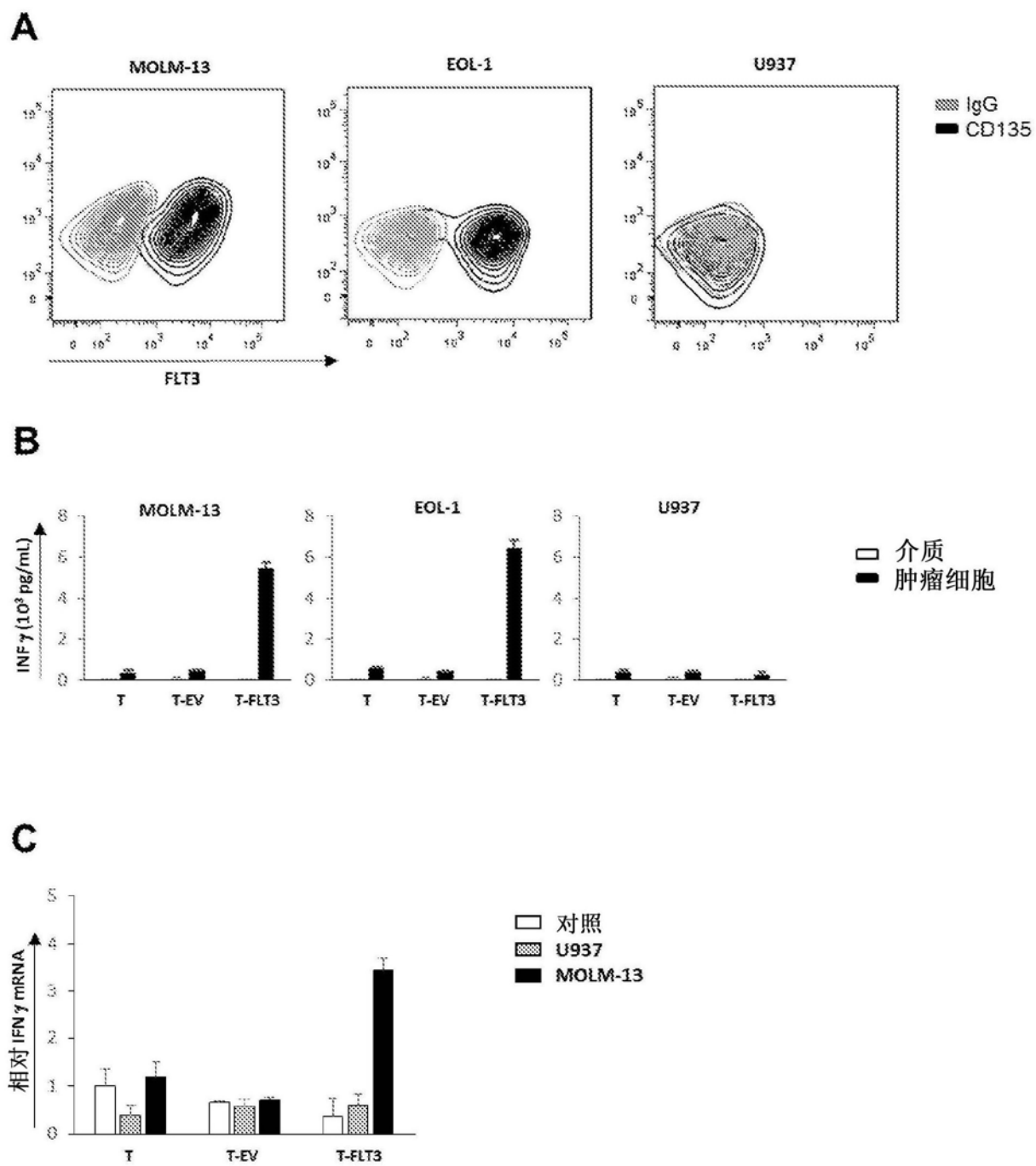


图5

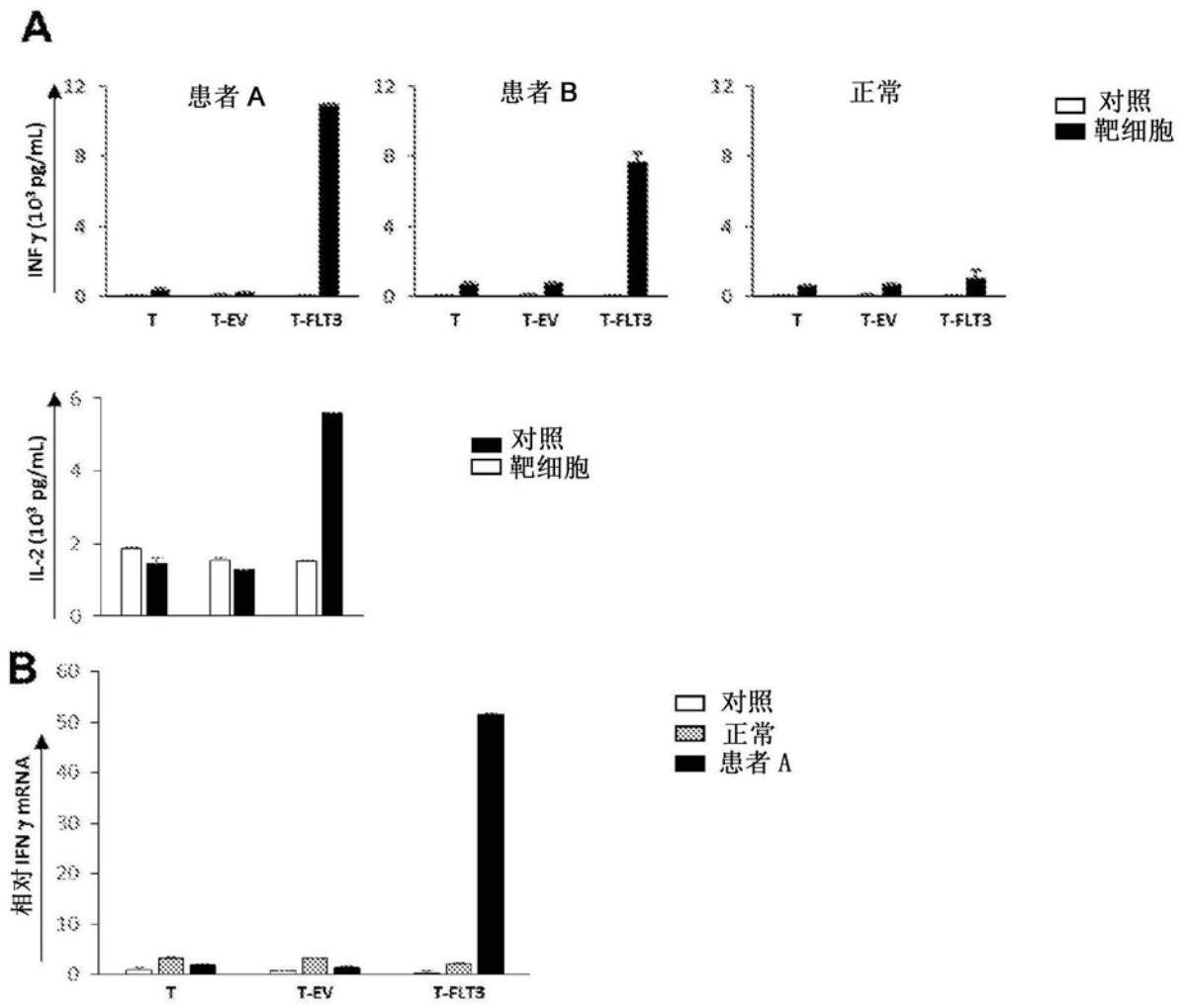
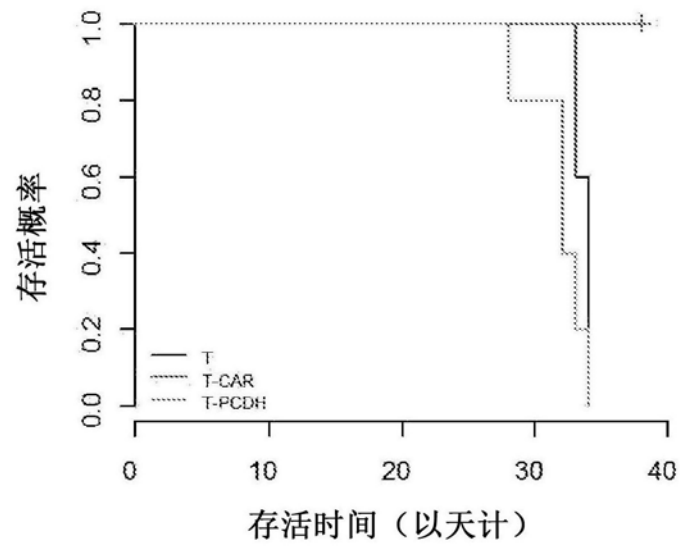
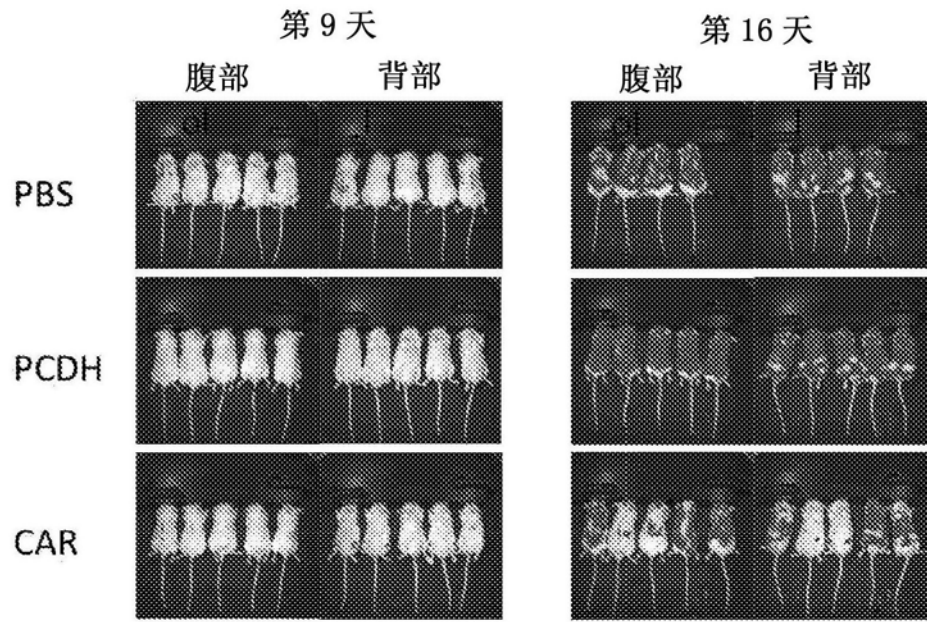


图6

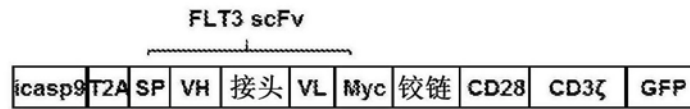




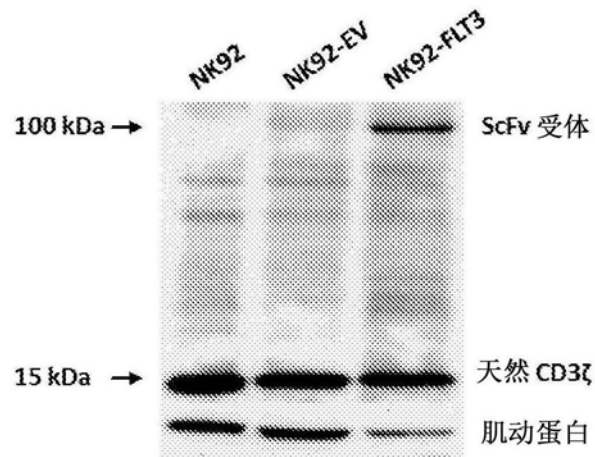
组织层比较		p 值
第 1 组	第 2 组	调节的 P 值
T	T-CAR	0.0348
T	T-PCDH	0.3795
T-CAR	T-PCDH	0.0006

图7

A



B



C

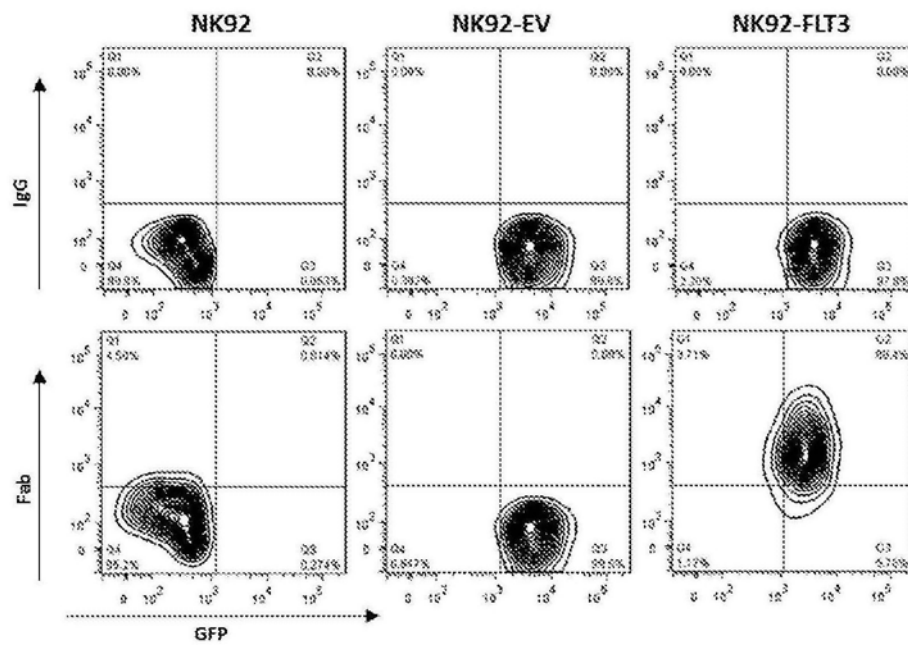


图8

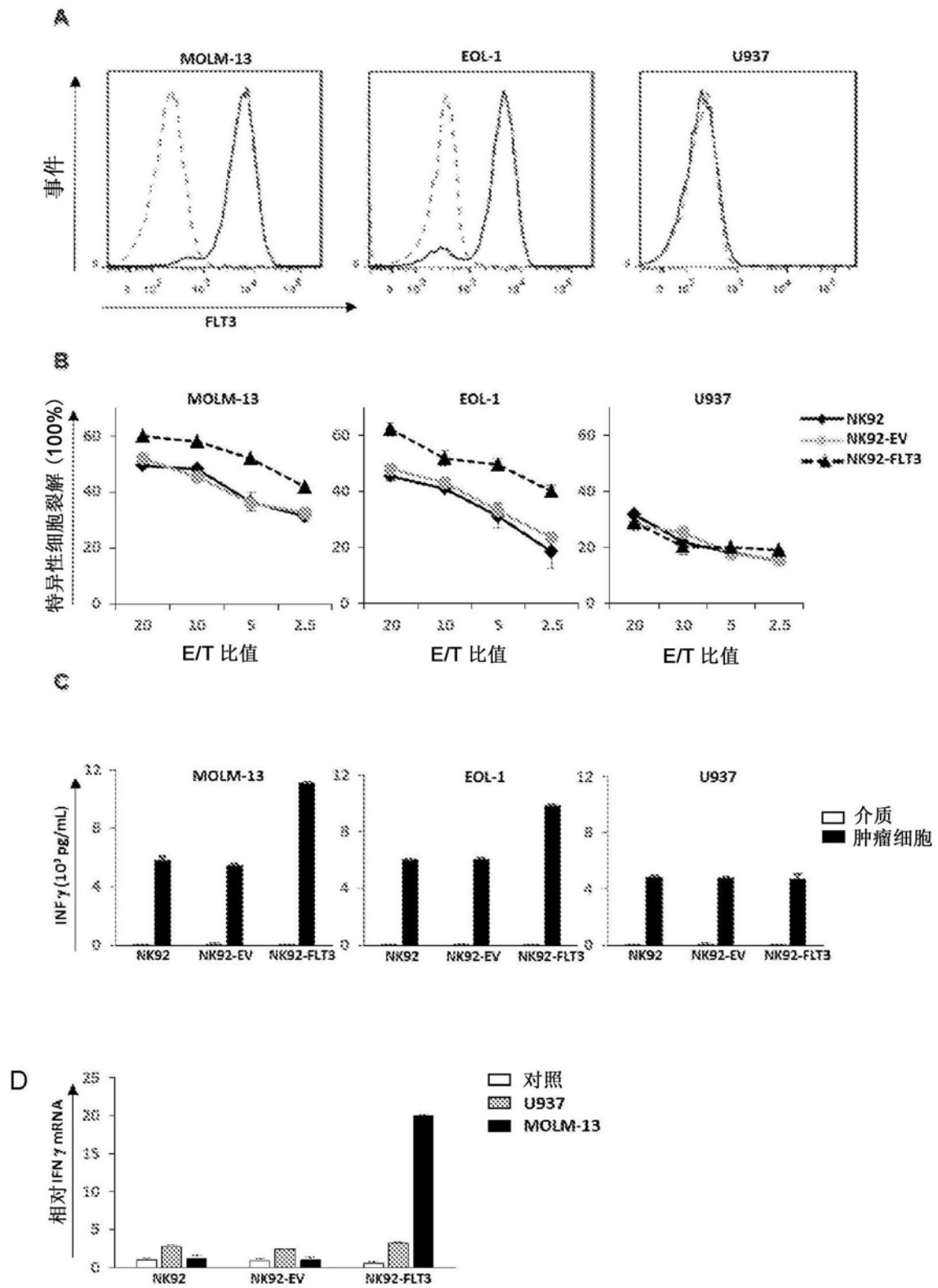


图9

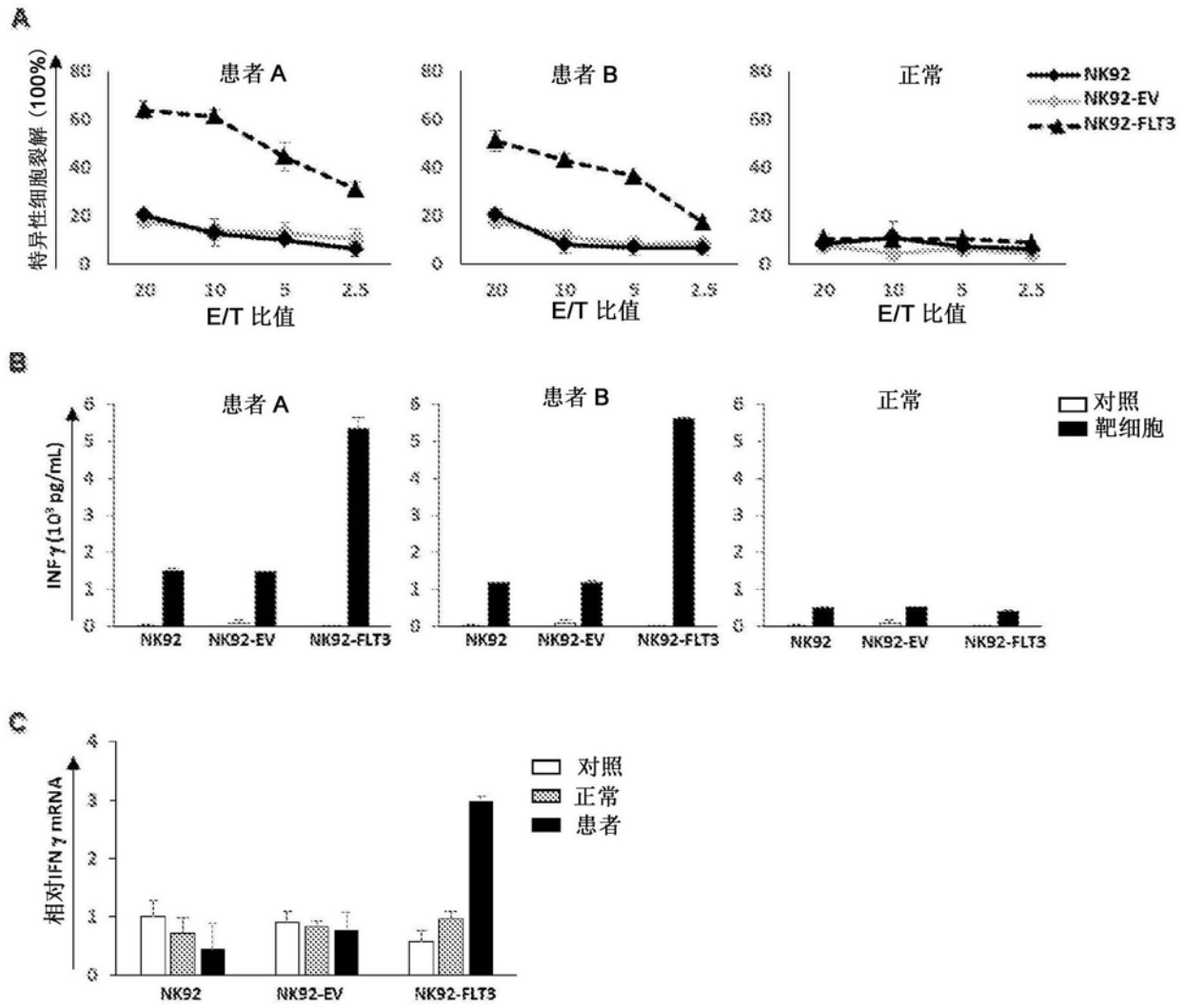


图10

## pNK-CAR

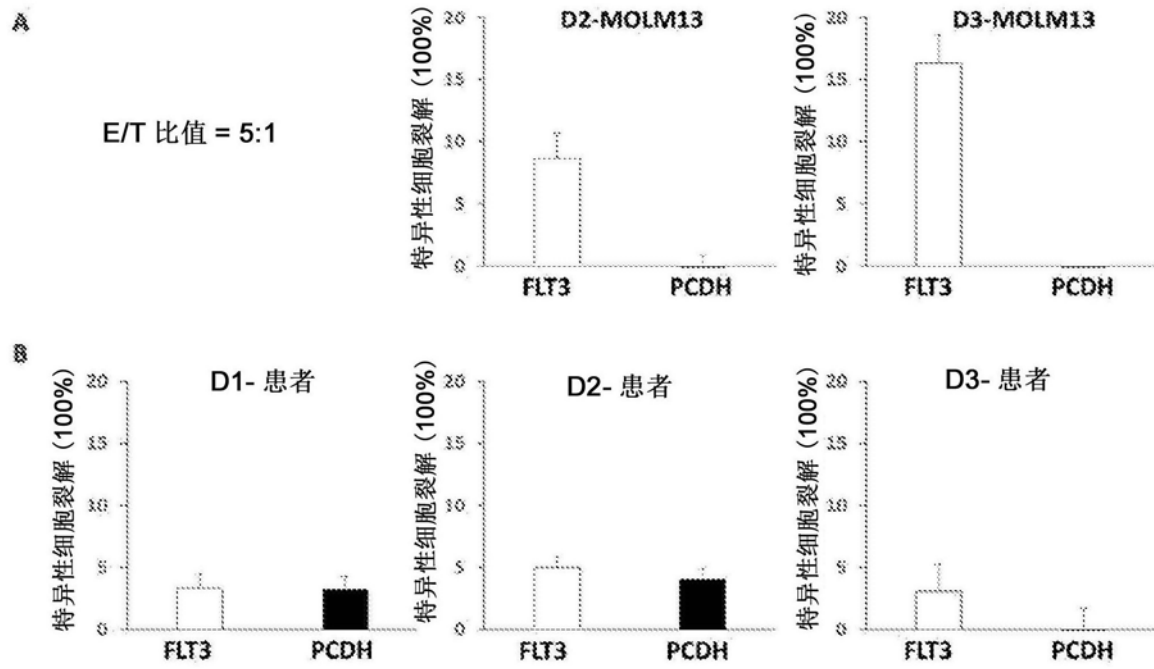


图11

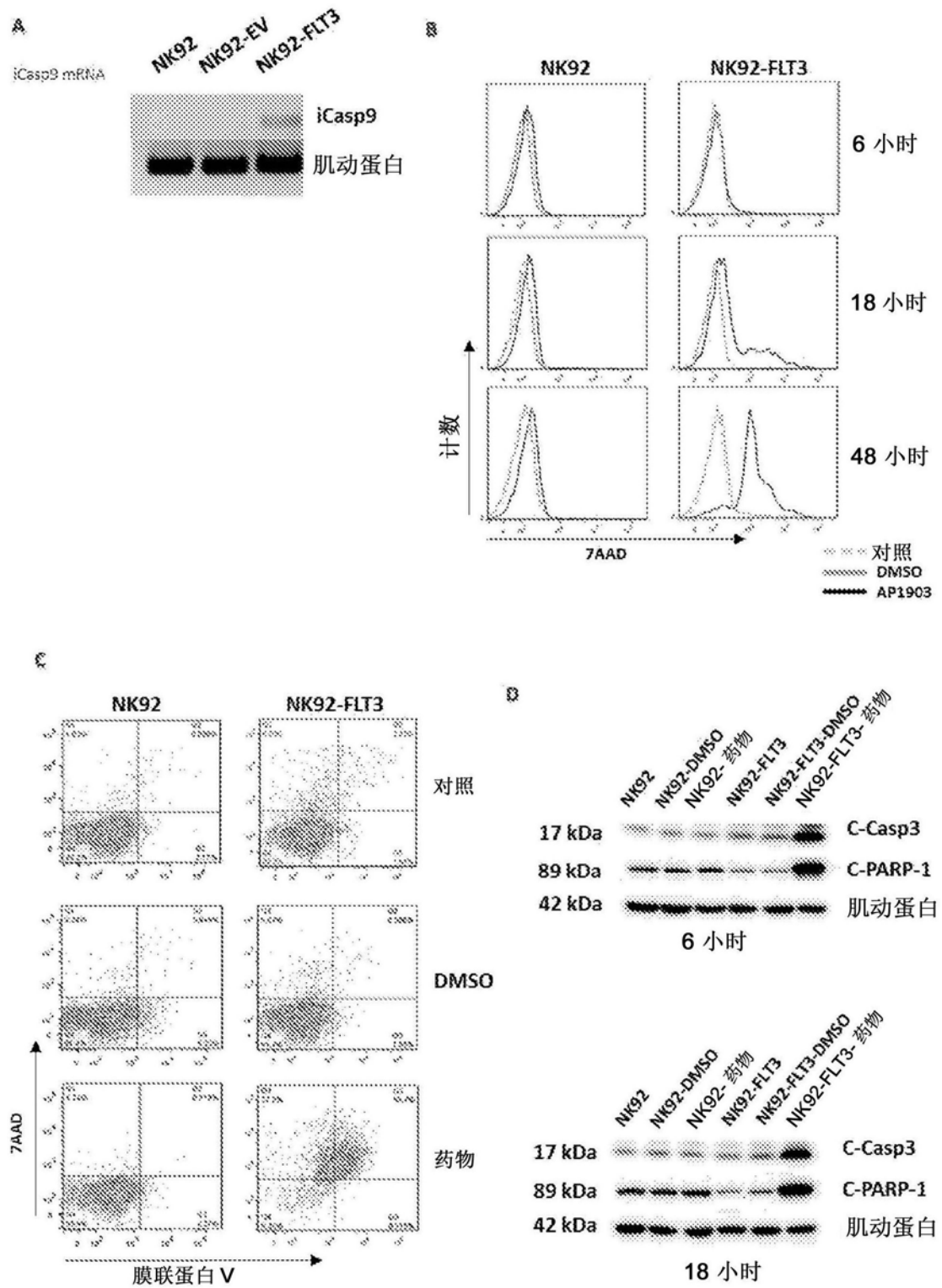


图12

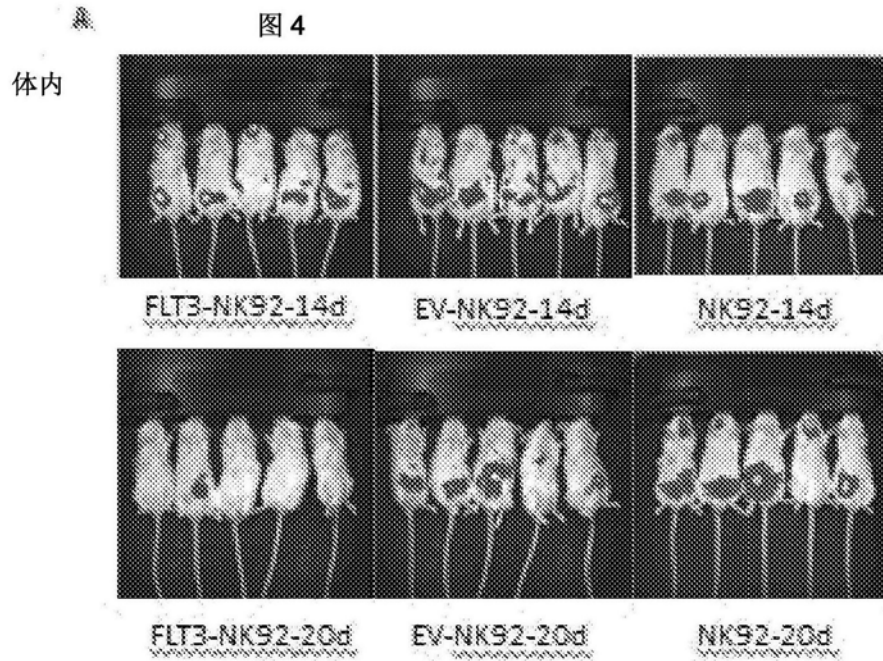


图13

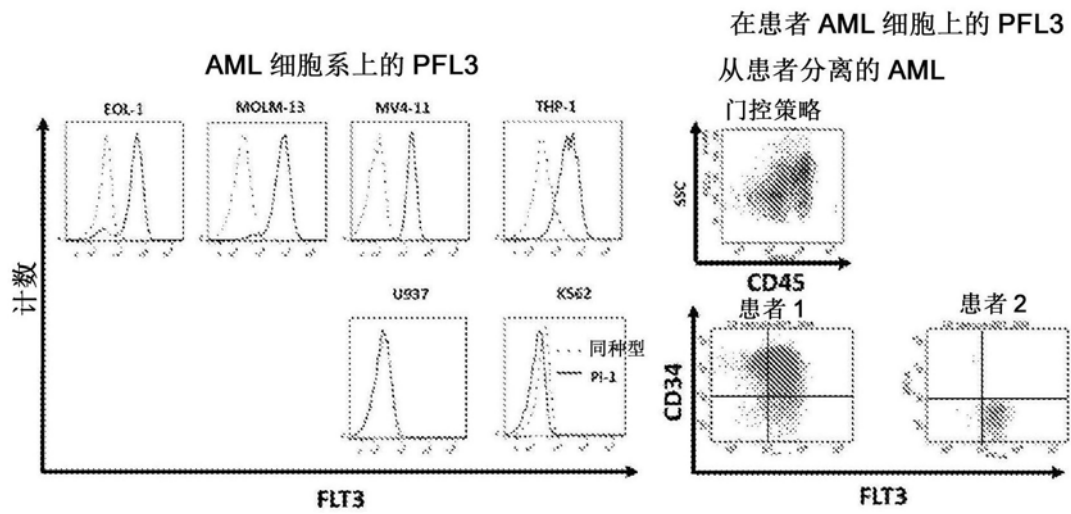


图14