



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109715668 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201780057921.3

(22)申请日 2017.08.02

(30)优先权数据

62/370,189 2016.08.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/045159 2017.08.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/026953 EN 2018.02.08

(71)申请人 T细胞受体治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 帕特里克·博伊尔勒

格雷戈里·西兹克维克兹

罗伯特·霍夫梅斯特

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 贺淑东

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

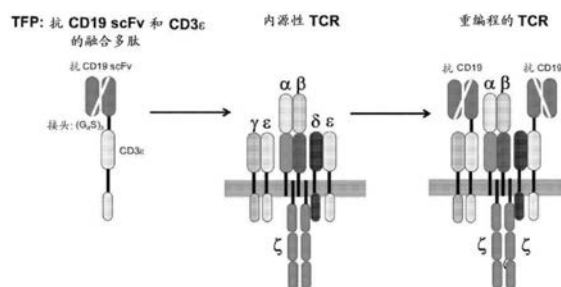
权利要求书9页 说明书68页 附图27页

### (54)发明名称

用于使用融合蛋白进行TCR重编程的组合物和方法

### (57)摘要

本文提供了T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)、经工程改造以表达一种或多种TFP的T细胞,及其用于治疗包括癌症在内的疾病的方法。



1. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

2. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

3. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

4. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

5. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

6. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含:

(a) TCR亚基, 其包含

(i) TCR细胞外结构域的至少一部分, 和

(ii) TCR细胞内结构域, 其包含来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域; 和

(b) 人或人源化抗体结构域, 其包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接, 以及

其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

7. 一种编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的分离的重组核酸分子, 所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基和人或人源化抗体结构域, 所述人或人源化抗体结构域包含为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域。

8. 如权利要求7所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接。

9. 如权利要求7-8中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述编码的抗原结合结构域通过接头序列与所述TCR细胞外结构域连接。

11. 如权利要求10所述的分离的核酸分子, 其中所述编码的接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至 4。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含TCR细胞外结构域。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含TCR跨膜结构域。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含TCR细胞内结构域。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含 (i) TCR细胞外结构域, (ii) TCR跨膜结构域, 和 (iii) TCR细胞内结构域, 其中 (i)、(ii) 和 (iii) 中的至少两个来自同一TCR亚基。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含TCR细胞内结构域, 所述TCR细胞内结构域包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$  或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述TCR亚基包含细胞内结构域, 所述细胞内结构域包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域, 或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述人或人源化抗体结构域包含抗体片段。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述人或人源化抗体结构域包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子编码(i) 分别与本文提供的抗BCMA轻链结合结构域的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3具有70-100%序列同一性的抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的轻链(LC) CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii) 分别与本文提供的抗BCMA重链结合结构域的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3具有70-100%序列同一性的抗BCMA重链结合结构域氨基酸序列的重链(HC) CDR1、HC CDR2和HC CDR3。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子编码轻链可变区,其中所述轻链可变区包含对本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含对本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述TFP包括TCR亚基的细胞外结构域,所述细胞外结构域包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述编码的TFP包括跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述编码的TFP包括跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链,CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域的序列。

27. 如权利要求26所述的分离的核酸分子,其中所述共刺激结构域是从选自由OX40、CD2、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD34、CD35、CD36、CD38、CD39、CD40、CD44、CD45、CD47、CD48、CD49、CD50、CD52、CD54、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60、CD62、CD63、CD64、CD66、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD76、CD77、CD78、CD79、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述至少一个但不超过20个对其的修饰包含介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或响应于配体与所述TFP的结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子是mRNA。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的分离的核酸分子,其中所述TFP包括TCR亚基的基

于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM), 所述免疫受体酪氨酸激活基序基于免疫受体酪氨酸的激活基序包含选自CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$  TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

31. 如权利要求30所述的分离的核酸分子, 其中所述ITAM替代CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。

32. 如权利要求30所述的分离的核酸分子, 其中所述ITAM选自由CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$  TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组, 并替代选自由CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$  TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的分离的核酸分子, 其中所述核酸包含核苷酸类似物。

34. 如权利要求33所述的分离的核酸分子, 其中所述核苷酸类似物选自由以下组成的组: 2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基 (2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基 (2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基 (2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基 (2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基 (2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基 (2'-O-NMA) 修饰的锁核酸 (LNA)、乙烯核酸 (ENA)、肽核酸 (PNA)、1', 5'-脱水己糖醇核酸 (HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、巯基膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的分离的核酸分子, 所述分离的核酸分子还包含前导序列。

36. 一种分离的多肽分子, 所述分离的多肽分子由权利要求1-35中任一项的核酸分子编码。

37. 一种分离的重组TFP分子, 所述分离的重组TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

38. 一种分离的重组TFP分子, 所述分离的重组TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域, 其中所述TFP分子能够与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

39. 一种分离的重组TFP分子, 所述分离的重组TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域, 其中所述TFP分子能够功能性整合到内源性TCR复合物中。

40. 如权利要求37所述的分离的TFP分子, 所述分离的TFP分子包含含有人或人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

41. 如权利要求37-40中任一项所述的分离的TFP分子, 其中所述抗BCMA结合结构域是scFv或V<sub>H</sub>结构域。

42. 如权利要求37-41中任一项所述的分离的TFP分子, 其中所述抗BCMA结合结构域包含与本文提供的抗BCMA轻链的氨基酸序列具有95-100%同一性的重链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

43. 如权利要求37-42中任一项所述的分离的TFP分子, 其中所述抗BCMA结合结构域包

含与本文提供的抗BCMA重链的氨基酸序列具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

44. 如权利要求37-43中任一项所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子包含TCR细胞外结构域,所述TCR细胞外结构域包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

45. 如权利要求37-44中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述TCR细胞外结构域通过接头序列。

46. 如权利要求57所述的分离的TFP分子,其中所述接头区包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

47. 一种分离的重组TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

48. 一种分离的重组TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

49. 一种分离的重组TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中所述TFP分子能够功能性整合到内源性TCR复合物中。

50. 如权利要求49所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子包含含有人或人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

51. 如权利要求47-50中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域是scFv或V<sub>H</sub>H结构域。

52. 如权利要求47-51中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含具有如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中所示的三个CDR序列的重链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

53. 如权利要求47-52中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含具有如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中所示的三个CDR序列的重链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

54. 如权利要求47-51中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有95-100%同一性的V<sub>H</sub>H结构域、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

55. 如权利要求47-51中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有95-100%同一性的V<sub>H</sub>H结构域、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。

56. 如权利要求47-53中任一项所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子包含TCR细胞外结构域,所述TCR细胞外结构域包含选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:T细胞受体的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 。

57. 如权利要求37-45中任一项所述的分离的TFP分子,其中所述抗BCMA结合结构域通过接头序列与所述TCR细胞外结构域连接。

58. 如权利要求57所述的分离的TFP分子,其中所述接头区包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

59. 如权利要求37-58中任一项所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子还包含编码共刺激结构域的序列。

60. 如权利要求37-59中任一项所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子还包含编码细胞内信号传导结构域的序列。

61. 如权利要求37-60中任一项所述的分离的TFP分子,所述分离的TFP分子还包含前导序列。

62. 一种核酸,其包含编码权利要求37-61中任一项所述的TFP的序列。

63. 如权利要求62所述的核酸,其中所述核酸选自由DNA和RNA组成的组。

64. 如权利要求62或63所述的核酸,其中所述核酸是mRNA。

65. 如权利要求62-64中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含核苷酸类似物。

66. 如权利要求65所述的核酸,其中所述核苷酸类似物选自以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、巯基膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

67. 如权利要求62-66中任一项所述的核酸,所述核酸还包含启动子。

68. 如权利要求62-67中任一项所述的核酸,其中所述核酸是体外转录的核酸。

69. 如权利要求62-68中任一项所述的核酸,其中所述核酸还包含编码聚(A)尾的序列。

70. 如权利要求62-69中任一项所述的核酸,其中所述核酸还包含3' UTR序列。

71. 一种载体,所述载体包含编码权利要求37-61中任一项的TFP的核酸分子。

72. 如权利要求71所述的载体,其中所述载体选自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。

73. 如权利要求71或72所述的载体,所述载体还包含启动子。

74. 如权利要求71-73中任一项所述的载体,其中所述载体是体外转录的载体。

75. 如权利要求71-74中任一项所述的载体,其中所述载体中的核酸序列还包含聚(A)尾。

76. 如权利要求71-75中任一项所述的载体,其中所述载体中的核酸序列还包含3' UTR。

77. 一种细胞,所述细胞包含权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子,权利要求36所述的多肽分子,权利要求37-61中任一项所述的TFP分子,权利要求62-70中任一项所述的核酸,权利要求71-76中任一项所述的载体。

78. 如权利要求77所述的细胞,其中所述细胞是人T细胞。

79. 如权利要求78所述的细胞,其中所述T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

80. 如权利要求77-79中任一项所述的细胞,所述细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含与第二多肽缔合的第一多肽,所述第一多肽包含抑制性分子的至少一部分,所述第二多肽包含来自细胞内信号传导结构域的阳性信号。

81. 如权利要求80所述的细胞,其中所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

82. 一种包含至少两个TFP分子的人CD8+T细胞或CD4+T细胞,所述TFP分子包含人或人

源化抗BCMA结合结构域、TCR胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够在人CD8+T细胞或CD4+T细胞中、细胞的表面处和/或表面上与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

83. 一种蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含:

i) TFP分子,其包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;和

ii) 至少一种内源性TCR亚基或内源性TCR复合物。

84. 如权利要求83所述的蛋白质复合物,其中所述TCR包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚基、CD3 $\gamma$  TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分。

85. 如权利要求83或84所述的蛋白质复合物,其中所述抗BCMA结合结构域通过接头序列与所述TCR细胞外结构域连接。

86. 如权利要求85所述的蛋白质复合物,其中所述接头区包含 (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, 其中n=1至4。

87. 一种蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含

(a) 由权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子编码的TFP,和

(b) 至少一种内源性TCR亚基或内源性TCR复合物。

88. 一种蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含:

i) TFP分子,其包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;和

ii) 至少一种内源性TCR亚基或内源性TCR复合物。

89. 如权利要求88所述的蛋白质复合物,其中所述TCR包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$  TCR亚基、CD3 $\gamma$  TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分。

90. 如权利要求88或89所述的蛋白质复合物,其中所述抗BCMA结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。

91. 如权利要求90所述的蛋白质复合物,其中所述接头区包含 (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, 其中n=1至4。

92. 一种人CD8+T细胞或CD4+T细胞,其包含每一权利要求83-87中任一项所述的蛋白质复合物至少两种不同的TFP蛋白。

93. 一种人CD8+T细胞或CD4+T细胞,其包含至少两种不同的由权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子编码的TFP蛋白。

94. 一种人CD8+T细胞或CD4+T细胞群,其中所述群的T细胞单独地或共同地包含至少两个TFP分子,所述TFP分子包含人 or 人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域,跨膜结构域和细胞内结构域,其中所述TFP分子能够在所述人CD8+T细胞或CD4+T细胞中、细胞的表面处和/或表面上与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

95. 一种人CD8+T细胞或CD4+T细胞群,其中所述群的T细胞单独或共同地包含至少两种由权利要求1-35中任一项的分离的核酸分子编码的TFP分子。

96. 一种制备细胞的方法,所述方法包括用权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求62-70中任一项所述的核酸或权利要求71-76中任一项所述的载体转导T细胞。

97. 一种产生RNA工程改造的细胞群的方法,所述方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞,其中所述RNA包含编码权利要求37-61中任一项所述的TFP分子的核酸。



98. 一种在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法, 所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求36所述的多肽分子、表达权利要求36所述的多肽分子的细胞、权利要求37-61中任一项所述的TFP分子、权利要求62-70中任一项所述的核酸、权利要求71-76中任一项所述的载体或权利要求77-82和88-96中任一项所述的细胞。

99. 如权利要求98所述的方法, 其中所述细胞是自体T细胞。

100. 如权利要求98所述的方法, 其中所述细胞是同种异体T细胞。

101. 如权利要求98-100中任一项所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

102. 一种治疗患有与BCMA表达相关的疾病的哺乳动物的方法, 所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求36所述的多肽分子、表达权利要求36所述的多肽分子的细胞、权利要求37-61中任一项所述的TFP分子、权利要求62-70中任一项所述的核酸、权利要求71-76中任一项所述的载体或权利要求77-82和88-96中任一项所述的细胞。

103. 如权利要求102所述的方法, 其中与BCMA表达相关的疾病选自由增殖性疾病、癌症、恶性肿瘤和与BCMA表达相关的非癌症相关适应症组成的组。

104. 如权利要求102所述的方法, 其中所述疾病是选自由以下组成的组的癌症: 间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、急性淋巴瘤母细胞性白血病(ALL); 慢性粒细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞性白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤、大细胞-滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴瘤组织增生症、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良、骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、白血病前期卵巢癌、混合性苗勒氏卵巢癌、子宫内膜样粘液性卵巢癌、胰腺腺癌、导管腺癌、子宫浆液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食管腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、与BCMA表达相关的疾病及其组合。

105. 如权利要求102所述的方法, 其中将所述表达TFP分子的细胞与增加表达TFP分子的细胞功效的剂组合施用。

106. 如权利要求102-105中任一项所述的方法, 其中与施用了有效量的表达抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物相比, 在所述哺乳动物中释放的细胞因子较少。

107. 如权利要求102-106中任一项所述的方法, 其中将所述表达TFP分子的细胞和改善与施用表达TFP分子的细胞相关的一种或多种副作用的剂组合施用。

108. 如权利要求102-107中任一项所述的方法, 其中将所述表达TFP分子的细胞与治疗与BCMA相关的疾病的剂组合施用。

109. 如权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子、如权利要求36所述的分离的多肽分子、表达权利要求36所述的多肽分子的细胞、如权利要求37-61中任一项所述的分离的TFP、如权利要求62-70中任一项所述的载体、如权利要求71-76中任一项所述的载体、如权利要求83-87中任一项所述的复合物或如权利要求77-82和88-96中任一项所述的细胞, 其用作药物。

110. 一种治疗患有与BCMA表达相关的疾病的哺乳动物的方法, 所述方法包括向所述哺

乳动物施用有效量的权利要求1-35中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求36所述的多肽分子、表达权利要求36所述的多肽分子的细胞、权利要求37-61中任一项所述的TFP分子、权利要求62-70中任一项所述的核酸、权利要求71-76中任一项所述的载体或权利要求77-82和88-96中任一项所述的细胞,其中与施用了有效量的表达抗BCMA嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞的哺乳动物相比,在所述哺乳动物中释放的细胞因子较少。

## 用于使用融合蛋白进行TCR重编程的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本专利申请要求2016年8月2日提交的美国临时申请序列号62/370,189的权益,该临时申请通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 大多数患有血液系统恶性肿瘤或晚期实体瘤的患者无法用标准疗法治愈。另外,常规治疗方案通常具有严重的副作用。已经进行了许多尝试来使患者的免疫系统参与抵制癌细胞,这种方法统称为癌症免疫疗法。然而,若干障碍使得获得临床效果变得相当困难。尽管已经鉴定了数百种所谓的肿瘤抗原,但这些抗原通常来源于自身,因此可以指导癌症免疫疗法对抗健康组织,或者免疫原性差。此外,癌细胞使用多种机制来使其自身对癌症免疫疗法的免疫攻击的起始和传播不可见或不利。

[0004] 使用嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞疗法的最新发展,其依赖于将遗传工程改造的T细胞重定向至癌细胞上的合适细胞表面分子,在利用免疫系统的能力治疗癌症方面显示出有前景的结果。例如,来自正在进行的利用B细胞成熟抗原(BCMA)特异性CAR T细胞的试验的临床结果已经显示在一些多发性骨髓瘤患者中的部分缓解(一个这样的试验可以通过clinicaltrials.gov标识符NCT02215967找到)。可选的方法是使用针对肿瘤相关肽抗原选择的T细胞受体(TCR)  $\alpha$  和  $\beta$  链来对自体T细胞进行遗传工程改造。这些TCR链将形成完整的TCR复合物,并为T细胞提供TCR的第二确定的特异性。在滑膜癌患者中用表达NY-ESO-1特异性TCR  $\alpha$  和  $\beta$  链的工程改造的自体T细胞获得了令人鼓舞的结果。

[0005] 除了表达CAR或第二TCR的遗传修饰的T细胞在体外/体内识别和破坏相应的靶细胞的能力之外,利用工程改造的T细胞成功进行患者治疗需要T细胞能够随着时间的推移强烈激活、扩增、持续,并且在疾病复发的情况下,使得能够产生“记忆”反应。CAR T细胞的高且可控制的临床功效目前仅限于间皮素阳性B细胞恶性肿瘤和表达HLA-A2的表达NY-ESO-1-肽的滑膜肉瘤患者。显然需要改进基因工程改造的T细胞以更广泛地对抗各种人恶性肿瘤。本文描述了TCR亚单位(包括CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$  和CD3 $\delta$ )的新型融合蛋白,以及具有对细胞表面抗原具有特异性的结合结构域的TCR  $\alpha$  和TCR  $\beta$  链的新型融合蛋白,所述新型融合蛋白具有克服现有方法的限制的潜力。本文描述的是新型融合蛋白,其比CAR更加高效地杀伤靶细胞,但释放相当或更低水平的促炎细胞因子。这些融合蛋白及其使用方法代表了TFP相对于CAR的优势,因为这些细胞因子的升高水平与过继CAR-T疗法的剂量限制毒性相关。

### 发明内容

[0006] 本文提供了BCMA结合蛋白,以及包含此类BCMA结合蛋白的抗体和T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)。另外,提供了经工程改造以表达一种或多种TFP的T细胞,及其用于治疗疾病的方法。

[0007] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述融合蛋白包含TCR亚基和含有抗BCMA结合结构域的人或人源化抗体结构域。

[0008] 在一个方面,本文提供了编码包含BCMA结合区的抗体例如双特异性抗体的一种或多种分离的重组核酸分子。在一些情况下,抗体是亲和力成熟抗体。在一些情况下,BCMA结合蛋白是骆驼科动物抗体或单结构域抗体(sdAb)。在一些情况下,抗体具有包含SEQ ID NO:24的V<sub>H</sub>H区。在其它情况下,抗体具有包含SEQ ID NO:28的V<sub>H</sub>H区。在一些情况下,抗体是具有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27所示的CDR序列的单结构域抗体。在一些情况下,抗体是具有如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中所示的CDR序列的单结构域抗体。

[0009] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分和含有来自CD3 $\epsilon$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;和包含抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域,其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

[0010] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分和含有来自CD3 $\gamma$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;和包含抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域,其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

[0011] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分和含有来自CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;和包含抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域,其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

[0012] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分和含有来自TCR $\alpha$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;和包含抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域,其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

[0013] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基,其包含TCR细胞外结构域的至少一部分和含有来自TCR $\beta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域的TCR细胞内结构域;和包含抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域,其中所述TCR亚基与所述抗体结构域可操作地连接,并且其中所述TFP在T细胞中表达时掺入TCR。

[0014] 在一个方面,本文提供了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的重组核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基和含有为抗BCMA结合结构域的抗原结合结构域的人或人源化抗体结构域。

[0015] 在一些情况下,TCR亚基与抗体结构域可操作地连接。在一些情况下,TFP当在T细胞中表达时掺入TCR。在一些情况下,编码的抗原结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。在一些情况下,编码的接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。在一些情况下,TCR亚基包含TCR细胞外结构域。在一些情况下,TCR亚基包含TCR跨膜结构域。在一些情况下,TCR

亚基包含TCR细胞内结构域。在一些情况下,TCR亚基包含(i) TCR细胞外结构域,(ii) TCR跨膜结构域和(iii) TCR细胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。在一些情况下,TCR亚基包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域,或对其具有至少一个、两个或三个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,TCR亚基包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,人或人源化抗体结构域包含抗体片段。在一些情况下,人或人源化抗体结构域包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。在一些情况下,分离的核酸分子编码(i)分别与本文提供的抗BCMA轻链结合结构域的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3具有70-100%序列同一性的抗BCMA轻链结合结构域氨基酸序列的轻链(LC)CDR1、LC CDR2和LC CDR3,和/或(ii)分别与本文提供的抗BCMA重链结合结构域的(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3具有70-100%序列同一性的抗BCMA重链结合结构域氨基酸序列的重链(HC)CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一些情况下,分离的核酸分子编码轻链可变区,其中轻链可变区包含对本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的轻链可变区的轻链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一些情况下,分离的核酸分子编码重链可变区,其中所述重链可变区包含对本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有至少一个但不多于30个修饰的氨基酸序列,或与本文提供的重链可变区的重链可变区氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。

[0016] 在一些情况下,TFP包括TCR亚基的细胞外结构域,其包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,编码的TFP包括跨膜结构域,其包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,编码的TFP包括跨膜结构域,其包含选自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、TCR $\zeta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,分离的核酸分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,共刺激结构域是从选自由OX40、CD2、CD27、CD28、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 组成的组的蛋白质获得的功能性信号传导结构域以及对其具有至少1个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,分离的核酸分子还包含前导序列。在一些情况下,分离的核酸分子是mRNA。

[0017] 在一些情况下,TFP包括TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),其包括选自由CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基、TCR $\zeta$ 链、Fc $\epsilon$ 受体1链、Fc $\epsilon$ 受体2链、Fc $\gamma$ 受体1链、Fc $\gamma$ 受体2a链、Fc $\gamma$ 受体2b1链、Fc $\gamma$ 受体2b2链、Fc $\gamma$ 受体3a链、Fc $\gamma$ 受体3b链、Fc $\beta$ 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分,其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,ITAM取代了CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 或CD3 $\epsilon$ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自由CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基和CD3 $\delta$

TCR亚基组成的组,并取代选自自由CD3 $\zeta$ TCR亚基、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

[0018] 在一些情况下,核酸包含核苷酸类似物。在一些情况下,核苷酸类似物选自自由以下组成的组:2'-O-甲基,2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE),2'-O-氨基丙基,2'-脱氧,T-脱氧-2'-氟代,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP),2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE),2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP),T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE),2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、巯基膦酸酯核苷酸和2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺。

[0019] 在一个方面,本文提供了由本文提供的核酸分子编码的分离的多肽分子。

[0020] 在一个方面,本文提供了分离的TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0021] 在一个方面,本文提供了分离的TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中TFP分子能够与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

[0022] 在一个方面,本文提供了分离的TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中TFP分子能够功能性整合到内源性TCR复合物中。

[0023] 在一些情况下,分离的TFP分子包含含有人或人源化抗BCMA结合结构域的抗体或抗体片段、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。在一些情况下,抗BCMA结合结构域是scFv或V<sub>H</sub>结构域。在一些情况下,抗BCMA结合结构域包含与本文提供的重链的氨基酸序列具有95-100%同一性的重链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,抗BCMA结合结构域包含与本文提供的轻链的氨基酸序列具有95-100%同一性的轻链、其功能性片段或其具有至少一个但不超过30个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,分离的TFP分子包含TCR细胞外结构域,其包含选自自由TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基、CD3 $\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分、其功能性片段以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,抗BCMA结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。在一些情况下,接头区包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

[0024] 在一些情况下,分离的TFP分子还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,分离的TFP分子还包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在一些情况下,分离的TFP分子还包含前导序列。

[0025] 在一个方面,本文提供了包含编码本文提供的TFP的核酸分子的载体。在一些情况下,载体选自自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。在一些情况下,载体还包含启动子。在一些情况下,载体是体外转录的载体。在一些情况下,载体中的核酸序列还包含聚(A)尾。在一些情况下,载体中的核酸序列还包含3' UTR。

[0026] 在一个方面,本文提供了包含本文提供的载体的细胞。在一些情况下,细胞是人T细胞。在一些情况下,T细胞是CD8+或CD4+T细胞。在一些情况下,细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含与第二多肽缔合的第一多肽,所述第一多肽包含抑制性分

子的至少一部分,所述第二多肽包含来自细胞内信号传导结构域的阳性信号。在一些情况下,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域(primary signaling domain)的第二多肽。

[0027] 在一个方面,本文提供了包含至少两个TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中TFP分子能够在人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、细胞的表面处和/或表面上与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

[0028] 在一个方面,本文提供了蛋白质复合物,其包含:TFP分子,所述TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;和至少一种内源性TCR复合物。

[0029] 在一些情况下,TCR包含选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:TCR $\alpha$ 链、TCR $\beta$ 链、CD3 $\epsilon$ TCR亚基、CD3 $\gamma$ TCR亚基和CD3 $\delta$ TCR亚基。在一些情况下,抗BCMA结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。在一些情况下,接头区包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至4。

[0030] 在一些情况下,TFP分子包含一个或多个嵌合结构域,其包含来自多个TCR或CD3亚基的序列。在一些情况下,嵌合TFP通过基因编辑技术进行工程改造。

[0031] 在一个方面,本文提供了人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其包含每一本文提供的蛋白质复合物至少两种不同的TFP蛋白。

[0032] 在一个方面,本文提供了制备细胞的方法,所述方法包括用本文提供的载体转导T细胞。

[0033] 在一个方面,本文提供了产生RNA工程改造的细胞群的方法,所述方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞,其中RNA包含编码本文提供的TFP分子的核酸。

[0034] 在一个方面,本文提供了在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的表达本文提供的TFP分子或表达本文提供的多肽分子的细胞。

[0035] 在一些情况下,细胞是自体T细胞。在一些情况下,细胞是同种异体T细胞。在一些情况下,哺乳动物是人。

[0036] 在一个方面,本文提供了治疗患有与BCMA表达相关的疾病的哺乳动物的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的本文提供的TFP分子、本文提供的细胞或本文提供的多肽分子。在一些情况下,与BCMA表达相关的疾病选自由以下组成的组:增殖性疾病、癌症、恶性肿瘤和与BCMA表达相关的非癌症相关适应症,例如系统性红斑狼疮、高血压或肾脏病症。在一些情况下,该疾病是选自由以下组成的组的癌症:肾细胞癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌和胃癌。

[0037] 在一些情况下,该疾病是选自由以下组成的组的癌症:浆细胞病症、B细胞癌、白血病、淋巴瘤或与BCMA表达相关的疾病及其组合。

[0038] 在一些情况下,将表达TFP分子的细胞与增加表达TFP分子的细胞的功效的剂组合施用。此类剂可以是例如化学治疗剂和/或通过增加哺乳动物中一种或多种肿瘤的通透性来增加表达TFP分子的细胞的功效的剂。在一些情况下,增加表达TFP分子的细胞的功效的剂是环磷酸胺。在一些情况下,与施用了有效量的表达抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物相比,该哺乳动物中释放的细胞因子较少。在一些情况下,将表达TFP分子的细

胞和改善与施用表达TFP分子的细胞相关的一种或多种副作用的剂组合施用。在一些情况下,将表达TFP分子的细胞与治疗与BCMA相关的疾病的剂组合施用。

[0039] 在一个方面,本文提供的分离的核酸分子、本文提供的分离的多肽分子、本文提供的分离的TFP、本文提供的复合物、本文提供的载体或本文提供的细胞用作药物。

[0040] 在一个方面,本文提供了治疗患有与BCMA表达相关的疾病的哺乳动物的方法,所述方法包括向哺乳动物施用有效量的本文提供的TFP分子、本文提供的细胞或本文提供的多肽分子,其中与施用了有效量的表达抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的哺乳动物相比,哺乳动物中释放的细胞因子较少。

[0041] 通过引用并入

[0042] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出通过引用并入。

## 附图说明

[0043] 在所附权利要求中具体阐述了本发明的新颖特征。通过参考阐述其中利用本发明的原理的说明性实施方案的以下详细描述以及其附图,将更好地理解本发明的特征和有利方面:

[0044] 图1是展示本发明的T细胞受体融合多肽(TFP)的用途的示意图。示例性TFP含有通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA scFv和全长CD3 $\epsilon$ 多肽。当由T细胞产生或被引入T细胞时,TFP与内源性T细胞受体(TCR)的其它多肽(显示包括两个CD3 $\epsilon$ 多肽、一个CD3 $\gamma$ 多肽、一个CD3 $\delta$ 多肽、两个CD3 $\zeta$ 多肽、一个TCR $\alpha$ 亚基和一个TCR $\beta$ 亚基,其中水平灰色区段代表质膜)缔合以形成重编程的TCR,其中一个或两个内源性CD3 $\epsilon$ 多肽被TFP取代。

[0045] 图2A表示展示本发明的重编程的T细胞受体融合多肽(TFP)的示例性变化的示意图。

[0046] 图2B说明含有TFP的示例性重编程TCR,其含有抗BCMA TFP,包括i) 抗通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>H和全长TCR V $\alpha$ 多肽以及ii) 通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>H和全长TCR V $\beta$ 多肽。

[0047] 图2C说明了包含多个TFP的示例性重编程TCR,其包括i) 通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>H和截短的( $\Delta$ )TCR多肽以及ii) 通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的BCMA V<sub>H</sub>H和全长CD3 $\epsilon$ 多肽。截短的( $\Delta$ )TCR多肽通过V $\alpha$ 的缺失而被截短。

[0048] 图2D说明了包含多个TFP的示例性重编程TCR,其包括i) 通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>H和截短的( $\Delta$ )TCR V $\alpha$ 多肽以及ii) 通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>H和截短的( $\Delta$ )TCR V $\beta$ 多肽。截短的( $\Delta$ )TCR多肽通过V $\beta$ 的缺失而被截短。

[0049] 图3是展示使用本发明的T细胞受体融合多肽(TFP)的示意图。示例性TFP含有通过(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头序列融合的抗BCMA V<sub>H</sub>结构域和全长CD3 $\epsilon$ 多肽。当由T细胞产生或被引入T细胞时,TFP与内源性T细胞受体(TCR)的其它多肽(经显示包括两个CD3 $\epsilon$ 多肽、一个CD3 $\gamma$ 多肽、一个CD3 $\delta$ 多肽、两个CD3 $\zeta$ 多肽、一个TCR $\alpha$ 亚基和一个TCR $\beta$ 亚基,其中水平灰色区段代表质膜)缔合以形成重编程的TCR,其中内源性CD3 $\epsilon$ 多肽之一或两者被TFP取代。

[0050] 图4是展示一系列编码各种TFP的DNA构建体的示意图。

[0051] 图5是描绘慢病毒转导后抗BCMA TFP在T细胞上的表面表达的示例性条形图。不转



导效应T细胞或用抗BCMA-CD3 $\epsilon$  TFP或抗BCMA-CD3  $\gamma$  TFP构建体转导效应T细胞。在IL-2中扩增10天后,通过流式细胞术测定它们的表面TFP表达。

[0052] 图6是描绘通过抗BCMA TFP杀伤表达BCMA的RPMI8226靶细胞的示例性条形图。将转导的效应T细胞扩增12天,然后以10:1或5:1的E:T比与 $1 \times 10^4$  RPMI8226靶细胞一起孵育4小时。在流式细胞术细胞毒性测定中测定细胞毒性百分比。

[0053] 图7A是描绘抗BCMA TFP随时间推移杀伤BCMA转导的HeLa靶细胞的示例性图。将非转导的或用抗BCMA-CD3 $\epsilon$  TFP或抗BCMA-CD3  $\gamma$  TFP转导的效应T细胞扩增7天,然后与 $1 \times 10^4$  HeLa或HeLa-BCMA靶细胞一起孵育。在RTCA测定中测定指示细胞毒性的细胞指数。以5:1 (图7B)、1:1 (图7C) 和1:5 (图7D) 的E:T比用呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、TCR $\beta$ 和CD28 $\zeta$ 形式的抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28) 重复测定;以及以5:1 (图7E)、1:1 (图7F) 和1:5 (图7G) 的E:T比用具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  和TCR $\beta$ 形式以及具有HL取向的呈CD3 $\epsilon$ 形式的抗BCMA scFv2 (SEQ ID NO:43) 重复测定。

[0054] 图8A是描述用抗BCMA TFP转导的T细胞响应于携带BCMA的靶细胞而释放IL-2的示例图。将非转导的或用抗BCMA-CD3 $\epsilon$  TFP或抗BCMA-CD3  $\gamma$  TFP转导的效应T细胞扩增7天,然后与 $1 \times 10^4$  HeLa或HeLa-BCMA靶细胞一起孵育。IL-2的产生由2-plex Luminex测定。

[0055] 图8B是描绘用抗BCMA TFP转导的T细胞响应于携带BCMA的靶细胞释放IFN- $\gamma$ 的示例性图。将非转导的或用抗BCMA-CD3 $\epsilon$  TFP或抗BCMA-CD3  $\gamma$  TFP转导的效应T细胞扩增7天,然后与 $1 \times 10^4$  HeLa或HeLa-BCMA靶细胞一起孵育。通过2-plex Luminex测定IFN- $\gamma$ 的产生。

[0056] 图9是描绘用抗BCMA TFP转导的T细胞响应于携带BCMA的靶细胞而脱粒的示例性图。将非转导的或用50MOI的抗BCMA-CD3 $\epsilon$  TFP或抗BCMA-CD3  $\gamma$  TFP转导的效应T细胞扩增13天,然后与 $1 \times 10^4$ 个指定的BCMA+ve RPMI8226靶细胞一起孵育。测定CD3+CD8+门中CD107+细胞的百分比。

[0057] 图10是显示通过细胞活化验证TFP表达的一系列图。在慢病毒转导或mRNA电穿孔后,通过流式细胞术证实抗BCMA TFP对靶细胞的活化。用与CD3 $\epsilon$ 亚基连接的BCMA阳性对照scFv (SEQ ID NO:45) 和呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、TCR $\beta$ 和CD28 $\zeta$ 形式的单结构域抗体(sdAb) 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28) 转导T细胞。将转导的T细胞和BCMA阳性K562靶细胞(灰色条)以1:1的比率共培养过夜。BCMA阴性K562细胞(黑色条)用作阴性对照,非转导的BCMA阳性T细胞培养物(“NT”)也用作阴性对照。对细胞的CD25 (10A) 和CD69 (10B) 进行染色。对于拥有具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  和TCR $\beta$ 形式和具有HL取向的呈CD3 $\epsilon$ 形式的抗BCMA scFv2 (SEQ ID NO:43) 的TFP T细胞,图10C (CD25阳性细胞) 和10D (CD69阳性细胞) 显示相似结果。所有TFP (在任一方向上) 能够活化BCMA阳性靶细胞(灰色条),但不活化BCMA阴性细胞(黑色条)。在图10E中,用与CD3 $\epsilon$ 亚基连接的BCMA阳性对照scFv (SEQ ID NO:45) 和呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、TCR $\beta$ 和CD28 $\zeta$ 的形式的单结构域抗体(sdAb) 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28) 转导细胞;在图10F中,用具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  和TCR $\beta$ 形式和具有HL取向的呈CD3 $\epsilon$ 形式的抗BCMA scFv2 (SEQ ID NO:43) 转导细胞。如图所示,除阴性对照外,所有TFP T细胞在与BCMA阳性靶细胞(灰色条)接触后与BCMA阴性细胞(黑色条)相比具有升高的粒酶B水平;在图10G (E:T 3:1) 和图10H (E:T 1:3) 中,用与CD3 $\epsilon$ 亚基连接的BCMA阳性对照scFv1 (SEQ ID NO:45)、呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、TCR $\beta$ 形式的单结构域抗体(sdAb) 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28) 和具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  和TCR $\beta$ 形式的抗BCMA scFv2 (SEQ ID NO:43) 转导细胞。如10G中所示,在3:1的效应细

胞对T细胞的比率下,除空载体外,所有构建体均足以减少肿瘤细胞的数量。在1:3的效应细胞对T细胞的比率下(10H),所有构建体都能够以稍微更多的变化效率减少肿瘤细胞的数量。实心条代表BCMA阴性HeLa细胞,空条代表BCMA阳性细胞。

[0058] 图11是显示抗BCMA scFv1TFP T细胞的体外分析及其在体内多发性骨髓瘤模型中的功效的一系列图。通过以3:1(图11A)或1:3(图11B)比率的效应细胞对靶细胞比率用表达萤光素酶的HeLa-CD19(阴性对照)或HeLa-BCMA肿瘤靶细胞培养T细胞24小时,来测试呈CD3 $\epsilon$ 形式的TFP T细胞或呈CD28 $\zeta$ 或41BB $\zeta$ 形式的CAR T细胞的溶细胞活性。进行萤光素酶测定并且相对于单独的靶细胞(如通过非转导的T细胞或空载体T细胞所证明的)计算杀伤百分比。还通过实时细胞毒性测定(RTCA)测试TFP或CAR T细胞的溶细胞功能。将T细胞与BCMA阳性靶细胞(HeLa-BCMA)或BCMA阴性肿瘤靶标(HeLa-CD19)以1:3(图11C)或1:3(图11D)的E:T比共培养。测量如由细胞指数值所指示的细胞阻抗(Cellular impedance)以测定细胞毒性潜力。将非转导的或用如上所列的抗BCMA TFP或CAR构建体转导的效应T细胞与BCMA阳性靶细胞(HeLa-BCMA)或BCMA阴性靶细胞(HeLa-CD19)以3:1和1:3的E:T比在如上所述的RTCA中孵育。测量细胞上清液中的释放的细胞因子IFN- $\gamma$ (图11E)和IL-2(图11F)。

[0059] 图12是显示scFv2(HL形式)和V<sub>H</sub>H2TFP T细胞的体内功效的一系列图。用RPMI-8226肿瘤细胞接种小鼠,然后使用空载体T细胞作为阴性对照和scFv1-CD3 $\epsilon$ TFP T细胞作为阳性对照进行处理(图12A);呈 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\beta$ 形式的V<sub>H</sub>H2TFP T细胞(图12B),和呈 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\beta$ 形式的scFv2TFP T细胞(图12C)。每个图中的每一行代表一只小鼠。数据表示随着以天表示的时间推移以mm<sup>3</sup>为单位的肿瘤体积。第0天表示接种肿瘤细胞后三周的治疗开始日。

[0060] 图13是显示上文图11中使用的TFP和CAR T细胞的体内功效的一系列图。为了评估TFP对比CAR的效力,使用RPMI8226多发性骨髓瘤细胞和NSG小鼠模型。在T细胞注射后第8天开始在TFP和CAR T组中观察到肿瘤体积的显著减小(图13A)。与对照相比,所有组中通过肿瘤的平均辐射度(radiance of the tumor)评估的肿瘤负荷显著降低(图13B)。另外,与CD28 $\zeta$ CAR T组相比,TFP和41BB $\zeta$ CAR T细胞组显示增加的存活率(图13C)。

## 具体实施方式

[0061] 在一个方面,本文描述了编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的分离的核酸分子,所述T细胞受体融合蛋白包含TCR亚基和含有抗BCMA结合结构域的人或人源化抗体结构域。在一些实施方案中,TCR亚基包含TCR细胞外结构域。在其它实施方案中,TCR亚基包含TCR跨膜结构域。在其它实施方案中,TCR亚基包含TCR胞内结构域。在另外的实施方案中,TCR亚基包含(i) TCR细胞外结构域,(ii) TCR跨膜结构域和(iii) TCR细胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。在另外的实施方案中,TCR亚基包含TCR细胞内结构域,其包含选自CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ 的细胞内信号传导结构域的刺激结构域,或对其具有至少一个、两个或三个修饰的氨基酸序列。在另外的实施方案中,TCR亚基包含细胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 $\zeta$ 的功能性信号传导结构域的刺激结构域,或对其具有至少一个、两个或三个修饰的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含抗体片段。在一些实施方案中,人或人源化抗体结构域包含scFv或V<sub>H</sub>结构域。

[0063] 在一些实施方案中,分离的核酸分子包含(i) 本文提供的任何抗BCMA轻链结合结



[0073] 在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。在一些情况下,接头区包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $4$ 。在一些情况下,接头序列包含长接头 (LL) 序列。在一些情况下,长接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=2$  至  $4$ 。在一些情况下,接头序列包含短接头 (SL) 序列。在一些情况下,短接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $3$ 。

[0074] 在一些实施方案中,分离的TFP分子还包含编码共刺激结构域的序列。在其它实施方案中,分离的TFP分子还包含编码细胞内信号传导结构域的序列。在其它实施方案中,分离的TFP分子还包含前导序列。

[0075] 本文还提供了包含编码任何前述TFP分子的核酸分子的载体。在一些实施方案中,载体选自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。在一些实施方案中,载体还包含启动子。在一些实施方案中,载体是体外转录的载体。在一些实施方案中,载体中的核酸序列还包含聚 (A) 尾。在一些实施方案中,载体中的核酸序列还包含3' UTR。

[0076] 本文还提供了包含任何所述载体的细胞。在一些实施方案中,细胞是人T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞。在其它实施方案中,细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含第二多肽缔合的第一多肽,所述第一多肽包含抑制性分子的至少一部分,所述第二多肽包含来自细胞内信号传导结构域的阳性信号。在一些情况下,所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0077] 在另一个方面,本文提供了分离的TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中TFP分子能够与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

[0078] 在另一个方面,本文提供了分离的TFP分子,其包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中TFP分子能够功能性整合到内源性TCR复合物中。

[0079] 在另一个方面,本文提供了包含至少两个TFP分子的人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,所述TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中TFP分子能够在人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、细胞的表面处和/或表面上与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

[0080] 在另一个方面,本文提供了蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含i) TFP分子,其含有人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域;和ii) 至少一种内源性TCR复合物。

[0081] 在一些实施方案中,TCR包含选自由以下组成的组的蛋白质的细胞外结构域或其部分:T细胞受体的 $\alpha$ 或 $\beta$ 链、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 。在一些实施方案中,抗BCMA结合结构域通过接头序列与TCR细胞外结构域连接。在一些情况下,接头区包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $4$ 。在一些情况下,接头序列包含长接头 (LL) 序列。在一些情况下,长接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=2$  至  $4$ 。在一些情况下,接头序列包含短接头 (SL) 序列。在一些情况下,短接头序列包含  $(G_4S)_n$ , 其中  $n=1$  至  $3$ 。

[0082] 本文还提供了人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞,其包含每一任何所述蛋白质复合物至少两种不同的TFP蛋白。

[0083] 在另一个方面,本文提供了人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群,其中所述群的T细胞单独地或共同地包含至少两个TFP分子,TFP分子包含人或人源化抗BCMA结合结构域、TCR细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,其中TFP分子能够在人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞中、细胞的表面处和/或表面上与内源性TCR复合物和/或至少一种内源性TCR多肽功能性相互作用。

[0084] 在另一个方面,本文提供了人CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞群,其中所述群的T细胞单独地或共同地包含至少两种由本文提供的分离的核酸分子编码的TFP分子。

[0085] 在另一个方面,本文提供了制备细胞的方法,所述方法包括用任何上述载体转导T细胞。

[0086] 在另一个方面,本文提供了产生RNA工程改造的细胞群的方法,所述方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞,其中所述RNA包含编码任何所述TFP分子的核酸。

[0087] 在另一个方面,本文提供了在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,其包括向哺乳动物施用有效量的表达任何所述TFP分子的细胞。在一些实施方案中,所述细胞是自体T细胞。在一些实施方案中,细胞是同种异体T细胞。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0088] 在另一个方面,本文提供了治疗患有与BCMA表达相关的疾病的哺乳动物的方法,其包括向哺乳动物施用有效量的包含任何所述TFP分子的细胞。在一些实施方案中,与BCMA表达相关的疾病选自增殖性疾病诸如癌症或恶性肿瘤或癌前病状诸如骨髓增生异常、骨髓增生异常综合征或白血病前期,或者是与BCMA表达相关的非癌症相关适应症。在一些实施方案中,疾病是选自一种或多种急性白血病组成的组的血液癌症,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(“B-ALL”)、T细胞急性淋巴细胞白血病(“T-ALL”)、急性淋巴瘤细胞性白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性粒细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL);另外的血液系统癌症或血液病状,包括但不限于B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm)、伯基特淋巴瘤、弥漫大B细胞性淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞性白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴瘤组织增生症、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、郁积型多发性骨髓瘤、孤立性浆细胞瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、浆细胞白血病、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和为由骨髓血细胞的无效产生(或发育不良)和与BCMA表达相关的疾病联合的血液病症的多样性集合的“白血病前期”,包括但不限于非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病状或表达BCMA的增殖性疾病;及其组合。

[0089] 在一些实施方案中,将表达任何所述TFP分子的细胞和改善与施用表达TFP分子的细胞相关的一种或多种副作用的剂组合施用。在一些实施方案中,将表达任何所述TFP分子的细胞与治疗与BCMA相关的疾病的剂组合施用。

[0090] 本文还提供了任何所述的分离的核酸分子,任何所述的分离的多肽分子、任何所述的分离的TFP、任何所述的蛋白质复合物、任何所述的载体或任何所述的细胞用作药物。

[0091] 定义

[0092] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0093] 术语“一个/种(a)”和“一个/种(an)”是指该冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法对象。举例来说,“元素”表示一个元素或多于一个元素。

[0094] 如本文所用,“约”可以表示正负不超过1%或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%或大于30%,取决于具体情况并且是本领域技术人员已知或可知的。

[0095] 如本说明书中所用,“受试者(subject)”或“多个受试者(subjects)”或“多个个体(individuals)”可包括但不限于哺乳动物,诸如人或非人哺乳动物,例如驯养的、农业的或野生的动物,以及鸟类和水生动物。“患者”是患有疾病、病症或病况或有发展疾病、病症或病况的风险或者另外需要本文提供的组合物和方法的受试者。

[0096] 如本文中所用,“医治”或“治疗”是指疾病或病况的成功治疗或改善的任何征象。治疗可以包括,例如,减轻、延迟或缓各疾病或病况的一种或多种症状的严重度,或者其可包括降低患者经历疾病、缺陷、病症或不良病况等的症状的频率。如本文中所用,“治疗或预防”在本文中有时用于指导致疾病或病况的某种水平的治疗或改善,并设想针对该目的的一系列结果(包括但不限于对病况的完全预防)的方法。

[0097] 如本文中所用,“预防”是指防止患者的疾病或病况(例如肿瘤形成)。例如,如果具有患肿瘤或其它形式癌症的风险的个体用本发明的方法治疗并且之后不发展肿瘤或其它形式的癌症,则所述疾病在该个体中在至少在一段时间内得到预防。

[0098] 如本文中所用,“治疗有效量”是足以提供有益效果或以其它方式减少对向其施用了组合物的个体的有害非有益事件的组合物或其活性组分的量。本文的“治疗有效剂量”是指对于其施用产生一种或多种所需或想要的(例如,有益的)效果的剂量,此类施用在给定的一段时间内进行一次或多次。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (第1-3卷, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); 和Pickar, Dosage Calculations (1999))。

[0099] 如本文中所用,“T细胞受体(TCR)融合蛋白”或“TFP”包括源自各种包含TCR的多肽的重组多肽,其通常能够i)与靶细胞上的表面抗原结合,并且ii)与完整TCR复合物的其它多肽组分相互作用,此时通常共定位在T细胞表面中或表面上。

[0100] 如本文中所用,术语“B细胞”,如本文中所用,术语“BCMA”是指“B细胞成熟抗原”或“BCMA”或“BCM”,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)和分化簇269蛋白(CD269)或TNFRSF13A,是在人中由TNFRSF17基因编码的蛋白质。BCMA是TNF受体超家族的细胞表面受体,其识别B细胞活化因子(BAFF)。该受体优先在成熟B淋巴细胞中表达,并且可能对B细胞发育和自身免疫应答很重要。已显示该受体特异性结合肿瘤坏死因子(配体)超家族成员13b(TNFSF13B/TALL-1/BAFF),并导致NF- $\kappa$ B和MAPK8/JNK活化。其为配体BAFF和APRIL的非糖基化整合膜受体。BCMA的配体还可以结合另外的受体:TACI(跨膜激活剂和钙调节亲环素配体相互作用分子(Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor)),其结合APRIL和BAFF;以及BAFF-R(BAFF受体或BR3),其对BAFF显示出受限但高的亲和力。这些受体及其相应的配体一起调节体液免疫、B细胞发育和体内平衡的不同方面。

[0101] BCMA的表达通常局限于B细胞谱系,据报道其在终末B细胞分化中增加。BCMA由人血浆母细胞、来自扁桃体和脾和骨髓的浆细胞,以及扁桃体记忆B细胞和生发中心B细胞表达,其具有TACI-BAFFR低表型(Darce等,2007)。在原初B细胞和记忆B细胞上实际上不存在

BCMA (Novak等, 2004a和b)。BCMA抗原在细胞表面表达, 因此抗体可接近, 但也在高尔基体中表达。正如其表达谱所暗示的, BCMA信号传导通常与B细胞存活和增殖相关联, 在B细胞分化的晚期以及长寿骨髓浆细胞 (O'Connor等, 2004) 和浆母细胞 (Avery等, 2003) 的存活中是重要的。此外, 由于BCMA以高亲和力结合APRIL, 因此暗示BCMA-APRIL信号传导轴在B细胞分化的后期占主导作用, 可能是最生理学相关的相互作用。

[0102] 人和鼠的氨基酸和核酸序列可以在公共数据库中找到, 诸如GenBank、UniProt和Swiss-Prot。例如, 人BCMA的氨基酸序列可按UniProt/Swiss-Prot登录号Q02223找到。人BCMA多肽的经典序列是UniProt登录号Q02223-1 (本文中, SEQ ID NO:42, 参见附录A)。

[0103] 如本文中所用, 术语“抗体”是指源自免疫球蛋白分子的与抗原特异性结合的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆来源的完整免疫球蛋白, 或其片段, 并且可来源于天然来源或来源于重组来源。

[0104] 术语“抗体片段”或“抗体结合结构域”是指抗体的至少一部分或其重组变体, 其含有抗原结合结构域, 即完整抗体的抗原决定可变区, 其足以赋予抗体片段对靶标 (诸如抗原及其确定的表位) 的识别和特异性结合。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段、单链(sc)Fv (“scFv”) 抗体片段、线性抗体、单结构域抗体 (缩写为“sdAb” (V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>))、骆驼科动物V<sub>H</sub>结构域和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0105] 术语“scFv”是指融合蛋白, 其包含至少一个含有轻链的可变区的抗体片段和至少一个含有重链的可变区的抗体片段, 其中所述轻链和重链可变区通过短的柔性多肽接头连续连接, 并且能够表达为单一多肽链, 并且其中scFv保留了其所源自的完整抗体的特异性。

[0106] 关于抗体的“重链可变区”或“V<sub>H</sub>” (或, 在单结构域抗体的情况下, 例如, 纳米抗体, “V<sub>H</sub>”) 是指包含间插在称为框架区的侧翼区段之间的三个CDR的重链的片段, 这些框架区通常比CDR更加高度保守并形成支持CDR的支架。

[0107] 除非另有说明, 否则如本文中所用, scFv可以以任一顺序具有V<sub>L</sub>区和V<sub>H</sub>区, 例如, 相对于多肽的N-末端和C-末端, scFv可包含V<sub>L</sub>-接头-V<sub>H</sub>或可包含V<sub>H</sub>-接头-V<sub>L</sub>。

[0108] 包含抗体或其抗体片段的本发明的TFP组合物的部分可以多种形式存在, 其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的一部分, 包括例如单结构域抗体片段(sdAb)或重链抗体(HCAb 242:423-426)。在一个方面, 本发明的TFP组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另外的方面, TFP包含含有scFv或sdAb的抗体片段。

[0109] 术语“抗体重链”是指处于其天然存在的构象的抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较大的并且通常决定抗体所属的类别的多肽链。

[0110] 术语“抗体轻链”是指处于其天然存在的构象的抗体分子中存在的两种类型的多肽链中的较小的多肽链。Kappa (“κ”) 和lambda (“λ”) 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0111] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体, 例如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语还应解释为表示已通过合成编码抗体的DNA分子 (并且该DNA分子表达抗体蛋白或指定所述抗体的氨基酸序列) 而产生的抗体, 其中所述DNA或氨基酸序列已使用本领域可用的且公知的重组DNA或氨基酸序列技术获得。

[0112] 术语“抗原”或“Ag”是指能够被抗体特异性结合或以其它方式激发免疫应答的分子。该免疫应答可涉及抗体产生或特定免疫活性细胞的活化, 或涉及这两者。

[0113] 技术人员将理解, 任何大分子, 包括实际上所有蛋白质或肽, 都可用作抗原。此外,

抗原可源自重组DNA或基因组DNA。本领域技术人员将理解,包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因而编码“抗原”(如该术语在本文中所使用的)。此外,本领域技术人员将理解,抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一种基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以编码引发所需免疫应答的多肽。此外,技术人员将理解抗原根本不必由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以合成产生或可以源自生物样品,或者可以是除多肽外的大分子。此类生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其它生物组分的流体。

[0114] 术语“抗肿瘤作用”是指可以通过各种手段证明的生物效应,包括但不限于例如肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移的数量减少、预期寿命延长、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤细胞存活减少或与癌性病况相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤作用”还可通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来证明。

[0115] 术语“自体的”是指来自同一个体的任何材料,所述材料随后将被重新引入该个体。

[0116] 术语“同种异体的”是指源自与材料被引入的个体相同的物种的不同动物或与所述个体不同的患者的任何材料。当一个或多个基因座处的基因不不同时,两个或更多个体被认为彼此是同种异体的。在一些方面,来自同一物种的个体的同种异体材料对于抗原性相互作用在遗传上可能充分不同。

[0117] 术语“异种的”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0118] 术语“癌症”是指特征在于异常细胞的快速和不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部位。本文描述了各种癌症的实例,包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0119] 短语“与BCMA表达相关的疾病”包括但不限于与BCMA表达相关的疾病或与表达BCMA的细胞相关的病况,包括例如增殖性疾病诸如癌症或恶性肿瘤或癌前病况等,或B细胞发育/免疫球蛋白产生的缺陷(免疫缺陷)。在一个方面,癌症是非霍奇金淋巴瘤、B细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、非分泌性多发性骨髓瘤、郁积型多发性骨髓瘤、POEMS综合征/骨硬化黑素瘤,与BCMA表达相关的非癌症相关适应症包括,但不限于,例如自身免疫性疾病(例如,狼疮、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、结肠炎、I型和II型冷球蛋白血症、轻链沉积疾病、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、特发性血小板减少性紫癜、急性肾小球肾炎、天疱疮和类天疱疮病症或后天性大疱性表皮松解症)、炎症性病症(过敏和哮喘)和移植。

[0120] 术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可通过本领域已知的标准技术(诸如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本发明的抗体或抗体片段。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙



氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明的TFP内的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链家族的其它氨基酸残基替换,并且可使用本文所述的功能测定法来测试改变的TFP。

[0121] 术语“刺激”是指通过刺激结构域或刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合(从而介导信号传导事件,诸如但不限于,通过TCR/CD3复合物的信号传导)诱导的初级应答。刺激可以介导某些分子的改变的表达,和/或细胞骨架结构的重组织等。

[0122] 术语“刺激分子”或“刺激结构域”是指由T细胞表达的分子或其部分,其提供以刺激方式在T细胞信号传导途径的至少一些方面调节TCR复合物的初级活化的初级细胞质信号传导序列。在一个方面,初级信号通过例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合而起始,并且这导致T细胞应答(包括但不限于增殖、激活、分化等)的介导。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列(也称为“初级信号传导结构域”)可含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或“ITAM”。含有在本发明中具有特定用途的初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括但不限于源自TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为“ICOS”)和CD66d的那些。

[0123] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指在其表面上展示与主要组织相容性复合物(MHC)复合的外来抗原的免疫系统细胞,诸如辅助细胞(例如,B细胞、树突状细胞等)。T细胞可以使用它们的T细胞受体(TCR)识别这些复合物。APC处理抗原并将其呈递给T细胞。

[0124] 如所述术语在本文中所用,“细胞内信号传导结构域”是指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域产生促进含有TFP的细胞(例如,表达TFP的T细胞)的免疫效应子功能的信号。免疫效应子功能的实例,例如在表达TFP的T细胞中,包括溶细胞活性和T辅助细胞活性,包括细胞因子的分泌。在实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含初级细胞内信号传导结构域。示例性初级细胞内信号传导结构域包括源自负责初级刺激或抗原依赖性模拟的分子的那些初级细胞内信号传导结构域。在实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含共刺激细胞内结构域。示例性共刺激细胞内信号传导结构域包括源自负责共刺激信号或不依赖于抗原的刺激的分子的那些共刺激细胞内信号传导结构域。

[0125] 初级细胞内信号传导结构域可包含ITAM(“基于免疫受体酪氨酸的激活基序”)。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括但不限于源自CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d DAP10和DAP12的那些ITAM。

[0126] 术语“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导T细胞的共刺激反应,诸如但不限于增殖。共刺激分子是除抗原受体或其配体外的高效免疫应答所需的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC 1类分子、BTLA和To11配体受体,以及OX40、CD2、CD27、CD28、CD30、CD32、CD36、CD44、CD48、CD54、CD63、CD68、CD71、CD74、CD80、CD86、CD95、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120、CD121、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140、CD141、CD142、CD143、CD144、CD145、CD146、CD147、CD148、CD149、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158、CD159、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172、CD173、CD174、CD175、CD176、CD177、CD178、CD179、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD187、CD188、CD189、CD190、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202、CD203、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210、CD211、CD212、CD213、CD214、CD215、CD216、CD217、CD218、CD219、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235、CD236、CD237、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD250、CD251、CD252、CD253、CD254、CD255、CD256、CD257、CD258、CD259、CD260、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD285、CD286、CD287、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD323、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD330、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD341、CD342、CD343、CD344、CD345、CD346、CD347、CD348、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD356、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362、CD363、CD364、CD365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、CD371、CD372、CD373、CD374、CD375、CD376、CD377、CD378、CD379、CD380、CD381、CD382、CD383、CD384、CD385、CD386、CD387、CD388、CD389、CD390、CD391、CD392、CD393、CD394、CD395、CD396、CD397、CD398、CD399、CD400、CD401、CD402、CD403、CD404、CD405、CD406、CD407、CD408、CD409、CD410、CD411、CD412、CD413、CD414、CD415、CD416、CD417、CD418、CD419、CD420、CD421、CD422、CD423、CD424、CD425、CD426、CD427、CD428、CD429、CD430、CD431、CD432、CD433、CD434、CD435、CD436、CD437、CD438、CD439、CD440、CD441、CD442、CD443、CD444、CD445、CD446、CD447、CD448、CD449、CD450、CD451、CD452、CD453、CD454、CD455、CD456、CD457、CD458、CD459、CD460、CD461、CD462、CD463、CD464、CD465、CD466、CD467、CD468、CD469、CD470、CD471、CD472、CD473、CD474、CD475、CD476、CD477、CD478、CD479、CD480、CD481、CD482、CD483、CD484、CD485、CD486、CD487、CD488、CD489、CD490、CD491、CD492、CD493、CD494、CD495、CD496、CD497、CD498、CD499、CD500、CD501、CD502、CD503、CD504、CD505、CD506、CD507、CD508、CD509、CD510、CD511、CD512、CD513、CD514、CD515、CD516、CD517、CD518、CD519、CD520、CD521、CD522、CD523、CD524、CD525、CD526、CD527、CD528、CD529、CD530、CD531、CD532、CD533、CD534、CD535、CD536、CD537、CD538、CD539、CD540、CD541、CD542、CD543、CD544、CD545、CD546、CD547、CD548、CD549、CD550、CD551、CD552、CD553、CD554、CD555、CD556、CD557、CD558、CD559、CD560、CD561、CD562、CD563、CD564、CD565、CD566、CD567、CD568、CD569、CD570、CD571、CD572、CD573、CD574、CD575、CD576、CD577、CD578、CD579、CD580、CD581、CD582、CD583、CD584、CD585、CD586、CD587、CD588、CD589、CD590、CD591、CD592、CD593、CD594、CD595、CD596、CD597、CD598、CD599、CD600、CD601、CD602、CD603、CD604、CD605、CD606、CD607、CD608、CD609、CD610、CD611、CD612、CD613、CD614、CD615、CD616、CD617、CD618、CD619、CD620、CD621、CD622、CD623、CD624、CD625、CD626、CD627、CD628、CD629、CD630、CD631、CD632、CD633、CD634、CD635、CD636、CD637、CD638、CD639、CD640、CD641、CD642、CD643、CD644、CD645、CD646、CD647、CD648、CD649、CD650、CD651、CD652、CD653、CD654、CD655、CD656、CD657、CD658、CD659、CD660、CD661、CD662、CD663、CD664、CD665、CD666、CD667、CD668、CD669、CD670、CD671、CD672、CD673、CD674、CD675、CD676、CD677、CD678、CD679、CD680、CD681、CD682、CD683、CD684、CD685、CD686、CD687、CD688、CD689、CD690、CD691、CD692、CD693、CD694、CD695、CD696、CD697、CD698、CD699、CD700、CD701、CD702、CD703、CD704、CD705、CD706、CD707、CD708、CD709、CD710、CD711、CD712、CD713、CD714、CD715、CD716、CD717、CD718、CD719、CD720、CD721、CD722、CD723、CD724、CD725、CD726、CD727、CD728、CD729、CD730、CD731、CD732、CD733、CD734、CD735、CD736、CD737、CD738、CD739、CD740、CD741、CD742、CD743、CD744、CD745、CD746、CD747、CD748、CD749、CD750、CD751、CD752、CD753、CD754、CD755、CD756、CD757、CD758、CD759、CD760、CD761、CD762、CD763、CD764、CD765、CD766、CD767、CD768、CD769、CD770、CD771、CD772、CD773、CD774、CD775、CD776、CD777、CD778、CD779、CD780、CD781、CD782、CD783、CD784、CD785、CD786、CD787、CD788、CD789、CD790、CD791、CD792、CD793、CD794、CD795、CD796、CD797、CD798、CD799、CD800、CD801、CD802、CD803、CD804、CD805、CD806、CD807、CD808、CD809、CD810、CD811、CD812、CD813、CD814、CD815、CD816、CD817、CD818、CD819、CD820、CD821、CD822、CD823、CD824、CD825、CD826、CD827、CD828、CD829、CD830、CD831、CD832、CD833、CD834、CD835、CD836、CD837、CD838、CD839、CD840、CD841、CD842、CD843、CD844、CD845、CD846、CD847、CD848、CD849、CD850、CD851、CD852、CD853、CD854、CD855、CD856、CD857、CD858、CD859、CD860、CD861、CD862、CD863、CD864、CD865、CD866、CD867、CD868、CD869、CD870、CD871、CD872、CD873、CD874、CD875、CD876、CD877、CD878、CD879、CD880、CD881、CD882、CD883、CD884、CD885、CD886、CD887、CD888、CD889、CD890、CD891、CD892、CD893、CD894、CD895、CD896、CD897、CD898、CD899、CD900、CD901、CD902、CD903、CD904、CD905、CD906、CD907、CD908、CD909、CD910、CD911、CD912、CD913、CD914、CD915、CD916、CD917、CD918、CD919、CD920、CD921、CD922、CD923、CD924、CD925、CD926、CD927、CD928、CD929、CD930、CD931、CD932、CD933、CD934、CD935、CD936、CD937、CD938、CD939、CD940、CD941、CD942、CD943、CD944、CD945、CD946、CD947、CD948、CD949、CD950、CD951、CD952、CD953、CD954、CD955、CD956、CD957、CD958、CD959、CD960、CD961、CD962、CD963、CD964、CD965、CD966、CD967、CD968、CD969、CD970、CD971、CD972、CD973、CD974、CD975、CD976、CD977、CD978、CD979、CD980、CD981、CD982、CD983、CD984、CD985、CD986、CD987、CD988、CD989、CD990、CD991、CD992、CD993、CD994、CD995、CD996、CD997、CD998、CD999、CD1000、CD1001、CD1002、CD1003、CD1004、CD1005、CD1006、CD1007、CD1008、CD1009、CD1010、CD1011、CD1012、CD1013、CD1014、CD1015、CD1016、CD1017、CD1018、CD1019、CD1020、CD1021、CD1022、CD1023、CD1024、CD1025、CD1026、CD1027、CD1028、CD1029、CD1030、CD1031、CD1032、CD1033、CD1034、CD1035、CD1036、CD1037、CD1038、CD1039、CD1040、CD1041、CD1042、CD1043、CD1044、CD1045、CD1046、CD1047、CD1048、CD1049、CD1050、CD1051、CD1052、CD1053、CD1054、CD1055、CD1056、CD1057、CD1058、CD1059、CD1060、CD1061、CD1062、CD1063、CD1064、CD1065、CD1066、CD1067、CD1068、CD1069、CD1070、CD1071、CD1072、CD1073、CD1074、CD1075、CD1076、CD1077、CD1078、CD1079、CD1080、CD1081、CD1082、CD1083、CD1084、CD1085、CD1086、CD1087、CD1088、CD1089、CD1090、CD1091、CD1092、CD1093、CD1094、CD1095、CD1096、CD1097、CD1098、CD1099、CD1100、CD1101、CD1102、CD1103、CD1104、CD1105、CD1106、CD1107、CD1108、CD1109、CD1110、CD1111、CD1112、CD1113、CD1114、CD1115、CD1116、CD1117、CD1118、CD1119、CD1120、CD1121、CD1122、CD1123、CD1124、CD1125、CD1126、CD1127、CD1128、CD1129、CD1130、CD1131、CD1132、CD1133、CD1134、CD1135、CD1136、CD1137、CD1138、CD1139、CD1140、CD1141、CD1142、CD1143、CD1144、CD1145、CD1146、CD1147、CD1148、CD1149、CD1150、CD1151、CD1152、CD1153、CD1154、CD1155、CD1156、CD1157、CD1158、CD1159、CD1160、CD1161、CD1162、CD1163、CD1164、CD1165、CD1166、CD1167、CD1168、CD1169、CD1170、CD1171、CD1172、CD1173、CD1174、CD1175、CD1176、CD1177、CD1178、CD1179、CD1180、CD1181、CD1182、CD1183、CD1184、CD1185、CD1186、CD1187、CD1188、CD1189、CD1190、CD1191、CD1192、CD1193、CD1194、CD1195、CD1196、CD1197、CD1198、CD1199、CD1200、CD1201、CD1202、CD1203、CD1204、CD1205、CD1206、CD1207、CD1208、CD1209、CD1210、CD1211、CD1212、CD1213、CD1214、CD1215、CD1216、CD1217、CD1218、CD1219、CD1220、CD1221、CD1222、CD1223、CD1224、CD1225、CD1226、CD1227、CD1228、CD1229、CD1230、CD1231、CD1232、CD1233、CD1234、CD1235、CD1236、CD1237、CD1238、CD1239、CD1240、CD1241、CD1242、CD1243、CD1244、CD1245、CD1246、CD1247、CD1248、CD1249、CD1250、CD1251、CD1252、CD1253、CD1254、CD1255、CD1256、CD1257、CD1258、CD1259、CD1260、CD1261、CD1262、CD1263、CD1264、CD1265、CD1266、CD1267、CD1268、CD1269、CD1270、CD1271、CD1272、CD1273、CD1274、CD1275、CD1276、CD1277、CD1278、CD1279、CD1280、CD1281、CD1282、CD1283、CD1284、CD1285、CD1286、CD1287、CD1288、CD1289、CD1290、CD1291、CD1292、CD1293、CD1294、CD1295、CD1296、CD1297、CD1298、CD1299、CD1300、CD1301、CD1302、CD1303、CD1304、CD1305、CD1306、CD1307、CD1308、CD1309、CD1310、CD1311、CD1312、CD1313、CD1314、CD1315、CD1316、CD1317、CD1318、CD1319、CD1320、CD1321、CD1322、CD1323、CD1324、CD1325、CD1326、CD1327、CD1328、CD1329、CD1330、CD1331、CD1332、CD1333、CD1334、CD1335、CD1336、CD1337、CD1338、CD1339、CD1340、CD1341、CD1342、CD1343、CD1344、CD1345、CD1346、CD1347、CD1348、CD1349、CD1350、CD1351、CD1352、CD1353、CD1354、CD1355、CD1356、CD1357、CD1358、CD1359、CD1360、CD1361、CD1362、CD1363、CD1364、CD1365、CD1366、CD1367、CD1368、CD1369、CD1370、CD1371、CD1372、CD1373、CD1374、CD1375、CD1376、CD1377、CD1378、CD1379、CD1380、CD1381、CD1382、CD1383、CD1384、CD1385、CD1386、CD1387、CD1388、CD1389、CD1390、CD1391、CD1392、CD1393、CD1394、CD1395、CD1396、CD1397、CD1398、CD1399、CD1400、CD1401、CD1402、CD1403、CD1404、CD1405、CD1406、CD1407、CD1408、CD1409、CD1410、CD1411、CD1412、CD1413、CD1414、CD1415、CD1416、CD1417、CD1418、CD1419、CD1420、CD1421、CD1422、CD1423、CD1424、CD1425、CD1426、CD1427、CD1428、CD1429、CD1430、CD1431、CD1432、CD1433、CD1434、CD1435、CD1436、CD1437、CD1438、CD1439、CD1440、CD1441、CD1442、CD1443、CD1444、CD1445、CD1446、CD1447、CD1448、CD1449、CD1450、CD1451、CD1452、CD1453、CD1454、CD1455、CD1456、CD1457、CD1458、CD1459、CD1460、CD1461、CD1462、CD1463、CD1464、CD1465、CD1466、CD1467、CD1468、CD1469、CD1470、CD1471、CD1472、CD1473、CD1474、CD1475、CD1476、CD1477、CD1478、CD1479、CD1480、CD1481、CD1482、CD1483、CD1484、CD1485、CD1486、CD1487、CD1488、CD1489、CD1490、CD1491、CD1492、CD1493、CD1494、CD1495、CD1496、CD1497、CD1498、CD1499、CD1500、CD1501、CD1502、CD1503、CD1504、CD1505、CD1506、CD1507、CD1508、CD1509、CD1510、CD1511、CD1512、CD1513、CD1514、CD1515、CD1516、CD1517、CD1518、CD1519、CD1520、CD1521、CD1522、CD1523、CD1524、CD1525、CD1526、CD1527、CD1528、CD1529、CD1530、CD1531、CD1532、CD1533、CD1534、CD1535、CD1536、CD1537、CD1538、CD1539、CD1540、CD1541、CD1542、CD1543、CD1544、CD1545、CD1546、CD1547、CD1548、CD1549、CD1550、CD1551、CD1552、CD1553、CD1554、CD1555、CD1556、CD1557、CD1558、CD1559、CD1560、CD1561、CD1562、CD1563、CD1564、CD1565、CD1566、CD1567、CD1568、CD1569、CD1570、CD1571、CD1572、CD1573、CD1574、CD1575、CD1576、CD1577、CD1578、CD1579、CD1580、CD1581、CD1582、CD1583、CD1584、CD1585、CD1586、CD1587、CD1588、CD1589、CD1590、CD1591、CD1592、CD1593、CD1594、CD1595、CD1596、CD1597、CD1598、CD1599、CD1600、CD1601、CD1602、CD1603、CD1604、CD1605、CD1606、CD1607、CD1608、CD1609、CD1610、CD1611、CD1612、CD1613、CD1614、CD1615、CD1616、CD1617、CD1618、CD1619、CD1620、CD1621、CD1622、CD1623、CD1624、CD1625、CD1626、CD1627、CD1628、CD1629、CD1630、CD1631、CD1632、CD1633、CD1634、CD1635、CD1636、CD1637、CD1638、CD1639、CD1640、CD1641、CD1642、CD1643、CD1644、CD1645、CD1646、CD1647、CD1648、CD1649、CD1650、CD1651、CD1652、CD1653、CD1654、CD1655、CD1656、CD1657、CD1658、CD1659、CD1660、CD1661、CD1662、CD1663、CD1664、CD1665、CD1666、CD1667、CD1668、CD1669、CD1670、CD1671、CD1672、CD1673、CD1674、CD1675、CD1676、CD1677、CD1678、CD1679、CD1680、CD1681、CD1682、CD1683、CD1684、CD1685、CD1686、CD1687、CD1688、CD1689、CD1690、CD1691、CD1692、CD1693、CD1694、CD1695、CD1696、CD1697、CD1698、CD1699、CD1700、CD1701、CD1702、CD1703、CD1704、CD1705、CD1706、CD1707、CD1708、CD1709、CD1710、CD1711、CD1712、CD1713、CD1714、CD1715、CD1716、CD1717、CD1718、CD1719、CD1720、CD1721、CD1722、CD1723、CD1724、CD1725、CD1726、CD1727、CD1728、CD1729、CD1730、CD1731、CD1732、CD1733、CD1734、CD1735、CD1736、CD1737、CD1738、CD1739、CD1740、CD1741、CD1742、CD1743、CD1744、CD1745、CD1746、CD1747、CD1748、CD1749、CD1750、CD1751、CD1752、CD1753、CD1754、CD1755、CD1756、CD1757、CD1758、CD1759、CD1760、CD1761、CD1762、CD1763、CD1764、CD1765、CD1766、CD1767、CD1768、CD1769、CD1770、CD1771、CD1772、CD1773、CD1774、CD1775、CD1776、CD1777、CD1778、CD1779、CD1780、CD1781、CD1782、CD1783、CD1784、CD1785、CD1786、CD1787、CD1788、CD1789、CD1790、CD1791、CD1792、CD1793、CD1794、CD1795、CD1796、CD1797、CD1798、CD1799、CD1800、CD1801、CD1802、CD1803、CD1804、CD1805、CD1806、CD1807、CD1808、CD1809、CD1810、CD1811、CD1812、CD1813、CD1814、CD1815、CD1816、CD1817、CD1818、CD1819、CD1820、CD1821、CD1822、CD1823、CD1824、CD1825、CD1826、CD1827、CD1828、CD1829、CD1830、CD1831、CD1832、CD1833、CD1834、CD1835、CD1836、CD1837、CD1838、CD1839、CD1840、CD1841、CD1842、CD1843、CD1844、CD1845、CD1846、CD1847、CD1848、CD1849、CD1850、CD1851、CD1852、CD1853、CD1854、CD1855、CD1856、CD1857、CD1858、CD1859、CD1860、CD1861、CD1862、CD1863、CD1864、CD1865、CD1866、CD1867、CD1868、CD1869、CD1870、CD1871、CD1872、CD1873、CD1874、CD1875、CD1876、CD1877、CD1878、CD1879、CD1880、CD1881、CD1882、CD1883、CD1884、CD1885、CD1886、CD1887、CD1888、CD1889、CD1890、CD1891、CD1892、CD1893、CD1894、CD1895、CD1896、CD1897、CD1898、CD1899、CD1900、CD1901、CD1902、CD1903、CD1904、CD1905、CD1906、CD1907、CD1908、CD1909、CD1910、CD1911、CD1912、CD1913、CD1914、CD1915、CD1916、CD1917、CD1918、CD1919、CD1920、CD1921、CD1922、CD1923、CD1924、CD1925、CD1926、CD1927、CD1928、CD1929、CD1930、CD1931、CD1932、CD1933、CD1934、CD1935、CD1936、CD1937、CD1938、CD1939、CD1940、CD1941、CD1942、CD1943、CD1944、CD1945、CD1946、CD1947、CD1948、CD1949、CD1950、CD1951、CD1952、CD1953、CD1954、CD1955、CD1956、CD1957、CD1958、CD1959、CD1960、CD1961、CD1962、CD1963、CD1964、CD1965、CD1966、CD1967、CD1968、CD1969、CD1970、CD1971、CD1972、CD1973、CD1974、CD1975、CD1976、CD1977、CD1978、CD1979、CD1980、CD1981、CD1982、CD1983、CD1984、CD1985、CD1986、CD1987、CD1988、CD1989、CD1990、CD1991、CD1992、CD1993、CD1994、CD1995、CD1996、CD1997、CD1998、CD1999、CD2000、CD2001、CD2002、CD2003、CD2004、CD2005、CD2006、CD2007、CD2008、CD2009、CD2010、CD2011、CD2012、CD2013、CD2014、CD2015、CD2016、CD2017、CD2018、CD2019、CD2020、CD2021、CD2022、CD2023、CD2024、CD2025、CD2026、CD2027、CD2028、CD2029、CD2030、CD2031、CD2032、CD2033、CD2034、CD2035、CD2036、CD2037、CD2038、CD2039、CD2040、CD2041、CD2042、CD2043、CD2044、CD2045、CD2046、CD2047、CD2048、CD2049、CD2050、CD2051、CD2052、CD2053、CD2054、CD2055、CD2056、CD2057、CD2058、CD2059、CD2060、CD2061、CD2062、CD2063、CD2064、CD2065、CD2066、CD2067、CD2068、CD2069、CD2070、CD2071、CD2072、CD2073、CD2074、CD2075、CD2076、CD2077、CD2078、CD2079、CD2080、CD2081、CD2082、CD2083、CD2084、CD2085、CD2086、CD2087、CD2088、CD2089、CD2090、CD2091、CD20

个细胞内部分或整个天然细胞内信号传导结构域或其功能性片段。术语“4-1BB”是指具有如GenBank登录号AAA62478.2提供的氨基酸序列或来自非人物种(例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等)的等同残基的TNFR超家族的成员;并且“4-1BB共刺激结构域”被定义为GenBank登录号AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人物种(例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等)的等同残基。

[0127] 术语“编码”是指多核苷酸诸如基因、cDNA或mRNA中的特定核苷酸序列用作在生物过程中用于合成其它聚合物和大分子的模板的固有特性,所述其它聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA,tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及从其产生的生物特性。因此,如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则基因、cDNA或RNA编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)均可称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0128] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括作为彼此的简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可包括内含子至编码所述蛋白质的核苷酸序列可在某些形式中含有一个或多个内含子的程度。

[0129] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所述有效实现特定的生物学或治疗结果的化合物、制剂、材料或组合物的量。

[0130] 术语“内源性的”是指来自生物体、细胞、组织或系统的或在其内部产生的任何材料。

[0131] 术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统引入的或产在其外部产生的任何材料。

[0132] 术语“表达”是指由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0133] 术语“转移载体”是指包含分离的核酸并且可用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质的组合物。本领域已知许多载体,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应解释为进一步包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0134] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的顺式作用元件以用于表达;用于表达的其它元件可以由宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,包括粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和掺入重组多核苷酸的病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0135] 术语“慢病毒属”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒属在逆转录病毒中是独特的,因为其能够感染非分裂细胞;它们可以将大量的遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,因此它们是基因传递载体的最高效方法之一。HIV、SIV和FIV均为慢病毒的实例。

[0136] 术语“慢病毒载体”是指源自慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括Milone等,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009)中提供的自失活型慢病毒载体。可在临床中使用的慢病毒载体的其它实例包括但不限于例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR™基因递

送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也是可获得的并且是本领域技术人员已知的。

[0137] 术语“同源的”或“同一性”是指两个聚合分子之间，例如两个核酸分子诸如两个DNA分子或两个RNA分子，或两个多肽分子之间的亚单位序列同一性。当两个分子中的亚单位位置均被相同的单体亚单位占据时；例如，如果两个DNA分子中的每一个中的位置被腺嘌呤占据，那么它们在该位置处是同源的或相同的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数量的直接函数；例如，如果两个序列中的位置的一半（例如，长度为10个亚基的聚合物中的5个位置）是同源的，则这两个序列是50%同源的；如果90%的位置（例如，10个中的9个）是匹配的或同源的，则两个序列是90%同源的。

[0138] 非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式是含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其它抗原结合子序列）。就大部分来说，人源化抗体及其抗体片段是人免疫球蛋白（受者抗体或抗体片段），其中来自受者的互补决定区（CDR）的残基被来自非人物种（诸如小鼠、大鼠或兔）的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR（供体抗体）的残基取代。在一些情况下，人免疫球蛋白的Fv框架区（FR）残基被相应的非人残基替代。此外，人源化抗体/抗体片段可包含既不存在于受者抗体中也不存在于引入的CDR或框架序列中的残基。这些修饰可以进一步改善和优化抗体或抗体片段的性能。通常，人源化抗体或其抗体片段将包含基本上全部至少一个，通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区，并且FR区的全部或大部分是人免疫球蛋白序列的那些FR区。人源化抗体或抗体片段还可包含免疫球蛋白恒定区（Fc）（通常是人免疫球蛋白的恒定区）的至少一部分。关于进一步的细节，参见Jones等，Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann等，Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992。

[0139] “人”或“完全人”是指其中整个分子是人源的或由与人形式的抗体或免疫球蛋白相同的氨基酸序列组成的免疫球蛋白，诸如抗体或抗体片段。

[0140] 术语“分离的”意指从天然状态改变的或取出的。例如，天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”，但与其天然状态的共存物质部分或完全分离的同一核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或者可以存在于非天然环境诸如，例如宿主细胞中。

[0141] 在本发明的说明书中，使用以下常见核酸碱基的缩写。“A”指腺苷，“C”指胞嘧啶，“G”指鸟苷，“T”指胸苷，且“U”指尿苷。

[0142] 术语“可操作地连接的”或“转录控制”是指调控序列与异源核酸序列之间的导致后者表达的功能性键联。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系中时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子与编码序列可操作地连接。可操作地连接的DNA序列可以彼此邻接，例如在必需连接两个蛋白质编码区的情况下，处于同一阅读框中。

[0143] 术语免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下（s.c.）、静脉内（i.v.）、肌肉（i.m.）或胸骨内注射、瘤内或输注技术。

[0144] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）及其聚合物。除非特别限定，否则该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的

核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合特性,并以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另外指出,否则特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0145] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对蛋白质或肽的序列可包含的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文中所用,该术语是指短链(其例如在本领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚体)和较长的链(其在本领域中通常称为蛋白质),其中存在许多类型。“多肽”包括,例如,生物活性片段、基本上同源的、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0146] 术语“启动子”是指由启动多核苷酸序列的特定转录所需的细胞转录机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0147] 术语“启动子/调控序列”是指表达与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,并且在其它情况下,该序列还可包括增强子序列和表达基因产物所需的其它调控元件。启动子/调控序列可以是,例如,以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0148] 术语“组成型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,导致在大多数或所有细胞生理条件下在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0149] 术语“诱导型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,导致基本上仅当对应于启动子的诱导物存在于细胞中时才在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0150] 术语“组织特异性”启动子是指当与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅在细胞是对应于所述启动子的组织类型的细胞时在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0151] 如在scFv的上下文中所用,术语“接头”和“柔性多肽接头”是指将可变重链区与可变轻链区连接在一起的由单独或组合使用的氨基酸诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽接头。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的正整数。例如,n=1,n=2,n=3,n=4,n=5,n=6,n=7,n=8,n=9,n=10。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。在另一个实施方案中,接头包括(Gly<sub>2</sub>Ser)、(GlySer)或(Gly<sub>3</sub>Ser)的多个重复。WO2012/138475(通过引用并入本文)中描述了也包括在本发明的范围内的接头。在一些情况下,接头序列包含长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>,其中n=1至3。

[0152] 如本文所用,5'帽(也称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m<sup>7</sup>G帽)是经修饰的鸟嘌呤核苷酸,其已在转录开始后不久被添加至真核信使RNA的“前端”或5'端。5'帽由与第一

个转录核苷酸连接的末端基团组成。其存在对于被核糖体识别和免受RNA酶作用的保护至关重要。帽的添加与转录偶联,并且共转录发生,使得每个都影响另一个。在转录开始后不久,合成的mRNA的5'末端被与RNA聚合酶缔合的帽合成复合物结合。该酶促复合物催化mRNA加帽所需的化学反应。合成作为多步生化反应进行。可以修饰加帽部分以调节mRNA的功能性,诸如其稳定性或翻译效率。

[0153] 如本文中所用,“体外转录的RNA”是指已在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0154] 如本文中所用,“聚(A)”是通过多腺苷酸化与mRNA连接的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中,聚A为50至5000,优选大于64,更优选大于100,最优选大于300或400。聚(A)序列可被化学或酶促修饰以调节mRNA功能性诸如定位、稳定性或翻译效率。

[0155] 如本文中所用,“多腺苷酸化”是指聚腺苷酰基部分或其修饰的变体与信使RNA分子的共价键联。在真核生物中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'末端被多腺苷酸化。3'聚(A)尾是通过酶聚腺苷酸聚合酶的作用添加到前mRNA的长腺苷酸核苷酸序列(通常数百个)。在高等真核生物中,将聚(A)尾添加到含有特定序列即多腺苷酸化信号的转录物上。聚(A)尾和与其结合的蛋白质有助于保护mRNA免于被外切核酸酶降解。聚腺苷酸化对于转录终止、从细胞核输出mRNA和翻译也很重要。聚腺苷酸化在DNA转录成RNA后立即在细胞核中发生,但另外也可在细胞质中发生。转录终止后,mRNA链通过与RNA聚合酶缔合的内切核酸酶复合物的作用被切割。切割位点的特征通常在于切割位点附近存在碱基序列AAUAAA。在mRNA被切割后,腺苷残基被添加到切割位点的游离3'末端。

[0156] 如本文中所用,“瞬时”是指非整合转基因在数小时、数天或数周的时间内表达,其中表达的时间段小于在被整合到基因组中或包含在宿主细胞中的稳定质粒复制子中时基因表达时的表达时间段。

[0157] 术语“信号传导途径”是指在将信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中起作用的多种信号传导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞膜传递信号的分子和分子复合物。

[0158] 术语“受试者”意图包括其中可引发免疫应答的活生物体(例如哺乳动物、人)。

[0159] 术语“基本上纯化的”细胞是指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与在其天然存在状态下通常与其结合的其它细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群是指同质的细胞群。在其它情况下,该术语仅指已经与在其天然状态下与它们天然结合的细胞分离的细胞。在一些方面,体外培养细胞。在其它方面,不在体外培养细胞。

[0160] 如本文中所用,术语“治疗的”是指治疗。通过减轻、抑制、缓解或根除疾病状态来获得治疗效果。

[0161] 如本文中所用,术语“预防”是指对疾病或疾病状态的预防或保护性治疗。

[0162] 在本发明的说明书中,“肿瘤抗原”或“过度增殖性病征抗原”或“与过度增殖性病征相关的抗原”是指对于特异性过度增殖性病征是常见的抗原。在某些方面,本发明的过度增殖性病征抗原源自癌症,包括但不限于原发性或转移性黑素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、NHL、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌和腺癌诸如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、

胰腺癌等。

[0163] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指籍以将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代受试细胞及其后代。

[0164] 术语“特异性结合”是指抗体、抗体片段或特异性配体，其识别并结合存在于样品中的同源结合配偶体(例如，BCMA)，但不一定并且基本上不识别或结合样品中的其它分子。

[0165] 范围：贯穿本公开，本发明的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解，以范围格式进行的描述仅仅是为了方便和简洁，不应该被解释为对本发明范围的不可改变的限定。因此，应该认为范围的描述已经明确地公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如，应当认为对诸如1至6的范围的描述具有明确公开的子范围，诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及该范围内的单个数，例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一个实例，范围诸如95-99%同一性，包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的一些范围，以及包括子范围诸如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%和98-99%同一性。无论范围的宽度如何，这都适用。

[0166] 详细说明

[0167] 本文提供了使用T细胞受体(TCR)融合蛋白治疗疾病诸如癌症的物质组合物和使用方法。如本文中所用，“T细胞受体(TCR)融合蛋白”或“TFP”包括源自包含TCR的各种多肽的重组多肽，其通常能够i)与靶细胞上的表面抗原结合，和ii)与完整TCR复合物的其它多肽组分相互作用，此时通常共定位在T细胞的表面中或表面上。如本文所提供的，与嵌合抗原受体相比，TFP提供了实质性益处。术语“嵌合抗原受体”或可选地“CAR”是指包含scFv形式的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(在本文中也称为“细胞内信号传导结构域”)的重组多肽，所述细胞质信号传导结构域包含源自如下定义的刺激分子的功能性信号传导结构域。通常，CAR的中心细胞内信号传导结构域源自通常发现与TCR复合物缔合的CD3 $\zeta$ 链。CD3 $\zeta$ 信号传导结构域可以与源自至少一种共刺激分子诸如4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28的一个或多个功能性信号传导结构域融合。

[0168] T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)

[0169] 本发明包括编码TFP的重组DNA构建体，其中TFP包含与BCMA例如人BCMA特异性结合的抗体片段，其中抗体片段的序列与编码TCR亚基或其部分的核酸邻接并处于同一阅读框中。本文提供的TFP能够与一种或多种内源性(或可选地，一种或多种外源性，或内源性和外源性的组合)TCR亚基缔合，以形成功能性TCR复合物。

[0170] 在一个方面，本发明的TFP包含另称为抗原结合结构域的靶特异性结合元件。部分的选择取决于限定靶细胞表面的靶抗原的类型和数量。例如，可以选择抗原结合结构域以识别作为与特定疾病状态相关联的靶细胞上的细胞表面标志物的靶抗原。因此，可以作为本发明的TFP中的抗原结合结构域的靶抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌症疾病(例如，恶性疾病)相关的那些细胞表面标志物。

[0171] 在一个方面，通过将抗原结合结构域工程改造为特异性结合所需抗原的TFP，可以将TFP介导的T细胞应答导向目标抗原。

[0172] 在一个方面，包含抗原结合结构域的TFP的部分包含靶向BCMA的抗原结合结构域。在一个方面，抗原结合结构域靶向人BCMA。

[0173] 抗原结合结构域可以是与抗原结合的任何结构域,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体及其功能性片段,包括但不限于限于单结构域抗体诸如重链可变结构域( $V_H$ )、轻链可变结构域( $V_L$ )和骆驼科动物来源的纳米抗体的可变结构域( $V_{HH}$ ),以及本领域已知的用作抗原结合结构域的替代性支架诸如重组纤连蛋白结构域、anticalin、DARPIN等。同样地,特异性识别和结合靶抗原的天然或合成配体可用作TFP的抗原结合结构域。在一些情况下,抗原结合结构域源自最终将在其中使用TFP的同一物种是有益的。例如,对于在人中的使用,TFP的抗原结合结构域包含人或人源化残基以用于抗体或抗体片段的抗原结合结构域可以是有益的。

[0174] 因此,在一个方面,抗原结合结构域包含人源化或人抗体或抗体片段,或鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源化或人抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化或人抗BCMA结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3),和/或本文所述的人源化或人抗BCMA结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如包含一个或多个,例如全部三个LC CDR和一个或多个,例如全部三个HC CDR的人源化或人抗BCMA结合结构域。在一个实施方案中,人源化或人抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化或人抗BCMA结合结构域的一个或多个(例如,全部三个)重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),例如,人源化或人抗BCMA结合结构域具有两个可变重链区,每个可变重链区包含本文所述的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人源化或人抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化或人轻链可变区和/或本文所述的人源化或人重链可变区。在一个实施方案中,人源化或人抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化重链可变区,例如,至少两个本文所述人源化或人重链可变区。在一个实施方案中,抗BCMA结合结构域是scFv,其包含本文提供的氨基酸序列的轻链和重链。在实施方案中,抗BCMA结合结构域(例如,scFv或 $V_{HH}$  nb)包含:轻链可变区,其包含对本文提供的轻链可变区的氨基酸序列具有至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含对本文提供的重链可变区的氨基酸序列具有至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化或人抗BCMA结合结构域是scFv,并且包含本文所述氨基酸序列的轻链可变区通过接头(例如本文所述的接头)与包含本文所述的氨基酸序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,人源化抗BCMA结合结构域包括 $(Gly_4-Ser)_n$ 接头,其中n为1、2、3、4、5或6,优选3或4。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下取向中的任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。在一些情况下,接头序列包含长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中n=1至3。

[0175] 在一些方面,非人抗体是人源化的,其中抗体的特定序列或区域被修饰以增加与人中天然产生的抗体或其片段的相似性。在一个方面,抗原结合结构域是人源化的。

[0176] 可使用本领域已知的多种技术产生人源化抗体,所述技术包括但不限于CDR-移植



(参见,例如,欧洲专利第EP 239,400号;国际公开号W0 91/09967;和美国专利第5,225,539号、5,530,101号和5,585,089号,其每一个通过引用整体并入本文)、镶饰或表面重塑(参见,例如,欧洲专利第EP 592,106号和EP 519,596号;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498;Studnicka等,1994,Protein Engineering,7(6):805-814;和Roguska等,1994,PNAS,91:969-973,其每一个通过引用整体并入本文)、链改组(参见,例如,美国专利第5,565,332号,其通过引用整体并入本文)以及在例如美国专利申请公开第20050042664号、美国专利申请公开第20050048617号、美国专利第6,407,213号、美国专利第5,766,886号、国际公开号W0 9317105,Tan等,J.Immunol.,169:1119-25(2002),Caldas等,Protein Eng.,13(5):353-60(2000),Morea等,Methods,20(3):267-79(2000),Baca等,J.Biol.Chem.,272(16):10678-84(1997),Roguska等,Protein Eng.,9(10):895-904(1996),Couto等,Cancer Res.,55(23Supp):5973s-5977s(1995),Couto等,Cancer Res.,55(8):1717-22(1995),Sandhu J S, Gene,150(2):409-10(1994)和Pedersen等,J.Mol.Biol.,235(3):959-73(1994)(其每一个通过引用整体并入本文)中公开的技术。通常,框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代,以改变例如改善抗原结合。这些框架取代通过本领域熟知的方法,例如,通过对CDR与框架残基的相互作用建模(以鉴定对抗原结合来说是重要的框架残基)和序列比较(以鉴定特定位置处的罕见框架残基)来鉴定(参见例如,Queen等,美国专利第5,585,089号;和Riechmann等,1988,Nature,332:323,其通过引用整体并入本文)。

[0177] 人源化抗体或抗体片段具有一个或多个氨基酸残基,其来自非人来源。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。如本文所提供的,人源化抗体或抗体片段包含来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和其中构成框架的氨基酸残基完全或主要来源于人种系的框架区。用于人源化抗体或抗体片段的多种技术在本领域中是公知的,并且基本上可以按照Winter和同事的方法(Jones等,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science,239:1534-1536(1988)),通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列,即CDR接枝(EP 239,400;PCT公开号W0 91/09967;以及美国专利第4,816,567号、6,331,415号、5,225,539号、5,530,101号、5,585,089号和6,548,640号,其内容通过引用整体并入本文)来进行。在此类人源化抗体和抗体片段中,基本上少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些框架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。抗体和抗体片段的人源化也可通过镶饰或表面重塑来实现(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology,28(4/5):489-498;Studnicka等,Protein Engineering,7(6):805-814(1994);和Roguska等,PNAS,91:969-973(1994))或链改组(美国专利第5,565,332号),其内容通过引用整体并入本文。

[0178] 用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链)的选择是降低抗原性。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人可变域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后接受最接近啮齿动物的序列的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims等,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia等,J.Mol.Biol.,196:901(1987),其内容通过在本文中引用整体并入本文)。另一种方法使用源自特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(参见,例如,Nicholson等,



Mol. Immun. 34 (16-17) :1157-1165 (1997) ;Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992) ;Presta等, J. Immunol., 151:2623 (1993), 其内容通过在本文中引用整体并入本文)。在一些实施方案中,重链可变区的框架区(例如,所有四个框架区)源自V<sub>H</sub>4-4-59种系序列。在一个实施方案中,框架区可以包含例如来自相应鼠序列的氨基酸的一个、两个、三个、四个或五个修饰(例如,取代)。在一个实施方案中,框架区,例如轻链可变区的所有四个框架区,均源自VK3-1.25种系序列。在一个实施方案中,框架区可以包含例如来自相应鼠序列的氨基酸的一个、两个、三个、四个或五个修饰(例如,取代)。

[0179] 在一些方面,包含抗体片段的本发明的TFP组合物的部分被人源化,保留对靶抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。根据本发明的一个方面,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法制备人源化抗体和抗体片段。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且是本领域技术人员熟悉的。可获得说明和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。这样,可以从受者和输入序列中选择和组合FR残基,使得实现所需的抗体或抗体片段特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。通常,CDR残基直接且最基本地参与影响抗原结合。

[0180] 人源化抗体或抗体片段可以保留与原始抗体相似的抗原特异性,例如在本发明中,结合人BCMA的能力。在一些实施方案中,人源化抗体或抗体片段可具有提高的与人BCMA结合的亲和力和/或特异性。

[0181] 在一个方面,抗BCMA结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特性或性质。例如,在一个方面,包含抗原结合结构域的本发明TFP组合物的部分特异性结合人BCMA。在一个方面,本发明涉及包含抗体或抗体片段(例如,V<sub>H</sub>H)的抗原结合结构域,其中所述抗体结合结构域与BCMA蛋白或其片段特异性结合,其中所述抗体或抗体片段包含包括本文提供的氨基酸序列的可变轻链和/或可变重链。在某些方面,scFv与前导序列邻接并处于同一阅读框中。

[0182] 在一个方面,抗BCMA结合结构域是片段,例如单链可变片段(scFv)或骆驼科动物重链(V<sub>H</sub>H)。在一个方面,抗BCMA结合结构域是Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>或双功能(例如双特异性)杂交抗体(例如,Lanzavecchia等, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))。在一个方面,本发明的抗体及其片段以野生型或增强的亲和力结合BCMA蛋白。

[0183] 本文还提供了用于获得对靶抗原(例如,BCMA或本文其它地方针对融合部分结合结构域的靶标描述的任何靶抗原)有特异性的抗体抗原结合结构域的方法,该方法包括通过在本文所示的V<sub>H</sub>(或V<sub>H</sub>H)结构域的氨基酸序列中添加、删除、取代或插入一个或多个氨基酸来提供为所述V<sub>H</sub>结构域的氨基酸序列变体的V<sub>H</sub>结构域,任选地将所提供的V<sub>H</sub>结构域与一个或多个V<sub>L</sub>结构域组合,并测试V<sub>H</sub>结构域或一种或多种V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>组合以鉴定对目标靶抗原(例如BCMA)有特异性的且任选地具有一种或多种所需性质的特异性结合成员或抗体抗原结合结构域。

[0184] 在一些情况下,V<sub>H</sub>结构域和scFv可以根据本领域已知的方法(参见,例如,Bird等, ((1988) Science 242:423-426和Huston等, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883) 制备。scFv分子可以通过使用柔性多肽接头将V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>区连接在一起来产生。scFv分子

包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的接头(例如,Ser-Gly接头)。接头长度可以极大地影响scFv折叠和相互作用的方式。事实上,如果使用短多肽接头(例如,5个至10个氨基酸),则阻止了链内折叠。还需要链间折叠以将两个可变区组合在一起以形成功能性表位结合位点。在一些情况下,接头序列包含长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=2$ 至4。在一些情况下,接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至3。关于接头取向和大小的实例,参见,例如Hollinger等,1993Proc Natl Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448,美国专利申请公开号20050100543和20050175606,美国专利第7,695,936号以及PCT公开号W02006/020258和W02007/024715,通过引用并入本文。

[0185] scFv可在 $V_L$ 与 $V_H$ 区之间包含约10个、11个、12个、13个、14个、15个或超过15个残基的接头。接头序列可包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一个实施方案中,接头序列包含多组甘氨酸和丝氨酸重复,诸如 $(Gly_4Ser)_n$ ,其中 $n$ 为等于或大于1的正整数。在一个实施方案中,接头可以是 $(Gly_4Ser)_4$ 或 $(Gly_4Ser)_3$ 。接头长度的变化可以保持或增强活性,从而在活性研究中产生优异的功效。在一些情况下,接头序列包含长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=2$ 至4。在一些情况下,接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(G_4S)_n$ ,其中 $n=1$ 至3。

#### [0186] 稳定性和突变

[0187] 可以参考常规对照scFv分子或全长抗体的生物物理性质(例如,热稳定性)来评估抗BCMA结合结构域(例如scFv分子(例如,可溶性scFv))的稳定性。在一个实施方案中,人源化或人scFv在所述测定中的热稳定性比亲本scFv高约0.1℃、约0.25℃、约0.5℃、约0.75℃、约1℃、约1.25℃、约1.5℃、约1.75℃、约2℃、约2.5℃、约3℃、约3.5℃、约4℃、约4.5℃、约5℃、约5.5℃、约6℃、约6.5℃、约7℃、约7.5℃、约8℃、约8.5℃、约9℃、约9.5℃、约10℃、约11℃、约12℃、约13℃、约14℃或约15℃。

[0188] 随后将抗BCMA结合结构域(例如scFv)的提高了的热稳定性赋予整个BCMA-TFP构建体,从而导致改善的抗BCMA TFP构建体的治疗性质。与常规抗体相比,抗BCMA结合结构域(例如scFv)的热稳定性可以提高至少约2℃或3℃。在一个实施方案中,与常规抗体相比,抗BCMA结合结构域(例如scFv)的热稳定性具有1℃的提高。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,抗BCMA结合结构域(例如scFv)的热稳定性具有2℃的提高。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,scFv的热稳定性具有4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃或15℃的提高。例如,可在本文公开的scFv分子与所述scFv  $V_H$ 和 $V_L$ 所源自的抗体的scFv分子或Fab片段之间进行比较。可以使用本领域已知的方法测量热稳定性。例如,在一个实施例中,可以测量 $T_M$ 。下文中描述了测量 $T_M$ 的方法和测定蛋白质稳定性的其它方法。

[0189] scFv中的突变(通过可溶性scFv的人源化或诱变产生)改变scFv的稳定性并提高scFv和抗BCMA TFP构建体的总体稳定性。使用测量结果(诸如 $T_M$ 、温度变性(temperature denaturation)和温度聚集(temperature aggregation))将人源化scFv的稳定性与鼠scFv进行比较。在一个实施方案中,抗BCMA结合结构域,例如scFv,包含至少一个从人源化过程产生的突变,使得突变的scFv赋予抗BCMA TFP构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,抗BCMA结合结构域,例如scFv,包含从人源化过程产生的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个突

变,使得突变的scFv赋予BCMA-TFP构建体提高的稳定性。

[0190] 在一个方面,TFP的抗原结合结构域包含与本文所述的抗原结合结构域氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且所述抗原结合结构域保留了本文所述的抗BCMA抗体片段的所需功能特性。在一个具体方面,本发明的TFP组合物包含抗体片段。在另外的方面,该抗体片段包含scFv。

[0191] 在各个方面,通过修饰一个或两个可变区(例如,V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个氨基酸来对TFP的抗原结合结构域进行工程改造。在一个具体方面,本发明的TFP组合物包含抗体片段。在另外的方面,该抗体片段包含scFv。

[0192] 本领域普通技术人员将理解,可以进一步修饰本发明的抗体或抗体片段,使得它们在氨基酸序列(例如,相对于野生型)上变化,但期望的活性不变。例如,可对蛋白质进行额外的核苷酸取代,导致“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代。例如,分子中的非必需氨基酸残基可来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换。在另一个实施方案中,一串氨基酸可用在侧链家族成员的顺序和/或组成上不同的结构相似的串替换,例如,可产生其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的保守取代。

[0193] 本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0194] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中的百分比同一性是指为相同的两个或更多个序列。当在比较窗口或指定的区域上就最大对应(如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查测量的)进行比较和比对时,如果两个序列具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(例如,在指定的区域上,或当未指定时在整个序列上具有60%同一性,任选地70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性),则两个序列“基本上同一”。任选地,该同一性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100个至500个或1000个或更多个核苷酸(或20个、50个、200个或更多个氨基)的区域上。

[0195] 对于序列比较,通常一个序列充当将测试序列与其比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,也可指定替代参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。可以例如通过Smith和Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443的同源比对算法,通过Pearson和Lipman, (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444的相似性搜索方法,通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 或通过手动比对和目视检查(参见, 例如, Brent等, (2003) Current Protocols in Molecular Biology) 进行用于比较的最佳序

列比对方法。适用于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等,(1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402和Altschul等,(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。

[0196] 在一个方面,本发明考虑了产生功能等同的分子的起始抗体或片段(例如scFv)氨基酸序列的修饰。例如,可以修饰包含在TFP中的抗BCMA结合结构域(例如,scFv)的V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>,以保留抗BCMA结合结构域(例如,scFv)的起始V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>框架区的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。本发明考虑了整个TFP构建体的修饰,例如,TFP构建体的各种结构域的一个或多个氨基酸序列中的修饰,以产生功能等同的分子。可以修饰TFP构建体以保留起始TFP构建体的至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

#### [0197] 细胞外结构域

[0198] 细胞外结构域可源自天然来源或重组来源。在来源是天然的情况下,结构域可源自任何蛋白质,但特别地源自膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面,细胞外结构域能够与跨膜结构域缔合。在本发明中特别使用的细胞外结构域可以包括例如T细胞受体的 $\alpha$ 链、 $\beta$ 链或 $\zeta$ 链、或CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 或CD3 $\delta$ ,或者在替代地实施方案中,CD28、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的至少一个或多个细胞外区域。

#### [0199] 跨膜结构域

[0200] 通常,TFP序列含有由单个基因组序列编码的细胞外结构域和跨膜结构域。在替代实施方案中,TFP可被设计成包含与TFP的细胞外结构域异源的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括与跨膜区相邻的一个或多个另外的氨基酸,例如,与跨膜区所源自的蛋白质的细胞外区域相关的一个或多个氨基酸(例如,细胞外区域的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多达15个氨基酸)和/或与跨膜蛋白质所源自的蛋白质的细胞内区域相关的一个或多个另外的氨基酸(例如,细胞内区域的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或多达15个氨基酸)。在一个方面,跨膜结构域是与所使用的TFP的另外的结构域之一缔合的跨膜结构域。在一些情况下,可以通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,例如,以使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。在一个方面,跨膜结构域能够与TFP-T细胞表面上的另一种TFP同源二聚化。在不同的方面,可以修饰或取代跨膜结构域的氨基酸序列,以便使与相同TFP中存在的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。

[0201] 跨膜结构域可以源自天然来源或来自重组来源。在来源是天然的情况下,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面,每当TFP结合靶标时,跨膜结构域能够向细胞内结构域发信号。在本发明中特别使用的跨膜结构域可以包括例如T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的至少一个或多个跨膜区。

[0202] 在一些情况下,跨膜结构域可以通过铰链(例如,来自人蛋白质的铰链)连接至TFP的细胞外区域,例如TFP的抗原结合结构域。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人免疫球

蛋白 (Ig) 铰链, 例如 IgG4 铰链或 CD8a 铰链。

[0203] 接头

[0204] 任选地, 长度为 2 至 10 个氨基酸的短寡肽或多肽接头可以在 TFP 的跨膜结构域与细胞质区域之间形成键联。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。例如, 在一个方面, 接头包含 GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3) 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 接头由 GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 4) 的核苷酸序列编码。

[0205] 细胞质结构域

[0206] 如果 TFP 含有 CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$  或 CD3 $\epsilon$  多肽, 则 TFP 的细胞质结构域可包括细胞内信号传导结构域; TCR $\alpha$  和 TCR $\beta$  亚基通常缺乏信号传导结构域。细胞内信号传导结构域通常负责其中已引入了 TFP 的免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种的激活。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如, T 细胞的效应子功能可以是溶细胞活性或辅助活性, 包括细胞因子的分泌。因此, 术语“细胞内信号传导结构域”是指蛋白质的一部分, 其传导效应子功能信号并指导细胞执行特化功能。虽然通常可以使用整个细胞内信号传导结构域, 但在许多情况下不必使用整条链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分来说, 可使用此类截短的部分替代完整的链, 只要其传导效应子功能信号即可。因此, 术语细胞内信号传导结构域意味着包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0207] 用于本发明的 TFP 的细胞内信号传导结构域的实例包括协同作用以在抗原受体接合后启动信号传导的 T 细胞受体 (TCR) 和辅助受体的细胞质序列, 以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何重组序列。

[0208] 已知通过单独的 TCR 产生的信号不足以完全活化原初 T 细胞, 并且需要次级和/或共刺激信号。因此, 据说原初 T 细胞的活化可由两种不同种类的细胞质信号传导序列介导的: 通过 TCR (初级细胞内信号传导结构域) 启动抗原依赖性初级激活的那些细胞质信号传导序列和以不依赖抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号 (次级细胞质结构域, 例如共刺激结构域) 的细胞质信号传导序列。

[0209] 初级信号传导结构域以刺激方式或以抑制方式调节 TCR 复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级细胞内信号传导结构域可含有称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导基序。

[0210] 特别适用于本发明中的含有 ITAM 的初级细胞内信号传导结构域的实例包括 CD3 $\zeta$ 、Fc $\gamma$ 、Fc $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些初级细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中, 本发明的 TFP 包含细胞内信号传导结构域, 例如 CD3- $\epsilon$  的初级信号传导结构域。在一个实施方案中, 初级信号传导结构域包含经修饰的 ITAM 结构域, 例如与天然 ITAM 结构域相比具有改变 (例如, 增强或降低的) 活性的突变的 ITAM 结构域。在一个实施方案中, 初级信号传导结构域包含含有经修饰的 ITAM 的初级细胞内信号传导结构域, 例如含有优化的和/或截短的 ITAM 的初级细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中, 初级信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个 ITAM 基序。

[0211] TFP 的细胞内信号传导结构域本身可包含 CD3 $\zeta$  信号传导结构域, 或者其可以与用于本发明的 TFP 背景中的任何其它所需的细胞内信号传导结构域组合。例如, TFP 的细胞内信号传导结构域可包含 CD3 $\epsilon$  链部分和共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域是指包含共刺激分子的细胞内结构域的 TFP 的一部分。共刺激分子是除抗原受体或其配体外的

细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原的高效响应所必需的。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。例如,已证明CD27共刺激可在体外增强人TFP-T细胞的扩增、效应子功能和存活,并在体内增强人T细胞持久性和抗肿瘤活性 (Song等, Blood. 2012; 119 (3): 696-706)。

[0212] 本发明的TFP的细胞质部分内的细胞内信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接。任选地,短的寡肽或多肽接头 (例如,长度为2至10个氨基酸 (例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)) 可在细胞内信号传导序列之间形成键联。

[0213] 在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸,可以用作合适的接头。

[0214] 在一个方面,本文所述的表达TFP的细胞还可包含第二TFP,例如,包括例如针对相同靶标 (BCMA) 或不同靶标 (例如,CD123) 的不同抗原结合结构域的第二TFP。在一个实施方案中,当表达TFP的细胞包含两种或更多种不同的TFP时,不同TFP的抗原结合结构域可以是使得抗原结合结构域不彼此相互作用的抗原结合结构域。例如,表达第一TFP和第二TFP的细胞可具有第一TFP的抗原结合结构域 (例如,作为片段,例如scFv), 其不与第二TFP的抗原结合结构域缔合,例如,第二TFP的抗原结合结构域是V<sub>H</sub>H。

[0215] 在另一个方面,本文所述的表达TFP的细胞还可表达另一种剂,例如增强表达TFP的细胞的活性的剂。例如,在一个实施方案中,所述剂可以是抑制抑制性分子的剂。在一些实施方案中,抑制性分子 (例如PD1) 可降低表达TFP的细胞引发免疫效应子应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的剂包含与向细胞提供阳性信号的第二多肽 (例如,本文所述的细胞内信号传导结构域) 缔合的第一多肽 (例如,抑制性分子)。在一个实施方案中,所述剂包含第一多肽,例如抑制性分子 (诸如PD1、LAG3、CTLA4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4和TIGIT) 的第一多肽,或这些分子中的任一种的片段 (例如,这些分子中的任一种的细胞内结构域的至少一部分); 以及第二多肽,其为本文所述的细胞内信号传导结构域 (例如,包含共刺激结构域 (例如,4-1BB、CD27或CD28,例如,如本文所述的) 和/或初级信号传导结构域 (例如,本文所述的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域))。在一个实施方案中,所述剂包含PD1的第一多肽或其片段 (例如,PD1的细胞外结构域的至少一部分), 和本文所述的细胞内信号传导结构域 (例如,本文所述的CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域) 的第二多肽。PD1是CD28受体家族的抑制性成员,所述CD28受体家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达 (Agata等, 1996 Int. Immunol 8: 765-75)。已经显示PD1、PD-L1和PD-L2的两种配体在与PD1结合后下调T细胞活化 (Freeman等, 2000 J Exp Med 192: 1027-34; Latchman等, 2001 Nat Immunol 2: 261-8; Carter等, 2002 Eur J Immunol 32: 634-43)。PD-L1在人癌症中是丰富的 (Dong等, 2003 J Mol Med 81: 281-7; Blank等 2005 Cancer Immunol. Immunother 54: 307-314; Konishi等 2004 Clin Cancer Res 10: 5094)。通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制。

[0216] 在一个实施方案中,所述剂包含抑制性分子的细胞外结构域 (ECD), 例如,可将程序性死亡1 (PD1) 与跨膜结构域和任选的细胞内信号传导结构域诸如41BB和CD3 $\zeta$ 融合 (在本

文中也称为PD1TFP)。在一个实施方案中,PD1TFP,当与本文所述的抗BCMA TFP组合使用时,改善了T细胞的持久性。在一个实施方案中,TFP是包含PD 1的细胞外结构域的PD1TFP。或者,提供了含有与程序性死亡-配体1 (PD-L1) 或程序性死亡-配体2 (PD-L2) 特异性结合的抗体或抗体片段诸如scFv的TFP。

[0217] 在另一方面,本发明提供了表达TFP的T细胞(例如TFP-T细胞)群。在一些实施方案中,表达TFP的T细胞群包含表达不同TFP的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,TFP-T细胞群可包括表达具有本文所述的抗BCMA结合结构域的TFP的第一细胞,和表达具有不同抗BCMA结合结构域(例如,与由第一细胞表达的TFP中的抗BCMA结合结构域不同的本文所述的抗BCMA结合结构域)的TFP的第二细胞。作为另一个实例,表达TFP的细胞群可包括表达包括例如本文所述的抗BCMA结合结构域的TFP的第一细胞,和表达包括针对除BCMA外的靶标(另一种肿瘤相关抗原)的抗原结合结构域的TFP的第二细胞。

[0218] 在另一个方面,本发明提供了细胞群(其中群中的至少一个细胞表达具有本文所述的抗BCMA结构域的TFP)和表达另一种剂(例如,增强表达TFP的细胞的活性的剂)的第二细胞。例如,在一个实施方案中,所述剂可以是抑制抑制性分子的剂。在一些实施方案中,抑制性分子例如可降低表达TFP的细胞引发免疫效应子应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的剂包含与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例如,本文所述的细胞内信号传导结构域)缔合的第一多肽,例如抑制性分子。

[0219] 本文公开了用于产生编码TFP的体外转录的RNA的方法。本发明还包括可以直接转染到细胞中的编码TFP的RNA构建体。产生用于转染的mRNA的方法可包括用特别设计的引物对模板进行体外转录(IVT),然后添加聚A,以产生含有3' 和5' 非翻译序列(“UTR”)、5' 帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达的核酸和聚A尾(长度通常为50-2000个碱基)的构建体。如此产生的RNA可以高效地转染不同类型的细胞。在一个方面,模板包括用于TFP的序列。

[0220] 在一个方面,抗BCMA TFP由信使RNA (mRNA) 编码。在一个方面,将编码抗BCMA TFP的mRNA引入T细胞中以产生TFP-T细胞。在一个实施方案中,可将体外转录的RNA TFP以瞬时转染的形式引入细胞。使用聚合酶链反应(PCR)产生的模板,通过体外转录产生RNA。可使用适当的引物和RNA聚合酶,通过PCR将来自任何来源的目标DNA直接转化为用于体外mRNA合成的模板。DNA的来源可以是,例如,基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其它合适的DNA来源。用于体外转录的所需模板是本发明的TFP。在一个实施方案中,待用于PCR的DNA含有开放阅读框架。DNA可来自生物基因组的天然存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可包括5' 和/或3' 非翻译区(UTR)中的一些或全部。核酸可包括外显子和内含子。在一个实施方案中,待用于PCR的DNA是人核酸序列。在另一个实施方案中,待用于PCR的DNA是包括5' 和3' UTR的人核酸序列。或者,DNA可以是通常不在天然存在的生物体中表达的人工DNA序列。示例性人工DNA序列是包含连接在一起以形成编码融合蛋白的开放阅读框架的基因的部分的序列。连接在一起的DNA的部分可来自单个生物体或来自多于一个的生物体。

[0221] PCR用于产生用于体外转录用于转染的mRNA的模板。用于进行PCR的方法是本领域公知的。用于PCR的引物被设计成具有与待作用于PCR的模板的DNA的区域基本上互补的

区域。如本文中所用,“基本上互补”是指其中引物序列中的大部分或全部碱基是互补的,或者一个或多个碱基是非互补的或错配的核苷酸序列。基本上互补的序列能够在用于PCR的退火条件下与预期的DNA靶标退火或杂交。可将引物设计成与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,引物可被设计来扩增通常在细胞中转录的核酸的部分(开放阅读框架),包括5'和3' UTR。引物还可被设计来扩增编码特定目标结构域的核酸的一部分。在一个实施方案中,引物被设计来扩增人cDNA的编码区,包括5'和3' UTR的全部或部分。可用于PCR的引物可通过本领域公知的合成方法产生。“正向引物”是含有与DNA模板上的核苷酸基本上互补的核苷酸区域的引物,所述核苷酸区域位于待扩增的DNA序列的上游。“上游”在本文中用于指待扩增的DNA序列相对于编码链处于5'位置。“反向引物”是含有与双链DNA模板基本上互补的核苷酸区域的引物,所述核苷酸区域位于待扩增的DNA序列的下游。“下游”在本文中用于指待扩增的DNA序列相对于编码链处于3'位置。

[0222] 可用于PCR的任何DNA聚合酶均可用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可从许多来源商购获得。

[0223] 还可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。RNA优选具有5'和3' UTR。在一个实施方案中,5' UTR的长度为1至3,000个核苷酸。待添加到编码区的5'和3' UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,包括但不限于设计用于与UTR的不同区域退火的PCR的引物。使用该方法,本领域普通技术人员可以改变在转染转录的RNA后实现最佳翻译效率所需的5'和3' UTR长度。

[0224] 5'和3' UTR可以是用于目标核酸的天然存在的内源性5'和3' UTR。或者,可以通过将UTR序列整合到正向和反向引物中或通过模板的任何其它修饰来添加对于目标核酸不是内源性UTR序列。使用对目标核酸不是内源性UTR序列可用于修饰RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3' UTR序列中的富含AU的元件可降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域公知的UTR的性质选择或设计3' UTR,以增加转录的RNA的稳定性。

[0225] 在一个实施方案中,5' UTR可含有内源性核酸的Kozak序列。或者,当如上所述通过PCR添加对目标核酸不是内源性5' UTR时,可以通过添加5' UTR序列重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但似乎并非是所有RNA能够实现高效翻译所需的。对于许多mRNA的对Kozak序列的需要是本领域已知的。在其它实施方案中,5' UTR可以是RNA病毒的5' UTR,其RNA基因组在细胞中是稳定的。在其它实施方案中,各种核苷酸类似物可用于3'或5' UTR以阻止mRNA的外切核酸酶降解。

[0226] 为了能够从DNA模板合成RNA而无需基因克隆,应将转录的启动子连接至位于待转录的序列上游的DNA模板。当将用作RNA聚合酶的启动子的序列添加到正向引物的5'末端时,RNA聚合酶启动子在待转录的开放阅读框架上游被整合到PCR产物中。在一个优选实施方案中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其它地方所述。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0227] 在优选实施方案中,mRNA具有帽(在5'上)和3'聚(A)尾,所述5'上的帽和3'聚(A)尾在细胞中决定核糖体结合、翻译起始和mRNA的稳定性。例如,在环状DNA模板上,质粒DNA、RNA聚合酶产生长的多联体产物(concatameric product),其不适合于在真核细胞中表达。在3' UTR末端线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,其在真核转染中无效,即使其在转录后被多腺苷酸化。



[0228] 在线性DNA模板上,噬菌体T7RNA聚合酶可以将转录物的3'末端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0229] 将聚A/T区段整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的聚A/T序列可导致质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常被缺失和其它畸变高度污染的原因。这使得克隆程序不仅费力且耗时,而且通常不可靠。这就是为什么允许用聚A/T 3'区段构建DNA模板而无需克隆的方法是非常想要的原因。

[0230] 转录DNA模板的聚A/T区段可以在PCR期间通过使用含有聚T尾诸如100T尾(大小可以是50-5000T)的反向引物产生,或者在PCR之后通过任何其它方法(包括但不限于DNA连接或体外重组)产生。聚(A)尾也为RNA提供稳定性并降低其降解。通常,聚(A)尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,聚(A)尾为100至5000个腺苷。

[0231] 在使用聚(A)聚合酶(诸如大肠杆菌(E.coli)聚A聚合酶(E-PAP))进行体外转录后,可以进一步延伸RNA的聚(A)尾。在一个实施方案中,将聚(A)尾的长度从100个核苷酸增加至300至400个核苷酸导致RNA的翻译效率增加约2倍。另外,不同化学基团与3'末端的连接可以增加mRNA稳定性。此类连接可含有经修饰的/人工核苷酸、适体和其它化合物。例如,可使用聚(A)聚合酶将ATP类似物掺入聚(A)尾部。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。

[0232] 5'上的帽也为RNA分子提供稳定性。在优选实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域已知的和本文描述的技术(Cougot等,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski等,RNA,7:1468-95(2001);Elango等,Biochim.Biophys.Res.Comm.,330:958-966(2005))提供5'帽。

[0233] 通过本文公开的方法产生的RNA还可含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒、染色体或人工设计的序列,其启动不依赖帽的核糖体与mRNA的结合并促进翻译的起始。可以包括适用于细胞电穿孔的任何溶质,所述溶质可包含促进细胞通透性和活力的因子,诸如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0234] 可以使用许多不同方法中的任一种将RNA引入靶细胞,所述方法是例如商购可得的方法,包括但不限于电穿孔(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems,Cologne,Germany))、(ECM 830(BTX)(Harvard Instruments,Boston,Mass.)或Gene Pulser II(BioRad,Denver,Colo.)、Multiporator(Eppendorf,Hamburg Germany)、使用脂转染的阳离子脂质介导的转染、聚合物包封、肽介导的转染或生物射弹颗粒递送系统诸如“基因枪”(参见,例如,Nishikawa等,Hum Gene Ther.,12(8):861-70(2001))。

[0235] 编码TFP的核酸构建体

[0236] 本发明还提供了编码本文所述的一种或多种TFP构建体的核酸分子。在一个方面,将所述核酸分子作为信使RNA转录物提供。在一个方面,将所述核酸分子作为DNA构建体提供。

[0237] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过筛选来自表达该基因的细胞的选文库,通过从已知包含该基因的载体中获得该基因,或者通过使用标准技术直接从含有所述基因的细胞和组织中分离。或者,可合成产生而非克隆目标基因。

[0238] 在一个实施方案中,使用基因编辑技术(诸如,规律成簇间隔短回文重复系统)(

**CRISPR®**,参见,例如,美国专利第8,697,359号)、转录激活子样效应因子核酸酶(TALEN,参见例如美国专利第9,393,257号)、大范围核酸酶(具有包含12至40个碱基对的双链DNA序列的大识别位点的天然存在的内切脱氧核糖核酸酶类)或锌指核酸酶(ZFN,参见,例如,Urnov等,Nat.Rev.Genetics (2010) v11,636-646)方法对TFP构建体的一个或多个结构域(例如,细胞外结构域、跨膜结构域和细胞信号传导结构域)进行工程改造。这样,嵌合构建体可被工程改造来组合每个亚基的期望特征,诸如构象或信号传导能力。另见Sander&Joung,Nat.Biotech. (2014) v32,347-55,通过引用并入本文。

[0239] 本发明还提供了插入本发明DNA的载体。源自逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的传播。慢病毒载体相对于源自致癌-逆转录病毒诸如鼠白血病病毒的载体具有额外的有利方面,因为它们可以转导非增殖细胞,诸如肝细胞。它们还具有低免疫原性的额外有利方面。

[0240] 在另一个实施方案中,包含编码本发明所需的TFP的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,编码TFP的核酸的表达可以使用转座子诸如sleeping beauty、crisper、CAS9和锌指核酸酶来实现(参见June等,2009Nature Reviews Immunol.9.10:704-716,通过引用并入本文)。

[0241] 使用标准基因递送方案,本发明的表达构建体也可用于核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法是本领域已知的(参见,例如,通过引用整体并入本文的美国专利第5,399,346、5,580,859、5,589,466号)。在另一个实施方案中,本发明提供了基因疗法载体。

[0242] 可以将核酸克隆到许多类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0243] 另外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域熟知的,并且描述于例如Sambrook等,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1至4卷,Cold Spring Harbor Press,NY),以及其它病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中起作用的复制起始点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种选择标志物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利第6,326,193号)。

[0244] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便利的平台。可使用本领域已知的技术将选择的基因插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并在体内或离体递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0245] 另外的启动子元件,例如增强子,调节转录起始的频率。通常,这些元件位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是柔性的,使得当元件相对于彼此反转或移动时保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至50bp。取决于启动子,似乎单个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。

[0246] 能够在哺乳动物T细胞中表达TFP转基因的启动子的实例是EF1a启动子。天然EF1a

启动子驱动延伸因子-1复合物的 $\alpha$ 亚基的表达,所述 $\alpha$ 亚基负责将氨酰基tRNA酶促递送至核糖体。EF1a启动子已广泛用于哺乳动物表达质粒,并已显示其在驱动TFP从克隆到慢病毒载体中的转基因表达中是有效的(参见,例如,Milone等,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009))。启动子的另一个实例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。然而,也可以使用其它组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。另外,本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,所述分子开关能够在需要此类表达时启动与其可操作地连接的多核苷酸序列表达,或者在不期望表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素调节的启动子。

[0247] 为了评估TFP多肽或其部分的表达,待引入至细胞中的表达载体还可含有选择标记基因或报告基因或两者,以便于从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其它方面,选择标志物可携带在单独的DNA片段上并用于共转染程序。选择标志物和报告基因都可以侧接适当的调节序列以使其能够在宿主细胞中表达。有用的选择标志物包括,例如,抗生素抗性基因,诸如neo等。

[0248] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评估调控序列的功能性。通常,报告基因是不存在于受者生物体或组织中或由其表达的基因,并且编码其表达通过一些易于检测的特性(例如酶促活性)表现出来的多肽。在将DNA引入受者细胞后的适当时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白的基因(例如,Ui-Tei等,2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的,并且可以使用已知技术制备或商购获得。通常,具有显示报告基因最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区域可以与报告基因连接,并用于评估剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0249] 将基因引入细胞并在所述细胞中表达所述基因的方法是本领域已知的。在表达载体的上下文中,可以通过本领域的任何方法将载体容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞或昆虫细胞。例如,可通过物理、化学或生物手段将表达载体转移到宿主细胞中。

[0250] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的(参见,例如,Sambrook等,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)。将多核苷酸引入宿主细胞的一种方法是磷酸钙转染

[0251] 用于将目标多核苷酸引入宿主细胞的生物方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已成为将基因插入哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其它病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等(参见,例如,美国专利第5,350,674号和5,585,362号)。

[0252] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶态分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送运载体的示例性胶态系统是脂质体(例如,人造膜小囊泡)。可获得现有技术的靶向递送核酸的其它方法,诸如利用靶向纳米颗粒的多核苷酸的递送或其它合适的亚微米大小的递送系统。

[0253] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送运载体是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。在另一个方面,核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可被包封在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸缔合的连接分子附着于脂质体,包埋在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,作为悬浮物包含在脂质中,含有胶束或与胶束复合,或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以以双层结构、胶束存在或具有“塌陷的”结构。它们还可简单地散布在溶液中,可能形成尺寸或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂族烃及其衍生物(诸如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛)的化合物种类。

[0254] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可从Sigma, St. Louis, MO获得;磷酸联十六烷基酯(“DCP”)可从K&K Laboratories (Plainview, N.Y.)获得;胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以在约-20℃下储存。氯仿用作唯一的溶剂,因为其比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,其包括通过产生封闭的脂质双层或聚集体形成的各种单层和多层脂质运载体。脂质体可表征为具有拥有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过水性介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。在形成封闭结构之前,脂质组分经历自身重排,并在脂质双层之间捕获水和溶解的溶质(Ghosh等,1991Glycobiology 5:505-10)。然而,还包括在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。例如,脂质可呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了lipofectamine-核酸复合物。

[0255] 无论用于将外源核酸引入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法,为了证实重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可进行多种测定法。此类测定包括,例如,本领域技术人员公知的“分子生物学”测定,诸如DNA和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文所述的鉴定落入本发明范围内的剂的测定法。

[0256] 本发明还提供了包含TFP编码核酸分子的载体。在一个方面,可将TFP载体直接转导到细胞(例如T细胞)中。在一个方面,载体是克隆性载体或表达载体,例如载体,包括但不限于一种或多种质粒(例如,表达质粒、克隆性载体、微环、微型载体(minivectors)、双微染色体(double minute chromosomes))、逆转录病毒和慢病毒载体结构体。在一个方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达TFP构建体。在一个方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0257] T细胞的来源

[0258] 在扩增和遗传修饰之前,从受试者获得T细胞来源。术语“受试者”旨在包括其中可

引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可以从许多来源获得,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、胸膜积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些方面,可以使用本领域可获得的许多T细胞系。在本发明的某些方面,T细胞可获自使用本领域技术人员已知的许多技术(诸如Ficoll™分离)从受试者采集的血液单位。在一个优选方面,来自个体的循环血液的细胞通过单采血液成分术获得。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个方面,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆级分并将细胞置于合适的缓冲液或介质中用于后续处理步骤。在本发明的一个方面,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在替代方面,洗涤溶液缺乏钙并且可缺乏镁,或者可缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子。在钙不存在的情况下的初始活化步骤可以导致放大的激活。如本领域普通技术人员将容易理解的,洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法完成,诸如通过按照制造商的说明使用半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液(诸如,例如不含Ca、不含Mg的PBS、PlasmaLyte A或其它含有或不含缓冲剂的盐溶液)中。或者,可以除去单采血液成分术样品中不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0259] 在一个方面,通过裂解红细胞和耗尽单核细胞从外周血淋巴细胞分离T细胞,例如,通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘洗。可以通过阳性或阴性选择技术来进一步分离特定的T细胞亚群,诸如CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和CD45RO<sup>+</sup>T细胞。例如,在一个方面,通过与缀合有抗CD3/抗CD28(例如,3x28)的珠粒(诸如DYNABEADS™ M-450CD3/CD28T)一起孵育足以用于所需T细胞的阳性选择的时间段来分离T细胞。在一个方面,该时间段约为30分钟。在另外的方面,该时间段的范围为30分钟至36小时或更长,以及其间的所有整数值。在另一个方面,该时间段为至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时。在另一个优选方面,时间段为10小时至24小时。在一个方面,孵育时间段为24小时。在与其它细胞类型相比,存在少数T细胞的任何情况下,诸如在从肿瘤组织或从免疫受损个体中分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中,可以使用更长的孵育时间来分离T细胞。另外,使用更长的孵育时间可以提高CD8<sup>+</sup>T细胞的捕获效率。因此,通过仅缩短或延长使T细胞与CD3/CD28珠粒结合的时间和/或通过增加或减少珠粒与T细胞的比率(如本文进一步描述的),可以在培养开始时或在该过程中的其它时间点优先选择T细胞亚群或排除T细胞亚群。另外,通过增加或减少珠粒或其它表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或在其它所需时间点优先选择或排除T细胞亚群。技术人员会认识到,在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。在某些方面,可能需要执行选择程序并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。还可对“未选择的”进行附加轮次的选择。

[0260] 通过阴性选择富集T细胞群可以利用针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体组合来实现。一种方法是通过使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物的负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过阴性选择富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面,可能需要富集或阳性选择通常表达CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62Lhi、GITR<sup>+</sup>和FoxP3<sup>+</sup>的调节性T细胞。或者,在某些方面,T调节性细胞被缀合有抗CD25的珠粒或其它类似

的选择方法耗尽。

[0261] 在一个实施方案中,可以选择表达IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔素,或其它合适的分子,例如其它细胞因子中的一种或多种的T细胞群。用于筛选细胞表达的方法可以例如通过PCT公开号:WO 2013/126712中描述的方法确定。

[0262] 为了通过阳性或阴性选择分离所需的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,颗粒诸如珠粒)的浓度。在某些方面,可能需要显著减小珠粒和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,在一个方面,使用20亿个细胞/mL的浓度。在一个方面,使用10亿个细胞/mL的浓度。在另外的方面,使用大于1亿个细胞/mL。在另一个方面,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/mL的细胞浓度。在另一个方面,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/mL的细胞浓度。在另外的方面,可使用1.25亿或1.5亿个细胞/mL的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产量、细胞活化和细胞扩增。另外,使用高细胞浓度可允许更高效地捕获可能微弱地表达目标靶抗原的细胞,诸如CD28阴性T细胞,或来自其中存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群可能具有治疗价值并且期望获得。例如,使用高浓度的细胞允许更高效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8+T细胞。

[0263] 在相关方面,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,颗粒诸如珠粒)的混合物,使颗粒和细胞之间的相互作用最小化。这选择将与所述颗粒结合的表达大量所需抗原的细胞。例如,相较于CD8+T细胞,CD4+T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀释浓度下被更高效地捕获。在一个方面,使用的细胞浓度为 $5 \times 10^6$ /mL。在其它方面,使用的浓度可以是约 $1 \times 10^5$ /mL至 $1 \times 10^6$ /mL,以及其间的任何整数值。在其它方面,可将细胞在旋转器上以不同的速度在2-10℃或室温下孵育不同的时间长度。

[0264] 还可在洗涤步骤后冷冻用于刺激的T细胞。不希望受理论束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度的单核细胞提供更均匀的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并且在这种情况下是有用的,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40%和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基,或含有31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%葡萄糖,20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基或含有例如羟乙基淀粉(Hespan)和PlasmaLyte A的其它合适的细胞冷冻介质,然后将细胞以1℃/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。可以使用其它受控冷冻方法以及在-20℃下或在液氮中立即进行的不受控制的冷冻。在某些方面,将冷冻保存的细胞如本文所述进行解冻和洗涤,并在室温下静置1小时,然后使用本发明的方法活化。

[0265] 在本发明的说明书中还考虑了在可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采血液成分术产物。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩增细胞的来源,并且分离和冷冻所需的细胞(诸如T细胞)以便随后在T细胞疗法中用于可受益于T细胞疗法的多种疾病或病况,诸如本文所述的那些疾病或病况。在一个方面,血液样品或单采血液成分取自通常健康的受试者。在某些方面,血液样品或单采血液成分取自一般健康的受试者,所述受试者有发展疾病的风险,但尚未发展疾病,并且分离和冷冻目标细

胞供以后使用。在某些方面,可扩增、冷冻T细胞以供以后使用。在某些方面,在诊断如本文所述的特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另外的方面,在进行多种相关治疗方式之前,从受试者的血液样品或单采血液成分中分离细胞,所述相关治疗形式包括但不限于利用剂诸如那他珠单抗、依法珠单抗,抗病毒剂,化学疗法,放射,免疫抑制剂诸如环孢霉素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506,抗体或其它免疫烧蚀剂诸如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢霉素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐射的治疗。

[0266] 在本发明的另外的方面,在给予受试者功能性T细胞的治疗后直接从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到在某些癌症治疗(特别是用损害免疫系统的药物治疗)后,在治疗后不久在患者通常将从治疗中恢复期间,就其离体扩增的能力而言,获得的T细胞的质量可能是最佳或得到提高。同样地,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可处于用于增强的植入和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的上下文中,考虑了在该恢复期期间收集血细胞,包括T细胞、树突状细胞或造血谱系的其它细胞。此外,在某些方面,动员(例如,用GM-CSF动员)和预处理方案可用于在受试者中产生病症,其中特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增是有利的,尤其是在治疗后确定的时间窗口期间。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突状细胞和免疫系统的其它细胞。

[0267] T细胞的激活和扩增

[0268] 通常可以使用例如美国专利第6,352,694号、6,534,055号、6,905,680号、6,692,964号、5,858,358号、6,887,466号、6,905,681号、7,144,575号、7,067,318号、7,172,869号、7,232,566号、7,175,843号、5,883,223号、6,905,874号、6,797,514号、6,867,041号和7,572,631号中所述的方法活化和扩增T细胞。

[0269] 通常,本发明的T细胞可通过与其上附接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触来进行扩增。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群,诸如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段,或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过和与钙离子载体结合的蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,在适于刺激T细胞增殖的条件下,可使T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France),可以使用本领域通常已知的其它方法(Berg等, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen等, J. Exp. Med. 190(9):1319-1328; Garland等, J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

[0270] 已暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如,典型的血液或外周血单核细胞产物具有辅助T细胞群(TH, CD4+),其大于细胞毒性T细胞或抑制性T细胞群(TC, CD8+)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩增T细胞产生T细胞群,所述T细胞群在约8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约8-9天之后,T细胞群包含不断增大的TC细胞群。因此,取决于治疗目的,向受试者输注主要包含TH细胞的T细胞群可以是有利的。类似地,如果已经分离了TC细胞的抗原特异性亚群,则将该亚群扩增至更大程度可以是有益的。

[0271] 此外,除了CD4和CD8标志物以外,其它表型标志物变化很大,但在很大程度上,在细胞扩增过程中可再现。因此,此类再现性使得能够针对特定目的定制活化的T细胞产物。



[0272] 一旦构建抗BCMA TFP,就可使用各种测定来评估分子的活性,诸如但不限于在抗原刺激后扩增T细胞的能力、在再刺激不存在的情况下维持T细胞扩增以及在适当的体外和动物模型中的抗癌活性。评估抗BCMA TFP的作用的测定在下面进一步详细描述

[0273] 原代T细胞中TFP表达的蛋白质印迹分析可用于检测单体和二聚体的存在(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,将表达TFP的T细胞(CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的1:1混合物)在体外扩增超过10天,然后裂解并在还原条件下进行SDS-PAGE。使用针对TCR链的抗体通过蛋白质印迹检测TFP。将同一T细胞亚群用于在非还原条件下的SDS-PAGE分析,以允许评估共价二聚体形成。

[0274] 可通过流式细胞术测量抗原刺激后TFP<sup>+</sup>T细胞的体外扩增。例如,用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28和APC刺激CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,然后在待分析的启动子的控制下用表达GFP的慢病毒载体进行转导。示例性启动子包括CMV IE基因、EF-1 $\alpha$ 、遍在蛋白C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。通过流式细胞术在CD4<sup>+</sup>T细胞和/或CD8<sup>+</sup>T细胞亚群中培养的第6天评估GFP荧光(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。或者,在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠刺激CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,并在第1天使用表达TFP的双顺反子慢病毒载体用TFP以及使用2A核糖体跳跃序列利用eGFP转导所述细胞。在抗CD3和抗CD28抗体(K562-BBL-3/28)存在的情况下,用BCMA+K562细胞(K562-BCMA)、野生型K562细胞(K562野生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞再次刺激培养物,然后洗涤。每隔一天以100IU/mL向培养物中加入外源IL-2。使用基于珠粒的计数通过流式细胞术计数GFP<sup>+</sup>T细胞(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。

[0275] 还可以测量在再刺激不存在的情况下持续的TFP<sup>+</sup>T细胞扩增(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,在于第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁珠刺激并在第1天用指定的TFP转导后,使用Coulter Multisizer III颗粒计数器在培养的第8天测量平均T细胞体积(f1)。

[0276] 动物模型也可用于测量TFP-T活性。例如,使用人BCMA特异性TFP<sup>+</sup>T细胞治疗免疫缺陷小鼠中的癌症的异种移植模型(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,在癌症建立后,将小鼠随机分配至治疗组。将不同数量的工程改造的T细胞以1:1比率共注射到携带癌症的NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ 小鼠中。在T细胞注射后的不同时间评估来自小鼠的脾DNA中每种载体的拷贝数。以每周一次的间隔评估动物的癌症。在注射了 $\alpha$ BCMA- $\zeta$ TFP<sup>+</sup>T细胞或模拟转导的T细胞的小鼠中测量外周血BCMA<sup>+</sup>癌细胞计数。使用对数秩检验比较组的存活曲线。另外,还可以分析在NOD/SCID/ $\gamma^{-/-}$ 小鼠中注射T细胞后4周的绝对外周血CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞计数。给小鼠注射癌细胞,并在3周后注射T细胞,所述T细胞经工程改造以通过编码与eGFP连接的TFP的双顺反子慢病毒载体表达TFP。通过在注射前与模拟转导的细胞混合将T细胞针对45-50%的输入GFP<sup>+</sup>T细胞进行标准化,并通过流式细胞术确认。以1周的间隔评估动物的癌症。使用对数秩检验比较TFP<sup>+</sup>T细胞组的存活曲线。

[0277] 可以评估剂量依赖性TFP治疗反应(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。例如,在于第21天用TFP<sup>+</sup>T细胞、相同数量的模拟转导的T细胞或无T细胞注射的小鼠中建立癌症后35-70天获得外周血。将来自每组的小鼠随机放血以测定外周血BCMA<sup>+</sup>癌细胞计数,然后在第35天和第49天杀死。在第57天和第70天评估剩余的动物。



[0278] 先前已在例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)中描述了细胞增殖和细胞因子产生的评估。简言之,通过将洗涤的T细胞与表达BCMA或CD32和CD137(KT32-BBL)的细胞混合(最终的T细胞:表达BCMA的细胞的比率为2:1)在微量滴定板中进行TFP介导的增殖的评估。表达BCMA细胞在使用前用 $\gamma$ 射线照射。将抗CD3(克隆OKT3)和抗CD28(克隆9.3)单克隆抗体加入到含有KT32-BBL细胞的培养物中,以用作刺激T细胞增殖的阳性对照,因为这些信号支持长期CD8+T细胞离体扩增。如制造商所述,使用CountBright™荧光珠(Invitrogen)和流式细胞术在培养物中计数T细胞。使用用表达连接有eGFP-2A的TFP的慢病毒载体工程改造的T细胞,通过GFP表达鉴定TFP+T细胞。对于不表达GFP的TFP+T细胞,用生物素化的重组BCMA蛋白和第二抗生物素蛋白-PE缀合物检测TFP+T细胞。还用特异性单克隆抗体(BD Biosciences)同时检测T细胞上的CD4+和CD8+表达。根据制造商的说明,使用人TH1/TH2细胞因子细胞计数珠阵列试剂盒(BD Biosciences)对再刺激后24小时收集的上清液进行细胞因子测量。使用FACScalibur流式细胞仪评估荧光,并根据制造商的说明分析数据。

[0279] 可通过标准 $^{51}\text{Cr}$ -释放测定法(参见,例如,Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))来评估细胞毒性。简言之,在37°C下将靶细胞加载 $^{51}\text{Cr}$ (作为 $\text{NaCrO}_4$ ,New England Nuclear)2小时并频繁搅拌,在完全RPMI中洗涤两次并涂铺到微量滴定板中。以不同比率的效应细胞:靶细胞(E:T)将效应T细胞与靶细胞在孔中于完全RPMI中混合。还制备了仅含有培养基(自发释放,SR)或1%triton-X100洗涤剂溶液(总释放,TR)的额外孔。在37°C孵育4小时后,收获每个孔的上清液。然后使用 $\gamma$ 粒子计数器(Packard Instrument Co., Waltham,Mass.)测量释放的 $^{51}\text{Cr}$ 。每种条件至少进行一式三次,并且使用公式:裂解%=(ER-SR)/(TR-SR)计算裂解百分比,其中ER表示对于每种实验条件释放的平均 $^{51}\text{Cr}$ 。

[0280] 成像技术可用于评估荷瘤动物模型中TFP的特定运输和增殖。例如,在Barrett等,Human Gene Therapy 22:1575-1586(2011)中已经描述了此类测定。简言之,用癌细胞静脉内(IV)注射NOD/SCID/ $\gamma$ c-/- (NSG)小鼠,7天后在用TFP构建体电穿孔后4小时用T细胞注射。用慢病毒构建体稳定转染T细胞以表达萤火虫荧光素酶,并对小鼠进行生物发光成像。或者,可以如下测量在癌症异种移植模型中单次注射TFP+T细胞的治疗功效和特异性:给NSG小鼠注射经转导以稳定表达萤火虫荧光素酶的癌细胞,然后在7天后单次尾静脉注射用BCMA TFP电穿孔的T细胞。在注射后的不同时间点对动物进行成像。例如,可以产生第5天(处理前2天)和第8天(TFP+PBL后24小时)的代表性小鼠中萤火虫荧光素酶阳性癌症的光子密度热图。

[0281] 其它测定,包括本文实施例部分中描述的那些测定以及本领域已知的那些测定也可用于评估本发明的抗BCMA TFP构建体。

#### [0282] 治疗应用

[0283] BCMA相关疾病和/或病症

[0284] 在一个方面,本发明提供了治疗与BCMA表达相关的疾病的方法。在一个方面,本发明提供了治疗其中部分肿瘤对BCMA呈阴性,部分肿瘤对BCMA呈阳性的疾病的方法。例如,本发明的抗体或TFP可用于治疗已经历过与BCMA表达升高相关的疾病的治疗的受试者,其中已经历过用于升高的BCMA水平的治疗的受试者表现出与升高的BCMA水平相关的疾病。

[0285] 在一个方面,本发明涉及包含与用于在哺乳动物T细胞中表达的启动子可操作地

连接的抗BCMA抗体或TFP的载体。在一个方面,本发明提供了用于治疗表达BCMA的肿瘤的表  
达BCMA TFP的重组T细胞,其中表达BCMA TFP的重组T细胞称为BCMA TFP-T。在一个方面,本  
发明的BCMA TFP-T能够使肿瘤细胞与在其表面上表达的至少一种本发明的BCMA TFP接触,  
使得TFP-T靶向肿瘤细胞并抑制肿瘤的生长。

[0286] 在一个方面,本发明涉及抑制表达BCMA的肿瘤细胞生长的方法,其包括使肿瘤细胞  
与本发明的BCMA抗体或TFP T细胞接触,使得TFP-T响应于抗原而被活化并靶向癌细胞,  
其中肿瘤的生长被抑制。

[0287] 在一个方面,本发明涉及治疗受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用本  
发明的BCMA抗体、双特异性抗体或TFP T细胞,使得在受试者的癌症得以治疗。可通过本发  
明的BCMA TFP T细胞治疗的癌症的实例是与BCMA表达相关的癌症。在一个方面,癌症是骨  
髓瘤。在一个方面,癌症是淋巴瘤。在一个方面,癌症是结肠癌。

[0288] 在一些实施方案中,可将BCMA抗体或TFP疗法与一种或多种另外的疗法组合使用。  
在一些情况下,此类另外的疗法包括化学治疗剂,例如环磷酰胺。在一些情况下,此类另外的  
疗法包括手术切除或放射治疗。

[0289] 在一个方面,本文公开了细胞疗法的方法,在所述细胞疗法中对T细胞进行遗传修  
饰以表达TFP,并将表达TFP的T细胞输注给有需要的受者。输注的细胞能够杀伤受者中的肿  
瘤细胞。与抗体疗法不同,表达TFP的T细胞能够在体内复制,从而导致长期持续性,这可导  
致持续的肿瘤控制。在各个方面,在向患者施用T细胞后,向患者施用的T细胞或其后代在患  
者中持续至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、  
14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3  
年、4年或5年。

[0290] 在一些情况下,本文公开了一种类型的细胞疗法,其中T细胞被修饰(例如通过体  
外转录的RNA)以瞬时表达TFP,并且将表达TFP的T细胞输注给有需要的受者。输注的细胞能  
够杀伤受者中的肿瘤细胞。因此,在各个方面,给患者施用的T细胞在将T细胞施用于患者后  
存在不足1个月,例如3周、2周或1周。

[0291] 不希望受任何特定理论的束缚,表达TFP的T细胞引发的抗肿瘤免疫应答可以是主  
动或被动免疫应答,或者可归因于直接免疫应答对比间接免疫应答。在一个方面,TFP转导  
的T细胞响应于表达BCMA抗原的人癌细胞表现出特定的促炎细胞因子分泌和强效的溶细胞  
活性,抵抗可溶性BCMA抑制,介导旁观者杀伤和/或介导已建立的人肿瘤的消退。例如,在表  
达BCMA的肿瘤的异质区域内的无抗原肿瘤细胞(antigen-less tumor cell)可能易受BCMA  
重定向的T细胞间接破坏,所述T细胞先前已经与邻近的抗原阳性癌细胞反应。

[0292] 在一个方面,本发明的人TFP修饰的T细胞可以是用于哺乳动物体外免疫和/或体  
内治疗的一类疫苗。在一个方面,哺乳动物是人。

[0293] 关于离体免疫,在向哺乳动物施用细胞之前,体外发生以下的至少一种:i)细胞扩  
增,ii)将编码TFP的核酸引入细胞或iii)冷冻保存细胞。

[0294] 离体方法是本领域公知的,并在下面更全面地讨论。简言之,从哺乳动物(例如人)  
分离细胞,并用表达本文公开的TFP的载体进行遗传修饰(即,体外转导或转染)。可向哺乳  
动物受者施用TFP修饰的细胞以提供治疗益处。哺乳动物受者可以是人,并且TFP修饰的细  
胞相对于受者可以是自体的。或者,相对于受者,细胞可以是同种异体的、同基因的或异基

因的。

[0295] 用于离体扩增造血干细胞和祖细胞的方法描述于例如美国专利第5,199,942号(通过引用并入本文)中,可以应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞离体扩增的任何特定方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从外周血收获物或骨髓外植体收集来自哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;(2)离体扩增此类细胞。除了美国专利第5,199,942号中描述的细胞生长因子以外,其它因子诸如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体也可用于培养和扩增所述细胞。

[0296] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗以外,本发明还提供了用于体内免疫以引发针对患者中的抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0297] 通常,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫受损个体中出现的疾病。特别地,本发明的TFP修饰的T细胞用于治疗与BCMA表达相关的疾病、病症和病况。在某些方面,本发明的细胞用于治疗有发展与BCMA表达相关的疾病、病症和病况风险的患者。因此,本发明提供了治疗或预防与BCMA表达相关的疾病、病症和病况的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的TFP-修饰的T细胞。

[0298] 在一个方面,本发明的抗体或TFP-T细胞可用于治疗增殖性疾病诸如癌症或恶性肿瘤,或者是癌前病症。在一个方面,癌症是骨髓瘤。在一个方面,癌症是淋巴瘤。在一个方面,癌症是结肠癌。另外,与BCMA表达相关的疾病包括但不限于例如非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病况或表达BCMA的增殖性疾病。与BCMA表达相关的非癌相关适应症包括但不限于例如自身免疫性疾病(例如狼疮)、炎症病症(过敏症和哮喘)和移植。

[0299] 本发明的抗体或TFP-修饰的T细胞可以单独施用,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其它组分诸如IL-2或其它细胞因子或细胞群组合施用。

[0300] 本发明还提供了抑制表达BCMA的细胞群的增殖或减少表达BCMA的细胞群的方法,所述方法包括使包含BCMA表达细胞的细胞群与本发明的抗BCMA TFP-T细胞接触,所述抗BCMA TFP-T细胞与表达BCMA的细胞结合。在具体的方面,本发明提供了抑制表达BCMA的癌细胞增殖或减小其群的方法,所述方法包括使表达BCMA的癌细胞群与本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细胞接触,所述抗BCMA抗体或TFP-T细胞与表达BCMA的细胞结合。在一个方面,本发明提供了抑制表达BCMA的癌细胞增殖或减少其群的方法,所述方法包括使表达BCMA的癌细胞群与本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细胞接触,所述抗BCMA抗体或TFP-T细胞与表达BCMA的细胞结合。在某些方面,本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细胞使患有多发性骨髓瘤或与表达BCMA的细胞相关的另一种癌症的受试者或所述疾病的动物模型中的细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比相对于阴性对照减少至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一个方面,受试者是人。

[0301] 本发明还提供了用于预防、治疗和/或控制与表达BCMA的细胞相关的疾病(例如,表达BCMA的癌症)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用与表达BCMA的细胞结合的本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细胞。在一个方面,受试者是人。与表达BCMA的细胞相关的病症的非限制性实例包括自身免疫性病症(诸如狼疮)、炎症病症(诸如过敏症和哮喘)和癌症(诸如血液癌症或表达BCMA的非典型癌症)。

[0302] 本发明还提供预防、治疗和/或控制与表达BCMA的细胞相关的疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用与表达BCMA的细胞结合的本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细

胞。在一个方面,受试者是人。

[0303] 本发明提供了用于预防与表达BCMA的细胞相关的癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用与表达BCMA的细胞结合的本发明的抗BCMA抗体或TFP-T细胞。在一个方面,所述方法包括向有需要的受试者施用与有效量的另一种疗法组合的有效量的本文所述的抗BCMA抗体或TFP-T细胞,所述抗BCMA抗体或TFP-T细胞与表达BCMA的细胞结合。

[0304] 组合疗法

[0305] 可将本文所述的抗体或表达TFP的细胞与其它已知的剂和疗法组合使用。如本文中所用,“组合”施用意指在受试者患有病症的过程中向所述受试者递送两种(或更多种)不同的治疗,例如,在受试者已被诊断患有病症后并且在所述病症已被治愈或消除之前或者治疗因其它原因已停止后,递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,当第二次治疗的递送开始时,仍然在进行一种治疗的递送,从而使得在施用方面存在重叠。这在本文中有早称为“同时”或“同时递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的一些实施方案中,由于组合施用,治疗更有效。例如,第二治疗更有效,例如,对于较少的第二治疗看到等同的作用,或者与在第一治疗不存在的情况下施用第二治疗时看到的相比,第二治疗使症状减轻的程度更大,或对于第一治疗看到类似的情形。在一些实施方案中,递送是使得与病症相关的症状或其它参数的减小大于对于在另一种治疗不存在的情况下递送的一种治疗所观察到的所述症状或参数的减小的递送。两种治疗的作用可以是部分累加的、完全累加的或大于累加的。递送可以是使得所递送的第一治疗的作用在递送第二治疗时仍然是可检测的递送。

[0306] 在一些实施方案中,“至少一种另外的治疗剂”包括表达TFP的细胞。还提供了表达多种TFP的T细胞,其结合相同或不同的靶抗原,或同一靶抗原上的相同或不同的表位。还提供了其中第一T细胞亚群表达第一TFP并且第二T细胞亚群表达第二TFP的T细胞群。

[0307] 本文所述的表达TFP的细胞和至少一种另外的治疗剂可以在相同或分开的组合物中同时或依次施用。对于顺序施用,可以首先施用本文所述的表达TFP的细胞,接着可施用另外的剂,或者可以颠倒施用的顺序。

[0308] 在另外的方面,可将本文所述的表达TFP的细胞与如下治疗方法组合地用于治疗:手术、化学疗法、放射、免疫抑制剂诸如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506、抗体或其它免疫烧蚀剂诸如CAMPATH、抗CD3抗体或其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢霉素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射、肽疫苗(诸如Izumoto等,2008J Neurosurg108:963-971中描述的肽疫苗)。

[0309] 在一个实施方案中,可向受试者施用降低或改善与施用表达TFP的细胞相关的副作用的剂。与施用表达TFP的细胞相关的副作用包括但不限于细胞因子释放综合征(CRS)和噬血细胞淋巴组织细胞增多症(HLH)(也称为巨噬细胞活化综合征(MAS))。CRS的症状包括高烧、恶心、短暂性低血压、缺氧等。因此,本文所述的方法可包括向受试者施用本文所述的表达TFP的细胞,并进一步施用剂以控制由使用表达TFP的细胞的治疗导致的升高的可溶性因子水平。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子是IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2和IL-6中的一种或多种。因此,施用来治疗该副作用的剂可以是中和这些可溶性因子中的一种或多种的剂。此类剂包括但不限于类固醇、TNF $\alpha$ 的抑制剂和IL-6的抑制剂。TNF $\alpha$ 抑制剂的实例是依那西普(以名称 ENBREL® 销售)。IL-6抑制剂的实例是托珠单抗(以商品名

ACTEMRA®销售)。

[0310] 在一个实施方案中,可向受试者施用增强表达TFP的细胞的活性的剂。例如,在一个实施方案中,剂可以是抑制抑制性分子的剂。在一些实施方案中,抑制性分子(例如,程序性死亡1(PD1))可降低表达TFP的细胞引发免疫效应子应答的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。抑制性分子的抑制(例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上的抑制)可优化表达TFP的细胞的性能。在实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可用于抑制抑制性分子在表达TFP的细胞中的表达。在实施方案中,抑制剂是shRNA。在实施方案中,抑制性分子在表达TFP的细胞内被抑制。在这些实施方案中,抑制抑制性分子表达的dsRNA分子与编码TFP的组分(例如所有组分)的核酸连接。在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是例如与抑制性分子结合的抗体或抗体片段。例如,该剂可以是与PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如,伊匹木单抗(也称为MDX-010和MDX-101,并且作为YERVOY®销售;Bristol-Myers Squibb;曲美木单抗(可从Pfizer获得的IgG2单克隆抗体,以前称为替西木单抗,CP-675,206))。在实施方案中,该剂是与T细胞免疫球蛋白和含粘蛋白结构域-3(TIM3)结合的抗体或抗体片段。在实施方案中,所述剂是与淋巴细胞活化基因3(LAG3)结合的抗体或抗体片段。

[0311] 在一些实施方案中,增强表达TFP的细胞的活性的剂可以是例如包含第一结构域和第二结构域的融合蛋白,其中第一结构域是抑制性分子或其片段,并且第二结构域是与阳性信号相关的多肽,例如包含如本文所述的细胞内信号传导结构域的多肽。在一些实施方案中,与阳性信号相关的多肽可包括CD28、CD27、ICOS的共刺激结构域,例如CD28、CD27和/或ICOS的细胞内信号传导结构域,和/或例如CD3 $\zeta$ 的初级信号传导结构域(例如,本文所述的)。在一个实施方案中,融合蛋白由表达TFP的同一细胞表达。在另一个实施方案中,融合蛋白由不表达抗BCMA TFP的细胞(例如,不表达抗BCMA TFP的T细胞)表达。

[0312] 药物组合物

[0313] 本发明的药物组合物可包含表达TFP的细胞(例如,如本文所述的多种表达TFP的细胞)与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合。此类组合物可包含缓冲液,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。在一个方面,将本发明的组合物配制用于静脉内施用。

[0314] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性等因素确定,尽管适当的剂量可以通过临床试验确定。

[0315] 在一个实施方案中,药物组合物基本上不含污染物,例如,不存在可检测水平的污染物,所述污染物例如选自以下组成的组:内毒素、支原体、复制型慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被的珠粒、小鼠抗体、合并的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、载体包装细胞或质粒组分、细菌和真菌。在一个实施方案中,细菌是选自以下组成的组的至少一种:粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus*

influenza)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitides*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumonia*) 和化脓性链球菌A组 (*Streptococcus pyogenes* group A)。

[0316] 当指示“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医生在考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)状况的个体差异的情况下确定。通常可以说,包含本文所述T细胞的药物组合物可以以 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞/kg体重,在一些情况下,以 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞/kg体重(包括这些范围内的所有整数值)的剂量施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术(参见,例如,Rosenberg等,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)来施用细胞。

[0317] 在某些方面,可能需要向受试者施用活化的T细胞,然后随后重新抽取血液(或进行单采血液成分),根据本发明从中活化T细胞,并用这些活化的且扩增的T细胞重新输注患者。该过程可以每隔几周进行多次。在某些方面,可从10cc至400cc的血液抽取活化T细胞。在某些方面,从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的血液抽取中活化T细胞。

[0318] 本发明组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。可将本文所述的组合物经动脉、皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内向患者施用。在一个方面,通过皮内或皮下注射将本发明的T细胞组合物向患者施用。在一个方面,将本发明的T细胞组合物通过静脉内注射施用。可以将T细胞的组合物直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位中。

[0319] 在特定的示例性方面,受试者可经历白细胞去除术,其中离体收集、富集或耗尽白细胞以选择和/或分离目标细胞,例如T细胞。可通过本领域已知的方法扩增和处理这些T细胞分离物,合得可以引入本发明的一种或多种TFP构建体,从而产生本发明的表达TFP的T细胞。有需要的受试者随后可经历高剂量化学疗法的标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些方面,在移植后或与移植同时,受试者接受本发明的扩增的TFP T细胞的输注。在另一方面,在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0320] 向患者施用的上述治疗的剂量将随所治疗病况的确切性质和治疗的受者而变化。可以根据本领域公认的实践来进行用于人施用的剂量的缩放。例如,对于成年患者,阿仑单抗(CAMPATH®)的剂量通常为1mg至约100mg,通常每天施用一次,持续1至30天。优选的日剂量为每天1mg至10mg,但在某些情况下,可以使用每天最多40mg的较大剂量(描述于美国专利第6,120,766号中)。

[0321] 在一个实施方案中,例如使用体外转录将TFP引入T细胞中,并且受试者(例如,人)接受本发明的TFP T细胞的初始施用,和本发明的TFP T细胞的一次或多次后续施用,其中在先前的施用后不到15天,例如14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天施用一次或多次后续施。在一个实施方案中,每周向受试者(例如人)施用超过一次本发明的TFP T细胞的施用,例如每周施用2次、3次或4次本发明的TFP T细胞的施用。在一个实施方案中,受试者(例如,人受试者)每周接受多于一次TFP T细胞的施用(例如,每周2次、3次或4次施用)(在本文中也称为周期),然后是在一周不施用TFP T细胞,然后向受试者施用一次或多次额外的TFP T细胞施用(例如,每周施用多于一次的TFP T细胞)。在另一个

实施方案中,受试者(例如,人受试者)接受多于一个周期的TFP T细胞,并且每个周期之间的时间小于10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天或3天。在一个实施方案中,每隔一天施用TFP T细胞,每周施用3次。在一个实施方案中,施用本发明的TFP T细胞,持续至少2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周或更多周。

[0322] 在一个方面,使用慢病毒病毒载体(诸如慢病毒)产生BCMA TFP T细胞。以这种方式产生的TFP-T细胞将具有稳定的TFP表达。

[0323] 在一个方面,TFP T细胞在转导后4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天瞬时表达TFP载体。TFP的瞬时表达可以通过RNA TFP载体递送来实现。在一个方面,通过电穿孔将TFP RNA转导到T细胞中。

[0324] 使用瞬时表达TFP T细胞(特别是利用具有鼠scFv的TFP T细胞)治疗的患者可能出现的潜在问题是多次治疗后的过敏反应。

[0325] 不受该理论的束缚,据信这种过敏反应可能是由患者发展体液抗TFP反应,即具有抗IgE同种型的抗TFP抗体引起的。据认为,当暴露于抗原时间为十至十四天时,患者的抗体产生细胞经历从IgG同种型(不会引起过敏反应)到IgE同种型的类别转换。

[0326] 如果患者有在短暂TFP治疗过程中产生抗TFP抗体反应的高风险(诸如通过RNA转导产生的那些),则TFP T细胞输注中断不应持续超过10至14天。

[0327] 实施例

[0328] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。除非另有说明,否则提供这些实施例仅用于说明的目的,并不意图作限制。因此,本发明不应被解释为限于以下实施例,而是应理解为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。无需进一步描述,相信使用前述说明和以下说明性实施例,本领域普通技术人员可以制备和利用本发明的化合物并实施所要求保护的方法。以下工作实施例具体指出了本发明的各个方面,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0329] 实施例1:TFP构建体

[0330] 通过将经由编码短接头(SL):AAAGGGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1)或编码长接头(LL):AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGG GSGGGGSLE (SEQ ID NO:2)的DNA序列与CD3或TCR DNA片段连接的抗BCMA scFv DNA片段在XbaI和EcoRI位点克隆到p510载体((System Biosciences (SBI))中来工程改造抗BCMA TFP构建体。

[0331] 产生的抗BCMA TFP构建体是p510\_抗BCMA\_LL\_TCR $\alpha$ (抗BCMA scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\alpha$ 链)、p510\_抗BCMA\_LL\_TCR $\alpha$ C(抗BCMA scFv-长接头-人T细胞受体 $\alpha$ 恒定结构域链)、p510\_抗BCMA\_LL\_TCR $\beta$ (抗BCMA scFv-长接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_抗BCMA\_LL\_TCR $\beta$ C(抗BCMA scFv-长接头-人T细胞受体 $\beta$ 恒定结构域链)、p510\_抗BCMA\_LL\_CD3 $\gamma$ (抗BCMA scFv-长接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_抗BCMA\_LL\_CD3 $\delta$ (抗BCMA scFv-长接头-人CD3 $\delta$ 链)、p510\_抗BCMA\_LL\_CD3 $\epsilon$ (抗BCMA scFv-长接头-人CD3 $\epsilon$ 链)、p510\_抗BCMA\_SL\_TCR $\beta$ (抗BCMA scFv-短接头-人全长T细胞受体 $\beta$ 链)、p510\_抗BCMA\_SL\_CD3 $\gamma$ (抗BCMA scFv-短接头-人CD3 $\gamma$ 链)、p510\_抗BCMA\_SL\_CD3 $\delta$ (抗BCMA scFv-短接头-人CD3 $\delta$ 链)、p510\_抗BCMA\_SL\_CD3 $\epsilon$ (抗BCMA scFv-短接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0332] 通过将编码抗BCMA、部分CD28细胞外结构域、CD28跨膜结构域、CD28细胞内结构域和CD3 $\zeta$ 的合成DNA在XbaI和EcoRI位点克隆到p510载体中产生抗BCMA CAR构建体p510\_抗

BCMA<sub>28ζ</sub>。

[0333] 通过将经由编码接头:GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:5) 的DNA序列与CD3DNA片段连接的抗BCMA scFv DNA片段在XbaI和EcoRI位点克隆到p510载体 (SBI) 中来工程改造抗BCMA TFP构建体。产生的抗BCMA TFP构建体是p510\_抗BCMA\_CD3 $\gamma$  (抗BCMA scFv (或V<sub>H</sub>H)-接头-人CD3 $\gamma$ 链) 和p510\_抗BCMA\_CD3 $\epsilon$  (抗BCMA scFv (或V<sub>H</sub>H)-接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0334] 合成全长BCMA并将其在BamHI和NheI位点克隆到p514 (SBI) 中以产生构建体p514\_BCMA,用于产生稳定的靶细胞系。

[0335] 通过将经由编码接头:GGGSGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:5) 的DNA序列与CD3DNA片段连接的抗FAP或抗CAIX scFv DNA片段在XbaI和EcoRI位点克隆到p510载体 (SBI) 中来工程改造抗成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 和抗碳酸酐酶-9 (CAIX) TFP构建体。可以产生的抗FAP或抗CAIX TFP构建体包括p510\_抗FAP\_CD3 $\gamma$  (抗FAP scFv-接头-人CD3 $\gamma$ 链) 以及p510\_抗FAP\_CD3 $\epsilon$  (抗FAP scFv-接头-人CD3 $\epsilon$ 链) 和p510\_抗CAIX\_CD3 $\gamma$  (抗CAIX scFv-接头-人CD3 $\gamma$ 链) 和p510\_抗CAIX\_CD3 $\epsilon$  (抗CAIX scFv-接头-人CD3 $\epsilon$ 链)。

[0336] 可以合成全长FAP和CAIX并将其在BamHI和NheI位点克隆到p514 (SBI) 中以产生构建体p514\_FAP和p514\_CAIX,其可以用于产生稳定的靶细胞系。

[0337] 示例性构建体序列公开于附录A:序列中。

[0338] 实施例2:抗体序列

[0339] 抗体序列的产生

[0340] 人BCMA多肽规范序列是UniProt登录号Q02223。提供了能够特异性结合人BCMA多肽及其片段或结构域的抗体多肽。抗BCMA抗体可使用多种技术(参见,例如,(Nicholson等,1997)产生。当鼠抗BCMA抗体用作起始材料时,鼠抗BCMA抗体的人源化是临床环境所需要的,其中小鼠特异性残基可在接受T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 治疗(即利用TFP.BCMA构建体转导的T细胞的治疗)的受试者中诱导人抗小鼠抗原 (HAMA) 应答。人源化通过将来自鼠抗BCMA抗体的CDR区移植到合适的人种系受体框架上(任选地包括对CDR和/或框架区的其它修饰)来完成。如本文所提供的,抗体和抗体片段残基编号遵循Kabat (Kabat E.A.等,1991;Chothia等,1987)。

[0341] scFv的产生

[0342] 人或人源化抗BCMA IgG用于产生TFP构建体的scFv序列。获得编码人或人源化V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域的DNA序列,并且任选地针对在来自智人的细胞中表达来优化构建体的密码子。V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域在scFv中出现的顺序是不同的(即,V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>或V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>取向),并且“G4S”或“G4S”亚基的三个拷贝 (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>连接可变结构域以产生scFv结构域。抗BCMA scFv质粒构建体可具有任选的Flag、His或其它亲和标签,并且被电穿孔到HEK293或其它合适的人或哺乳动物细胞系中并纯化。验证测定包括通过FACS的结合分析,使用Proteon的动力学分析和表达BCMA的细胞的染色。

[0343] V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域的示例性抗BMCA CDR和编码它们的核苷酸序列分别如下所示:

[0344] 抗BCMA

[0345] 抗BCMA轻链CDR1

[0346] 编码序列:



- [0347] AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCAT (SEQ ID NO:7)。
- [0348] 氨基酸序列: KSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:8)。
- [0349] 抗BCMA轻链CDR2
- [0350] 编码序列: AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC (SEQ ID NO:9)。
- [0351] 氨基酸序列: KVSNRFS (SEQ ID NO:10)。
- [0352] 抗BCMA轻链CDR3
- [0353] 编码序列: GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC (SEQ ID NO:11)
- [0354] 氨基酸序列: AETSHVPWT (SEQ ID NO:12)。
- [0355] 抗BCMA重链CDR1
- [0356] 编码序列: AAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCGGATTATTATATTAAC (SEQ ID NO:13)。
- [0357] 氨基酸序列: KASGYSFPDYYIN (SEQ ID NO:14)。
- [0358] 抗BCMA重链CDR2
- [0359] 编码序列:
- [0360] TGGATTTATTTTTCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGC (SEQ ID NO:15)。
- [0361] 氨基酸序列: WIYFASGNSEYNQKFTG (SEQ ID NO:16)。
- [0362] 抗BCMA重链CDR3
- [0363] 编码序列: CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG (SEQ ID NO:17)。
- [0364] 氨基酸序列: LYDYDWYFDV (SEQ ID NO:18)。
- [0365] 抗BCMA轻链可变区
- [0366] 编码序列:
- [0367] GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGACCCGGGCGAACCGGC  
GAGCATTAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATC  
TGCATTGGTATCTGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGCTGCTGATTATAAAGTG  
AGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGA  
TTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTATTGCG  
CGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAGC (SEQ ID NO:19)。
- [0368] 氨基酸序列:
- [0369] DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS  
SGVPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWTFGQGTKLEIKS (SEQ ID NO:20)。
- [0370] 抗BCMA重链可变区
- [0371] 编码序列:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGA  
AAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCGGATTATTATATTAAGTGGGTG  
CGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATTTATTTTGCAGCGG  
[0372] CAACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCA  
GCAGCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTG  
TATTTTTCGCGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAGGGC  
ACCATGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:21)。

[0373] 氨基酸序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLEWMGWYIFASG  
[0374] NSEYNQKFTGRVTMTRDTSSTAYMELSSLRSEDVAVYFCASLYDYDWFVWGQGT  
MVTVSS (SEQ ID NO:22)。

[0375] 抗BCMA V<sub>H</sub>H 1

[0376] 编码序列:

ATGGCGGTGGTCCTGGCTGCTCTACTACAAGGTGTCCAGGCTCAGGTGCACC  
CGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGACTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGT  
GCAGCCTCTGCTGGTATCTTCAGTATCAATGTCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCA  
GGGAAGCAGCGCGAATTGGTCGCGAGTATAACTAGTCGTGGTGATACAACGTATGC  
GAACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTAT  
[0377] ATCTGCAAATGAACGCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTAATTTA  
AAGGGGACAGACTATAGTGGTACATCCACCCAGACCTTCGACAGACAGGGCCAGG  
GGACCCAGGTACCGTCTCTTCGGAACCCAAGACACCAAAACCACAACCACAACCA  
CAACCACAACCACAACCCAATCCTACAACAGAATCCAAGTGTCCCAAATGTCCAGC  
CCCTGAGCTCCTGGGAGGGCCCTCAGTCTTCATCTTCCCCCGAAACCCAAGGACGT  
CCTCTCCATC (SEQ ID NO:23)

[0378] 氨基酸序列:

QVHPVESGGGLVQTGGSLRLSCAASAGIFSINVMGWYRQAPGKQRELVASITSRGDTTY  
ANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNALKPEDTAVYYCNLKGTDYSGTSTQTFDRQGQG  
[0379] TQVTVSSEPKTPKPQPPQPPQPPNPTTESKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLIS  
(SEQ ID NO:24)

[0380] 抗BCMA V<sub>H</sub>H1 CDR1

[0381] INVMG (SEQ ID NO:25)

[0382] 抗BCMA V<sub>H</sub>H1 CDR2

[0383] SITSRGDTTYANSVKG (SEQ ID NO:26)

[0384] 抗BCMA V<sub>H</sub>H1 CDR3

[0385] LKGTDYSGTSTQTFDR (SEQ ID NO:28)

[0386] 抗BCMAV<sub>H</sub>H2

QVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASNIFISIPMGWYRQAPGKQRELVAIHGFSTLYA  
[0387] DSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCNKVPWGDYHPRNVYWGQGTQVT  
VSSEPKTPKPQPPQPPQPPNPTTESKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLIS

- [0388] 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 CDR1
- [0389] **ISPMG (SEQ ID NO:29)**
- [0390] 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 CDR2
- [0391] **AIHGFSTLYADSVKG(SEQ ID NO:30)**
- [0392] 抗BCMA V<sub>H</sub>H2 CDR3
- [0393] **VPWGDYHPRNVY (SEQ ID NO:31)**
- [0394] TCR亚基的来源
- [0395] 人T细胞受体 (TCR) 复合物的亚基均含有细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。人TCR复合物含有CD3-ε多肽、CD3-γ多肽、CD3-δ多肽、CD3-ζ多肽、TCRα链多肽和TCRβ链多肽。人CD3-ε多肽规范序列是Uniprot登录号P07766。人CD3-γ多肽规范序列是Uniprot登录号P09693。人CD3-δ多肽规范序列是Uniprot登录号P043234。人CD3-ζ多肽规范序列是Uniprot登录号P20963。人TCRα链规范序列是Uniprot登录号Q6ISU1。人TCRβ链C区规范序列是Uniprot登录号P01850, 人TCRβ链V区序列是P04435。
- [0396] 人CD3-ε多肽规范序列是：  
MQSGTHWRVLGLCLISVGWVGQDNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEIL  
WQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRA
- [0397] RVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR  
GQNKERPPVPNPDPYPIRKQQRDLYSGLNQRR (SEQ ID NO:32)。
- [0398] 人CD3-γ多肽规范序列是：  
MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKD
- [0399] GKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATI  
SGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHL  
QGNQLRRN (SEQ ID NO:33)。
- [0400] 人CD3-δ多肽规范序列是：  
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLG
- [0401] KRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALG  
VFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID  
NO:34)。
- [0402] 人CD3-ζ多肽规范序列是：  
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSAD
- [0403] APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID  
NO:35)。
- [0404] 人TCRα链规范序列是：

- MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAPPGLD  
SPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWNLHLSPSEELASWEPLVCHTGPGEAGHS  
[0405] RSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPA  
GPLPSPATTTTRLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTTPGRKPGSPVWG  
EGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:36)。
- [0406] 人TCR $\alpha$ 链C区规范序列是：  
PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
[0407] SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFTETDNLNFQNL SVIG  
FRILLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:37)。
- [0408] 人TCR $\alpha$ 链V区CTL-L17规范序列是：  
MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFD  
[0409] YFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCA  
AKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:38)。
- [0410] 人TCR $\beta$ 链C区规范序列是：  
EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD  
PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV  
[0411] TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK  
DF (SEQ ID NO:39)。
- [0412] 人TCR $\beta$ 链V区CTL-L17规范序列是：  
MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNP RHNITKRGQNVTFRCDPIS EHNRLYWYRQT  
[0413] LGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAG  
LNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO:40)。
- [0414] 人TCR $\beta$ 链V区YT35规范序列是：  
MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM  
[0415] MRGLELLIYFNNNPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCS  
ANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO:41)。

[0416] 从TCR结构域和scFv产生TFP

[0417] 使用接头序列(诸如G<sub>4</sub>S、(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>或(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>)将BCMA scFv与CD3- $\epsilon$ 或其它TCR亚基重组连接(参见1C)。使用各种接头和scFv构型。TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链用于产生TFP(作为全长多肽或仅作为其恒定结构域)。允许TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的任何可变序列用于制备TFP。

[0418] TFP表达载体

[0419] 提供了表达载体,其包括:启动子(巨细胞病毒(CMV)增强子-启动子)、使得能够分泌的信号序列、多腺苷酸化信号和转录终止子(牛生长激素(BGH)基因)、允许在原核生物中附加型复制和复制的元件(例如,SV40起始点和ColE1或本领域已知的其它元件)和允许选择的元件(氨苄青霉素抗性基因和zeocin标志物)。

[0420] 优选地,将编码TFP的核酸构建体克隆到慢病毒表达载体中,并基于TFP.BCMA转导的T细胞(“BCMA.TFP”或“BCMA.TFP T细胞”或“TFP.BCMA”或“TFP.BCMA T细胞”)响应于BCMA+靶细胞的效应T细胞应答的数量和质量来验证表达。效应T细胞应答包括但不限于细胞扩增、增殖、倍增、细胞因子产生和靶细胞裂解或溶细胞活性(即,脱粒)。

[0421] 将TFP.BCMA慢病毒转移载体用于产生包装在VSVg假型慢病毒颗粒中的基因组材料。将慢病毒转移载体DNA与VSVg、gag/pol和rev的三种包装组分与Lipofectamine试剂的组合混合,以将它们一起转染到293细胞中。24和48小时后,收集培养基,过滤并通过超速离心浓缩。将得到的病毒制剂在-80℃下储存。通过在SupT1细胞上滴定来确定转导单位的数量。重定向的TFP.BCMA T细胞通过用抗CD3x抗CD28珠粒激活新鲜原初T细胞24小时,然后加入适当数量的转导单位以获得所需百分比的转导T细胞来产生。使这些经修饰的T细胞扩增直至它们静息并大小降低,此时将它们冷冻保存用于后续分析。使用库尔特微粒分析仪III测量细胞数量和大小。在冷冻保存之前,通过流式细胞术分析测定转导的细胞(在细胞表面表达TFP.BCMA)的百分比和它们的相对荧光强度。从直方图中,通过将转导的百分比与其相对荧光强度进行比较来检查TFP的相对表达水平。

[0422] 在一些实施方案中,通过用多种病毒载体进行T细胞转导来引入多种TFP。

[0423] 评估人源化TFP重定向T细胞的溶细胞活性、增殖能力和细胞因子分泌

[0424] 使用本领域已知的测定法测定TFP.BCMA T细胞产生细胞表面表达的TFP和杀伤靶肿瘤细胞、增殖和分泌细胞因子的功能能力。

[0425] 用人白细胞介素-2(IL-2)处理人PBMC(例如,来自正常单采血液成分供体的血液,该供体的原初T细胞通过对T细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的阴性选择而获得),然后例如在10%RPMI中于37℃、5%CO<sub>2</sub>下用抗CD3x抗CD28珠粒激活,然后用编码TFP的慢病毒载体转导。利用流式细胞术测定诸如通过抗FLAG抗体或抗鼠可变域抗体确认TFP的细胞表面存在。使用ELISA或其它测定法测量细胞因子(例如,IFN- $\gamma$ )的产生。

[0426] 实施例1:人TFP T细胞在人ALL小鼠模型中的功效

[0427] 可将原代人ALL细胞在免疫受损小鼠(例如NSG或NOD)中生长,而不必在体外培养它们。同样,培养的人ALL细胞系可在此类小鼠中诱导白血病。荷ALL小鼠可用于测试人TFP.BCMA T细胞例如在模型HALLX5447中的功效。该模型中的读数是在静脉内施用的人TFP.BCMA T细胞不存在和存在的情况下静脉内(i.v.)输注ALL细胞后小鼠的存活率。

[0428] 实施例2:体内实体瘤异种移植小鼠模型中的人TFP T细胞治疗

[0429] 还可以在荷有源自表达人BCMA的ALL、CLL或NHL人细胞系的皮下实体瘤的免疫受损小鼠模型中测试人TFP.BCMA T细胞的功效。响应于人TFP.BCMA T细胞治疗的肿瘤收缩可以通过卡尺测量肿瘤大小来评估,或者通过跟踪由表达GFP的肿瘤细胞发射的GFP荧光信号的强度来评估。

[0430] 原代人实体瘤细胞可以在免疫受损小鼠中生长,而不必在体外培养它们。示例性实体瘤细胞包括实体瘤细胞系,诸如在癌症基因组图谱(TCGA)和/或广泛癌症细胞系百科全书(Broad Cancer Cell Line Encyclopedia)(CCLE,参见Barretina等,Nature 483:603(2012))中提供的。示例性实体瘤细胞包括从间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌或胃癌分离的原代肿瘤细胞。在一些实施方案中,待治疗的癌症选自以下组成的组:间皮瘤、乳头状浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌、混合性苗勒氏卵巢癌、子宫内膜样粘液性卵巢癌、胰腺腺癌、导管腺癌、子宫浆液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食管腺癌、结肠直肠癌和乳腺癌。这些小鼠可用于测试TFP.BCMA T细胞在人肿瘤异种移植模型中的功效(参见,例如,Morton等,Nat.Procol.2:247(2007))。在皮下植入或注射 $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ 个原代细胞(EC基质材料中

的胶原酶处理的大块肿瘤悬浮液)或肿瘤碎片(EC基质材料中的原发性肿瘤碎片)后,使肿瘤生长至200-500mm<sup>3</sup>然后开始治疗。

[0431] 实施例3:多重TFP多肽的证明,以及多重人源化TFP重定向T细胞的用途

[0432] 本文提供的TFP多肽能够与内源性TCR亚基多肽功能性缔合以形成功能性TCR复合物。此处,慢病毒载体中的多个TFP用于转导T细胞以产生功能性多重重组TCR复合物。例如,提供了T细胞,所述T细胞包含i)具有来自CD3- $\delta$ 多肽的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域和BCMA特异性scFv抗体片段的第一TFP,和ii)具有来自CD3- $\gamma$ 多肽的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域和BCMA特异性抗体片段的第二TFP。第一TFP和第二TFP能够彼此相互作用并且能够与内源性TCR亚基多肽相互作用,从而形成功能性TCR复合物。

[0433] 可以在上述实施例中提供的液体和实体肿瘤中证明这些多重人源化TFP.BCMA T细胞的用途。

[0434] 实施例4:用TFP转导的T细胞的制备

[0435] 慢病毒的产生

[0436] 如下制备编码适当构建体的慢病毒。将 $5 \times 10^6$ 个HEK293FT细胞接种到100mm培养皿中并使其达到70-90%汇合过夜。将2.5 $\mu$ g所示DNA质粒和20 $\mu$ L慢病毒包装混合物(ALSTEM,目录号VP100;参见附录B3)稀释于0.5mL不含血清的DMEM或Opti-MEM1培养基中并轻轻混合。在单独的管中,将30 $\mu$ L NanoFect转染试剂(ALSTEM,目录号NF100)稀释于0.5mL不含血清的DMEM或Opti-MEM1培养基中并轻轻混合。然后将NanoFect/DMEM和DNA/DMEM混合在一起并涡旋10-15秒,然后在室温下孵育DMEM-质粒-NanoFect混合物15分钟。将来自前一步骤的完全转染复合物滴加到细胞板并摇动以将转染复合物均匀地分散在板中。然后将板在37°C下于潮湿的5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。第二天,将上清液替换为10mL新鲜培养基并补充20 $\mu$ L ViralBoost (500x,ALSTEM,目录号VB100)。然后将板在37°C下再孵育24小时。然后将含有慢病毒的上清液收集到50mL无菌的加盖的锥形离心管中并置于冰上。在4°C下以3000rpm离心15分钟后,用低蛋白质结合0.45 $\mu$ m无菌过滤器过滤澄清的上清液,随后通过在4°C以25,000rpm(Beckmann,L8-70M)超速离心1.5小时来分离病毒。取出沉淀并重悬于DMEM培养基中,使用Lenti-X qRT-PCR滴定试剂盒(Clontech;目录号631235)通过定量RT-PCR确定慢病毒的浓度/滴度。通过用DNA酶I处理除去任何残留的质粒DNA。病毒原液制剂可立即用于感染或等分,并储存在-80°C以备将来使用。

[0437] PBMC分离

[0438] 外周血单核细胞(PBMC)由全血或血沉棕黄层制备。将全血收集在10mL肝素真空采血管中,立即处理或在4°C下储存过夜。将大约10mL的抗凝全血与无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲液在50mL锥形离心管(PBS,pH7.4,不含Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)中混合,总体积为20mL。然后将20mL该血液/PBS混合物轻轻覆盖在15mL Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare,17-1440-03)的表面上,然后在不施加制动的情况下,在室温下以400g离心30-40分钟。

[0439] 血沉棕黄层购自Research Blood Components(Boston,MA)。通过添加15mL Ficoll-Paque(GE Health Care)制备Leucosep管(Greiner bio-one)并以1000g离心1分钟。将血沉棕黄层以1:3稀释于PBS(pH7.4,不含Ca<sup>2+</sup>或Mg<sup>2+</sup>)中。将稀释的血沉棕黄层转移至Leucosep管并在不施加制动的情况下以1000g离心15分钟。小心地取出在稀释的血浆/Ficoll界面处观察到的含有PBMC的细胞层以使Ficoll的污染最小化。然后通过室温下以

200g离心10分钟,用40mL PBS洗涤PBMC三次来除去残留的Ficoll、血小板和血浆蛋白。然后用血细胞计数器计数细胞。用具有5% AB血清和1.25 $\mu$ g/mL两性霉素B (Gemini Bioproducts, Woodland, CA)、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素的CAR-T培养基 (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies) 洗涤经洗涤的PBMC一次。或者,将经洗涤的PBMC转移到隔离小瓶中并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻24小时,然后储存在液氮中供以后使用。

#### [0440] T细胞活化

[0441] 在病毒转导之前,用缀合有抗人CD28和CD3抗体的磁珠刺激从全血或血沉棕黄层制备的PBMC 24小时。将新鲜分离的PBMC在含有5% AB血清和1.25 $\mu$ g/mL两性霉素B (Gemini Bioproducts)、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素而无huIL-2的CAR-T培养基 (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies) 中洗涤一次,然后以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的终浓度重悬于具有300IU/mL人IL-2 (来自1000x原液; Invitrogen) 的CAR-T培养基中。如果PBMC先前已冷冻,则将它们解冻并在10% FBS、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素存在的情况下,以 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL重悬于9mL预温热 (37 $^{\circ}$ C) 的cDMEM培养基 (Life Technologies) 中,浓度为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL,然后在CART培养基中洗涤一次,以为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度重悬于CAR-T培养基中,并如上所述加入IL-2。

[0442] 在活化之前,将缀合有抗人CD28和CD3抗体的磁珠 (Invitrogen) 用1mL无菌 $1 \times$  PBS (pH7.4) 洗涤三次,使用磁架从溶液中分离珠粒,然后重悬于具有300IU/mL人IL-2的CAR-T培养基中,至终浓度为 $4 \times 10^7$ 个珠粒/mL。然后通过将25 $\mu$ L ( $1 \times 10^6$ 个珠粒) 珠粒转移到1mL PBMC中,以1:1的珠粒与细胞比率混合PBMC和珠粒。然后将所需数量的等分试样分配到12孔低附着或未处理的细胞培养板的单个孔中,并在37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>下孵育24小时,然后进行病毒转导。

#### [0443] T细胞转导/转染和扩增

[0444] 在活化PBMC后,将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下孵育24小时。将慢病毒在冰上解冻,将 $5 \times 10^6$ 个慢病毒以及2 $\mu$ L Transplus (Alstem) /mL培养基 (最终稀释度为1:500) 添加到 $1 \times 10^6$ 个细胞的每个孔中。将细胞再孵育24小时,然后在重复添加病毒。或者,将慢病毒在冰上解冻,并在5 $\mu$ g/mL聚凝胺 (Sigma) 存在的情况下,将相应的病毒以5或50MOI加入。将细胞在室温下以100g离心接种100分钟。然后将细胞在持续存在300IU/mL人IL-2的情况下生长6-14天 (总孵育时间取决于所需CAR-T细胞的最终数量)。每2-3天分析细胞浓度,此时加入培养基以使细胞悬浮液保持在 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。

[0445] 在一些情况下,用体外转录的 (IVT) mRNA对活化的PBMC进行电穿孔。在300IU/ml重组人IL-2 (R&D System) 存在的情况下,用 **Dynabeads®** (ThermoFisher) 以1:1比率刺激人PBMC 3天。在电穿孔之前去除珠粒。洗涤细胞并以 $2.5 \times 10^7$ 个细胞/mL的浓度重悬于 **OPTI-MEM®** 培养基 (ThermoFisher) 中。将200 $\mu$ L细胞悬浮液 ( $5 \times 10^6$ 个细胞) 转移至2mm间隙Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus BTX) 并在冰上预冷。将10 $\mu$ g的IVT TFP mRNA添加至细胞悬浮液中。然后使用ECM830Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX) 将mRNA/细胞混合物在200V下电穿孔20毫秒。在电穿孔后,立即将细胞转移至新鲜细胞培养基 (AIM V AlbuMAX (BSA) 无血清培养基+5% 人AB血清+300IU/ml IL-2) 并在37 $^{\circ}$ C孵育。

[0446] 通过细胞染色验证TFP表达

[0447] 在慢病毒转导或mRNA电穿孔后,使用检测鼠抗BCMAscFv的抗小鼠Fab抗体,通过流式细胞术确认抗BCMA TFP的表达。将T细胞在3mL染色缓冲液(PBS,4%BSA)中洗涤三次,并以每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞重悬于PBS中。对于死细胞排除,将细胞用活死水(Live dead aqua)(Invitrogen)在冰上孵育30分钟。用PBS洗涤细胞两次,并重悬于50 $\mu$ L染色缓冲液中。为了阻断Fc受体,将1 $\mu$ L 1:100稀释的正常山羊IgG(Life Technologies)添加到每个管中并在冰中孵育10分钟。向每个管中加入1.0mL FACS缓冲液,充分混合,通过以300g离心5分钟使细胞沉淀。通过生物素标记的多克隆山羊抗小鼠-F(ab)<sub>2</sub>抗体(Life Technologies)检测scFv TFP的表面表达,其中生物素标记的正常多克隆山羊IgG抗体(Life Technologies)用作同种型对照。将两种抗体以10 $\mu$ g/mL加入,反应体积为100 $\mu$ L。然后将细胞在4 $^{\circ}$ C孵育45分钟,洗涤一次,重悬于FACS缓冲液中,并通过向每个管中加入100 $\mu$ L 1:1000稀释的正常小鼠IgG,用正常小鼠IgG(Invitrogen)进行阻断。然后将细胞在冰上孵育10分钟,用染色缓冲液洗涤并重悬于100 $\mu$ L染色缓冲液中。然后通过添加1.0 $\mu$ L藻红蛋白(PE)标记的链霉抗生物素蛋白(BD Biosciences)和APC抗人CD3抗体(Clone-UCHT1,BD Biosciences)对细胞进行染色,向每个管中添加PerCP/Cy5.5抗人CD8抗体(Clone-SK1,BD Biosciences)和太平洋蓝抗人CD4抗体(Clone-RPA-T4,BD Biosciences)。使用LSRFortessa™ X20(BD Biosciences)进行流式细胞术,并且使用FACS diva软件获取数据并用**FlowJo®**(Treestar,Inc.Ashland,OR)进行分析。20%至40%的转导的T细胞表达抗BCMA TFP,表明CAR和TFP构建体的转导和表面表达水平相当(图5)。

[0448] 通过细胞活化验证TFP表达

[0449] 在慢病毒转导或mRNA电穿孔后,通过流式细胞术确认抗BCMA TFP对靶细胞的活化。用附接于CD3 $\epsilon$ 亚基的BCMA阳性对照scFv(SEQ ID NO:45)和呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、TCR $\beta$ 和CD28 $\zeta$ 形式的单结构域抗体(sdAb)抗BCMA V<sub>H</sub>H 2(SEQ ID NO:28)转导T细胞。将转导的T细胞(效应细胞)和BCMA阳性的K562靶细胞以1:1比率共培养过夜。BCMA阴性K562细胞用作阴性对照,非转导的BCMA阳性T细胞培养物也是如此。如上所述对细胞的CD25和CD69(两者均为靶细胞活化的标志物)进行染色。

[0450] 结果示于图10中。如图10A(CD25阳性细胞)和图10B(CD69阳性细胞)所示,与BCMA阴性对照(黑色条)相比,所有转导的细胞能够激活靶细胞群中的CD69和CD25表达(灰色柱),尤其是用V<sub>H</sub>H 2构建体转导的细胞,其比阳性对照更加显著地激活。

[0451] 使用具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和TCR $\beta$ 形式以及具有HL取向的呈CD3 $\epsilon$ 形式的抗BCMA scFv 2(SEQ ID NO:43)进行类似的实验。如图10C(CD25阳性细胞)和图10D(CD69阳性细胞)所示,所有TFP(在任一取向上)均能够活化BCMA阳性靶细胞(灰色条)。

[0452] 接下来,对靶细胞的粒酶B(细胞毒性淋巴细胞的颗粒中存储的丝氨酸蛋白酶)进行染色,所述粒酶B在分泌时介导靶细胞的凋亡。通过细胞内抗体染色和流式细胞术分析评估TFP-T细胞的活化。如上所述制备TFP T细胞(用sdAb V<sub>H</sub>H2转导的)和BCMA阳性K562靶细胞,并以1:1共培养。将BCMA阴性细胞用作对照。固定细胞后,将粒酶B抗体(Alexa Fluor 700™小鼠抗人粒酶B,Clone GB11,BD Biosciences目录号560213)在洗涤缓冲液中1:100稀释。将细胞重悬于100 $\mu$ L稀释的抗体中,并在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中孵育30分钟。洗涤细胞,并将其在BD LSRFortessa® X-20细胞分析仪上立即进行分析。



[0453] 结果显示在图10E (抗BCMA V<sub>H</sub>H2 TFP T细胞)和图10F (抗BCMA scFv2 TFP T细胞)中,并且显示在与BCMA阳性靶细胞接触后TFP T细胞中的粒酶B水平。在图10E中,用附接于CD3 $\epsilon$ 亚基的BCMA阳性对照scFv (SEQ ID NO:45)和呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、TCR $\beta$ 和CD28 $\zeta$ 形式的单结构域抗体(sdAb)抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28)转导细胞;在图10F中,用具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和TCR $\beta$ 形式和具有HL取向的呈CD3 $\epsilon$ 的抗BCMA scFv 2 (SEQ ID NO:43)转导细胞。如图所示,除阴性对照外,与BCMA阴性细胞(黑色条)相比,所有TFP T细胞在与BCMA阳性靶细胞接触后具有升高的粒酶B水平(灰色条)。在图10G (E:T为3:1)和图10H (E:T为1:3)中,用附接于CD3 $\epsilon$ 亚基的BCMA阳性对照scFv1 (SEQ ID NO:45),呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、TCR $\beta$ 形式的单结构域抗体(sdAb)抗BCMA V<sub>H</sub>H2 (SEQ ID NO:28)和具有LH取向的呈CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 和TCR $\beta$ 形式的抗BCMA scFv2 (SEQ ID NO:43)转导细胞。如图10G所示,在3:1的效应细胞与T细胞的比率下,除空载体外的所有构建体均足以减少肿瘤细胞的数量。在1:3的效应细胞与T细胞(10H)的比率下,所有构建体都能够减少肿瘤细胞的数量,其中效力稍有更多变化。实心条代表BCMA阴性HeLa细胞,空条代表BCMA阳性细胞。

#### [0454] 实施例5:通过流式细胞术进行的细胞毒性测定

[0455] 用荧光染料羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记对BCMA靶标呈阳性或阴性的靶细胞。将这些靶细胞与未转导的、用对照CAR-T构建体转导的或用TFP转导的效应T细胞混合。在指定的孵育期后,通过流式细胞术确定每种效应物/靶细胞培养物的死的对活的CFSE标记的靶细胞和阴性对照靶细胞的百分比。计算相对于仅含靶细胞的孔,每种T细胞+靶细胞培养物中靶细胞的存活百分比。

[0456] 使用流式细胞术,在效应细胞与靶细胞共孵育之后,通过比较在效应T细胞不存在或存在的情况下靶细胞中存活的靶细胞的数量来测量效应T细胞的细胞毒性活性。在利用BCMA TFPs或CAR-T细胞的实验中,靶细胞是BCMA阳性RPMI-8226浆细胞瘤/骨髓瘤细胞(ATCC,CCL-155),而用作阴性对照的细胞是BCMA阴性伯基特氏淋巴瘤细胞(ATCC,CCL-86)。

[0457] 将靶细胞洗涤一次,并以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL重悬于PBS中。将荧光染料羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE) (ThermoFisher)以0.03 $\mu$ M的浓度添加到细胞悬浮液中,并将细胞在室温下孵育20分钟。通过以5倍反应体积的体积向细胞悬浮液中加入完全细胞培养基(RPMI-1640+10%HI-FBS),使标记反应停止,并将细胞在室温下再孵育2分钟。通过离心沉淀细胞并将其以 $2 \times 10^5$ 个细胞/mL重悬于细胞毒性培养基(不含酚红的RPMI1640 (Invitrogen)加5%AB血清(Gemini Bioproducts)中。将50微升CFSE标记的靶细胞悬液(相当于10,000个细胞)加入到96孔U型底板(Corning)的每个孔中。

[0458] 将用抗BCMA TFP构建体转导的效应T细胞与作为阴性对照的非转导的T细胞一起洗涤并以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL或 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮于细胞毒性培养基中。将50 $\mu$ L效应T细胞悬浮液(相当于100,000个或50,000个细胞)加入到涂铺的靶细胞中,以在100 $\mu$ L的总体积中达到效应物与靶标的比率分别为10:1或5:1。然后将培养物混合,离心,并在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育4小时。在该孵育后,立即按照制造商的推荐将7AAD (7-氨基放线菌素D) (BioLegend®)添加到培养的细胞中,并用BD Fortessa X-20 (BD Biosciences)进行流式细胞术。使用FlowJo®软件(TreeStar, Inc.)分析流式细胞术数据。

[0459] RPMI-8226靶细胞的存活百分比通过将具有效应T细胞和靶细胞的样品中活的

RPMI-8226靶细胞(CFSE+7-AAD-)的数量除以仅具有靶细胞的样品中的活的RPMI-8226(CFSE+7-AAD-)细胞的数量来计算。效应细胞的细胞毒性计算为RPMI-8226的杀伤百分比=100%-RPMI-8226细胞的存活百分比。

[0460] 当与非转导的或用非BCMA特异性CAR对照转导的T细胞相比时,用抗BCMA 28 $\zeta$ CAR构建体转导的T细胞可表现出针对表达BCMA的细胞的细胞毒性。然而,用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ 转导的T细胞相较于抗BCMA CAR对照可更高效地诱导针对靶标的细胞毒性。在5:1至10:1的效应物:靶标比率下,抗BCMA-CD3 $\gamma$  TFP也可介导强效细胞毒性,该细胞毒性大于针对抗BCMA-CAR观察到的细胞毒性。对于抗BCMA-TCR $\alpha$ 和抗BCMA-TCR $\beta$ TFP可观察到一定的细胞毒性。类似的结果可以用利用替代铰链区构建的抗BCMA TFP获得。再次地,抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP或抗BCMA-CD3 $\gamma$  TFP-转导的T细胞针对表达BCMA的靶细胞的细胞毒性可大于抗BCMA-CAR-转导的T细胞针对所述靶细胞的细胞毒性。

[0461] 用编码对BCMA有特异性的TFP的mRNA电穿孔的T细胞也表现出针对表达BCMA的细胞的强效细胞毒性。虽然对于对照或抗BCMA TFP构建体均未能看到对BCMA阴性细胞的显著杀伤,但可看到用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ SL或抗BCMA-CD3 $\gamma$  SL TFP转导的T细胞对表达BCMA的细胞的BCMA特异性杀伤。

[0462] 用对B细胞成熟抗原(BCMA)有特异性的TFP转导的T细胞也显示出针对表达BCMA的RPMI8226细胞的强效细胞毒性。用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP或抗BCMA-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞高效地介导针对表达BCMA的RPMI8226靶细胞的细胞毒性。在效应细胞与靶细胞的比率为10:1时,几乎100%的靶细胞被杀伤(图6)。

[0463] 可用FAP.TFP和CAIX.TFP构建体进行类似的实验。

[0464] 实施例6:通过实时细胞毒性测定的细胞毒性

[0465] 抗BCMA TFP还可以在实时细胞毒性测定(RTCA)形式中表现出优于抗BCMA CAR的细胞毒性。RTCA测定实时测量专门的96孔板的每个孔中的粘附的靶细胞单层的电阻抗,并将最终读数呈现为称为细胞指数的值。细胞指数的变化表明由于共孵育的T细胞效应物杀伤靶细胞而导致的靶细胞单层的破坏。因此,效应T细胞的细胞毒性可被评估为具有靶细胞和效应T细胞的孔的细胞指数相较于仅具有靶细胞的孔的细胞指数的变化。

[0466] RTCA的靶细胞是表达BCMA的HeLa细胞(BCMA-HeLa),其中亲本、非转导的HeLa细胞作为阴性对照。编码全长人BCMA或BCMA的DNA由**GeneArt®** (ThermoFisher)合成,并被插入携带新霉素作为选择标志物的双启动子慢病毒载体pCDH514B(System Bioscience)的多克隆位点中,处于EF1a启动子的控制下。然后包装携带BCMA或BCMA编码载体的慢病毒。用BCMA-慢病毒转导HeLa细胞24小时,然后用G418(1mg/mL)进行选择。利用抗人BCMA抗体(BioLegend,克隆编号19A2;Miltenyi,克隆编号REA315)通过FACS分析证实转导的BCMA-HeLa表达BCMA。

[0467] 将粘附的靶细胞在DMEM、10%FBS、1%抗生素抗真菌剂(Life Technologies)中培养。为了制备RTCA,将50 $\mu$ L RPMI培养基加入到E-板(ACEA Biosciences, Inc, 目录号:JL-10-156010-1A)的适当孔中。然后将板置于RTCA MP仪器(ACEA Biosciences, Inc.)中,并按照制造商手册中的描述将适当的板布局和测定方案输入RTCA 2.0软件。基线测量每15分钟进行100次测量。然后将100 $\mu$ L体积的 $1 \times 10^4$ 个靶细胞加入每个测定孔中,使细胞沉降15分钟。将板返回读数器并再次读数。

[0468] 第二天,将效应T细胞洗涤并重悬于细胞毒性培养基(不含酚红的RPMI1640(Invitrogen)加5%AB血清(Gemini Bioproducts;100-318))中。然后将平板从仪器中取出,将悬浮在细胞毒性培养基(不含酚红的RPMI1640+5%AB血清)中的效应T细胞以100,000个细胞或50,000个细胞加入到每个孔中以达到分别为10:1或5:1的效应物对靶标的比率。然后将板放回仪器。测量每2分钟进行100次测量,然后每15分钟进行1,000次测量。

[0469] 在RTCA测定中,如通过添加效应细胞后相对于单独的细胞或与用对照CAR构建体转导的T细胞共孵育的细胞的细胞指数的时间依赖性降低所证明的,可观察到用抗BCMA-28 $\zeta$ CAR转导的T细胞对BCMA转导的细胞的杀伤。然而,表达抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP的T细胞的靶细胞杀伤可能比对于抗BCMA CAR观察到的更深和更快。例如,在添加用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP转导的T细胞的4小时内,可以基本上完全杀伤表达BCMA的靶细胞。对于用许多包含其它CD3和TCR构建体的TFP构建体转导的T细胞几乎未观察到或未观察到杀伤。类似的结果可以用替代铰链区构建的抗BCMA TFP获得。抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP或抗BCMA-CD3 $\gamma$  TFP转导的T细胞针对BCMA转导的靶细胞的细胞毒性可以大于抗BCMA-CAR转导的T细胞对所述靶细胞的细胞毒性。

[0470] 用抗BCMA TFP转导的T细胞也显示出针对表达BCMA的RPMI8226细胞的强效细胞毒性。如图6所示,用抗BCMA (CD3 $\epsilon$ 或CD3 $\gamma$ 形式的VHH2) TFP转导的T细胞高效地介导针对表达BCMA的RPMI8226靶细胞的细胞毒性。在效应物与靶标的比率为10:1时,几乎100%的靶细胞被杀伤(图7)。

[0471] TFP-转导的T细胞的细胞毒活性相对于用于转导的病毒量(MOI)可以是剂量依赖性的。随着抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP慢病毒的MOI增加,可观察到BCMA细胞的杀伤增加,进一步加强了TFP转导与细胞毒活性之间的关系。

[0472] 实施例7:通过ELISA测定的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌

[0473] 与识别携带同源抗原的细胞相关的效应T细胞活化和增殖的另一个量度是效应细胞因子诸如白细胞介素-2(IL-2)和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )的产生。

[0474] 如产品说明书中所述进行人IL-2(目录号EH2IL2,Thermo Scientific)和IFN- $\gamma$ (目录号KHC4012,Invitrogen)的ELISA测定。将50 $\mu$ L重构的标准品或样品以一式两份加入到96孔板的每个孔中,然后加入50 $\mu$ L的生物素化的抗体试剂。通过轻轻敲打板几次混合样品。然后将50 $\mu$ L标准稀释剂加入到不含标准品或样品的所有孔中,并用粘性板盖小心地密封板,然后在室温(20-25 $^{\circ}$ C)下孵育3小时。然后取下板盖,清空板内容物,并用洗涤缓冲液填充每个孔。将该洗涤程序重复总共3次,并将板吸印到纸巾或其它吸收材料上。向每个孔中加入100 $\mu$ L制备的链霉抗生物素蛋白-HRP溶液,并粘附新的板盖,然后在室温下孵育30分钟。再次移除板盖,丢弃板内容物,并向每个孔中加入100 $\mu$ L TMB底物溶液。使反应在室温下在黑暗中发生30分钟,之后向每个孔中加入100 $\mu$ L终止溶液。评估板。在停止反应30分钟内,在设置为450nm和550nm的ELISA板读数器上测量吸光度。从450nm值中减去550nm值,并且相对于从IL-2标准曲线获得的值计算未知样品中的IL-2量。

[0475] 或者,使用Human Cytokine Magnetic Buffer Reagent试剂盒(Invitrogen, LHB0001M)以及Human IL-2Magnetic Bead试剂盒(Invitrogen,LHC0021M)和Human IFN- $\gamma$  Magnetic Bead试剂盒(Invitrogen,LHC4031M)进行2-Plex测定。简言之,将25 $\mu$ L人IL-2和IFN- $\gamma$ 抗体珠加入96孔板的每个孔中,并使用以下指南洗涤:200 $\mu$ L 1x洗涤溶液洗涤两次,使板与磁性96孔板分离器(Invitrogen,A14179)接触放置,使珠粒沉降1分钟并倾析液体。

然后,将50 $\mu$ L孵育缓冲液与一式两份100 $\mu$ L的重构标准品或一式三份50 $\mu$ L的样品(来自细胞毒性测定的上清液)和50 $\mu$ L测定稀释剂加入到板的每个孔中,总体积为150 $\mu$ L。用具有3mm轨道半径的轨道振荡器以600rpm将样品在室温下于黑暗中混合2小时。按照相同的洗涤指南洗涤板,并向每个孔中加入100 $\mu$ L人IL-2和IFN- $\gamma$ 生物素化的检测抗体。用具有3mm轨道半径的轨道振荡器以600rpm将样品在室温下于黑暗中混合1小时。按照相同的洗涤指南洗涤板,并向每个孔中加入100 $\mu$ L链霉抗生物素蛋白-R-藻红蛋白。用具有3mm轨道半径的轨道振荡器以600rpm将样品在室温下于黑暗中混合30分钟。使用相同的洗涤指南将板洗涤3次,并在倾析液体后,将样品重悬于150 $\mu$ L的1x洗涤溶液中。用具有3mm轨道半径的轨道振荡器以600rpm将样品混合3分钟并在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。然后,按照相同的洗涤指南洗涤板,并将样品重悬于150 $\mu$ L的1x洗涤溶液中。

[0476] 使用MAGPIX系统(Luminex)和xPONENT软件读取板。使用MILLIPLEX Analyst软件对数据进行分析,该软件提供标准曲线和细胞因子浓度。

[0477] 相对于非转导的或对照CAR转导的T细胞,用抗BCMA TFP转导的T细胞在与内源性表达BCMA的细胞或BCMA转导的细胞共培养时可产生更高水平的IL-2和IFN- $\gamma$ 。相反,与BCMA阴性细胞或非转导的细胞的共培养可以几乎未导致或未导致细胞因子从TFP转导的T细胞中释放。与先前的细胞毒性数据一致,用替代铰链区构建的抗BCMA TFP可在与携带BCMA的靶细胞共培养时产生类似的结果。

[0478] 与先前的细胞毒性数据一致,呈CD3 $\epsilon$ 和CD3 $\gamma$ 形式的抗BCMA(V<sub>H</sub>H2)可以产生TFP构建体的最高IL-2和IFN- $\gamma$ 水平。然而,用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP和抗BCMA-CD3 $\gamma$ TFP转导的T细胞的细胞因子产生可以与表达抗BCMA-28 $\zeta$ CAR的T细胞的细胞因子产生相当,尽管TFP显示出高得多水平的靶细胞杀伤。TFP可以比CAR更高效地杀伤靶细胞,但释放相当或更低水平的促炎细胞因子的可能性,代表了TFP相对于CAR的潜在优势,因为这些细胞因子的升高水平与过继CAR-T疗法的剂量限制毒性相关。

[0479] 用抗BCMA-CD3 $\epsilon$ TFP或抗BCMA-CD3 $\gamma$ TFP转导的T细胞在与BCMA-HeLa细胞共培养时也产生IL-2和IFN- $\gamma$ ,但与不表达BCMA的对照HeLa细胞共培养时不产生(图8)。

#### [0480] 实施例10:通过流式细胞术进行的CD107a暴露

[0481] 用于T细胞活化的另一种测定是CD107a(一种位于静息细胞中的细胞质溶细胞颗粒的膜中的溶酶体相关膜蛋白(LAMP-1))的表面表达。效应T细胞的脱粒(细胞活性的先决条件)导致活化诱导的颗粒胞吐作用后CD107a至细胞表面的动员。因此,除了细胞因子产生以外,CD107a暴露还提供了与细胞毒性密切相关的T细胞活化的额外量度。

[0482] 将靶细胞和效应细胞单独洗涤并重悬于细胞毒性培养基(RPMI+5%人AB血清+1%抗生素抗真菌剂)中。在0.5 $\mu$ L/孔的PE/Cy7标记的抗人CD107a(LAMP-1)抗体(Clone-H4A3, BD Biosciences)存在的情况下,通过在U形底96孔板(Corning)中以100 $\mu$ L终体积将 $2 \times 10^5$ 个效应细胞与 $2 \times 10^5$ 个靶细胞组合来进行测定。然后将培养物在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育1小时。在该孵育后立即将10 $\mu$ L 1:10稀释的分泌抑制剂莫能菌素(1000x溶液, BD GolgiStop<sup>TM</sup>)小心地添加到每个孔中而不扰动细胞。将板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下再孵育2.5小时。在该孵育后,用APC抗人CD3抗体(Clone-UCHT1, BD Biosciences)、PerCP/Cy5.5抗人CD8抗体(Clone-SK1, BD Biosciences)和太平洋蓝抗人CD4抗体(Clone-RPA-T4, BD Biosciences)对细胞进行染色,然后在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下孵育30分钟。然后将细胞用FACS缓冲液洗涤2次(并在分析前重悬

于100μL FACS缓冲液和100μL IC固定缓冲液中)。

[0483] 通过流式细胞术检测CD107a在T细胞表面上的暴露。用LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences) 进行流式细胞术,使用FlowJo软件 (Treestar, Inc. Ashland, OR) 进行流式细胞术数据的分析。测定每种效应细胞/靶细胞培养物的为CD107+ve的CD3门控内的CD8+效应细胞的百分比。

[0484] 与先前的细胞毒性和细胞因子数据一致,表达BCMA的靶细胞与用抗BCMA-28ζCAR转导的效应T细胞的共培养可诱导表面CD107a表达相对于与BCMA-ve靶孵育的效应细胞的增加。相比之下,在相同条件下,表达抗BCMA-CD3εLL或抗BCMA-CD3 γ LL TFP的效应细胞可表现出CD107a表达的5至7倍诱导。用替代铰链区构建的抗BCMA TFP可在与携带BCMA的靶细胞共培养时产生类似的结果。

[0485] 相对于非转导的T细胞,用抗BCMA-CD3εTFP或抗BCMA-CD3 γ TFP转导的细胞在与BCMA+ve RPMI8226细胞共培养时表现出CD107a表面表达的增加(图9)。这些结果表明,TFP-转导的效应T细胞在暴露于表达其同源抗原的靶细胞时变得活化和脱粒。

[0486] 实施例8:体内小鼠功效研究

[0487] 为了评估用抗BCMA (scFv1, SEQ ID NO:45) TFP转导的效应T细胞在体内实现抗肿瘤反应的能力,将用抗BCMA-CD3εTFP、抗BCMA-28ζCAR或抗BCMA-41BBζTFP转导的效应T细胞过继转移至用BCMA+RPMI-8226多发性骨髓瘤细胞系(ATCC目录号CRM-CCL-155)接种的NOD/SCID/IL-2R γ -/- (NSG-JAX) 小鼠中。将人癌细胞系非转导的T细胞用作对照。

[0488] 材料和方法

[0489] RPMI-8226的维持和扩增

[0490] RPMI-8226多发性骨髓瘤细胞系获自ATCC(目录号CRM-CCL-155)。用萤光素酶转染这些细胞以产生RPMI-8226Luc品系。每2-3天将细胞在补充有10%HI FBS (Invitrogen, 目录号10438-026, 批号1785079) 和1%抗生素 (Life Technologies, 目录编号15240-062) 的RPMI 1640培养基 (Corning, 目录号10-041-CV) 中传代一次。

[0491] 慢病毒的产生

[0492] 通过瞬时转染293TN Producer细胞系 (System Biosciences, Inc., LV900A-1) 制备慢病毒。使用与CD3ε链 (在TFP中) 或CD28z或41BBz (在CAR中) 融合的抗BCMA单链片段可变区 (scFv) 产生TFP/CAR构建体。

[0493] T细胞分离和慢病毒转导

[0494] 使用 **Ficoll®**-Paque PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) 从全血 (Hemacare, Donor 12, 批号W313716040526) 纯化PBMC。

[0495] 使用 **DynaBeads®** (Gibco, 目录号00415447, 批号1785079) 以1:1的比率活化T细胞,并将保持在存在300IU/ml IL-2 (Peprotech, 目录号200-02, 批号051512) 的含有5%人AB血清 (Gemini Products, 目录号100-318, 批号H605001) 和1%抗生素 (Life Technologies, 目录号15240-062) 的AminV培养基 (Life Technologies, 目录号31035025) 中。在聚凝胺 (5ug/ml, Millipore#TR-1003-G) 存在的情况下,用10MOI (基于Jurkat细胞系中的滴度) 的慢病毒 (对于抗BCMA-CD3εTFP、抗BCMA-CD28ζCAR和抗BCMA-41BBζCAR) 和单独的510-载体对照病毒转导Dynabead活化的T细胞,并以100G旋转接种100分钟。在T细胞活化

后24小时和48小时进行总共两轮转导。将细胞扩增11天并冷冻。

**[0496] 转导效率的测定**

**[0497]** 通过流式细胞术确定转导效率。使用抗CD3APC,克隆:UCHT1(BD Biosciences,目录号561811,批号5090862)、抗CD4-太平洋蓝,克隆:RPAT4(Biolegend,目录号300521,批次B231611)、抗CD8-APCCY7,克隆:SK1(BD Biosciences,目录号557834,批号6082865)和/或山羊抗小鼠FAB(Invitrogen,目录号31803,批号SC2362539)对T细胞进行染色。另外,用Zenon标记的(Thermofisher,目录号Z25055A,批号1851333)BCMA-Fc蛋白对细胞进行染色以检测TFP和CAR的表面表达。使用BD-LSRII Fortessa® X20分析细胞。

**[0498] 体外功能测定**

**[0499]** 在活化后第9天进行所有体外功能测定。

**[0500]** 萤光素酶测定:将T细胞与过表达截短的CD19和萤光素酶(BCMA阴性靶标)的HeLa细胞系或过表达BCMA和萤光素酶(BCMA阳性靶标)的HeLa细胞系以不同的效应物(E):靶标(T)比率(3:1和1:3)共培养24小时。裂解细胞并使用制造商的说明书(Promega,目录号E1500)将其进行萤光素酶测定(SOP 002)。

**[0501]** 实时细胞毒性测定(RTCA):将T细胞与上述靶细胞以不同的E:T比共培养。通过经由xCELLigence® RTCA MP(Multiple Plate)仪测量96孔板(E-Plate 96)上的细胞传感器电极的电阻抗来测定细胞毒性。最终读数显示为细胞指数。细胞指数的变化表明因共培养的T细胞杀伤靶细胞而导致的靶细胞单层破坏。离心后收集培养物上清液以用于细胞因子分析,并在-80C下储存直至进一步分析。

**[0502] 细胞因子测量**

**[0503]** 使用人细胞因子/趋化因子磁珠组分析来自RTCA测定的培养物上清液的细胞因子释放。如产品说明书中所述进行人IL-2和IFN  $\gamma$  的ELISA测定。在Magpix  $\gamma$  Luminex® xMAP®技术上收集数据并以pg/ml的量进行测量。

**[0504] 体内研究**

**[0505]** 使用NOD/SCID(NSG)小鼠模型进行体内效力研究。在研究开始之前至少6周龄的雌性NOD/SCID/IL-2R  $\gamma$  -/- (NSG-JAX)小鼠获自Jackson实验室(库存号005557)并在实验使用前使其适应3天。将用于接种的表达人BCMA的细胞系在收获前保持在对数期培养中,并用台盼蓝计数以测定活细胞计数。在肿瘤攻击当天,将细胞以300g离心5分钟,并以 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/100 $\mu$ L重悬于预温热的无菌PBS中。将 $3 \times 10^6$ 个RPMI-8226-Luc细胞皮下(s.c.)注射到NSG小鼠中。肿瘤接种后19天,以 $15 \times 10^6$ 个细胞向每只小鼠静脉内施用T细胞。每组有7只动物。在研究的第3天、7天、14天、21天、28天和35天进行生物发光成像。通过每周两天的卡尺测量来测量肿瘤体积。每天记录对动物的详细临床观察直至无痛致死。每周对所有动物进行体重测量直至死亡或无痛致死。在过继转移测试和对照物品后35天对所有动物实施无痛致死。在研究期间出现垂死的任何动物由研究主任在与兽医协商后自行决定是否实施无痛致死

**[0506] T细胞上的高效TFP和CAR表面表达**

**[0507]** 评估了scFv2在TFP或CAR T细胞上的表面表达。通过使用各种慢病毒构建体转导DynaBead®刺激的T细胞来制备TFP或CAR T细胞。将转导的T细胞培养7天,并进行流式细

胞术分析。通过抗Fab或BCMA-Fc染色证实的TFP和CAR表面表达在所有组中为40-50%。TFP和CAR T细胞具有相当的scFv表面表达(图11)。

[0508] 体外TFP和CAR T细胞功能

[0509] 通过两种不同的细胞毒性测定评估TFP或CAR转导的T细胞的效应子功能。在第一种测定中,将非转导的T细胞、510空载体对照、TFP或CAR T细胞与表达HeLa-BCMA-萤光素酶的靶细胞以不同比率(3:1(图11A)和1:3(图11B)的效应物:靶标)共培养。表达HeLa-CD19萤光素酶的细胞用作BCMA阴性对照。所有T细胞在3:1下高效地清除BCMA阳性靶细胞(98%至99%的死细胞)。在为1:3的较低E:T比下,观察到的细胞毒性为38%至53%(图11B)。在非转导(NT)或仅510-载体的对照组中未发现杀伤。

[0510] 还通过实时细胞毒性测定法(RTCA)测量抗BCMA TFP或CAR的细胞毒性,所述实时细胞毒性测定法以专门的96孔格式实时测量靶细胞单层的电阻抗。在该测定中,如通过添加转导的T细胞后细胞指数的时间依赖性降低所指示的,在TFP或CAR转导的组中在3:1的E:T比下观察到强效的杀伤(图11C)。靶细胞在添加T细胞的10小时内被清除。41BB $\zeta$ 组显示出最高的杀伤动力学,其次是TFP和CD28 $\zeta$ CAR。尽管如此,所有组在24小时结束时均杀伤靶细胞。在1:3的E:T比下,杀伤较慢并且肿瘤细胞未被任何组高效清除。未观察到NT组或仅510载体组的杀伤。HeLa-CD19萤光素酶细胞用作阴性对照并且甚至在添加T细胞后继续生长(图11D)。

[0511] 效应T细胞活化和增殖的另一个量度是细胞因子诸如IFN  $\gamma$  和IL-2的产生。使用2-plex **Luminex**<sup>®</sup>试剂盒(EMD Millipore)分析来自上述RTCA测定的培养物上清液的细胞因子释放。如图11E(IFN  $\gamma$ )和11F(IL-2)所示,当与表达BCMA的HeLa共培养时,相对于非转导或510空载体对照细胞,TFP和CAR转导的T细胞在3:1和1:3的E:T比下产生高水平的IFN  $\gamma$  和IL-2。最值得注意的是,41BB $\zeta$ 组在1:3的E:T比下产生更多细胞因子。

[0512] 抗BCMA TFP和CAR T细胞证明体内抗肿瘤功效

[0513] 为了评估scFv2(呈HL形式)和V<sub>H</sub>H2TFP T细胞的体内功效,使用空载体T细胞(作为阴性对照)以及scFv1-CD3 $\epsilon$ TFP T细胞(作为阳性对照)(图12A);呈 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\beta$ 形式的V<sub>H</sub>H2TFP T细胞(图12B)和呈 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\beta$ 形式的scFv2TFP T细胞(图12C)如上所述进行体内研究。每个图中的每一条线代表一只小鼠。如图12A所示,用仅载体的T细胞处理的小鼠具有随时间生长的肿瘤,而阳性对照能够减少或根除小鼠中的肿瘤。如图12B所示,许多小鼠在用V<sub>H</sub>H2TFP T细胞处理后显示肿瘤尺寸减小,用图12C中所示的scFv2TFP T细胞处理的小鼠也是如此。显然,在图12B中,BH10-CD3 $\epsilon$ 和CD3  $\gamma$  组在注射时共表达PD1、TIM3和LAG3耗竭标志物。

[0514] 为了评估TFP对比CAR的效力,使用RPMI8226多发性骨髓瘤细胞和NSG小鼠模型。以 $3 \times 10^6$ 个细胞/小鼠注射RPMI8226细胞。将在第11天冷冻的T细胞解冻并恢复24小时,然后以 $15 \times 10^6$ 个细胞/小鼠进行体内注射。在T细胞注射后第8天开始在TFP和CAR T组中观察到肿瘤体积的显著减小(图13A)。这种趋势一直持续到第37天,此时由于没有肿瘤,研究终止。与对照相比,所有组中通过肿瘤的平均辐射度评估的肿瘤负荷显著降低(图13B)。另外,与CD28 $\zeta$ CAR T组相比,TFP和41BB $\zeta$ CAR T细胞组显示出增加的存活率(图13C)。这些结果表明抗BCMA-TFP和CAR T细胞在体内杀伤多发性骨髓瘤肿瘤细胞方面是强效的。

[0515] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员来说显而易见的是,此类实施方案仅作为示例提供。对于本领域技术人员来说,在不背离本发明

的情况下现在将进行许多变化、改变和替换而不背离本发明。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。下面的权利要求旨在限定本发明的范围和方法,并且这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物由此涵盖。

[0516] 附录

[0517]

1	接头 1 (SL)	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
2	接头 2 (LL)	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE
3	接头 3	GGGGSGGGGS
4	接头 4	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
5	接头 5	GGGGSGGGGSGGGGSLE
6	p514_BCMA (DNA)	ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTA ACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGT GCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAG GAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAT TGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAT AAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCT GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTT



[0518]

GAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAA  
CTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGC  
AGTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAAGCGAAAGGGAAACCAGAG  
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGA  
GGCGAGGGGCGGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGC  
GGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAG  
CGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCA  
GGGGGAAAAGAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGC  
AGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT  
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTC  
AGACAGGATCAGAAGAATTAGATCATTATATAATACAGTAGCAA  
CCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGG  
AAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACC  
ACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGA  
TATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGT  
AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAAG  
AGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTT  
CCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTC  
AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTG  
CAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAG  
GGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGC  
ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTA  
AAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCA  
TTTGCACTACTGCTGTGCCTTGGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATC  
TCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAG  
AGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA  
TCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTA  
GATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGC  
TGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGG  
TTTAAGAATAGTTTTTGTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGC  
AGGGATATTACCATTTATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCCGAG  
GGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAGGTGGAGAGA  
GAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT  
ATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTG  
CAGGGGAAAAGATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTA  
AAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAATTTTATCGATACT  
AGTATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA  
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTT  
GGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT  
TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCA  
CCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCA  
TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATA  
AGCAGAGCTCGTTTGTAGTAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATC  
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATTCTAGAGCTAGCGCCGCCA  
CCATGCTCCAGATGGCTGGCCAGTGCAGCCAGAACGAGTACTTCG  
ACAGCCTGCTGCACGCTGCATCCCTTGCCAGCTGCGGTGCAGCAG  
CAACACCCACCCCTGACCTGCCAGCGGTACTGCAACGCCAGCGTG  
ACCAACAGCGTGAAGGGCACCAACGCCATCCTGTGGACCTGCCTG  
GGCCTGAGCCTGATCATCAGCCTGGCCGTGTTCTGTGCTGATGTTCC  
TGCTGCGGAAGATCAACAGCGAGCCCCTGAAGGACGAGTTCAAGA  
ACACCGGCAGCGGCCTGCTGGGCATGGCCAACATCGACCTGGAAA  
AGAGCCGGACCGGCAGCAGATCATCCTGCCAGAGGCCTGGAGT  
ACACCGTGGAAGAGTGTACCTGCGAGGACTGCATCAAGAGCAAGC  
CAAAGGTGGACAGCGACCACTGCTTCCCTCTGCCC GCCATGGAAGA  
GGGCGCCACCATCCTGGTGACAACAAAGACCAACGACTACTGCAA  
GAGCCTGCCTGCCGCCCTGAGCGCCACCGAGATCGAGAAGTCCAT  
CAGCGCCAGATGAGGATCCGCGGCCGCAAGGATCTGCATCGCTC

[0519]

CGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGA  
 GAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAG  
 GTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG  
 CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTC  
 GCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGC  
 TGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCC  
 TACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCT  
 CCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTT  
 TAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGTCCTTGGAAG  
 CCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCGTGACCCTGCTTG  
 CTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGA  
 TCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACGTGAGATGATTGAACAAGATG  
 GATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCTG  
 GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT  
 GTTCCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACC  
 GACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGG  
 CTATCGTGGCTGGCCGCGACGGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCG  
 ACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAG  
 TGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCTCACCTTGCTCTGCCGAGAA  
 AGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT  
 CCGGCTACCTGCCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC  
 GAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCT  
 GGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAG  
 GCTCAAGGCGCGCATGCCCCACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCA  
 TGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGTTT  
 TCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC  
 AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG  
 CGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC  
 GATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG  
 ACTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT  
 GGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC  
 TTTAATGCCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTT  
 CTCCTCCTTGATATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGT  
 GGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA  
 CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT  
 TCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCAT  
 CGCCGCTGCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC  
 ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTT  
 GGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTT  
 CTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCG  
 GCCTGCTGCGGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCT  
 CAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCGCTCCCCGCTGGTACCT  
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTT  
 TAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAA  
 GATAAGATCTGCTTTTGTCTGTACTGGGTCTCTGTTAGACCAG  
 ATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTA  
 AGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCG  
 TCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT  
 CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTAT  
 TCAGTATTTATAAATTGCAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAG  
 GAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC  
 ATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTG  
 TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTTAGC  
 TATCCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTT  
 CCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCA  
 GAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGA  
 GGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGACTTTTGCAGAGACGGCCCAAATT

[0520]

CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC  
ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGGCC  
TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT  
CACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA  
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCG  
CTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGC  
TGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATC  
CACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG  
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGTGCGCT  
TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACG  
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA  
GGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCC  
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT  
GGCGCTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAG  
GTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACG  
CCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCC  
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG  
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA  
GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATC  
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCT  
CTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT  
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA  
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAC  
TCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA  
CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTTTAAATCAATCTAAAG  
TATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT  
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGC  
CTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCA  
TCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAG  
CTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGC  
GCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA  
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG  
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGT  
CGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCG  
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCCCTTC  
GGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCAC  
TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCC  
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCT  
GAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT  
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCAT  
CATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACC  
CTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCAACTGAT  
CTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC  
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA  
AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT  
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT  
AGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG  
TGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAACCTA  
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGT  
GATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTC  
ACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAG  
GGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATG  
CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTG  
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGC  
GCCATTGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGT  
GCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCT  
GCAAGGCGATTAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC

[0521]

		GTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG
7	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR1 (DNA)	AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTG CAT
8	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR1 (氨基酸)	KSSQSLVHSNGNTYLH
9	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR2 (DNA)	AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC
10	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR2 (氨基酸)	KVSNRFS
11	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR3 (DNA)	GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC
12	抗 BCMA scFv 1 轻链 CDR3 (氨基酸)	AETSHVPWT
13	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR1 (DNA)	AAAGCGAGCGGCTATAGCTTCCGGATTATTATATTAAC
14	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR1 (氨基酸)	KASGYSFPDYYIN
15	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR2 (DNA)	TGGATTTATTTTTCGAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTA CCGGC
16	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR2 (氨基酸)	WIYFASGNSEYNQKFTG
17	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR3 (DNA)	CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG
18	抗 BCMA scFv 1 重链 CDR3 (氨基酸)	LYDYDWYFDV
19	抗 BCMA 轻链可变区 (DNA)	GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGG GCGAACC GGCGAGCATTAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGC ATAGCAACGGCAACACCTATCTGCATTGGTATCTGCAGAAACCGG GCCAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAG CGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGATTTT ACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTAT TATTGCGCGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCA



[0522]

		CCAAACTGGAAATTAAGC
20	抗 BCMA 轻链可变 (氨基酸)	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSP QLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGADFTLKISRVEAEDVGVVYCAETS HVPWTFGQGTKLEIKS
21	抗 BCMA 重链可变区 (DNA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCG GATTATTATTAACCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATGGGCTGGATTTATTTTGCAGCGGCAACAGCGAATATA ACCAGAAATTTACCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCA GCAGCACCGGTATATGGAAGTGCAGCAGCTGCGCAGCGAAGATA CCGCGGTGTATTTTGCAGCGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTT GATGTGTGGGGCCAGGGCACCATTGGTGACCGTGAGCAGC
22	抗 BCMA 重链可变区 (氨基酸)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLE WMGWYIFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSSTAYMELSSLRSEDTAV YFCASLYDYDWYFDVWVGQGTMTVSS
23	抗 BCMA V <sub>H</sub> 1 DNA	ATGGCGGTGGTCTGGCTGCTCTACTACAAGGTGTCCAGGCTCAGG TGCACCCGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGACTGGGGGGT CTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGCTGGTATCTTCAGTATCAAT GTCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAATTG GTCGCGAGTATAACTAGTCGTGGTGATACAACGTATGCGAACTCCG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGG TATATCTGCAAATGAACGCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCGTCTA TTACTGTAATTTAAAGGGGACAGACTATAGTGGTACATCCACCCAG ACCTTCGACAGACAGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCTTCG GAACCCAAGACACCAAAACCACAACCACAACCACAACCACAACCA CAACCCAATCTACAACAGAATCCAAGTGTCCCAATGTCCAGCCC CTGAGCTCCTGGGAGGGCCCTCAGTCTTCATCTCCCCCGAAACC CAAGGACGTCTCTCCATC
24	抗 BCMA V <sub>H</sub> 1 氨基酸	MAVVLAALLQGVQAQVHPVESGGGLVQTGGSLRLSCAASAGIFSINV MGWYRQAPGKQRELVASITSRGDTTYANSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNALKPEDTAVYYCNLKGTDYSGTSTQTFDRQGQGTQVTVSSEPKT PKPQPQPQPQPQNPPTTESKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLIS
25	抗 BCMA V <sub>H</sub> 1 CDR1	INVMG
26	抗 BCMA V <sub>H</sub> 1 CDR2	SITSRGDTTYANSVKG
27	抗 BCMA V <sub>H</sub> 1 CDR3	LKGTDYSGTSTQTFDR
28	抗 BCMA V <sub>H</sub> 2 氨基酸	QVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASTNIFSIKPMGWYRQAPGKQREL VAIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNKNTIYLMNSLKPEDTAVYYCNK VPWGDYHPRNVYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPQPQPQPQNPPTTE SKCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLIS
29	抗 BCMA V <sub>H</sub> 2 CDR1	ISPMG
30	抗 BCMA V <sub>H</sub> 2 CDR2	AIHGFSTLYADSVKG
31	抗 BCMA V <sub>H</sub> 2 CDR3	VPWGDYHPRNVY
32	人 CD3-ε	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVIL TCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGY YVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICTG GLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDPY

[0523]

		EPIRKGQRDLYSGLNQRRI
33	人 CD3- $\gamma$	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCD EAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNK KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQD GVRQSRASDKQTLPLNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
34	人 CD3- $\delta$	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKPIEELEDVFNVCNTSITWVEGT VGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMC QSCVELDPATVAGIHVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQ ALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS
35	人 CD3- $\zeta$	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVIL TALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
36	人 TCR $\alpha$ -链	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQQM VVCLVLDVAPPGLDSPWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAH LSLSEELASWEPLVCHTGPAGAEHRSRSTQPMHLSGEASTARTCPQ EPLRGTGGALWLGVLRLLLFKLLFDLLTCSCLCDPAGPLPSPATTT RLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSP VWEGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAG A
37	人 TCR $\alpha$ -链 C 区	PNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLW SS
38	人 TCR $\alpha$ -链 V 区 CTL-L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQKNDQVQKQNSPSSLSVQEGRI SILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFL NKSAKHLHLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQV TL
39	人 TCR $\beta$ -链	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNP RNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSV SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVKKRDF
40	人 TCR $\beta$ -链 V 区 CTL-L17	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPРНITKRGQNVTFRCDP ISEHNRLYWYRQTLGGQPEFLTIFYQNEAQLEKSRLLSDRFSAER PKGSFSTLEIQRTEQGDSAMLYLCASSLAGLNQPPHFQDGTLSIL
41	人 TCR $\beta$ -链 V 区 YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKP ISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMP NASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTV
42	人 BCMA 规范多肽序列	MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASV TNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNT GSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLETVVECTCEDCIKSKPKV DSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
43	抗 BCMA scFv 2	DIVMTQSQRFMTTSGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSP KALIFSASLRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQ QYNNYPLTFGAGTKLELKGSGSGSGSGSGSQVQLQQSGGGLVQPG GSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINY APSLKDKFII SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDYGD AMDYWGQGSVTSS
44	用于抗 BCMA scFv 1 的接头	GGGGSGGGGSGGGGS
45	抗 BCMA scFv 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLE WMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDT AVYFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWY LQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPRDFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGV YYCAETSHVPWTFGQGTKLEIKS



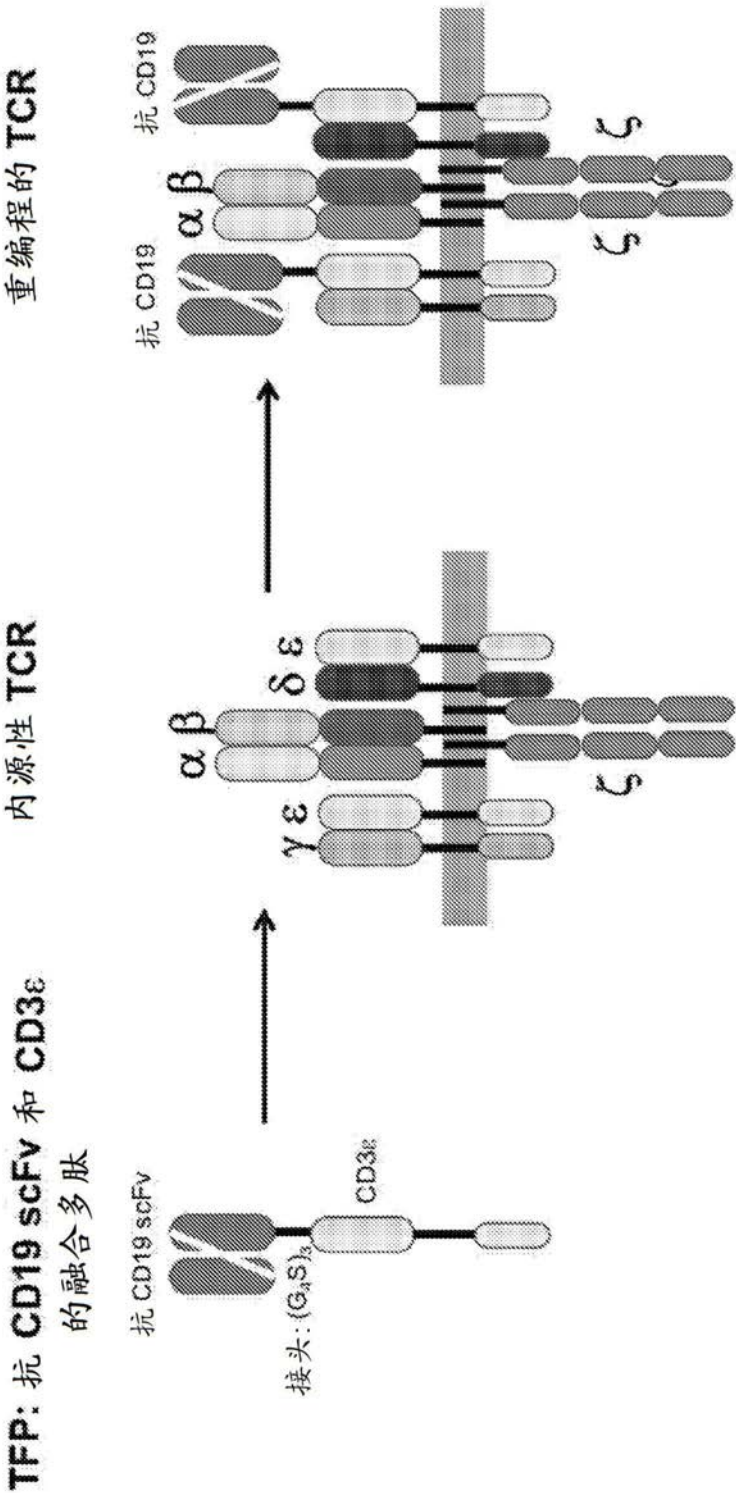
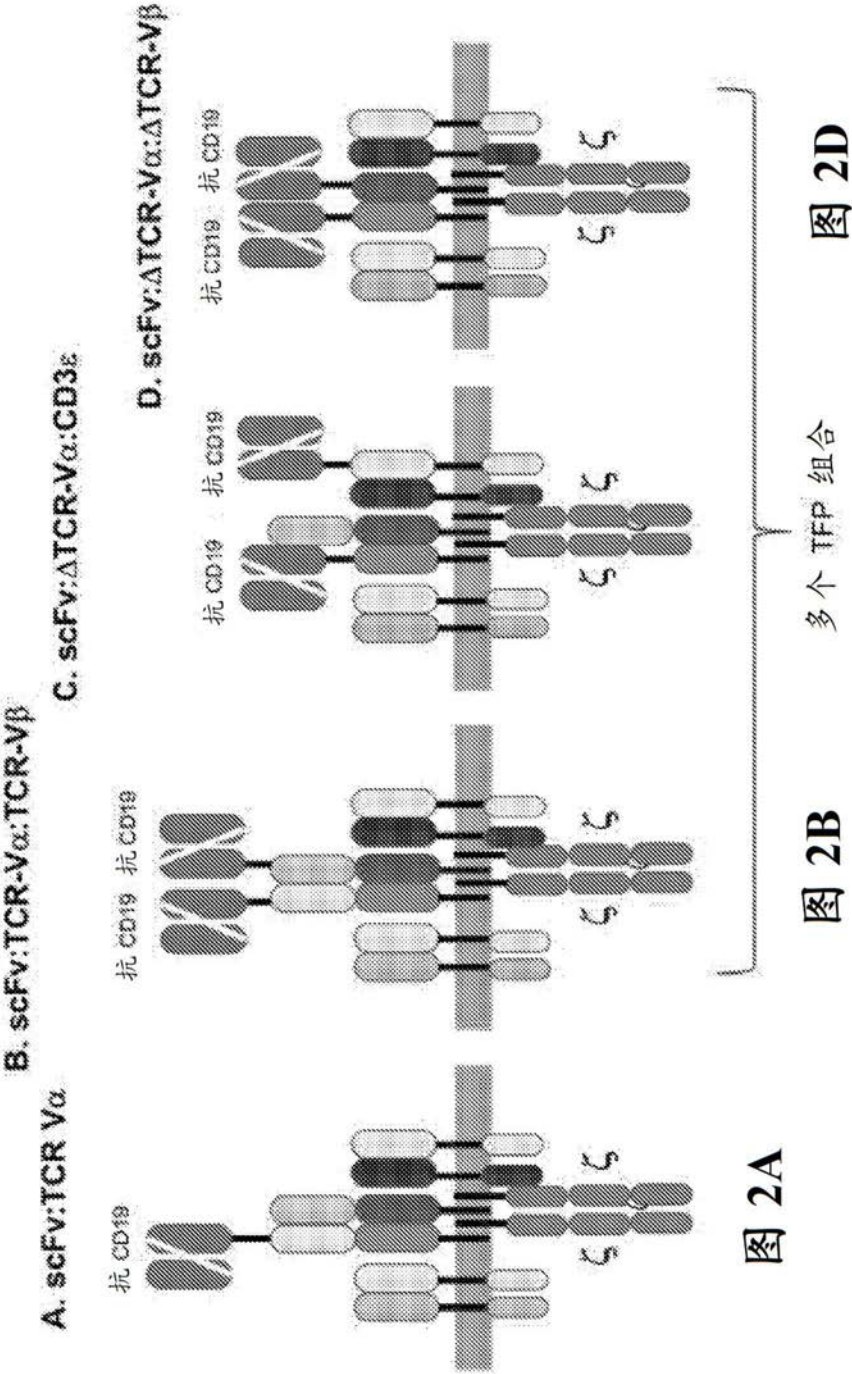


图1





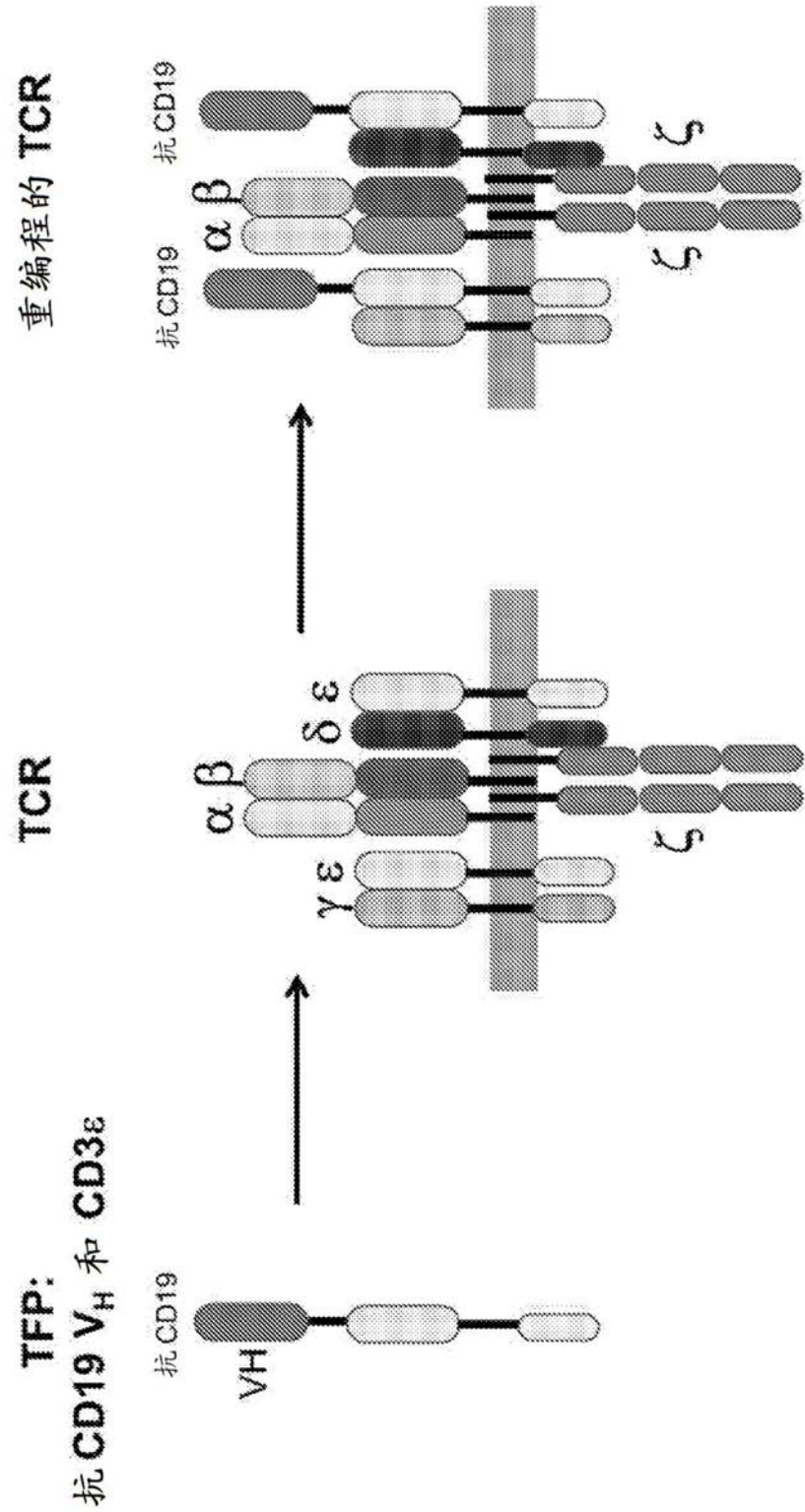


图3

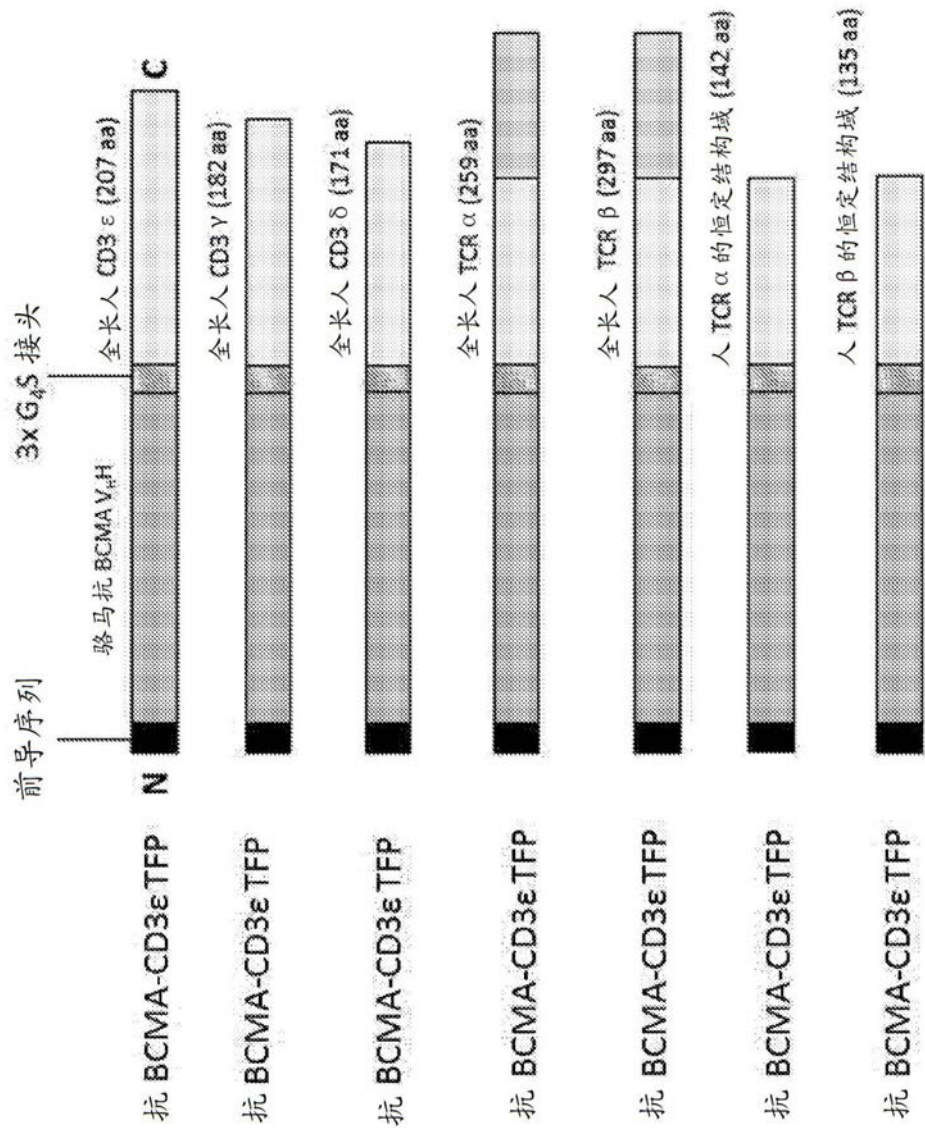


图4

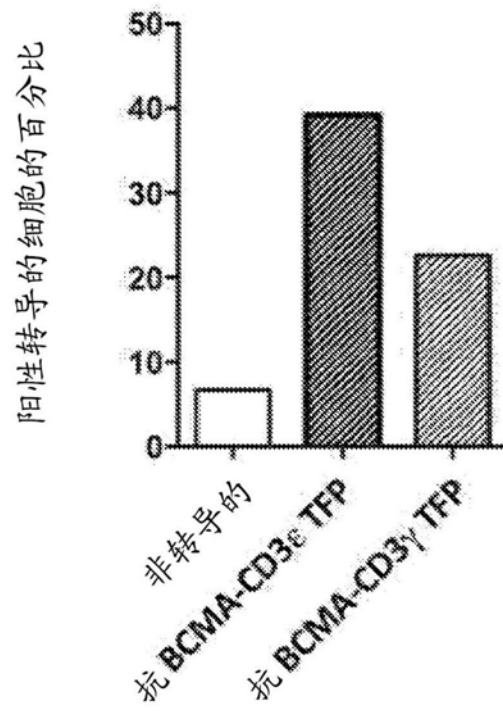


图5

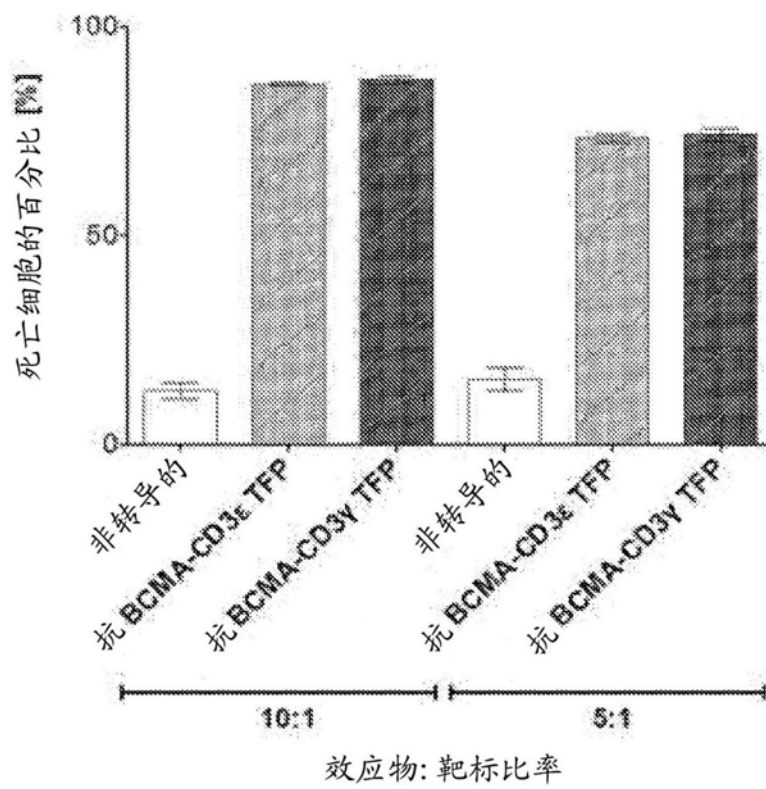


图6

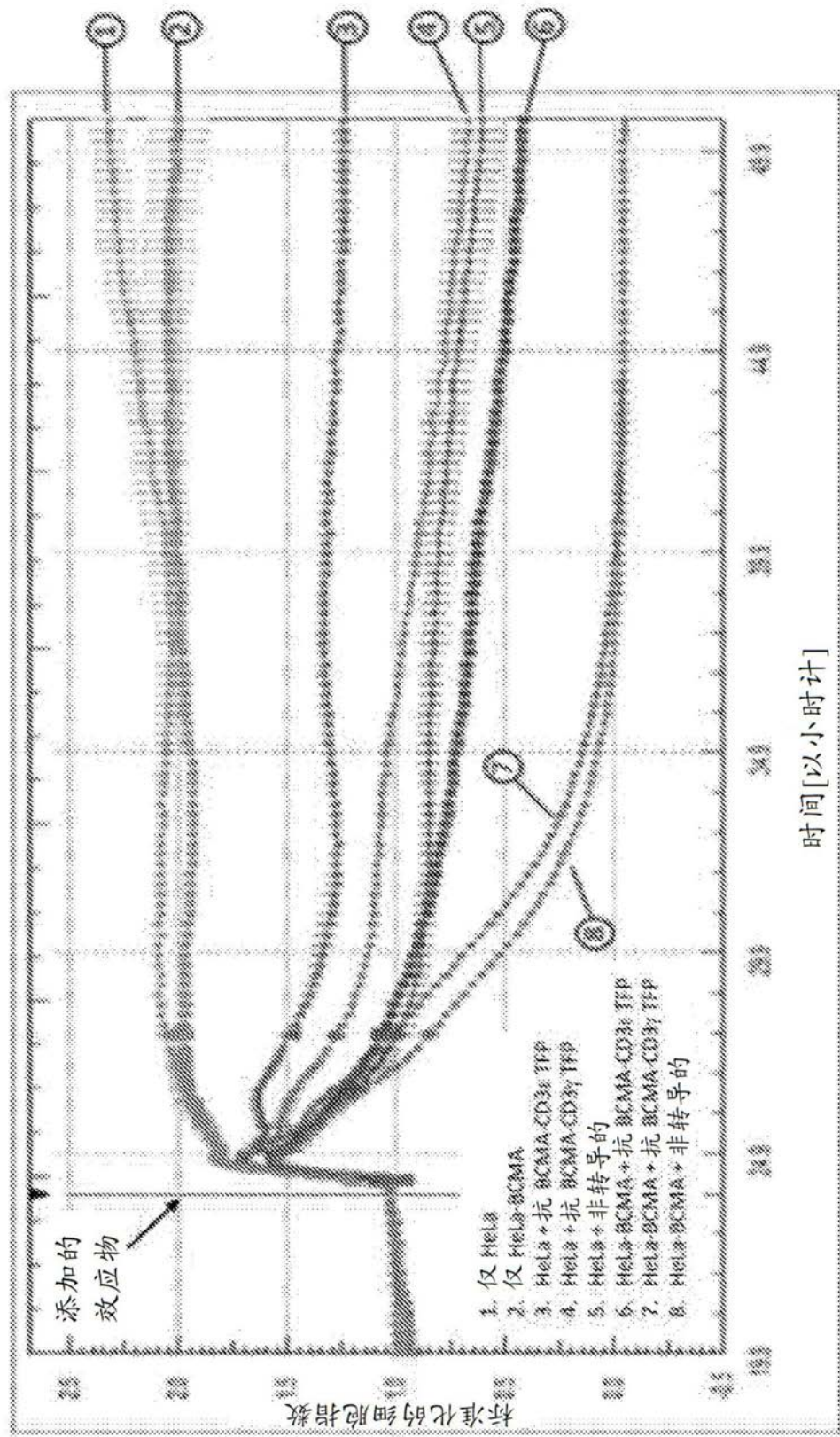
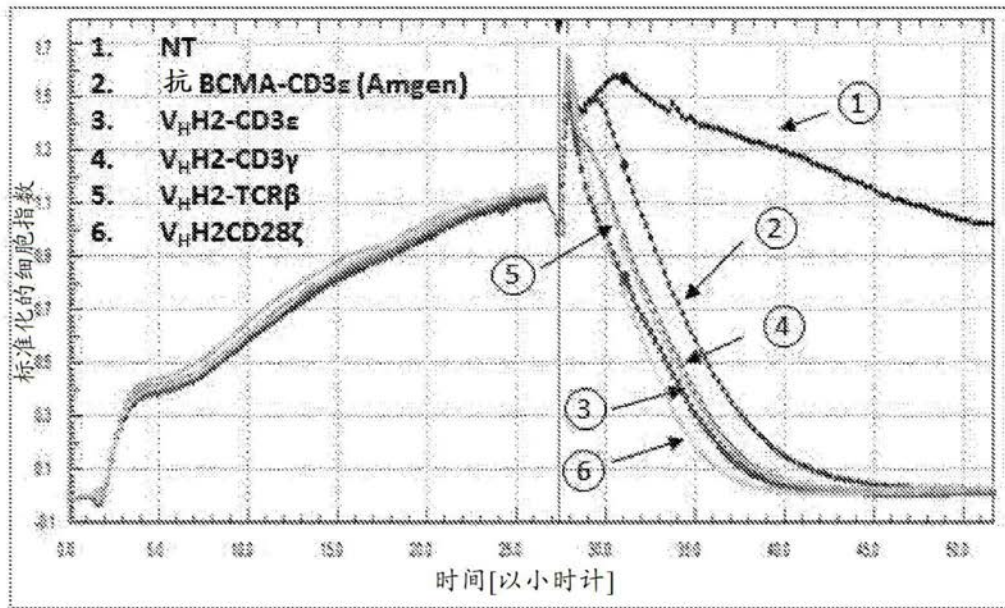


图7A



E:T 5:1

## HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



## HeLa-CD19 (BCMA-肿瘤靶标)

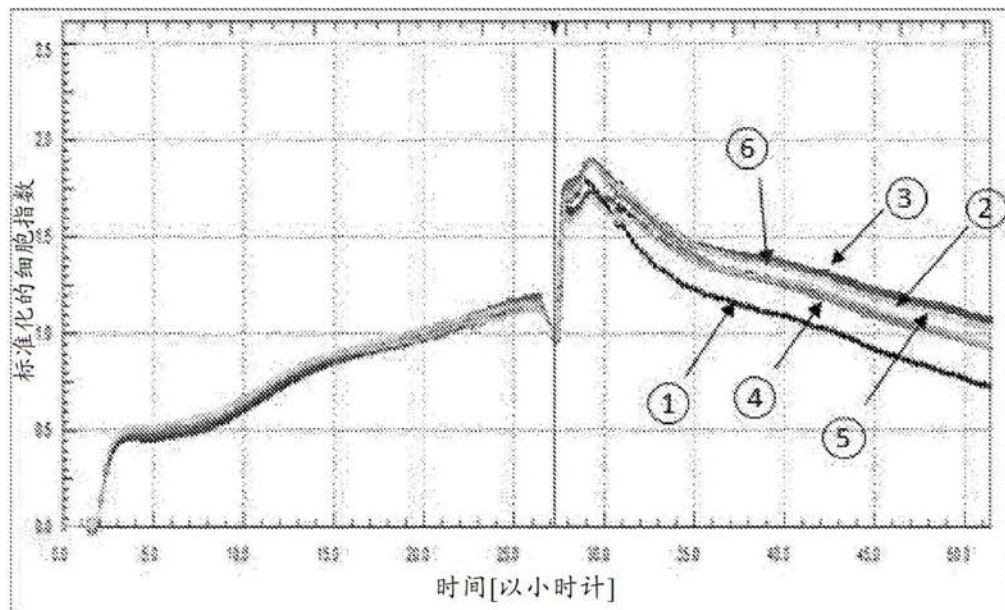
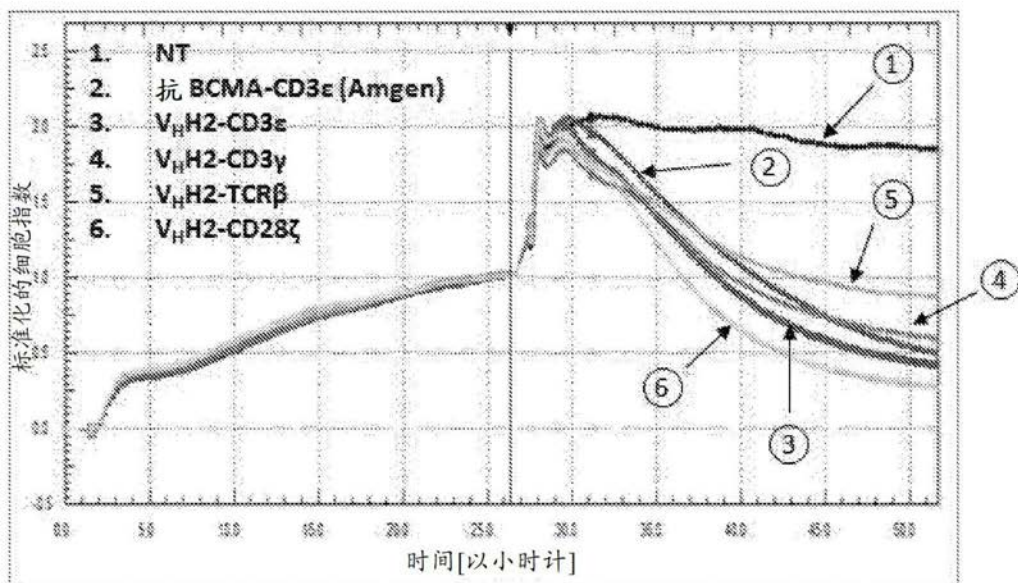


图7B

E:T 1:1

## HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



## HeLa-CD19 (BCMA- 肿瘤靶标)

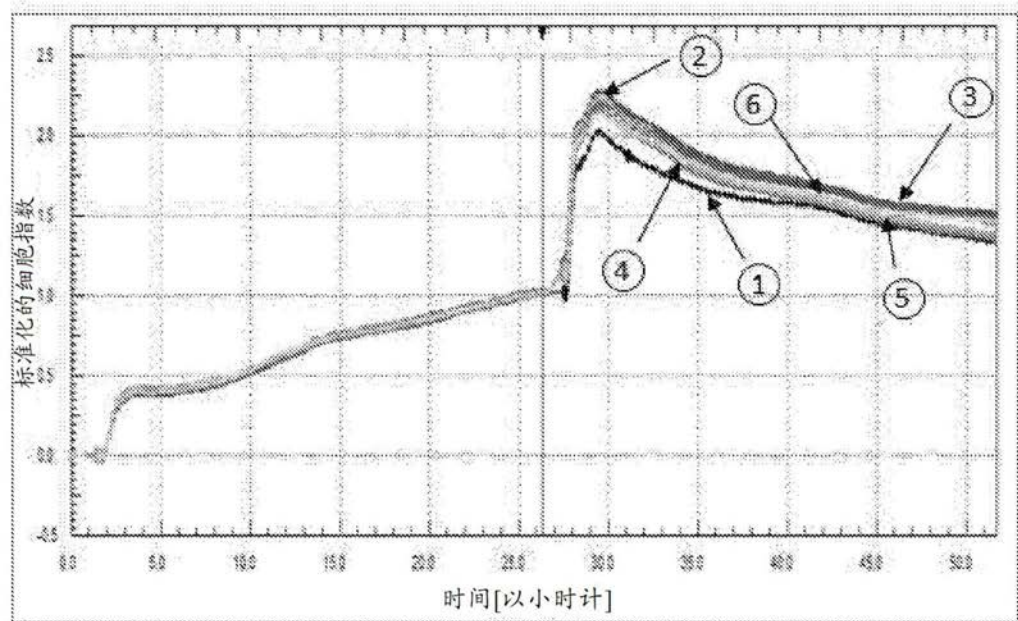
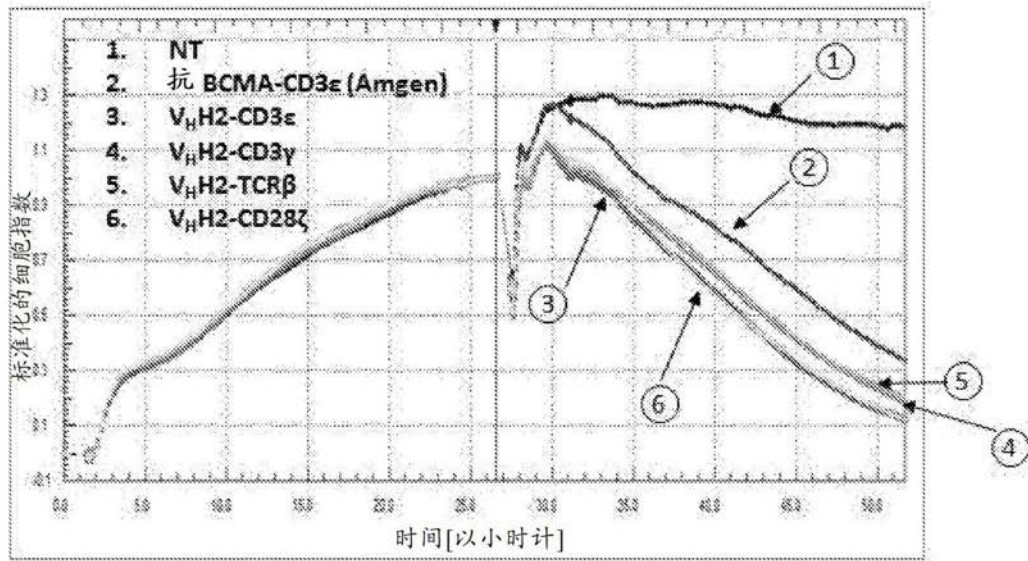


图7C



E:T 1:5

HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



HeLa-CD19 (BCMA- 肿瘤靶标)

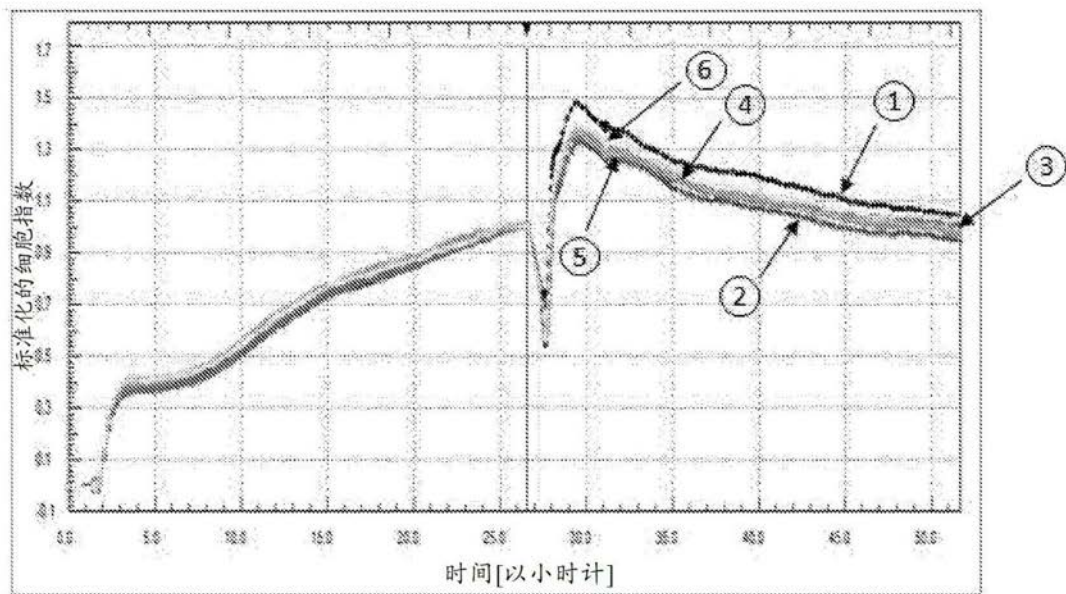
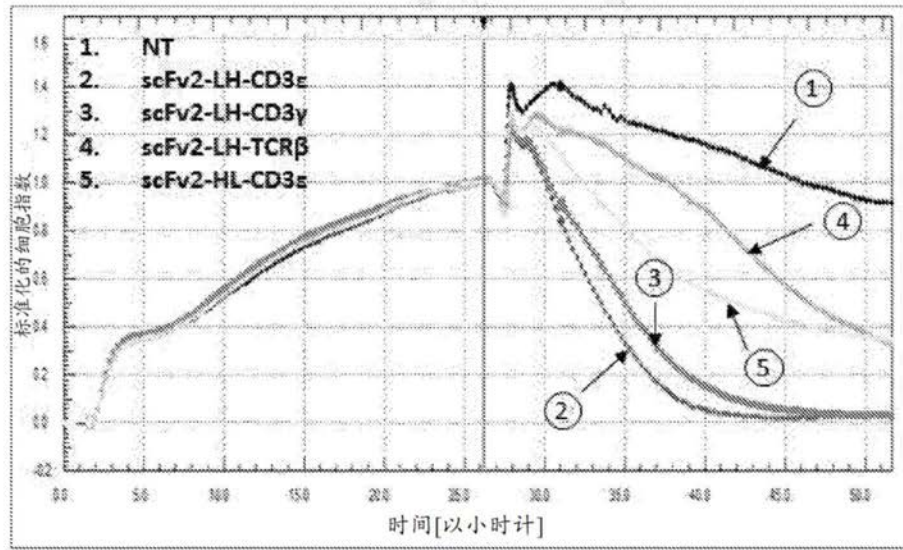


图7D

E:T 5:1

## HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



## HeLa-CD19 (BCMA- 肿瘤靶标)

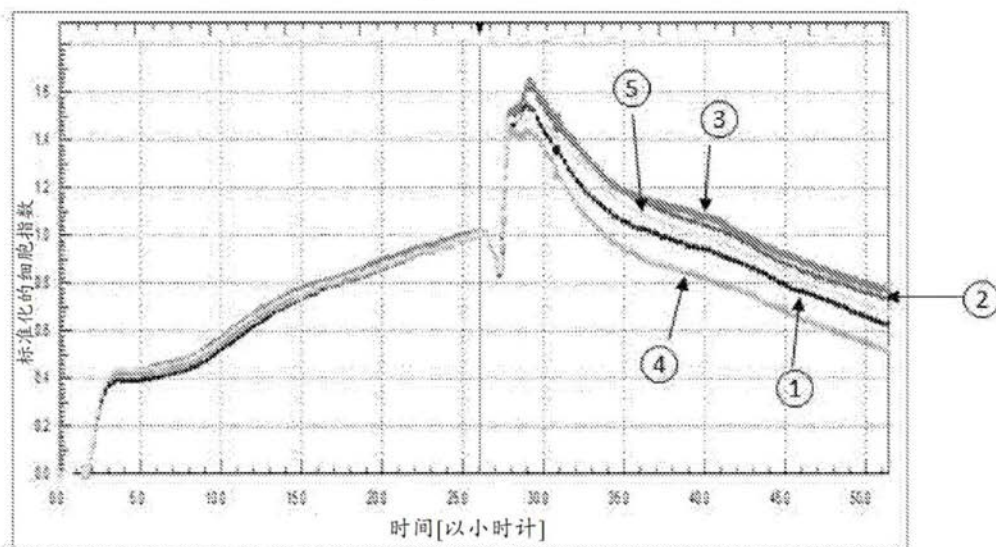
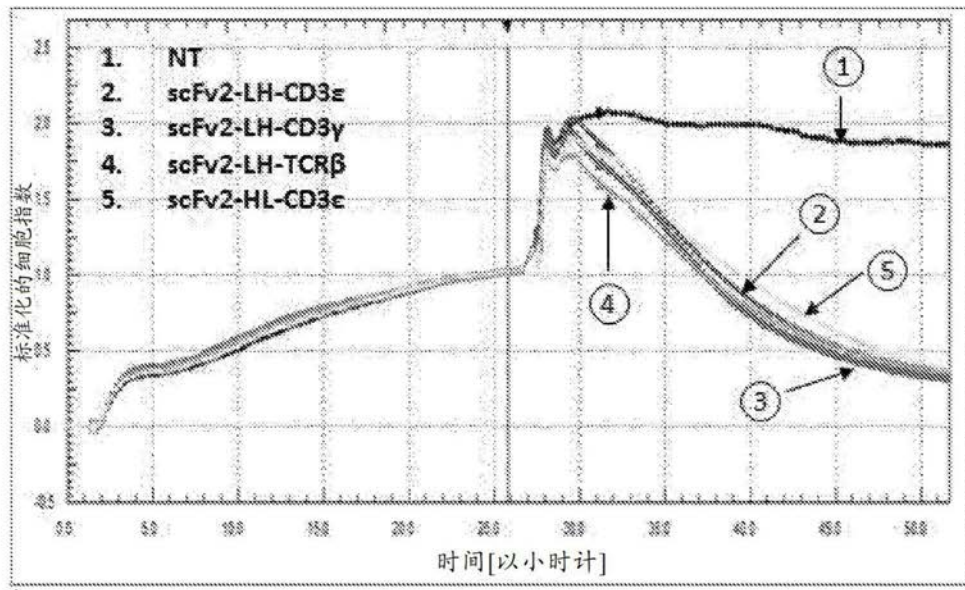


图7E



E:T 1:1

## HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



## HeLa-CD19 (BCMA- 肿瘤靶标)

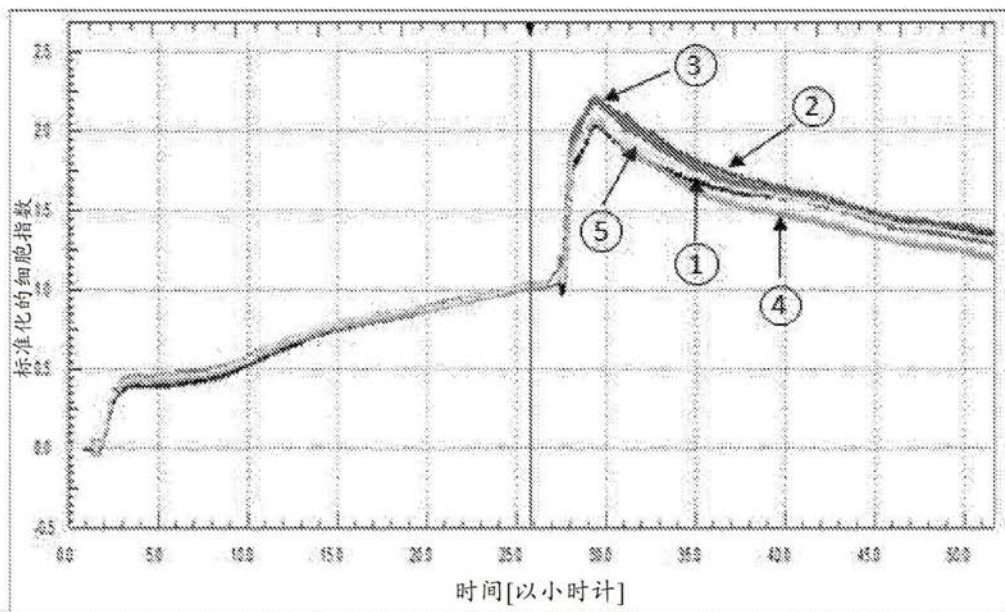
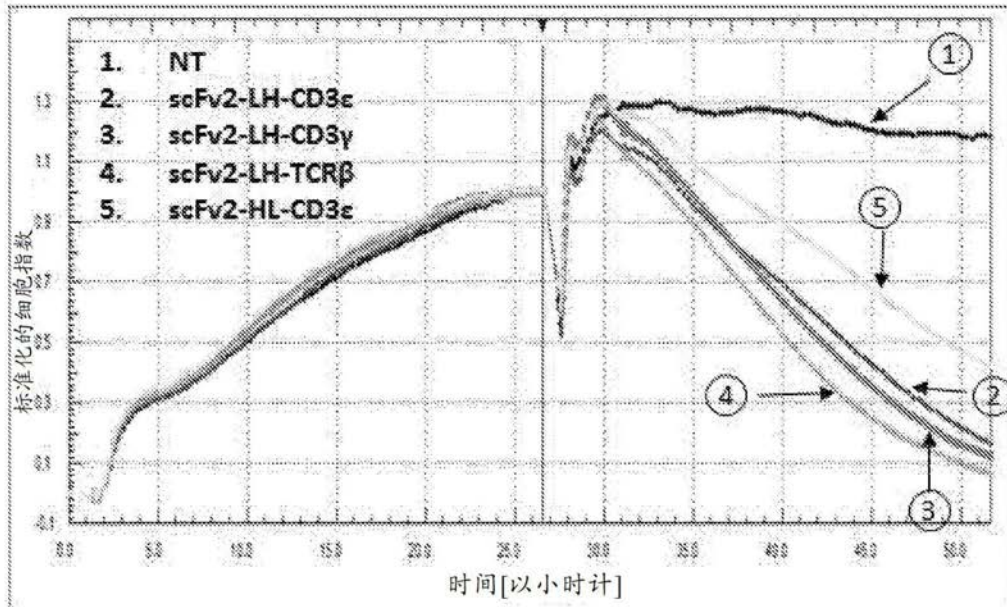


图7F

E:T 1:5

## HeLa-BCMA (BCMA+ 肿瘤靶标)



## HeLa-CD19 (BCMA- 肿瘤靶标)

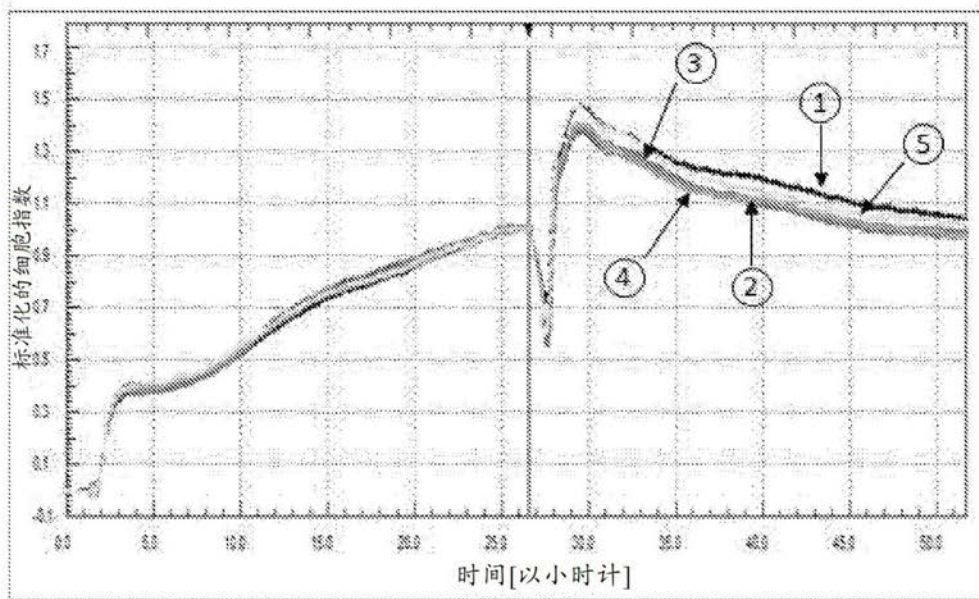


图7G

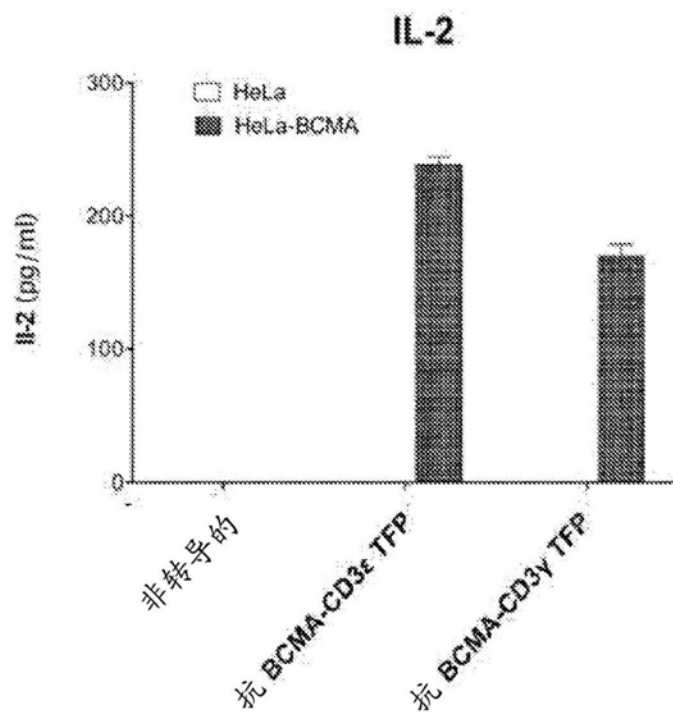


图8A

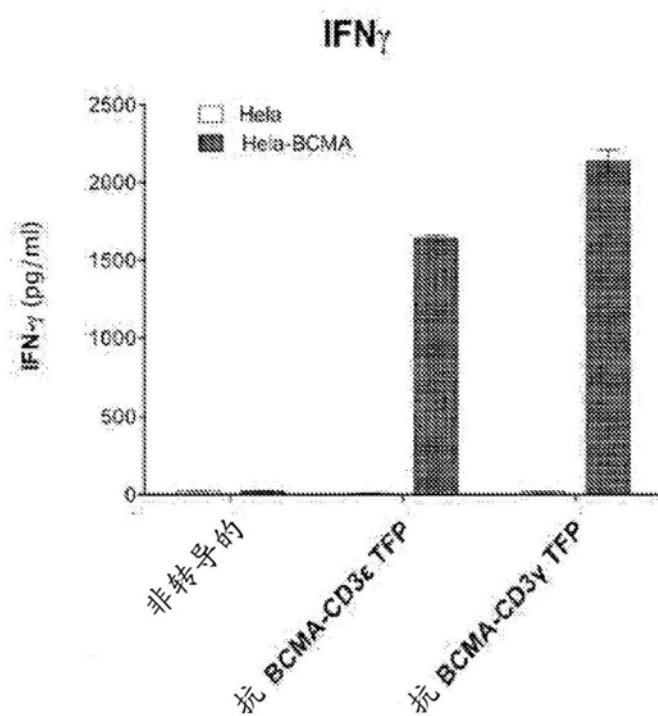


图8B

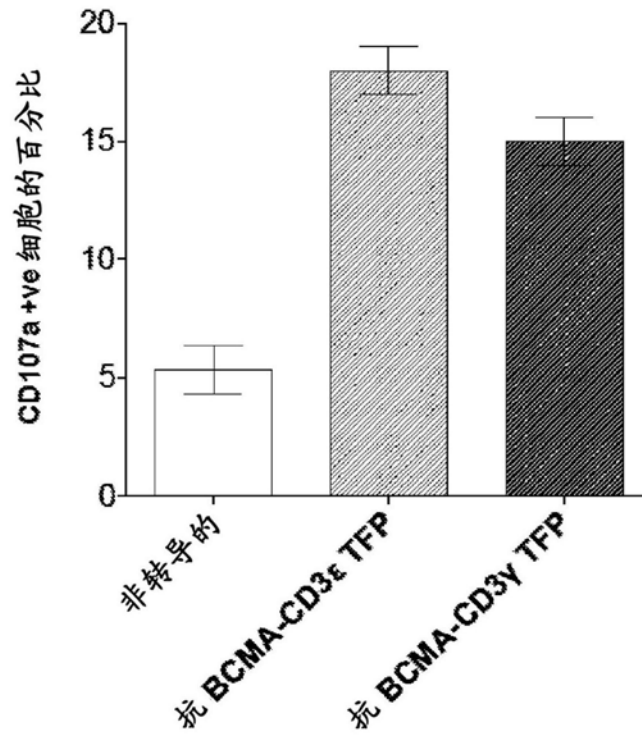


图9

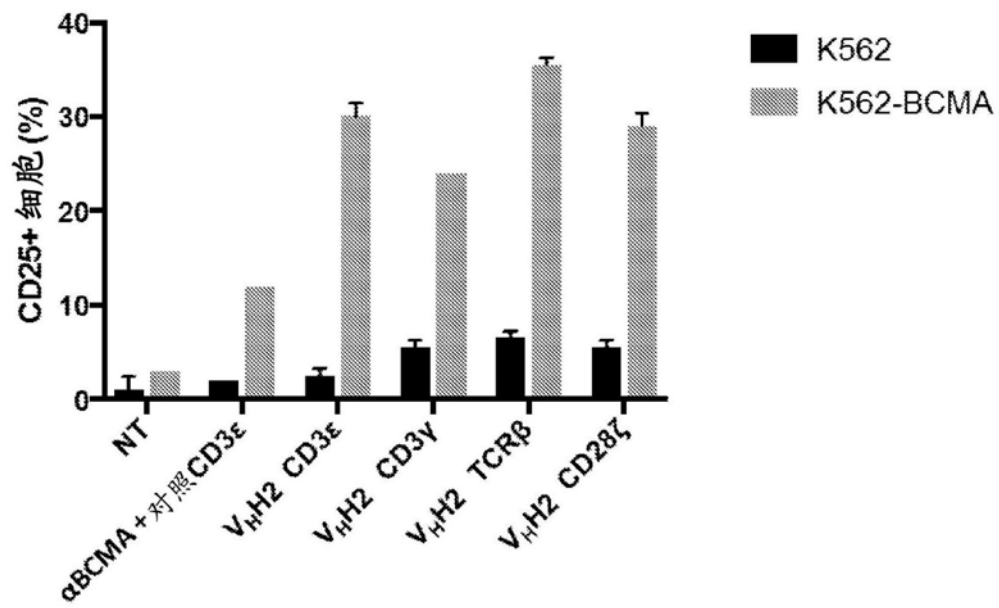


图10A

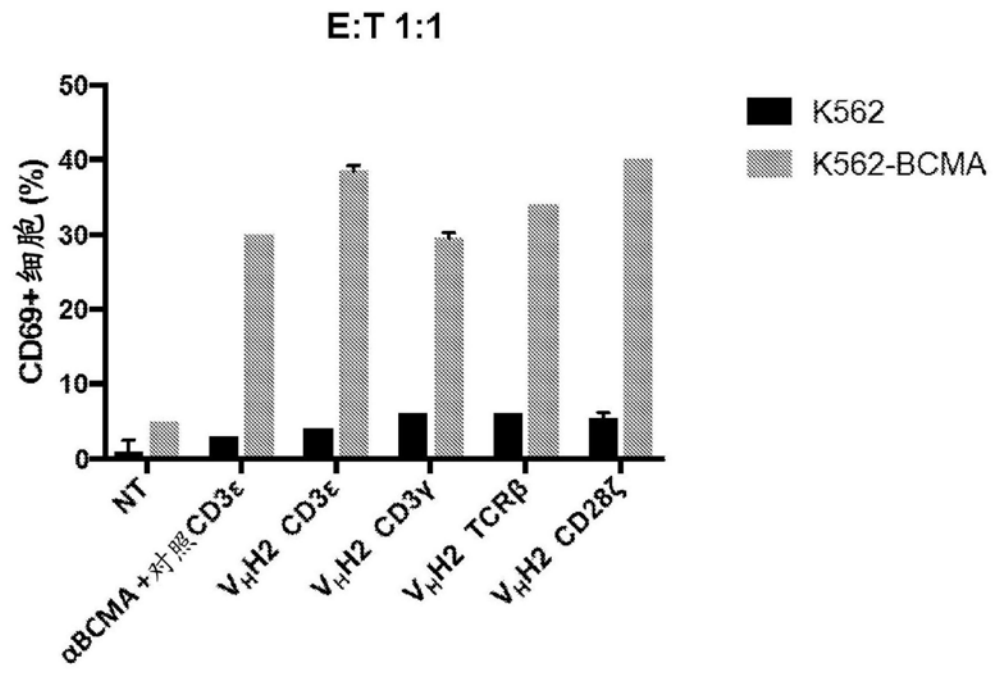


图10B

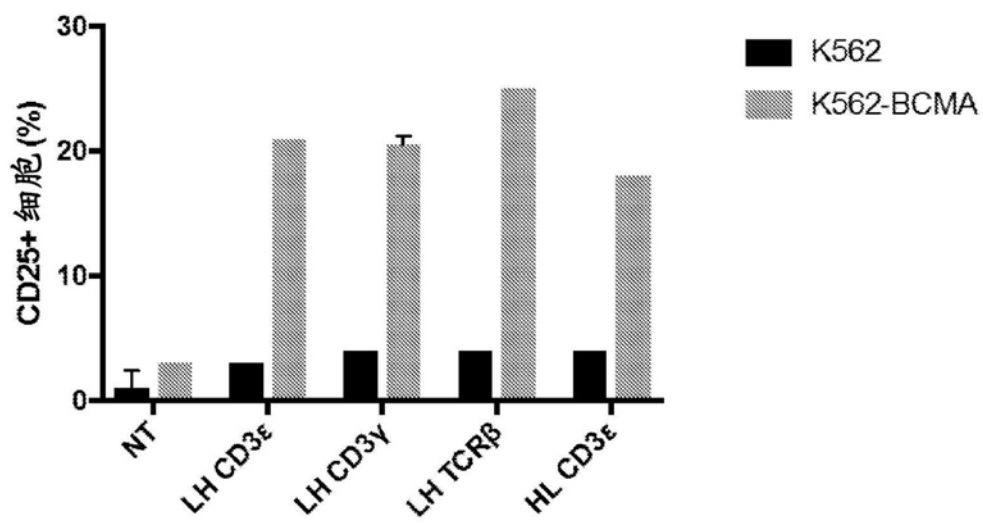


图10C

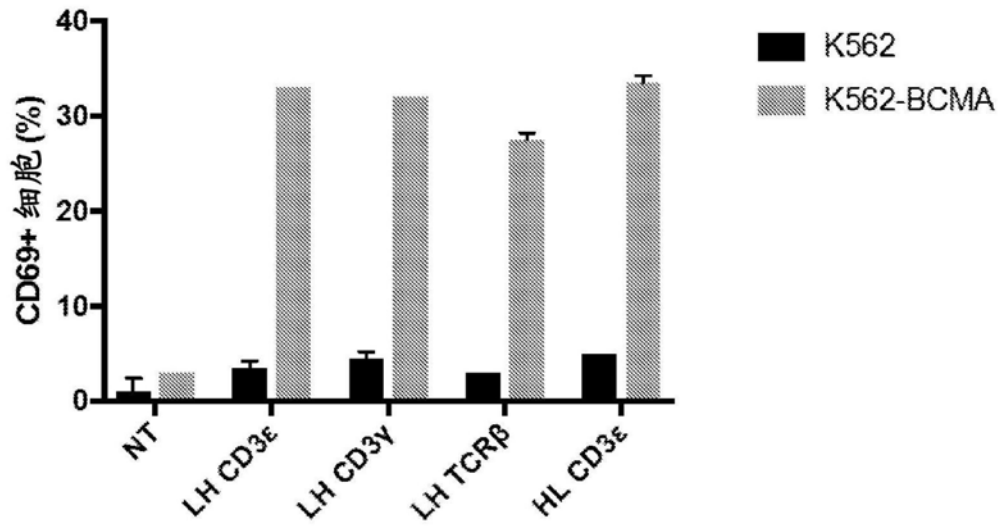


图10D

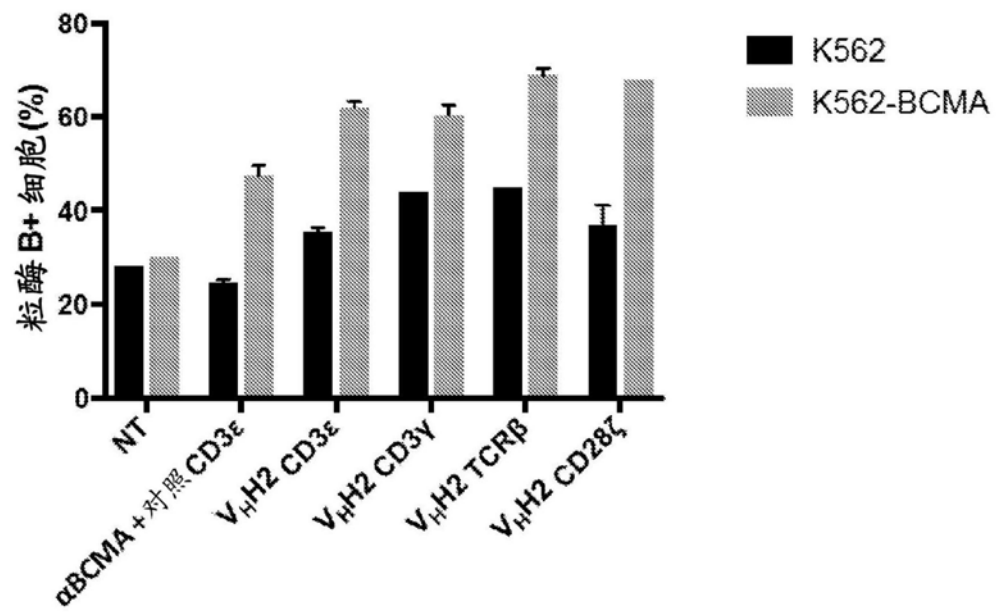


图10E

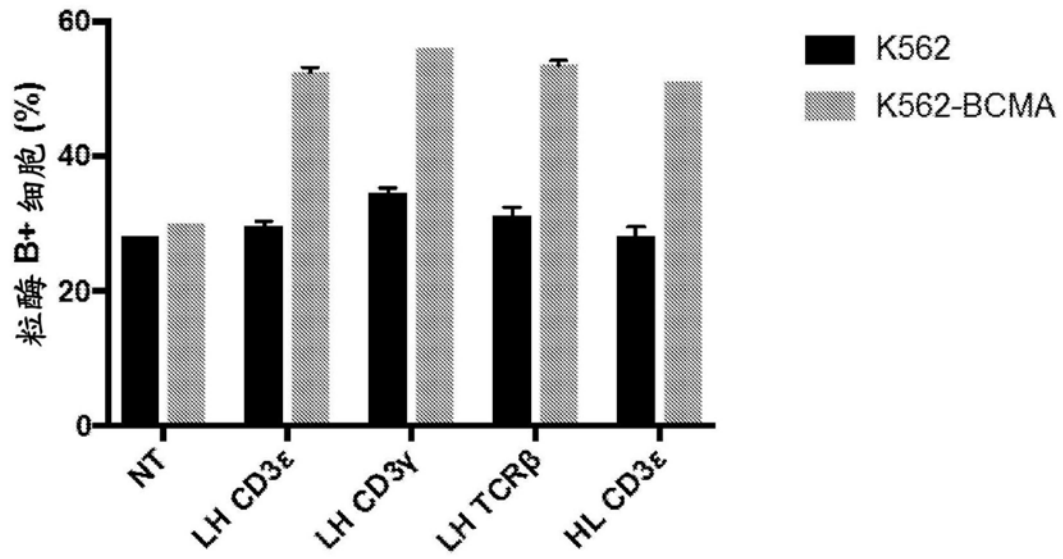


图10F

3:1

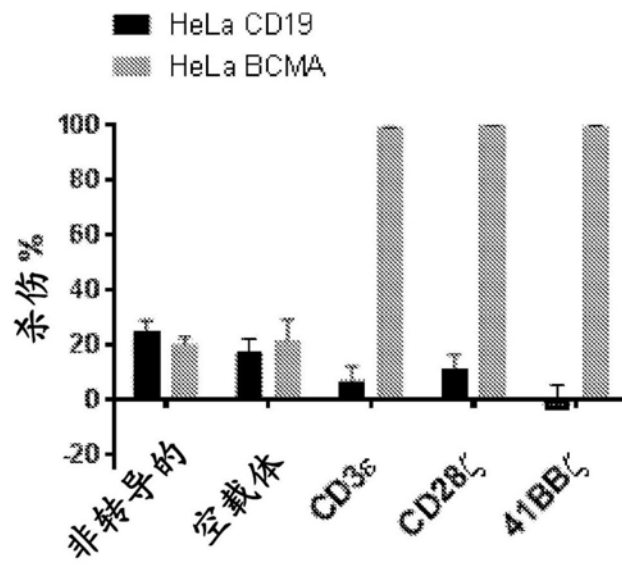


图11A

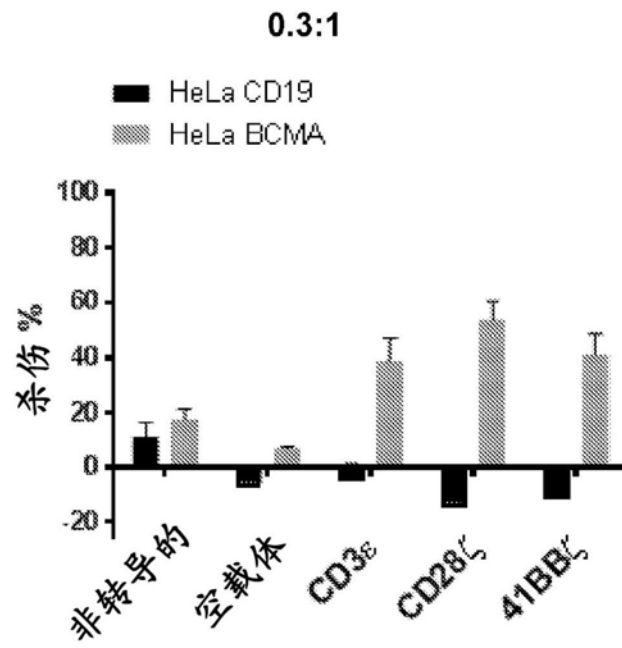


图11B



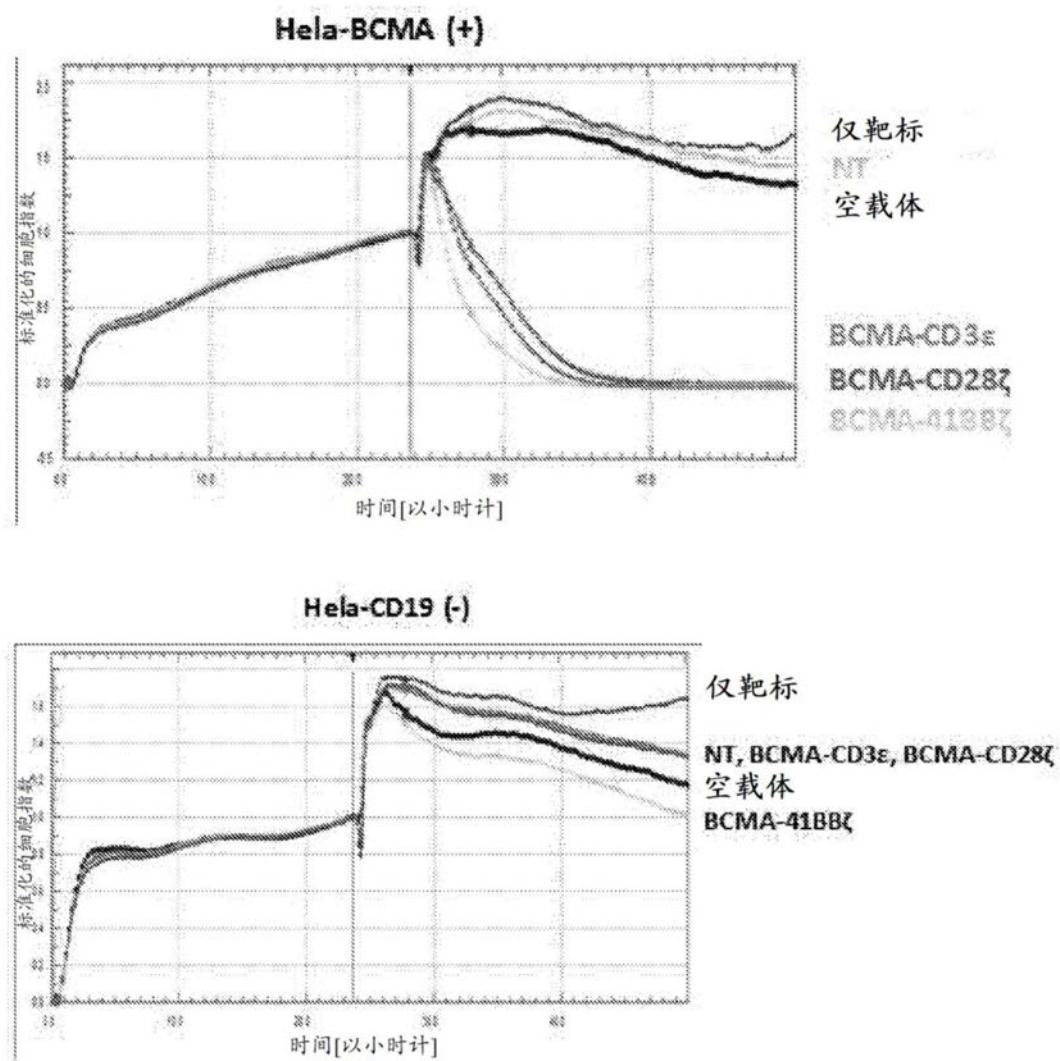


图11C

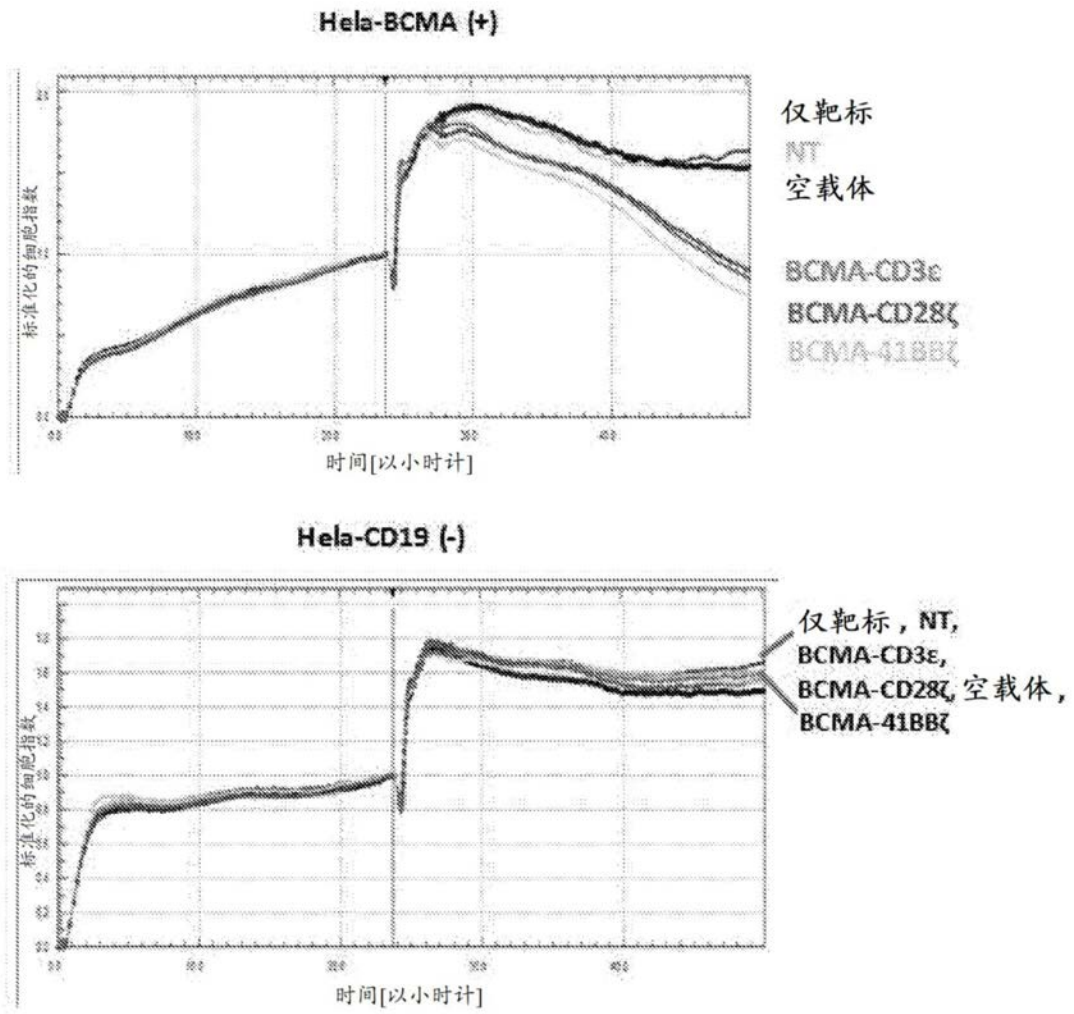


图11D

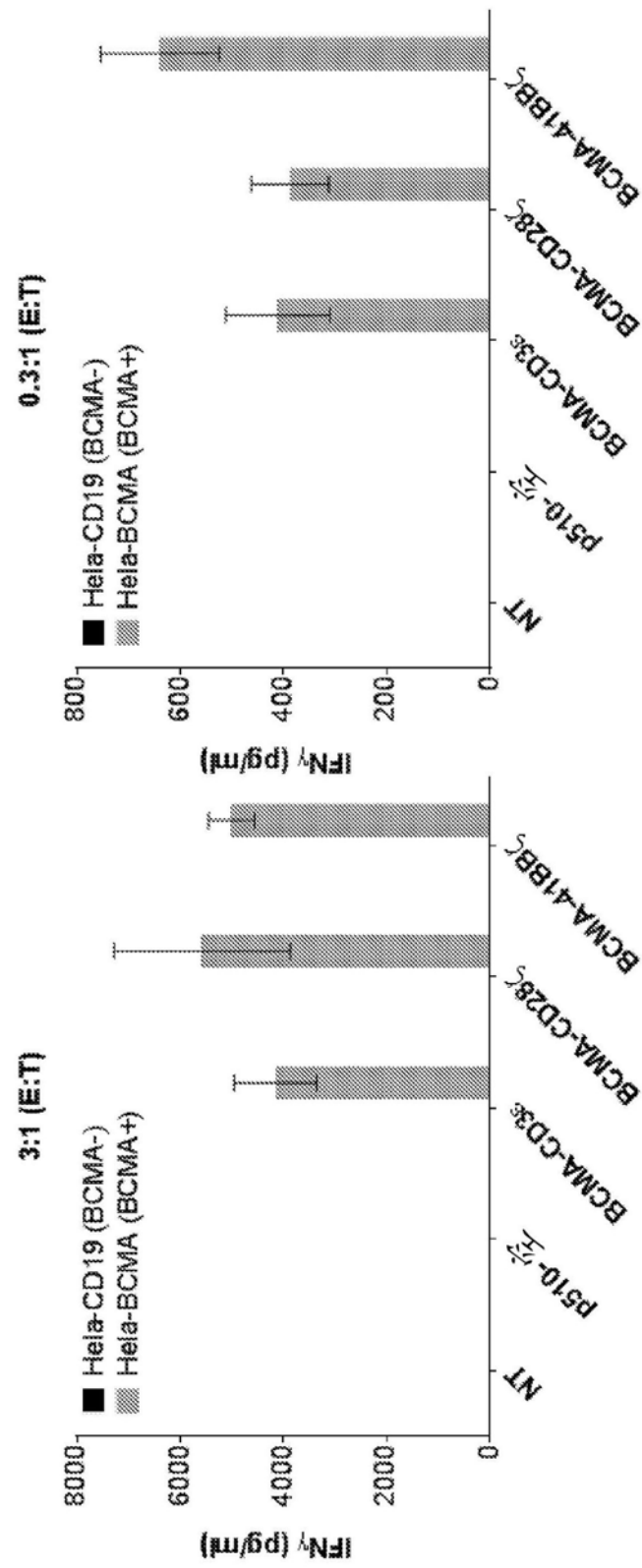


图11E

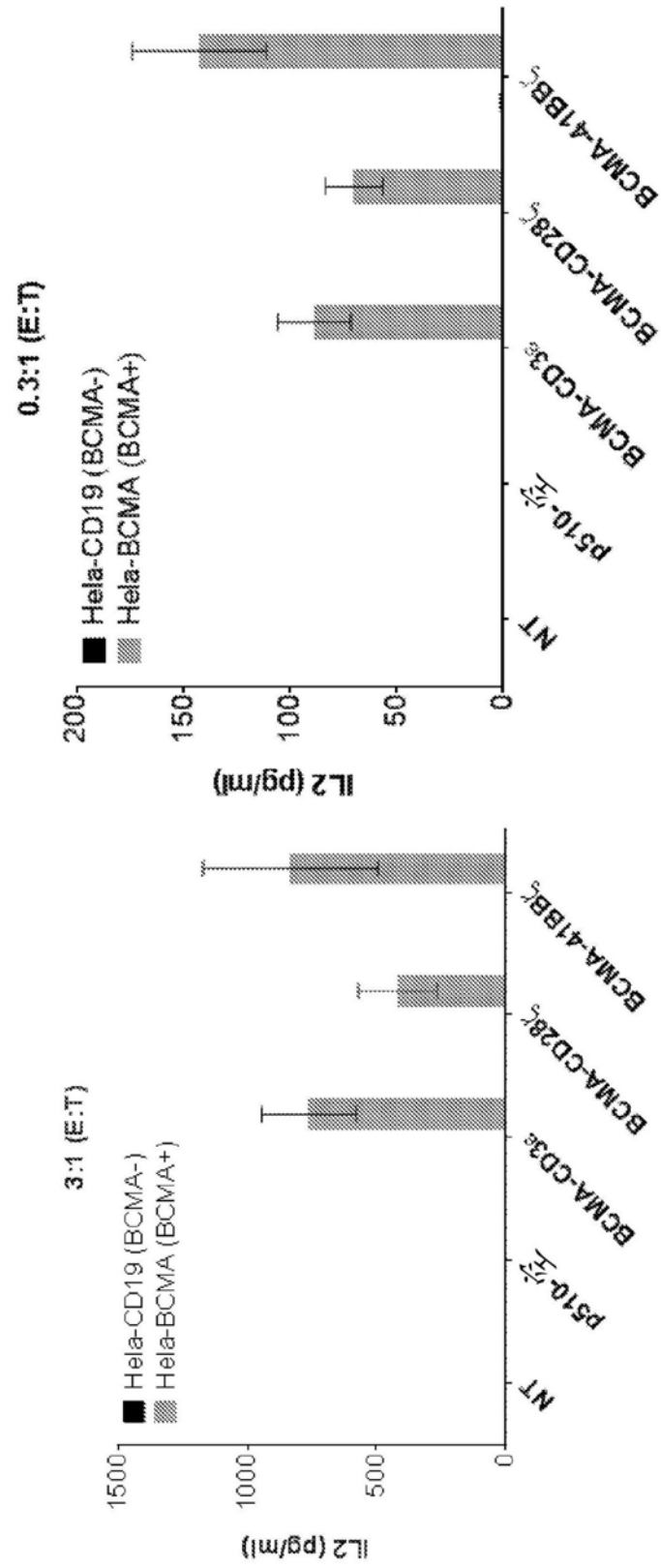


图11F

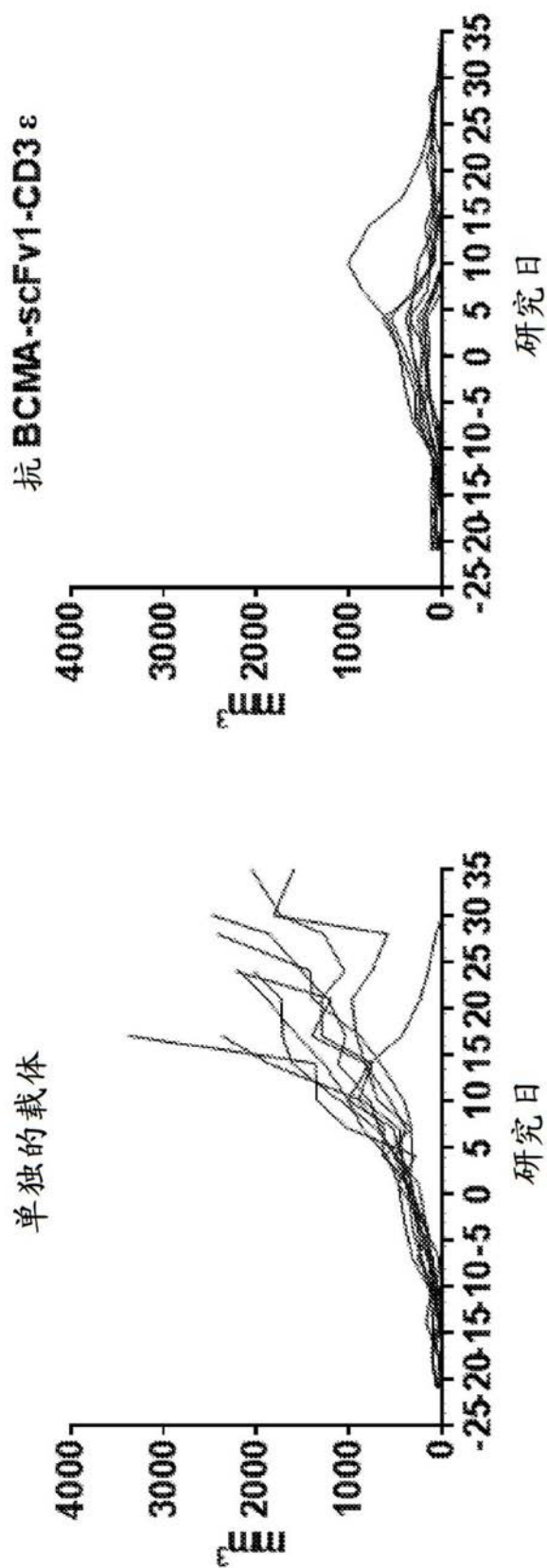


图12A

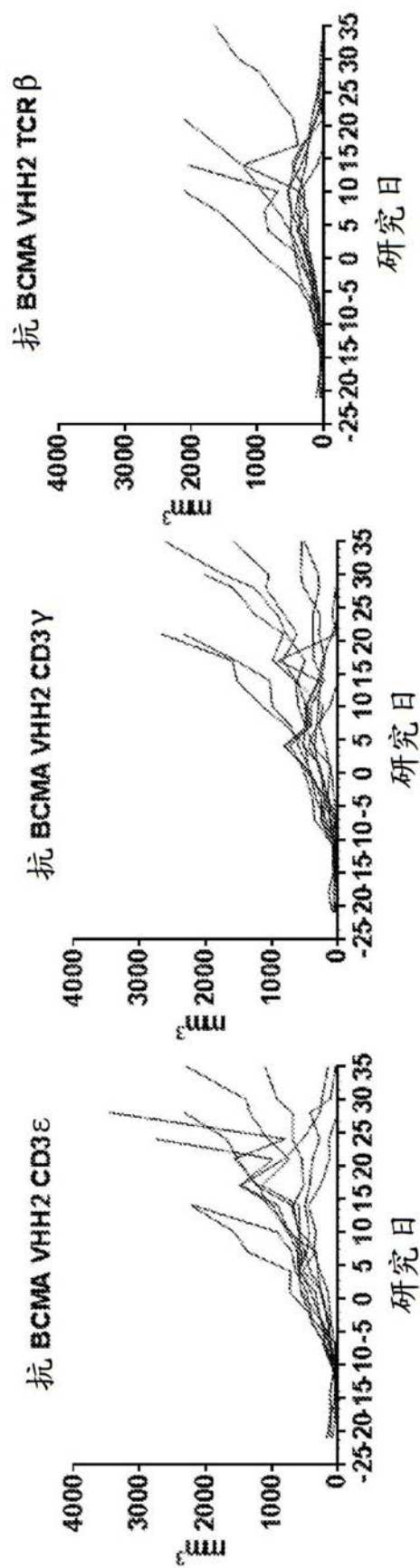


图12B

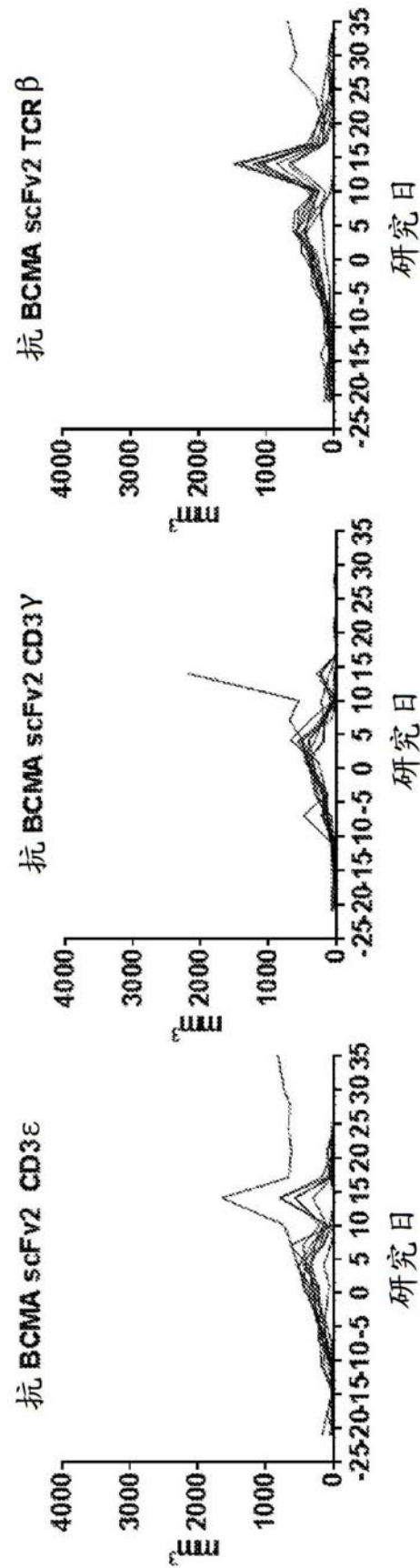


图12C

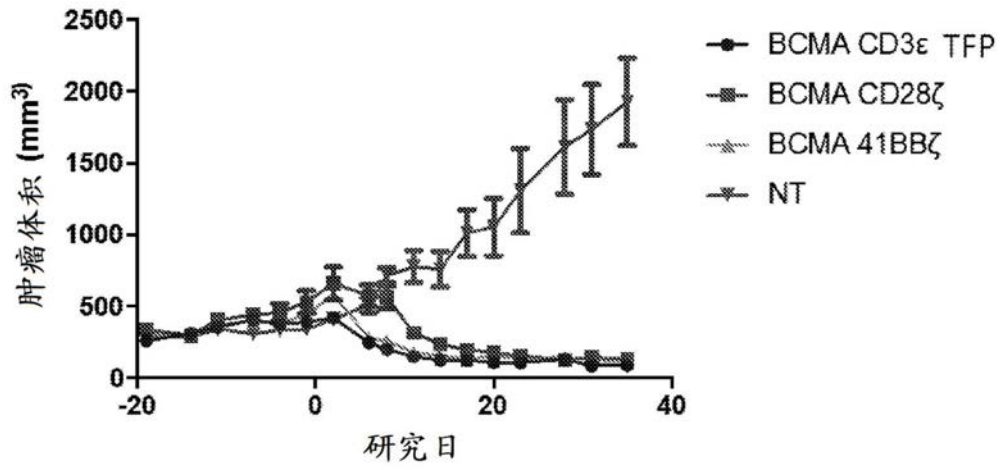


图13A

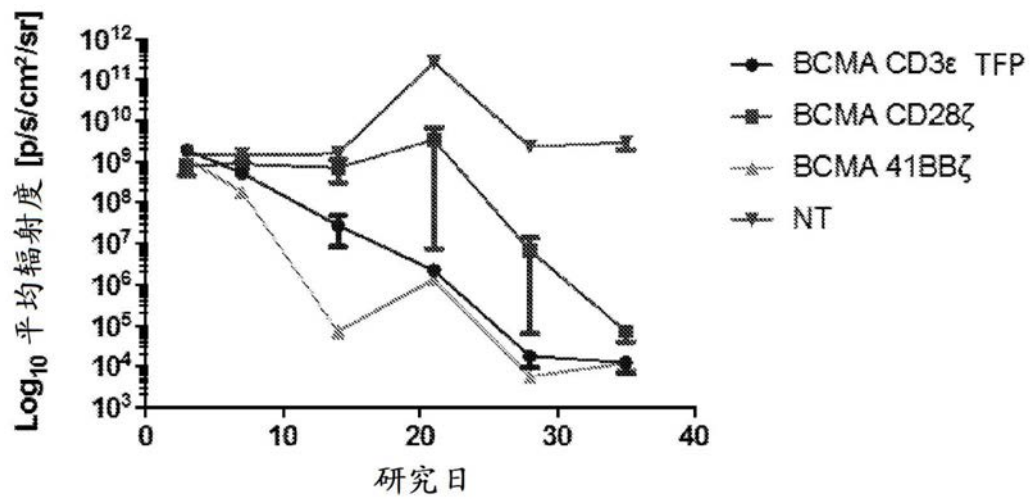


图13B



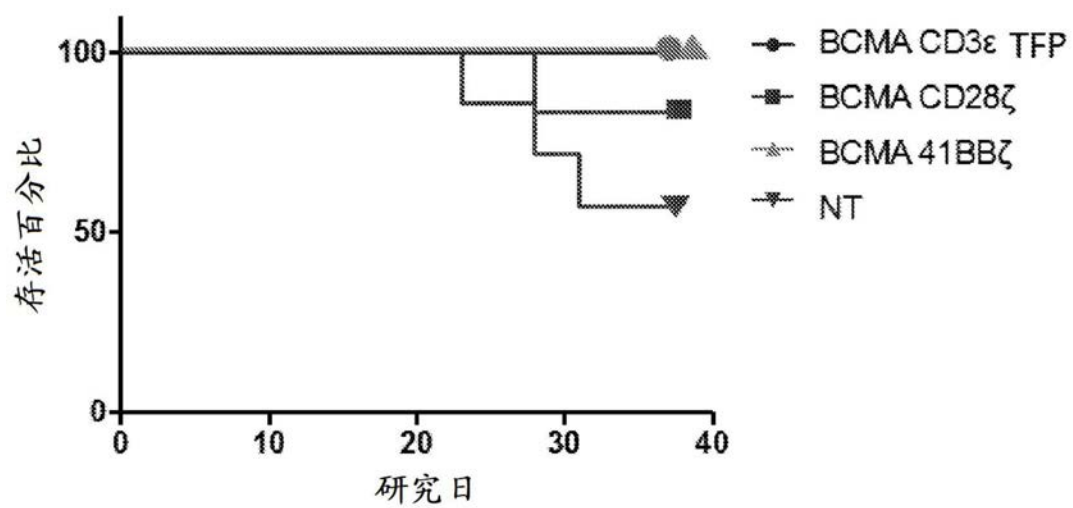


图13C