



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104379599 B

(45)授权公告日 2018.04.10

(21)申请号 201380029374.X

(22)申请日 2013.04.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104379599 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(30)优先权数据

1206559.5 2012.04.13 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/050935 2013.04.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/153391 EN 2013.10.17

(73)专利权人 UCL商务股份有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 M.普利 B.菲利普

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

(56)对比文件

CN 101687015 A,2010.03.31,

WO 2008097541 A2,2008.08.14,

Philipbrian et al.A highly compact epitope-based marker-suicide gene for more convenient and safer T-cell adoptive immunotherapy.《Blood》.2010,第116卷(第21期),

审查员 韩福平

权利要求书2页 说明书14页

序列表7页 附图16页

(54)发明名称

能用于过继性细胞疗法的多肽

(57)摘要

本发明提供具有下式的多肽:St-R1-S1-Q-S2-R2,其中St是柄序列,当所述多肽在靶细胞表面表达时,其导致R和Q表位从细胞表面伸出;R1和R2是利妥昔单抗结合表位,其各自具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16或其保留利妥昔单抗结合活性的变体;S1和S2是任选的间隔序列,其可以是相同或不同的;且Q是具有如SEQ ID No.2所示氨基酸序列的QBEnd10结合表位或保留QBEnd10结合活性的其变体。本发明还提供编码这类多肽的核酸序列及其在过继性细胞转移中的用途。

1. 具有如SEQ ID No.4显示的序列的多肽,其中所述多肽
 - (i) 结合QBEND10;
 - (ii) 结合利妥昔单抗;且
 - (iii) 在细胞表面上表达时,在利妥昔单抗的存在下诱导补体介导的细胞杀伤。
2. 融合蛋白,其包含与目的蛋白质(POI)融合的根据权利要求1的多肽。
3. 根据权利要求2的融合蛋白,其中所述POI是嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。
4. 根据权利要求2或3的融合蛋白,其包含在所述多肽与所述目的蛋白质之间的自身切割肽。
5. 核酸序列,其能编码根据权利要求1的多肽或权利要求2至4中任一项的融合蛋白。
6. 包含根据权利要求5的核酸序列的载体。
7. 根据权利要求6的载体,其还包含目的转基因。
8. 根据权利要求7的载体,其中所述目的转基因编码嵌合抗原受体或T细胞受体,从而当使用所述载体转导靶细胞时,所述靶细胞共表达根据权利要求1的多肽和嵌合抗原受体或T细胞受体。
9. 表达根据权利要求1的多肽的细胞。
10. 根据权利要求9的细胞,其在所述细胞表面上共表达所述多肽和POI。
11. 包含根据权利要求5的核酸序列的细胞。
12. 根据权利要求9至11中任一项的细胞,其为T细胞。
13. 用于制备根据权利要求9至12中任一项的细胞的方法,其包括用根据权利要求6至8中任一项的载体离体转导或转染细胞的步骤。
14. 用于选择表达POI的细胞的方法,其包括以下步骤:
 - (i) 在用根据权利要求6至8中任一项的载体离体转染或转导的细胞表面上检测QBEnd10结合表位的表达;并
 - (ii) 选出鉴定为表达所述QBEnd10结合表位的细胞。
15. 用于制备富集表达POI的细胞的纯化细胞群体的方法,其包括使用根据权利要求14的方法从选择的细胞群体中选出表达POI的细胞的步骤。
16. 根据权利要求15的方法,其包括以下步骤:
 - (i) 用根据权利要求6至8中任一项的载体离体转导或转染从患者分离的细胞群体;并
 - (ii) 通过根据权利要求15的方法从经转导/转染的细胞群体中选出表达POI的细胞。
17. 细胞群体,其富集表达根据权利要求1的多肽的细胞,因此富集表达POI的细胞。
18. 利妥昔单抗在制备药物中的用途,所述药物用于用于消除根据权利要求9至12中任一项的细胞的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于利妥昔单抗的步骤。
19. 根据权利要求9至12中任一项的细胞在制备用于治疗受试者中的疾病的药物中的用途,所述细胞共表达根据权利要求1的多肽和嵌合抗原受体或T细胞受体。
20. 根据权利要求19的用途,其中所述治疗包括以下步骤:
 - (i) 用根据权利要求8的载体转导或转染从受试者分离的细胞样品;并
 - (ii) 将经转导或转染的细胞返回至所述患者。
21. 根据权利要求20的用途,其用于治疗癌症。
22. 根据权利要求9至12中任一项的细胞或根据权利要求17的细胞群体在制备用于过

继性细胞转移的药物中的用途。

能用于过继性细胞疗法的多肽

发明领域

[0001] 本发明涉及一种能用于过继性细胞疗法 (ACT) 的多肽。所述多肽包含能实现经转导细胞的选择的表位, 和使表达所述多肽的细胞被消除的表位。本发明还提供编码这类多肽的核酸, 包含这类核酸的细胞及其治疗用途。

[0002] 发明背景

[0003] 过继性细胞疗法 (ACT) 已显示在临床应用中针对恶性和感染性疾病的希望。例如, 已开发出埃巴病毒 (Epstein-Barr virus) 特异性细胞毒性T细胞 (EBV-CTL) 来治疗干细胞或器官移植后的移植后淋巴增殖性疾病 (PTLD) (Brewin等 (2009) 114:4792-4803)。已使用经遗传工程化以识别CD19的T细胞来治疗滤泡性淋巴瘤 (Kochenderfer等 (2010) Blood 116:4099-4102)。已利用使用遗传修饰为表达抗肿瘤T细胞受体的自体淋巴细胞的ACT来治疗转移性黑素瘤 (Rosenberg和Dudley (2009) Curr.Opin.Immunol. 21:233-240)。

[0004] 根据报道, 肿瘤抗原特异性T淋巴细胞成功用于治疗黑素瘤和EBV相关恶性, 这导致为T效应细胞重新定目标, 并由此扩大其能治疗的肿瘤范围的努力。

[0005] 已经工程化改造T细胞, 其包含具有新特异性的T细胞受体 (TCR)。还开发了嵌合抗原受体 (CAR), 其包含通常源自抗体的抗原结合域, 该抗原结合域与源自T细胞受体的信号转导内域 (endodomain) 偶联。如此, CAR具有与T细胞的细胞毒性效应器机制联系的抗体特异性。

[0006] 许多临床试验正在进行中, 其使用CAR修饰的T淋巴细胞进行B谱系恶性的免疫治疗 (Kohn等 (2011) Mol. Ther. 19:432-438)。经抗GD2 CAR转导的T细胞目前正处在用于治疗成神经细胞瘤 (neuroblastoma) 的临床开发中 (Pule等 (2008) Nat. Med. 14:1264-1270)。在成人淋巴瘤的CAR临床研究中报道了显示功效的数据。再举一个例子, 用识别黑素瘤抗原的天然T细胞受体转导的T细胞已导致散布性黑素瘤 (disseminated melanoma) 的明显消退。

[0007] 自杀基因

[0008] 提高过继性免疫治疗的功效已经与严重不良事件 (adverse event) 的报告联系起来。在输注工程化的T细胞后, 已报道有急性不良事件, 如细胞因子风暴 (cytokine storm)。另外, 发生了慢性不良事件, 并且其他通过动物模型预测。例如, 由于在胆上皮上预料不到的CAIX表达, 再靶向碳酸酐酶IX (CAIX) (一种由肾癌表达的抗原) 的T细胞在数名患者中产生肝中毒。针对黑素瘤的天然T细胞受体转移研究由于皮肤和虹膜上的靶抗原表达而在患者中导致白癜风 (vitiligo) 和虹膜炎 (iritis)。在天然TCR转移后在小鼠中报道了由于TCR交叉配对所致的移植物抗宿主病 (GvHD) 样症状。报道了在使用纳入共刺激的一些CAR的过继性转移后在动物模型中的淋巴增殖性病症。最后, 载体插入性诱变的风险始终存在。虽然急性毒性可通过小心给药来解决, 但慢性毒性可能是不依赖于细胞剂量的。

[0009] 由于工程化的T细胞在施用后能扩充并持续数年, 期望在面临毒性时纳入安全性机制以允许过继性输注的T细胞的选择性缺失。

[0010] 自杀基因使得能够在体内选择性缺失经转导的细胞。有两种自杀基因处于临床测

试中:HSV-TK和iCasp9。

[0011] T细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)表达赋予对更昔洛韦(Ganciclovir)的易感性。HSV-TK使用局限于深度免疫抑制的临床背景如单倍体相合骨髓移植(haploidentical bone marrow transplantation),因为该病毒蛋白质是高度免疫原性的。另外,它排除了将更昔洛韦用于巨细胞病毒治疗。

[0012] 最近,描述了可诱导的胱天蛋白酶9(iCasp9),其可通过施用小分子药物(AP20187)激活。iCasp9的使用依赖于临床级AP20187的可用性。另外,在遗传工程化细胞产品外的实验小分子的使用可能导致管理问题。

[0013] 因此,需要改进的自杀基因,其克服了与免疫原性和与已知自杀基因有关的诱导药物的可用性有关的问题。

[0014] 标志基因

[0015] 为了最大化过继性细胞疗法的效率,期望具有用于监测转导效率和选择经转导细胞的机制。然后可将纯化的经转导细胞的群体给予患者。

[0016] 一些T细胞工程化策略不导致容易检出的表面蛋白质的转基因表达。在这些情况中,难以进行转导测量和外周血中细胞的追踪。另外,在一些背景中,需要仅施用转导的T细胞,例如在GvHD基因治疗方案中。此时,需要允许临床级分选的标志物。

[0017] 已描述了几种标志基因。第一种是新霉素抗性基因,其现在具有历史性兴趣,因为该异种(xenogeneic)蛋白质仅允许通过抗生素选择的缓慢分选。还提出了低亲和力神经生长因子受体。尽管是非免疫原性的,但其表明预料不到的生物学效果。

[0018] 最近,已经将截短的CD34用作标志物。这具有如下的优点,即CD34 Miltenyi ClinMACS选择系统可容易地用于临床级分选。然而,已报道CD34转基因的纳入可导致经转导T细胞的异常归巢(homing)(Lange等(2007) Stem Cells Dev.16:297-304)。

[0019] 还有,甚至截短的CD34也具有较长的编码序列,将该蛋白质作为标志基因纳入可能加重载体包装容量和转录效率的负担。

[0020] 因此,需要改进的标志基因,其克服了与已知标志基因有关的免疫原性、预料不到的生物学活性和长编码序列相关的问题。

[0021] 附图简述

[0022] 图1:QBEND10与全长CD34(CD34)的结合,表位经由接头(QL8)、不经接头(Q8)融合至CD8柄(stalk),或直接融合至CD8 α 跨膜域(Q)。使用的逆转录病毒载体共表达eGFP。结论是QBEND10的有效结合需要间隔区,但柔性接头不然。

[0023] 图2:使用Miltenyi CD34选择试剂盒将用低滴度上清液转导的T细胞富集至接近纯。

[0024] 图3:对利妥昔单抗结合物的不同尝试,结合通过FACS显示,如下:(a)全长CD20。剩余部分均附接CD8柄。(b)CD20的主要胞外环,在二硫键任一侧包含5个残基;(c)来自二硫键半胱氨酸的CD20的主要胞外环;(d)来自Perosa(2007, J. Immunol 179:7967-7974)的环状模拟位(mimotope);(e)来自Perosa(2007, 如上文)的线性模拟位。选择构建体(d),因为其他构建体不能结合、结合较差或产生两阶段结合模式(bi-phasic binding pattern)。

[0025] 图4:(a)显示RQR8结构的草图;(b)将QBEND10结合与全长CD34的结合比较(左);将利妥昔单抗对RQR8的结合与全长CD20的结合比较(右)。注意共表达eGFP。(c)在活细胞上暴

露于补体和利妥昔单抗门孔后的杀伤效率显示实际上所有经转导T细胞的消除。

[0026] 图5: (a) 通过FACS检测的在人T细胞上第三代抗GD2 CAR的表达, 和 (b) 在针对GD2+靶细胞系的铬释放测定法中未转导的T细胞 (NT)、抗CD19 T细胞和抗GD2 T细胞 (HuK) 的功能。(c) 通过四聚体染色检测的、识别在EBV特异性CTL上表达的HA-1次要组织相容性抗原的天然TCR $\alpha\beta$ 。(d) 由这些经转导的EBV-CTL对HA-1阳性HLA-A2+PHA母细胞 (HH) 的杀伤, 且不存在对HA-1阴性 (RR) HLA-A2+母细胞的杀伤。

[0027] 图6: GvHD模型。Balb/c接受体小鼠被辐射并接受来自C57BL/6小鼠的 10^7 个T消除的骨髓细胞。对照小鼠不接受另外的细胞; 测试小鼠接受 3×10^6 个磁性分选的用RQR8转导的C57BL/6脾细胞。(a) BMT后在第29天对针对CD4和Thy1.1染色的脾细胞的FACS。残余接受体淋巴细胞 (Thy1.1⁺) 存在于对照小鼠而非指示GvHD的接受体小鼠中。(b) 可以看到, 同样是在第29天与经QBEnd10转导的淋巴细胞一起染色的脾细胞被植入接受体小鼠内。(c) 对照小鼠和 (d) 接受体小鼠的肠组织学, 后者中显示清楚的肠GvHD。

[0028] 图7: 在GvHD小鼠模型中经转导的脾细胞的BLI。(a) 我们已将RQR8与我们的红移的 (red-shifted)、密码子优化的萤火虫萤光素酶以符合读码框的方式克隆, 由自身切割性2A序列分隔开 (RQR8-2A-FLuc)。(b) 将Black 6脾细胞用上述载体转导、分选并以DLI施用。7天后在 (b) 活体动物和 (c) 解剖的小肠上实施生物发光成像。

[0029] 图8: 重组Ritux-鼠IgG2a抗体 (Ritux-mG2a) 对未转导的Jurkat T细胞、用仅QBEnd10表位的构建体转导的Jurkat T细胞和用仅RQR8构建体转导的Jurkat T细胞的结合。(eGFP共表达)

[0030] 图9: 共表达RQR8和以下任一项的构建体: (a) 抗GD2 CAR或抗HA1天然TCR

[0031] 图10: 提议的构建体, 它们具有 (a) 在CD8柄上的Qbend10表位 (Q8作为对照), (b) 仅RQR8, 或与以下任一项共表达的Q8: (c) iCasp9或 (d) HSV-TK。还显示了工程化为共表达萤火虫萤光素酶 (FLuc) 的构建体。

[0032] 图11: QBEnd10结合的更精细的表位定位。

[0033] 图12: 基于模拟位结合构建体的利妥昔单抗结合表位。

[0034] 图13: 重新工程化的构建体。

[0035] 图14: 使用重新工程化的构建体的CDC测定法。

[0036] 图15: GvHD模型评估。

[0037] 图16: 显示晶体结构和适宜距离的示意图。

[0038] 发明概述

[0039] 本发明提供一种紧凑的多肽, 其包含标志模块和自杀模块两者。所述多肽可以与治疗性转基因, 如编码TCR或CAR的基因共表达。

[0040] 所述标志模块包含CD34的最小表位, 其允许使用例如Miltenyi CD34 cliniMACS系统有效选择经转导的细胞。

[0041] 所述自杀模块包含基于来自CD20的表位的最小表位。使用溶胞抗体如利妥昔单抗可选择性杀伤表达包含该序列的多肽的细胞。

[0042] 组合的标志物和自杀多肽在细胞表面上稳定表达, 例如在其编码序列的逆转录病毒转导后。

[0043] 由于载体包装限制和CD34和CD20两者的复杂化生物学作用, 除了治疗性转基因

(如编码TCR或CAR的转基因)以外还共表达CD20和CD34是在技术上有挑战性的。通过提供包含来自这些蛋白质的结合表位的多肽,本发明人提供了高度紧凑的标志/自杀多肽,其编码序列足够小以易于包装并与T细胞工程化转基因共表达,但其保留就标志物选择和经由自杀模块的选择性删除而言的功能性。通过提供所述结合表位,组合的标志/自杀多肽避免与全长CD20和CD34分子相关的生物学作用。

[0044] 因此,在第一方面,本发明通过具有下式的多肽:

[0045] St-R1-S1-Q-S2-R2

[0046] 其中

[0047] St是柄序列,当所述多肽在靶细胞表面表达时,其导致R和Q表位从所述细胞表面伸出;

[0048] R1和R2是利妥昔单抗结合表位,它们各自具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16或其保留利妥昔单抗结合活性的变体;

[0049] S1和S2是任选的间隔序列,其可以是相同或不同的;和

[0050] Q是具有如SEQ ID No.2所示氨基酸序列的QBEnd10结合表位或保留QBEnd10结合活性的其变体。

[0051] R1和R2可以各自具有如SEQ ID No.7所示的序列。

[0052] R1和R2之间的距离太长以致所述多肽不能同时结合利妥昔单抗的两个抗原结合位点。

[0053] 间隔序列S1和S2可以具有至少约10个氨基酸的联合长度。

[0054] R1和R2之间的距离可以超过76.57Å。

[0055] 所述柄序列可以是源自CD8α的。

[0056] 所述柄序列可以包含如SEQ ID No.3中显示的氨基酸序列。

[0057] 所述多肽可以包含显示为SEQ ID No.4的序列或其变体,该变体与显示为SEQ ID No.4的序列具有至少80%同一性且其(i)结合QBEND10;(ii)结合利妥昔单抗,和(iii)当在细胞表面上表达时,在利妥昔单抗存在的情况下诱导补体介导的细胞杀伤。

[0058] 在第二个方面,本发明提供一种融合蛋白,其包含与目的蛋白质(POI)融合的根据本发明第一方面的多肽。

[0059] 所述POI可以是嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

[0060] 所述融合蛋白可以包含在所述多肽与所述目的蛋白质之间的自身切割肽。

[0061] 在第三方面,本发明提供一种核酸序列,其能编码根据本发明第一方面的多肽或根据本发明第二方面的融合蛋白。

[0062] 在第四方面,本发明提供一种包含根据本发明第三方面的核酸序列的载体。

[0063] 所述载体还可以包含目的转基因,其可以编码嵌合抗原受体或T细胞受体。

[0064] 在第五方面,本发明提供表达根据本发明第一方面的多肽的细胞。

[0065] 所述细胞可在细胞表面上共表达所述多肽和POI。

[0066] 还提供一种包含根据本发明第三方面的核酸序列的细胞。

[0067] 所述细胞可以是T细胞。

[0068] 在第六方面,本发明提供一种用于制备根据本发明第五方面的细胞的方法,其包括用根据本发明第四方面的载体转导或转染细胞的步骤。

[0069] 在第七方面,本发明提供一种用于研究基因治疗方法的转导效率的方法,其包括在用根据本发明第四方面的载体转导或转染的细胞表面上检测QBEnd10结合表位的表达的步骤。

[0070] 在第八方面,本发明提供用于选择表达POI的细胞的方法,其包括以下步骤:

[0071] (i) 在用根据本发明第四方面的载体转导或转染的细胞表面上检测QBEnd10结合表位的表达;并

[0072] (ii) 选出鉴定为表达所述QBEnd10结合表位的细胞。

[0073] 在第九方面,本发明提供一种用于制备富集表达POI的细胞的纯化的细胞群体的方法,其包括使用根据本发明第八方面的方法从细胞群体中选出表达POI的细胞的步骤。

[0074] 所述方法可包括以下步骤:

[0075] (i) 用根据本发明第四方面的载体离体转导或转染从患者分离的细胞群体;并

[0076] (ii) 通过根据本发明第八方面的方法从经转导/转染的细胞群体中选出表达POI的细胞。

[0077] 在第十方面,本发明提供富集表达根据本发明第一方面的多肽的细胞,由此富集有表达POI的细胞的细胞群体。

[0078] 在第十一方面,本发明提供一种用于体内追踪经转导细胞的方法,其包括在所述细胞表面上检测根据本发明第一方面的多肽的表达的步骤。

[0079] 在第十二方面,本发明提供一种用于消除根据本发明第五方面的细胞的方法,其包括将所述细胞暴露于利妥昔单抗的步骤。

[0080] 在第十三方面,本发明提供一种用于治疗受试者中疾病的方法,其包括施用根据本发明第五方面的细胞,或根据本发明第十方面的细胞群体的步骤。

[0081] 所述方法可以包括以下步骤:

[0082] (i) 用根据本发明第四方面的载体转导或转染从受试者分离的细胞的样品;并

[0083] (ii) 将所述经转导/转染的细胞返回至患者。

[0084] 所述方法可用于治疗癌症。

[0085] 在第十四方面,本发明提供根据本发明第五方面的细胞或根据本发明第十方面的细胞群体,其用于通过过继性细胞转移的疗法。

[0086] 发明详述

[0087] 本发明提供一种包含标志表位和自杀表位的多肽。

[0088] 标志基因

[0089] 标志基因是一种通常不由靶细胞表达的蛋白质,其允许鉴定成功的转导。

[0090] 在本发明的多肽中,使用源自CD34的标志物。CD34是细胞表面糖蛋白且作为细胞-细胞粘着因子发挥功能。它还介导干细胞对骨髓细胞外基质或直接对基质细胞的附着。

[0091] CD34不由终末分化的造血谱系表达,因此它是用于经修饰T细胞的理想标志物。

[0092] 可以容易地鉴定并使用Miltenyi CliniMACS磁性细胞选择系统(一种普遍使用的用于临床干细胞分离的试剂)分离表达CD34的细胞。CliniMACS CD34选择系统利用QBEnd10单克隆抗体来实现细胞选择。

[0093] 本发明人已从CD34抗原内匹配QBEnd10结合表位(见实施例)并确定其具有如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。

[0094] ELPTQGTFSNVSTNVS (SEQ ID No.2)。

[0095] 本发明的多肽包含QBEnd10结合表位,其具有如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列或保留QBEnd10结合活性的其变体。

[0096] 如本文中使用的,术语“具有”与术语“包含/包括”同义。

[0097] 变体QBEnd10结合表位基于如SEQ ID No.2所示的序列,但包含一个或多个氨基酸突变,如氨基酸插入、取代或缺失,只要该表位保留QBEnd10结合活性。具体地,所示序列可在一个或两个末端截短例如一或两个氨基酸。

[0098] 可基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性性质进行有意的氨基酸取代,只要表位的QBEnd10结合活性得以保留。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;而有不带电荷的极性头基团且具有相似的疏水性值的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0099] 可以例如按照下表进行保守性取代。处于第二列同一区组且第三列同一行中的氨基酸可以彼此取代:

[0100]	脂肪族	非极性	GAP
			ILV
		极性-不带电荷	CSTM
			NQ
[0101]		极性-带电荷	DE
			KR
	芳香族		HFWY

[0102] 所述QBEnd10结合表位可以相比于如SEQ ID No.2所示的序列例如含有5个以下、4个以下、3个以下、2个以下或1个氨基酸突变。

[0103] 所述QBEnd10结合表位可以基本由如SEQ ID No.2所示的序列或其保留QBEnd10结合活性的变体组成。所述QBEnd10结合表位可由如SEQ ID No.2所示的序列或其保留QBEnd10结合活性的变体组成。

[0104] 自杀基因

[0105] 自杀基因编码拥有导致细胞死亡的可诱导能力的蛋白质。

[0106] 在本发明的多肽中,使用基于CD20 B细胞抗原的自杀模块。

[0107] 可通过用抗体利妥昔单抗处理来选择性消除表达CD20的细胞。由于CD20表达不存在于浆细胞中,在利妥昔单抗处理后尽管消除了B细胞区室但仍保留了体液免疫。

[0108] 来自CD20的利妥昔单抗结合表位是CEPANPSEKNSPSTQYC (SEQ ID No.5)

[0109] Perosa等(2007,J.Immunol 179:7967-7974)描述了一系列半胱氨酸约束性7聚体环状肽,其具有由抗CD20 mAb利妥昔单抗识别的抗原性基序但具有不同的基序周围的氨基酸。总共描述了11种肽,如下表中显示的:

[0110]

肽	插入序列
R15-C	acPYANPSLc (SEQ ID No.6)
R3-C	acPYSNPSLc (SEQ ID No.7)
R7-C	acPFANPSTc (SEQ ID No.8)
R8-,R12-,R18-C	acNFSNPSLc (SEQ ID No.9)
R14-C	acPFSNPSMc (SEQ ID No.10)
R16-C	acSWANPSQc (SEQ ID No.11)
R17-C	acMFSNPSLc (SEQ ID No.12)
R19-C	acPFANPSMc (SEQ ID No.13)

[0111]

R2-C	acWASNPSLc (SEQ ID No.14)
R10-C	acEHSNPSLc (SEQ ID No.15)
R13-C	acWAANPSMc (SEQ ID No.16)

[0112] Li等(2006 Cell Immunol 239:136-43)还描述了利妥昔单抗的模拟表位,包括以下序列:

[0113] QDKLTQWPKWLE (SEQ ID No.1)。

[0114] 本发明的多肽包含利妥昔单抗结合表位,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16或其保留利妥昔单抗结合活性的变体。

[0115] 本发明的多肽可以包含利妥昔单抗结合表位,其具有如SEQ ID No.7所示的氨基酸序列或其保留利妥昔单抗结合活性的变体。

[0116] 变体利妥昔单抗结合表位基于选自下组的序列:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16,但包含一个或多个氨基酸突变,如氨基酸插入、取代或缺失,只要该表位保留利妥昔单抗结合结合活性。具体地,所示序列可在一个或两个末端截短例如一或两个氨基酸。

[0117] 可基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性性质进行有意的氨基酸取代,只要表位的利妥昔单抗结合活性得以保留。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;而有不带电荷的极性头基团且具有相似的疏水性值的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0118] 可以例如按照前面部分呈现的表进行保守性取代。处于第二列同一区组且第三列同一行中的氨基酸可以彼此取代:

[0119] 利妥昔单抗结合表位可以相比于选自下组的序列例如含有3个以下、2个以下、或1个氨基酸突变:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16。

[0120] 所述利妥昔单抗结合表位可以基本由以如下所示的一种序列组成:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16或其保留利妥昔单抗结合活性的变体。所述利妥昔单抗结合表位可以基本由以如下所示的序列组成:SEQ ID No.1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15和16或其保留利妥昔单抗结合活性的变体。

[0121] 当使用两种相同(或相似)的利妥昔单抗结合氨基酸序列时,最好可以使用不同的

DNA序列来编码两个R部分。在许多表达系统中,同源序列可能导致不想要的重组事件。利用遗传密码子的简并性,可以使用备选的密码子来实现DNA序列变化,而不改变蛋白质序列,由此防止同源重组事件。

[0122] 柄序列

[0123] 本发明的多肽包含柄序列,当所述多肽在靶细胞表面表达时,导致R和Q表位从靶细胞表面伸出。

[0124] 所述柄序列导致R和Q表位离细胞表面具有足够的距离,从而促进例如利妥昔单抗和/或QEnd10的结合。

[0125] 所述柄序列将表位从细胞表面提升。

[0126] 柄序列可以是基本线性的氨基酸序列。所述柄序列可以足够长以隔开R和Q表位与靶细胞的表面,但没有长得使得其编码序列危及载体包装和转导效率。所述柄序列可以例如长为30至100个氨基酸。所述柄序列可以长为约40-50个氨基酸。

[0127] 柄序列可以是高度糖基化的。

[0128] 所述柄序列可以包含以下序列或长度大致等同于以下序列:

[0129] PAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID No.3)

[0130] 所述柄序列可另外包含跨膜域,任选地与胞内锚定序列一起。所述跨膜域和胞内锚定序列可与柄序列的胞外部分源自相同的蛋白质或其可以源自不同的蛋白质。跨膜域和胞内锚定序列可以源自CD8。

[0131] 包含跨膜域和胞内锚定的CD8柄序列可以具有以下序列:

[0132]

PAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKC
PRPVV (SEQ ID No.17)。

[0133] 在该序列内,带下划线部分对应CD8 α 柄;中心部分对应于跨膜域;而粗体部分对应于胞内锚定物。

[0134] 间隔物

[0135] 本发明的多肽具有下式:

[0136] St-R1-S1-Q-S2-R2

[0137] 其中

[0138] St是柄序列;

[0139] R1和R2是利妥昔单抗结合表位;而

[0140] Q是QEnd10结合表位。

[0141] 在上式中,S1和S2是任选的间隔序列,其可以相同或不同。

[0142] 利妥昔单抗是经典抗体分子,具有两个抗原结合位点,各在Y型分子的各尖端处。

[0143] 所述间隔序列可以具有以下长度和构造,从而当在细胞表面表达该多肽时,R1和R2之间的距离太长以致多肽不能同时结合利妥昔单抗分子的两个抗原结合位点。

[0144] 所述间隔序列S1和S2可具有至少约10个氨基酸的联合长度。

[0145] 在表达的多肽中,R1和R2之间的距离可以超过76.57Å。例如,间隔序列的长度和构造可以为使得R1和R2之间的距离至少是78、80或85 Å。就该计算而言,在线性骨架中分开的氨基酸之间的分子距离可以假定为是约3Å每氨基酸。

[0146] 接头序列可以是基本线性的。它们可以包含丝氨酸和甘氨酸残基或由丝氨酸和甘氨酸残基组成。接头序列可以具有以下通式：

[0147] S-(G)_n-S

[0148] 其中S是丝氨酸,G是甘氨酸,而n是2至8的数字。所述接头或每个接头可以包含序列S-G-G-G-S或由序列S-G-G-G-S组成。

[0149] Q表位和间隔物的联合长度(即肽的S1-Q-S2部分的长度)可以是至少28个氨基酸。

[0150] RQR8序列

[0151] 本发明的多肽可以包含如SEQ ID.No.4显示的136个氨基酸序列或由如SEQ ID.No.4显示的136个氨基酸序列组成。

[0152]

CPYSNPNSLCSGGGGSELPTQGTFSTNVSTNVSPAKPTTTACPYNSNPNSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID No.4)

[0153] 所述多肽还可以在氨基末端包含信号肽。所述信号肽可以例如包含如SEQ ID No.18显示的序列或由如SEQ ID No.18显示的序列组成。

[0154] MGTSLLCWMALCLLGADHADA (SEQ ID No.18)

[0155] 因此,包含上文给出的这类信号肽和136个氨基酸序列的多肽会具有以下157个氨基酸的序列:

[0156]

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYNSNPNSLCSGGGGSELPTQGTFSTNVSTNVSPAKPTTTACPYNSNPNSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID No.19)

[0157] 一旦所述多肽由靶细胞表达,该信号肽就被切割,从而产生136aa的成熟肽产物。

[0158] 天然CD34蛋白长度为385个氨基酸残基,因此对于全长CD34表达需要超过1kb的DNA序列。因此,完整的RQR8构建体是单独的CD34蛋白的大小的约1/3。

[0159] 因此,RQR8构建体是比全长CD34标志基因大得多的可管理大小。它具有的额外的优点在于,包含自杀基因元件,其具有的裂解敏感性至少等于全长CD20表明的。

[0160] 本发明的多肽可以包含或组成为(consist of)如SEQ ID No.4所显示的序列的变体,其与如SEQ ID No.4所示序列具有至少70%、80%或90%同一性,只要它保留SEQ ID No.4多肽的功能活性。例如,所示变体序列应(i)结合QBEND10;(ii)结合利妥昔单抗,且(iii)在细胞表面上表达时,在利妥昔单抗的存在下诱导补体介导的细胞杀伤。

[0161] 同源性比较可通过肉眼进行,或借助于容易可用的序列比较程序,如GCG Wisconsin Bestfit程序包进行。

[0162] 融合蛋白

[0163] 本发明的多肽可以为融合蛋白的形式,其中所述多肽与目的蛋白质(POI)融合。

[0164] 融合蛋白可以在所述多肽和目的蛋白质之间包含自身切割肽。这类自身切割肽应当允许所述多肽和POI在靶细胞内的共表达,接着进行切割,从而所述多肽和POI在细胞表面上表达为分开的蛋白质。例如,所述融合蛋白可以包含口蹄疫自身切割2A肽。

[0165] 目的蛋白质

[0166] 所述目的蛋白质是用于在靶细胞表面表达的分子。当靶细胞在体内时,POI可以施

加治疗或预防效果。

[0167] 所述POI可以是嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

[0168] 嵌合抗原受体通过将抗原识别域(胞外域(ectodomain))连接至信号传导分子的跨膜和细胞内部分(内域)而生成。所述胞外域最普遍地源自抗体可变链(例如ScFv),但也可以从T细胞受体可变域或其他分子生成。所述胞内域可以包含CD3- ζ 的胞内部分。内域可以包含CD28-OX40-CD3 ζ 三重细胞质域。

[0169] POI可以是具有对肿瘤相关抗原,即在癌细胞上表达或过表达的蛋白质特异性的CAR或TCR。这类蛋白质包括ERBB2 (HER-2/neu),其在15-20%的乳腺癌患者中过表达且与更具攻击性的疾病相关;CD19,其在大多数B细胞恶性上表达;羧基脱水酶IX,其经常在肾细胞癌中过表达;GD2,其由神经母细胞瘤细胞表达;p53;MART-1 (DMF5);gp100:154;NY-ESO-1;和CEA。

[0170] 核酸序列

[0171] 本发明的第二方面涉及能编码本发明的多肽或融合蛋白的核酸序列。

[0172] 所述核酸在由靶细胞表达时导致编码的多肽在靶细胞的细胞表面表达。当核酸编码所述多肽和POI两者时(例如作为融合蛋白),它应当使得本发明的多肽和POI在靶细胞的表面表达。

[0173] 核酸序列可以是RNA或DNA,如cDNA。

[0174] 载体

[0175] 本发明还提供包含本发明的核酸序列的载体。所述载体还可以包含目的转基因,即编码POI的基因。

[0176] 所述载体应当能够转染或转导靶细胞,从而使其表达本发明的多肽和任选地目的蛋白质。

[0177] 所述载体可以是非病毒载体如质粒。

[0178] 所述载体可以是病毒载体,如逆病毒或慢病毒(lentiviral)载体。

[0179] 载体可以以分开的实体或作为单个核苷酸序列包含编码所述多肽的核酸和包含POI的核酸。如果它们作为单个核苷酸序列呈现,那么其可以在两个编码部分之间包含一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)以使下游序列被翻译。

[0180] 细胞

[0181] 本发明还提供表达依照本发明第一方面的多肽的细胞。所述细胞可以在细胞表面共表达所述多肽和POI。

[0182] 本发明还提供包含以下核酸序列的细胞,该核酸序列能编码依照本发明第一方面的多肽。

[0183] 所述细胞可经过依照本发明的载体转导或转染。

[0184] 所述细胞可以适用于过继性细胞疗法。

[0185] 所述细胞可以是T细胞,如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。该T细胞可以具有已有的特异性。例如,它可以是埃巴病毒(EBV)特异性T细胞。

[0186] 所述细胞可以源自患者。例如,细胞可以是患者取出,然后用依照本发明的载体离体转导。

[0187] 适用于ACT的T细胞群体包括:大外周血单核细胞(PBMC)、CD8+细胞(例如CD4消减

的PBMC);选择性消灭T调节细胞(Treg)的PBMC;分离的中心记忆(Tcm)细胞;EBV特异性CTL;和三病毒特异性CTL。

[0188] 本发明还包含细胞群体,其包含依照本发明的细胞。所述细胞群体可以经依照本发明的载体转导。所述细胞群体中一定比例的细胞可以在细胞表面表达依照本发明第一方面的多肽。所述细胞群体中一定比例的细胞可以在细胞表面共表达依照本发明第一方面的多肽和POI。所述细胞群体可以是源自患者的离体细胞群体。

[0189] 使用标志序列进行的选择

[0190] 本发明提供一种用于测量使用目的转基因(其编码目的蛋白质POI)的转导的方法,包括用共表达本发明的多肽和目的蛋白质的载体转导细胞群体并在细胞表面上检测QBEnd10结合表位的表达的步骤,其中表达本发明多肽的细胞比例对应于用目的转基因转导的细胞比例。

[0191] 本发明还提供用于选择表达POI的细胞的方法,其包括以下步骤:

[0192] (i) 在经包含编码POI的核苷酸序列的本发明载体转染或转导的细胞表面上检测QBEnd10结合表位的表达;并

[0193] (ii) 选出鉴定为表达所述QBEnd10结合表位的细胞。

[0194] 可以使用Miltenyi CD34 cliniMACS系统分选细胞。该系统完全适用于在GMP设施中的临床级分选。

[0195] 可以通过本领域中已知的方法如FACS鉴定和/或分选表达QBEnd10结合表位的细胞。

[0196] 本发明还提供用于制备富集表达POI的细胞的纯化的细胞群体的方法,其包括使用上述方法从细胞群体中选出表达POI的细胞的步骤。

[0197] 本发明还提供通过这类方法制备的POI表达细胞的纯化的群体。

[0198] 在纯化的细胞群体中,至少80%,85%,90%或95%的细胞可以表达POI(和依照本发明的多肽)。

[0199] 本发明还提供用于体内追踪经转导细胞的方法,其包括在细胞表面检测本发明多肽的表达的步骤。可以通过本领域中已知的方法如生物发光成像来体内追踪细胞。对于这类应用,本发明的多肽可以工程化改造为与可检测的蛋白质如萤光素酶共表达。

[0200] 使用自杀序列进行的消除

[0201] 本发明还提供一种用于消除由依照本发明的载体转导的细胞的方法,其包括将所述细胞暴露于补体和利妥昔单抗的步骤。

[0202] 当本发明的多肽在细胞表面表达时,利妥昔单抗对多肽R表位的结合导致细胞的裂解。

[0203] 超过一个分子的利妥昔单抗可以结合在细胞表面表达的每个多肽。多肽的每个R表位可以结合分别的利妥昔单抗分子。

[0204] 细胞的消除可以体内发生,例如通过对患者施用利妥昔单抗。

[0205] 消除转移细胞的决定可能源于在患者中检测到的不想要的、可归因于转移细胞的作用。例如,可以检测到不可接受的毒性水平。

[0206] 治疗方法

[0207] 经遗传修饰的T细胞的过继性转移是用于生成期望的免疫应答,如抗肿瘤免疫应

答的有吸引力的办法。

[0208] 本发明提供一种用于治疗 and/或预防受试者中疾病的方法,其包括对所述受试者施用依照本发明的细胞的步骤。所述方法可以包括对所述受试者施用细胞群体的步骤。可以使用上述方法对细胞群体富集表达目的转基因的细胞。

[0209] 所述方法可以涉及以下步骤:

[0210] (i) 从患者取细胞样品,如血液样品,

[0211] (ii) 提取T细胞,

[0212] (iii) 用本发明的载体转导或转染该T细胞,所述载体包含编码标志/自杀序列的核酸序列和目的转基因,

[0213] (iv) 离体扩大经转导的细胞,

[0214] (v) 将该细胞返回至患者。

[0215] 所述经转导的细胞可以拥有期望的治疗特性,如增强的肿瘤特异性靶向和杀伤。

[0216] 本发明的细胞可用于治疗癌症。如在Rosenburg和Dudley (2009-如上文) 中解释的,几乎所有肿瘤对使用ACT办法的裂解是同等易感的,且在遇到肿瘤抗原时均能刺激从抗肿瘤淋巴细胞的细胞因子释放。

[0217] 本发明的细胞可以例如用于治疗淋巴瘤、B谱系恶性、转移性肾细胞癌(RCC)、转移性黑色素瘤或神经母细胞瘤。

[0218] 或者,本发明的细胞可用于治疗或预防非癌性疾病。所述疾病可以是传染病或与移植有关的状况。

[0219] 本发明的细胞可用于治疗或预防移植后淋巴增生性疾病(PTLD)。

[0220] 现将通过实施例进一步描述本发明,该实施例意图用来帮助本领域中的普通技术人员实施本发明且不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0221] 实施例1:表位定位来自CD34抗原的QBEnd10表位

[0222] 本发明人首先试图发现结合QBEND10 (在Miltenyi ClinMACS CD34选择系统中使用的抗体)的CD34表位。为此,其从天然CD34抗原生成假定的QBEnd10结合表位的逆转录病毒文库。

[0223] 分离了QBEnd10结合域,使用双向删除策略实现了QBEnd10结合表位的进一步最小化(图11)。

[0224] 得到了最终的最小表位结合构建体,其仅含有16个氨基酸残基且具有序列为ELPTQGTFSTNVSTNVS。

[0225] 实施例2:导入间隔物以隔开CD34表位与细胞表面

[0226] 测试了多种柄和接头组合以研究表位呈递中的改进。为了测试标志基因的结合功效,使用一种双顺反子载体,其表达eGFP作为成功转染的标志物。

[0227] 使用的柄源于CD8 α 。这一高度糖基化的结构充当有效的间隔物,将表位从细胞表面抬高。其长度相对较短:仅长49个氨基酸。

[0228] 考虑3种构建体:2种CD8柄结合构建体,有和无柔性接头序列,相比于较小的膜近端构建体,要将假定的表位从细胞表面伸出。CD8柄结合构建体能够实现与全长CD34等同的对

QBEND10的结合(图1)。显示用该构建体转导的T细胞容易使用Miltenyi QBEnd10珠进行磁性分选(图2)。

[0229] 实施例3:利妥昔单抗结合表位的纳入

[0230] 本发明人决定将CD20 B细胞抗原作为假定的自杀基因进行表位定位。利妥昔单抗对于表达CD20的靶物是高度裂解性的。最近的晶体学数据已将利妥昔单抗结合相互作用鉴定为定位在大的胞外环。基于该数据,本发明人生成了一对构建体,它们表达此最小环结的多种形式。

[0231] 他们首先共表达了由晶体学鉴定为利妥昔单抗结合位点的CD20主要胞外环的不同片段。这些构建体不能结合利妥昔单抗。

[0232] 接着,他们尝试了线性和环状的利妥昔单抗结合性模拟位(由Perosa等(2006)描述,如上文)。模拟位是通过噬菌体展示鉴定的肽序列,其显示对靶抗体的较好结合。他们选择了线性模拟位和由二硫键约束的环状模拟位两者进行考虑(图12)。环状模拟位(11个氨基酸)的纳入提供了很好的利妥昔单抗结合(图3)。

[0233] 在显示了有效的利妥昔单抗结合后,他们接着实施了功能测定法以使用体外CDC测定法评估组合构建体的功能功效。然而,补体介导的杀伤较差,为仅65%(数据未显示)。生成了变体构建体以试图解决该问题(图13)。

[0234] 一个最终构建体在CD8柄上单个QBEnd10表位侧翼包含两个CD20环状模拟位,它允许最佳的QBend10和利妥昔单抗结合,以及高度有效的补体介导的杀伤(称为RQR8,图4和14)。

[0235] 该RQR8构建体仅长136个氨基酸。QBEND10的结合类似于全长CD34的。使用CD34 c liniMACS能有效分选用RQR8转导的T细胞(数据未显示)。对利妥昔单抗的结合相对于天然CD20增加了3.4倍。补体介导的杀伤能消除>97%的经转导的分选出的T细胞。

[0236] 实施例4:构建利妥昔单抗的鼠IgG2a形式

[0237] 具有其人IgG1恒定区的利妥昔单抗在鼠中不是特别裂解性的。杂交瘤IDEC-2B8是利妥昔单抗可变区的一个来源,但是是一种小鼠IgG1杂交瘤。为了产生利妥昔单抗的鼠等同物,有必要生成小鼠IgG2a形式。本发明人以与小鼠kappa/IgG2a恒定区符合阅读框的方式克隆重链和轻链可变区。然后,从悬浮K562细胞生成重组mAb(称为Ritux-mG2a)。这结合RQR8(图8),并且在鼠模型中就补体介导的裂解和ADCC而言是利妥昔单抗的功能等同物。

[0238] 实施例5:将RQR8用于T细胞癌基因疗法

[0239] 本发明人先前生成了第三代抗GD2嵌合抗原受体[图5(a)和(b)]。他们还优化了HA-1¹⁸天然TCR用于转基因表达[图5(c)和(d)]。两者均已与RQR8共表达。

[0240] 构建了两种测试构建体,其中RQR8基因与以下任一种共表达:(a) CAR或(b)天然TCR(图8)。口蹄疫自身切割性2A肽允许共表达。

[0241] 在正常的供体T细胞中通过流式细胞术(如图5中显示的)和Western印迹测试共表达/2A切割的效率。通过铬释放测定法、增殖、和细胞因子珠阵列,比较未分选的和分选经转导的T细胞响应靶物和对照时的功能。

[0242] 还表征了分选的和未分选的T细胞的扩充的表型(extended phenotype)。在利用利妥昔单抗/补体消减之前和之后测量经转导的大批群体的效应器活性的丧失。

[0243] 实施例6:RQR8的体内测试和与其他自杀基因的体内比较

[0244] 本发明人已开发了GvHD的小鼠模型。用RQR8转导的脾细胞在施用后导致GvHD(图6)。为了体内测试RQR8,经移植的小鼠接受用RQR8-2A-FLuc或对照Q8-2A-FLuc转导的脾细胞[图10(a')和(b')]。在第10天小鼠体重减半表示出现GvHD,这时,施用Ritux-mG2a。

[0245] 可以通过生物发光成像(BLI)来体内追踪T细胞,所述生物发光成像使用已针对体内用途优化过的萤火虫萤光素酶(图7)。在此实验中,在7天里比较BLI信号衰减和重量。在这之后,处死小鼠。通过定量流式细胞术从血液、骨髓和脾测量供体T细胞的持续性。通过对肠和肝的组织学评估来测量GvHD。

[0246] 如图15中显示的,对接受RQR8的小鼠有明显益处,如由存活和GvHD消退例示的。骨髓看来是供体细胞储库。由该图例示的数据代表了在鼠利妥昔单抗介导的消除后在受体小鼠中转基因细胞的残留植入。柱形的高度指示植入的T细胞的比例水平,作为在实验结束时小鼠中的T细胞区室的比例。显然,红色柱形比绿色柱形高得相当多,该绿色柱形表明在不存在利妥昔单抗介导的消除的情况下转基因细胞的植入水平。

[0247] 为了将iCasp9和HSV-TK与RQR8比较,对移植小鼠施用用构建体(b'),(c')和(d')转导的脾细胞。在第10天,分别施用ritux-mG2a,AP20187和Ganciclovir。测量BLI信号随时间的衰减和重量减轻,接着在第17天处死后通过组织学量化供体T细胞和GvHD的持续性。

[0248] 结论

[0249] 本发明人已为T细胞创建了一种136个氨基酸的标志/自杀基因。在逆转录病毒转导后,所翻译的蛋白质在细胞表面上稳定表达。它以与全长CD34相等的亲和力结合QBEND10。此外,该构建体结合利妥昔单抗,且双重表位设计造成高度有效的补体介导的杀伤。由于构建体的大小较小,它能容易地与典型T细胞工程化转基因如T细胞受体或嵌合抗原受体等共表达,从而在面临使用成品临床级试剂/药物的不可接受的毒性时允许容易的检测、细胞选择以及细胞消除。

[0250] 上文说明书中提及的所有公开出版物均通过提述并入本文。本发明所描述的方法和系统的各种修改和变化在不偏离本发明的范围和精神的情况下对于本领域技术人员来说将是显而易见的。尽管已使用特别优选的实施方案描述了本发明,但应理解所要求保护的发明不应过度受限于这类具体的实施方式。事实上,对于细胞治疗、T细胞工程化、分子生物学或相关领域中的技术人员显而易见的、用于实施本发明的所述模式的多种修改均意图落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> UCL 商务股份有限公司

<120> 多肽

<130> P046393CN

<140> PCT/GB2013/050935

<141> 2013-04-11

<150> GB1206559.5

<151> 2012-04-13

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 1

Gln Asp Lys Leu Thr Gln Trp Pro Lys Trp Leu Glu
 1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> QBEnd10 结合表位

<400> 2

Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 柄序列

<400> 3

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 20 25 30

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40

<210> 4

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 包含 RQR8 序列的多肽

<400> 4

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Pro
20 25 30

Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
50 55 60

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
65 70 75 80

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
85 90 95

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
100 105 110

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val
115 120 125

[0002]

Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
130 135

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 5

Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr
1 5 10 15

Cys

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 6

Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 7

Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 8

Ala Cys Pro Phe Ala Asn Pro Ser Thr Cys
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0003] <220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 9

Ala Cys Asn Phe Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

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

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 10

Ala Cys Pro Phe Ser Asn Pro Ser Met Cys
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 11

Ala Cys Ser Trp Ala Asn Pro Ser Gln Cys
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 12
Ala Cys Met Phe Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 13
Ala Cys Pro Phe Ala Asn Pro Ser Met Cys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位
[0004] <400> 14
Ala Cys Trp Ala Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 15
Ala Cys Glu His Ser Asn Pro Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 利妥昔单抗结合表位

<400> 16
Ala Cys Trp Ala Ala Asn Pro Ser Met Cys
1 5 10

<210> 17
<211> 82

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 具有跨膜域和胞内锚定物的柄序列

 <400> 17
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 1 5 10 15

 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 20 25 30

 His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 35 40 45

 Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
 50 55 60

 Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro
 65 70 75 80

 Val Val

[0005]

<210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 信号肽

 <400> 18
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

 Asp His Ala Asp Ala
 20

 <210> 19
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 包含 RQR8 序列和信号肽的多肽

 <400> 19
 Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

 Asp His Ala Asp Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly
 20 25 30

 Gly Gly Gly Ser Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser
 35 40 45

Thr Asn Val Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Ala Cys Pro Tyr Ser
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ala Pro Arg Pro
65 70 75 80

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
85 90 95

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
100 105 110

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
115 120 125

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg
130 135 140

Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
145 150 155

<210> 20
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006] <220>
<223> QBEnd10 结合表位和侧翼残基

<400> 20

Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro
1 5 10 15

Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser
20 25 30

Tyr Gln Glu Thr Thr Thr
35

<210> 21
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD20ep-v1

<400> 21

Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys
1 5 10 15

Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Ser

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

<220>
<223> CD20ep_v2

<400> 22

Gly Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln
1 5 10 15

Tyr Cys Gly Gly Gly Ser
20

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 环状利妥昔单抗结合模拟位

<400> 23

Gly Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 线性利妥昔单抗结合模拟位

<400> 24

Gln Asp Lys Leu Thr Gln Trp Pro Lys Trp Leu Glu Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

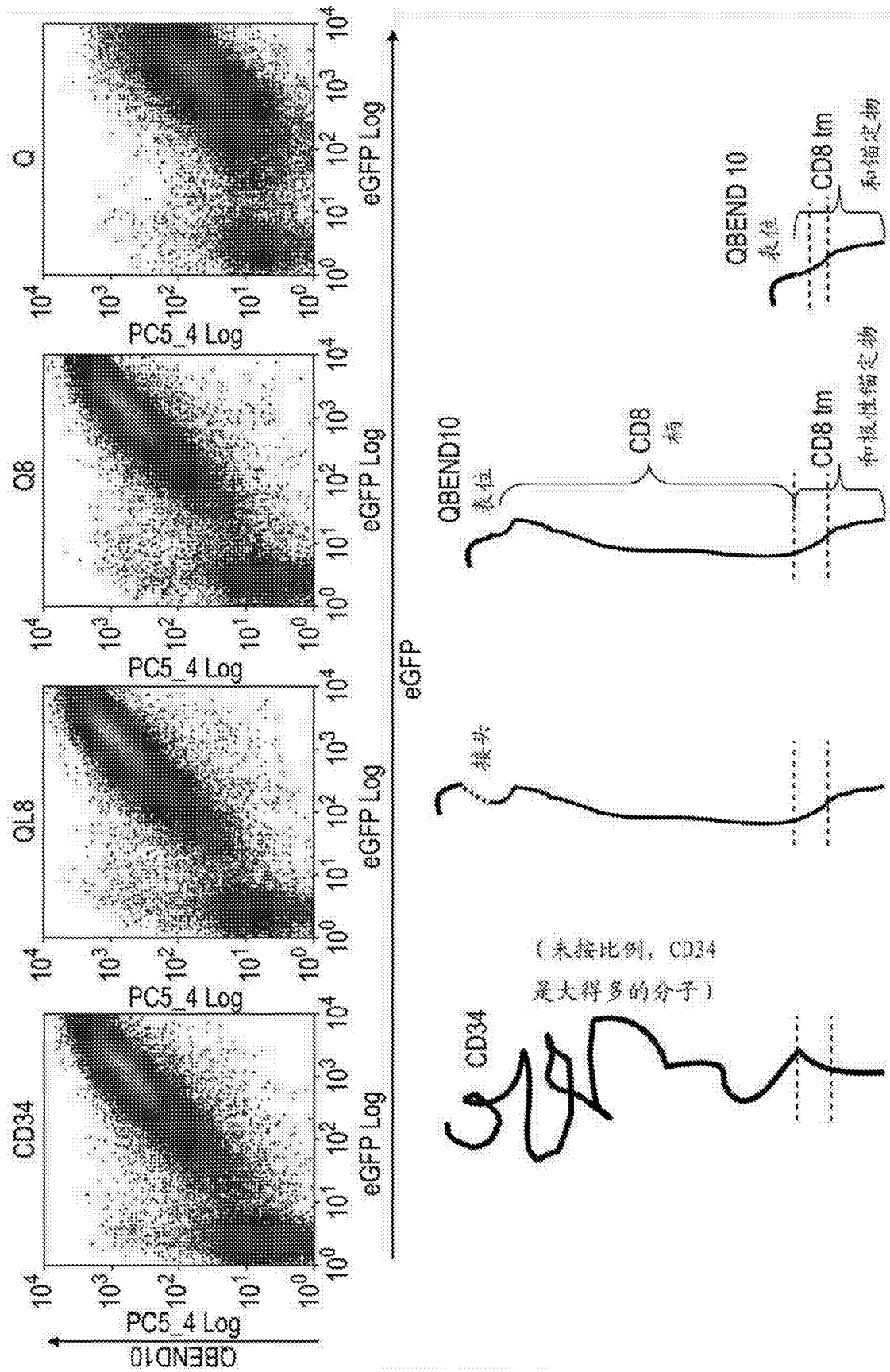


图1

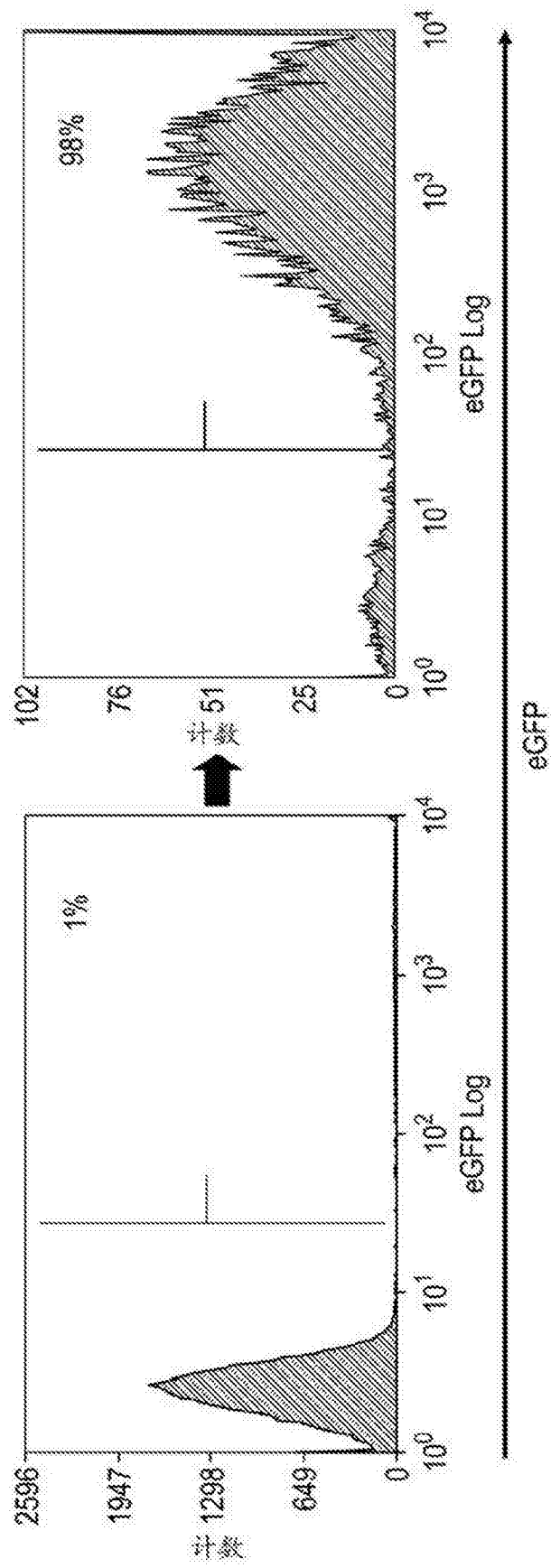


图2

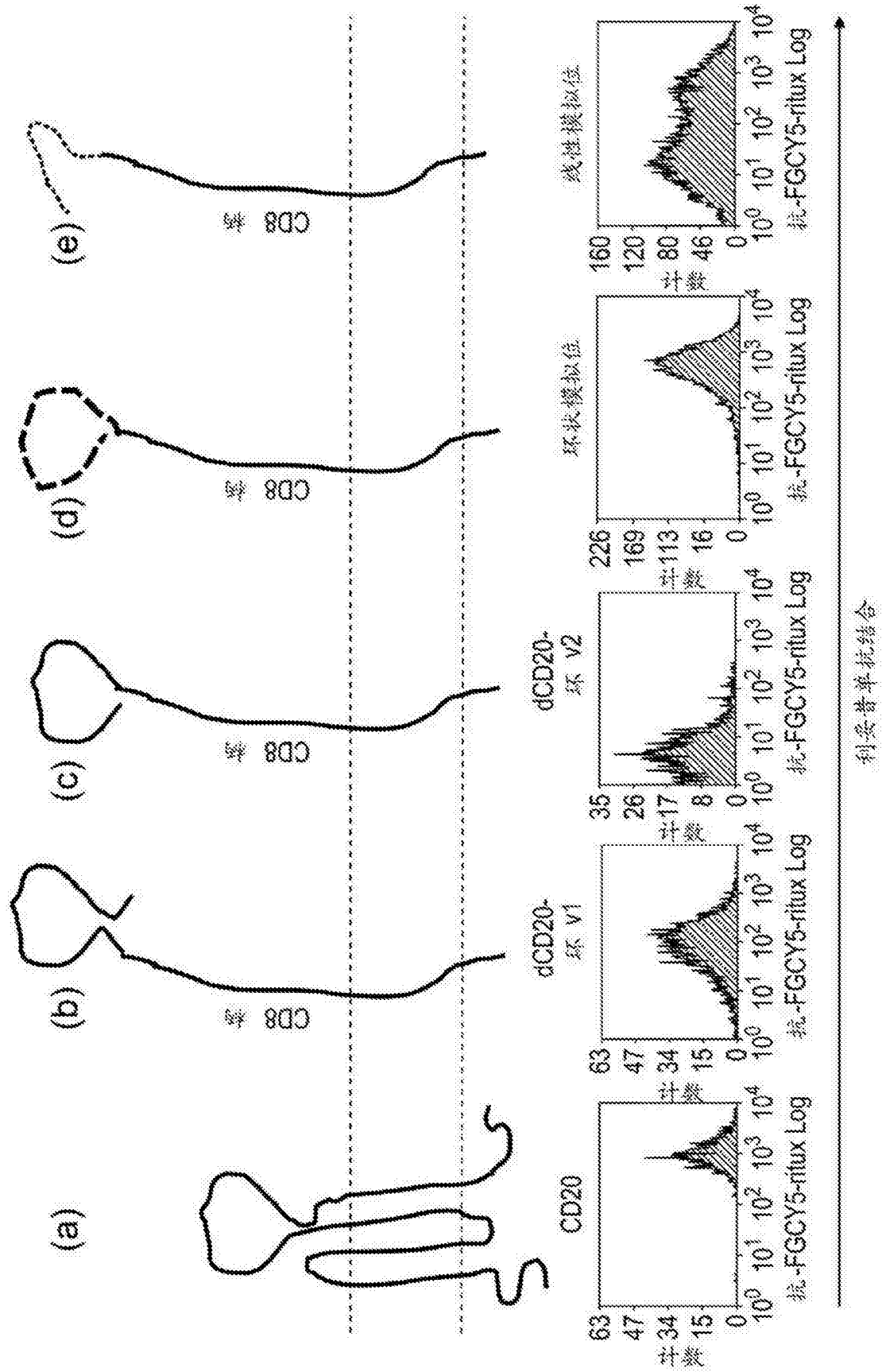


图3

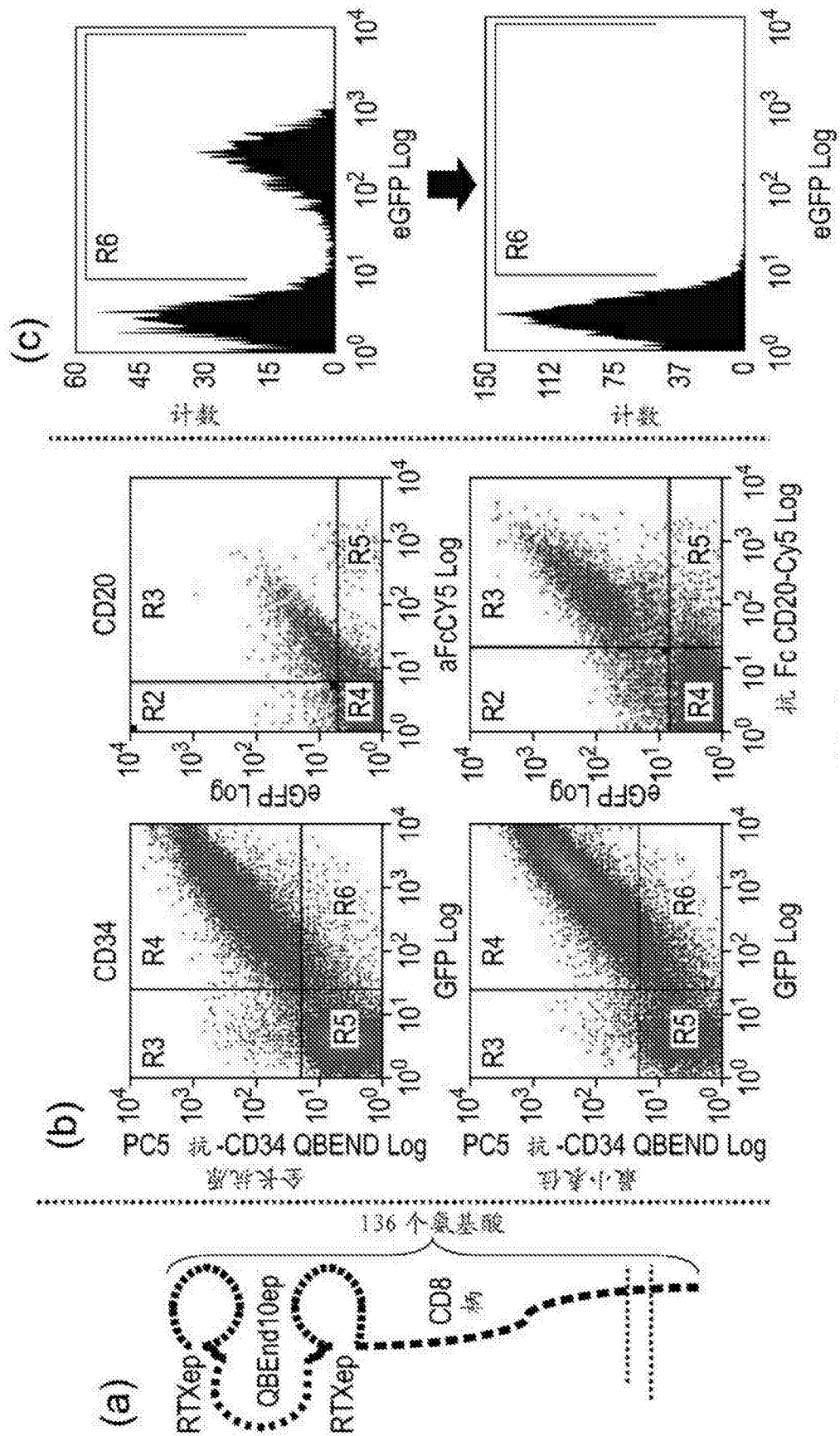


图4

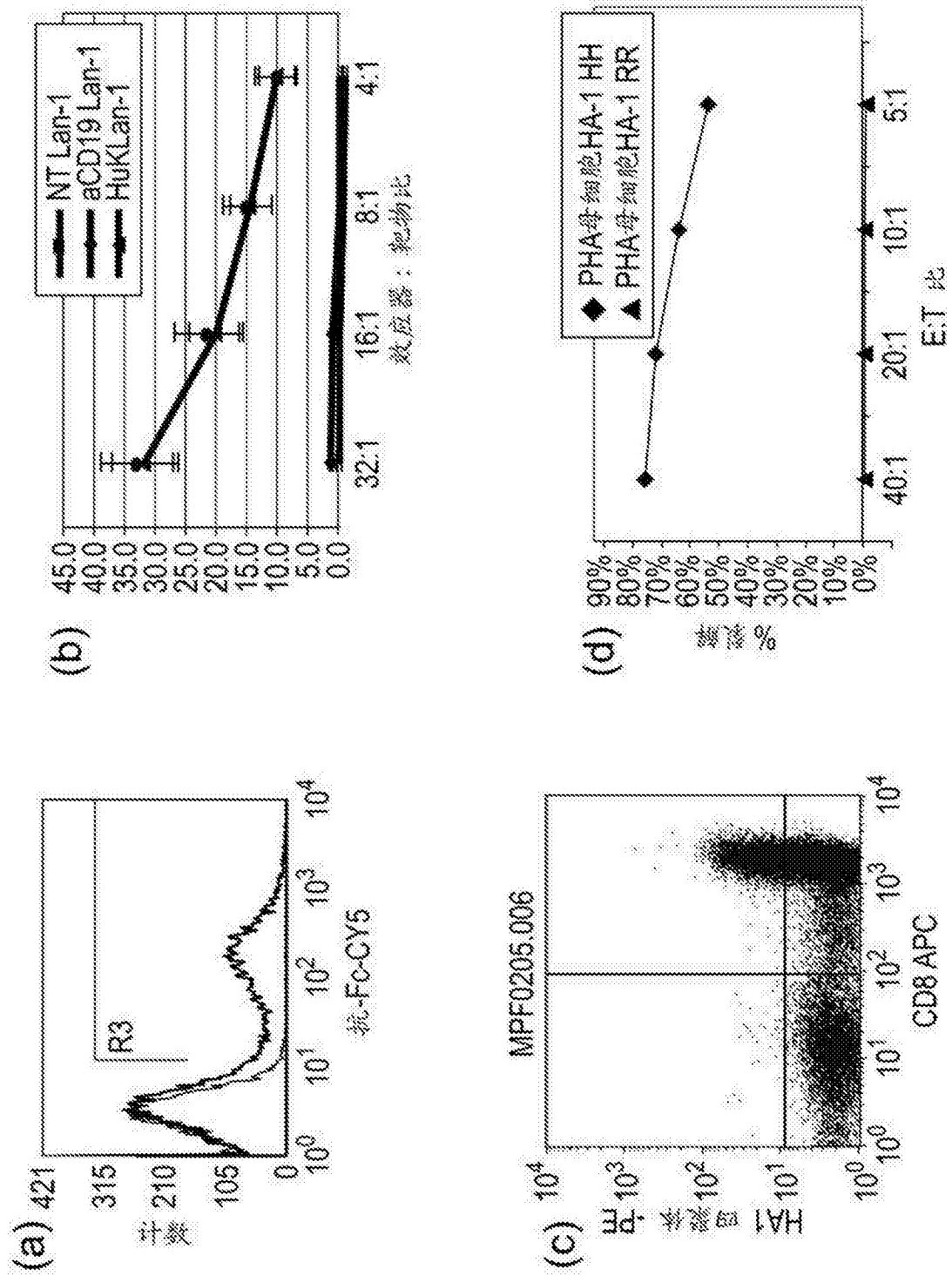


图5

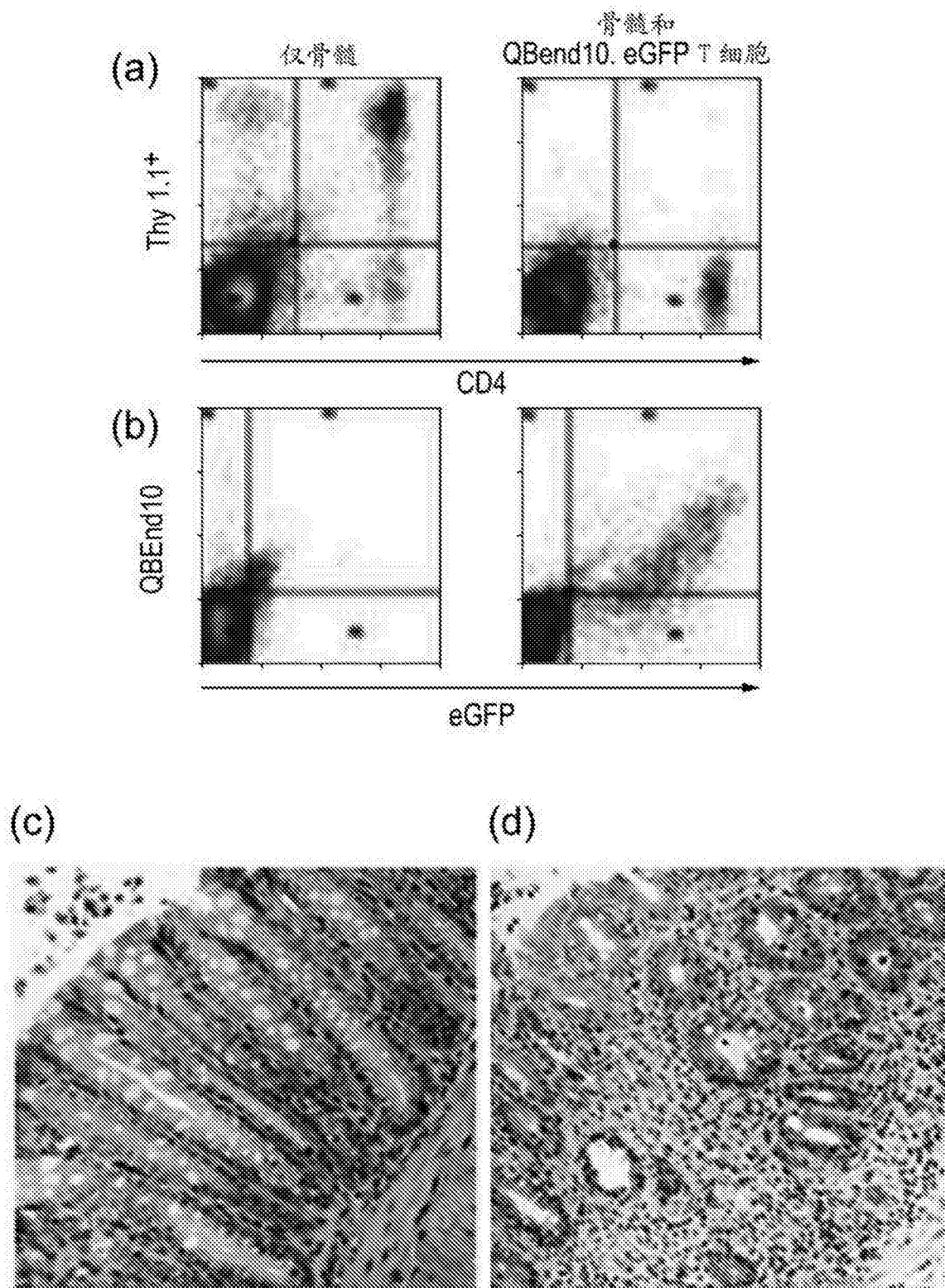


图6

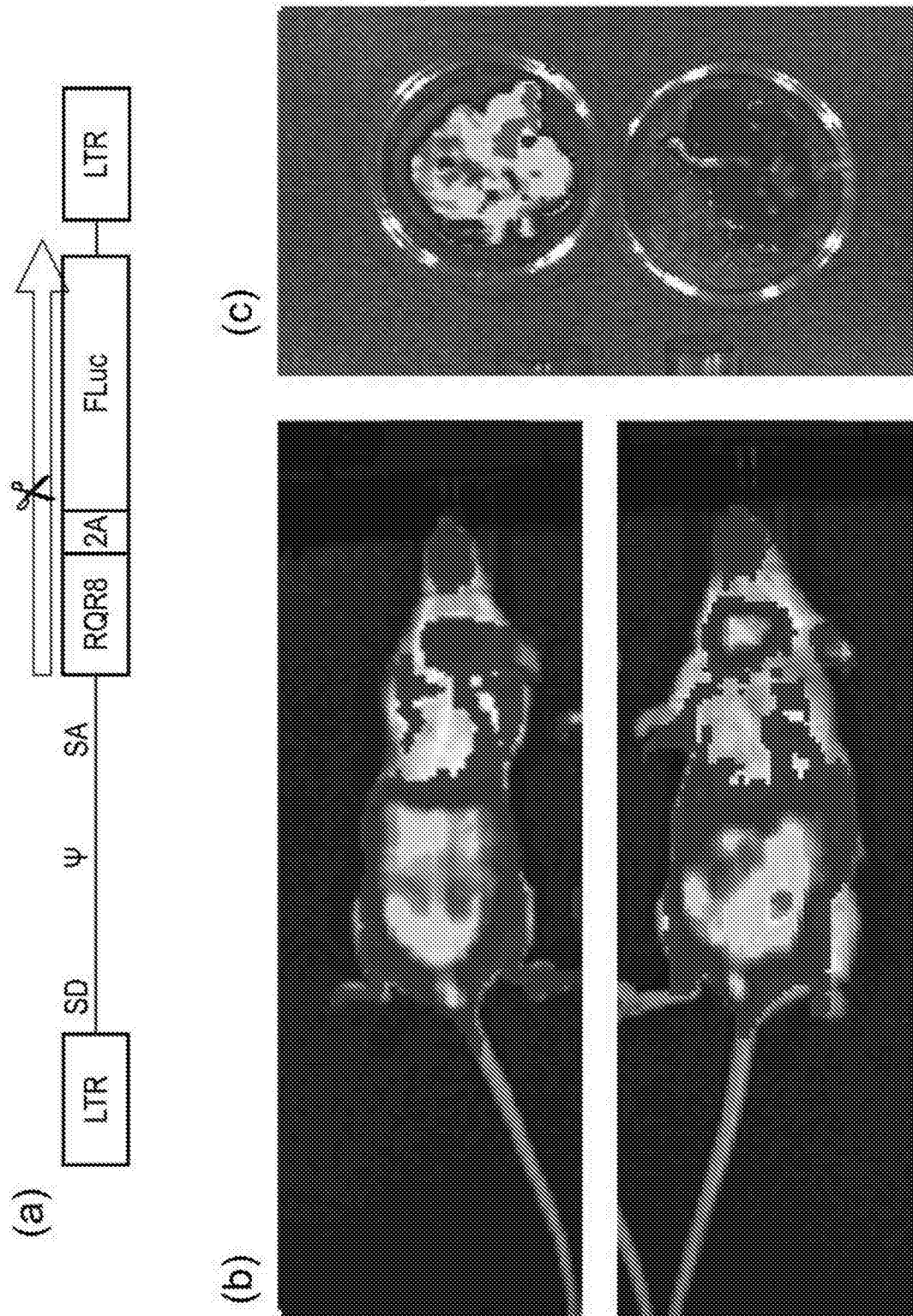


图7

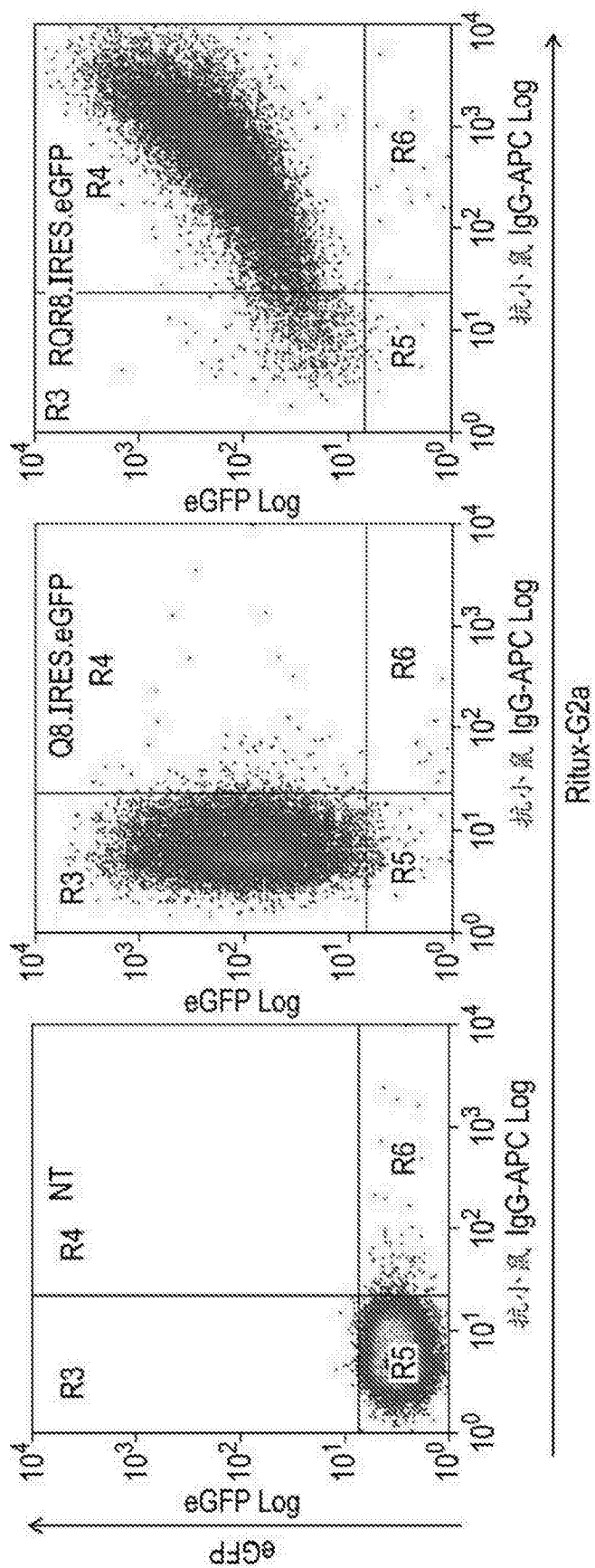


图8

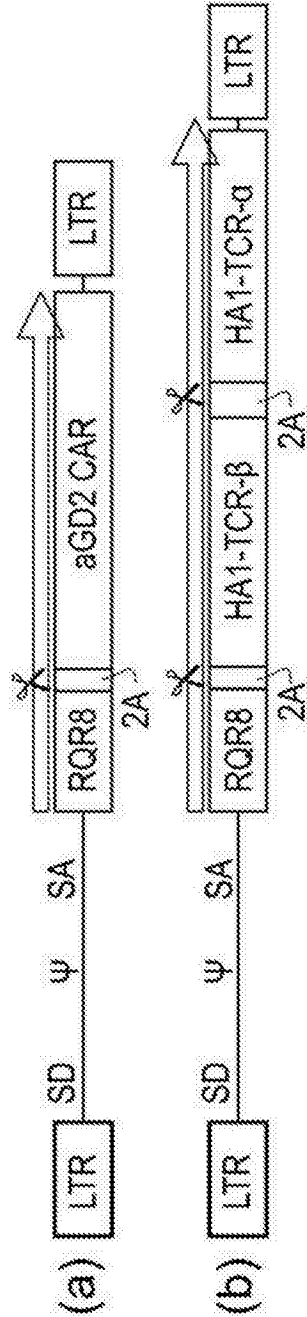


图9

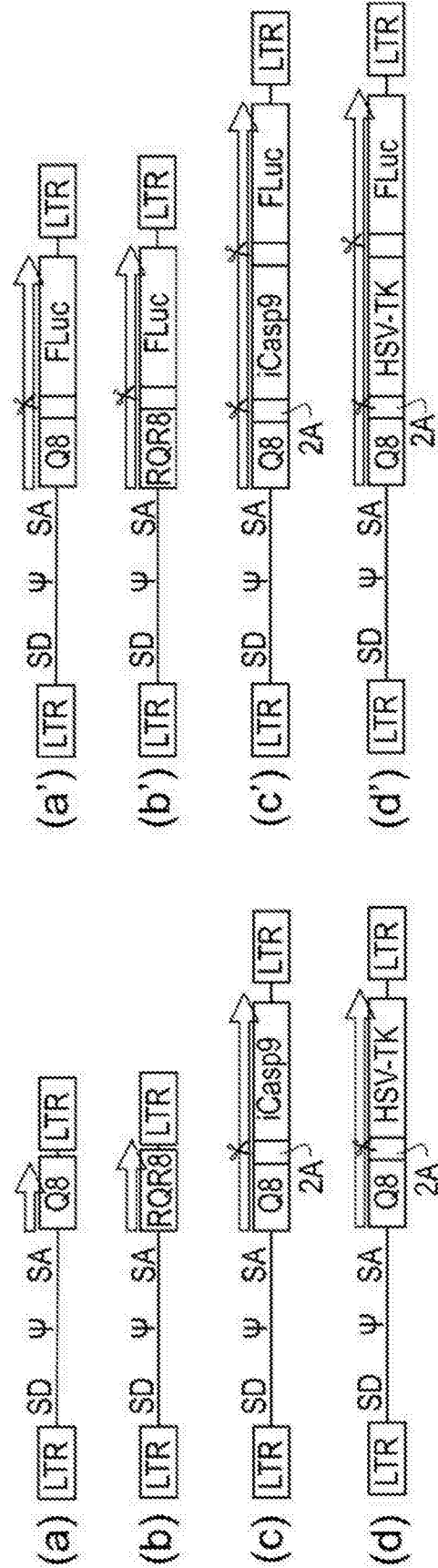


图10

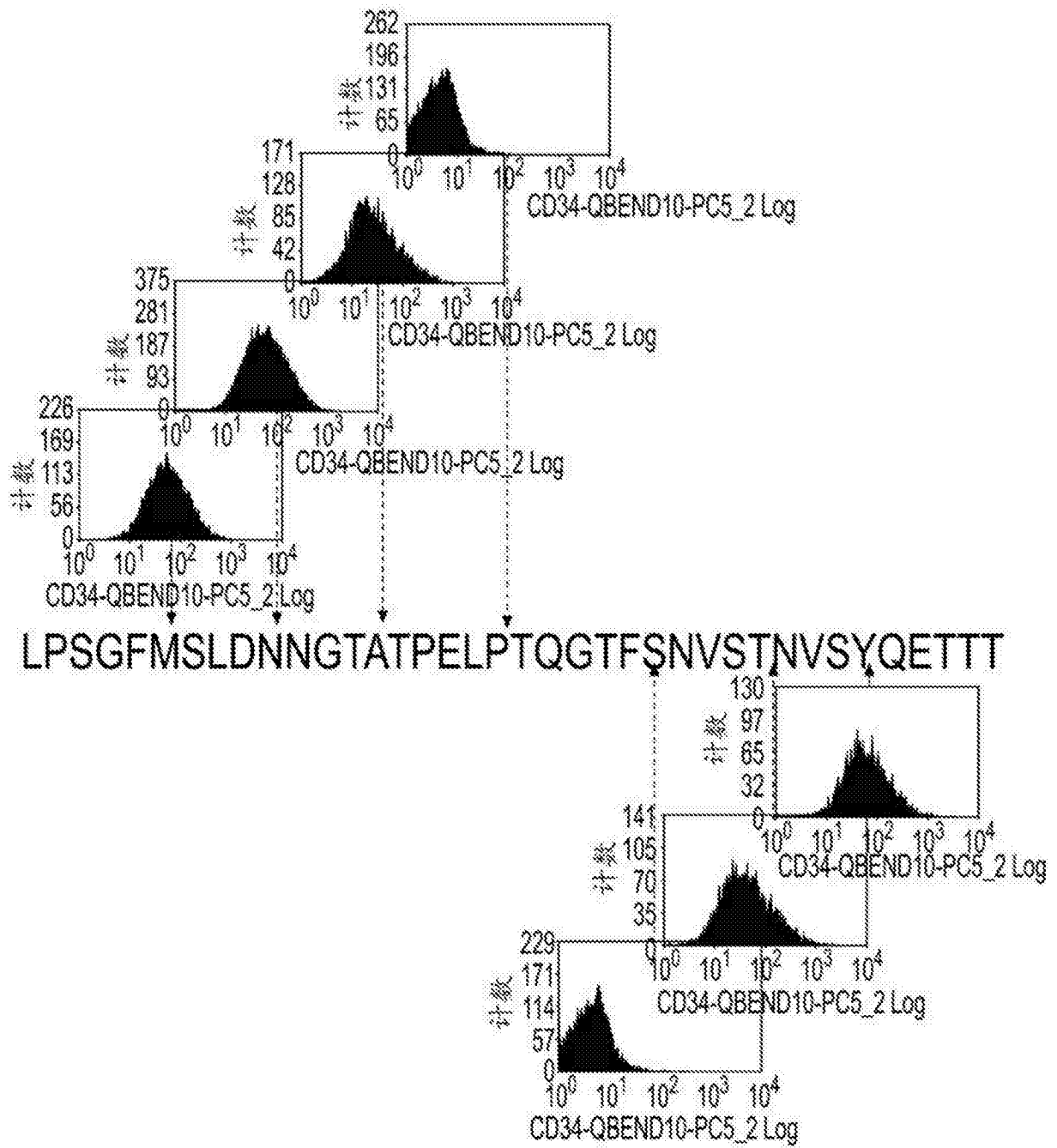


图11

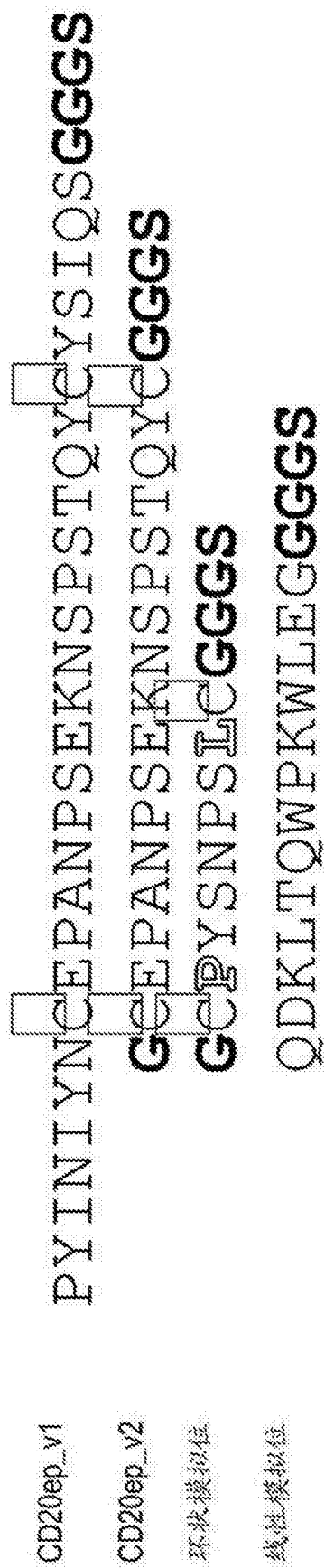


图12

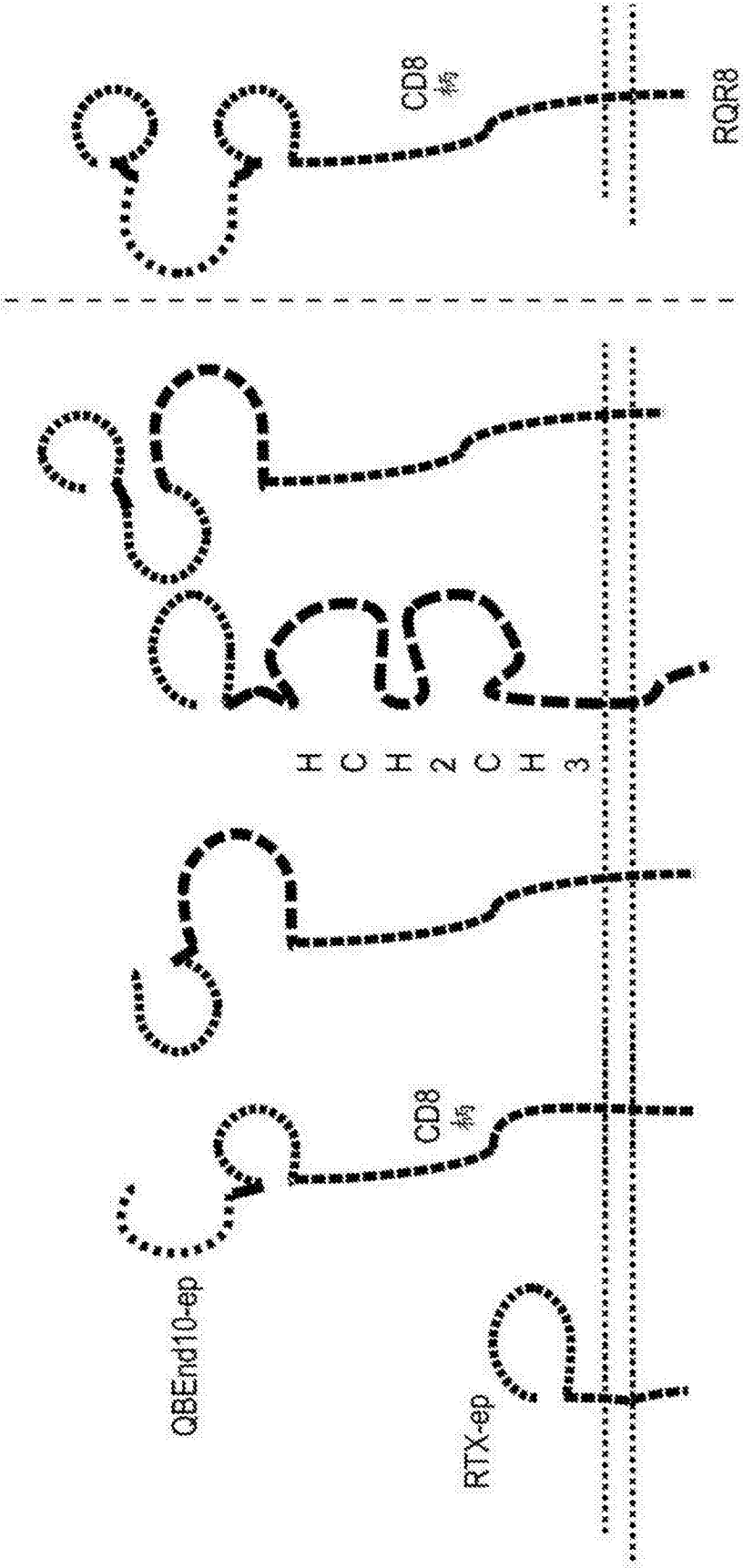


图13

表位构建体的 CDC 敏感性测定比较

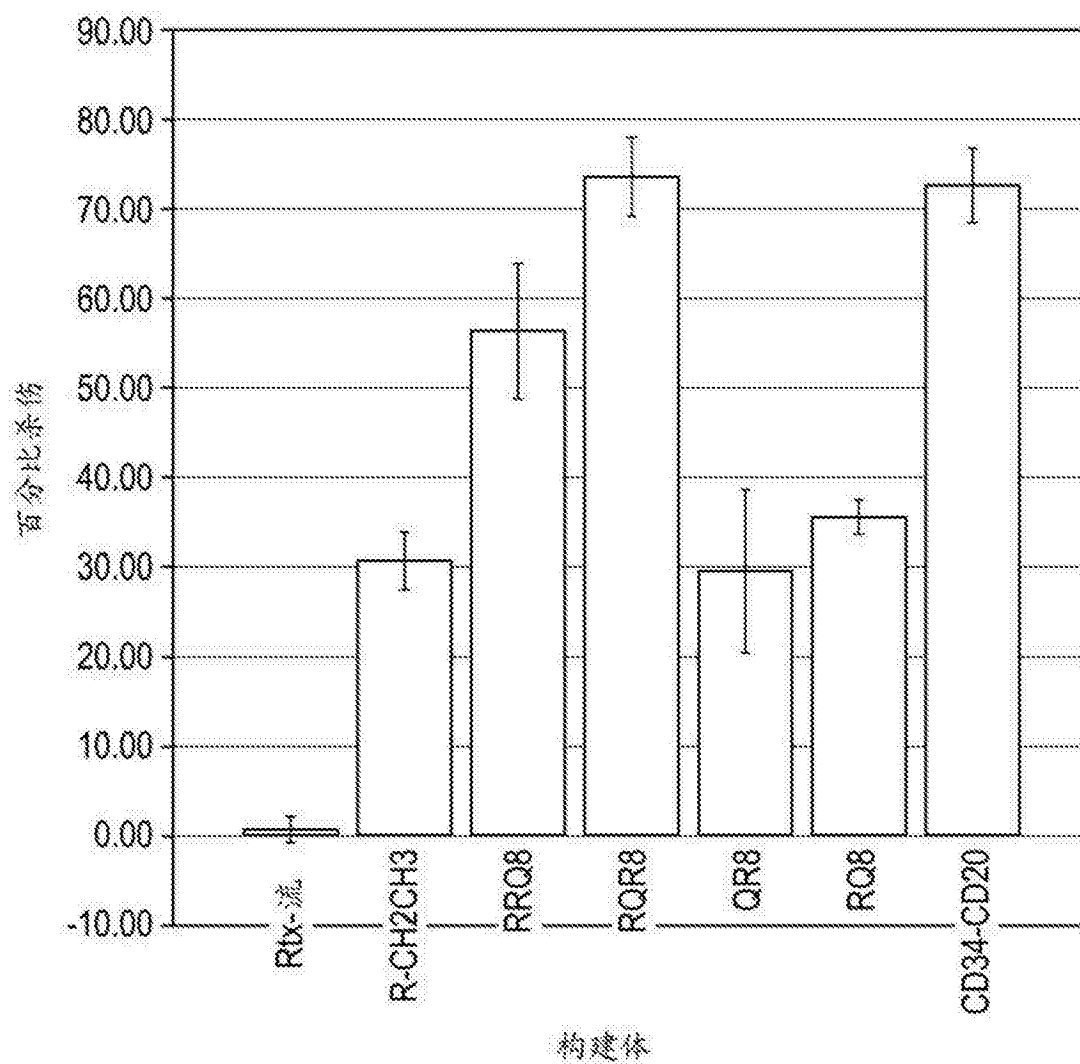


图14

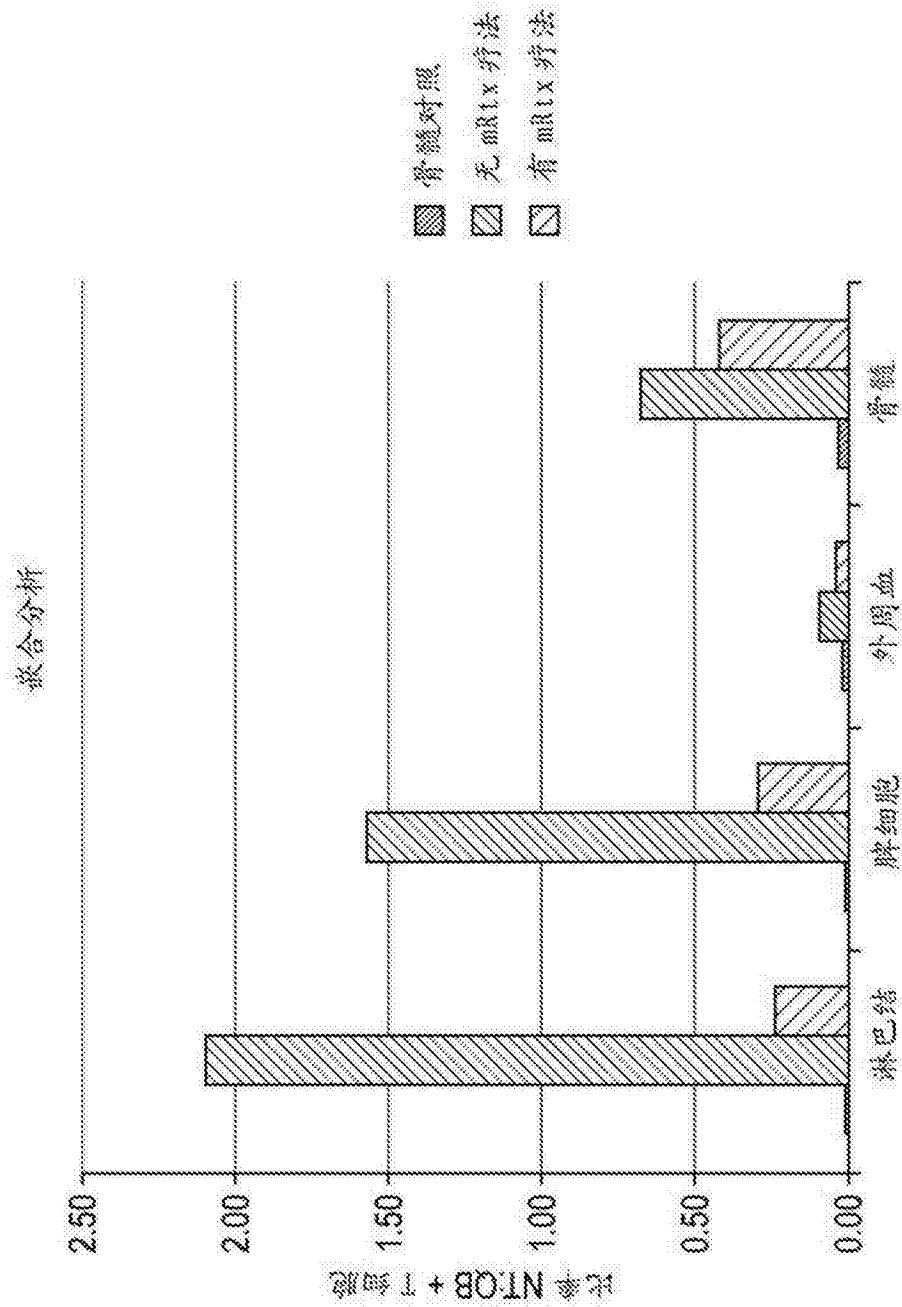


图15

