



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118878696 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 01

(21) 申请号 202410508213.9

(22) 申请日 2019.02.11

(30) 优先权数据

62/629,103 2018.02.11 US

(62) 分案原申请数据

201980025160.2 2019.02.11

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·A·布卢斯通 C·拉芬

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

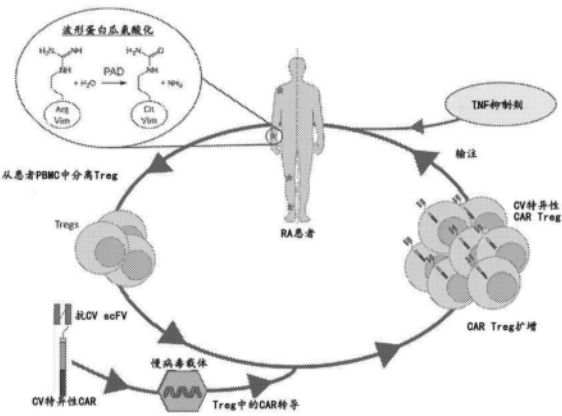
权利要求书1页 说明书56页 附图34页

(54) 发明名称

CAR-T细胞与自身免疫性疾病

(57) 摘要

本发明涉及嵌合抗原受体 (CAR)、嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T), 以及在疾病如自身免疫性疾病的治疗中的用途。本发明的实施方案部分针对特异性识别与自身免疫性疾病相关的抗原的嵌合抗原受体 (CAR)。特别地, CAR对翻译后修饰的抗原具有特异性。CAR被转导至抑制自身免疫应答或细胞毒性T细胞的T细胞中。表达嵌合抗原受体 (CAR) 的Treg特异性靶向RA患者的关节中存在的抗原, 以诱导局部化且有效的免疫抑制反应。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 所述嵌合抗原受体包含抗原特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域, 其中所述抗原特异性结合结构域特异性结合包含波形蛋白多肽或其肽的抗原。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其中所述波形蛋白多肽或其肽经翻译后修饰, 包括瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 多肽或其肽。

3. 根据权利要求1或2所述的嵌合抗原受体, 其中所述抗原特异性结合结构域包含抗体、抗体片段、骆驼科动物纳米抗体或适体。

4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体, 其中所述抗体片段是单链片段。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体, 其中所述单链片段是单链可变片段 (scFv)。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中:

a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;

b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;

c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码; 和/或;

d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中:

a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;

b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;

c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码; 和/或;

d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

9. 根据权利要求1-6中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中:

a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;

b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;

c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码; 和/或;

d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中:

a) 所述铰链结构域由SEQ ID NO:8的核酸序列编码;

b) 所述跨膜结构域由SEQ ID NO:9的核酸序列编码;

c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码; 和/或;

d) 所述CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。

CAR-T细胞与自身免疫性疾病

[0001] 本发明申请是基于申请日为2019年2月11日,申请号为201980025160.2(国际申请号为PCT/US2019/017532)、名称为“CAR-T细胞与自身免疫性疾病”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 根据35U.S.C. §119(e),本申请要求2018年2月11日提交的美国临时申请号62/629,103的优先权的权益,其通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0004] 本发明的实施方案涉及嵌合抗原受体(CAR)、嵌合抗原受体T细胞(CAR-T),以及在疾病如自身免疫性疾病的治疗中的用途。

背景技术

[0005] 传统上,抗原特异性T细胞是通过选择性扩增对靶抗原具有天然特异性的外周血T细胞产生的。然而,选择和扩增大量对大多数癌症和自身抗原具有特异性的T细胞是困难的,并且常常是不可能的。使用整合载体的基因疗法为这个问题提供了解决方案,因为嵌合抗原受体(CAR)的转基因表达允许通过大量外周血T细胞的离体病毒载体转导产生大量对任何表面抗原具有特异性的T细胞。

发明内容

[0006] 本发明的实施方案部分针对特异性识别与自身免疫性疾病相关的抗原的嵌合抗原受体(CAR)。特别地,CAR对翻译后修饰的抗原具有特异性。CAR被转导至抑制自身免疫应答或细胞毒性T细胞的T细胞,如调节性T细胞中。

[0007] 因此,在本发明的一个方面,提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含抗原特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,其中所述抗原特异性结合结构域特异性结合经修饰的多肽或其肽,包括瓜氨酸化蛋白,如瓜氨酸化细胞外基质蛋白和瓜氨酸化细胞表面蛋白。

[0008] 在本发明的第二方面,提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含抗原特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,其中所述抗原特异性结合结构域特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)多肽或其肽。

[0009] 在第三方面,本发明提供了分离的T细胞,其被修饰以表达:嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)的单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,抗原结合结构域包含抗体、抗体片段、骆驼科动物纳米抗体或适体。

[0010] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ

信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0011] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

[0012] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

[0013] 在某些实施方案中,铰链结构域由SEQ ID NO:8的核酸序列编码;跨膜结构域由SEQ ID NO:9的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。

[0014] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0015] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

[0016] 在某些实施方案中,铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

[0017] 在某些实施方案中,铰链结构域由SEQ ID NO:8的核酸序列编码;跨膜结构域由SEQ ID NO:9的核酸序列编码;CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。

[0018] 在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少50%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少75%序列同一性的CV肽。

[0019] 在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少95%序列同一性的CV肽。

[0020] 在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合包含SEQ ID NO:3或4的CV肽。

[0021] 在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少50%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少75%序列同一性的CV肽。

[0022] 在某些实施方案中,CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少95%序列同一性的CV肽。

[0023] 在某些实施方案中, CV-CAR特异性结合包含SEQ ID NO:21或22的CV肽。

[0024] 在第四方面, 本发明提供了分离的T细胞, 其被修饰以表达: 嵌合抗原受体 (CAR), 所述嵌合抗原受体包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域, 其中所述抗原结合结构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 的单链可变片段 (scFv)。在某些实施方案中, 共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码; 和/或; CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; 41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; 41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码; 和/或; 41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中, CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域; CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域; CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码; 和/或; 41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。

[0025] 在某些实施方案中, T细胞是哺乳动物调节性T细胞 (Treg)。在某些实施方案中, Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻、FOXP3⁺。

[0026] 在某些实施方案中, 表达载体编码嵌合抗原受体 (CAR)。

[0027] 在第五方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含嵌合抗原受体 (CAR)、编码嵌合抗

原受体 (CAR) 的表达载体或经修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的T细胞。

[0028] 在第六方面,本发明提供了治疗被诊断为类风湿性关节炎的受试者的方法,其包括给予经修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的T细胞,其中所述CAR特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 抗原。在某些方面,抗炎剂和/或治疗剂也被给予至受试者。在某些实施方案中,治疗被诊断为类风湿性关节炎的受试者的方法,包括从获自所述受试者的生物学样品分离T淋巴细胞;将CD4⁺T调节性细胞 (Treg) 与常规T细胞 (Tconv) 分开,其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻,并且所述Tconv是CD4⁺CD25⁻CD127⁺;用编码特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的表达载体转导所述Treg细胞;用抗CD3/CD28珠至少一次离体扩增转导的Treg,以获得对CV抗原具有特异性的扩增的Treg细胞;并将Treg重新注入受试者中,从而治疗所述受试者。在某些实施方案中,CAR包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 的单链可变片段 (scFv)。在某些实施方案中,共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。在某些实施方案中,CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0029] 在第七方面,本发明提供了嵌合抗原受体 (CAR),其中所述CAR被转导到各种类型的细胞中,包括T细胞,如调节性T细胞 (Treg)、细胞毒性T细胞 (CTL)、常规T细胞 (Tconv);免疫系统的其他类型的细胞,如自然杀伤细胞 (NK);干细胞、细胞系等。CAR包含针对特定疾病靶抗原 (如细胞外抗原、细胞表面抗原、病毒抗原、经翻译后修饰的抗原等) 产生的抗原结合结构域。

[0030] 下文描述了其他方面。

[0031] 定义

[0032] 除非另外定义,否则本文使用的所有术语 (包括技术和科学术语) 具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。还应当理解,术语 (如在常用词典中定义的那些术语) 应当被解释为具有与它们在相关领域的语境中的含义一致的含义,并且不会以理想化或过于正式的意义来解释,除非本文明确如此定义。

[0033] 如本文所用,单数形式“一种/一个” (“a”)、“一种/一个” (“an”) 和“所述” (“the”) 意图也包括复数形式,除非上下文另有明确说明。此外,就在详细说明和/或权利要求书中使用的术语“包括” (“including”)、“包括” (“includes”)、“具有” (“having”)、“具有” (“has”)、“具有” (“with”) 或其变体而言,此类术语旨在以与术语“包含” (“comprising”) 相似的方式是包含性的。

[0034] 术语“约”或“大约”意指在如通过本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,所述误差范围部分取决于如何测量或确定所述值,即测量系统的局限性。例如,

根据本领域的实践,“约”可以意指在1个或超过1个标准差内。可替代地,“约”可以意指给定值或范围的至多20%、至多10%、至多5%或至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的一个数量级以内、在值的5倍以内、以及在值的2倍以内。在本申请和权利要求书中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假设术语“约”意指在所述特定值的可接受的误差范围内。

[0035] 如本文所用,术语“亲和力”意指结合强度的量度。不受理论的束缚,亲和力取决于抗体结合位点与抗原决定簇之间的立体化学拟合的紧密度、它们之间接触区域的大小,以及带电和疏水基团的分布。亲和力还包括术语“亲合力”,其是指可逆复合物形成后抗原-抗体键的强度。用于计算抗体对抗原的亲和力的方法是本领域已知的,包括使用结合实验来计算亲和力。功能测定(例如,流式细胞术测定)中的抗体活性也反映了抗体亲和力。抗体和亲和力可以根据表型来表征并使用功能测定(例如,流式细胞术测定)加以比较。

[0036] 如本文所用,术语“药剂”意在涵盖能够预防、改善或治疗疾病或其他医学状况的任何分子、化学实体、组合物、药物、治疗剂、化学治疗剂或生物药剂。所述术语包括小分子化合物、反义寡核苷酸、siRNA试剂、抗体、带有表位识别位点的抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂片段、Fv片段)、单链抗体、抗体模拟物(如DARPin、亲和体分子、affilin、affitin、anticalin、avimer、fynomer、Kunitz结构域肽和单体(monobody))、类肽、适体;酶、肽有机或无机分子、天然或合成化合物等。可以在临床试验期间、预试验测试期间或FDA批准之后的任何阶段,根据本发明的方法测定药剂。

[0037] “改善”意指减少、抑制、减弱、减小、停止或稳定疾病的发展或进程。

[0038] 如本文所用,术语“抗体”不仅意指完整的抗体分子,而且意指抗体分子保留免疫原结合能力的片段。此类片段在本领域中也是熟知的,并且在体外和体内均常规采用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅意指完整的免疫球蛋白分子,而且是熟知的活性片段F(ab')₂和Fab。缺少完整抗体的Fc片段的F(ab')₂和Fab片段更快速地从循环中清除,并且可能具有更少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316-325(1983))。本发明的抗体包含全天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。

[0039] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的,术语“或”通常以其包括“和/或”的意义使用,除非内容清楚地另外指明。

[0040] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指与能够激活或刺激免疫细胞的细胞内信号传导结构域融合的抗原结合结构域,并且在某些实施方案中,CAR还包含跨膜结构域。在某些实施方案中,CAR的细胞外抗原结合结构域由来源于融合鼠或人源化单克隆抗体的可变重和轻区的单链可变片段(scFv)构成。可替代地,可以使用来源于Fab(而不是来源于抗体,例如获自Fab文库)的scFv。在各种实施方案中,scFv与跨膜结构域融合,然后与细胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR包括在抗原结合时仅提供CD3ζ信号的那些CAR,“第二代”CAR包括同时提供共刺激(例如,CD28或CD137)和激活(CD3ζ)的那些CAR。“第三代”CAR包括提供多重共刺激(例如CD28和CD137)和激活(CD3ζ)的那些CAR。已描述了第四代CAR,将CART细胞重定向用于细胞因子杀伤(TRUCKS),其中含有CAR构建体的载体具有细胞因子盒。当连接CAR时,CAR T细胞将促炎性细胞因子沉积到肿瘤病变中。CAR-T细胞是表达嵌合抗原受体的T细胞。如本文所用且通常在本领域中使用的短语“嵌合抗原受体(CAR)”是指重组融

合蛋白,其具有与细胞内结构域偶联的抗原特异性细胞外结构域,所述细胞内结构域引导细胞在抗原结合到细胞外结构域时执行特化功能。术语“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”和“嵌合免疫受体”在本文中各自可以与术语“嵌合抗原受体”互换使用。

[0041] 如本文所用,关于物品、组合物、装置、方法、过程、系统等限定或描述的要素,术语“包含(comprising)”、“包含(comprise)”或“包含(comprised)”及其变型意味着是包含性的或开放性的,允许另外的要素,从而表明所限定或描述的物品、组合物、装置、方法、过程、系统等包括那些指定的要素(或者,视情况,其等效物),并且可以包括其他要素并且仍然落在所限定的物品、组合物、装置、方法、过程、系统等范围/定义内。

[0042] “诊断性(diagnostic)”或“诊断(diagnosed)”意指鉴定病理状况的存在或性质。诊断方法的灵敏度和特异性不同。诊断测定的“灵敏度”是测试呈阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。所述测定未检测到的患病个体是“假阴性”。未患病且在测定中测试呈阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断测定的“特异性”是1减去假阳性率,其中“假阳性”率定义为那些未患病但检测呈阳性的个体的比例。尽管特定的诊断方法可能无法提供对病症的确定的诊断,但只要所述方法提供有助于诊断的正面指示就足够了。

[0043] “疾病”是动物的健康状态,其中动物无法维持体内平衡,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康将持续恶化。疾病的例子包括自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBM)、克罗恩氏病(CD)、强直性脊柱炎(AS)等。

[0044] 术语“铰链”或“铰链区”是指柔性连接器区域,例如天然或合成多肽,或任何其他类型的分子,从而提供结构柔性和与侧翼多肽区的间隔。

[0045] 如本文所用的“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中的独特之处在于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有效方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的例子。

[0046] 如本文所用的术语“接头”,也称为“间隔子”或“间隔子结构域”是指在本发明的融合蛋白中任选地位于两个氨基酸序列之间的氨基酸或氨基酸序列。

[0047] 免疫原性组合物的“肠胃外”给予包括例如,皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0048] 术语“患者”或“个体”或“受试者”在本文中可互换使用,并且是指待治疗的哺乳动物受试者,人患者是优选的。在一些情况下,本发明的方法可用于实验动物、兽医应用和疾病的动物模型的开发中,所述动物模型包括但不限于啮齿动物(包括小鼠、大鼠和仓鼠)和灵长类动物。

[0049] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过肽编码接头(例如,10、15、20、25个氨基酸)连接,所述肽编码接头将VH的N末端与VL的C末端连接,或将VH的C末端与VL的N末端连接。接头通常富含甘氨酸以具有柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以具有溶解性。尽管去除了恒定区并引入了接头,但scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包括VH和VL编码序列的核酸表达,如Huston等人(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)所描述。还参见,美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。已描述了具有抑制活性的拮抗性scFv(参见例如,Zhao等人,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等人,J Cachexia

Sarcopenia Muscle 2012年8月12日;Shieh等人,J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli等人,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife等人,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等人,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等人,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。已描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见例如,Peter等人,J Biol Chem 2003 278(38):36740-7;Xie等人,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等人,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等人,Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0050] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指减轻或改善障碍和/或与其相关的症状。应当理解,尽管没有排除,但治疗障碍或病症并不需要完全消除所述障碍、病症或与其相关的症状。

[0051] “载体”是包含分离的核酸并且可以用于将所述分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。载体的例子包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。所述术语还被解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0052] 本文公开的所有基因、基因名称和基因产物旨在对应于来自本文公开的组合物和方法适用的任何物种的同源物。因此,所述术语包括但不限于来自人和小鼠的基因和基因产物。应当理解,当公开来自特定物种的基因或基因产物时,本公开文本仅旨在是示例性的,并且不应解释为限制性的,除非其出现的上下文明确指出。因此,例如,对于本文公开的基因或基因产物,所述术语在一些实施方案中涉及哺乳动物核酸和氨基酸序列,旨在涵盖来自其他动物(包括但不限于其他哺乳动物、鱼类、两栖动物、爬行动物和鸟类)的同源和/或直向同源基因和基因产物。在优选的实施方案中,基因、核酸序列、氨基酸序列、肽、多肽和蛋白质是人的。术语“基因”还旨在包括变体。

[0053] 本文提供的范围应理解为是所述范围内所有值的简写。例如,范围1至50应理解为包括来自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50组成的组的任何数字、数字组合或子范围。

[0054] 除非另有说明,否则本发明的实践采用化学、分子生物学、微生物学、重组DNA、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养和转基因生物学的常规技术,所述技术都在本领域的技术范围内。参见例如,Maniatis等人,1982,Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Sambrook等人,1989,Molecular Cloning,第2版.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约);Sambrook和Russell,2001,Molecular Cloning,第3版.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约);Ausubel等人,1992,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,包括定期更新);Glover,1985,DNA Cloning(IRL Press,Oxford);Anand,1992;Guthrie和Fink,1991;Harlow和Lane,1988,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约);Jakoby和Pastan,1979;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames和S.J.Higgins编1984);Transcription And Translation(B.D.Hames和S.J.Higgins编1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized

Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., 纽约); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller 和 M.P. Calos 编, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, 第154和155卷 (Wu 等人编), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker 编, Academic Press, 伦敦, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV卷 (D.M. Weir 和 C.C. Blackwell, 编, 1986); Riott, Essential Immunology, 第6版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan 等人, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 冷泉港, 纽约, 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (第4版, Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000)。

附图说明

[0055] 图1是示出根据一些实施方案实施的过程的示意图;

[0056] 图2是示出根据一些实施方案实施以产生 (CV) -CAR Treg 的过程的示意图;

[0057] 图3是示出在患者中靶向抗原的 CV-CAR Treg 的示意图;

[0058] 图4从 BVCA1 抗体合成的单链可变片段 (scFv) 对 CV 的特异性和亲和力的评估。评估了人和鼠样品。使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。结果表明, 作为 BVCA1 抗体 (如图7所描述), BVCA1 scFv 对瓜氨酸化波形蛋白具有特异性;

[0059] 图5A、图5B. 从 BVCA1 抗体合成的单链可变片段 (scFv) 对 CV 的特异性和亲和力的评估。通过使用表面等离子体共振 (Biacore 系统) 测量解离常数 (K_D)。结果显示 (图5A) 在 BVCA1 完全人 IgG 与人 CV 肽之间的 K_D 为 10nM, 并且 (图5B) 在 BVCA1 scf 与人 CV 肽之间的 K_D 为 198nM。结果表明, 作为 BVCA1 抗体, BVCA1 scFv 对瓜氨酸化波形蛋白具有特异性;

[0060] 图6. 人和鼠波形蛋白肽 60-75 的序列的比较, 其显示所述序列高度相似, 并且在瓜氨酸化后被修饰为瓜氨酸的三个精氨酸氨基酸 (缩写为 R) 在两个物种中处于相同位置。

[0061] 图7. BVCA1 抗体对 CV 的特异性和亲和力的评估。使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。结果表明, 人和鼠的 BVCA1 抗体二者对人和鼠的瓜氨酸化波形蛋白均具有特异性;

[0062] 图8A. CV-CAR 的示意图, 其示出 CV-CAR 的结构域;

[0063] 图8B. 根据一些实施方案产生的 CV-CAR 的某些结构域的一个例子的示意图。CV-CAR 包括 α CV scFv、铰链区和跨膜基序 (TM)、共刺激结构域 (CD28 (CV.28z-CAR) 或 41BB (CV.41BBz-CAR))、CD3 ζ 。使用 CD28 的天然 TM 部分; 表皮生长因子受体的截短形式 (EGFRt) 位于待用作报告物的 C 末端中, 并通过使得能够切割 EGFRt 报告物的 T2A 肽与 CAR 序列分开。

[0064] 图9示出了引入 Treg 中的 CV 特异性 CAR 的体外产生、扩增和评估的时间线的例子;

[0065] 图10A-图10B. CAR 构建体的不同长度铰链的分析。在转导后第5天, 基于 EGFRt 的表达, 通过流式细胞术对 CV-CAR⁺Treg 进行分选。然后在存在或不存在抗 CD3/CD28 珠或 CV-肽/链霉亲和素 (CV-pep-SA) 珠的情况下, 对分选的 CV-CAR Treg 进行再刺激。图10A. 在再刺激后第3天对激活标记 CD71 和 CD25 的表达的分析。图10B. 在再刺激后第5天对细胞扩增的分析。

[0066] 图11A-图11D. 对具有不同形式的 BVCA1 scFv 的 CV-CAR 构建体的比较分析。在刺激

后第2天,用不同形式的CV-CAR构建体转导Tconv和Treg细胞。通过流式细胞术评估转导效率。示出了在细胞表面表达CAR-报告基因(图11A)和CV-CAR(图11B)的细胞的百分比。在存在不同刺激条件(仅IL-2、抗CD3/CD28珠和CV-SA珠)的情况下进行第二轮刺激后两天,通过流式细胞术分析激活标记CD69和CD71的表达(图11C和图11D);

[0067] 图12A-图12C.报告物EGFRt在Treg和Tconv中的表面表达的评估。图12A.在用不同的CAR构建体转导后第4天,通过流式细胞术评估报告物EGFRt在Treg和Tconv中的表面表达。所有供体(n=4)的数据汇总图12B.在用不同的CAR构建体转导后第4天,通过流式细胞术,报告物EGFRt在Treg和Tconv中的表面表达的代表性点图。图12C.生物素化CV肽(pep)/SA-FITC复合物的示意图。图12D.报告物EGFRt和CV-CAR在Treg中的表面表达的评估。在转导后第5天,使用与FITC(CV_{pep}-SA-FITC)和EGFRt抗体缀合的生物素化CV-肽/链霉亲和素四聚体针对CV-CAR对Treg细胞进行染色。点图代表4个独立实验;

[0068] 图13是由包被有生物素化CV肽的SADYNABEAD®形成的生物素化CV-pep-SA珠的示意图;

[0069] 图14A-图14C.对经由CV-CAR介导的信号激活产生的CV-CAR Treg的能力的评价。在通过流式细胞术富集CV特异性CAR⁺Treg后,在存在或不存在抗CD3/CD28珠或生物素化CV(CV-pep-SA)珠的情况下,对细胞进行再刺激。图14A.在第1天,对细胞聚簇的评估。图14B.在第3天,对激活标记CD71和CD25的表达评估。图14C.在再刺激后第5天测量的所有条件下,对不同CARTreg群体的扩增倍数的评估;

[0070] 图15A-图15C.在体外扩增后,对CV-CAR Treg的表型和稳定性的评估。未转导的Treg和CV-CAR Treg经历了两轮刺激,其中第二轮激活使用抗CD3/CD28珠或CV-SA珠。图15A.在第18天,通过流式细胞术评估细胞的CD25和CD127表面表达。图15B.在第18天,通过流式细胞术评估细胞的FOXP3和Helios核内表达。图15C.在用PMA/离子霉素刺激细胞4小时(最后2小时在布雷菲德菌素A存在下进行)后,对扩增的Treg的细胞因子产生谱的评估。然后固定细胞并用靶向IFN- γ 、IL-2、IL-10和IL-17的抗体染色;

[0071] 图16A-图16B.对CV-CAR T细胞在从类风湿性关节炎(RA)患者的关节收集的滑液存在下被激活的能力的评估。在具有或不具有CV-SA珠或来自RA患者的滑液的情况下,在IL-2的存在下,将表达各种CAR构建体的扩增的Treg以及未转导的Treg置于培养中。在培养3.5天后,通过流式细胞术评估CD71的表达。图16A.对CD71和EGFRt的表达的评估(点图)。红色数字(在每个图的右上角)表示EGFRt⁺级分中CD71⁺细胞的百分比。图16B.不同CAR Treg群体中EGFRt⁻和EGFRt⁺级分中CD71⁺细胞的百分比;

[0072] 图17A-图17B.慢病毒转导后CV特异性CAR在Treg表面表达的能力的评估。通过流式细胞术检测CAR(使用抗人IgG(H+L)抗体)和表皮生长因子受体(EGFRt)两者。图17A.CAR和EGFRt在未转导的Treg、CV/CD28 ζ CAR⁺Treg和CV/41BB ζ CAR⁺Treg表面的表达的评估。图17B.CAR⁺细胞在各种实验中的百分比;

[0073] 图18A-图18C.对CV-CAR T细胞在从类风湿性关节炎(RA)患者的关节收集的滑液存在下被激活的能力的评估。在具有或不具有CV-SA珠或来自3名不同RA患者的滑液(SF)或来自对照痛风患者的SF的情况下,在IL-2的存在下,将表达各种CAR构建体的扩增的Treg(19.28 ζ -CAR Treg、19.41BB ζ -CAR Treg、CV.28 ζ -CAR Treg和19.41BB ζ -CAR Treg)以及未转导的(UTD)Treg置于培养中。在培养3.5天后,通过流式细胞术评估激活标记CD71的表达。

图18A.在各种条件下共同培养后,CD71和EGFRt在CV.28 ζ -CAR Treg群体中的表达。图18B.代表性点图,其示出了在来自痛风阴性对照患者的SF或RASf的存在下,19.28 ζ -CAR Treg和CV.28 ζ -CAR Treg中针对EGFRt的CD71表达。图18C.在来自RA患者(n=4)的SF存在下共培养后,在不同CAR Treg群体中在EGFRt⁻和EGFRt⁺级分中CD71⁺细胞的百分比的汇总。

[0074] 图19.在转染后三天,通过流式细胞术评估EGFRt在HEK 293T细胞中的表达。在转染后,CV-CAR构建体在HEK 293T细胞的细胞表面处有效表达。

[0075] 图20A和图20B.在用PAD2-GFP慢病毒质粒转导后,瓜氨酸化波形蛋白在SKNBE2c肿瘤细胞系中的表达的评估。将人酶肽基精氨酸脱氨酶(PAD2)的基因插入带有GFP报告物的慢病毒载体中,然后转导到SKNBE2c细胞(一种已知在细胞表面处表达波形蛋白的肿瘤细胞系)中。图20A.在转导后三天,通过流式细胞术评估SKNBE2C细胞中的GFP表达。图20B.通过免疫荧光染色评估野生型(WT)和PAD2-GFP转导的SKNBE2C细胞中瓜氨酸化波形蛋白的存在。

[0076] 图21.通过直接ELISA检测滑液中的瓜氨酸化波形蛋白。通过ELISA评估来自RA和阴性对照痛风患者的滑液中瓜氨酸化波形蛋白的存在。瓜氨酸化和非瓜氨酸化波形蛋白分别用作阳性和阴性对照。

[0077] 图22A-图22B.在来自RA患者的无细胞滑液存在下,CV特异性CAR Treg中CAR介导的刺激评估。图22A.代表性点图,其显示了在来自RA患者的全滑液上清液或无细胞滑液上清液的存在下培养3天后,针对EGFRt的CD71表达。图22B.在与来自RA患者的全滑液或无细胞滑液共培养后,在CV.28z-CAR Treg中在EGFRt⁻和EGFRt⁺级分中CD71⁺细胞的百分比。

[0078] 图23A-图23B.TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺Treg细胞的产生。图23A.产生TCR^{KO}CV.28z-CAR⁺Treg的方案示意图。图23B.在第9天,通过流式细胞术富集后的CV.28z-CAR⁺Treg细胞纯度。顶部点图示出了在第0天未经历CRISPR/Cas9TCR敲除的细胞,而底部点图中的细胞经历了所述敲除。

[0079] 图24A-图24B.在CAR介导的刺激后CV-CAR Treg的抑制功能的评估。图24A.在板结合的抗CD3抗体和CV-pep-SA珠(CVb)的存在下,将TCR^{KO}CV.28z-CAR⁺Treg与反应CD4⁺T细胞以指示的反应细胞与抑制细胞比率共培养。在第3天添加3H-胸苷。结果显示为抑制百分比,其基于平均每分钟计数(CPM)计算,通过3H胸苷的掺入测量,在反应细胞与Treg细胞的共培养中获得,并且在单独的条件反应者中获得(实验以一式两份进行)。图24B.在板结合的抗CD3抗体和CVb或波形蛋白珠的存在下,将TCR^{KO}CV.28z-CAR⁺Treg与反应CD4⁺T细胞以比率2:1(反应者:Treg)共培养。在板结合的抗CD3抗体和CVb的存在下,将19.28z-CAR⁺Treg与CFSE标记的反应CD4⁺T细胞以比率2:1(反应者:Treg)共培养。如图24A所示分析数据。

具体实施方式

[0080] 为自身免疫性疾病提供疗法的需求尚未得到满足。例如,尚未发现治愈类风湿性关节炎的治疗。RA患者经历终生治疗,以及所有相关费用、不良的可能性和不便之处。通过本文所体现的本发明解决了这第一个尚未满足的需求,用于通过恢复适当的免疫耐受来治愈RA患者。更一般地,虽然深入研究了CAR T细胞在癌症中的使用,并在临床试验中显示出非常有希望的结果,但尚未在自身免疫性疾病或瓜氨酸化波形蛋白(CV)起作用的其他疾病状态(如肿瘤或慢性阻塞性肺疾病(COPD))中测试CAR T细胞的使用。因此,通过本文所体现

的本发明解决的第二个尚未满足的需求是通过使用Treg而不是T效应细胞来将CAR T细胞疗法应用于治疗自身免疫性疾病。

[0081] 因此,如以下实施例部分中详细描述,将嵌合抗原受体(CAR)工程化以特异性靶向名为瓜氨酸化波形蛋白(CV)的翻译后修饰的蛋白,所述蛋白在患有类风湿性关节炎(RA)的患者中的发炎关节的细胞外基质中以及在一些肿瘤细胞上表达。CV-CAR的单链可变片段(scFv)部分是从对从RA患者外周血分离的CV蛋白具有高度特异性的抗体获得的。将CV特异性scFv链插入在慢病毒载体中克隆的第二代CAR构建体中。将此CAR构建体引入T效应细胞和调节性T细胞两者中。CV-CAR Treg在CV肽四聚体存在下以及在与来自RA患者的滑液共培养时能够特异性识别其靶抗原。在识别抗原后,CAR-CV Treg在保持Treg表型的同时被激活并扩增。

[0082] 嵌合抗原受体和T细胞

[0083] 嵌合抗原受体(CAR)是工程化的跨膜嵌合蛋白,其被设计用于为T细胞赋予抗原特异性。它们是包含抗原结合区、跨膜区和细胞内信号传导区的重组受体。

[0084] 通常,产生了CV-CAR Treg,以用于开发针对RA患者的细胞疗法。参见例如图2。采取的治疗方法是通过对血液样品分离细胞来使用患者的Treg(自体)。然后,使用携带CV-CAR转基因的慢病毒载体对分离的Treg进行基因再工程化。CV-CAR Treg在体外经历了两轮扩增,然后结合或不结合抗TNF治疗输注至患者,以优化Treg在疾病部位的效率。参见例如图1。

[0085] 被CV-CAR靶向的抗原是经翻译后修饰的抗原,并且结合蛋白质的瓜氨酸化形式,但不结合其天然形式。CV-CAR是所开发的靶向瓜氨酸化抗原的第一种CAR。在实施例部分中描述的结果表明,靶向经翻译后修饰的抗原的CAR可以成功地识别其靶标并激活细胞,从而提供证据证明,经翻译后修饰的抗原在自身免疫性障碍和甚至某些癌症的新治疗策略的开发中代表非常令人感兴趣的治疗工具。此外,这种CAR靶向由一些细胞分泌至多聚复合物中的细胞外基质蛋白,这可能代表CAR的新用途。瓜氨酸化波形蛋白(CV)存在于患有类风湿性关节炎(RA)的患者中的发炎关节的细胞外基质中,并在一些肿瘤细胞上表达。波形蛋白是III型中间丝蛋白,并且其瓜氨酸化形式大量存在于关节微环境中。CV表达仅限于健康个体中的人脾脏、胎盘。50%的RA患者的滑膜组织中存在大量CV。参见例如图3。

[0086] 因此,在某些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)包含抗原特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,其中所述抗原特异性结合结构域特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)多肽或其肽。CV多肽或其肽经翻译后修饰。在某些实施方案中,共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。在某些实施方案中,抗原特异性结合结构域包含抗体、抗体片段或适体。在某些实施方案中,抗体片段是单链片段。例如,单链片段是单链可变片段(scFv)。

[0087] 在某些实施方案中,对瓜氨酸化波形蛋白(CV)多肽或肽具有特异性的嵌合抗原受体包含SEQ ID NO:1或2。

[0088] 在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:1所示核酸序列具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:1所示核酸序列具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:1所

示核酸序列具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由包含SEQ ID NO:1的核酸序列编码。

[0089] 在一些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体具有与SEQ ID NO:1具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。

[0090] 在其他实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:2所示核酸序列具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:2所示核酸序列具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:2所示核酸序列具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由包含SEQ ID NO:2的核酸序列编码。

[0091] 在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体具有与SEQ ID NO:2具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。

[0092] 在某些实施方案中,对瓜氨酸化波形蛋白(CV)多肽或肽具有特异性的嵌合抗原受体包含一种或多种由SEQ ID NO:1或2或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体编码的嵌合抗原受体组分(例如,CV特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或CD3 ζ 信号传导结构域)。例如,在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含由SEQ ID NO:1或2编码的抗CV scFv,如由SEQ ID NO:7或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体的核酸序列编码的scFv。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含由SEQ ID NO:1或2编码的人CD28间隔子结构域,如由SEQ ID NO:8或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体的核酸序列编码的人CD28间隔子结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含由SEQ ID NO:1或2编码的CD28跨膜结构域,如由SEQ ID NO:9或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体的核酸序列编码的CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含由SEQ ID NO:1或2编码的CD3 ζ 信号传导结构域,如由SEQ ID NO:10或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体的核酸序列编码的CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含由SEQ ID NO:1或2编码的共刺激结构域,如由SEQ ID NO:11或12或与其具有至少约70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的变体的核酸序列编码的共刺激结构域。

[0093] 在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:1所示核酸序列具有至少50%序列同一性的核酸序列(如SEQ ID NO:5的核酸序列)编码。因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:5具有至少50%(如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28

共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:5所示核酸序列具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:5所示核酸序列具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由包含SEQ ID NO:5的核酸序列编码。

[0094] 在一些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:5具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列编码。

[0095] 在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:13具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:13具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:13具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:13具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0096] 在其他实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:2所示核酸序列具有至少50%序列同一性的核酸序列 (如SEQ ID NO:6的核酸序列) 编码。因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:6具有至少50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:6所示核酸序列具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:6所示核酸序列具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由包含SEQ ID NO:6的核酸序列编码。

[0097] 在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:6具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的核酸序列编码。

[0098] 在某些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:14具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:14具有至少约80%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:14具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:14具有至少约95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0099] 在某些实施方案中,CAR包含一个或多个共刺激结构域,所述共刺激结构域包括:CD28、ICOS、OX-40或41BB。除本文指定的其他区域之外,本发明的CAR或细胞的细胞内信号传导区域还可以包含来自这些蛋白质中的一个、两个、三个、四个或全部五个的信号传导区域。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11或其与SEQ ID NO:11具有至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者) 序列同一性的变体

的核酸序列编码。在一些实施方案中,CD28共刺激结构域具有SEQ ID NO:19或与其与SEQ ID NO:19具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的变体的氨基酸序列。在一些实施方案中,41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12或与其与SEQ ID NO:12具有至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者) 序列同一性的变体的核酸序列编码。在一些实施方案中,41BB共刺激结构域具有SEQ ID NO:20或与其与SEQ ID NO:20具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的变体的氨基酸序列。

[0100] 本发明的CAR或细胞的共刺激结构域可以包含来自41BB和CD28两者的共刺激结构域。41BB共刺激结构域可以在CD28共刺激结构域的下流。

[0101] 在某些实施方案中,CAR包含CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10或与其与SEQ ID NO:10具有至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者) 序列同一性的变体的核酸序列编码。在一些实施方案中,CD3 ζ 信号传导结构域具有SEQ ID NO:18或与其与SEQ ID NO:18具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的变体的氨基酸序列。

[0102] 在某些实施方案中,CAR包含来自CD28的跨膜结构域。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域由SEQ ID NO:9或与其与SEQ ID NO:9具有至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者) 序列同一性的变体的核酸序列编码。在一些实施方案中,CD28跨膜结构域具有SEQ ID NO:17或与其与SEQ ID NO:17具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的变体的氨基酸序列。

[0103] CAR还可以包含位于抗原结合区与T细胞质膜之间的间隔子或铰链区。通常,间隔子或铰链是来源于IgG亚类IgG1、IgG4、IgD或CD8的序列。在某些实施方案中,铰链区包含CD28基序。铰链区可以具有任何长度。在一些实施方案中,铰链区包含1个氨基酸或10个氨基酸或20个氨基酸或50个氨基酸或60个氨基酸或70个氨基酸或80个氨基酸或100个氨基酸或120个氨基酸或140个氨基酸或160个氨基酸或180个氨基酸或200个氨基酸或250个氨基酸或300个氨基酸或它们之间的任何数量。在一些实施方案中,间隔子由SEQ ID NO:8或与其与SEQ ID NO:8具有至少约50% (如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者) 序列同一性的变体的核酸序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:16或与其与SEQ ID NO:16具有至少约70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的变体的氨基酸序列。

[0104] CAR可以进一步包含接头区。该接头区可以富含甘氨酸以具有柔性。接头区可以富含丝氨酸和苏氨酸以具有溶解性。接头区可以连接至可变重链(VH)的N末端与可变轻链(VL)的C末端,反之亦然。

[0105] 抗原结合结构域

[0106] 在某些实施方案中,抗原结合结构域是或包含抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述抗体是人抗体,包括已知结合靶分子的任何抗体。本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体、骆驼科动物纳米抗体)或片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化和/或以其他方式修饰的形式,如细胞内抗体、肽抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和异源缀合抗体、多特异性抗体(例如双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二scFv、串联三scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0107] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是其片段的人源化抗体。“人源化”抗体是这样的抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基来源于非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基来源于人FR。人源化抗体任选地可以包括来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指所述非人抗体的变体,其经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0108] 在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,尤其选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别地,IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,抗体轻链恒定区选自例如κ或λ,特别是κ。

[0109] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域V_H单抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0110] 当关于抗体(如抗体片段)使用时,术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版.,W.H.Freeman和Co.,第91页(2007)。单个V_H或V_L结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的V_H或V_L结构域来分离,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0111] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0112] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,如包含并非天然存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些),和/或可能并非通过酶消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些方面,抗体片段是 scFv。

[0113] 在某些实施方案中,CAR的抗体或抗体片段对特定靶抗原或经翻译后修饰的靶抗原具有高结合亲和力。在实施方案中,增加的结合亲和力大于通过参考抗原所实现的亲和力。

[0114] 在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少50%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少75%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:3或4具有至少95%序列同一性的CV肽。

[0115] 在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少50%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少75%序列同一性的CV肽。在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少95%序列同一性的CV肽。

[0116] 在某些实施方案中,嵌合抗原特异性结合CV肽。

[0117] T细胞:调节性T细胞(Treg)在维持免疫细胞稳态方面是重要的,如由Treg群体的遗传或物理消除的灾难性后果所证明。具体地,Treg细胞通过对其他免疫细胞实施显性负调节来维持免疫系统的秩序。广义上分为天然或适应性(诱导)Treg;天然Treg是CD4⁺CD25⁺T细胞,它们从胸腺发育并迁移,以在免疫稳态中发挥其关键作用。适应性Treg是非调节性CD4⁺T细胞,其可在胸腺外获得CD25(IL-2R α)表达,并且通常由炎症和疾病过程(如自身免疫和癌症)诱导。

[0118] 越来越多的证据表明,Treg通过多种机制表现其功能,这些机制包括分泌免疫抑制性可溶性因子(如IL-9、IL-10和TGF β)、经由高亲和力TCR和其他共刺激分子(如CTLA-4、GITR)进行细胞接触介导的调节、和细胞溶解活性。在TGF β 的影响下,适应性Treg细胞从CD4⁺Treg前体在外周部位(包括粘膜相关淋巴组织(MALT))中成熟,在那里它们获得Treg的典型标记(包括CD25、CTLA4和GITR/AITR)的表达。在转录因子Foxp3上调后,Treg细胞开始发挥其抑制作用。这包括分泌细胞因子(包括IL-10和TGF β),这些因子可以诱导效应T细胞的细胞周期停滞或细胞凋亡,并阻断树突细胞的共刺激和成熟。

[0119] 活的Treg细胞的分离

[0120] 在以下实施例部分中详细提供了用于分离Treg细胞的程序。

[0121] 通常,最初将T调节性细胞鉴定为具有抑制免疫应答的能力的CD4⁺CD25⁺T细胞群体。将Foxp3鉴定为Treg的“主调节因子”是将Treg定义为独特的T细胞谱系的关键步骤。Treg表面上其他抗原标记的鉴定使得能够鉴定活Treg并进行FACS分选达至更高的纯度,从而产生更高度富集和抑制性的Treg群体。除CD4和CD25之外,现在已知小鼠和人类Treg两者均表达GITR/AITR、CTLA-4,但仅表达低水平的CD127(IL-7R α)。此外,Treg可以以不同的状态存在,这些状态可以基于其表面标记的表达来鉴定。在胸腺中由CD4⁺胸腺细胞发育而来的Treg被称为“天然”Treg,然而Treg也可以在外周响应于TCR、TGF β 和IL-2的低剂量接合从

幼稚CD4⁺T细胞来诱导。这些“诱导的”Treg分泌免疫抑制性细胞因子IL-10。Treg的表型随着它们被激活而再次改变,并且已经显示包括小鼠和人的GARP以及小鼠的CD103的标记可用于鉴定激活的Treg。CD45RO和CD45RA仅由人CD4细胞的不同亚组表达,并且可以用于将人CD4⁺FoxP3⁺T细胞分为表型和功能不同的三个亚群:CD45RA⁺CD25⁺FoxP3^低静息Treg细胞和CD45RO⁺CD25^高FoxP3^高激活的Treg细胞,这两种细胞在体外均具有抑制性,以及产生促炎细胞因子的CD45RO⁺CD25⁺FoxP3^低非抑制性效应T细胞(Teff)。

[0122] 因此,在某些实施方案中,分离的T细胞被修饰以表达:嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)的单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体具有与SEQ ID NO:1具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体具有与SEQ ID NO:2具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体包含一种或多种由与SEQ ID NO:5具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列编码的CAR组分(例如,CV特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或CD3 ζ 信号传导结构域)。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体包含一种或多种CAR组分(例如,CV特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或CD3 ζ 信号传导结构域),所述CAR组分选自与SEQ ID NO:13具有至少70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体包含一种或多种由与SEQ ID NO:6具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列编码的CAR组分(例如,CV特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或CD3 ζ 信号传导结构域)。在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体包含一种或多种CAR组分(例如,CV特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和/或CD3 ζ 信号传导结构域),所述CAR组分选自与SEQ ID NO:14具有至少70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:5具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列编码。在某些实施方案中,包含CD28共刺激结构域的嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO:13具有至少70%(如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体由与SEQ ID NO:6具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的核酸

序列编码。在一些实施方案中,包含41BB共刺激结构域的嵌合抗原受体包含与SEQ ID NO: 14具有至少70% (如至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高) 序列同一性的氨基酸序列。

[0123] 在某些实施方案中,所述T细胞是哺乳动物调节性T细胞(Treg),其中所述Treg细胞是CD4⁺、CD25⁺、CD127⁻、FOXP3⁺和/或Helios^{+/+}。在其他实施方案中,所述T细胞是哺乳动物调节性T细胞(Treg),其中所述Treg细胞是CD4⁺、CD25⁺、CD127⁻和/或FOXP3⁺。

[0124] 细胞分离的方法

[0125] 可以使用本领域已知的任何数量的方法来分离细胞,如Treg,或可以用于进行受试者治疗的任何其他细胞类型。因此,还提供了表达嵌合抗原受体例如CAR的各种其他基因工程化细胞。所述细胞通常是真核细胞,如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞来源于血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如髓样或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,通常是T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导的多能干细胞(iPSC)。所述细胞通常是原代细胞,如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些。在一些实施方案中,所述细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如全T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,如依据以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位、和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌谱、和/或分化程度。关于待治疗的受试者,所述细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现成的技术,所述细胞是多能的和/或多潜能的,如干细胞,如诱导的多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者中分离细胞,对其进行制备、加工、培养和/或工程化,如本文所述,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0126] T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群包括幼稚T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(T_{SCMX})、中枢记忆T(T_{CM}),效应记忆T(T_{EM})或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞(如T_H1细胞、T_H2细胞、T_H3细胞、T_H17细胞、T_H9细胞、T_H22细胞、滤泡辅助T细胞)、α/βT细胞和δ/γT细胞。

[0127] 在一些实施方案中,所述细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,所述细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0128] 在一些实施方案中,所述细胞包括经由基因工程化引入的一种或多种核酸,从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,如并非在自然界中发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0129] 在以下实施例部分中描述了分离细胞和用CAR工程化这些细胞的示例性方法。

[0130] 在一些实施方案中,工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于

引入CAR的细胞可以从样品(如生物样品,例如获自或源自受试者的样品)中分离。在一些实施方案中,分离出所述细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其给予细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,细胞被分离、加工和/或工程化用于所述过继细胞疗法)的人。

[0131] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及从一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)得到的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括源自它们的加工样品。

[0132] 在一些方面,从其衍生或分离细胞的样品是血液或源自血液的样品,或者是或来源于单采术或白细胞单采术产物。示例性的样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如,过继性细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0133] 在一些实施方案中,细胞来源于细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞获自异种来源,例如获自小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。

[0134] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或非基于亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、富集所需组分、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0135] 在一些例子中,例如通过单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,样品含有淋巴细胞(包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞)、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0136] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如如不含 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将细胞直接重悬于培养基中。

[0137] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0138] 在一些实施方案中,分离方法包括基于一种或多种特定分子(如表面标记(例如表面蛋白)、细胞内标记或核酸)在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用基于此类标记的任何已知分离方法。在一些实施方案中,分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,分离包括基于一种或多种标记(通常为细胞表面标记)的细胞表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过以下方式来进行:与特异性

结合此类标记的抗体或结合配偶体一起孵育,随后通常进行洗涤步骤,并分离已结合抗体或结合配偶体的细胞与未结合抗体或结合配偶体的那些细胞。

[0139] 此类分离步骤可以基于阳性选择,其中保留结合试剂的细胞以供进一步使用;和/或基于阴性选择,其中保留未结合抗体或结合配偶体的细胞。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在没有抗体可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由与所需群体不同的细胞表达的标记来进行分离。

[0140] 分离不需要导致特定细胞群或表达特定标记的细胞的100%富集或去除。例如,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0141] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经历另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(各自对被靶向用于阴性选择的标记具有特异性)一起孵育来进行。同样地,可以通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育对多种细胞类型同时进行阳性选择。例如,在一些方面,T细胞的特定亚群,如对一种或多种标记(例如 $CD4^+$ 、 $CD25^+$ 、 $CD127^-$ 、 $FOXP3^+$ 和/或Helios⁺)呈阳性或表达所述标记的细胞。

[0142] 通过阳性或阴性选择技术分离T细胞。例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)对 $CD3^+$ 、 $CD28^+$ T细胞进行阳性选择。

[0143] 在一些实施方案中,通过阳性选择富集特定细胞群,或通过阴性选择耗尽特定细胞群来进行分离。在一些实施方案中,通过以下方式来完成阳性或阴性选择:将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育,所述一种或多种抗体或其他结合剂特异性结合分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标记“1”)或以相对较高水平表达(标记“1”^高)的一种或多种表面标记。

[0144] 在一些实施方案中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记如CD 14的阴性选择,从PBMC样品分离T细胞。在一些方面, $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 选择步骤用于分离 $CD4^+$ 辅助T细胞和 $CD8^+$ 细胞毒性T细胞。可以通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记的阳性或阴性选择,将此类 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 群体进一步分选为亚群。

[0145] 在一些实施方案中,将 $CD8^+$ 细胞针对幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞进行进一步富集或耗尽,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择来进行。在一些实施方案中,进行针对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集以在给予后增加功效,如以改善长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012)Blood.1:72-82;Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富含 T_{CM} 的 $CD8^+$ T细胞和 $CD4^+$ T细胞进一步增强功效。

[0146] 在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、

CD28、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达；在一些方面，它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。

[0147] 在一些方面，基于CD4表达的选择步骤用于产生CD4⁺细胞群或亚群，使得保留来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分二者并将其用于所述方法的后续步骤中，任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后进行。

[0148] 在一个例子中，使PBMC样品或其他白细胞样品经历CD4⁺细胞的选择，其中保留了阴性和阳性两种级分。然后使阴性部分经历基于例如CD14和CD45RA的表达的阴性选择，以及基于中枢记忆T细胞的特征性标记（如CD62L或CCR7）的阳性选择，其中所述阳性和阴性选择以任一顺序进行。

[0149] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群，将CD4⁺T辅助细胞分选为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可以通过标准方法获得。在一些实施方案中，幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45R0⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方案中，中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45R0⁺。

[0150] 在一个例子中，为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞，单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中，抗体或结合配偶体与固体支持物或基质（如磁珠或顺磁珠）结合，以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择。例如，在一些实施方案中，使用免疫磁性（或亲和磁性）分开技术来分开或分离细胞和细胞群（综述于以下文献中：Methods in Molecular Medicine, 第58卷：Metastasis Research Protocols, 第2卷：Cell Behavior In Vitro and In Vivo, 第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编©Humana Press Inc., 新泽西州托托瓦）。

[0151] 在一些方面，将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料（如磁响应颗粒或微粒，如顺磁珠（例如，如Dynabeads或MACS珠））一起孵育。磁响应材料（例如，颗粒）通常直接或间接地附着至结合配偶体（例如，抗体），所述结合配偶体特异性结合希望分离（例如，希望阴性或阳性选择）的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子（例如，表面标记）。

[0152] 在一些实施方案中，磁性颗粒或磁珠包含与特异性结合成员（如抗体或其他结合配偶体）结合的磁响应材料。有许多熟知的在磁分离方法中使用的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday的美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中描述的那些，所述文献通过引用特此并入。胶体大小的颗粒（如在Owen的美国专利号4,795,698和Liberti等人的美国专利号5,200,084中描述的那些）是其他例子。

[0153] 孵育通常在这样的条件下进行，在所述条件下，附着于磁性颗粒或磁珠的抗体或结合配偶体或特异性结合此类抗体或结合配偶体的分子（如二抗或其他试剂）特异性结合细胞表面分子（如果存在于样品内的细胞上）。

[0154] 在一些方面，将样品置于磁场中，并且附着有磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体上并与未标记的细胞分离。对于阳性选择，保留被吸引到磁体上的细胞；对于阴性选择，保留未被吸引的细胞（未标记的细胞）。在一些方面，在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合，其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或进行进一步的分离步骤。

[0155] 在某些实施方案中，将磁响应颗粒包被在一抗或其他结合配偶体、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中，磁性颗粒经由对一种或多种标记具有特异性的一

抗包衣附着于细胞。在某些实施方案中,将细胞而不是珠用一抗或结合配偶体标记,并且然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗或生物素化的肽结合使用。

[0156] 在一些实施方案中,使磁响应颗粒保持附着于细胞,所述细胞随后待进行孵育、培养和/或工程化;在一些方面,使颗粒保持附着于用于给予至患者的细胞。在一些实施方案中,从细胞去除可磁化或磁响应颗粒。用于从细胞去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0157] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本市)进行的。磁激活细胞分选(MACS)系统能够对附着有磁化颗粒的细胞进行高纯度选择。在某些实施方案中,MACS以如下模式操作:其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶和靶种类。即,将附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而将未附着的种类洗脱。然后,在此第一洗脱步骤完成之后,以某种方式释放被困在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,对非靶细胞进行标记并从异质细胞群中去除。

[0158] 在某些实施方案中,使用进行所述方法的分离、细胞制备、分离、加工、孵育、培养和/或配制步骤中的一个或多个的系统、装置或设备来进行分离或分开。在一些方面,使用所述系统在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如,以使误差、用户操作和/或污染降至最低。在一个例子中,所述系统是如国际专利申请公开号W0 2009/072003或US20110003380 A1中所述的系统。

[0159] 在一些实施方案中,所述系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动化或可编程方式进行分离、加工、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0160] 在一些方面,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤,例如用于在封闭和无菌系统中以临床规模水平自动分离细胞。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,集成计算机控制仪器的所有部件,并引导系统以标准化顺序执行重复的程序。在一些方面,磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保经过系统的缓冲液的受控流动和细胞的持续悬浮。

[0161] 在一些方面,CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,所述颗粒在无菌、无热原的溶液中供应。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤细胞以去除过多颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,又将管组连接到装有缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,系统将细胞样品自动上样到分离柱上。标记的细胞被保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤被去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文所述的方法一起使用的细胞群在去

除磁场后从柱中洗脱,并且收集在细胞收集袋内。

[0162] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞加工单元,其允许自动化洗涤和通过离心来分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载摄像头和图像识别软件,其通过识别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。例如,可以将外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成的细胞培育室,所述细胞培育室完成细胞培养方案,如例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可以允许培养基的无菌去除和补充,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如,Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82,以及Wang等人(2012) *Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0163] 在一些实施方案中,经由流式细胞术收集和富集(或耗尽)本文所述的细胞群,在流式细胞术中针对多种细胞表面标记染色的细胞被载携于流体流中。在一些实施方案中,经由制备规模(FACS)分选收集和富集(或耗尽)本文所述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗尽)本文所述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573;和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376)。在两种情况下,可以用多种标记来标记细胞,从而允许以高纯度分离明确限定的T细胞亚组。

[0164] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测的标记来标记抗体或结合配偶体,以促进用于阳性和/或阴性选择的分离。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具有特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞是在流体流中进行,如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞术检测系统组合。此类方法允许同时基于多种标记进行阳性和阴性选择。

[0165] 在一些实施方案中,所述制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,冷冻和后续解冻步骤去除细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻介质。然后将其用介质1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将细胞以1°/分钟的速率冷冻至80°C,并储存在液氮储罐的气相中。

[0166] 在一些实施方案中,所提供的方法包括培育、孵育、培养和/或基因工程化步骤。例如,在一些实施方案中,提供了孵育耗尽的细胞群和培养起始组合物和/或将它们工程化的方法。

[0167] 因此,在一些实施方案中,在培养起始组合物中孵育细胞群。所述孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或用于培养或培育细胞的其他容器。

[0168] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与基因工程化结合来孵育和/或培养细胞。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育组合物或细胞。此类条件包括针对以下而设计的那些条件:诱导群体

中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露,和/或引发细胞用于基因工程化(如用于引入重组抗原受体)。

[0169] 所述条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和设计用于激活细胞的任何其他试剂))。

[0170] 在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种药剂(例如配体)。在一些方面,所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括抗体,如对TCR具有特异性的那些抗体,例如抗CD3。在一些实施方案中,刺激条件包括能够刺激共刺激受体的一种或多种药剂,例如配体,例如抗CD28。在一些实施方案中,此类药剂和/或配体可以与固体支持物如珠和/或一种或多种细胞因子结合。任选地,扩增方法还可以包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些方面,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0171] 在一些方面,根据多种技术进行孵育,所述技术如描述于以下文献中的那些:Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9):651-660;Terakura等人(2012) *Blood*. 1:72-82;和/或Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9):689-701。

[0172] 在一些实施方案中,通过以下方式扩增T细胞:向培养起始组合物中添加饲养细胞,如非分裂外周血单核细胞(PBMC)(例如,使得对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞);并且孵育培养物(例如,持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可以包含 γ 辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用在约3000至3600拉德范围内的 γ 射线来辐照PBMC以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加到培养基中。

[0173] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常至少约30摄氏度,并且通常在或在约37摄氏度。任选地,孵育可以还包括添加非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的 γ 射线辐照LCL。在一些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0174] 治疗方法

[0175] 在某些实施方案中,治疗被诊断为类风湿性关节炎的受试者的方法,包括从获自所述受试者的生物学样品分离T淋巴细胞;将CD4⁺T调节性细胞(Treg)与常规T细胞(Tconv)分开,其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻,并且所述Tconv是CD4⁺CD25⁻CD127⁺;用编码特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)抗原的嵌合抗原受体(CAR)的表达载体转导所述Treg细胞;用CV抗原至少一次离体刺激转导的Treg,以获得对CV抗原具有特异性的Treg细胞;并将Treg重新注入受试者中,从而治疗所述受试者。在某些实施方案中,Treg细胞是自体细胞。CAR-T细胞可以从本领域已知的任何合适的T细胞来源产生,包括但不限于从受试者收集的T细胞。受试者可以是需要CAR-T细胞疗法的患有自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)的患者,或者是与需要CAR-T细胞疗法的患有自身免疫性疾病的受试者相同物种的受试者。在用CAR转导以产生CAR-T细胞之前,可以使用本领域公知的方法离体扩增收集的T细胞。

[0176] 瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 抗原也与肿瘤和COPD相关,因此,在某些实施方案中,治疗肿瘤或慢性阻塞性肺病 (COPD) 的方法包括从获自所述受试者的生物学样品分离T淋巴细胞;将CD4⁺T调节性细胞 (Treg) 与常规T细胞 (Tconv) 分开,其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻,并且所述Tconv是CD4⁺CD25⁻CD127⁺;用编码特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的表达载体转导所述Treg细胞;用CV抗原至少一次离体刺激转导的Treg,以获得对CV抗原具有特异性的Treg细胞;并将Treg重新注入受试者中,从而治疗所述受试者。在某些实施方案中,Treg细胞是自体细胞。CAR-T细胞可以从本领域已知的任何合适的T细胞来源产生,包括但不限于从受试者收集的T细胞。

[0177] 用于CAR设计、递送和在T细胞中的表达以及临床级CAR-T细胞群的制造的方法是本领域已知的。参见例如, Lee等人, Clin. Cancer Res. 2012, 18(10):2780-90, 其通过引用以其全文特此并入。例如, 可以使用逆转录病毒将工程化CAR引入T细胞中, 所述逆转录病毒有效且稳定地将编码嵌合抗原受体的核酸序列整合到靶细胞基因组中。在以下实施例部分中描述了使用慢病毒载体的示例性方法。

[0178] CAR可以由载体编码和/或包含在一种或多种递送媒介物和配制品中,如下文详细描述。

[0179] 本领域已知的其他方法包括但不限于慢病毒转导、基于转座子的系统、直接RNA转染和CRISPR/Cas系统 (例如, 使用合适的Cas蛋白 (如Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (或CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (或CasA)、Cse2 (或CasB)、Cse3 (或CasE)、Cse4 (或CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966等) 的I型、II型或III型系统)。

[0180] 载体可以包括例如复制起点、支架附着区 (SAR) 和/或标记。标记基因可以在宿主细胞上赋予可选择的表型。例如, 标记可以赋予杀生物剂抗性, 如对抗生素 (例如, 卡那霉素、G418、博来霉素或潮霉素) 的抗性。表达载体可以包括标签序列, 所述标签序列被设计为促进操纵或检测 (例如, 纯化或定位) 所表达多肽。标签序列, 如绿色荧光蛋白 (GFP)、谷胱甘肽S-转移酶 (GST)、聚组氨酸、c-myc、血凝素或FLAGTM标签 (Kodak, New Haven, CT) 序列通常表示为与所编码多肽的融合体。此类标签可以插入多肽内的任何地方, 包括在羧基末端或氨基末端处。另一个例子是EGFRt报告物和可自我切割的T2A序列, 所述T2A序列被切割以产生缺少EGFRt蛋白的CAR。在一些实施方案中, 不需要EGFRt。

[0181] 另外的表达载体还可以包括例如染色体、非染色体和合成DNA序列的区段。合适的载体包括SV40的衍生物和已知的细菌质粒, 例如大肠杆菌 (E. coli) 质粒col E1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX、pMB9及其衍生物, 质粒如RP4; 噬菌体DNA, 例如噬菌体1的许多衍生物, 例如NM989, 以及其他噬菌体DNA, 例如M13和丝状单链噬菌体DNA; 酵母质粒, 如2 μ 质粒或其衍生物, 在真核细胞中有用的载体, 如在昆虫或哺乳动物细胞中有用的载体; 来源于质粒和噬菌体DNA的组合物, 如经修饰以采用噬菌体DNA或其他表达控制序列的质粒。

[0182] 几种递送方法可以与分离的核酸序列结合用于体外 (细胞培养) 和体内 (动物和患者) 系统。在一个实施方案中, 可以利用慢病毒基因递送系统。这种系统提供基因在分裂和非分裂细胞中的稳定长期存在, 以及广泛向性和用于大DNA插入物的容量。(Dull等人, J

Virology, 72:8463-8471, 1998)。在一实施方案中,可以利用腺相关病毒(AAV)作为递送方法。AAV是非致病性的单链DNA病毒,近年来已被积极地用于在体外和体内系统中递送治疗性基因(Choi等人, Curr Gene Ther, 5:299-310, 2005)。AAV包括血清型1至9。非病毒递送方法的例子可以利用纳米颗粒技术。此平台已经显示了作为体内药物的实用性。纳米技术改善了药物穿过紧密的上皮和内皮屏障的转胞吞作用。它以特定的方式提供其有效载荷到细胞和组织的靶向递送(Allen和Cullis, Science, 303:1818-1822, 1998)。

[0183] 载体还可以包括调节区。术语“调节区”是指影响转录或翻译起始和速率以及转录或翻译产物的稳定性和/或迁移率的核苷酸序列。调节区包括但不限于启动子序列、增强子序列、反应元件、蛋白质识别位点、诱导型元件、蛋白质结合序列、5'和3'非翻译区(UTR)、转录起始位点、终止序列、聚腺苷酸化序列、核定位信号和内含子。

[0184] 术语“可操作地连接”是指调节区和待转录的序列在核酸中的定位,以便影响这种序列的转录或翻译。例如,为了使编码序列处于启动子的控制下,多肽的翻译阅读框的翻译起始位点通常位于启动子下游的一至约五十个核苷酸之间。然而,启动子可以位于翻译起始位点上游的多达约5,000个核苷酸或转录起始位点上游的多达约2,000个核苷酸处。启动子通常至少包含核心(基础)启动子。启动子还可以包括至少一个控制元件,如增强子序列、上游元件或上游激活区(UAR)。待包括的启动子的选择取决于几个因素,包括但不限于效率、选择性、诱导性、所希望表达水平和细胞或组织优先表达。通过适当地选择启动子和其他调节区以及相对于编码序列适当地定位来调节编码序列的表达是本领域技术人员的常规工作。

[0185] 载体包括,例如,病毒载体(如腺病毒Ad、AAV、慢病毒和水疱性口炎病毒(VSV)和逆转录病毒)、脂质体和其他含脂质的复合物,以及能够介导将多核苷酸递送至宿主细胞的其他大分子复合物。载体还可以包含其他组分或功能,所述组分或功能进一步调节基因递送和/或基因表达,或以其他方式为靶细胞提供有益的特性。如下文更详细描述和说明的,此类其他组分包括例如影响对细胞的结合或靶向的组分(包括介导细胞类型特异性结合或组织特异性结合的组分);影响细胞对载体核酸的摄取的组分;影响摄取后细胞内多核苷酸的定位的组分(如介导核定位的因子);和影响多核苷酸的表达的组分。此类组分还可以包括标记,如可以用于检测或选择已经吸收并正在表达通过载体递送的核酸的细胞的可检测和/或可选择标记。此类组分可以作为载体的天然特征来提供(如使用某些病毒载体,其具有介导结合和摄取的组分或功能),或者载体可以被修饰以提供此类功能。其他载体包括由Chen等人;BioTechniques, 34:167-171 (2003)描述的那些。众多种此类载体是本领域已知的并且通常是可用的。“重组病毒载体”是指包含一种或多种异源基因产物或序列的病毒载体。由于许多病毒载体展现出与包装相关的大小限制,因此异源基因产物或序列通常通过替代病毒基因组的一个或多个部分来引入。此类病毒可能变为复制缺陷性,在病毒复制和衣壳化期间需要反式提供缺失的一种或多种功能(通过使用例如携带复制和/或衣壳化所需基因产物的辅助病毒或包装细胞系)。已描述了经修饰的病毒载体,其中待递送的多核苷酸被携带在病毒颗粒的外部(参见例如,Curie, D. T等人PNAS 88:8850-8854, 1991)。

[0186] 另外的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括Moloney鼠白血病病毒和基于HIV的病毒。一种基于HIV的病毒载体包含至少两个载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组,并且env基因来自另一种病毒。DNA病毒载体包括痘病毒载体,如正

痘病毒或禽痘病毒载体;疱疹病毒载体,如单纯疱疹I型病毒(HSV)载体[Geller,A.I.等人,J.Neurochem,64:487(1995);Lim,F.等人,in DNACloning:Mammalian Systems,D.Glover,编(Oxford Univ.Press,Oxford England)(1995);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.:90 7603(1993);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci USA:87:1149(1990)];腺病毒载体[LeGal LaSalle等人,Science,259:988(1993);Davidson等人,Nat.Genet.3:219(1993);Yang等人,J.Virol.69:2004(1995)]和腺相关病毒载体[Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.8:148(1994)]。

[0187] 本文所体现的多核苷酸可以与微递送媒介物如阳离子脂质体和腺病毒载体一起使用。关于脂质体制备、靶向和内容物递送的程序的综述,参见Mannino和Gould-Fogerite,BioTechniques,6:682(1988)。还参见,Felgner和Holm,Bethesda Res.Lab.Focus,11(2):21(1989);以及Maurer,R.A.,Bethesda Res.Lab.Focus,11(2):25(1989)。

[0188] 复制缺陷型重组腺病毒载体可以根据已知技术产生。参见,Quantin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:2581-2584(1992);Stratford-Perricadet等人,J.Clin.Invest.,90:626-630(1992);和Rosenfeld等人,Cell,68:143-155(1992)。

[0189] 另一种方法是使用产生单链DNA的载体,所述载体可以在细胞内产生所表达产物。参见例如,Chen等人,BioTechniques,34:167-171(2003),其通过引用以其全文并入本文。

[0190] 可以将本发明的核酸序列递送至受试者的适当细胞。这可以通过例如使用聚合的、可生物降解的微粒或微胶囊递送媒介物来实现,所述递送媒介物的大小可优化吞噬细胞(如巨噬细胞)的吞噬作用。例如,可以使用直径为大约1-10 μ m的PLGA(聚-乳酸-共-乙交酯)微粒。多核苷酸被封装在这些微粒中,所述微粒被巨噬细胞吸收并在细胞内逐渐发生生物降解,从而释放出多核苷酸。一旦被释放,DNA就在细胞内表达。第二种类型的微粒旨在不被细胞直接吸收,而是主要充当核酸的缓释储库,其仅在通过生物降解从微粒中释放时才被细胞吸收。因此,这些聚合物颗粒应足够大以阻止吞噬作用(即,大于5 μ m,且优选大于20 μ m)。实现核酸摄取的另一方式是使用通过标准方法制备的脂质体。可以将核酸单独掺入这些递送媒介物中或者与例如对Treg细胞具有特异性的细胞或组织特异性抗体共掺入,或者作为靶标递送至肿瘤细胞。可替代地,可以制备分子复合物,其由通过静电或共价力附接至聚-L-赖氨酸的质粒或其他载体构成。聚-L-赖氨酸结合至可以与靶细胞上的受体结合的配体。将“裸DNA”(即,没有递送媒介物)递送至肌内、皮内或皮下部位是实现体内表达的另一种手段。如上所述,在相关的多核苷酸(例如表达载体)中,编码分离的核酸序列的核酸序列包含编码CAR的序列。

[0191] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以被配制成纳米颗粒,例如,由与DNA复合的高分子量线性聚乙烯亚胺(LPEI)的核构成,并被聚乙二醇修饰的(聚乙二醇化的)低分子量LPEI的壳包围的纳米颗粒。核酸和载体也可以被施加至装置(例如导管)的表面或包含在泵、贴剂或其他药物递送装置内。本文公开的核酸和载体可以在药学上可接受的赋形剂或载体(例如生理盐水)的存在下单独或以混合物形式给予。所述赋形剂或载体是基于给药方式和途径来选择的。合适的药物载体以及用于药物配制品的药物必需品描述于Remington's Pharmaceutical Sciences(E.W.Martin)(本领域熟知的参考文本)和USP/NF(美国药典和国家处方集)中。

[0192] 在一些实施方案中,可以将组合物配制成封装本文所体现的组合物的纳米颗粒。

[0193] 无论组合物是作为核酸还是多肽给予,它们都是以促进哺乳动物细胞摄取的方式配制的。以上描述了有用的载体系统和配制品。在一些实施方案中,载体可以将组合物递送至特定细胞类型。然而,本发明并不局限于此,并且还考虑了其他DNA递送方法,如化学转染,其使用例如磷酸钙、DEAE葡聚糖、脂质体、脂质复合物、表面活性剂和全氟化学液体,还考虑物理递送方法,如电穿孔、微注射、弹道粒子和“基因枪”系统。

[0194] 在其他实施方案中,组合物包含已用一种或多种编码一种或多种CAR的载体或核酸转化或转染的细胞。在一些实施方案中,本发明的方法可以离体应用。即,可以从体内取出受试者的细胞,并在具有所需靶抗原的培养中用组合物进行转导,扩增靶抗原特异性(例如)T细胞,并将扩增的细胞返回受试者体内。所述细胞可以是受试者的细胞,或者它们可以是单倍型匹配的或细胞系。可以辐照细胞以防止复制。在一些实施方案中,所述细胞是人白细胞抗原(HLA)匹配的、自体的、细胞系或其组合。在其他实施方案中,所述细胞可以是干细胞。例如,胚胎干细胞或人工多能干细胞(诱导的多能干细胞(iPS细胞))。已从包括人在内的许多动物物种建立了胚胎干细胞(ES细胞)和人工多能干细胞(诱导的多能干细胞,iPS细胞)。这些类型的多能干细胞将是用于再生医学的最有用的细胞来源,因为这些细胞能够通过适当诱导其分化而分化成几乎所有器官,并保留其主动分裂的能力,同时维持其多能性。特别是iPS细胞,其可以由自身来源的体细胞建立,因此与通过破坏胚胎产生的ES细胞相比,不可能引起伦理和社会问题。此外,作为自身来源的细胞的iPS细胞可以避免排斥反应,这是再生医学或移植疗法的最大障碍。

[0195] 通过本领域已知的方法,例如,递送siRNA的方法,可以容易地将CAR递送至受试者。因此,CAR分子可以在临床上使用,类似于当前基因疗法所采用的方法。特别地,可以开发用于细胞移植疗法以及疫苗接种的CAR稳定表达干细胞或iPS细胞以用于受试者。

[0196] 一旦将CAR-T细胞离体扩增,则可以以治疗有效量将其重新注入受试者。在一个实施方案中,使用抗CD3/CD28珠刺激CAR-T细胞用于其体外扩增。CAR-T细胞可以用于响应自身免疫性疾病抗原(例如,瓜氨酸化波形蛋白(CV))。如本文所用的术语“治疗有效量”意指CAR T细胞在被给予至需要这种治疗的哺乳动物(特别是人)时,足以治疗自身免疫性疾病如类风湿性关节炎的量。

[0197] 待给予的CAR T细胞的精确量可以由医师在考虑受试者的年龄、体重、疾病程度和健康状况的个体差异后确定。

[0198] 通常,T细胞疗法的给予是通过每公斤体重的细胞数来限定的。然而,由于T细胞将在转移后复制并扩增,因此给予的细胞剂量将不会与细胞的最终稳态数量相近。

[0199] 在一实施方案中,包含本发明CAR T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量给予。在另一个实施方案中,包含本发明CAR T细胞的药物组合物可以以 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重(包括那些范围内的所有整数值)的剂量给予。

[0200] 包含本发明CAR T细胞的组合物还可以以这些剂量多次给予。可以通过使用本领域已知的输注技术来给予细胞(参见例如,Rosenberg等人,1988,New England Journal of Medicine,319:1676)。本领域的技术人员可以通过监测患者的疾病体征和相应地调整治疗容易地确定特定受试者的最佳剂量和治疗方案。

[0201] 在某些实施方案中,用于治疗自身免疫性疾病的本文所体现的任何组合物(例如CV-CAR T细胞)的给予可以与其他基于细胞的疗法(例如干细胞、抗原呈递细胞等)组合。

[0202] 本发明的组合物可以以本领域已知的方式制备并且是适合于对哺乳动物(特别是人)肠胃外给予的那些组合物,其包含治疗有效量的单独的组合物,以及一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0203] 如本文所用的术语“药学上可接受的载体”意指任何合适的载体、稀释剂或赋形剂。这些包括所有水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂和溶质,所述溶液使组合物与预期接受者的血液等渗;水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂、分散介质、抗真菌和抗菌剂、等渗和吸收剂等。应当理解,本发明的组合物还可包含其他补充性生理活性剂。

[0204] 在与组合物的其他成分相容并且不损伤受试者的意义上,载体必须是药学上“可接受的”。组合物包括适用于肠胃外给予(包括皮下、肌内、关节内、静脉内和皮内给予)的那些。组合物可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域中熟知的任何方法制备。此类方法包括制备与CAR T细胞缔合的载体。通常,组合物是通过将任何活性成分与液体载体均匀且紧密地缔合在一起制备。

[0205] 在一实施方案中,组合物适合于肠胃外给予。在另一个实施方案中,组合物适合于静脉内给予。在另一个实施方案中,组合物适合于关节内给予。

[0206] 适合于肠胃外给予的组合物包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂和溶质,所述溶液使组合物与预期接受者的血液等渗;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。

[0207] 本发明还考虑了本发明的组合物与其他药物和/或除其他治疗方案或方式(如手术)之外的组合。当本发明的组合物与已知的治疗剂组合使用时,所述组合可以按顺序(连续地或通过无治疗期隔开)或同时或作为混合物给予。在自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎)的情况下,治疗包括向受试者给予本文所体现的组合物,例如用对瓜氨酸化波形蛋白(CV)具有特异性的CAR转导的自体T细胞和一种或多种抗炎剂和/或治疗剂。抗炎剂包含一种或多种特异性结合促炎细胞因子(例如促炎细胞因子,如IL-1、TNF、IL-6、GM-CSF和IFN- γ)的抗体。在某些实施方案中,所述抗体是抗TNF α 、抗IL-6或其组合。在某些实施方案中,可以给予除抗体之外的一种或多种减少促炎细胞因子的药剂,例如非甾体抗炎药(NSAID)。可以给予抗体与一种或多种减少促炎细胞因子的药剂的任何组合。

[0208] 还考虑组合治疗以涵盖用本发明组合物进行治疗,随后进行已知的治疗,或用已知的药剂进行治疗,随后用本发明组合物进行治疗,例如作为维持疗法。例如,在自身免疫性疾病的治疗中,免疫细胞(如T和B淋巴细胞)的过度和延长激活以及主要的促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF)以及其他介体(如白介素-6(IL-6)、白介素-1(IL-1)和干扰素 γ (IFN- γ))的过度表达在类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBD)、克罗恩氏病(CD)和强直性脊柱炎(AS)的自身免疫性炎症反应的发病机制中起着核心作用。

[0209] 传统上,将非甾体抗炎药(NSAID)、糖皮质激素、改变病情的抗风湿药(DMARD)用于治疗自身免疫性炎性疾病。NSAID和糖皮质激素在缓解疼痛和抑制炎症中有效,而DMARD具有减少由炎症反应引起的组织和器官损伤的能力。最近,由于发现TNF在RA和其他自身免疫性疾病的发展中至关重要,所述疾病的治疗已经彻底改变。抗TNF生物制剂(如英夫利昔单抗、阿达木单抗、依那西普、戈利木单抗和赛妥珠单抗(certolizumab pegol))显著改善了管理自身免疫性炎性疾病的结果。

[0210] 非甾体抗炎药具有镇痛、解热和抗炎作用,通常用于治疗如关节炎和头痛的病症。NSAID通过阻断环加氧酶(COX)酶来减轻疼痛。COX促进前列腺素的产生,前列腺素是一种引起炎症和疼痛的介体。尽管NSAID具有不同的化学结构,但它们均具有相似的治疗作用,例如抑制自身免疫性炎症反应。通常,NSAID可以分为两大类:传统的非选择性NSAID和选择性环加氧酶-2(COX-2)抑制剂(关于综述,参见P.Li等人Front Pharmacol.2017;8:460)。

[0211] 除抗TNF药剂之外,靶向其他促炎细胞因子或免疫活性分子的生物制剂也已得到广泛研究和积极开发。例如,阿巴西普(CTLA-4的细胞外结构域和IgG1的Fc部分的完全人源化融合蛋白)已被批准用于对抗TNF疗法反应不足的RA患者。阿巴西普的主要免疫学机制是对共刺激途径(CD80和CD86)的选择性抑制和对T细胞的激活。托珠单抗(一种人源化抗IL-6受体单克隆抗体)已被批准用于不耐受DMARD和/或抗TNF生物制剂的RA患者。这种治疗性mAb通过与IL-6受体的可溶性和膜形式结合来阻断IL-6的跨膜信号传导。靶向IL-1(阿那白滞素)、Th1免疫应答(IL-12/IL-23,优特克单抗)、Th17免疫应答(IL-17,苏金单抗)和CD20(利妥昔单抗)的生物药物也已被批准用于治疗自身免疫性疾病(关于综述,参见P.Li等人Front Pharmacol.2017;8:460)。

[0212] 尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于本发明的实践或测试,但以下描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用以其全文并入。如果发生冲突,以包括定义在内的本说明书为主。此外,所述材料、方法以及实施例仅仅是说明性的,并不意图具有限制性的。

[0213] 实施例

[0214] 实施例1:表达CV-CAR的慢病毒载体的产生。

[0215] 评估了在CAR有效性方面起重要作用的不同要素。因此,在一些实施方案中,比较了scFv的三种不同形式,评估了铰链的两个长度,并且分析了两种不同的共刺激结构域。在这些步骤的每一个中,选择一个提供最佳T细胞激活特征的CV-CAR候选者。

[0216] CV特异性scFv的产生:对BVCA1抗体的重链和轻链可变区进行测序,并用于产生 V_H -接头- V_L 格式的CV特异性scFv基因。通过将所述序列插入pSYN质粒中来产生scFv蛋白,并将其接种到DH5- α 大肠杆菌感受态细胞中。在摇床中于30°C下,使单个菌落在5ml补充有2%葡萄糖和100 μ g/ml氨苄青霉素的2YT培养基中生长过夜。将5ml O/N培养物接种到500ml新鲜2YT培养基(含0.1%葡萄糖和100 μ g/ml氨苄青霉素)中,并在37°C下孵育2.5小时,直到 $OD_{600}=0.9$ 。通过添加250 μ l异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导scFv的表达,然后在30°C下振荡孵育4小时。在以5000rpm离心20min后,将细菌沉淀物用12.5ml冰冷的周质提取缓冲液(PPB,200g/L蔗糖,30mM Tris-HCl,pH 8.0)重新悬浮,并保持在冰O/N上。第二天,将细菌以10,000rpm离心30min,保留上清液,并将沉淀用12.5ml 5mM冰冷的 Mg_2SO_4 重新悬浮,并在冰上保持30min,以引起渗透压冲击。将裂解的细菌以10,000rpm离心30min,然后将上清液与先前上清液合并。然后,通过Ni-NTA色谱法纯化CV特异性scFv。

[0217] BVCA1抗体和scFv对CV肽的结合特异性和亲和力的评估:通过ELISA评估BVCA1 IgG和scFv的结合特异性。将96孔ELISA板在4°C下用50 μ l的10 μ g/ml链霉亲和素进行O/N涂布。将孔洗涤三次,并在RT下用200 μ l的1X PBS 1%BSA封闭1h,然后再次洗涤。添加100 μ l以10 μ g/ml稀释于PBS1%BSA中的生物素化肽,并在RT下孵育1h。然后将孔洗涤三次。添加100 μ l各种浓度(连续稀释)的BVCA1 IgG或scFv或同种型对照。在RT下孵育1.5h后,将孔洗涤3

次,然后向孔中添加与碱性磷酸酶(AP)缀合的适当二抗:对于全人BVCA1 IgG,以1/5000稀释度使用山羊抗人IgG Ab-A(Life Technologies#62-8422);对于具有小鼠IgG2a CH2和CH3结构域的BVCA1 Ab的嵌合形式,以1/10000稀释度使用山羊抗小鼠IgG(全分子)Ab-AP(Sigma#A3562);对于BVCA1的scFv,以1/200稀释度使用抗c-Myc Ab(克隆9E10、小鼠IgG1; Santa Cruz Biotech,sc-40),随后以1/10 000稀释度使用抗小鼠IgG-AP(Sigma,A3562)。将孔洗涤三次,并添加100 μ l的Step pNPP底物溶液。在15至30min后,用50 μ l NaOH 3M停止反应,并在酶标仪中于405nm处读取吸光度。使用Biacore T100(GE Healthcare)通过表面等离子共振分析BVCA1Ig和scFv对CV肽的动力学和亲和力。将生物素化CV肽固定在涂布链霉亲和素的传感器芯片(CM5)上。以30 μ l/min的流速注入不同浓度的抗体。

[0218] CV特异性CAR构建体的产生:通过使用Gibson组装方法(Gibson Assembly Master Mix,BioLabs,根据制造商的说明书),抗CD19 scFv序列被CV特异性scFv序列替代到已存在的19-CAR构建体中,所述19-CAR构建体在p10001慢病毒质粒中克隆,所述构建体具有CD28z或41BBz细胞内结构域以及随后的CD3 ζ 结构域和EGFR(EGFRt)的截短形式,所述截短形式用作受体并通过T2A结构域与CAR隔开(CAR构建体由Juno Technologies提供)。这些CAR构建体均具有短铰链(IgG4-36bp),因此再次使用Gibson组装方法用长铰链(人CD28序列的细胞外结构域的117bp)替代短铰链。由此,产生具有短或长铰链以及41BB或CD28共刺激结构域或多个CV特异性CAR构建体。

[0219] HEK 293T细胞转染和慢病毒颗粒滴定:将HEK 293T细胞以800,000个细胞/孔铺板于含有2ml的补充有10% FBS(无抗生素)的DMEM高葡萄糖培养基的6孔板中,并置于37°C 5%CO₂下过夜。在孔中80%汇合时,将1.5 μ g CV-CAR p10001与1.33 μ g包装载体p8.91、0.168 μ g VSV包膜载体pMD2.G和9 μ g FuGENE HD转染试剂(Promega)的混合物温和地逐滴添加到每个孔中。为了提高病毒颗粒产生的效率,在14小时后用补充有ViralBoost试剂(以1/500稀释;VC-100,Alstem)的新鲜10% FBS-DMEM高葡萄糖培养基更换培养基。2天后收获病毒上清液,并使用慢病毒沉淀溶液(VP100,Alstem,遵循制造商的说明书)浓缩100倍。使用抗EGFRt Ab(Erbix, Juno Therapeutics)通过流式细胞术评估HEK 293T细胞的转染效率。为了滴定慢病毒颗粒,将Jurkat细胞(10,000个/孔在96孔板中)置于含有病毒的连续稀释液的培养物中4天,然后用抗EGFRt Ab染色并通过流式细胞术(LSR II;BD Biosciences)分析。通过按照以下等式,使用产生1%至20%阳性细胞的稀释液来确定病毒滴度:[靶细胞数 $\times$ (EGFRt⁺细胞%/100)]/上清液的体积(ml)。

[0220] 图19示出了对转染后第3天在HEK 293T细胞的细胞表面处的CV特异性CAR表达的评估。以上描述了用于HEK 293T细胞转染和慢病毒颗粒滴定的技术。

[0221] 实施例2:表达CV-CAR的慢病毒载体的产生

[0222] CV-CAR构建体产生:为了产生在慢病毒载体中表达的CV-CAR构建体,使用Gibson组装方法将存在于慢病毒骨架质粒p10001(可从Juno Therapeutics, Inc.获得)中的CD19-CAR构建体的单链可变片段(scFv)替代为BVCA1 scFv(图8A和图8B)。由于在人波形蛋白与鼠波形蛋白的氨基酸序列之间仅观察到很少的差异,因此抗CV抗体对人肽和鼠肽两者均显示出高特异性。这允许在体外对人样品和在体内对RA小鼠模型进行评估。图6示出了人波形蛋白肽和鼠波形蛋白肽的部分的比对,解释了为什么BVCA1单克隆抗体对人和鼠瓜氨酸化波形蛋白两者均具有特异性。图7显示了对抗CV抗体(BVCA1)的特异性的评估。图4示出了从

BVCA1抗体合成的单链可变片段(scFv)对CV的特异性和亲和力的评估。图5示出了(图5A)在BVCA1完全人IgG与人CV肽之间的解离常数(K_D)为约10nM,并且(图5B)在BVCA1 scFv与人CV肽之间的 K_D 为约198nM。结果表明,作为BVCA1抗体,BVCA1 scFv对瓜氨酸化波形蛋白具有特异性。

[0223] 如图8B所示,产生了两种形式的CV特异性CAR,每种形式含有CD3 ζ 加CD28(CV.28z-CAR)或41BB(CV.41BBz-CAR)共刺激结构域。根据所描述的实施方案的CV-CAR构建体可以具有共刺激结构域的任何一种或多种合适的类型。使用通过T2A肽与CAR隔开的EGFR基因的截短形式作为报告基因。通过转染HEK 293T细胞产生了慢病毒颗粒。在第3天收集上清液,并沉淀病毒颗粒以进行富集。

[0224] 图9示出了产生CV-CAR构建体和后续评估所产生构建体的时间线的例子。在整个本公开文本中描述了构建体产生和评估的各个步骤的细节和例子。

[0225] 不同长度的CV-CAR构建体铰链的评估:比较了具有两种不同长度的铰链的构建体:(1)来源于IgG4基序的短铰链,和(2)作为人CD28的细胞外结构域的一部分的长铰链。据观察,对于CV.28z-CAR和CV.41BBz-CAR两者而言,长铰链的存在都诱导对CV-CAR T细胞的更有效激活。取决于CAR构建体的靶抗原,可以确定铰链的最佳长度以允许适当的抗原结合。为了评估哪种铰链长度最适合CV特异性CAR Treg激活,比较了两种不同的铰链,即短铰链IgG4(36bp)和使用人CD28细胞外结构域的一部分产生的长铰链(117bp)。为了在具有CD28z细胞内结构域的CV-CAR和具有41BBz细胞内结构域的CV-CAR二者中研究这两种不同的铰链,产生了四种形式的CV-CAR构建体:两种具有短铰链(CV-IgG4-28z和CV-IgG4-41BBz)且两种具有长铰链(CV-CD28-28z和CV-CD28-41BBz)。通过慢病毒转导来诱导这些不同的CV-CAR构建体在Treg中的表达,并分析了在CV-SA珠存在下再刺激后CV-CAR Treg的激活特征。如图10A所示,在第3天,与具有短铰链的CAR构建体相比,在表达具有长铰链的CAR构建体的CV-CAR Treg的群体中,较高百分比的细胞表达激活标记CD71。在第3天评估CD25平均荧光强度(MFI)时,可以作出相同的观察。此外,具有长铰链的CV-CAR Treg比具有短铰链的CV-CAR Treg更有效地扩增(图10B)。

[0226] scFv的不同形式的评估:发明人开发了一种新型scFv(BVCA1),其特异性结合瓜氨酸化波形蛋白。大多数靶向在RA患者中发现的瓜氨酸化蛋白的抗体的特异性较低,并且与多种瓜氨酸化蛋白交叉反应。因此,进一步分析使用BVCA1。然而,从这种单IgG产生了三种形式的scFv:(1)一种具有具有起源的核苷酸序列的 V_L 和 V_H 链和24个氨基酸的接头(scFv#1), (2)一种具有起源的核苷酸序列和(GGGGS)₃接头(scFv#2),和(3)第三种具有 V_L 和 V_H 链的密码子优化序列和(GGGGS)₃接头(scFv#3)。

[0227] 如图11A-图11D所示,在转导后第3天,仅具有scFv#1的CV-CAR在Treg和T conv的细胞表面处有效表达,而报告基因的表达表明3种不同CAR构建体之间的转导效率相当(图11A和图11B)。在CV-pep-SA珠(CV珠)存在下再刺激后第2天,观察到与另外两组CV-CAR Treg相比,在先前用CV-CAR scFv#1转导的Treg群体中表达激活标记CD71和CD69的细胞百分比更高(图11C和图11D)。基于这些结果,选择了具有scFv#1的CV-CAR构建体来继续开发CV-CAR构建体。

[0228] 实施例3:CV-CAR转导的人Treg和Tconv的产生

[0229] 样品、细胞分选和体外刺激:新鲜的全血单位从在旧金山加利福尼亚大学的普通

人群中招募的健康血液供者获得,或由StemCell Technologies提供。使用Ficoll Paque培养基(GE Healthcare)通过密度梯度沉降法分离PBMC。通过磁性细胞分选(Miltenyi Biotec)通过从PBMC进行阳性选择来富集CD4⁺T细胞。然后将CD4⁺T细胞用荧光染料标记的对CD4、CD25和CD127具有特异性的mAb染色,并通过流式细胞术(FACS Aria; BD Biosciences)以高于97%的纯度将其分离为两个亚组:CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (CD4⁺调节性T细胞;Treg)和CD4⁺CD25⁻CD127⁺ (CD4⁺T常规细胞;Tconv)。然后,在以下T细胞培养基中,在白介素-2 (IL-2; Proleukin, Prometheus Laboratories; 对于Tconv为100U/ml,且对于Treg为300U/ml)的存在下,以对于Tconv为1:1比率并且对于Treg为1个细胞对2个珠的比率,用抗CD3/抗CD28包被的Dynabeads (ThermoFisher Scientific) 刺激分选的细胞群:补充有5mM HEPES、2mM L-谷氨酰胺、各50mg/ml的青霉素/链霉素 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)、5mM非必需氨基酸、5mM丙酮酸钠 (Mediatech) 和10% FBS (Invitrogen) 的RPMI 1640培养基。每2天添加含有IL-2的新鲜培养基,并在需要时分割细胞。

[0230] Tconv和Treg群体的慢病毒转导和转导效率评估:在刺激分选的CD4⁺群体后第2天,计数细胞并以每孔250,000至500,000个细胞接种到24孔板中,并在孵育器中于37°C下放置至少1小时。然后将病毒颗粒和硫酸鱼精蛋白(100μg/ml)的混合物添加到孔中,以达到每个细胞1个颗粒的感染复数(MOI)。然后将细胞以1200xg于32°C下旋转接种30分钟。然后将板放回37°C下90分钟。将细胞旋转沉降5min,并用含有IL-2的新鲜培养基替代接种培养基。三天后,使用抗EGFRt Ab通过流式细胞术确定转导效率。为了证实EGFRt⁺细胞的百分比代表了这些细胞的细胞表面处的CAR表达,将所述细胞用缀合有APC或PE的EGFRt Ab和CV-链霉亲和素(SA)-AF488四聚体共染色,在搅拌下于4°C下孵育2小时,并在转导后第4天通过流式细胞术进行分析。在即将进行细胞染色之前通过以下方式制备CV-SA-AF488复合物:将生物素化CV肽(Innovagen)与SA-AF488缀合物(Life Technologies)以1个SA蛋白对4个生物素化肽的比率在搅拌下于4°C下共孵育15min,并将管以高14000xg旋转沉降5min。

[0231] 结果

[0232] 使用CV-CAR慢病毒载体,以1个病毒对1个细胞的比率转导人T CD4⁺调节性细胞(Treg)和常规(Tconv)细胞。这些细胞是从健康供体(HD)的外周血中分离,基于CD4、CD25和CD127的表达通过流式细胞术加以分选(Treg:CD4⁺CD25⁺CD127⁻;Tconv:CD4⁺CD25⁻CD127⁺),并在转导之前用抗CD3/CD28珠刺激2天。还用CD19.28z-CAR和CD19.41BBz-CAR转导细胞以用作对照。

[0233] 在转导后第4天,通过使用抗EGFRt抗体确定EGFRt⁺细胞的百分比。数据表明,用CV-CAR和CD19-CAR进行的转导在Treg和Tconv群体中产生了相似的EGFRt⁺百分比(图12A)。此外,在所有测试的CAR中观察到,Treg比Tconv更有效地被转导。因此,在一个实验中,取决于CAR构建体,约74%至约80%的Treg是EGFRt⁺,与之相比,Tconv群体中为约53%至约59%(图12A)。如图12B的例子中所示,与EGFRt⁺Tconv相比,EGFRt⁺Treg中的平均荧光强度(MFI)也更高。

[0234] 为了验证EGFRt表达代表细胞表面处的CAR表达并且为了评估CV-CAR构建体结合其靶抗原的能力,将所述细胞用图12C所示的与FITC缀合的生物素化CV-肽/链霉亲和素四聚体(CVpep-SA-FITC)和EGFRt抗体染色。数据证实EGFRt表达与Treg表面处的CV-CAR表达相关,并证明BVCA1 scFv结合CV的能力在插入CV-CAR构建体后被保留(图12D)。用Tconv细

胞获得了相似的结果。结果表明,在Tregs表面处表达的CV特异性CAR特异性结合CV肽。

[0235] 实施例4:CV-CAR信号传导对体外Treg激活和扩增的作用的分析

[0236] 用于第二轮刺激的细胞的制备:为了避免由于存在抗CD3/抗CD28包被的Dynabeads而引起细胞的任何残留激活,在第7天通过使用磁体(ThermoFisher Scientific,根据制造商的说明书)从细胞培养物中去除这些珠。另外,在指示时,在第7天通过流式细胞术基于EGFRt的表达分选CAR⁺Treg和Tconv群体。

[0237] CV-CAR T细胞的再刺激:在第一次刺激后的第9天或第10天,再刺激CAR⁺T细胞。使用了不同的刺激条件来比较当通过CAR或通过其内源性TCR进行刺激时, CV-CAR T细胞的激活特征。通过将生物素化CV肽(Innovagen)与Dynabeads M-280链霉亲和素(Innovagen,根据制造商的说明书)偶联(称为CV-SA珠)来产生呈递CV肽的珠。在不存在或存在比率为1:1的抗CD3/抗CD28包被的Dynabeads或比率为2个珠对1个细胞的CV-SA珠的情况下,在IL-2(对于Tconv为100U/ml且对于Treg为300U/ml)的存在下再刺激细胞。每2天添加含有IL-2的新鲜培养基,并在需要时分割细胞。

[0238] 第二轮刺激后CV-CAR T细胞的激活特征和扩增的研究:在再刺激细胞后的第一天,使用明场显微镜可视化细胞簇。在第2天和第3天,从每种刺激条件收获小部分细胞,并用针对CD4、CD25、CD69、CD71、EGFRt的抗体和LIVE/DEAD可固定蓝染料(Invitrogen)染色,并在4°C下孵育20min。通过在LIVE CD4⁺细胞上固相,通过流式细胞术分析细胞。为了测量再刺激后CV-CAR Treg的扩增倍数,在第二轮刺激之前(在第一次刺激后的第7天)通过流式细胞术富集CV-CAR⁺细胞。在再刺激后的第5天对这些分选的CV-CAR⁺Treg进行计数,并计算扩增倍数(第5天的细胞数/第0天的细胞数)。

[0239] 评价了通过所产生的CV-CAR Treg的CAR介导的信号激活细胞的能力。在转导后5天去除抗CD3/CD28珠,并将转导的Treg在仅存在IL-2的情况下培养2天以使其休眠,从而避免任何残留的激活迹象。然后在仅存在IL-2(阴性对照)或者存在IL-2与抗CD3/CD28珠组合(阳性对照)或与包被有生物素化CV肽的SA Dynabeads®(CV-SA珠,图13)组合的情况下,再刺激CAR-Treg的不同群体。

[0240] 在再刺激后的第1天,评估孔中簇的存在,作为细胞与珠之间的相互作用的指示。如图14A所示,在仅IL-2条件下(没有珠),所有孔中都没有簇,这与转导的CAR的特异性无关。同样如图14A所示,在抗CD3/CD28珠条件下,在所有Treg群体中均观察到簇。在此实施例中,当在CV-SA珠的存在下培养细胞时,簇仅在CV-CAR Treg孔中可见,这可能指示CV-CAR与CV-SA珠特异性相互作用。

[0241] 通过流式细胞术评估在第3天激活标记CD71和CD25在细胞的细胞表面处的表达。而在仅IL-2条件下,细胞不表达CD71,且CD25 MFI较低,用抗CD3/CD28珠刺激诱导绝大多数CAR Treg(CD19和CV特异性)中的CD71表达以及CD25 MFI的显著增加(图14B)。仅在CV-SA珠条件下,在CV-CAR Treg中观察到CD71表达的诱导。CD71⁺细胞的百分比低于用抗CD3/CD28珠观察到的所述百分比,特别是对于CV.41BBz-CAR Treg。类似地,CD25 MFI仅在CV-CAR Treg中在CV-SA珠条件下增加,且在CV.28z-CAR Treg中MFI略高(图14C)。

[0242] 图14A-图14C显示,当在CV-SA珠的存在下刺激时,仅表达CV特异性CAR的Treg显示出激活的迹象。

[0243] 然后评估在CV-SA珠存在下诱导的CV特异性CAR介导的刺激是否足以触发细胞的

扩增。在再刺激后第5天测量在所有条件下不同CAR Treg群体的扩增倍数(图14C)。所得数据表明,即使由CV-SA珠诱导的扩增倍数低于在抗CD3/CD28珠存在下所观察到的扩增倍数,在通过CV特异性CAR介导的刺激后,CV-CAR Treg仍有效地增殖。与图14B所示的数据一致,CV.41BBz-CAR Treg的扩增似乎不如CV.28z-CAR Treg有效,这表明CV.28z-CAR信号传导可能在激活细胞方面更有效。还对Tconv细胞进行了这些实验,并且得到相似的结果。

[0244] 此外,为了验证使用CV-SA珠诱导的激活是由于存在CV₆₀₋₇₅肽引起的,还产生了精氨酸-波形蛋白₆₀₋₇₅(ArgVim)肽-SA珠和瓜氨酸化-纤维蛋白原 β 链₃₆₋₅₂(CitFib)肽-SA珠。当在未包被的SA-珠、ArgVim SA珠或CitFib SA珠的存在下共培养CV-CAR Treg时,未观察到激活的迹象。

[0245] 实施例5:在体外扩增后,对CV-CAR Treg的表型和稳定性的评估

[0246] 扩增的CV-CAR Treg中细胞因子产生的表型分析和评估:在第18天,在第二轮刺激结束时,在4°C下,用荧光染料标记的对CD4、CD25、CD127、EGFRt具有特异性的Ab和LIVE/DEAD可固定蓝色染料对不同Treg群体的一部分进行表面染色20min。平行地,用CD4、CD127、EGFRt和LIVE/DEAD可固定蓝色染料对另一细胞样品进行染色,随后根据制造商的说明书使用Foxp3染色缓冲液组(eBioscience)对FOXP3和Helio进行核内染色。对于细胞因子产生的评估,在4h期间用PMA(100ng/ml)和离子霉素(1 μ g/ml)刺激细胞,并在开始孵育后2小时添加布雷菲德菌素A(1X, Invitrogen)。然后将细胞用LIVE/DEAD可固定蓝色染料和抗CD4、抗CD127、抗EGFRt Ab染色,用含有2% D-葡萄糖的1X PBS中的1%多聚甲醛(PFA)固定,用PBS 5%FBS中的0.1%皂苷进行渗透化处理,并用对IFN- γ 、IL-2、IL-17和IL-10具有特异性的Ab染色。通过流式细胞术(LSR II; BD Biosciences)分析细胞。

[0247] 为了评价两轮扩增后CV-CAR Treg的表型稳定性,在第18天检查了主要Treg表面标记(CD25、CD127)和转录因子(FOXP3和Helios)的表达谱以及细胞因子的产生。未转导的和CV-CAR Treg经历了两轮刺激,第二轮激活使用抗CD3/CD28珠或CV-SA珠进行。在第18天,通过流式细胞术评估细胞的CD25和CD127表面表达(图15A)以及FOXP3和Helios核内表达(图15B)。如图17A和图15B所示,在两轮体外刺激后,CV-CAR Treg维持其Treg表型。

[0248] 为了评估这些扩增的Treg的细胞因子产生谱,用PMA/离子霉素刺激细胞4小时,最后2小时在布雷菲德菌素A存在下进行。然后固定细胞并用靶向IFN-g、IL-2、IL-10和IL-17的抗体染色(图15C)。

[0249] 如图15A和图15B所示,这三个亚组:未转导的Treg、CV.28z-CAR Treg和CV.41BBz-CAR Treg维持Treg表型(即CD25⁺CD127⁻、FOXP3⁺)。据观察,在扩增后,Treg均不表达IL-2或炎性细胞因子INF-g和IL-17(图15C)。在未转导的Treg与CV-CAR Treg之间未观察到差异。在第二轮评估了两种再刺激条件:抗CD3/CD28珠或CV-SA珠。在两种条件下均获得了相似的谱,这支持了Treg在CV-CAR介导的激活后维持其表型的观念。

[0250] 实施例6:用于评价CV-CAR Treg在RA中的治疗潜力的体外测定的开发

[0251] CV-CAR Treg与来自RA患者的滑液的共培养:通过使用与疾病更相关的瓜氨酸化波形蛋白来源,使用由Jonathan Graf提供的来自RA患者的滑液(SF)样品评估CV-CAR Treg通过CAR被激活的能力。在第一轮刺激后的第9天,将滑液样品(新鲜或解冻的)与补充有IL-2的T细胞培养基以1:8、1:16或1:32(SF:细胞培养基)的比率混合。将CAR T细胞以每孔50,000个细胞接种到96孔板中,并在每个孔中添加200 μ l SF与T细胞培养基的混合物。在三天

后,如前所述,用对CD4、CD71、CD25具有特异性的抗体和LIVE/DEAD可固定蓝色染料对细胞进行染色。通过在LIVE CD4⁺群体上设门控,通过流式细胞术获得表达CD71的细胞的百分比和CD25的MFI。

[0252] 表达瓜氨酸化波形蛋白的肿瘤细胞系的产生和表征:SKNBE2c是已知在细胞表面表达波形蛋白的神经母细胞瘤肿瘤细胞系。使SKNBE2c细胞(来自ATCC)解冻,并在含有Glutamax、10% FBS、HEPES和P/S的RPMI中培养。通过使用Gibson组装方法(Gibson Assembly Master Mix, BioLabs),将人酶肽基精氨酸脱亚氨酶2(PAD2)的基因插入pCDH-EF1-T2A-GFP慢病毒载体(Addgene)中。通过转染HEK 293T细胞产生病毒颗粒,并以每个细胞1个颗粒的MOI转导SKNBE2c。通过流式细胞术检测GFP的表达来评估转染和转导效率。为了确定对参与瓜氨酸化过程的酶PAD2的表达的人工诱导是否触发SKNBE2C中瓜氨酸化波形蛋白的产生,进行了免疫荧光染色。简而言之,将野生型(WT)和PAD-GFP转导的SKNBE2C细胞系两者均接种到8孔室硼硅酸盐盖玻片(Lab-Tek)中。在达到汇合时,将细胞用冷1X PBS中的2% PFA固定30min,在RT下用1X PBS中的2% BSA封闭30min,在4°C下与一抗(具有小鼠IgG2a的嵌合BVCA1 Ab、抗波形蛋白Ab或同种型对照)一起孵育过夜。然后在黑暗中于RT下添加二抗并保持1h,并用DAPI将细胞复染10min。使用荧光显微镜(BZ-X700系列, Keyence)使细胞可视化。结果示于图20A和图20B中。

[0253] CV-CAR Treg与PAD2-GFP SKNBE2C细胞系的共培养:将WT和PAD2-GFP SKNBE2C细胞接种到平底96孔板中。一旦达到汇合,在补充有300U/ml IL-2的T细胞培养基的存在下,将第一轮刺激第10天的未转导Treg、CD19-CAR Treg和CV-CAR Treg添加到孔中。在共培养三天后,收获细胞并如前所述用对CD4、CD71、CD25具有特异性的抗体和LIVE/DEAD可固定蓝色染料进行染色。通过在LIVE CD4⁺群体上设门控,通过流式细胞术测量表达CD71的细胞的百分比和CD25的MFI。

[0254] 使用几种体外方法证明CV-CAR T细胞可以通过使用与疾病更相关的瓜氨酸化波形蛋白来源来激活的能力。使用来自RA患者的滑液或表达CV的肿瘤细胞系作为CV来源获得的数据显示,CV.41BBz-CAR转导的Treg在这些条件下未被激活,而CV.28z-CAR转导的Treg被有效地激活。这表明即使两种CV-CAR构建体在CV-SA珠的存在下(靶抗原的人工呈递)都触发对CAR表达T细胞的有效激活信号,但是仅CV.28z-CAR在更符合生理的环境中激活细胞。

[0255] 体外方法之一是在从RA患者关节收获的已知富含嗜中性粒细胞和嗜中性粒细胞细胞外陷阱(NET)的滑液(RA中瓜氨酸化波形蛋白的主要来源之一)存在下共培养CV-CAR Treg。在具有或不具有CV-SA珠或来自RA患者的滑液的情况下,在IL-2的存在下,将表达各种CAR构建体的扩增的Treg以及未转导的Treg置于培养中。在培养3.5天后,通过流式细胞术评估CD71的表达(图16A)。图16B示出了不同CAR Treg群体中在EGFRt⁻和EGFRt⁺部分之间CD71⁺细胞的百分比。

[0256] 通过在RA滑液存在下共培养3.5天后用CD71 Ab对细胞进行染色,观察到仅CV.28z-CAR Treg的EGFRt⁺部分表达高百分比的CD71激活标记(图16A和图16B)。图16B是用来自4名不同RA患者的SF获得的数据的总结,在滑液存在下,未转导的Treg、CD19.28z-CAR Treg和CD19.41BBz未显示任何激活迹象。还对Tconv细胞进行了此实验,并产生了相似的结果(数据未示出)。测试了来自不同RA患者的三个滑液样品,并且它们全部在EGFRt⁺CV.28z-

CAR Treg (图18A) 和Tconv (数据未示出) 中特异性诱导CD71表达。这些数据表明,这种体外滑液介导的激活是CV-CAR依赖性的。重要的是,在第3.5天,在EGFRt⁺CV.41BBz-CAR的表面处仅诱导了CD71的弱表达 (图16B)。这个观察结果可能与以下事实有关:CV.41BBz-CAR介导的信号激活细胞的能力弱于经由CV.28z-CAR诱导的信号,如图14A-图14C所示。

[0257] 实施例7:用RA中的CV-CAR Treg治疗人受试者

[0258] 仍参考图1,已根据所述技术产生了CV-CAR Treg,用于开发用于患有类风湿性关节炎的患者的细胞疗法。这种治疗方法涉及通过从患者的血液样品分离细胞来使用患者自身 (自体) 的Treg。使用携带CV-CAR转基因的慢病毒载体对分离的Treg进行基因再工程化。使CV-CAR Treg在体外经历两轮扩增,然后将其注入患者体内。该方法可以与抗TNF治疗组合进行,以优化Treg在疾病部位的效率。

[0259] 因此,在一些实施方案中,提供了治疗被诊断为类风湿性关节炎的受试者的方法,其包括从获自所述受试者的生物学样品分离T淋巴细胞,将CD4⁺T调节性细胞 (Treg) 与常规T细胞 (Tconv) 分开,其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻,并且所述Tconv是CD4⁺CD25⁻CD127⁺,用编码特异性结合瓜氨酸化波形蛋白 (CV) 抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的表达载体转导所述Treg细胞,用抗CD3/CD28珠至少一次离体刺激转导的Treg细胞,以获得足量对CV抗原具有特异性的Treg细胞,并将Treg重新注入受试者中,从而治疗所述受试者。

[0260] 实施例8:CV-CAR的表面表达

[0261] 在一些实施方案中,通过使用抗人IgG (H+L) Ab评估了CV特异性CAR在Treg表面处被表达的能力,如图17A-图17B所示。这是在慢病毒转导后进行。通过流式细胞术检测CAR和表皮生长因子受体 (EGFRt) 两者。图17A示出了对CAR和EGFRt在未转导的Treg、CV/CD28ζCAR⁺Treg和CV/41BBζCAR⁺Treg表面处的表达的评估。图17B示出了各种实验中CAR⁺细胞的百分比。

[0262] 实施例9:在来自RA患者的滑液的存在下激活CV.28z-CAR Treg。

[0263] 为了证明表达CV-CAR的Treg在临床上更相关的瓜氨酸化波形蛋白来源存在下进行识别和信号传导的能力,我们在从RA患者关节收获的已知富含嗜中性粒细胞和嗜中性粒细胞细胞外陷阱 (NET) 的滑液 (RA中CV的主要产生者之一) 存在下共培养CV-CAR Treg。在与来自患有RA或痛风的患者的滑液共培养3天后,将最新的用作阴性对照,分析了Treg细胞中CD71的表达。在来自患有痛风的患者的滑液存在下,在任何Treg亚组中均未观察到CD71表达的诱导 (图18B)。然而,当与来自RA患者的滑液共培养时,CV.28z-CAR EGFRt⁺Treg表达高百分比的激活标记CD71,而存在于同一孔中的EGFRt-Treg或CD19.28z-CAR Treg和CD19.41BBz-CAR Treg未显示任何激活迹象 (图18B和图18C)。与这些数据一致,在来自RA患者的滑液中检测到瓜氨酸化波形蛋白,而在来自患有痛风的患者的滑液中未检测到瓜氨酸化波形蛋白 (图21)。

[0264] 实施例10:在来自RA患者的无细胞滑液的存在下激活CV.28z-CAR Treg。

[0265] 瓜氨酸化波形蛋白被描述为主要存在于发炎关节的细胞外基质中,这表明CV.28z-CAR Treg能够有效结合其靶抗原可能不需要细胞间的相互作用。为了验证该假设,我们通过使用密度梯度离心后获得的上层,比较了在来自RA患者的全滑液或无细胞滑液存在下共培养后CV.28z-CAR Treg的激活特征。我们的数据揭示,在来自RA患者的滑液中存在或不存在细胞的情况下,类似百分比的CV.28z-CAR Treg响应于与所述滑液的共培养而表

达CD71(图22A和图22B)。总之,这些数据有力地支持以下概念:表达CV.28z-CAR的Treg将能够结合其在位于患有RA的患者发炎关节中的细胞外基质中的靶抗原。

[0266] 实施例11:在CAR介导的刺激后CV.28z-CAR Treg细胞的抑制功能

[0267] 为了评估CAR介导的刺激后CV.28z-CAR Treg细胞的抑制能力,使用CRISPR/Cas9技术敲除Treg中的内源性TCR以产生TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺Treg(图23A和图23B)。使用被板结合的抗CD3抗体刺激的CD4⁺T效应细胞作为反应者进行抑制测定。以不同的反应细胞与抑制细胞比率,评估了在CV-pep-SA珠(CVb)(图24A和图24B)或波形蛋白珠(图24B)的存在下,TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺Treg抑制这些TCR刺激的反应T细胞的能力。我们的数据显示,TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺Treg在CV-SA珠存在下在CAR介导的刺激后具有抑制性,而TCR^{KO} CD19.28z-CAR⁺Treg在CV-SA珠存在下无抑制性。

[0268] 实施例12:材料和方法

[0269] CV-CAR Treg与来自RA患者的滑液的共培养:通过使用与疾病更相关的瓜氨酸化波形蛋白来源,使用来自Jonathan Graf提供的RA患者或阴性对照痛风患者的滑液(SF)样品评估CV-CAR Treg通过CAR被激活的能力。当滑液样品数量足够时,用1X PBS稀释部分滑液并通过密度梯度离心法加工。在离心后收集上层(不含细胞)并储存在-80度下。在第一轮刺激后的第9天,将全滑液样品和不含细胞的滑液样品解冻,并以不同比率与补充有IL-2的T细胞培养基混合。将CAR T细胞以每孔50,000个细胞接种到96孔板中,并在每个孔中添加200μl的SF与T细胞培养基的混合物。在三天后,如前所述,用对CD4、CD71、CD25具有特异性的抗体和LIVE/DEAD可固定蓝色染料对细胞进行染色。通过在LIVE CD4⁺群体上设门控,通过流式细胞术获得表达CD71的细胞的百分比和CD25的MFI。

[0270] 通过直接ELISA检测滑液中瓜氨酸化波形蛋白的存在:将96孔ELISA板在4°C下用10μg/ml的鸡抗波形蛋白Ab进行O/N涂布。将孔洗涤三次,并在RT下用200μl的1X PBS1%BSA封闭1h,然后再次洗涤。添加在PBS1%BSA 0.1% Tween 20中稀释的滑液上清液的不同样品,并在RT下孵育1.5h。在一些其他孔中,分别添加波形蛋白和瓜氨酸化波形蛋白来代替滑液用作阴性和阳性对照。将孔洗涤三次。添加100μl的10μg/ml的小鼠嵌合BVCA1 IgG(具有小鼠CH2和CH3结构域)或同种型对照。在RT下孵育1h后,将孔洗涤3次,并以1/1000的稀释度向孔中添加山羊抗小鼠IgG2a二抗-AP缀合物(Abcam,ab98695)。将孔洗涤三次,并添加100μl的Step pNPP底物溶液。在45min后,用50μl NaOH 3M停止反应,并在酶标仪中于405nm处读取吸光度。

[0271] 使用CRISPR/Cas9技术产生敲除TCR的CV-CAR⁺Treg细胞。如实施例3所述,通过流式细胞术从新鲜PBMC中分离Treg细胞,以90g离心10min,并使用每100万个细胞20μl缓冲液重悬于Lonza电穿孔缓冲液P3中。然后使用具有脉冲代码EH115的Lonza 4D 96孔电穿孔系统,用CRISPR-Cas9核糖核蛋白(RNP)复合物对Treg细胞进行电穿孔。在电穿孔后,立即向每个孔中添加80μl预热的培养基,并放置细胞37°C下静置15min。然后,如实施例3所述,在300UI IL-2/ml的存在下,以1:1的比率用抗CD3/CD28珠刺激Treg细胞。在分选和电穿孔后两天,如实施例3所述用不同的CAR构建体转导Treg细胞。7天后,基于EGFRt和CD3的表达将细胞分选为TCR^{KO} CAR⁺或TCR⁺CAR⁺群体。然后在300UI IL-2/ml的存在下,以1:1的比率用抗CD3/CD28珠再刺激细胞5至6天。

[0272] 用TCR^{KO} CAR⁺Treg进行抑制测定。通过基于[³H]胸苷掺入测量增殖来评估Treg抑

制。在扩增12天后,从TCR^{KO} CV.28z-CAR⁺Treg和TCR^{KO} 19.28z-CAR⁺Treg培养物中去除抗CD3/CD28珠。在抑制测定之前,将细胞静置2天。在测定的前一天,将CD4⁺T效应细胞(反应者细胞)解冻,并在IL-230UI/ml的存在下,在37°C 5%CO₂下保持过夜。将圆底96孔板用抗CD3抗体以5mg/ml涂布过夜,并用1X PBS洗涤。在测定当天,将TCR^{KO} CAR⁺Treg群体和反应细胞洗涤两次,以从培养基中去除残留的IL-2。然后将细胞以每孔50,000个反应细胞铺板于抗CD3 Ab涂布的孔中,并在存在波形蛋白-SA-珠、CV-SA-珠、CD19-珠或无珠的情况下,以不同的反应者:Treg比率(2:1至64:1)添加TCR^{KO} CAR⁺Treg。3天后,向每个孔中添加20μl [³H]胸苷(1μCi)。16小时后,将板在-20度下冷冻。在Packard FilterMate收获机上收获板,并在Packard TopCount闪烁和发光计数器(Perkin Elmer,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)上读取每个孔的每分钟计数(CPM)。对于这两种测定,抑制百分比的计算如下:抑制% = 1 - [平均CPM (Treg+反应者) / 平均CPM (仅反应者)] × 100%。

[0273] 综上所述,本发明包括但不限于以下各项:

[0274] 1. 一种嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含抗原特异性结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3ζ信号传导结构域,其中所述抗原特异性结合结构域特异性结合包含波形蛋白多肽或其肽的抗原。

[0275] 2. 根据项1所述的嵌合抗原受体,其中所述波形蛋白多肽或其肽经翻译后修饰,包括瓜氨酸化波形蛋白(CV)多肽或其肽。

[0276] 3. 根据项1或2所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原特异性结合结构域包含抗体、抗体片段、骆驼科动物纳米抗体或适体。

[0277] 4. 根据项3所述的嵌合抗原受体,其中所述抗体片段是单链片段。

[0278] 5. 根据项4所述的嵌合抗原受体,其中所述单链片段是单链可变片段(scFv)。

[0279] 6. 根据项1-5中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。

[0280] 7. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:

[0281] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;

[0282] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;

[0283] c) 所述CD3ζ信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0284] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0285] 8. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:

[0286] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;

[0287] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;

[0288] c) 所述CD3ζ信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0289] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

[0290] 9. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:

[0291] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;

- [0292] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;
- [0293] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0294] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。
- [0295] 10. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:
- [0296] a) 所述铰链结构域由SEQ ID NO:8的核酸序列编码;
- [0297] b) 所述跨膜结构域由SEQ ID NO:9的核酸序列编码;
- [0298] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;
- [0299] d) 所述CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。
- [0300] 11. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:
- [0301] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;
- [0302] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;
- [0303] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0304] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。
- [0305] 12. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:
- [0306] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;
- [0307] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;
- [0308] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0309] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。
- [0310] 13. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:
- [0311] a) 所述铰链结构域由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;
- [0312] b) 所述跨膜结构域由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;
- [0313] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0314] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。
- [0315] 14. 根据项1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中:
- [0316] a) 所述铰链结构域由SEQ ID NO:8的核酸序列编码;
- [0317] b) 所述跨膜结构域由SEQ ID NO:9的核酸序列编码;
- [0318] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;
- [0319] d) 所述41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。
- [0320] 15. 根据项1-14中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少50%序列同一性的CV肽。
- [0321] 16. 根据项1-14中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述CV-CAR特异性结合与SEQ

ID NO:21或22具有至少75%序列同一性的CV肽。

[0322] 17. 根据项1-14中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述CV-CAR特异性结合与SEQ ID NO:21或22具有至少95%序列同一性的CV肽。

[0323] 18. 根据项1-14中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述CV-CAR特异性结合包含SEQ ID NO:21或22的CV肽。

[0324] 19. 一种分离的T细胞,所述分离的T细胞被修饰以表达:嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)的单链可变片段(scFv)。

[0325] 20. 根据项19所述的分离的T细胞,其中所述共刺激结构域包含CD28或

[0326] 41BB多肽。

[0327] 21. 根据项19或20所述的分离的T细胞,其中:

[0328] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0329] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0330] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0331] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0332] 22. 根据项19或20所述的分离的T细胞,其中:

[0333] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0334] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0335] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0336] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

[0337] 23. 根据项19或20所述的分离的T细胞,其中:

[0338] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0339] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0340] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0341] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

[0342] 24. 根据项19或20所述的分离的T细胞,其中:

- [0343] a) 所述CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0344] b) 所述CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0345] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;
- [0346] d) 所述CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。
- [0347] 25. 根据项19或20所述的分离的T细胞, 其中:
- [0348] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0349] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0350] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0351] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。
- [0352] 26. 根据项19或20所述的分离的T细胞, 其中:
- [0353] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0354] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0355] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0356] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。
- [0357] 27. 根据项19或20所述的分离的T细胞, 其中:
- [0358] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0359] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0360] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;
- [0361] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。
- [0362] 28. 根据项19或20所述的分离的T细胞, 其中:
- [0363] a) 所述CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0364] b) 所述CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0365] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;
- [0366] d) 所述41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。
- [0367] 29. 根据项19-28中任一项所述的分离的T细胞, 其中所述T细胞是哺乳动物调节性T细胞 (Treg)。
- [0368] 30. 根据项29所述的分离的T细胞, 其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺

- [0369] CD127⁻、FOXP3⁺。
- [0370] 31. 一种表达载体, 所述表达载体编码根据项1-18中任一项所述的嵌合抗原受体(CAR)。
- [0371] 32. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含根据项31所述的表达载体。
- [0372] 33. 一种治疗被诊断为类风湿性关节炎的受试者的方法, 所述方法包括:
- [0373] 从获自所述受试者的生物学样品分离T淋巴细胞;
- [0374] 将CD4⁺T调节性细胞(Treg)与常规T细胞(Tconv)分开, 其中所述Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127⁻, 并且所述Tconv是CD4⁺CD25⁻CD127⁺;
- [0375] 用编码特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)抗原的嵌合抗原受体(CAR)的表达载体转导所述Treg细胞;
- [0376] 用抗CD3/CD28珠至少一次离体扩增转导的Treg, 以获得对所述CV抗原具有特异性的扩增的Treg细胞; 并且
- [0377] 将所述Treg重新注入所述受试者中, 从而治疗所述受试者。
- [0378] 34. 根据项33所述的方法, 其中所述Treg细胞是自体细胞。
- [0379] 35. 根据项33或34所述的方法, 其中所述CAR包含连接至至少一个共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的抗原结合结构域, 其中所述抗原结合结
- [0380] 构域包含特异性结合瓜氨酸化波形蛋白(CV)的单链可变片段(scFv)。
- [0381] 36. 根据项35所述的方法, 其中所述共刺激结构域包含CD28或41BB多肽。
- [0382] 37. 根据项35或36所述的方法, 其中:
- [0383] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0384] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0385] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码; 和/或;
- [0386] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。
- [0387] 38. 根据项35或36所述的方法, 其中:
- [0388] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0389] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0390] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码; 和/或;
- [0391] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。
- [0392] 39. 根据项35或36所述的方法, 其中:
- [0393] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0394] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0395] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0396] d) 所述CD28共刺激结构域由与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

[0397] 40. 根据项35或36所述的方法, 其中:

[0398] a) 所述CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域;

[0399] b) 所述CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0400] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;

[0401] d) 所述CD28共刺激结构域由SEQ ID NO:11的核酸序列编码。

[0402] 41. 根据项35或36所述的方法, 其中:

[0403] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0404] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少50%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0405] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少50%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0406] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少50%序列同一性的核酸序列编码。

[0407] 42. 根据项35或36所述的方法, 其中:

[0408] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0409] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少75%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0410] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少75%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0411] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少75%序列同一性的核酸序列编码。

[0412] 43. 根据项35或36所述的方法, 其中:

[0413] a) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:8具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的铰链结构域;

[0414] b) 所述CAR包含由与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的核酸序列编码的跨膜结构域;

[0415] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由与SEQ ID NO:10具有至少95%序列同一性的核酸序列编码;和/或;

[0416] d) 所述41BB共刺激结构域由与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的核酸序列编码。

[0417] 44. 根据项35或36所述的方法, 其中:

- [0418] a) 所述CAR包含由SEQ ID NO:8的核酸序列编码的铰链结构域;
- [0419] b) 所述CAR包含由SEQ ID NO:9的核酸序列编码的跨膜结构域;
- [0420] c) 所述CD3 ζ 信号传导结构域由SEQ ID NO:10的核酸序列编码;和/或;
- [0421] d) 所述41BB共刺激结构域由SEQ ID NO:12的核酸序列编码。
- [0422] 45. 根据项33-44中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者给予一种或多种抗炎剂和/或治疗剂。
- [0423] 46. 根据项45所述的方法,其中所述抗炎剂包括一种或多种特异性结合促炎细胞因子的抗体。
- [0424] 47. 根据项46所述的方法,其中所述抗体是抗TNF α 、抗IL-6或其组合。
- [0425] 48. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域,其中所述抗原特异性结构域包含抗体或抗体片段。
- [0426] 49. 根据项48所述的嵌合抗原受体,其中所述抗体片段是单链可变片段 (scFv), 其特异性结合经翻译后修饰的抗原。
- [0427] 50. 根据项48或49所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激结构域包含CD28
- [0428] 或41BB多肽。
- [0429] 51. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据项1-18和48-50中任一项所述的嵌合抗原受体 (CAR)、根据项19-30中任一项所述的分离的T细胞、根据项31所述的表达载体,或根据项32所述的宿主细胞。

序列表

SEQ ID NO	序列	描述
1	gttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaaagcttgccctgagtgtctcaagtag tgtgtcccgtctgtgtgtgactctggtaactagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaaatctctagcagtggtgccccgaacag ggacttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgcacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggg cggcgactggtgagtacgccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattagcggggg agaattagatcgatgggaaaaattcggtaaggccagggggaaagaaaaataaataaaacatatagtagggcaagcaggggagc tagaacgattcgcatgtaacctggcctgttagaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacagg atcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaaggagcttag acaagatagaggaaagcaaaacaaaagtaaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagcca aaattaccctatagtcagaacatccaggggcaaatggtagcatcaggccatcacctagaactttaaatgcatgggtaaaagtagtagaa gagaaggcttcagcccagaagtataccatgtttcagcattatcagaaggagccaccccacaagatttaaacaccatgctaacaacag tggggggacatcaagcagccatgcaaatgttaaaagagaccatcaatgaggagctgcaggcaagagaagagtggtgcagagaga aaaaagagcagtggggaataggagctttgttccttgggtcttgggagcagcaggagcactatgggcgcagcgtcaatgacgtgacgg tacaggccagacaattattgtctgtatagtcagcagcagacaatttctgaggggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcac agtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctc tggaaaactatttgcaccactgctgtgccttggatctacaaatggcagttatccacacattttaaaagaaaaggggggatttggggggtg cagtgcaggggaaagaatagtagacataatgaacagacatacaaaactaaagaattacaaaacaaattacaaaaattcaaaatttcgg gttattacagggacagcagagatccagtttgggatcaattgcatgaagaatctgcttaggggttaggcgttttgcgctgcttcgcgaggat ctgcgatcgtccggtgccgtcagtgaggcagagcgcacatcggccacagtcgggagagttggggggaggggtcggcaattgaac cggfctctagagaagggtggcgcgggtaaaactgggaaagtgtgtgtactggctcggccttttcccgagggtgggggagaaccgt atataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacggggttgcggcagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcactctctct tcacgcgccgccgcctacctgaggccgccatccacgccggtgagtcgcggttctgccgcctcccgctgtggtgcctcctgaactgc gtccgccgtctagtaagtttaagctcaggtcgagaccgggcttctgctggcgctcccttgagcctacctagactcagccggtctcc acgctttgctgacctgctgtgctcaactctacgtcttctttctgttctgtctgcgcgttacagatccaagctgtgaccggcgctacggc tagcgccgccaccatgctgtgtgtgtgaccagcctgctgtgtgcgagctgccccaccccgcttctgtgateccccGAGGTGA AACTAATAGAATCTGGGGGAGGCTTGGTTGAGCCAGGGCGGTCTCTGAGACTCGC GTGTACAACGTCTGGATTACCTTTGCCGACTACGGTTTGTCTGGTTCCGCCAGGG TCCCGGCAAGGGCCTTGAATGGGTAGGTTTACTGGACCGAAACACCTCGGTGAG	抗 CV CAR-C D28z 表 达载体

[0430]

[0431]

ACAACAGAATGCGCCCCGTCTGTGGAAGACAGATGCACCATCTCAAGAGATGATT
 CCAAAAGCACCGTCTATCTGCAGATGCACAGGCTCCAACACGAAGACACAGCCGT
 GTACTTCTGTGTTGGACCTTGGTTCGGCGACTTATTAATGTGGGGCCAGGGAACCC
 TGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCTCCGGAGGCTCAACTTCTGGCTCCGGTAAGCCA
 GGCAGCGGAGAAGGTAGTAGTGATCCGCGCGGCCATCCAGATGACCCAGTCTC
 CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCTCCATCACTTGCCGGGCAACTC
 AGGACATCAGCACATCTTTAGGCTGGTATCACCAGAGACCCGGGAAAGCCCCGAG
 GCTCCTGATCTATGGTGCTTCGAAGGTACAACTGGGGTCCCATCACGATTCAGCG
 GCAATGGGTCTGGCACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT
 ATAGGGACTTATTATTGTCTACAAGATGATGGTTTCCCGTTCAGTGTGGCCAGGG
 CACCAAGCTGGACATCAAACGCGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTT
 ACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT
 TTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTtctgggtgctgggtgctggagggctgct
 ggctgtctacagcctgtggtcaccgtggccttcacatctttgggtgaggagtaaggaggagcaggtcctgcacagtactacatgaa
 catgactccccgcccccggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtcccggtg
 aagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacagctgaacctgggcagaagggaaga
 gtacgacgtcctgggataagcgagagggcgccgacccctgagatggcgccaaagcctcggcggaagaacccccagggaagcctgtata
 acgaactgcagaaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcgcatgaaggcgagcgaggcgggcgaaggccacgacg
 gcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaaggctcagggcgccg
 gagagggcagaggaaagtcttaacatgcggtgacgtggaggagaatccggccctaggatgcttctcctggtgacaagcctctgctct
 gtgagttaccaccccagcattcctcctgacccacgcaaaagtgtgaacggaatagggttggtgaatttaaagactcactctcataaatg
 ctacgaatattaacactcaaaaactgcacctcatcagtgccgatctccacatcctgcccgtggcatttaggggtgactccttcacata
 ctctcctctggtatccacagggaactggatattctgaaaaccgtaagggaatcacagggttttctgctgattcaggttgccctgaaaacagg
 acggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatagcgccgaggaccaagcaacatggtcagtttctcttcagctgtcagcctgaaca
 taacatccttgggattacgtccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatttcaggaaacaaaatttgctgtatgcaaatacaataa
 actgaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaccaaataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggt
 ctgcatgcctgtgtcccccgagggtgtggggcccgagccaggactgctcttgcgggaatgtacccgagggcaggga
 tgcgtggacaagtgaacctcttgagggtgagccaaaggagtttgggagaactctgagtcatacagtgccaccagagtgccctgcc
 tcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtggtcccactacattgacggccccactgcgtcaaga
 cctgccccgagagtcagtgaggagaaaacaacacctggcttggaagtacgcagacgcccggccatgtgtgccacctgtgccatcaaa
 ctgcacctacggatgactggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatgccactgggatgtggggg

[0432]

ccctcctcttgcctgctgggtggccctggggatcggcctcttcatgtgagcggccgctctagaccgggctgcaggaaatcgatatcaag
 cttatcgataaacaacctcgtgattacaaaatttgtaaagattgactgggtattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatacgtcgttt
 aatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttcctccttgataaatcctgggtgctgctctttatgaggagttggcccgtt
 gtcaggcaacgtggcgtgggtgactgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccggga
 ctttcgctttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcctgctgacaggggctcggcgtttgggactga
 caatfccgtggtgttcgggaaatcatcgtccttcttggctgctcgcctgtgttggccacctggattctgcggggacgtccttctgtac
 gtcccttcggccctcaatccagcggaccttctcccgcggcctgctgcccgtctgcggccttctccgcgtcttcgccttcgcctcagac
 gagtcgcatccttggggccctcccgcatcgataccgtcgactagccgtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagat
 cttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaaagggttaattcactccaaaagacaagaactgcttttgcctgtactgggtctc
 tggtagaccagatctgagcctgggagctctctggtactagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagt
 agtgtgtcccgtctgtgtgactctggtactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagaatcgatatcaa
 gcttaccgataccgtcgacctcggggggggcccggtacccaatcgcctatagtgagtcgtattacaattcactggccgtcgtttacaa
 cgtcgtgactgggaaaacccgtgcgttacccttaactgccttgcagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaaggcc
 cgcaccgatcgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggaaattgtaagcgttaattttgttaaaatcgcgttaaatgttgt
 taaacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttcca
 gtttgaacaagagtcactattaaagaaactggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtga
 accatcacctaatacaagtttttgggtgcgaggtgccgtaaaactaaatcgaacccctaaaggagccccgatttagagcttgacgg
 ggaaagccggcgaactggcgagaaagggaaggaaagcgaaggagcggcgctagggcgtggcaagtgtagcgggtcac
 gctgcgctaaccaccacaccgcgcgttaatgcgccgtcacaggcgcgctcaggtggcacttttcgggaaatgtgcgcggaacc
 cctattgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataattgaaaaaggaaagta
 tgagtattcaacatttcgctgcgcccttatcccttttgcggcatttgccttctgttttgcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaaga
 tgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtgacacgaactgcatcacaacgcggtgaagatccttgagagtttcgccccgaagaactgt
 ttccaatgatgagcacttttaagttctgtatgtggcgcggtattatccgtattgacccgggcaagagcaactcggtcgccgcataca
 ctattctcagaatgacttgggtgactcaccagtcacagaaaaatccttacggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccca
 taacatgagtgataaactcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaactggggg
 atcatgtaactgccttgatcgttgggaacgggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatg
 gcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaaactacttactctgcttccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagttg
 caggaccacttctgcctcggccctccggctggctggttattgtgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcgggtatcattgca
 gactggggccagatggtaagccctccgfatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagat
 cgctgagataggctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttaactcatatatacttttagattgattaaaactcatttttaatta
 aaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttccactgagcgtcagaccccgtagaaa

[illegible]

[0434]

gagaaggctttcagccagaagtataccatgtttcagcattatcagaaggagccacccacaaagatttaaacaccatgctaacacag
 tgggggacatcaagcagccatgcaaatgttaaaagagaccatcaatgaggaagctgcaggcaagagagaagtgtgcagagaga
 aaaaagagcagtggaataaggagctttgttccttgggttctgggagcagcagggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgtgacgg
 tacaggcca gacaattattgtctgtatagtcagcagcagaacaattgtctgagggtattgaggcgaacagcatctgttgaactcac
 agtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctctggggatttggggttctc
 tggaaaactatttgcaccactgtgtgccttgatctacaaatggcagttatccacaaattttaaagaaaagggggattgggggta
 cagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaacaaattacaaaaattcaaaatttcgg
 gtttattacaggacagcagagatccagtttggggatcaattgcatgaagaatctgcttagggtaggcgttttgcgtcttcgcgaggat
 ctgcgatcgtccggtgccgtcagtgaggcagagcgcacatcgcacacagctcccgagaagttgggggaggggtcggcaattgaac
 cgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgtgtgtactggctccgttttcccgagggtgggggagaaccgt
 atataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcattctct
 tcacgcgccgccgccctacgtgagggcccatccacgccggttgatgcggttgcgcctcccgctgtgtgcctcctgaactgc
 gtccgccgtctagtaagtttaagctcaggtcagaccgggcttctgtccggcgtcccttggagcctacactagactcagccggctctcc
 acgttttgcctgacctgctgtcactctacgttttctgtttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgctacggc
 tagcgccgccaccatgctgctgtgtgtgaccagcctgctgtgtgcgagctgccccacccgcctttctgtgatccccGAGGTGA
 AACTAATAGAATCTGGGGGAGGCTTGGTTGAGCCAGGGCGGTCTCTGAGACTCGC
 GTGTACAACGTCTGGATTACCTTTGCCGACTACGGTTTGTCTGGTTCCGCCAGGG
 TCCCGGCAAGGGCCTTGAATGGGTAGGTTTCACTGGACCGAAACACCTCGGTGAG
 ACAACAGAATGCGCCCCGTCTGTGGAAGACAGATGCACCATCTCAAGAGATGATT
 CCAAAGCACCGTCTATCTGCAGATGCACAGGCTCCAACACGAAGACACAGCCGT
 GTACTTCTGTGTTGGACCTTGGTTCGGCGACTTATTAATGTGGGGCCAGGGAACCC
 TGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCTCCGGAGGCTCAACTTCTGGCTCCGGTAAGCCA
 GGCAGCGGAGAAGGTAGTAGTGATCCGCGCGCGCCATCCAGATGACCCAGTCTC
 CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCTCCATCACTTGCCGGGCAACTC
 AGGACATCAGCACATCTTTAGGCTGGTATCACCAGAGACCCGGGAAAGCCCCGAG
 GCTCCTGATCTATGGTGCTTCGAAGGTACAACTGGGGTCCCATCACGATTCAGCG
 GCAATGGGTCTGGCACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT
 ATAGGGACTTATTATTGTCTACAAGATGATGGTTTCCCGTTCACTGTTGGCCAGGG
 CACCAAGCTGGACATCAAACGCGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCTT
 ACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCT
 TTGTCCAAGTCCCCTATTTCGGGACCTTCTAAGCCttctgggtgctggtggtgctggaggcgtgct

[0435]

ggctgtctacagcctgtggtcaccgtggccttcacatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaacat
 ttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtgctgccgatttcagaagaagaagaggaggtgaactgcgggtg
 aagttcagcagaagcggcagccccctgcctaccagcaggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaaagggaaga
 gtacgacgtcctggataagcggagaggccggaccctgagatggcggaagcctggcggaagaacccccaggaaggcctgtata
 acgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaaggcgagcgaggcgggcgaaggccacgacg
 gcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgccccaaagctcagggcgcg
 gagaggcgagaggaaagtcttaacatgcgggtgacgtggaggagaatccggccctaggatgcttctcctggtgacaagccttctgctct
 gtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgaaagtgtgaacggaataggattgtgaatttaaagactcactctccataatg
 ctacgaatattaacacttcaaaactgcacctecatcagtggtgatctccacatcctgccgggtggcatttaggggtgactccttcacacata
 ctctcctctggtaccacaggaactggatattctgaaaaccgtaagggaatcacagggttttctgctgattcaggcttgccctgaaaacagg
 acggacctcatgcttggagaacctagaaatcatcgcggcaggaccaagcaacatggcagtttctcttcagctcgtcagcctgaaca
 taacatcctgggattacgtccctcaaggagataagtgtggagatgtgataattcaggaaacaaaaattgtgctatgcaaatacaataa
 actggaaaaaactgttgggacctccggtcagaaaacaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggccagggt
 ctgcatgcttgcctccccgagggtgctggggcccgagcccaggactgcgtctctgccggaatgtcagccgaggcaggga
 tgcgtggacaagtgcacctctggagggtgagccaaggagttgtggagaactctgagtgcatagctgccaccagagtgctgcc
 tcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggccccactgcgtcaaga
 cctgcccggcaggagtcattggagaaaacaacacctggcttggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatcaaa
 ctgcacctaggtgactgggccaaggtttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgctcatcgccactgggatgtggggg
 ccctcctctgtgctggtggtggccctgggatcggcctctcatgtgagcggcgctctagacccgggctgcaggaattcgatacaag
 cttatcgataatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatacgtgcttt
 aatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttcttctcctctgtataaatcctgggtgctgctctttatgaggagttgtggccgtt
 gtcaggcaacgtggcgtgtgtgactgtgttgcgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccactgtcagctccttccggga
 cttcgttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcttgcctgctggacaggggctcggctgttgggactga
 caattccgtggtgtgtcgggaaatcatgctccttcttggctgctcgcctgtgtgccacctggattctgcggggacgtccttctgtac
 gtcccttggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgctgcccgtctgcccctcttccgctcttgccttcgacctcagac
 gagtcggatcctccttggccgcctccccgacatgataccgtcgactagccgtaaccttaagaccaatgactacaaggcagctgtatg
 cttagccacttttaaaagaaaagggggactggaagggttaattcactccaaagaagacaagatctgcttttgcctgtactgggtctctc
 tgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagt
 agtgtgtgcccgtctgtgtgactctgtaactagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagaattcgatatcaa
 gcttatcgataccgtgcacctcagggggggcccggtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacaattcactggccgtcgtttacaa
 cgtcgtgactgggaaacccctggcgttaccctaactaatgccttgacgacatcccccttcccaagctggcgtaatagcgaaggcc

[0436]

cgcaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggaattgtaagcgtaataattttgttaaaatcgcgttaaattttgt
 taaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtggttcca
 gtttgaacaagagtcactattaaagaaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaccgtctatcaggggcgatggccactacgtga
 accatcacctaatacaagtttttgggtcgagtgccgtaaaactaaatcgaaccctaaggaggccccgatttagagcttgacgg
 ggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagggaaggaaagcaaaaggagcggcgctaggcgctggcaagtgtagcgggtcac
 gctgcgcgtaaccaccacaccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgctcaggtggcactttcgggaaatgtgcgcggaacc
 cctatttttttttctaaatactcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataattgaaaaaggagagta
 tgagtattcaacatttcgctgcgccctattccctttttggcgactttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaaga
 tgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgt
 ttccaatgatgagcacttttaaaagtctgtatgtggcgcggtattatcccgattgacggcgaggcaagagcaactcggcgccgataca
 ctatttcagaatgacttggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccat
 taacatgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatggggg
 atcatgtaactgccttgatcgttggaaccggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatg
 gcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaaactacttactagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagttg
 caggaccacttctgcgctcgccctccggctgctggtttattgctgataaatcggagccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgca
 gcaactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagat
 cgtctgagatagggtcctcactgattaagcatttgtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagatttaaaacttatttttaattta
 aaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaa
 agatcaaaaggatctcttgagatcctttttctgcgctaactgtctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggttgggttcc
 ggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaactgttcttctagtgtagccgtagttagg
 ccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaatcctgttaccagtggtgctgctccagtgccgataagtcgtgtct
 taccgggttgactcaagacgatagttaccggataagcgcagcggctcgggtgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggga
 gcgaacgacctacaccgaactgagatactacagcgtgagctatgaaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcgacaggt
 atccggtgaagcggcagggcgcgaacaggagagcgcacgagggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatgtcctgtcgggtt
 cgcacctctgacttgagcgtcatttttggatgctcgtcaggggggggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggt
 tcttgcccttttctggccttttctcatatgttcttctcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgactgatac
 cgtctcccgagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtgagcagggaagcgggaagagcggcccaatcgcgaaccgcctctcccc
 gcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaatattgtgagtta
 gctcactcattaggcaccaggtttacactttatgcttccggctcgtatgtgttggaattgtgagcggataacaatttcacacagaaa
 cagctatgacatgattacgcaagctcgaaattaacctcactaaaagggaacaaaagctggagctccaccgcgggtggcgccctcag
 gtcgagatccggctgaccagcaaccatagtcggccctaaactccgccatcccgccctaaactcggccagttccgcccattctccgcc

[0437]

	ccatggctgactaattttttatgatgcagaggccgagggccctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttggagg cctaggcttttgcaaaaagcttcgacgggtatcgattggctcatgtccaacattaccgccatgttgacattgattattgactagttaataagtaa tcaattacggggcattagttcatagcccatatatggaggtccgcttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacga ccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggta aactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtagcccccattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatg cccagtagcatgaccttattggactttcctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgctattaccatggtgatgcgttttggcagtagcatc aatggcggtggatagcgggttgactcacggggatttccaagctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacg ggactttccaaaatgtcgtacaactcggcccattgacgcaaatggcggtaggcggtgtacggaattcggagtgaggagccctcagat cctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctg	
3	VYATRSSAVRLRSSVP	人波形 蛋白肽 60-75
4	AYVTRSSAVRLRSSVP	鼠波形 蛋白肽 60-75
5	gaggtgaaactaatagaatctgggggaggcttggttgagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctgattcacctttgcc gactacggtttgctggttccgccagggtcccggcaaggcccttgaatgggtagggttccactggaccgaacacctcgggtgagacaaca gaatgcgcccgctgtggaagacagatgcaccatctcaagagatgattcacaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaaca cgaagacacagccgtgtactctgtgttggaccttgggtcggcgacttattaatgtggggccagggaaccttggcaccgtctcctcagcta gtcctggaggctcaactctgtgctccggttaagccaggcagcggagaaggtatgtagtggtatccgcgcgccatccagatgaccagtc tccatcctcctgtctgcatctgttgagacagagctccatcacttgcgggcaactcaggacatcagcacatcttagctgggtatcacca gagaccgggaaagccccgaggtcctgatctatggtgcttcaaggtacaactgggtcccatcacgattcagcggcaatgggtctg gcacagagttcactctaccatcagcagcctgcagcctgaagatataggacttatttctacaagatgatggttcccgttcaactgttg gccagggcaccaagctggacatcaaacgcgcggcccaattgaagttatgtatcctcctcctacctagacaatgagaaggaatgga accattatccatgtgaaagggaacaccttgtccaagtccctatttccggaccttctaagcccttctgggtgctggtgtgtgctggagg cgtgtggcctgctacagcctgctgtcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtactac atgaacatgactccccggcccccgggcccaccgcaagcattaccagccctatgcccaccacgcgacttcgcagcctatcgtctcc gggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagg gaagagtacgagctcgtgataagcggagagccgggacctgagatggcgcggaagcctcgcggaagaacccccaggaaggc ctgtataacgaactgcagaagacagaatggccgaggcctacagcagatcgcatgaaggcgagcggagggcggaaggcc acgacggcctgtatcaggcctgtccaccgccaccaaggatactacagcgcctgcacatgcaggccctgcccccaagg	抗 CV CAR-C D28z , 核苷酸

[0438]

6	gagggtgaaactaatagaatctgggggaggcttggttgagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctggattcacctttgcc gactacggtttgtcctggttccgaggggtccggcaaggccttgaatggtaggtttcactggaccgaaacacctcggtgagacaaca gaatgcgccccgtctgtggaagacagatgcaccatctcaagagatgattccaaaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaaca cgaagacacagccgtgtacttctgtgtggaccttggttcggcgacttattaatgtggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcta gctccggaggctcaactctggtccgtaagccaggcagcggaaggtagtagtggtatccgcgcgccatccagatgaccagtc tcctcctccctgtctgcatctgttgagacagagtcctcatcacttgcgggcaactcaggacatcagcacatctttaggtgggtatcacca gagaccggggaagccccgaggctcctgatctatggtgcttgaaggtagaaactgggtcccatcacgattcagcggcaatgggtctg gcacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatataggacttatttctacaagatgatggttcccggtcactgttg gccagggcaccaagctggacatcaaacgcgcggccgaattgaagttagtctcctcctctacatagacaatgagaaggaatgga accattatccatgtgaaagggaacaccttggccaagtccctatttccggaccttctaagcccttgggtgctggtggtggtcgagg cgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaaac aaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggagatgctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactg cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcaggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaag ggaagagtagcagctcctggataagcgagagggccgggacctgagatggcgcgcaagcctcggcggaagaacccccaggaagg cctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcgcatgaaggcgagcggaggggggcaagggc cacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgcccccaagg	抗 CV CAR-41 BBz, 核 苷酸
7	gagggtgaaactaatagaatctgggggaggcttggttgagccaggcggtctctgagactcgcgtgtacaacgtctggattcacctttgcc gactacggtttgtcctggttccgaggggtccggcaaggccttgaatggtaggtttcactggaccgaaacacctcggtgagacaaca gaatgcgccccgtctgtggaagacagatgcaccatctcaagagatgattccaaaagcaccgtctatctgcagatgcacaggctccaaca cgaagacacagccgtgtacttctgtgtggaccttggttcggcgacttattaatgtggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcta gctccggaggctcaactctggtccgtaagccaggcagcggaaggtagtagtggtatccgcgcgccatccagatgaccagtc tcctcctccctgtctgcatctgttgagacagagtcctcatcacttgcgggcaactcaggacatcagcacatctttaggtgggtatcacca gagaccggggaagccccgaggctcctgatctatggtgcttgaaggtagaaactgggtcccatcacgattcagcggcaatgggtctg gcacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatataggacttatttctacaagatgatggttcccggtcactgttg gccagggcaccaagctggacatcaaacgcgcggccgca	抗 CV scFv, 核 苷酸
8	attgaagttagtctcctccttacctagacaatgagaaggaatggaaccattatccatgtgaaagggaacaccttggccaagtccc ctatttccggaccttctaagccc	hCD28 间 隔 子, 核 苷酸
9	ttctgggtgctggtggtggtcggaggcgctgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg	CD28 TM 结

[0439]

		构域， 核苷酸
10	cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaag ggaagagtagcagcgtcctggataagcggagagggccgggaccctgagatggcgccgaagcctcggcggagaacccccaggaagg cctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcgcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggc cacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaagg	CD3 ζ 细 胞内结 构域， 核苷酸
11	aggagtaaggaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccccggggcccccgaagcattaccagccc tatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtcc	CD28 细 胞内结 构域， 核苷酸
12	aaacggggcagaaagaactcctgtatataatcaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagctgc cgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactg	41BB 细 胞内结 构域， 核苷酸
13	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGE TTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGDLLMWGQGTLV TVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCRATQDISTSL GWYHQRPGKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYICYLQDD GFPFTVGQGTKLDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFW VLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	抗 CV CAR-C D28z， 氨基酸
14	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGE TTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGDLLMWGQGTLV TVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCRATQDISTSL GWYHQRPGKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYICYLQDD GFPFTVGQGTKLDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFW VLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA	抗 CV CAR-41 BBz，氨 基酸

[0440]

	LHMQALPPR	
15	EVKLIESGGGLVEPGRSLRLACTTSGFTFADYGLSWFRQGPKGLEWVGFTGPKHLGE TTECAPSVEDRCTISRDDSKSTVYLQMHRLQHEDTAVYFCVGPWFGLLMWGQGT TVSSASSGGSTSGSGKPGSGEGSSGSARAIQMTQSPSSLSASVGDRV SITCRATQDISTSL GWYHQRPGKAPRLLIYGASKVQTGVPSRFSNGSGTEFTLTISLQPEDIGTYCYCLQDD GFPFTVGQGTKLDIKRAAA	抗 CV scFv, 氨 基酸
16	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKP	hCD28 间 隔 子, 氨 基酸
17	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 TM 结 构域, 氨基酸
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 细 胞内结 构域, 氨基酸
19	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 细 胞内结 构域, 氨基酸
20	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	41BB 细 胞内结 构域, 氨基酸
21	ValTyrAlaThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit = 瓜氨酸	人 CV 肽 60-75
22	AlaTyrValThrCitSerSerAlaValCitLeuCitSerSerValPro Cit = 瓜氨酸	鼠 CV 肽 60-75

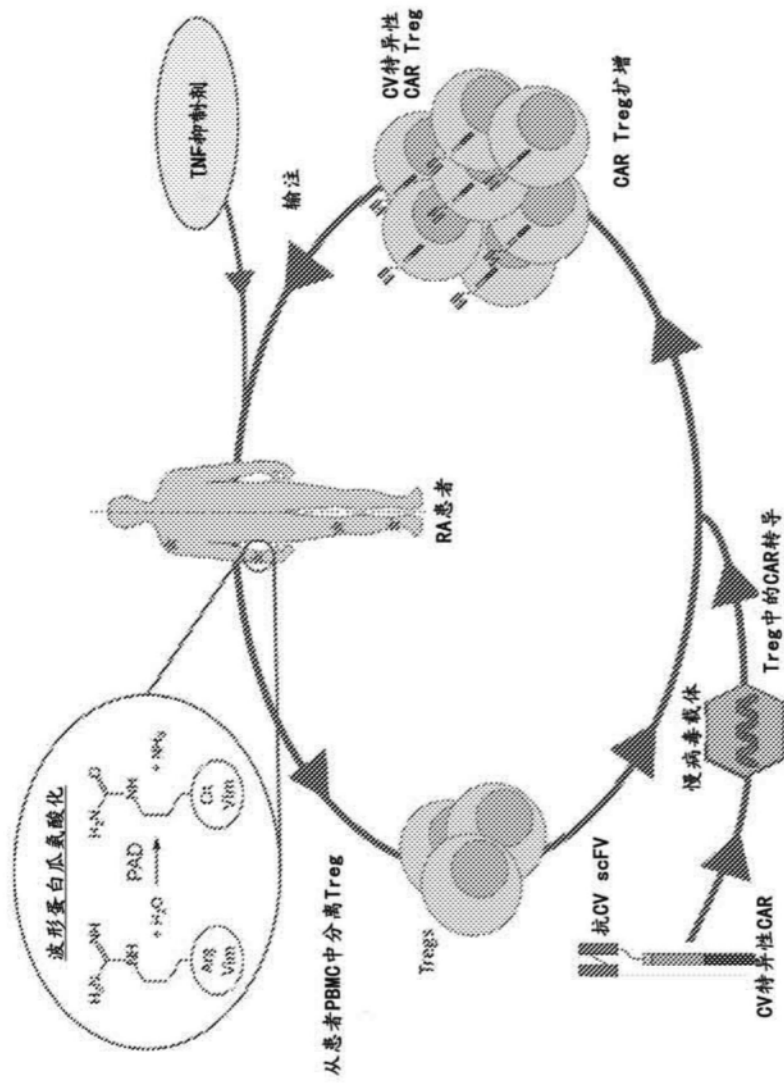


图1

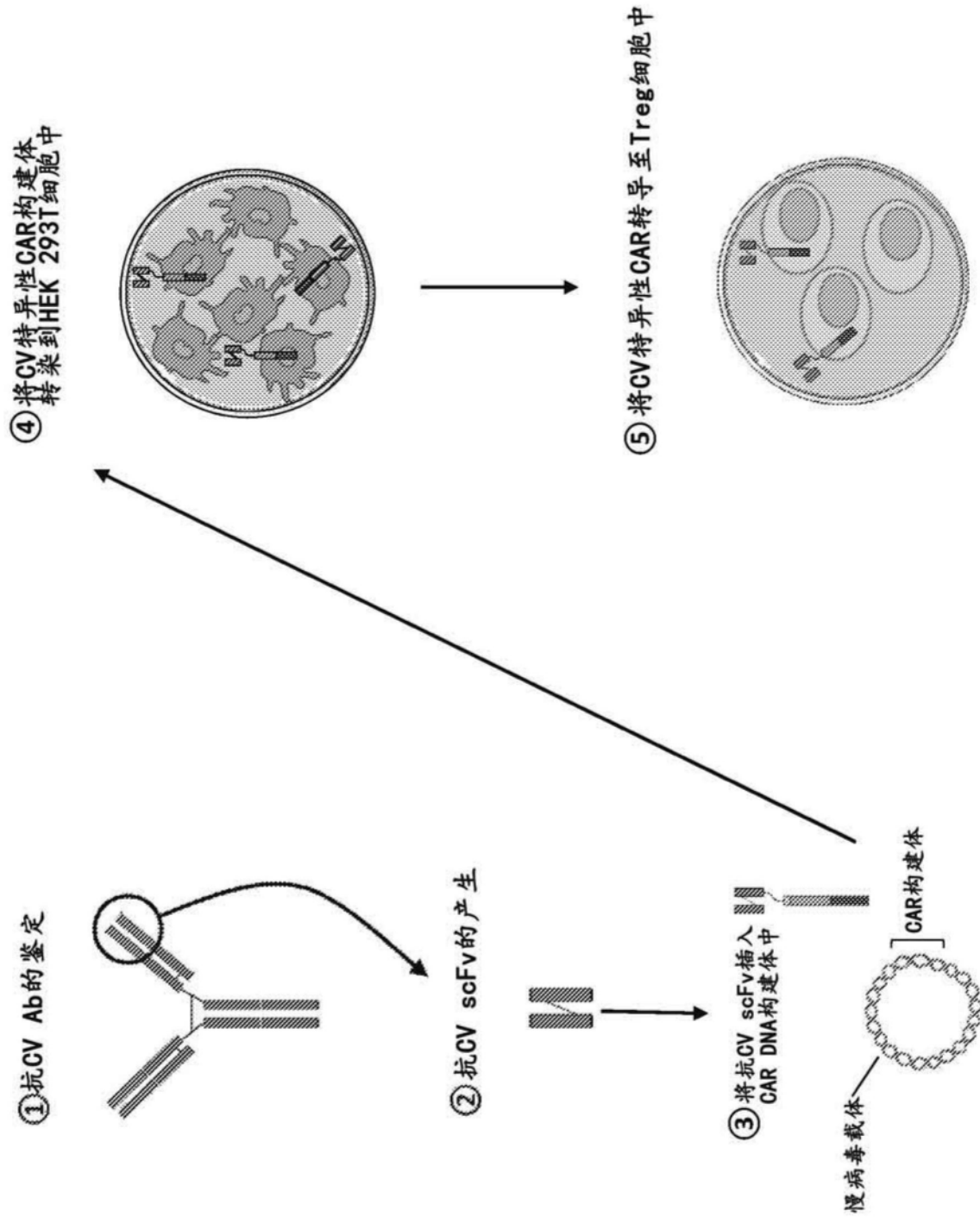


图2

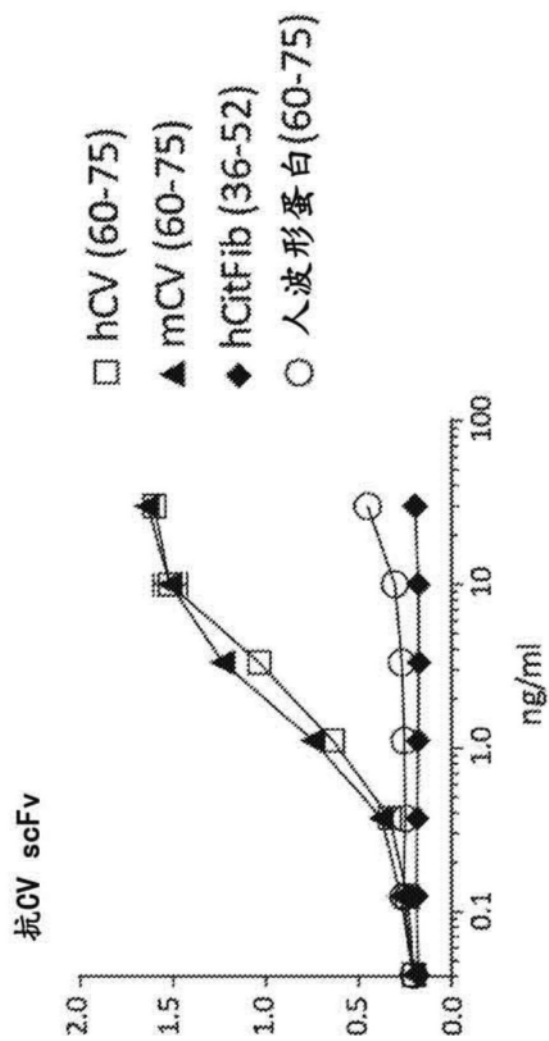


图4

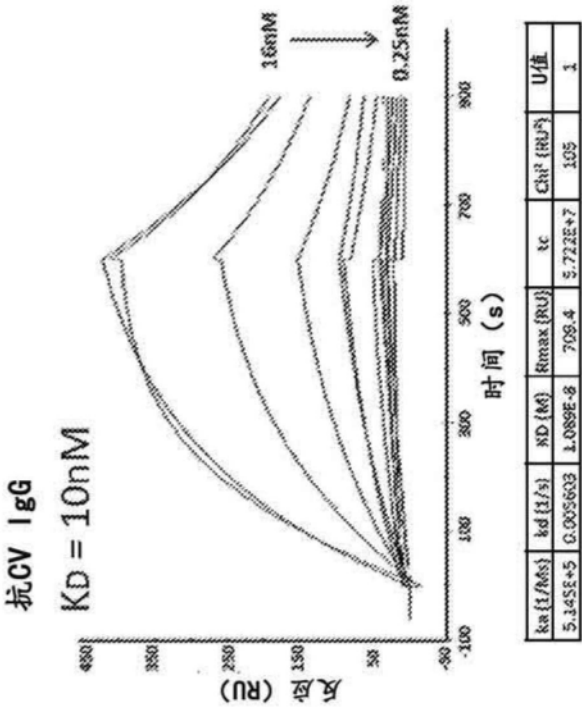


图5A

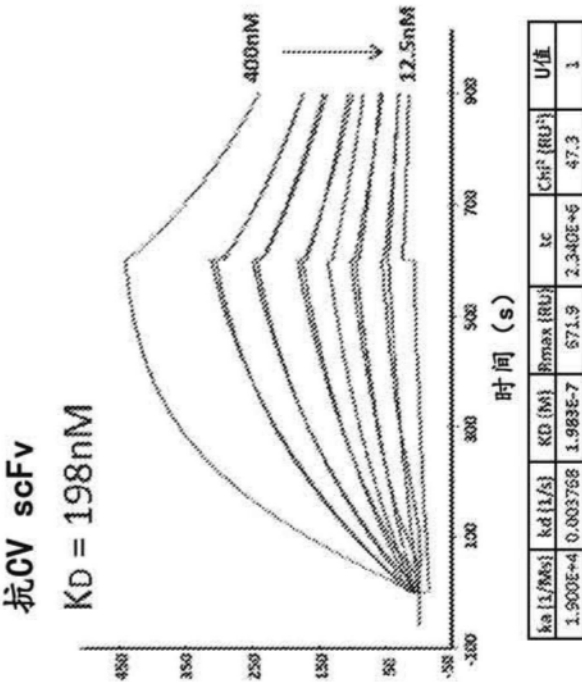


图5B

人波形蛋白肽60-75	VYATRSSAVRLRSSVP
鼠波形蛋白肽60-75	AYVTRSSAVRLRSSVP

图6

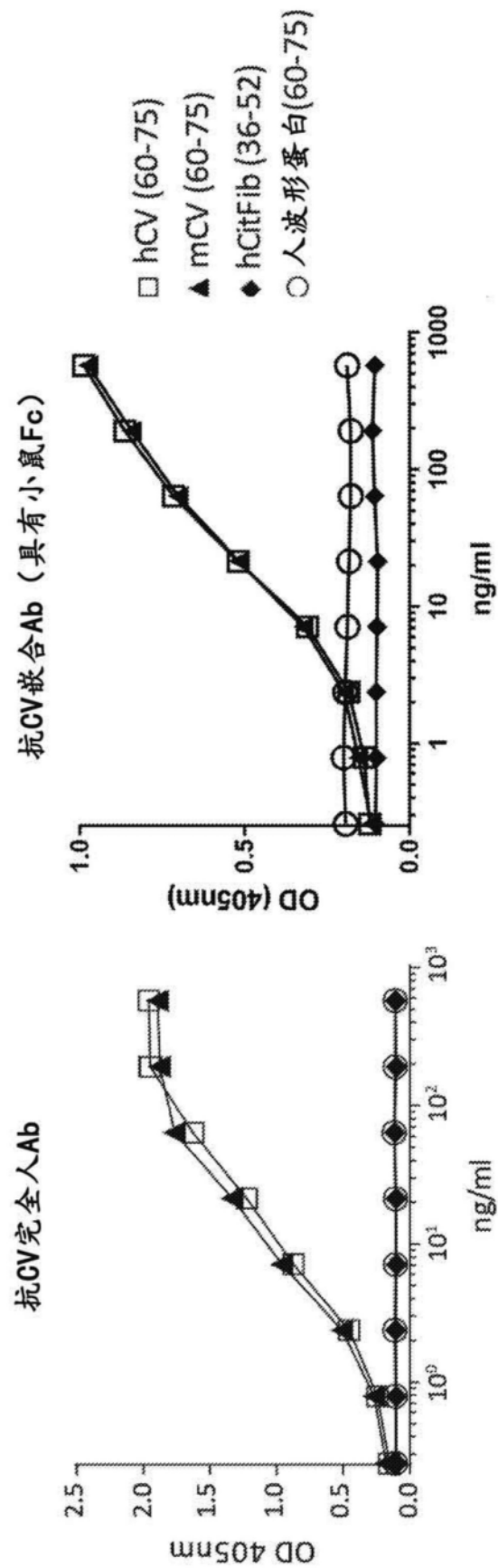


图7

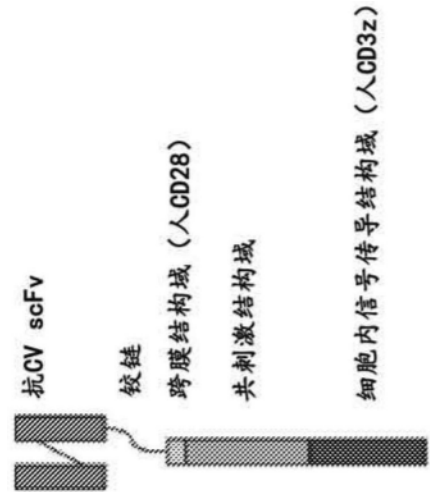


图8A



图8B

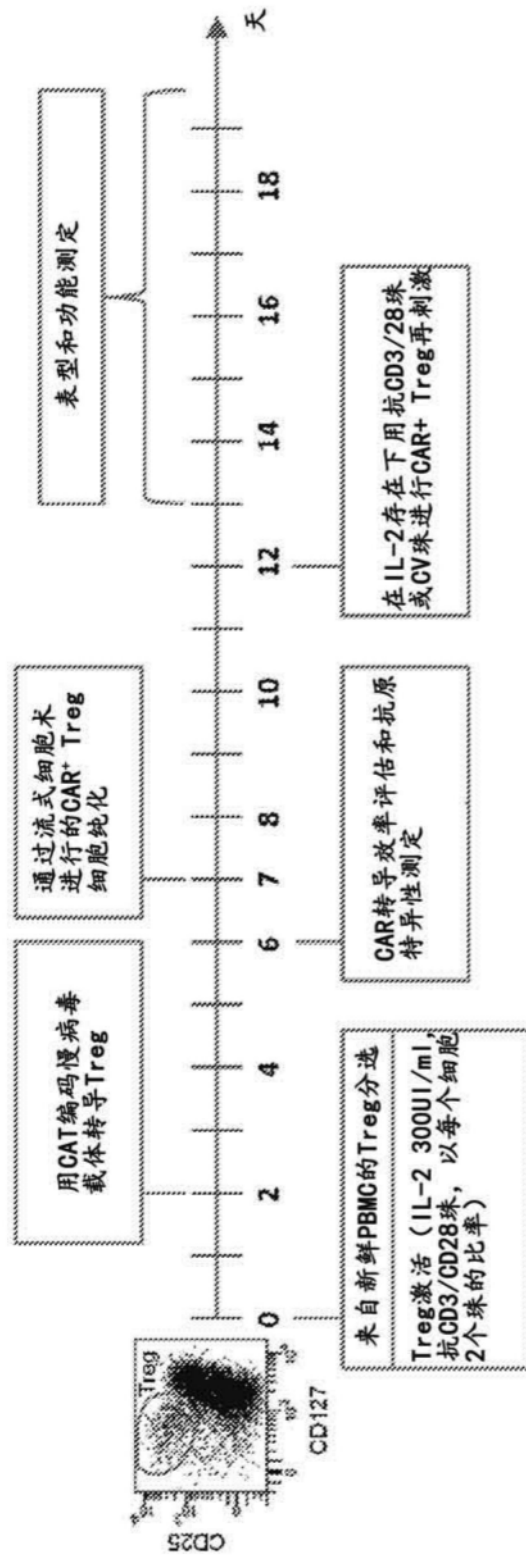


图9

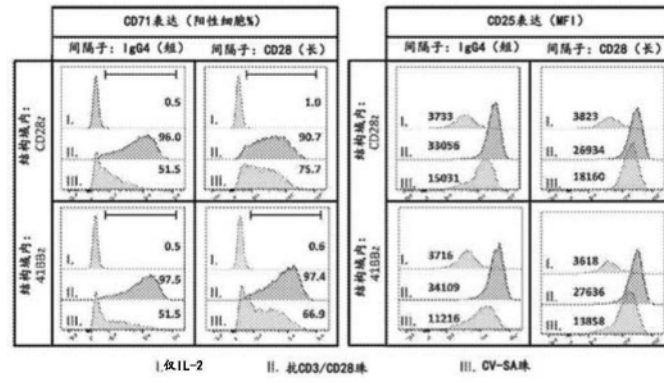


图10A

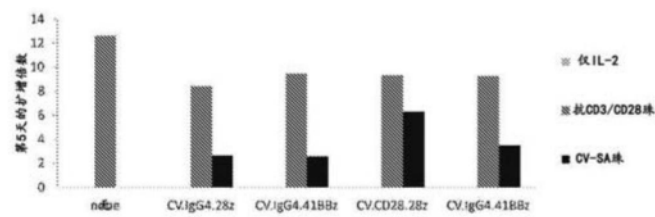


图10B

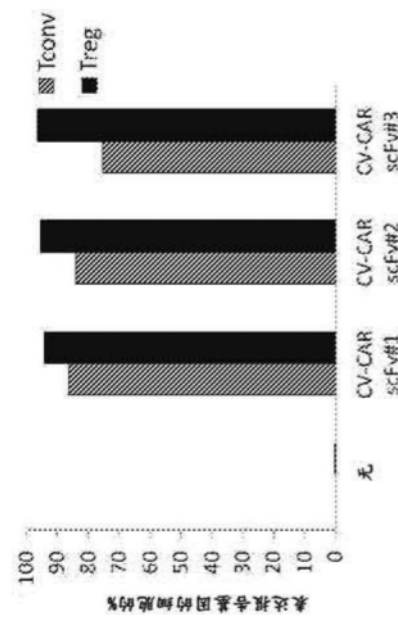


图11A

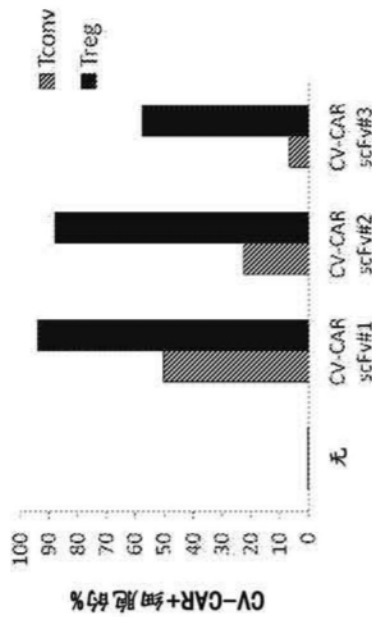


图11B

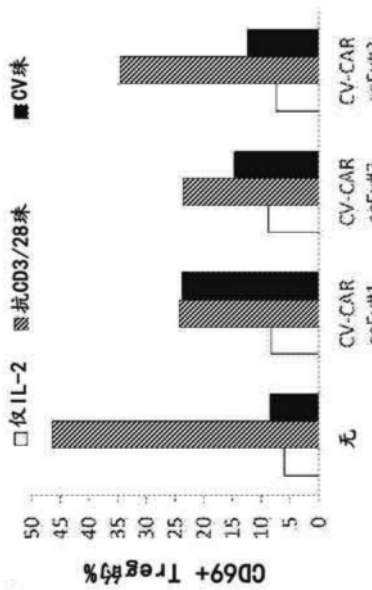


图11C

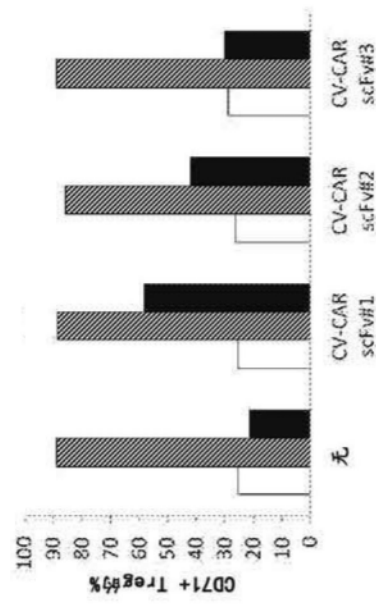


图11D

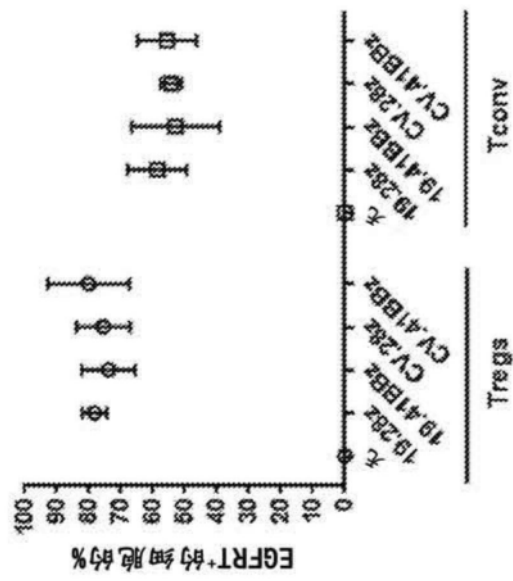


图12A

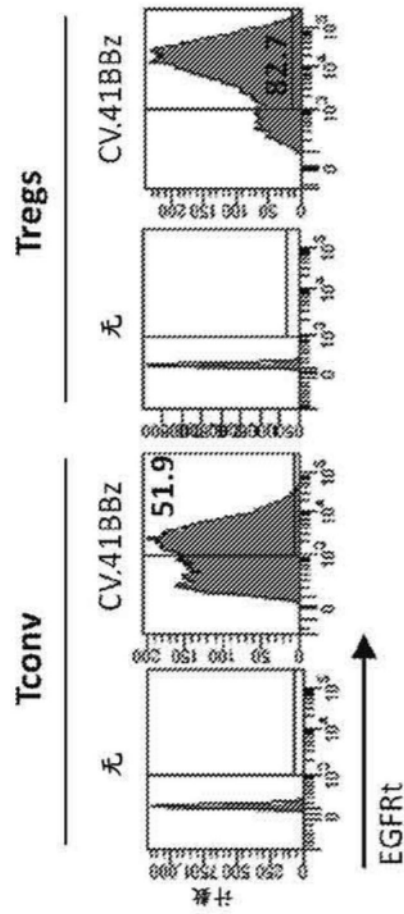


图12B

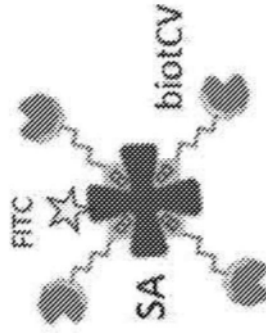


图12C

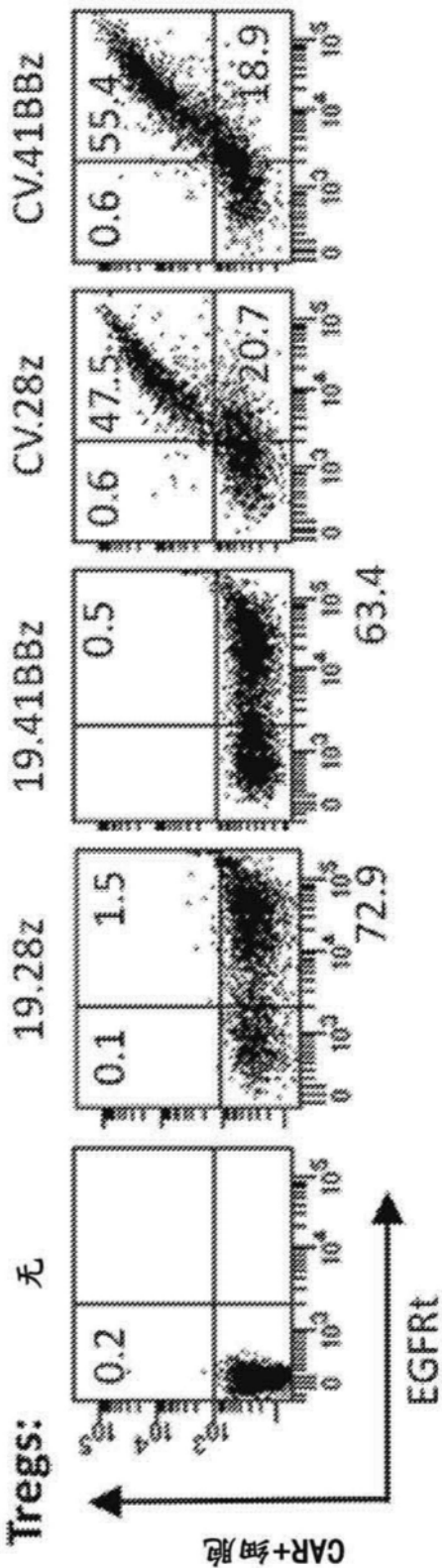


图12D



图13

	没有珠	CD3/CD28 珠	CV-SA 珠	CV特异性CAR ⁺ Treg	
				共刺激结构域 CD28	共刺激结构域 41BB
				共刺激结构域 CD28	共刺激结构域 41BB
				共刺激结构域 CD28	共刺激结构域 41BB

图14A

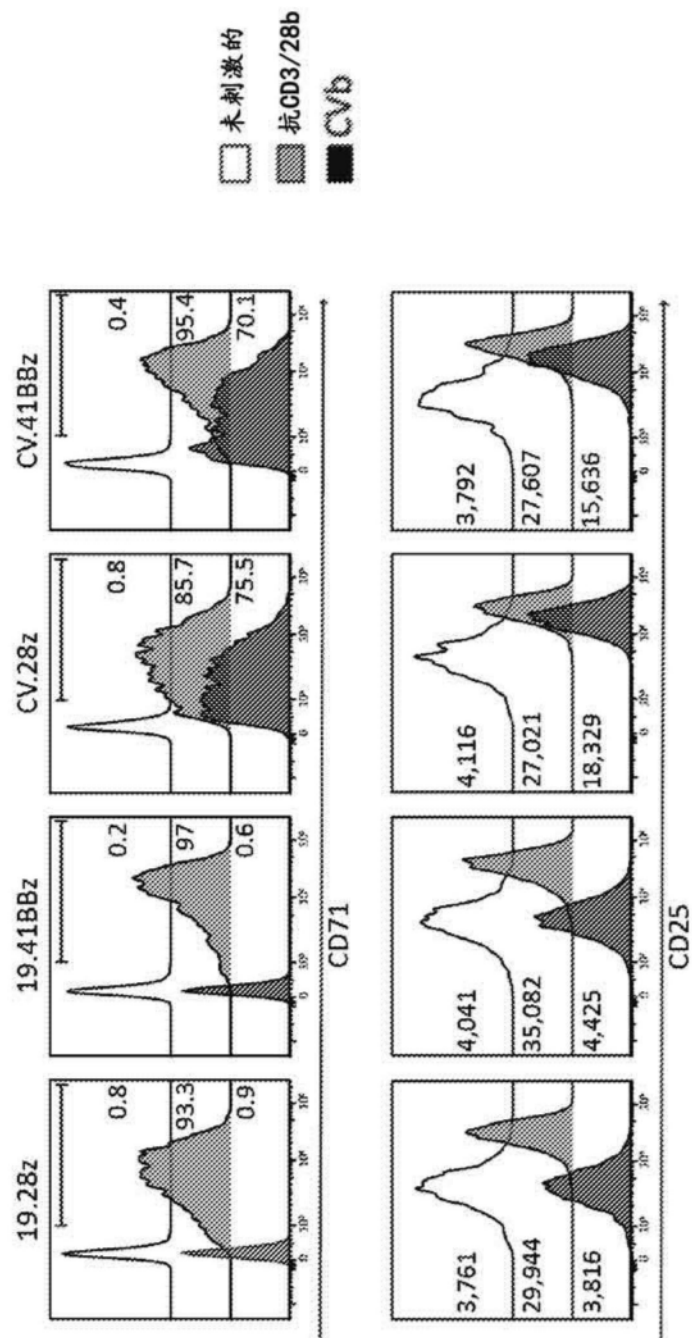


图14B

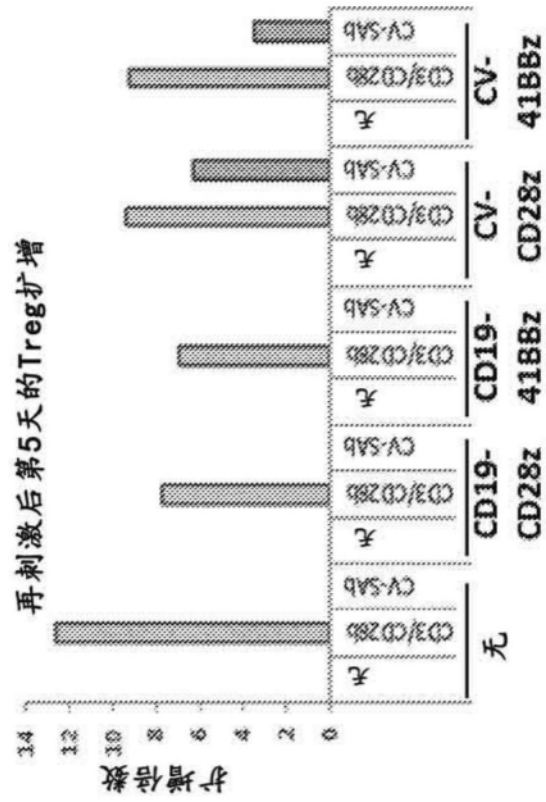


图14C

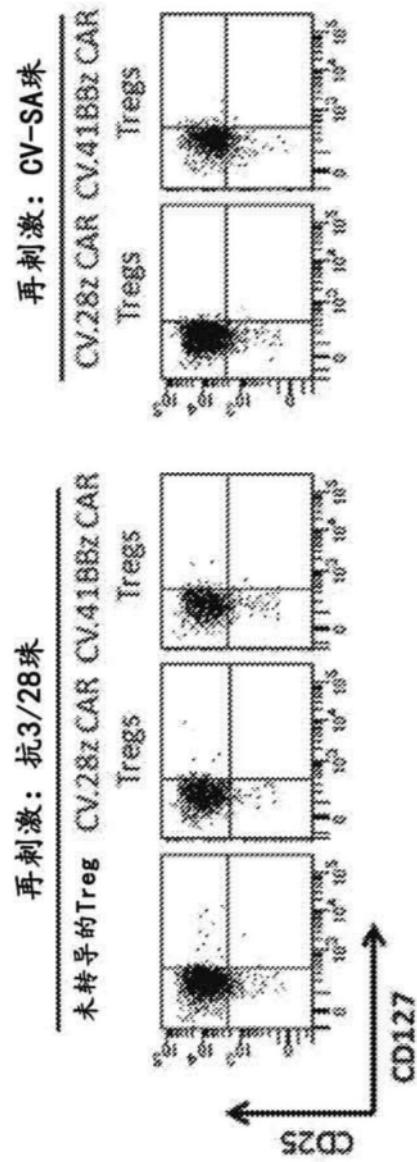


图15A

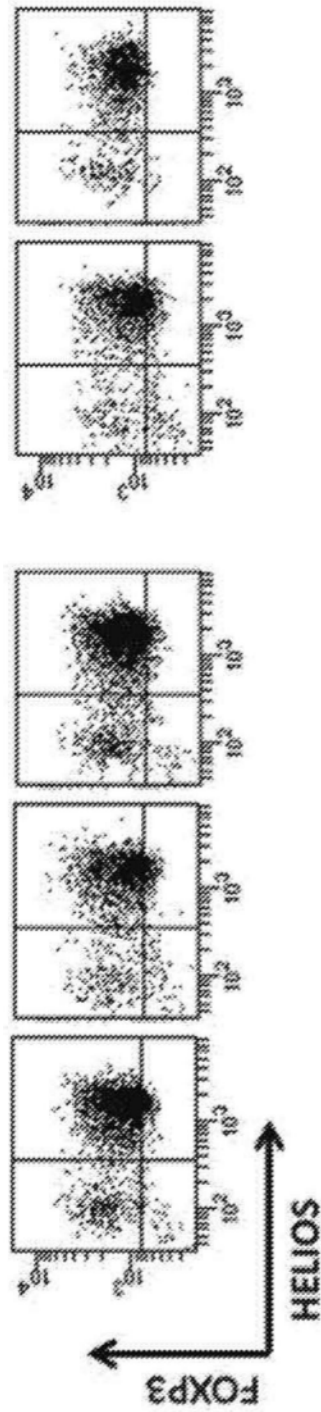


图15B

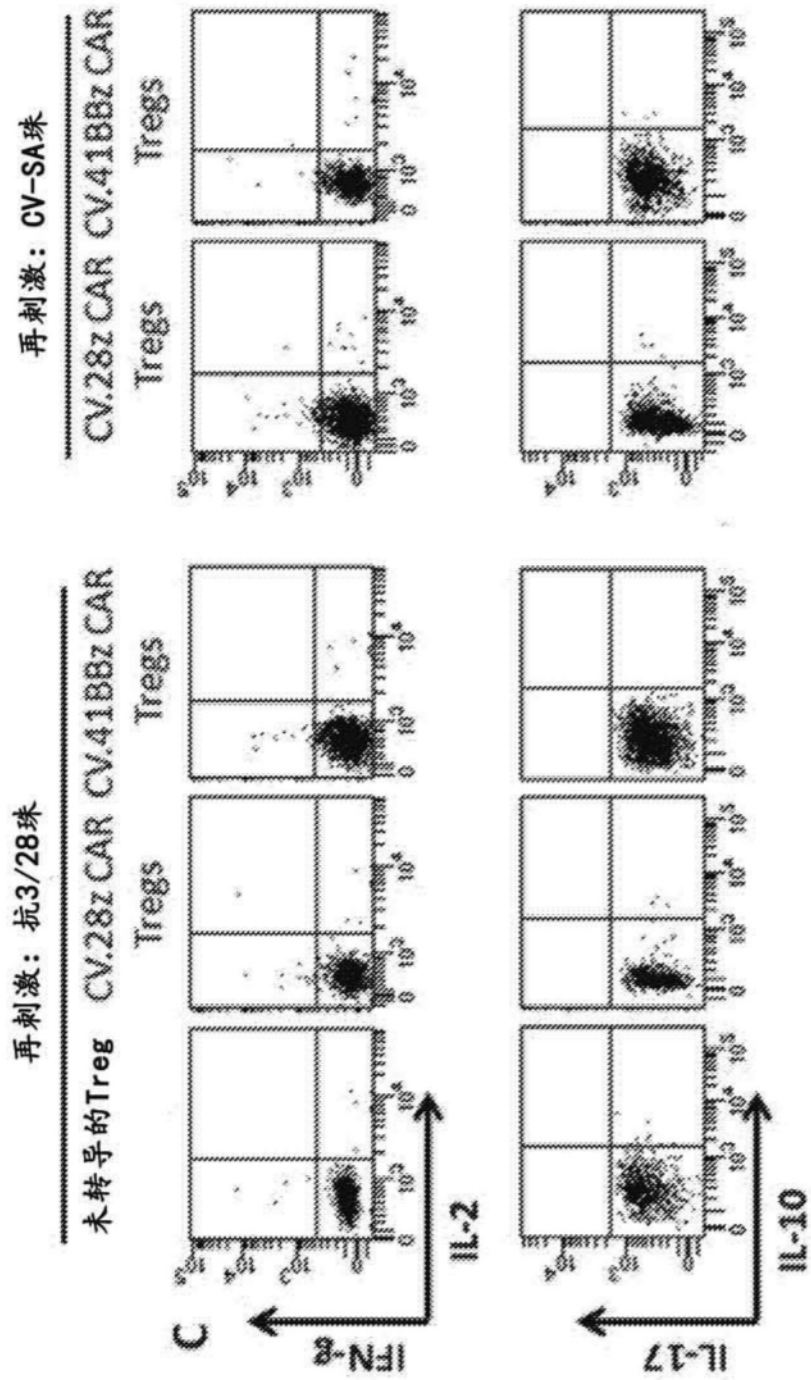


图15C

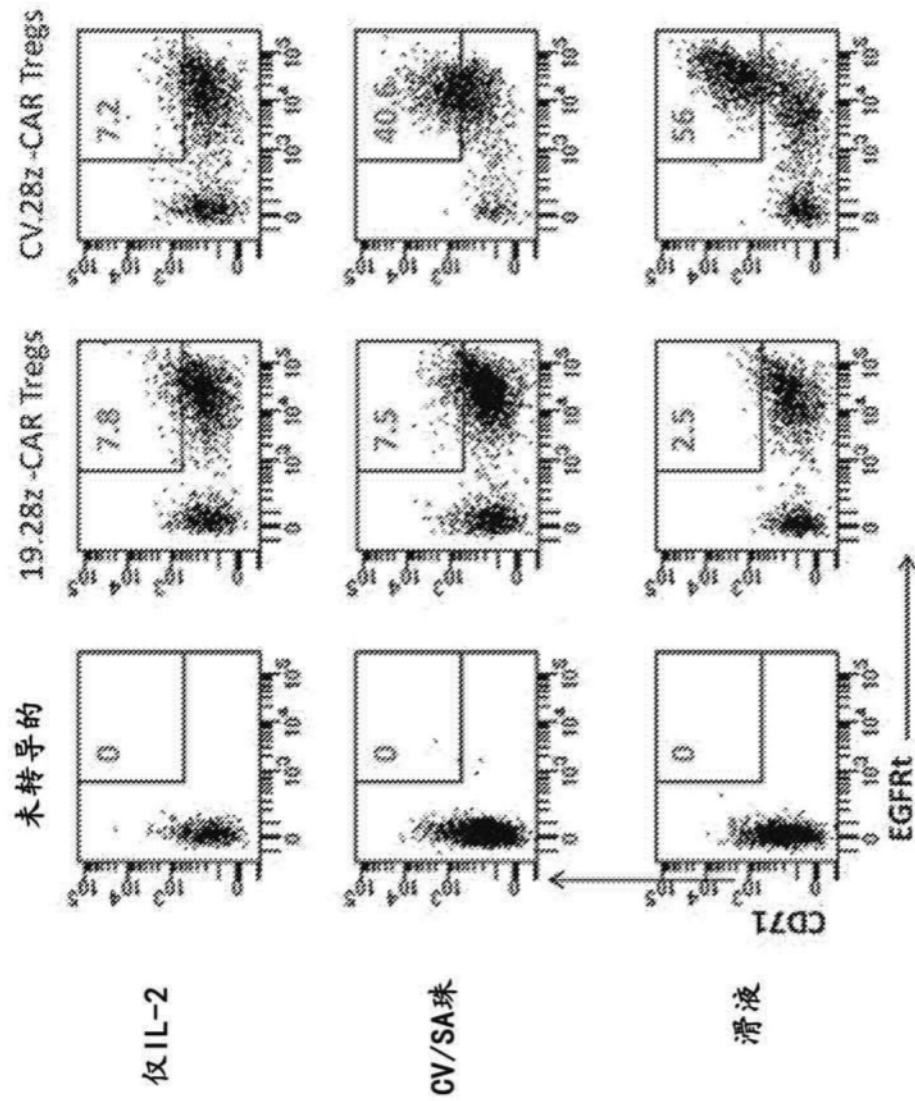


图16A

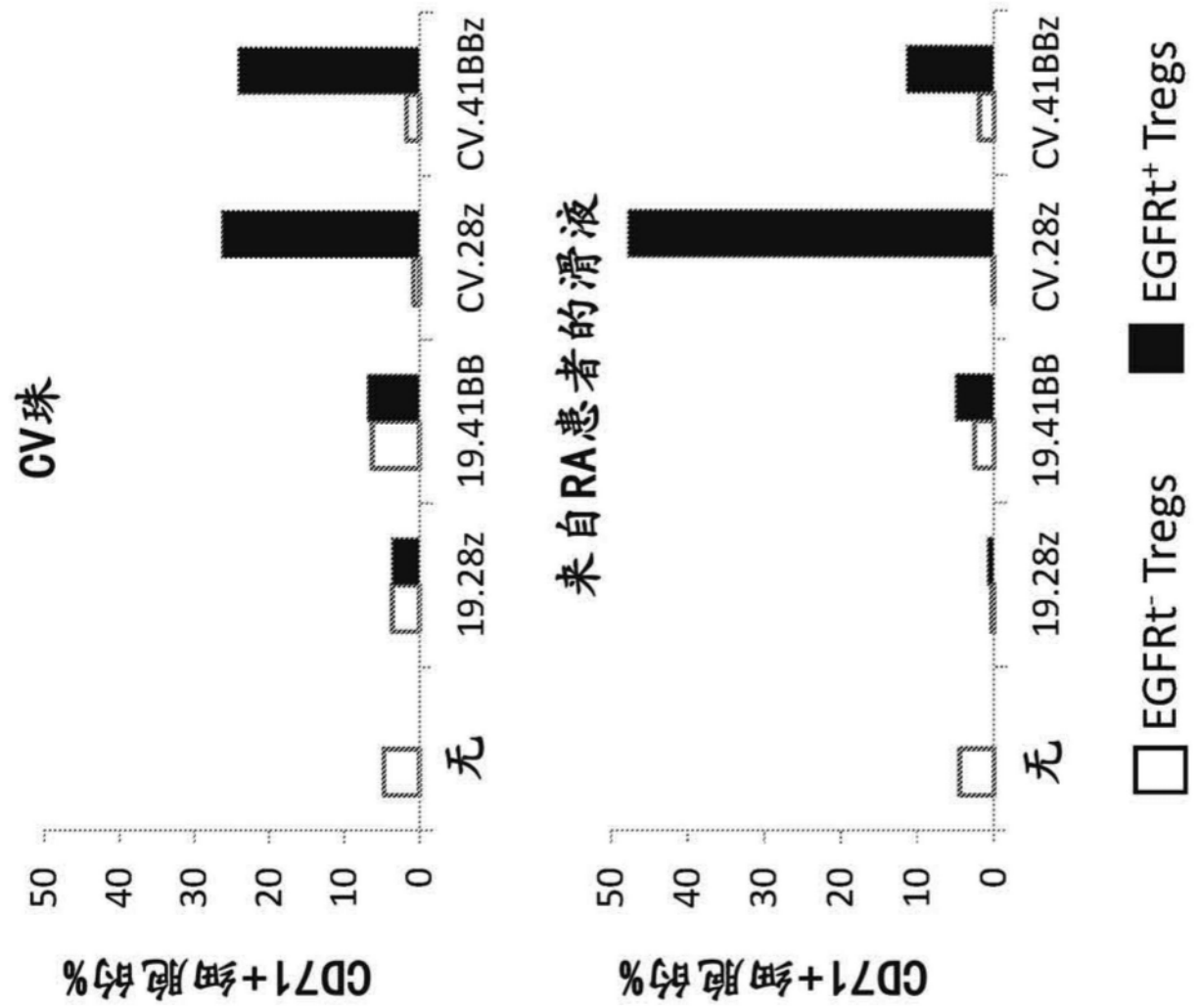


图16B

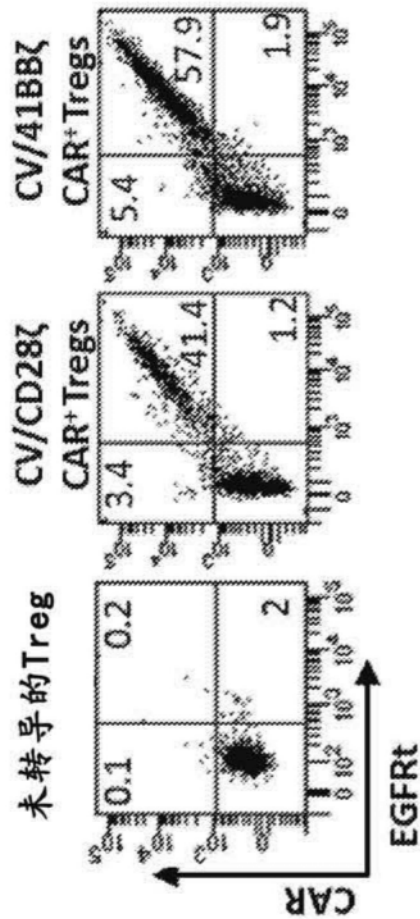


图17A

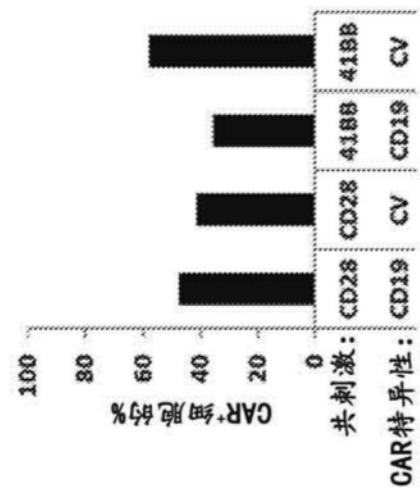


图17B

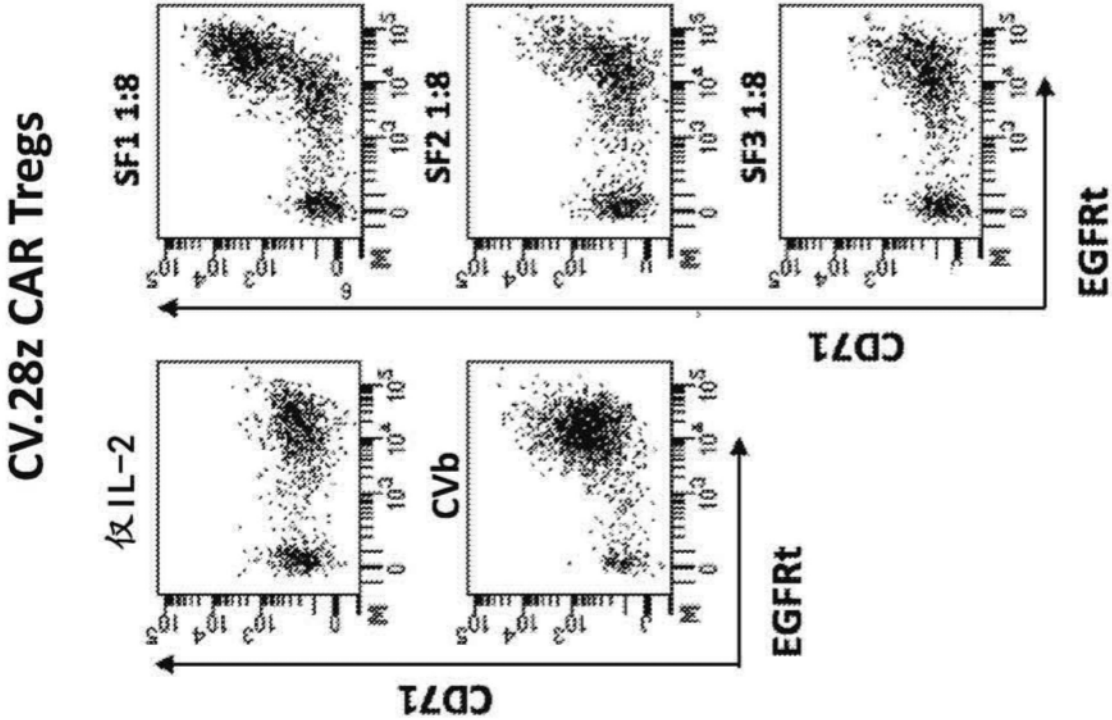


图18A

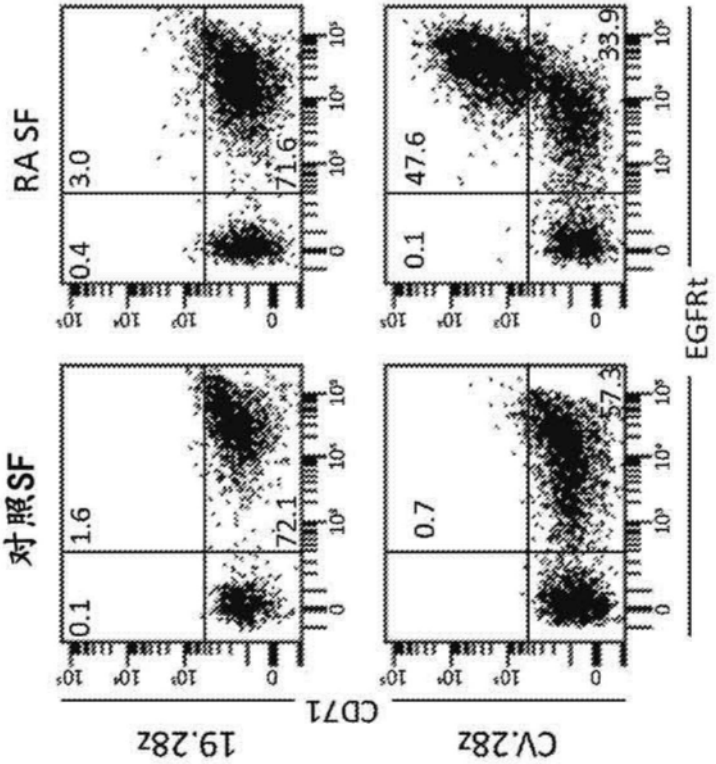


图18B

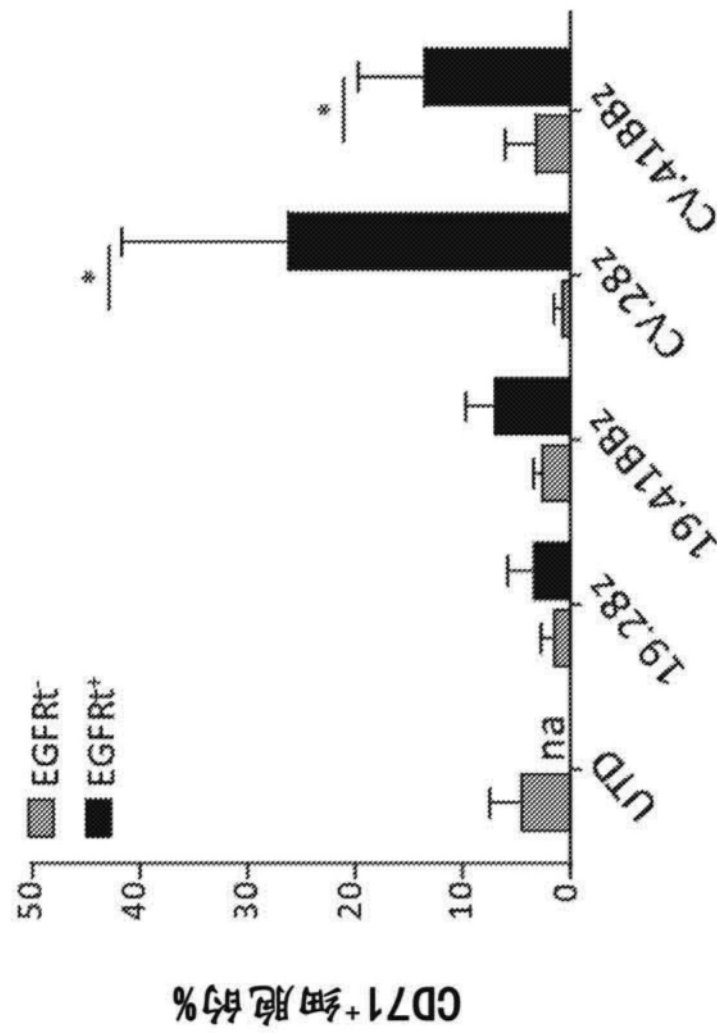


图18C

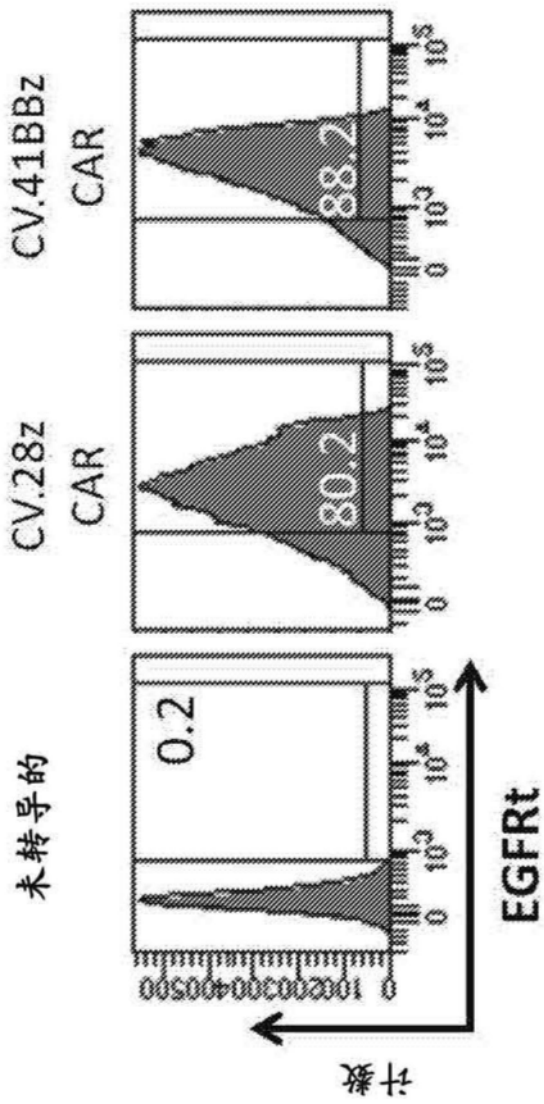


图19

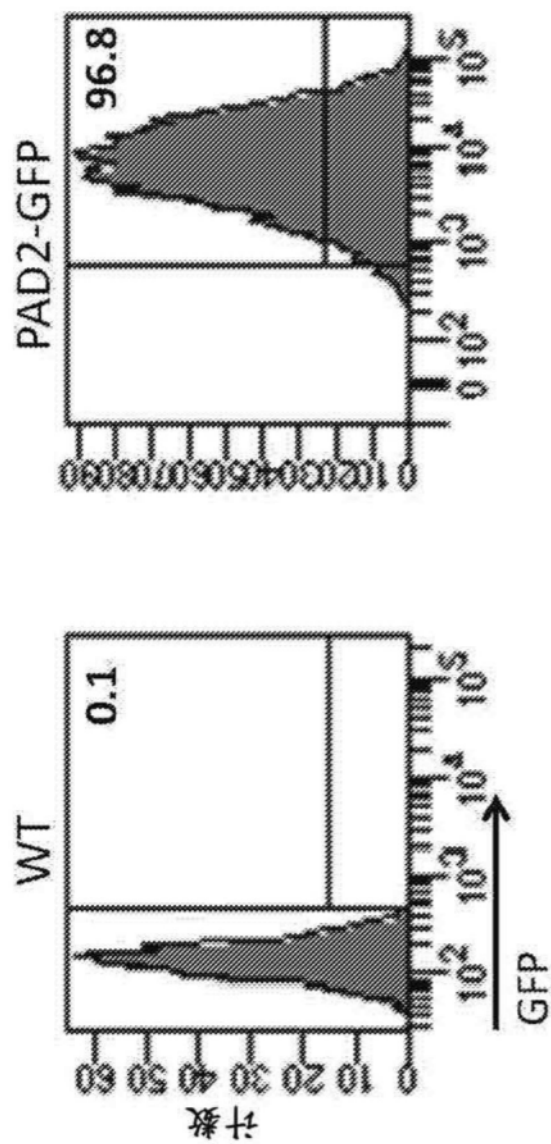


图20A

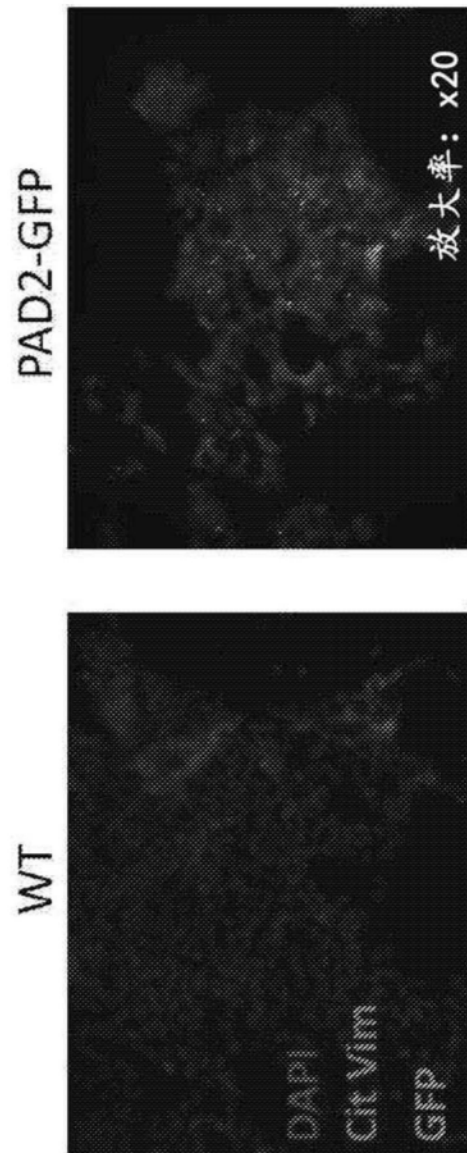


图20B

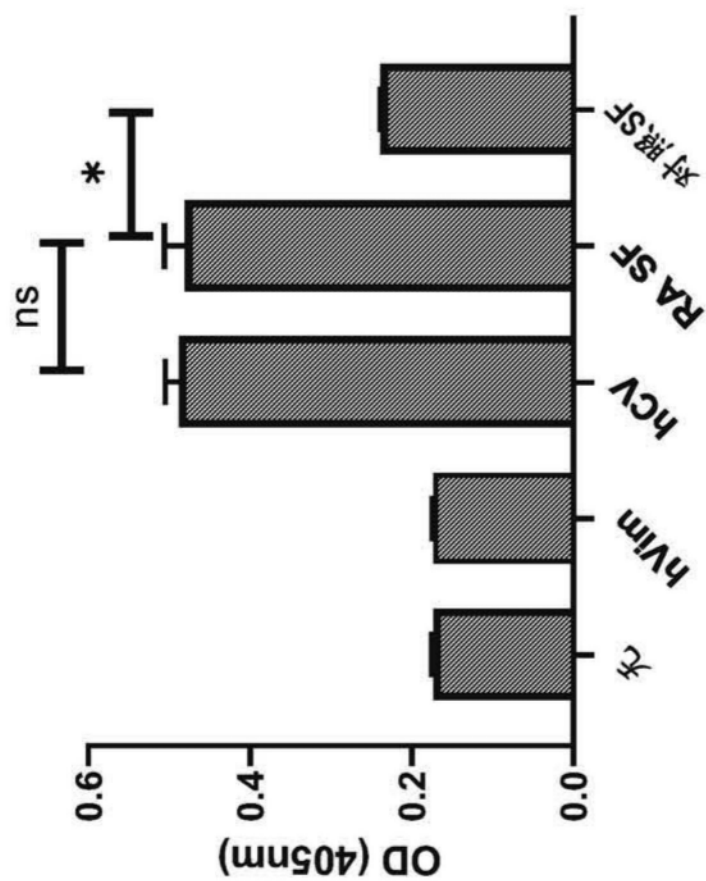


图21

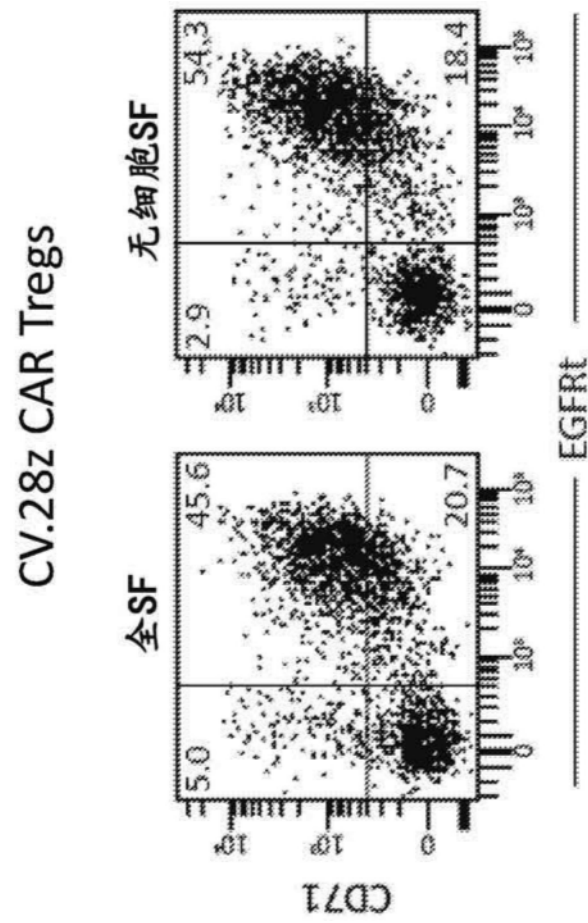


图22A

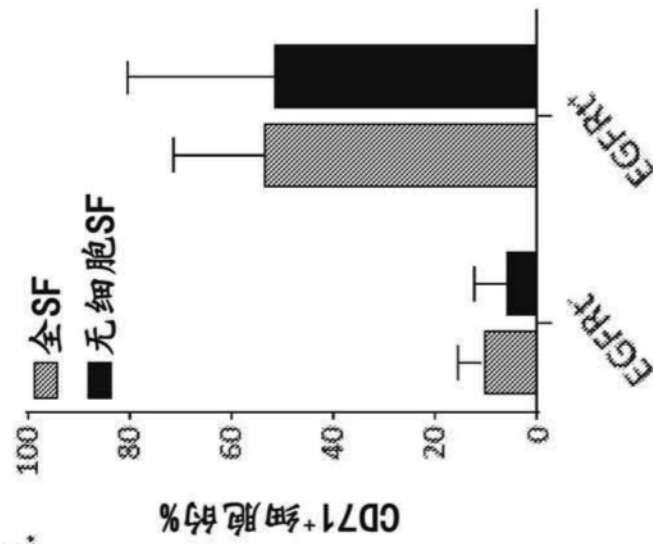


图22B

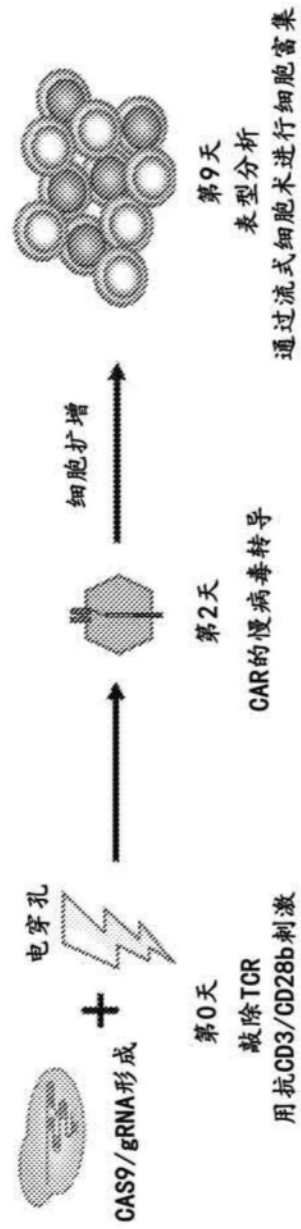


图23A

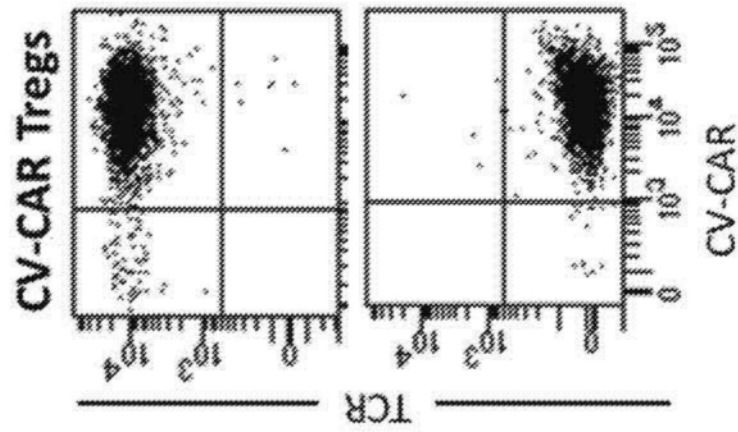


图23B

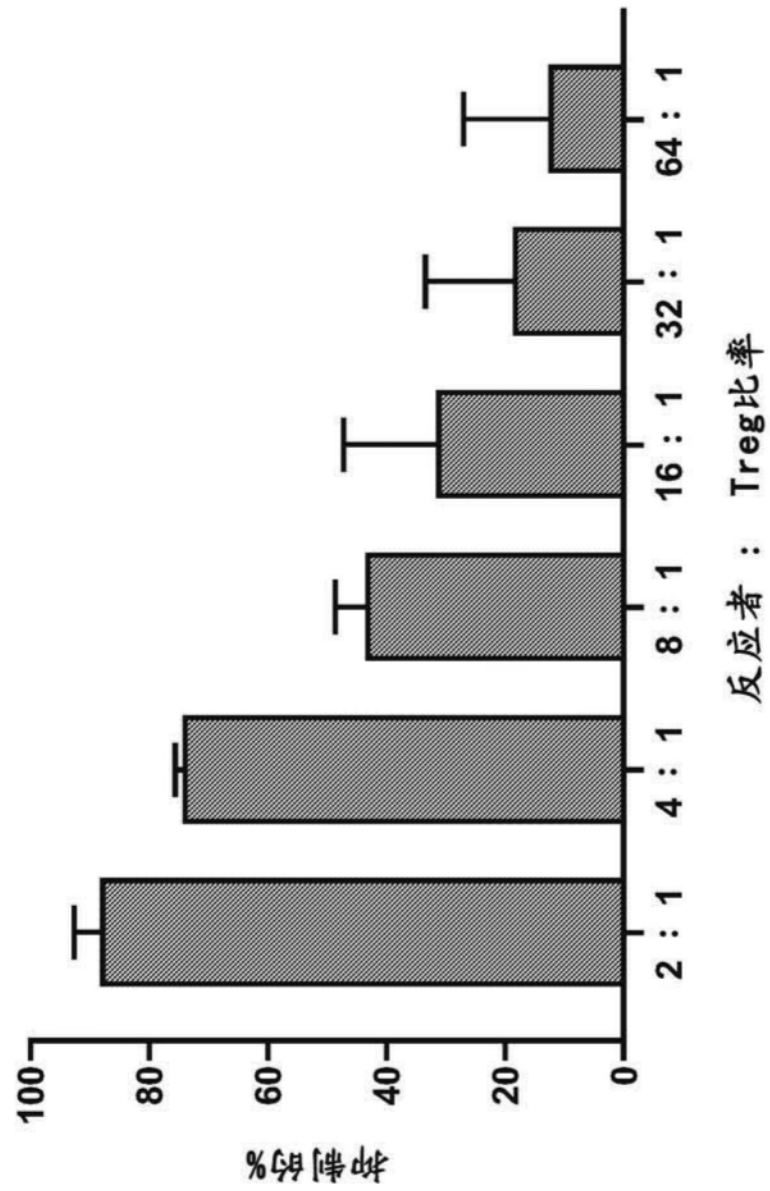


图24A

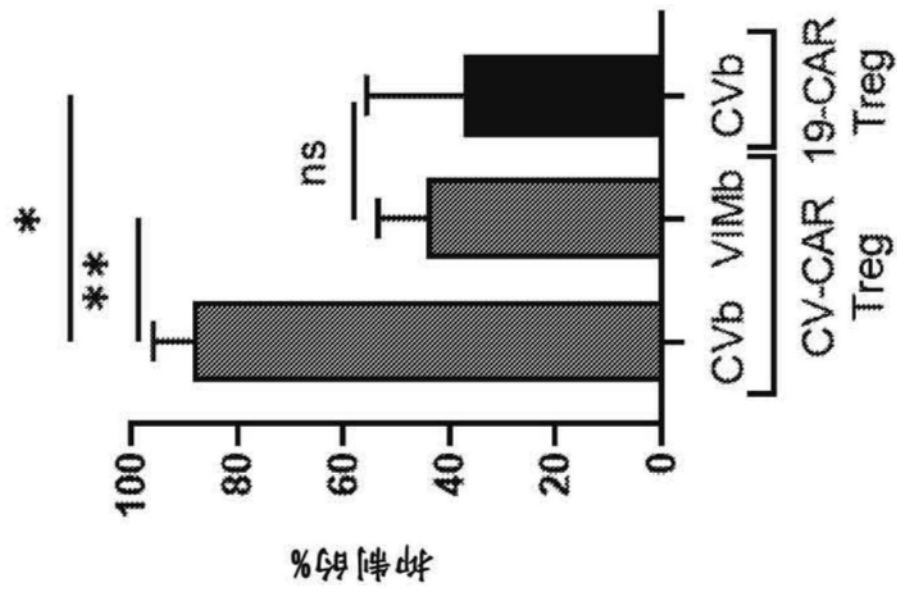


图24B