



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117693348 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202280051477.5

C • 阿莫尔维加斯 张则达

(22) 申请日 2022.06.10

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(30) 优先权数据

专利代理师 龙淳 邹亮

63/209,940 2021.06.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.01.22

A61K 35/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 5/0783 (2006.01)

PCT/US2022/032954 2022.06.10

C07K 19/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 16/28 (2006.01)

W02022/261403 EN 2022.12.15

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

申请人 斯隆-凯特琳癌症研究协会
癌症与相关疾病纪念医院

权利要求书6页 说明书54页

(72) 发明人 S • W • 洛 M • 塞德莱恩

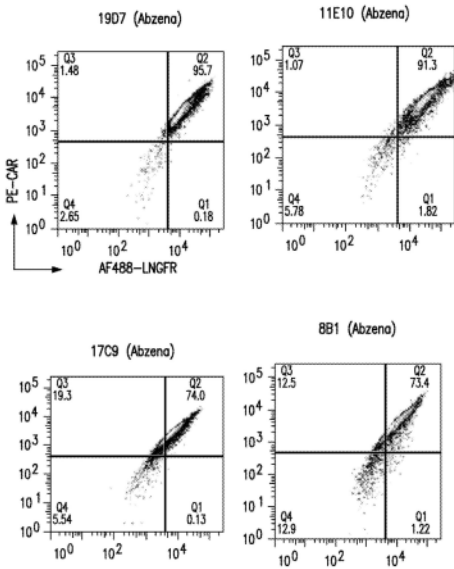
序列表32页 附图5页

(54) 发明名称

靶向uPAR的抗原识别受体和其用途

(57) 摘要

当前公开的主题提供了特异性靶向uPAR的抗原识别受体和包括此类靶向uPAR的抗原识别受体的细胞。当前公开的主题进一步提供了靶向uPAR的抗原识别受体用于治疗用途。



1. 一种抗原识别受体,其包括胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中所述胞外抗原结合结构域与uPAR特异性结合。

2. 根据权利要求1所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。

3. 根据权利要求2所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是人scFv。

4. 根据权利要求1所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是Fab,所述Fab任选地被交联。

5. 根据权利要求1所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的抗原识别受体,其中所述scFv、Fab和F(ab)₂中的一个或多个包括在具有异源序列的融合蛋白中以形成所述胞外抗原结合结构域。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括:

(a) 包括SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(b) 包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(c) 包括SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(d) 包括SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(e) 包括SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者

(f) 包括SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括:

(a) 包括SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(b) 包括SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:12或其保守修饰的CDR3;

(c) 包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其保

守修饰的CDR3;

(d) 包括SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

(e) 包括SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者

(f) 包括SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:

(a) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR3;

(b) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3;

(c) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:

16中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的CDR3;(d) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列的CDR3;

(e) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:

44中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的CDR3;或者

(f) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:

52中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR3。

10. 根据权利要求9所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3;以及包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的所选氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列;以及(b) 轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a) 重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列;以及(b) 轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求16所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:

(a) 包括SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

26中所示的氨基酸序列的轻链可变区;

(b) 包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

28中所示的氨基酸序列的轻链可变区；

(c) 包括SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

30中所示的氨基酸序列的轻链可变区；

(d) 包括SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

32中所示的氨基酸序列的轻链可变区；

(e) 包括SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

48中所示的氨基酸序列的轻链可变区；或者

(f) 包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:

56中所示的氨基酸序列的轻链可变区。

18. 根据权利要求17所述的抗原识别受体, 其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区包括SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述胞外抗原结合结构域包括所述胞外抗原结合结构域的重链可变区与轻链可变区之间的接头。

20. 根据权利要求19所述的抗原识别受体, 其中所述接头由SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列组成。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述胞外抗原结合结构域包括与所述胞外抗原结合结构域的5'末端共价接合的信号肽。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述跨膜结构域包括CD8多肽、CD28多肽、CD3 ζ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽或其组合。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述胞内信号传导结构域进一步包括至少一个共刺激信号传导区。

25. 根据权利要求24所述的抗原识别受体, 其中所述至少一个共刺激信号传导区包括CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽或其组合。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是嵌合抗原受体 (CAR)、T细胞受体 (TCR) 或T细胞样融合蛋白。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是CAR。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是重组表达的。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体由载体表达。

30. 根据权利要求29所述的抗原识别受体, 其中所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

31. 一种细胞, 其包括根据权利要求1至30中任一项所述的抗原识别受体。

32. 根据权利要求31所述的细胞, 其中所述细胞用所述抗原识别受体转导。

33. 根据权利要求31或32所述的细胞, 其中所述抗原识别受体在所述细胞的表面上组

成性地表达。

34. 根据权利要求31至33中任一项所述的细胞,其中所述细胞是免疫应答细胞。

35. 根据权利要求31至34中任一项所述的细胞,其中所述细胞是淋巴系的细胞或髓系的细胞。

36. 根据权利要求31至35中任一项所述的细胞,其中所述细胞选自由以下组成的组:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和干细胞,可从所述干细胞分化淋巴样细胞。

37. 根据权利要求31至36中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

38. 根据权利要求36或37所述的细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或调节性T细胞。

39. 根据权利要求36所述的细胞,其中所述干细胞是多能干细胞。

40. 根据权利要求39所述的细胞,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

41. 一种核酸,其编码根据权利要求1至30中任一项所述的抗原识别受体。

42. 一种载体,其包括根据权利要求41所述的核酸。

43. 根据权利要求42所述的载体,其中所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

44. 一种宿主细胞,其表达根据权利要求41所述的核酸或根据权利要求42或43所述的载体。

45. 根据权利要求44所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞。

46. 一种组合物,其包括根据权利要求31至40中任一项所述的细胞。

47. 根据权利要求46所述的组合物,其是进一步包括药学上可接受的载剂的药物组合物。

48. 一种治疗或改善受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用当前公开的根据权利要求31至40中任一项所述的细胞或根据权利要求46或47所述的组合物。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述疾病或病症选自由以下组成的组:肿瘤、衰老相关病理和与衰老相关的组织衰退。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述疾病或病症是衰老相关病理。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述衰老相关病理选自由以下组成的组:肺纤维化、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、糖尿病、骨关节炎、肝纤维化、慢性肾病、心脏纤维化和帕金森氏病(Parkinson's disease)。

52. 根据权利要求48所述的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述肿瘤选自由以下组成的组:乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、胃癌(stomach cancer)、前列腺癌、胃癌(gastric cancer)、肾癌、胰腺癌、血癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、尿路上皮癌、黑色素瘤和脑癌。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述血癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合征和红白血病。

55. 根据权利要求52至54中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是癌症。

56. 一种增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求31至40中任一项所述的细胞或根据权利要求46或

47所述的组合物。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述免疫激活细胞因子选自由以下组成的组: 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7 (IRF7)、CCL1、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL16、CXCL1、CXCL3、CXCL5、CXCL9、CXCL10和其组合。

58. 根据权利要求48至57中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人。

59. 一种用于治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的试剂盒, 所述试剂盒包括根据权利要求31至40中任一项所述的细胞、根据权利要求41所述的核酸或根据权利要求46或47所述的组合物。

60. 根据权利要求59所述的试剂盒, 其中所述试剂盒进一步包括用于使用所述细胞或所述组合物来治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的书面说明。

61. 一种用于产生靶向uPAR的根据权利要求1至30中任一项所述的抗原识别受体的方法, 所述方法包括将编码所述抗原识别受体的核酸引入到细胞中。

靶向uPAR的抗原识别受体和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月11日提交的美国临时申请第63/209,940号的优先权,所述美国临时申请的内容通过引用整体并入,并且要求所要求保护的优先权。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表已通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且由此通过引用以其整体在此并入。创建于2022年6月10日的所述ASCII副本命名为072734.1361_ST25.txt并且大小为48,969字节。

1. 技术领域

[0005] 当前公开的主题提供了用于免疫疗法的方法和组合物。当前公开的主题涉及特异性靶向uPAR的抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))、包括此类受体的细胞以及使用此类细胞进行治疗的方法。

2. 背景技术

[0006] 基于细胞的免疫疗法是用于治疗癌症的具有治愈潜力的疗法。T细胞和其它免疫细胞可以通过引入编码抗原的人工或合成受体的遗传材料而被修饰以靶向肿瘤抗原,所述受体被称为嵌合抗原受体(CAR),对选定的抗原具有特异性。使用CAR的靶向T细胞疗法最近在治疗血液系统恶性病和实体瘤方面显示出临床成功。

[0007] uPAR与各种不同类型的癌症,包含乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、直肠癌、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和急性髓细胞性白血病(AML)中的肿瘤生长或转移相关。它也在衰老中起作用,如与衰老相关的衰老相关疾病。它还可以调节免疫应答和细胞-基质相互作用,并且促进肿瘤细胞增殖和从休眠中出现。

[0008] 鉴于uPAR在各种疾病或病症中的重要作用,需要靶向uPAR的免疫疗法(例如,CAR)。

3. 发明内容

[0009] 当前公开的主题提供了特异性靶向uPAR的抗原识别受体和包括此类靶向uPAR的抗原识别受体的细胞。当前公开的主题进一步提供了靶向uPAR的抗原识别受体用于治疗的用途。

[0010] 当前公开的主题提供了一种抗原识别受体,所述抗原识别受体包括胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中所述胞外抗原结合结构域与uPAR特异性结合。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域是人scFv。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域是Fab,所述Fab任选地被交联。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。在某些实施例中,所述scFv、Fab和F(ab)₂中的一个或多个包括在具有异源序列的融合蛋白中以形成所

述胞外抗原结合结构域。

[0011] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括:

[0012] (a) 包括SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0013] (b) 包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0014] (c) 包括SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0015] (d) 包括SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0016] (e) 包括SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者

[0017] (f) 包括SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0018] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括:

[0019] (a) 包括SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0020] (b) 包括SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:12或其保守修饰的CDR3;

[0021] (c) 包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0022] (d) 包括SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:23或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;

[0023] (e) 包括SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者

[0024] (f) 包括SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:53或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列或其保守修饰的

CDR3。

[0025] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括:

[0026] (a) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR3;

[0027] (b) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3;

[0028] (c) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的CDR3;

[0029] (d) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列的CDR3;

[0030] (e) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的CDR3;或者

[0031] (f) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0032] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0033] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID

N0:55中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID N0:25、SEQ ID N0:27、SEQ ID N0:29、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:47或SEQ ID N0:55中所示的氨基酸序列。

[0034] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID N0:26、SEQ ID N0:28、SEQ ID N0:30、SEQ ID N0:32、SEQ ID N0:48或SEQ ID N0:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID N0:26、SEQ ID N0:28、SEQ ID N0:30、SEQ ID N0:32、SEQ ID N0:48或SEQ ID N0:56中所示的氨基酸序列。

[0035] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括:(a)重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID N0:25、SEQ ID N0:27、SEQ ID N0:29、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:47或SEQ ID N0:55中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID N0:26、SEQ ID N0:28、SEQ ID N0:30、SEQ ID N0:32、SEQ ID N0:48或SEQ ID N0:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括:(a)重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID N0:25、SEQ ID N0:27、SEQ ID N0:29、SEQ ID N0:31、SEQ ID N0:47或SEQ ID N0:55中所示的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID N0:26、SEQ ID N0:28、SEQ ID N0:30、SEQ ID N0:32、SEQ ID N0:48或SEQ ID N0:56中所示的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括:

[0037] (a)包括SEQ ID N0:25中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:26中所示的氨基酸序列的轻链可变区;

[0038] (b)包括SEQ ID N0:27中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:28中所示的氨基酸序列的轻链可变区;

[0039] (c)包括SEQ ID N0:29中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:30中所示的氨基酸序列的轻链可变区;

[0040] (d)包括SEQ ID N0:31中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:32中所示的氨基酸序列的轻链可变区;

[0041] (e)包括SEQ ID N0:47中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:48中所示的氨基酸序列的轻链可变区;或者

[0042] (f)包括SEQ ID N0:55中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID N0:56中所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0043] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区和轻链可变区,所述

重链可变区包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括所述胞外抗原结合结构域的重链可变区与轻链可变区之间的接头。在某些实施例中,所述接头包括SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0045] 在某些实施例中,所述胞外抗原结合结构域包括与所述胞外抗原结合结构域的5'末端共价接合的信号肽。在某些实施例中,所述跨膜结构域包括CD8多肽、CD28多肽、CD3 ζ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽或其组合。在某些实施例中,所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽。在某些实施例中,所述胞内信号传导结构域进一步包括至少一个共刺激信号传导区。在某些实施例中,所述至少一个共刺激信号传导区包括CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽或其组合。

[0046] 在某些实施例中,所述抗原识别受体是嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)或T细胞样融合蛋白。在某些实施例中,所述抗原识别受体是CAR。

[0047] 在某些实施例中,所述抗原识别受体是重组表达的。在某些实施例中,所述抗原识别受体由载体表达。在某些实施例中,所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

[0048] 当前公开的主题提供了细胞,其包括当前公开的抗原识别受体。在某些实施例中,所述细胞用所述抗原识别受体转导。在某些实施例中,所述抗原识别受体在所述细胞的表面上组成性地表达。

[0049] 在某些实施例中,所述细胞是免疫应答细胞。在某些实施例中,所述细胞是淋巴系的细胞或髓系的细胞。在某些实施例中,所述细胞选自以下组成的组:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和干细胞,可以从所述干细胞分化淋巴样细胞。在某些实施例中,所述细胞是T细胞。在某些实施例中,所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或调节性T细胞。在某些实施例中,所述干细胞是多能干细胞。在某些实施例中,所述多能干细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0050] 当前公开的主题进一步提供了核酸,其编码当前公开的抗原识别受体。当前公开的主题进一步提供了载体,其包括当前公开的核酸分子。在某些实施例中,所述载体是病毒载体。在某些实施例中,所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

[0051] 另外,当前公开的主题提供了宿主细胞,其表达本文公开的核酸分子。在某些实施例中,所述宿主细胞是T细胞。

[0052] 当前公开的主题进一步提供了组合物,其包括本文公开的细胞。在某些实施例中,所述组合物是进一步包括药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0053] 当前公开的主题进一步提供了治疗或改善受试者的疾病或病症的方法。在某些实施例中,所述方法包括向所述受试者施用当前公开的细胞或组合物。在某些实施例中,所述疾病或病症表达uPAR。在某些实施例中,所述疾病或病症与uPAR的过表达相关。在某些实施例中,所述疾病或病症选自以下组成的组:肿瘤、衰老相关病理和与衰老相关的组织衰退。在某些实施例中,所述疾病或病症选自以下组成的组:肺纤维化、心脏纤维化、肝纤维化、动脉粥样硬化、骨关节炎、糖尿病、慢性肾病、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病。

[0054] 在某些实施例中,所述疾病或病症是衰老相关病理。在某些实施例中,所述衰老相关病理选自自由以下组成的组:肺纤维化、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病、糖尿病、骨关节炎、肝纤维化、慢性肾病、心脏纤维化和帕金森氏病。

[0055] 在某些实施例中,所述疾病或病症是肿瘤。在某些实施例中,所述肿瘤选自自由以下组成的组:乳腺癌(包含三阴性乳腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胃癌(stomach cancer)、前列腺癌、胃癌(gastric cancer)、肾癌、胰腺癌、血癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌(例如,胆管癌、肝细胞癌和纤维瘤肝细胞癌)、尿路上皮癌、黑色素瘤和脑癌(包含多形性胶质母细胞瘤)。在某些实施例中,所述血癌选自自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合征、红白血病。在某些实施例中,所述肿瘤是癌症。

[0056] 当前公开的主题进一步提供了增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的方法。在某些实施例中,所述方法包括向所述受试者施用当前公开的细胞或组合物。在某些实施例中,所述免疫激活细胞因子选自自由以下组成的组:粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)、CCL1、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL16、CXCL1、CXCL3、CXCL5、CXCL9、CXCL10和其组合。在某些实施例中,所述受试者是人。

[0057] 当前公开的主题进一步提供了用于治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的试剂盒,所述试剂盒包括当前公开的细胞、核酸或组合物。在某些实施例中,所述试剂盒进一步包括用于使用当前公开的细胞或组合物来治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的书面说明。

[0058] 另外,当前公开的主题提供了产生靶向uPAR的抗原识别受体的方法,所述方法包括将编码所述抗原识别受体的核酸引入到细胞中。

4. 附图说明

[0059] 以下通过举例给出但不旨在将当前公开的主题限制于所描述的具体实施例的详细描述可以结合附图进行理解。

[0060] 图1描绘了当前公开的四种靶向uPAR的CAR在RD114生产细胞上的表达水平。11E10表示11E10 CAR。17C9表示17C9 CAR。8B1表示8B1 CAR。19D7表示19D7CAR。

[0061] 图2描绘了当前公开的四种靶向uPAR的CAR在人T细胞上的表达水平。11E10表示11E10 CAR。17C9表示17C9 CAR。8B1表示8B1 CAR。19D7表示19D7 CAR。

[0062] 图3A和3B描绘了四种当前公开的靶向uPAR的CAR的细胞毒性活性。11E10表示11E10 CAR。17C9表示17C9 CAR。8B1表示8B1 CAR。19D7表示19D7 CAR。

5. 具体实施方式

[0063] 当前公开的主题提供了特异性靶向uPAR的抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))。当前公开的主题进一步提供了包括此类受体的细胞。细胞可以是免疫应答细胞,例

如遗传修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞)。当前公开的主题还提供了使用此类细胞进行治疗的方法,例如用于治疗 and/或改善疾病或病症。

[0064] 本说明书和实例描述了本公开的非限制性实施例。

[0065] 为了本公开的清楚起见而非限制性地,详细描述被分成以下子部分:

[0066] 5.1.定义;

[0067] 5.2.uPAR;

[0068] 5.3.抗原识别受体;

[0069] 5.4.细胞;

[0070] 5.5.核酸组合物和载体;

[0071] 5.6.多肽;

[0072] 5.7.调配物和施用;

[0073] 5.8.治疗方法;以及

[0074] 5.9.试剂盒

[0075] 5.1.定义

[0076] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,《微生物学和分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology)》(第2版1994);《剑桥科学技术词典(The Cambridge Dictionary of Science and Technology)》(编者:Walker,,1988);《遗传学词汇表(The Glossary of Genetics)》,第5版,编者:Rieger等人,(编辑),施普林格出版公司(Springer Verlag)(1991);以及Hale和Marham,《哈勃·柯林斯生物学词典(The Harper Collins Dictionary of Biology)》(1991)。如本文所使用的,除非另外说明,否则以下术语具有赋予其的含义。

[0077] 如本文所使用的,术语“约(about)”或“大约(approximately)”意指在如由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于所述值是如何测量或确定的,例如,测量系统的局限性。例如,“约”可以意指根据本领域的实践在3个或多于3个标准偏差内。可替代地,“约”可以意指给定值的高达20%,优选地高达10%,更优选地高达5%并且还更优选地高达1%的范围。可替代地,特别是对于生物系统或过程,术语可以表示处于一个数量级内,优选地在值的5倍内,并且更优选地在2倍内。

[0078] “免疫应答细胞”意指在免疫应答中起作用的细胞或其祖细胞或子代细胞。在某些实施例中,免疫应答细胞是淋巴系细胞。淋巴系细胞的非限制性实例包含T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞和干细胞,可以从所述干细胞分化淋巴样细胞。在某些实施例中,免疫应答细胞是髓系细胞。

[0079] “激活免疫应答细胞”意指诱导细胞中信号转导或蛋白质表达的变化,导致免疫应答的启动。例如,当CD3链响应于配体结合和免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITAM)而聚集时,产生信号转导级联。在某些实施例中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,包含许多分子聚集在结合的受体(例如,CD4或CD8、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近。这种膜结合信号传导分子的聚集使得包含在CD3链中的ITAM基序被磷酸化。这种磷酸化进而启动T细胞激活通路,最终激活转录因子,如NF- κ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的整体

基因表达,以增加IL-2的产生,用于主调节T细胞蛋白的增殖和表达,从而启动T细胞介导的免疫应答。

[0080] “刺激免疫应答细胞”意指导致稳健和持续免疫应答的信号。在各个实施例中,这发生在免疫细胞(例如,T细胞)激活之后或伴随地通过受体介导,所述受体包含但不限于CD28、4-1BB、OX40、CD40和ICOS。接受多种刺激信号对建立稳健和长期的T细胞介导的免疫应答可能是重要的。T细胞可能很快被抑制,并且对抗原没有应答性。虽然这些共刺激信号的作用可能不同,但它们通常使得基因表达增加,以产生长期存活、增殖和抗凋亡的T细胞,所述细胞对抗原产生稳健应答,以实现完全和持续的根除。

[0081] 如本文所使用的,术语“抗原识别受体”是指能够识别靶抗原(例如,uPAR)的受体。在某些实施例中,抗原识别受体能够在与靶抗原结合后激活免疫或免疫应答细胞(例如,T细胞)。

[0082] 如本文所使用的,术语“抗体”不仅意指完整的抗体分子,还意指保留免疫原结合能力的抗体分子片段。此类片段在本领域中也是熟知的,并且通常在体外和体内采用。因此,如本文所使用的,术语“抗体”不仅意指完整的免疫球蛋白分子,还意指熟知的活性片段 $F(ab')_2$ 和Fab。 $F(ab')_2$ 和缺乏完整抗体得Fe片段的Fab片段,从循环中清除更快,并且可能具有较少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人,《核医学(Nucl Med)》(1983);24:316-325)。如本文所使用的,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。在某些实施例中,“抗体”是一种包括通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链包含重链可变区(本文缩写为 V_H)和重链恒定(C_H)区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2以及CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定 C_L 区。轻链恒定区包含一个结构域 C_L 。 V_H 区和 V_L 区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,所述超变区散布有更保守的被称作构架区(FR)的区。每个 V_H 和 V_L 由按以下顺序从氨基末端到羧基末端布置的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包含免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)以及经典补系统的第一组分(C1q)。

[0083] 如本文所使用的,“CDR”被定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,所述互补决定区氨基酸序列是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见例如,Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第4版美国卫生与公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services),国立卫生研究院(National Institutes of Health)(1987),或IMGT编号系统(Lefranc,《免疫学家(The Immunologist)》(1999);7:132-136;Lefranc等人,《发展与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》(2003);27:55-77)。在某些实施例中,CDR使用可在http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input处访问的IMGT编号系统来鉴定。通常,抗体在可变区包括三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR为抗体与抗原或表位的结合提供了大部分接触残基。在某些实施例中,CDR区使用Kabat编号系统来描述。在某些实施例中,CDR根据Kabat编号系统和Chothia系统来鉴定。

[0084] 如本文所使用的,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠或人)的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区共价连接形成 $V_H:V_L$ 异二聚体的融合蛋白。重链(V_H)和轻链

(V_L) 直接接合或者通过编码肽的接头 (例如, 10个、15个、20个、25个氨基酸) 接合, 所述接头将V_H的N末端与V_L的C末端连接, 或者将V_H的C末端与V_L的N末端连接。接头通常富含甘氨酸用于柔性, 以及富含丝氨酸或苏氨酸用于溶解度。接头可以连接胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。接头的非限制性实例公开于Shen等人,《分析化学 (Anal Chem)》80 (6):1910-1917 (2008) 和WO 2014/087010中, 所述文献的内容特此通过引用整体并入。在某些实施例中, 接头是G4S接头。

[0085] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0086] GGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO:62]

[0087] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:63中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0088] GGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO:63]

[0089] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0090] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO:64]

[0091] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:65中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0092] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO:65]

[0093] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:66中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0094] GGGGS [SEQ ID NO:66]

[0095] 在某些实施例中, 接头包括SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列, 所述氨基酸序列在下文提供:

[0096] GGGSGGGGS [SEQ ID NO:67]

[0097] 尽管去除了恒定区并引入了接头, scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包括编码V_H和V_L的序列的核酸表达, 如由Huston等人,《美国国家科学院院刊》, (1988); 85:5879-5883; 美国专利第5,091,513号、第5,132,405号和第4,956,778号; 以及美国专利公开第20050196754号和第20050196754号描述的。已经描述了具有抑制活性的拮抗scFv (参见例如, Zhao等人,《杂交瘤 (Hybridoma)》(Larchmt) (2008); 27 (6): 455-51; Peter等人,《恶病质、肌肉减少症和肌肉杂志 (J Cachexia Sarcopenia Muscle)》(2012); 8月12日; Shieh等人,《免疫学杂志 (J Immunol)》(2009); 183 (4): 2277-85; Giomarelli等人,《血栓形成与止血杂志 (Thromb Haemost)》(2007); 97 (6): 955-63; Fife等人,《临床研究杂志 (J Clin Invest)》(2006); 116 (8): 2252-61; Brocks等人,《免疫技术 (Immunotechnology)》1997 3 (3): 173-84; Moosmayer等人,《免疫学疗法 (Ther Immunol)》1995 2 (10): 31-40)。已经描述了具有刺激活性的激动性scFv (Peter等人,《生物化学杂志 (J Biochem)》(2003); 25278 (38): 36740-7; Xie等人,《自然生物技术 (Nat Biotech)》1997 15 (8): 768-71; Ledbetter等人,《免疫学关键性综述 (Crit Rev Immunol)》(1997); 17 (5-6): 427-55; Ho等人,《生物化学与生物物理学学报 (Biochim Biophys Acta)》(2003); 1638 (3): 257-66)。

[0098] 如本文所使用的,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包括胞外抗原结合结构域和跨膜结构域的分子,所述胞外抗原结合结构域与能够激活或刺激免疫应答细胞的胞内信号传导结构域融合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域包括scFv。scFv可以源自将抗体的可变重链和轻链区融合。可替代地或另外地,scFv可以源自Fab' (而不是源自抗体,例如从Fab文库获得)。在某些实施例中,scFv与跨膜结构域融合,并且然后与胞内信号传导结构域融合。“基本上相同”或“基本上同源”意指多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如,本文所描述的任何氨基酸序列)或参考核酸序列(例如,本文所描述的任何核酸序列)至少约50%同源或相同。在某些实施例中,此类序列与用于比较的氨基酸或核酸的序列至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源或相同。

[0099] 序列同一性可以通过使用序列分析软件(例如,威斯康星州麦迪逊大学大道1710号威斯康星大学生物技术中心,邮编53705的遗传计算机组的序列分析软件包BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量。此类软件通过对各种取代、缺失和/或其它修饰指定同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包含以下组中的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中e-3与e-100之间的概率得分表示密切相关的序列。

[0100] 如本文所使用的,两个氨基酸序列之间的同源性百分比相当于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是由所述序列所共有的相同位置的数量的函数(即,同源性% = 相同位置的#/位置的总# × 100),所述函数考虑了需要针对两个序列的最佳比对而引入的空位的数量和每个空位的长度。序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法实现。

[0101] 两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用已经并入ALIGN程序(第2.0版)中的E.Meyers和W.Miller的算法(《计算机应用生物科学(Comput. Appl. Biosci.)》,4:11-17(1988))使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分来确定。另外,两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用已并入到GCG软件包(可在www.gcg.com获得)中的GAP程序的Needleman和Wunsch(《分子生物学杂志》48:444-453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,16、14、12、10、8、6或4的空位权重,1、2、3、4、5或6的长度权重确定。

[0102] 另外或可替代地,当前公共的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如标识相关序列。此类搜索可以使用Altschul等人,(1990)《分子生物学杂志》215:403-10的XBLAST程序(第2.0版)来执行。可以用XBLAST程序进行BLAST蛋白搜索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的特定序列(例如,scFv m903、m904、m905、m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目标的有空位的比对,可以利用如在Altschul等人,(1997)《核酸研究》25(17):3389-3402中所述的有空位的BLAST。当利用BLAST程序和带空位的BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0103] “有效量”是足以在治疗时影响有益的或期望的临床结果的量。可以以一个或多个剂量将有效量施用于受试者。在某些实施例中,有效量可以是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其它方式减少疾病的病理后果的量。有效量可以由医生根据具体情况确

定并且在本领域的技术人员的能力范围内。在确定实现有效量的适当剂量时,通常要考虑若干因素。这些因素包含受试者的年龄、性别和体重、所治疗的病状、病状的严重程度以及所施用的细胞的形式和有效浓度。

[0104] 如本文所使用的,术语“内源”是指通常在细胞或组织中表达的核酸分子或多肽。

[0105] 如本文所使用的,术语“外源”是指细胞中非内源性存在的核酸分子或多肽。因此,术语“外源”将涵盖在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽,如外来的、异源的和过表达的核酸分子和多肽。“外源”核酸意指不存在于天然野生型细胞中的核酸;例如,外源核酸可以在序列、位置/定位或两者方面与内源对应物不同。为了清楚起见,外源核酸相对于其天然内源对应物可以具有相同或不同的序列;它可以通过基因工程化到细胞本身或其祖细胞中,并且可以任选地与替代性控制序列,如非天然启动子或分泌序列连接。

[0106] “异源核酸分子或多肽”意指通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中的核酸分子(例如,cDNA、DNA或RNA分子)或多肽。此核酸可以来自另一种生物体,或者它可以是例如在细胞或样品中不正常表达的mRNA分子。

[0107] “增加”意指正向改变至少约5%。改变可以是约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0108] “减少”意指负向改变至少约5%。改变可以是约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0109] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指在不同程度上在其天然状态下发现的通常伴随其的组分材料。“分离”表示与原始来源或周围环境的分离程度。“纯化”表示分开程度高于分离。“纯化的”或“生物学上纯的”蛋白质充分不含其它材料,使得任何杂质都不会实质性地影响蛋白质的生物学性质或引起其它不良后果。也就是说,如果核酸或肽在通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品,则所述核酸或肽是纯化的。纯度和均匀性通常使用分析化学技术,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱确定。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一条带。对于可以进行修饰(例如,磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,所述蛋白质可以单独纯化。

[0110] “分离的细胞”意指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0111] 如本文所使用的,术语“抗原结合结构域”是指能够与细胞上存在的特定抗原决定簇或抗原决定簇组特异性结合的结构域。

[0112] “识别”意指与靶标选择性地结合。识别肿瘤的T细胞可以表达与肿瘤抗原结合的受体(例如,CAR)。

[0113] “信号序列”或“前导序列”意指存在于新合成蛋白的N末端的肽序列(例如,5个、10个、15个、20个、25个或30个氨基酸),所述肽序列将所述蛋白引导到分泌通路中。

[0114] “特异性结合(specifically binds)”或“特异性结合(specifically binds to)”或“特异性靶向”意指识别和/或结合所关注生物分子(例如,多肽,例如uPAR多肽),但基本上不识别和/或结合样品,例如天然包含当前公开的多肽(例如,uPAR多肽)的生物样品中的其它分子的多肽或其片段。

[0115] 术语“包括(comprise)”、“包括(comprising)”旨在具有美国专利法中赋予其的广义含义并且可以意指“包含(include)”、“包含(including)”等。

[0116] 如本文所使用的,“治疗”是指试图改变正被治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以被执行以用于预防或者在临床病理学进程期间执行。治疗的治疗作用包含但不限于预防疾病发生或复发、缓解症状、减少疾病的任何直接或间接病理性后果、预防转移、降低疾病进展速率、改善或缓和疾病状态以及缓解或改进预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗可以防止受影响或诊断的受试者或怀疑患有所述病症的受试者的由于病症引起的恶化,而且治疗可以预防有患上所述病症的风险或怀疑患有所述病症的受试者的所述病症的发作或所述病症的症状。

[0117] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,如人类或非人类动物,例如哺乳动物。哺乳动物包含但不限于人类、灵长类动物、农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。非人类动物受试者的非限制性实例包含啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;牛;马;以及非人灵长类动物,如猿、猴。如本文所使用的,术语“免疫受损”是指患有免疫缺陷的受试者。受试者非常容易受到机会性感染,机会性感染是由通常不会在免疫系统健康的人身上引起疾病但会影响免疫系统功能低下或受抑制的人的生物体引起的感染。

[0118] 当前公开的主题的其它方面在以下公开中描述,并且在当前公开的主题的范围内。

[0119] 5.2. uPAR

[0120] uPAR (尿激酶型纤溶酶原激活物受体),也被称为CD87,是糖基磷脂酰肌醇锚定的蛋白质。uPAR富含半胱氨酸,并且由三个与尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)结合的串联的LU结构域组成。(Kessler等人,《神经化学杂志(J.Neurochem.)》(2017);142:7-18;Llinas等人,《欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J.)》(2005);24(9):1655-63;Huai等人,《科学》(2006);311(5761):656-9;Chelsea等人,《人类基因组学(Human Genomics)》(2016);10:10)。uPAR还与其它几种蛋白质,包含玻连蛋白、uPAR相关蛋白(uPARAP)和膜蛋白的整合蛋白家族相互作用。

[0121] uPAR与各种不同类型的癌症中的肿瘤生长或转移相关,所述癌症包含乳腺癌(包含三阴性乳腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、直肠癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、胃癌、泌尿道癌、黑色素瘤、脑癌(包含多形性胶质母细胞瘤)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和急性髓细胞性白血病(AML)。它也在衰老中起作用,如与衰老相关的衰老相关疾病。它还可以调节免疫应答和细胞-基质相互作用,并且促进肿瘤细胞增殖和从休眠中出现。

[0122] uPAR在细胞衰老过程期间被诱导,细胞衰老可以由某些癌症因子引发,并且在一系列年龄相关和组织损伤病理中累积(LIST)。衰老细胞的消除可以改善对疗法的应答,并且改善包含纤维化等在内的组织损伤病理的症状。

[0123] 发现可溶性尿激酶型纤溶酶原激活物受体(suPAR)在上述许多病理中上调,在慢性阻塞性肺病、哮喘、肝衰竭、心力衰竭、心血管疾病和类风湿性关节炎中也上调。(Desmedt等人,《临床实验室科学重要评论(Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.)》(2017);54(2):117-133, Amor等人,《自然》(2020年7月);583(7814):127-132)。因此,uPAR(例如,suPAR)可以用作疾病阶段生物标志物。发现uPAR在衰老细胞上高度表达。(Wagner等人,《自然》(2020);583(7814):37-38)。许多致癌信号传导通路和肿瘤微环境条件如缺氧可以激活转录因子,进而调节uPAR。uPAR可以通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚与质膜外层缔合来调节蛋白水解,但它也

可以从细胞表面分泌或脱落。(Harvey等人,《自然综述:分子细胞生物学(Nat.Rev.Mol.Cell Biol)》(2010);11,23-36)。uPAR表达与子宫内膜癌的侵袭能力直接相关。(Foca等人,《妇科肿瘤学(Gynecol.Oncol.)》(2000);79(2):244-50)。uPAR与若干血液系统恶性病,特别是急性白血病和多发性骨髓瘤有关。(Hata等人,《血液(Blood)》(1993);81:3357-3364;MC Bene等人,《白血病(Leukemia)》(2004);18,394-400)。据报告,uPAR与乳腺癌患者的不良预后相关。(Bo等人,《肿瘤学报告(Oncol.Rep.)》(2005);14(1):105-12;Foekens等人,《癌症研究(Cancer Res.)》(2000);60(3):636-43)。

[0124] 在某些实施例中,uPAR是人uPAR,其包括具有UniProt参考号Q03405-1(SEQ ID NO:61)的氨基酸序列或其片段或由其组成。SEQ ID NO:61在下文提供。在某些实施例中,uPAR包括三个结构域:结构域1(结构域UPAR/Ly6 1)、结构域2(结构域UPAR/Ly62)和结构域3(结构域UPAR/Ly6 3)。在某些实施例中,结构域1包括SEQ ID NO:61的氨基酸23至114或由其组成。在某些实施例中,结构域2包括SEQ ID NO:61的氨基酸115至213或由其组成。在某些实施例中,结构域3包括SEQ ID NO:61的氨基酸214至305或由其组成。

[0125] MGHPPLLPLLL LLLHTCVPAS WGLRCMQCKT NGDCRVEECA LGQDLCRTTI VRLWEEGEEL
ELVEKSCTHS EKTNRITLSYR TGLKITSLTE VVCGLDLCNQ GNSGRAVTYS RSRYLECISC
GSSDMSCERG RHQSLQCRSP EEQCLDVVTH WIQEGEEGRP KDDRHLRGCG YLPGCPGSNG
FHNNDTFHFL KCCNTTKCNE GPILELENLP QNGRQCYSCK GNSTHGCSSE ETFLIDCRGP
MNQCLVATGT HEPKNQSYMV RGCATASMCQ HAHLGDAFSM NHIDVSCCTK SGCNHPDLDV
QYRSGAAPQP GPAHLSTIT LLMTARLWGG TLLWT [SEQ ID NO: 61]

[0126] 在某些实施例中,所述uPAR包括与SEQ ID NO:61中所示的氨基酸序列或其片段至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%相同的氨基酸序列或由其组成。

[0127] 在某些实施例中,抗原识别受体与人uPAR的一部分结合。在某些实施例中,抗原识别受体与结构域1、结构域2和结构域3中至少一个结合。在某些实施例中,抗原识别受体与结构域2结合。在某些实施例中,抗原识别受体与结构域3结合。在某些实施例中,抗原识别受体与结构域2和结构域3两者结合。在某些实施例中,抗原识别受体与SEQ ID NO:61的氨基酸115至303结合。在某些实施例中,抗原识别受体与SEQ ID NO:61的氨基酸115至305结合。

[0128] 5.3. 抗原识别受体

[0129] 当前公开的抗原识别受体特异性靶向uPAR或与其结合。在某些实施例中,所述抗原识别受体为嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施例中,所述抗原识别受体是T细胞受体(TCR)。在某些实施例中,所述抗原识别受体是TCR样融合分子。

[0130] 当前公开的主题还提供了核酸分子,所述核酸分子编码当前公开的抗原识别受体。在某些实施例中,核酸分子包括编码本文公开的靶向uPAR的抗原识别受体的多肽的核苷酸序列。

[0131] 5.3.1. T细胞受体(TCR)

[0132] 在某些实施例中,所述抗原识别受体是TCR。TCR是一种由两条可变链组成的表达为具有不变CD3链分子的复合物的一部分的二硫键连接的异二聚体蛋白。在T细胞的表面上发现的TCR负责将抗原识别为与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽。在某些实施例中,TCR包括 α 链和 β 链(分别由TRA和TRB编码)。在某些实施例中,TCR包括 γ 链和 δ 链(分别由TRG和TRD编码)。

[0133] TCR的每条链由两个胞外结构域构成：可变(V)区和恒定(C)区。恒定区靠近细胞膜，随后是跨膜区和短的胞质尾部。可变区与肽/MHC复合物结合。两条链的可变结构域各自具有三个互补决定区(CDR)。

[0134] 在某些实施例中，TCR可以与三种二聚体信号传导模块CD3 δ /ε、CD3 γ/ε和CD247ζ/ζ或ζ/η形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC(肽/MHC)接合时，表达TCR复合物的T细胞被激活。

[0135] 在某些实施例中，TCR是内源性TCR。在某些实施例中，所述抗原识别受体是天然存在的TCR。

[0136] 在某些实施例中，所述抗原识别受体是外源性TCR。在某些实施例中，所述抗原识别受体是重组TCR。在某些实施例中，所述抗原识别受体是重组TCR。在某些实施例中，所述重组TCR与任何重组TCR相差至少一个氨基酸残基。在某些实施例中，所述重组TCR与任何天然存在的TCR相差至少约2个、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基。在某些实施例中，所述重组TCR由天然存在的TCR经至少一个氨基酸残基修饰而成。在某些实施例中，所述重组TCR由天然存在的TCR经至少约2个、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基修饰而成。

[0137] 5.3.2.嵌合抗原受体(CAR)

[0138] 在某些实施例中，所述抗原识别受体是CAR。CAR是工程化受体，其将所关注的特异性移植或赋予免疫效应细胞。CAR可以用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上；通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0139] 存在三代CAR。“第一代”CAR通常由与跨膜结构域融合的胞外抗原结合结构域(例如，scFv)构成，所述跨膜结构域与胞质/胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别，并通过单个融合分子中的CD3ζ链信号传导结构域激活CD4⁺和CD8⁺ T细胞两者，而不依赖HLA介导的抗原呈递。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如，CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的胞内信号传导结构域添加到CAR的胞质尾部，以向T细胞提供另外的信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如，CD28或4-1BB)和激活(CD3ζ)两者的那些。“第三代”CAR包括提供多种共刺激(例如，CD28和4-1BB)和激活(CD3ζ)两者的那些。在某些实施例中，所述抗原识别受体是第一代CAR。在某些实施例中，抗原识别受体是不包括共刺激分子或其片段的胞内信号传导结构域的CAR。在某些实施例中，所述抗原识别受体是第二代CAR。

[0140] 在某些实施例中，CAR包括与uPAR特异性结合的胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。

[0141] 5.3.2.1.CAR的胞外抗原结合结构域

[0142] 在某些实施例中，胞外抗原结合结构域是scFv。在某些实施例中，所述scFv是人scFv。在某些实施例中，所述scFv是人源化scFv。在某些实施例中，所述scFv是鼠scFv。在某些实施例中，通过用抗原-Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定scFv。

[0143] 在某些实施例中，胞外抗原结合结构域是Fab。在某些实施例中，Fab是交联的。在某些实施例中，所述胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。

[0144] 前述分子中的任一个分子可以包括在具有异源序列的融合蛋白中以形成所述胞

外抗原结合结构域。在某些非限制性实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(体现为例如scFv或其类似物)以结合亲和力,例如以约 1×10^{-6} M或更小,例如约 1×10^{-7} M或更小、约 1×10^{-8} M或更小、约 1×10^{-9} M或更小、约 1×10^{-10} M或更小或约 1×10^{-11} M或更小的解离常数(K_D)与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 1×10^{-7} M或更小的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-7} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 1×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 1.9×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 2×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 3×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 3.5×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 4×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 4.2×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 1×10^{-7} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 9.5×10^{-8} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 6×10^{-9} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 7×10^{-9} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域以约 6.6×10^{-9} M的 K_D 与uPAR(例如,人uPAR)结合。

[0145] CAR的胞外抗原结合结构域的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如,生长抑制)、或蛋白质印迹(Western Blot)测定来确认。这些测定中的每种测定通常通过采用对目的复合物具有特异性的标记试剂(例如,抗体或scFv)来检测特定目的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记并且用于放射免疫测定(RIA)(参见例如,Weintraub,B.,放射免疫测定原理(Principles of Radioimmunoassays),第七期放射配体测定技术培训课程(Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques),《内分泌学会(The Endocrine Society)》,1986年3月,所述文献通过引用并入本文)。放射性同位素可以通过 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射自显影等方式进行检测。在某些实施例中,用荧光标志物标记靶向uPAR的胞外抗原结合结构域。荧光标志物的非限制性实例包含绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、石青和mKalama1)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、天青和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、柠檬黄、Venus和YPet)。在某些实施例中,靶向uPAR的人scFv用GFP标记。

[0146] 在某些实施例中,CDR根据Kabat系统、Chothia系统或其组合来鉴定。

[0147] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_H ,所述 V_H 包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO:1-3提供于表1中。

[0148] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO:4-6提供于表1中。

[0149] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_H , 所述 V_H 包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2、包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;以及 V_L , 所述 V_L 包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0150] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_H , 所述 V_H 包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDR3;以及 V_L , 所述 V_L 包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0151] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_H , 所述 V_H 包括与SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_H , 所述 V_H 包括与SEQ ID NO:25约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 胞外抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列的 V_H 。编码SEQ ID NO:25的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:33中示出。SEQ ID NO:25和33提供于下表1中。

[0152] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_L , 所述 V_L 包括与SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括 V_L , 所述 V_L 包括与SEQ ID NO:26约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中, 胞外抗原结合结构域包括包含SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的 V_L 。编码SEQ ID NO:26的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:34中示出。SEQ ID NO:26和34提供于下表1中。

[0153] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括包含SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的 V_L 。在某些实施例中, V_H 和 V_L 通过接头连接。

[0154] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接, 使得重链可变区(V_H) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中, 如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv, 则可变区定位于从N末端至C末端: V_H - V_L 。

[0155] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接, 使得轻链可变区(V_L) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中, 如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv, 则可变区定位于从N末端至C末端: V_L - V_H 。

[0156] 在某些实施例中, scFv被指定为“8B1”。

[0157] 在某些实施例中, 表1中公开的CDR序列根据Kabat系统或Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。SEQ ID NO:2-6根据Kabat系统来鉴定。SEQ ID NO:1根据Kabat系统和

Chothia系统的组合来鉴定。

[0158] 表1

CDR	1	2	3
V _H	GYTFTNYGMN [SEQ ID NO: 1]	WINTNTGEPTYAEEFKG [SEQ ID NO: 2]	YEFAY [SEQ ID NO: 3]
V _L	RASENIYSNLA [SEQ ID NO: 4]	AATNLAD [SEQ ID NO: 5]	QHFWGTPWT [SEQ ID NO: 6]
[0159] 全 V _H	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNETATYFCGDYEFAYWGQGLVTVSA [SEQ ID NO: 25]		
全 V _L	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWEYQQKQKSPQQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSYYCQHFWGTPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 26]		
[0160] V _H 的 DNA	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCAACACTGGAGAGCCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGGGGATTACGAGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA [SEQ ID NO: 33]		
V _L 的 DNA	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGCTGCAACAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA [SEQ ID NO: 34]		

[0161] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 7中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 8中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 7-9提供于表2中。

[0162] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 10中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 11中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 12中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 10-12提供于表2中。

[0163] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 7中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 8中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 10中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 11中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 12中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0164] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 12中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0165] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括与

SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括V_H,所述V_H包括与SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括V_H,所述V_H包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:27的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:35中示出。SEQ ID NO:27和35提供于下表2中。

[0166] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括V_L,所述V_L包括与SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括V_L,所述V_L包括与SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括V_L,所述V_L包括SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:28的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:36中示出。SEQ ID NO:28和36提供于下表2中。

[0167] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括包含SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列的V_L。在某些实施例中,V_H和V_L通过接头连接。

[0168] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端:V_H-V_L。

[0169] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端:V_L-V_H。

[0170] 在某些实施例中,scFv被指定为“11E10”。

[0171] 在某些实施例中,表2中公开的CDR序列根据Kabat系统或Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。SEQ ID NO:8-12根据Kabat系统来鉴定。SEQ ID NO:7根据Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。

[0172] 表2

CDR	1	2	3
[0173] V _H	GYTFTDYVIT [SEQ ID NO: 7]	EIYPRSGNTYYNAKFRG [SEQ ID NO: 8]	GGYYDFDFFAMDY [SEQ ID NO: 9]

[0174]

V _L	RSSKSLHNSGNTYL Y [SEQ ID NO: 10]	RMSNLAS [SEQ ID NO: 11]	MQHLEYPYT [SEQ ID NO: 12]
全 V _H	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTDYVITWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGN TYYNNAKFRGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGYDFDFFAMDYWGQ GTSVTVSS [SEQ ID NO: 27]		
全 V _L	DIVMTQAAPSVPTPGESVSI SCRSSKSLHNSGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMS NLASGVPDRFSGSGGTAFTRLIRSRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTTKLEIK [SEQ ID NO: 28]		
V _H 的 DNA	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG ATGTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTACTATGTTATAACCTGGGTGAAG CAGAGAAGTGGACAGGGCCTTGAATGGATTGGAGAGATTTATCCTCGAAGTGGTAAT ACTTACTACAATGCGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCC AACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTTC TGTGCTAGAGGGGGCTACTATGATTTTCGACTTCTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAA GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 35]		
V _L 的 DNA	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTA TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTG TATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCC AACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAAGTCTTTTC ACACTGAGAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAA CATCTAGAATATCCGTACACGTTTCGAGGGGGGACCAAGTTGGAAATAAAA [SEQ ID NO: 36]		

[0175] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO:13-15提供于表3中。

[0176] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO:16-18提供于表3中。

[0177] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0178] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0179] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括与SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括与SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约

85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_H ,所述 V_H 包括SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:29的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:37中示出。SEQ ID NO:29和37提供于下表3中。

[0180] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_L ,所述 V_L 包括SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:30的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:38中示出。SEQ ID NO:30和38提供于下表3中。

[0181] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列的 V_L 。在某些实施例中, V_H 和 V_L 通过接头连接。

[0182] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_H - V_L 。

[0183] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_L - V_H 。

[0184] 在某些实施例中,scFv被指定为“17C9”。

[0185] 在某些实施例中,表3中公开的CDR序列根据Kabat系统或Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。SEQ ID NO:14-18根据Kabat系统来鉴定。SEQ ID NO:13根据Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。

[0186] 表3

CDR	1	2	3
V _H	GFTFSSYAMS [SEQ ID NO: 13]	EISSGGTYTYYPDVTG [SEQ ID NO: 14]	DDGFYAWFGY [SEQ ID NO: 15]
V _L	TSSQSLLDSDGKTYLN [SEQ ID NO: 16]	LVSKLDS [SEQ ID NO: 17]	WQGFTHFPRT [SEQ ID NO: 18]
全 V _H	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQSPGPKRLEWVAEISSGGTYTYYPDVTGTRFTISRDNAKNTLYLEMSSLRSEDAMYICARDDGFYAWFGYWGQGTLVTVSA [SEQ ID NO: 29]		
全 V _L	DVVMTQTPLTSLVTLGQPASISCTSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGFTHFPRTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 30]		
V _H 的 DNA	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCTAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGC CAGTCTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGAGAAATTAGTAGTGGTGGTACTTAC ACCTACTATCCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG AACACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC TGTGCAAGGGATGATGTTTTCTACGCTGGTTTGGTTACTGGGGCCAAGGACTCTG GTCACCTGTCTCTGCA [SEQ ID NO: 37]		
V _L 的 DNA	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTACCATTGGACAACCAGCC TCCATCTCTTGCACGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTG AATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCT AAAGTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTT CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAA GGTACACATTTTCTCGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA [SEQ ID NO: 38]		

[0187] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv) 包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 19中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 20中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 21中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 19-21提供于表4中。

[0189] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv) 包括V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 22中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 23中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 24中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 22-24提供于表4中。

[0190] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv) 包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 19中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 20中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 21中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 22中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 23中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 24中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0191] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv) 包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 19中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 20中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 21中所示的氨基酸序列的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 22中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 23中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 24中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0192] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv) 包括V_H, 所述V_H包括与

SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括 V_H ,所述 V_H 包括与SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_H ,所述 V_H 包括SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:31的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:39中示出。SEQ ID NO:31和39提供于下表4中。

[0193] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_L ,所述 V_L 包括SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:32的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:40中示出。SEQ ID NO:32和40提供于下表4中。

[0194] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv) 包括包含SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列的 V_L 。在某些实施例中, V_H 和 V_L 通过接头连接。

[0195] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_H - V_L 。

[0196] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L) 定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_L - V_H 。

[0197] 在某些实施例中,scFv被指定为“19D7”。

[0198] 在某些实施例中,表4中公开的CDR序列根据Kabat系统或Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。SEQ ID NO:20-24根据Kabat系统来鉴定。SEQ ID NO:19根据Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。

[0199] 表4

CDR	1	2	3
V _H	GYTFSTYWIE [SEQ ID NO: 19]	EILPGSGSTNYNEKFKG [SEQ ID NO: 20]	GNGLRRYAMDY [SEQ ID NO: 21]
V _L	KASQSVSNDVT [SEQ ID NO: 22]	YASNRYT [SEQ ID NO: 23]	QQDYSSPFT [SEQ ID NO: 24]
全 V _H	QVQLQLSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPFGHGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSLTSSEDSAVYYCARGNGLRRYAMDYWGQGTSVTVSS [SEQ ID NO: 31]		
全 V _L	SIVMTQTPKFLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVTWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVDPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPFTFGSGTKLEIK [SEQ ID NO: 32]		
[0200] V _H 的 DNA	CAGGTTTCAGCTGCAGCTGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTACCTACTGGATAGAGTGGGTAAAA CAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAATTCAAAGGCAAGGCCACATTCAGTCTGATACATCCTCC AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTAC TGTGCAAGAGGGAACGGATTACGACGGTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 39]		
V _L 的 DNA	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTCTCAGCAGGAGACAGGGTT ACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAACCTGGTACCAACAG AAGCCAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATATACTATGCATCCAATCGCTACACTGGA GTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGC ACTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCA TTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA [SEQ ID NO: 40]		

[0201] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 41中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 42中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 43中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 41-43提供于表5中。

[0202] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 44中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 45中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 46中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 44-46提供于表5中。

[0203] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 41中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 42中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 43中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 44中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 45中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 46中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0204] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 41中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 42中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 43中所示的氨基酸序列的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 44中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 45中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 46中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0205] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括与SEQ ID NO: 47中所示的氨基酸序列至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源或相同的氨基酸序列。例如, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所

述 V_H 包括与SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_H ,所述 V_H 包括SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:47的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:57中示出。SEQ ID NO:47和57提供于下表5中。

[0206] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_L ,所述 V_L 包括SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:48的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:58中示出。SEQ ID NO:48和58提供于下表5中。

[0207] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括包含SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列的 V_L 。在某些实施例中, V_H 和 V_L 通过接头连接。

[0208] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_H - V_L 。

[0209] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_L - V_H 。

[0210] 在某些实施例中,scFv被指定为“6C8”。

[0211] 在某些实施例中,表5中公开的CDR序列根据Kabat系统或Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。SEQ ID NO:42-46根据Kabat系统来鉴定。SEQ ID NO:41根据Kabat系统和Chothia系统的组合来鉴定。

[0212] 表5

CDR	1	2	3
V _H	GFTFTNYGMS [SEQ ID NO: 41]	TTNSNGGATYYPDVSKG [SEQ ID NO: 42]	DRDYYGGSMY [SEQ ID NO: 43]
V _L	KSSQSLLYSSDQKNYLA [SEQ ID NO: 44]	WASTRES [SEQ ID NO: 45]	QQYYSYPFT [SEQ ID NO: 46]
全 V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLKISCAASGFTFTNYGMSWVRQTPDKRLELVATTNSNGGATYYPDVSKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYFCTRDRDYYGGSMYWGQGTSTVTVSS [SEQ ID NO: 47]		
全 V _L	DIVMSQSPSSLAVSVGERVSMSCSKSSQSLLYSSDQKNYLAWYQQKPGQSPPELLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAIYYCQQYYSYPFTFGSGTKLEIK [SEQ ID NO: 48]		
[0213] V _H 的 DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAATCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACAATAATAGTAATGGTGGTGCCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTACAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTTCTGTACAAGAGATCGAGATTACTACGGGGGGTCTATGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 57]		
V _L 的 DNA	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGCGTTGGAGAGAGGGTTTCTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCGATCAAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTGAACTGCTGATTTACTGGGCTTCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTACTGTTCAGCAATATTATAGTTATCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA [SEQ ID NO: 58]		

[0214] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 49中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 50中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 51中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 49-51提供于表6中。

[0215] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 52中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 53中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 54中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。SEQ ID NO: 52-54提供于表6中。

[0216] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 49中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 50中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 51中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 52中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包含SEQ ID NO: 53中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2以及包含SEQ ID NO: 54中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0217] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括包含SEQ ID NO: 49中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 50中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 51中所示的氨基酸序列的CDR3; 以及V_L, 所述V_L包括包含SEQ ID NO: 52中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO: 53中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO: 54中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0218] 在某些实施例中, CAR的胞外抗原结合结构域(例如, scFv)包括V_H, 所述V_H包括与SEQ ID NO: 55中所示的氨基酸序列至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约

95%)同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_H ,所述 V_H 包括与SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_H ,所述 V_H 包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:55的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:59中示出。SEQ ID NO:55和59提供于下表6中。

[0219] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源或相同的氨基酸序列。例如,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括 V_L ,所述 V_L 包括与SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括 V_L ,所述 V_L 包括SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:56的氨基酸序列的示例性核苷酸序列在SEQ ID NO:60中示出。SEQ ID NO:56和60提供于下表6中。

[0220] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)包括包含SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列的 V_L 。在某些实施例中, V_H 和 V_L 通过接头连接。

[0221] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_H - V_L 。

[0222] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_L - V_H 。

[0223] 在某些实施例中,scFv被指定为“14C5”。

[0224] 在某些实施例中,表6中公开的CDR序列根据Kabat系统来鉴定。

[0225] 表6

CDR	1	2	3
V _H	GFSLTSYGVH [SEQ ID NO: 49]	VLWAGGSTDYNSALMS [SEQ ID NO: 50]	GGLRQVFAY [SEQ ID NO: 51]
V _L	RSSQSIVYSNGNTYL E [SEQ ID NO: 52]	KVSNRFS [SEQ ID NO: 53]	FQGSHPYPT [SEQ ID NO: 54]
[0226] 全 V _H	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVLWAGGSTDYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARGGLRQVFAYWGQGT LVT VSA [SEQ ID NO: 55]		
全 V _L	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPYPTFGGGTKLEMK [SEQ ID NO: 56]		
V _H 的 DNA	CTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTTATGGGCTGG TGAAGCACAGATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAA CTCGAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCAT GTACTACTGTGCCAGAGGGGATTACGACAGGTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTGCA [SEQ ID NO: 59]		
[0227] V _L 的 DNA	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTAGTCTTGAGATCAAGCC TCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTATATAGTAATGGAACACCTATTTA GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTT CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAA GGTTCACATGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA [SEQ ID NO: 60]		

[0228] 如本文所使用的,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变当前公开的包括氨基酸序列的靶向uPAR的CAR(例如,CAR的胞外抗原结合结构域)的结合特性的氨基酸修饰。保守修饰可以包含氨基酸取代、添加和缺失。通过本领域已知的标准技术,如定点诱变和PCR介导的诱变,可以将修饰引入到当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域中。根据氨基酸的物理化学性质,如电荷和极性,可以将氨基酸分类成组。保守氨基酸取代是氨基酸残基被同一组中的氨基酸替代的取代。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电荷的氨基酸包含赖氨酸、精氨酸、组氨酸;带负电荷的氨基酸包含天冬氨酸、谷氨酸;带中性电荷的氨基酸包含丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。另外,氨基酸可以按极性分类:极性氨基酸包含精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸;非极性氨基酸包含丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自同一组的其它氨基酸残基替代,并且可以使用本文所描述的功能测定测试改变的抗体的保留功能(即,上文(c)至(1)中所述的功能)。在某些实施例中,特定序列或CDR区内不超过一个、不超过两个、不超过三个、不超过四个、不超过五个残基被改变。

[0229] 与特定序列(例如,SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56)具有至少约80%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的V_H和/或V_L氨基酸序列可以含有相对于特定序列的取代(例如,保守取

代)、插入或缺失,但保留与uPAR结合的能力。在某些实施例中,在特定序列(例如,SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56)中总共有1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在胞外抗原结合结构域的CDR之外的区(例如,在FR中)。在某些实施例中,胞外抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56的V_H和/或V_L序列,包含所述序列(SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56)的翻译后修饰。

[0230] 在某些实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合片段包括例如任一种当前公开的scFv(例如,8B1、11E10、17C9、19D7、6C8和14C5)的V_H CDR1、CDR2和CDR3序列以及V_L CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合部分包括例如任一种当前公开的scFv(例如,8B1、11E10、17C9、19D7、6C8和14C5)的V_H序列和V_L序列。

[0231] 在某些实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合部分包括scFv 8B1的V_H CDR1、CDR2和CDR3序列以及V_L CDR1、CDR2和CDR3序列。例如,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合部分包括V_H,所述V_H包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的CDR3;以及V_L,所述V_L包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR3。在某些实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合部分包括scFv 8B1的V_H序列和V_L序列。例如,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争结合于uPAR(例如,人uPAR),所述参考抗体或其抗原结合部分包括包含具有SEQ ID NO:25中所示的序列的氨基酸的V_H和包含具有SEQ ID NO:26中所示的序列的氨基酸的V_L。

[0232] 在某些实施例中,胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分结合于uPAR(例如,人uPAR)上的同一表位区。例如,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分结合于uPAR(例如,人uPAR)上的同一表位区,所述参考抗体或其抗原结合部分包括例如任一种当前公开的scFv(例如,8B1、11E10、17C9、19D7、6C8和14C5)的V_H CDR1、CDR2和CDR3序列以及V_L CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合部分结合于EMR2(例如,人EMR2)上的同一表位区,所述参考抗体或其抗原结合部分包括例如任一种当前公开的scFv(例如,8B1、11E10、17C9、19D7、6C8和14C5)的V_H序列和V_L序列。

[0233] 与参考抗体或其抗原结合部分交叉竞争或竞争结合于uPAR(例如,人uPAR)的胞外

抗原结合结构域可以通过使用本领域已知的常规方法来鉴定,所述方法包含但不限于ELISA、放射免疫测定(RIA)、Biacore、流式细胞术、蛋白质印迹和任何其它合适的定量或定性抗体结合测定。竞争ELISA描述于Morris,“通过竞争ELISA进行的蛋白质抗原的表位定位(Epitope Mapping of Protein Antigens by Competition ELISA)”,《蛋白质协议手册(The Protein Protocols Handbook)》(1996),第595-600页,J.Walker编辑中,所述文献通过引用整体并入。在某些实施例中,抗体结合测定包括测量参考抗体与uPAR多肽的初始结合,将参考抗体与测试胞外抗原结合结构域混合,在存在测试胞外抗原结合结构域的情况下测量参考抗体与uPAR多肽的第二次结合,并且将所述初始结合与所述参考抗体的第二次结合进行比较,其中与所述初始结合相比,参考抗体与uPAR多肽的第二次结合减少表明测试胞外抗原结合结构域与参考抗体交叉竞争结合于uPAR,例如识别相同或基本上相同的表位、重叠表位或相邻表位的结合。在某些实施例中,参考抗体被标记,例如,用荧光染料、生物素或过氧化物酶标记。在某些实施例中,uPAR多肽在细胞中表达,例如在流式细胞术测试中。在某些实施例中,uPAR多肽被固定到表面上,所述表面包含Biacore芯片(例如,在Biacore测试中),或适于表面等离子体共振分析的其它介质。在存在完全不相关的抗体(不与uPAR结合)的情况下,参考抗体的结合可以作为对照高值。对照低值可以通过将标记的参考抗体与未标记的参考抗体一起温育来获得,其中标记的参考抗体的结合会发生竞争和减少。在某些实施例中,将参考抗体与uPAR多肽的结合减少至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的测试胞外抗原结合结构域被认为是与参考抗体交叉竞争结合于uPAR的胞外抗原结合结构域。在某些实施例中,测定在室温下进行。

[0234] 在某些实施例中,抗体结合测定包括测量测试胞外抗原结合结构域与uPAR多肽的初始结合,将测试胞外抗原结合结构域与参考抗体混合,在存在参考抗体的情况下测量测试胞外抗原结合结构域与uPAR多肽的第二次结合,并且将初始结合与测试胞外抗原结合结构域的第二次结合进行比较,其中与所述初始结合相比,测试胞外抗原结合结构域与uPAR多肽的第二次结合减少表明测试胞外抗原结合结构域与参考抗体交叉竞争结合于uPAR,例如识别相同或基本上相同的表位、重叠表位或相邻表位的结合。在某些实施例中,测试胞外抗原结合结构域被标记,例如,用荧光染料、生物素或过氧化物酶标记。在某些实施例中,uPAR多肽在细胞中表达,例如在流式细胞术测试中。在某些实施例中,uPAR多肽被固定到表面上,所述表面包含Biacore芯片(例如,在Biacore测试中),或适于表面等离子体共振分析的其它介质。在存在完全不相关的抗体(不与uPAR结合)的情况下,测试胞外抗原结合结构域的结合可以作为对照高值。通过将标记的测试胞外抗原结合结构域与未标记的测试胞外抗原结合结构域一起温育,可以获得对照低值,其中标记的测试胞外抗原结合结构域的结合会发生竞争和减少。在某些实施例中,在存在参考抗体的情况下,与uPAR多肽的结合减少至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的测试胞外抗原结合结构域被认为是与参考抗体交叉竞争结合于uPAR的胞外抗原结合结构域。在某些实施例中,测定在室温下进行。

[0235] 在某些非限制性实施例中,当前公开的CAR的胞外抗原结合结构域包括连接胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区的接头序列或肽接头。在某些实施例中,接头包括SEQ ID NO:62中所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,接头包括SEQ ID

N0:63中所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,接头包括SEQ ID N0:64中所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,接头包括SEQ ID N0:65中所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,接头包括SEQ ID N0:66中所示的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,接头包括SEQ ID N0:67中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0236] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得重链可变区(V_H)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_H-V_L 。

[0237] 在某些实施例中,CAR的胞外抗原结合结构域内的可变区必须一个接一个地连接,使得轻链可变区(V_L)定位于胞外抗原结合结构域的N末端处。在某些实施例中,如果CAR的胞外抗原结合结构域是scFv,则可变区定位于从N末端至C末端: V_L-V_H 。

[0238] 另外,胞外抗原结合结构域可以包括引导新生蛋白进入内质网的前导肽或信号肽。CAR被糖基化和锚定在细胞膜中,则信号肽或前导肽可能是必不可少的。信号序列或前导序列可以是存在于新合成蛋白的N末端的肽序列(例如,约5个、约10个、约15个、约20个、约25个或约30个氨基酸),所述肽序列将所述蛋白引导到分泌通路中。在某些实施例中,信号肽与胞外抗原结合结构域的5'末端共价接合。在某些实施例中,信号肽包括CD8多肽,例如,CAR包括截短的CD8信号肽。

[0239] 4.3.2.2.CAR的跨膜结构域

[0240] 在某些非限制性实施例中,CAR的跨膜结构域包括跨膜的至少一部分的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域产生不同的受体稳定性。在抗原识别之后,受体聚集,并且信号传递到细胞。根据当前公开的主题,CAR的跨膜结构域可以包括CD8或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD28或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD3 ζ 或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD4或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、4-1BB或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、OX40或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、ICOS或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD84或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD166或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD8a或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD8b或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、ICAM-1或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CTLA-4或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD27或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、CD40或其片段的天然或经修饰的跨膜结构域、NKGD2或其片段或其组合。

[0241] 在某些实施例中,CAR的跨膜结构域包括CD8多肽(例如,CD8或其片段的跨膜结构域)。在某些实施例中,CAR的跨膜结构域包括人CD8或其片段的跨膜结构域。在某些实施例中,CD8多肽包括与具有NCBI参考号NP_001139345.1 (SEQ ID N0:68)的氨基酸序列或其片段至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施例中,CD8多肽包括作为SEQ ID N0:68的连续部分的氨基酸序列或由其组成,所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个以及至多235个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各个实施例中,CD8多肽包括SEQ ID N0:68的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200、137至209或200至235的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,CAR的跨膜结构域包括CD8多肽,所述多肽包括SEQ ID N0:68的氨基酸137至209或由其组成。SEQ ID N0:68在下文提供。

[0242] MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPT
FLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRP
VVKSGDKPSLSARYV [SEQ ID NO:68]

[0243] 在某些实施例中, CAR的跨膜结构域包括小鼠CD8或其片段的跨膜结构域。在某些实施例中, CD8多肽包括与具有NCBI参考号AAA92533.1 (SEQ ID NO:69) 的氨基酸序列或其片段至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施例中, CD8多肽包括作为SEQ ID NO:69的连续部分的氨基酸序列或由其组成, 所述多肽的长度为至少约20个、或至少约30、或至少约40、或至少约50、或至少约60、或至少约70、或至少约100、或至少约200以及至多247个氨基酸。可替代地或另外地, 在非限制性的各个实施例中, CD8多肽包括SEQ ID NO:69的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219或200至247的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中, CAR的跨膜结构域包括CD8多肽, 所述多肽包括SEQ ID NO:69的氨基酸151至219或由其组成。SEQ ID NO:69在下文提供。

[0244]

1	MASPLTRFLS	LNLLLMGESI	ILGSGEAKPQ	APELRIFPKK	MDAELGQKVD	LVCEVLGSVS
61	QGCSWLFQNS	SSKLPQPTFV	VYMASSHNI	TWDEKLNSSK	LFSAVRDTNN	
	KYVLTlnKFS					
121	KENEGYFCS	VISNSVMYFS	SVVPVLQKVN	STTTKPVLR	PSPVHPTGTS	
	QPQRPEDCRP					
181	RGSVKGTGLD	FACDIYIWAP	LAGICVAPLL	SLIITLICYH	RSRKRVCCKP	
	RPLVRQEGKP					
241	RPSEKIV					

[SEQ ID NO: 69]

[0245] 在某些实施例中, 当前公开的CAR的跨膜结构域包括CD28多肽 (例如, CD28或其片段的跨膜结构域)。

[0246] 在某些实施例中, CAR的跨膜结构域包括人CD28或其片段的跨膜结构域。在某些实施例中, CD28多肽包括与具有NCBI参考号NP_006130 (SEQ ID NO:70) 的氨基酸序列或其片段至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施例中, CD28多肽包括作为SEQ ID NO:70的连续部分的氨基酸序列或由其组成, 所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个以及至多220个氨基酸。可替代地或另外地, 在非限制性的各个实施例中, CD28多肽包括SEQ ID NO:70的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、153至179或200至220的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中, CAR的跨膜结构域包括CD28多肽, 所述多肽包括SEQ ID NO:70的氨基酸153至179或由其组成。SEQ ID NO:70在下文提供:

[0247]

1	MLRLLLALNL	FPSIQVTGNK	ILVKQSPMLV	AYDNAVNLSC	KYSYNLFSRE	FRASLHKGLD
61	SAVEVCVYVG	NYSQQLQVYS	KTGFNC DGKL	GNESVT FYLQ	NLYVNQTDIY	
	FCKIEVMYPP					
121	PYLDNEKSNG	TIIHVKGKHL	CPSPLFPGPS	KPFWVLVVVG	GVLACYSLLV	
	TVAFIIFWVR					
181	SKRSRLHSD	YMNMTPRRPG	PTRKHYQPYA	PPRDFAAAYRS		

[SEQ ID NO: 70]

[0248] 在某些实施例中, CAR的跨膜结构域包括CD28多肽 (例如, 小鼠CD28或其片段的跨膜结构域)。在某些实施例中, CD28多肽包括与具有NCBI参考号NP_031668.3 (SEQ ID NO:

71)的氨基酸序列或其片段至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施例中,CD28多肽包括作为SEQ ID NO:71的连续部分的氨基酸序列或由其组成,所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个以及至多218个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各个实施例中,CD28多肽包括SEQ ID NO:71的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、151至177或200至218的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,CAR的跨膜结构域包括CD28多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:71的氨基酸151至177或由其组成。SEQ ID NO:71在下文提供:

```

1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FDNETVTFR L WNLHVNHTDI
YFCKIEFMYP
[0249] 121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV
ALCVIWTNSR
181 RNRLQSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA R DFAAYRP [SEQ ID NO: 71]

```

[0250] 在某些非限制性实施例中,CAR进一步包括将胞外抗原结合结构域与跨膜结构域连接的间隔子区。间隔子区可以是足够柔性的,以允许抗原结合结构域在不同方向上定向,从而促进抗原识别,同时保持CAR的激活活性。

[0251] 在某些实施例中,CAR的铰链/间隔子区包括CD8或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD28或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD3 ζ 或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD40或其片段的天然或经修饰的铰链区、4-1BB或其片段的天然或经修饰的铰链区、OX40或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD84或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD166或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD8a或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD8b或其片段的天然或经修饰的铰链区、ICOS或其片段的天然或经修饰的铰链区、ICAM-1或其片段的天然或经修饰的铰链区、CTLA-4或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD27或其片段的天然或经修饰的铰链区、CD40或其片段的天然或经修饰的铰链区、NKGD2或其片段的天然或经修饰的铰链区、合成多肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)或其组合。铰链/间隔子区可以是来自IgG1的铰链区或免疫球蛋白的CH₂CH₃区和CD3的部分、CD28多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:70或71的一部分)、CD8多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:68或69的一部分)、与其至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%同源或相同的前述中的任一者的变体或合成的间隔子序列。

[0252] 4.3.2.3.CAR的胞内信号传导结构域

[0253] 在某些实施例中,CAR包括胞内信号传导结构域。在某些非限制性实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽。CD3 ζ 可以激活或刺激细胞(例如,淋巴系的细胞,例如T细胞)。野生型(“天然”)CD3 ζ 包括三个功能性免疫受体基于酪氨酸的激活基序(ITAM)、三个功能性富含碱基的伸展(BRS)区(BRS1、BRS2和BRS3)。抗原被结合后,CD3 ζ 向细胞(例如,淋巴系的细胞,例如T细胞)传递激活信号。CD3 ζ 链的胞内信号传导结构域是内源性TCR的信号的主要传递者。

[0254] 在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括天然CD3 ζ 多肽。在某些实施例中,CD3 ζ 多肽包括与具有NCBI参考号NP_932170(SEQ ID NO:72)的氨基酸序列或其片段至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。

在某些非限制性的某些实施例中,CD3 ζ 多肽包括作为SEQ ID NO:72的连续部分的氨基酸序列或由其组成,所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个以及至多164个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各个实施例中,CD3 ζ 多肽包括SEQ ID NO:72的氨基酸1至164、1至50、50至100、52至164、100至150或150至164的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:72的氨基酸52至164或由其组成。SEQ ID NO:72在下文提供:

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSSRSAD
61 APAYQQGQONQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEG
[0255] YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO:
72]
```

[0256] 在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括经修饰的CD3 ζ 多肽。在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括一个、两个或三个ITAM。在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括天然ITAM1。在某些实施例中,天然ITAM1包括SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0257] QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR[SEQ ID NO:74]

[0258] 编码SEQ ID NO:74的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:75中示出。

[0259] CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGA
[SEQ ID NO:75]

[0260] 在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括包含一个或多个功能缺失突变的ITAM1变体。在某些实施例中,ITAM1变体包括两个功能缺失突变或由其组成。在某些实施例中,一个或多个(例如,两个)功能缺失突变中的每一个包括ITAM1中的酪氨酸残基的突变。在某些实施例中,ITAM1变体由两个功能缺失突变组成。在某些实施例中,ITAM1变体包括SEQ ID NO:76中所示的氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列在下文提供。
QNQLFNEELNLGRREEFDVLDKR[SEQ ID NO:76]

[0261] 编码SEQ ID NO:76的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:77中示出。

[0262] CAGAACCAGCTCTTTAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTTCGATGTTTTGGACAAGAGA
[SEQ ID NO:77]

[0263] 在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括天然ITAM2。在某些实施例中,天然ITAM2包括SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列在下文提供。

[0264] QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK[SEQ ID NO:78]

[0265] 编码SEQ ID NO:78的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:79中示出。

[0266] CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
[SEQ ID NO:79]

[0267] 在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括ITAM2变体。在某些实施例中,ITAM2变体包括一个或多个功能缺失突变或由其组成。在某些实施例中,ITAM2变体包括两个功能缺失

突变或由其组成。在某些实施例中,一个或多个(例如,两个)功能缺失突变中的每一个包括ITAM2中的酪氨酸残基的突变。在某些实施例中,ITAM1变体由两个功能缺失突变组成。在某些实施例中,ITAM2变体包括SEQ ID NO:80中所示的氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列在下文提供。QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK[SEQ ID NO:80]

[0268] 编码SEQ ID NO:80的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:81中示出。

[0269] CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAAA[SEQ ID NO:81]

[0270] 在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括天然ITAM3。在某些实施例中,天然ITAM3包括SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列在下文提供。

[0271] HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ[SEQ ID NO:82]

[0272] 编码SEQ ID NO:82的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:83中示出。

[0273] CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG[SEQ ID NO:83]

[0274] 在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括ITAM3变体。在某些实施例中,ITAM3变体包括两个功能缺失突变或由其组成。在某些实施例中,一个或多个(例如,两个)功能缺失突变中的每一个包括ITAM3中的酪氨酸残基的突变。在某些实施例中,ITAM3变体包括两个功能缺失突变或由其组成。在某些实施例中,ITAM3变体包括SEQ ID NO:84中所示的氨基酸序列或由其组成,所述氨基酸序列在下文提供。

[0275] HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ[SEQ ID NO:84]

[0276] 编码SEQ ID NO:84的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:85中示出。

[0277] CACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAG[SEQ ID NO:85]

[0278] 国际专利申请公开第W02019/133969号中公开了各种经修饰的CD3 ζ 多肽和包括经修饰的CD3 ζ 多肽的CAR,所述国际专利申请公开特此通过引用整体并入。

[0279] 在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括经修饰的CD3 ζ 多肽,所述多肽包括天然ITAM1、包含一个或多个(例如,两个)功能缺失突变或由其组成的ITAM2变体以及包含一个或多个(例如,两个)功能缺失突变或由其组成的ITAM3变体。在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括经修饰的CD3 ζ 多肽,所述多肽包括天然ITAM1、由两个功能缺失突变组成的ITAM2变体以及由两个功能缺失突变组成的ITAM3变体。在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括经修饰的CD3 ζ 多肽,所述多肽包括由SEQ ID NO:74中所示的氨基酸序列组成的天然ITAM1、由SEQ ID NO:78中所示的氨基酸序列组成的ITAM2变体和由SEQ ID NO:84中所示的氨基酸序列组成的ITAM3变体。在某些实施例中,CAR被指定为“1XX”。在某些实施例中,经修饰的CD3 ζ 多肽包括SEQ ID NO:86中所示的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:86在下文提供:

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLEFN
[0280] ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGDGLF QGLSTATKDT FDALHMQALP PR [SEQ ID
NO: 86]

[0281] 在某些实施例中, CAR的胞内信号传导结构域包括经修饰的CD3 ζ 多肽, 所述多肽包括与SEQ ID NO:86或其片段至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%相同的氨基酸序列或由其组成, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。

[0282] 编码SEQ ID NO:86的氨基酸序列的示例性核酸序列在下文提供的SEQ ID NO:87中示出。

[0283] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA
GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGA
TTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGA
CACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC[SEQ ID NO:87]

[0284] 在某些非限制性实施例中, CAR的胞内信号传导结构域进一步包括至少一个共刺激信号传导区。在某些实施例中, 共刺激信号传导区包括至少一个共刺激分子或其片段。在某些实施例中, 共刺激信号传导区包括至少一个共刺激分子或其片段的胞内结构域。

[0285] 如本文所使用的, “共刺激分子”是指除抗原受体或其配体之外的可以提供淋巴细胞对抗原的高效应答的细胞表面分子。在某些实施例中, 共刺激分子可以提供最佳的淋巴细胞激活。共刺激分子的非限制性实例包含CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、NKGD2、CD2、FN14、HVEM、LTBR、CD28H、TNFR1、TNFR2、BAFF-R、BCMA、TACI、TROY、RANK、CD40、CD27、CD30、EDAR、XEDAR、GITR、DR6和NGFR以及其组合。共刺激分子可以与共刺激配体结合, 所述共刺激配体是一种在与其受体结合时产生共刺激应答, 即当抗原识别受体(例如, 嵌合抗原受体(CAR))与其靶抗原结合时产生影响刺激的胞内应答的在细胞表面上表达的蛋白质。作为一个实例, 4-1BB配体(即, 4-1BBL)可以与4-1BB结合以提供胞内信号, 所述信号与CAR信号结合诱导CAR⁺ T细胞的效应细胞功能。

[0286] 在某些实施例中, CAR的胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区, 所述共刺激信号传导区包括CD28多肽, 例如CD28或其片段的胞内结构域。CD28多肽可以包括或具有与SEQ ID NO:70中所示的氨基酸序列或其片段至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源或相同的氨基酸序列, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施例中, CD28多肽包括作为SEQ ID NO:70的连续部分的氨基酸序列或由其组成, 所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个以及至多220个氨基酸。可替代地或另外地, 在非限制性的各个实施例中, CD28多肽包括SEQ ID NO:70的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、114至220、180至220或200至220的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中, CAR的胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区, 所述共刺激信号传导区包括CD28多肽, 所述多肽包括SEQ ID NO:70的氨基酸180至220的氨基酸序列或由其组成。

[0287] 在某些实施例中, CD28多肽包括与SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列或其片段至

少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施例中,CD28多肽包括作为SEQ ID NO:71的连续部分的氨基酸序列或由其组成,所述多肽的长度为至少约20个、或至少约30个、或至少约40个、或至少约50个以及至多218个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各个实施例中,CD28多肽包括SEQ ID NO:71的氨基酸1至218、1至50、50至100、100至150、150至218、178至218或200至218的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,当前公开的CAR的共刺激信号传导区包括CD28多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:71的氨基酸178至218或由其组成。

[0288] 在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包括4-1BB多肽,例如4-1BB或其片段的胞内结构域。4-1BB多肽可以包括与具有NCBI参考号NP_001552 (SEQ ID NO:73) 中所示的氨基酸序列或其片段至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源或相同的氨基酸序列或由其组成,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施例中,4-1BB多肽包括作为SEQ ID NO:73的连续部分的氨基酸序列或由其组成,所述多肽的长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个、或至少100个、或至少150个或至少150个以及至多255个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各个实施例中,4-1BB多肽包括SEQ ID NO:73的氨基酸1至255、1至50、50至100、100至150、150至200或200至255的氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包括4-1BB多肽,所述多肽包括SEQ ID NO:73的氨基酸214至255的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:73在下文提供。

```
1  MGNSCYNIVA  TLLLVLNFER  TRSLQDPCSN  CPAGTFCDNN  RNQICSPCPP  NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG  VFRTRKECSS  TSNAECDCTP  GFHCLGAGCS  MCEQDCKQGQ
    ELTKKGCKDC
[0289] 121  CFGTFNDQKR  GICRPWTNCS  LDGKSVLVNG  TKERDVVCGP  SPADLSPGAS
        SVTPPAPARE
        181  PGHSPQIISF  FLALTSTALL  FLLFFLT LRF  SVVKRGRKKL  LYIFKQPFMR
        PVQTTQEEDG
        241  CSCRFPEEEE  GGCEL [SEQ ID NO: 73]
```

[0290] 在某些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包括两个或更多个共刺激分子或其部分的胞内结构域,例如CD28或其片段的胞内结构域和4-1BB或其片段的胞内结构域,或者CD28或其片段的胞内结构域和OX40或其片段的胞内结构域。

[0291] 在某些实施例中,当前公开的CAR进一步包括用于在人细胞中表达核酸序列的诱导型启动子。用于表达CAR基因的启动子可以是组成型启动子,如泛素C(UbiC)启动子。

[0292] 5.3.3. TCR样融合分子

[0293] 在某些实施例中,所述抗原识别受体是TCR样融合分子。TCR融合分子的非限制性实例包含HLA非依赖性的基于TCR的嵌合抗原受体(也被称为“HIT-CAR”,例如在国际专利申请第PCT/US19/017525号中公开的那些,所述国际专利申请通过引用整体并入)和T细胞受体融合构建体(TRuC)(例如,Baeuerle等人,“合成的TRuC受体与完整的T细胞受体接合产生

有效的抗肿瘤应答 (Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response)”,《自然通信 (Nature Communications)》第10卷,文章编号:2087 (2019) 中公开的那些,所述文献通过引用整体并入)。

[0294] 在某些实施例中,TCR样融合分子包括抗原结合链,所述抗原结合链包括胞外抗原结合结构域和恒定结构域,其中所述TCR样融合分子以HLA非依赖性方式与抗原结合。在某些实施例中,恒定结构域包括T细胞受体恒定区,所述T细胞受体恒定区选自以下组成的组:天然或经修饰的TRAC肽、天然或经修饰的TRBC肽、天然或经修饰的TRDC肽、天然或经修饰的TRGC肽以及其任何变体或功能片段。在某些实施例中,恒定结构域包括天然或经修饰的TRAC肽。在某些实施例中,恒定结构域包括天然或经修饰的TRBC肽。在某些实施例中,恒定结构域能够与另一个恒定结构域形成同二聚体或异二聚体。在某些实施例中,抗原结合链能够与CD3 ζ 多肽缔合。在某些实施例中,抗原结合链在与抗原结合后,能够激活与抗原结合链缔合的CD3 ζ 多肽。在某些实施例中,CD3 ζ 多肽的激活能够激活免疫应答细胞。在某些实施例中,TCR样融合分子能够与CD3复合物整合,并且提供HLA非依赖性抗原识别。在某些实施例中,TCR样融合分子替代CD3/TCR复合物中的内源性TCR。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域能够与另一个胞外抗原结合结构域二聚化。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括细胞表面受体的配体、细胞表面配体的受体、抗体或其片段的抗原结合部分或TCR的抗原结合部分。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括一个或两个免疫球蛋白可变区。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括抗体的重链可变区(V_H)。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括抗体的轻链可变区(V_L)。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域能够与另一个胞外抗原结合结构域二聚化。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括抗体的 V_H ,其中 V_H 能够与包括抗体 V_L 的另一个胞外抗原结合结构域二聚化,并且形成可变片段(Fv)。在某些实施例中,TCR样融合分子的胞外抗原结合结构域包括抗体的 V_L ,其中 V_L 能够与包括抗体 V_H 的另一个胞外抗原结合结构域二聚化,并且形成可变片段(Fv)。

[0295] 5.4. 细胞

[0296] 当前公开的主题提供了包括当前公开的靶向uPAR的抗原识别受体(例如,4.3节中公开的受体)的细胞。在某些实施例中,细胞选自淋巴系细胞和髓系细胞组成的组。在某些实施例中,所述细胞是免疫应答细胞。在某些实施例中,免疫应答细胞是淋巴系细胞。

[0297] 在某些实施例中,所述细胞是淋巴系的细胞。淋巴系的细胞可以产生抗体、调节细胞免疫系统、检测血液中的外来药剂、检测宿主的外来细胞等。淋巴系的细胞的非限制性实例包含T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、树突状细胞和干细胞,可以从所述干细胞分化淋巴样细胞。在某些实施例中,所述干细胞是多能干细胞(例如,胚胎干细胞)。

[0298] 在某些实施例中,所述细胞是T细胞。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,并且主要负责细胞介导的免疫。T细胞涉及适应性免疫系统。当前公开的主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包含中枢记忆T细胞)、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞)和以下两种类型的效应记忆T细胞:例如,TEM细胞和TEMRA细胞、调节性T细胞(也被称为抑制性T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、自然杀伤T细胞、粘膜相关不变T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤T细胞)是T淋巴细

胞的子集,能够诱导受感染的体细胞或肿瘤细胞死亡。通过引入抗原识别受体,例如CAR,可以对患者自身的T细胞进行基因修饰以靶向特定抗原。在某些实施例中,所述免疫应答细胞是T细胞。所述T细胞可以是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在某些实施例中,所述T细胞是CD4⁺ T细胞。在某些实施例中,所述T细胞是CD8⁺ T细胞。

[0299] 在某些实施例中,所述细胞是NK细胞。自然杀伤(NK)细胞可以是作为细胞介导免疫的一部分并且在先天免疫应答期间起作用的淋巴细胞。NK细胞不需要预先激活就能对靶细胞产生细胞毒性作用。

[0300] 当前公开的主题的人淋巴细胞的类型包含但不限于外周供体淋巴细胞,例如以下中公开的外周供体淋巴细胞:Sadelain等人,《癌症自然评论(Nat Rev Cancer)》(2003);3:35-45(公开了经基因修饰以表达CAR的外周供体淋巴细胞);Morgan,R.A.等人,2006《科学》314:126-129(公开了经基因修饰以表达包括 α 和 β 异二聚体的全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物的外周供体淋巴细胞);Panelli等人,《免疫学杂志》(2000);164:495-504;Panelli等人,《免疫学杂志》(2000);164:4382-4392(公开了来自肿瘤活检中的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物);以及Dupont等人,《癌症研究》(2005);65:5417-5427;Papanicolaou等人,《血液》(2003);102:2498-2505(公开了采用人工抗原呈递细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞在体外选择性地扩增抗原特异性外周血白细胞)。

[0301] 所述细胞(例如,T细胞)可以是自体的、非自体的(例如,同种异体的)或从工程化的祖细胞或干细胞体外衍生。

[0302] 当前公开的主题的细胞可以是髓系细胞。髓系细胞的非限制性实例包含单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、肥大细胞、红细胞、血小板和髓系细胞可以从其分化的干细胞。在某些实施例中,干细胞是多能干细胞(例如,胚胎干细胞或诱导多能干细胞)。

[0303] 在某些实施例中,当前公开的细胞能够调节肿瘤微环境。肿瘤具有不利于宿主免疫应答的微环境,所述微环境涉及恶性细胞保护自身免于免疫识别和消除的一系列机制。这种“不利的肿瘤微环境”包括多种免疫抑制因子,包含浸润性调节性CD4⁺ T细胞(Treg)、骨髓源性抑制细胞(MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、免疫抑制性细胞因子(包含TGF- β)和靶向由激活的T细胞表达的免疫抑制性受体的配体表达(CTLA-4和PD-1)。这些免疫抑制机制在维持耐受性和抑制不适当的免疫应答中发挥作用,然而在肿瘤微环境中,这些机制阻止了有效的抗肿瘤免疫应答。总的来说,这些免疫抑制因子在遇到靶向肿瘤细胞时,可以诱导适应性转移的CAR修饰的T细胞的显著无反应性或凋亡。

[0304] 在某些实施例中,细胞可以用当前公开的靶向uPAR的抗原识别受体转导,使得细胞表达抗原识别受体。

[0305] 5.5.核酸组合物和载体

[0306] 当前公开的主题提供了一种核酸,所述核酸编码当前公开的靶向uPAR的抗原识别受体(例如,4.3节中公开的受体)。进一步提供了包括本文公开的核酸的核酸组合物。还提供了包括此类核酸组合物的细胞。

[0307] 在某些实施例中,核酸组合物进一步包括与当前公开的靶向uPAR的抗原识别受体可操作地连接的启动子。

[0308] 在某些实施例中,启动子是内源性或外源性的。在某些实施例中,外源性启动子选

自延伸因子(EF)-1启动子、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)启动子、猿猴病毒40早期启动子(SV40)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子和金属硫蛋白启动子。在某些实施例中,启动子是诱导型启动子。在某些实施例中,诱导型启动子选自NFAT转录应答元件(TRE)启动子、CD69启动子、CD25启动子和IL-2启动子。

[0309] 组合物和核酸组合物可以通过本领域已知的方法或如本文所描述施用于受试者或/和递送到细胞中。细胞(例如,T细胞或NK细胞)的基因修饰可以通过用重组DNA构建体转导基本上同质的细胞组合物来完成。在某些实施例中,逆转录病毒载体(例如, γ 逆转录病毒载体或慢病毒载体)用于将DNA构建体引入到细胞中。例如,可以将编码抗原识别受体的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,并且可以由其内源性启动子、逆转录病毒长末端重复序列或对所关注靶细胞类型具有特异性的启动子驱动表达。也可以使用非病毒载体。

[0310] 为了对细胞进行初始基因修饰以包含当前公开的靶向uPAR的抗原识别受体(例如,CAR),可以采用逆转录病毒载体进行转导,然而也可以使用任何其它合适的病毒载体或非病毒递送系统。抗原识别受体可以构建在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中。产生多顺反子表达盒的元件的实例包含但不限于各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- κ B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎 IRES、丙型肝炎 IRES、瘟病病毒 IRES、口疮病毒 IRES、小核糖核酸病毒 IRES、脊髓灰质炎病毒 IRES 和脑心肌炎病毒 IRES) 和可切割接头(例如,2A肽,例如P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽)。逆转录病毒载体和适当的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人体细胞的功能。已知多种产生兼嗜性病毒的细胞系,包含但不限于 PA12(Miller等人,(1985)《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》(1985);5:431-437);PA317(Miller等人,《分子细胞生物学》(1986);6:2895-2902);以及CRIP(Danos等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》(1988);85:6460-6464)。非兼嗜性颗粒也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包膜和任何其它本领域已知的颗粒假型。

[0311] 可能的转导方法还包含细胞与生产细胞的直接共培养(Bregni等人,《血液》(1992);80:1418-1422),或者与单独的病毒上清液或含有或不含适当的生长因子和聚阳离子的浓缩载体原液一起培养(Xu等人,《实验血液学(Exp Hemat)》(1994);22:223-230;以及Hughes等人《临床研究杂志(J Clin Invest)》(1992);89:1817)。

[0312] 其它转导病毒载体可以用于修饰细胞。在某些实施例中,选择的载体表现出高效的感染以及稳定的整合和表达(参见例如,Cayouette等人,《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》8:423-430,1997;Kido等人,《当前眼科研究(Current Eye Research)》15:833-844,1996;Bloomer等人,《病毒学杂志(Journal of Virology)》71:6641-6649,1997;Naldini等人,《科学》272:263-267,1996;以及Miyoshi等人,《美国国家科学院院刊》94:10319,1997)。可以使用的其它病毒载体包含例如腺病毒、慢病毒和腺嘌呤相关病毒载体、痘苗病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,如爱泼斯坦-巴尔病毒(还参见例如,以下中的载体:Miller,《人类基因疗法》(1990);15-14;Friedman,《科学》244:1275-1281,1989;Eglitis等人,《生物技术(BioTechniques)》(1988);6:608-614;Tolstoshev等人,《生物技术当前述评(Cur Opin Biotechnol)》(1990);1:55-61;Sharp,《柳叶刀(The Lancet)》(1991);337:1277-78;Cornetta等人,《核酸研究与分子生物学(Nucleic Acid Research and Molecular Biology)》36:311-22,1987;Anderson,《科学》(1984);226:401-409;Moen,《血

细胞(Blood Cells)》17:407-16,1991;Miller等人,《生物技术》(1989);7:980-90;LeGal La Salle等人,《科学》(1993);259:988-90;以及Johnson,《胸(Chest)》(1995)107:77S-83S)。逆转录病毒载体特别发达并已用于临床环境中(Rosenberg等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》(1990);323:370,1990;Anderson等人,美国专利第5,399,346号)。

[0313] 非病毒方法也可以用于细胞的基因修饰。例如,可以通过在存在脂质转染(Feigner等人,《美国国家科学院院刊》(1987);84:7413;Ono等人,《神经科学快报(Neurosci Lett)》(1990);17:259;Brigham等人,《美国医学杂志(Am J Med Sci)》(1989);298:278;Staubinger等人,《酶学方法(Methods in Enzymol)》(1983);101:512,Wu等人,《生物化学杂志(J Biol Chem)》(1988);263:14621;Wu等人,《生物化学杂志》(1989);264:16985)的情况下或在手术条件下通过微注射(Wolff等人,《科学》(1990);247:1465)施用核酸分子来将核酸分子引入细胞中。其它用于基因转移的非病毒手段包含使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体对于将DNA递送到细胞中而言也可能具有潜在的益处。将正常基因移植到受试者的受影响组织中也可以通过将正常核酸离体转移到可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其子代)中、之后将细胞(或其后代)注射到靶向组织或全身性注射来完成。重组受体也可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如,锌指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得。瞬时表达可以通过RNA电穿孔获得。

[0314] 任何靶向基因组编辑方法也可以用于将当前公开的抗原识别受体递送到细胞或受试者。在某些实施例中,CRISPR系统用于递送本文公开的当前公开的抗原识别受体。在某些实施例中,锌指核酸酶用于递送抗原识别受体。在某些实施例中,TALEN系统用于递送当前公开的抗原识别受体。

[0315] 成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,所述系统包含Cas9(一种能够利用crRNA作为其向导来修饰DNA的蛋白质)、CRISPR RNA(crRNA,含有Cas9使用的RNA,以引导其到达宿主DNA的正确区段,以及与tracrRNA(通常呈发夹环形式)结合的区,从而与Cas9形成活性复合物)、反式激活crRNA(tracrRNA,与crRNA结合并且与Cas9形成活性复合物)和DNA修复模板的任选区段(引导细胞修复过程的DNA,允许插入特定的DNA序列)。CRISPR/Cas9通常采用质粒来转染靶细胞。crRNA需要针对每个应用进行设计,因为这是Cas9用来鉴定并直接与细胞中靶DNA结合的序列。携带CAR表达盒的修复模板也需要针对每个应用而设计,因为它必须与切割的任一侧上的序列重叠,并且编码插入序列。多个crRNA和tracrRNA可以包装在一起形成单向导RNA(sgRNA)。此sgRNA可以与Cas9基因接合在一起,并且制成质粒,以便转染到细胞中。

[0316] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工限制酶,其是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域组合而产生的。锌指结构域可以被工程化以靶向特定DNA序列,这允许锌指核酸酶靶向基因组内的期望序列。单独的ZFN的DNA结合结构域通常含有多个单独的锌指重复序列,并且每个都可以识别多个碱基对。用于产生新的锌指结构域的最常见方法应组合具有已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的切割结构域是来自IIIs型限制性核酸内切酶FokI的非特异性切割结构域。使用内源性同源重组(HR)机制和携带CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可用于将CAR表达盒插入到基因组中。当靶向序列被ZFN切割时,HR机制搜索受损染色体与同源DNA模板之间的同源性,并且然后在染色体的两个断裂端之间复制模板的序列,由此

同源DNA模板被整合到基因组中。

[0317] 转录激活因子样效应子核酸酶 (TALEN) 是限制性酶,其可以被工程化以切割特定的DNA序列。TALEN系统的操作原理与ZFN几乎相同。它们是通过将转录激活因子样效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域组合而产生的。转录激活因子样效应物 (TALE) 由33-34个氨基酸重复基序构成,具有两个可变位置,对特定核苷酸具有强识别能力。通过组装这些TALE的阵列,可以工程化TALE DNA结合结构域以结合期望的DNA序列,并且由此引导核酸酶在基因组的特定位置处进行切割。用于多核苷酸疗法方法的cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如,人巨细胞病毒 (CMV)、猿猴病毒40 (SV40) 或金属硫蛋白启动子) 被引导并由任何合适的哺乳动物调节元件或内含子(例如,延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构) 来调节。例如,如果期望的话,已知优先在特定细胞类型中引导基因表达的增强子可以用于引导核酸的表达。所使用的增强子可以包含但不限于被表征为组织或细胞特异性增强子的增强子。可替代地,如果将基因组克隆用作治疗性构建体,则可以通过同源调节序列或(如果期望的话) 通过源自包含上文所描述的任何启动子或调节元件的异源来源的调节序列来介导调节。

[0318] 用于递送基因组编辑剂/系统的方法可以根据需要而变化。在某些实施例中,所选基因组编辑方法的组分作为一个或多个质粒中的DNA构建体被递送。在某些实施例中,这些组分通过病毒载体递送。常见的递送方法包含但不限于电穿孔、显微注射、基因枪、穿刺、流体静压、连续输注、超声处理、磁感染、腺相关病毒、病毒载体的包膜蛋白假型、复制型载体顺式和反式作用元件、单纯疱疹病毒和化学媒剂(例如,寡核苷酸、脂质体复合物(lipoplex)、聚合物囊泡、聚复合物、树枝状聚合物、无机纳米颗粒和细胞穿透肽)。

[0319] 5.6. 多肽

[0320] 当前公开的主题提供了用于通过在序列中产生改变来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。此类改变可以包含某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。当前公开的主题进一步包含本文公开的任何天然存在的多肽的类似物(包含但不限于uPAR、CD8、CD28、4-1BB和CD3 ζ)。类似物可以通过氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者与本文公开的天然存在的多肽不同。类似物可以表现出与当前公开的主题的天然存在的氨基酸序列的全部或部分至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多同源或相同。序列比较的长度为至少5个、10个、15个或20个氨基酸残基,例如至少25个、50个或75个氨基酸残基,或超过100个氨基酸残基。同样,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中e-3与e-100之间的概率得分表示密切相关的序列。修饰包含多肽的体内和体外化学衍生,例如乙酰化、羧基化、磷酸化或糖基化;此类修饰可以在多肽合成或加工期间发生,或者在用分离的修饰酶处理后发生。类似物也可以通过一级序列的改变而不同于天然存在的多肽。这些包含天然的和诱导的基因变体(例如,由照射或暴露于乙基甲基硫酸盐的随机诱变或由Sambrook, Fritsch和Maniatis,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版), CSH出版社(CSH Press), 1989或Ausubel等人,同上中所描述的定点诱变产生)。还包含含有除L-氨基酸以外的残基,例如D-氨基酸或非天然存在或合成的氨基酸,例如 β 或 γ 氨基酸的环化肽、分子和类似物。

[0321] 除了全长多肽,当前公开的主题还提供了本文公开的多肽中的任何多肽的片段。如本文所使用的,术语“片段”意指至少5个、10个、13个或15个氨基酸。在某些实施例中,片

段包括至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施例中,片段包括至少60个至80个、100个、200个、300个或更多个连续氨基酸。片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生或者可以由正常的蛋白质加工产生(例如,将生物活性不需要的氨基酸从新生多肽去除或者将氨基酸通过替代性mRNA剪接或替代性蛋白质加工事件去除)。

[0322] 5.7. 调配物和施用

[0323] 当前公开的主题提供了组合物,所述组合物包括当前公开的细胞。在某些实施例中,所述组合物是进一步包括药学上可接受的载剂的药物组合物。包括当前公开的细胞的组合物可以方便地以无菌液体制剂的形式提供,所述无菌液体制剂例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其可以被缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外地,施用液体组合物(尤其通过注射)稍微更加方便。另一方面,粘性组合物可以被调配在适当的粘度范围内以提供与特定组织的较长接触时间段。液体或粘性组合物可以包括载剂,所述载剂可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)和其合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0324] 无菌可注射溶液可以通过将基因修饰的细胞按照期望并入所需量的适当的溶剂和各种量的其它成分来制备。此类组合物可以与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。所述组合物也可以被冻干。取决于施用途和期望的制剂,组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、着色剂等。可以查询标准文本(如通过引用并入本文中的“雷明顿氏药物科学(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE)”,第17版,1985)以在不用进行过度实验的情况下制备合适的制剂。

[0325] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包含抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌剂以及抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。可以通过使用延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝(aluminum monostearate)和明胶)来实现可注射药物形式的延长的吸收。然而,根据当前公开的主题,所使用的任何媒剂、稀释剂或添加剂必须与基因修饰的细胞相容。

[0326] 组合物可以是等渗的,即,其可以具有与血液和泪液相同的渗透压。组合物的期望的等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的药剂(如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质)来实现。氯化钠对于含有钠离子的缓冲液可能是特别合适的。

[0327] 如果期望的话,组合物的粘度可以使用药学上可接受的增稠剂维持在所选择水平处。例如,甲基纤维素易于获得且经济适用并且容易起作用。其它合适的增稠剂包含例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆(carbomer)等。增稠剂的浓度可以取决于所选择药剂。重要的点是使用将会实现所选择粘度的量。明显地,合适的载剂和其它添加剂的选择将取决于具体施用途和具体剂型(例如,液体剂型)的性质(例如,组合物是否被调配成溶液、悬浮液、凝胶或另一种液体形式,如时间释放形式或液体填充形式)。

[0328] 包括当前公开的细胞的组合物可以全身性或直接提供给受试者,用于治疗或改善疾病或病症。在某些实施例中,将当前公开的细胞或包括其的组合物直接注射到所关注的器官(例如,受瘤形成影响的器官)中。可替代地,当前公开的细胞和包括其的组合物间接地提供给所关注器官,例如,通过施用到循环系统(例如,肿瘤脉管系统)中。可以在施用细胞

或组合物之前、期间或之后提供扩增剂和分化剂以增加细胞(例如,T细胞或NK细胞)的体外或体内产生。

[0329] 当前公开的细胞可以以任何生理学上可接受的媒剂(通常血管内)施用,尽管其也可以被引入骨骼或细胞可以找到用于进行再生和分化的适当部位的其它方便部位(例如,胸腺)中。

[0330] 要施用细胞的数量可以针对所治疗的受试者而变化。在某些实施例中,向受试者施用约 10^4 至约 10^{10} 、约 10^4 至约 10^7 、约 10^5 至约 10^7 、约 10^5 至约 10^9 或约 10^6 至约 10^8 个当前公开的细胞。更有效的细胞可以以甚至更小的数量施用。通常,将施用至少约 1×10^5 个细胞,最终达到约 1×10^{10} 或更多。在某些实施例中,向受试者施用至少约 1×10^5 个、 5×10^5 个、 1×10^6 个、约 5×10^6 、约 1×10^7 、约 5×10^7 、约 1×10^8 个或约 5×10^8 个当前公开的细胞。在某些实施例中,向受试者施用约 1×10^6 个当前公开的细胞。对将被视为有效剂量的剂量的精确测定可以基于每个受试者的个体因素,包含其大小、年龄、性别、体重和特定受试者的病状。本领域技术人员从本公开和本领域知识中可以容易地测定剂量。

[0331] 当前公开的细胞可以包括经纯化的细胞群体。本领域技术人员可以使用各种熟知的方法(如荧光活化细胞分选(FACS))容易地测定群体中的当前公开的细胞的百分比。在包括当前公开的免疫应答细胞的群体中,合适的纯度范围为约50%至约55%,约5%至约60%和约65%至约70%。在某些实施例中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%或约80%至约85%。在某些实施例中,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%和约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调整(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。细胞可以通过注射、导管等引入。

[0332] 本领域技术人员可以容易地测定组合物中细胞和任选的添加剂、媒剂和/或载剂的量,并且在方法中施用。通常,任何添加剂(除活性细胞和/或药剂外)以约0.001%至约50%(重量)的量存在于磷酸盐缓冲盐水溶液中,并且活性成分是以微克至毫克的量级存在,如约0.0001至约5wt%、约0.0001至约1wt%、约0.0001至约0.05wt%、或约0.001至约20wt%、约0.01至约10wt%或约0.05至约5wt%。对于要施用于动物或人的任何组合物,可以确定以下各项:毒性,如通过确定合适的动物模型(例如,啮齿动物,如小鼠)中的致死剂量(LD)和LD50;组合物的剂量、其中组分的浓度和施用引发合适的应答的组合物的时序。此类测定不需要根据本领域技术人员的知识、本公开和本文所引用的文献进行过度实验。并且,可以在不用进行过度实验的情况下确定依序施用的时间。

[0333] 在某些实施例中,所述组合物是包括当前公开的细胞和药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0334] 组合物的施用可以是自体的或异源的。例如,细胞可从一个受试者获得,并且施用于相同受试者或不同的相容受试者。可以施用外周血源性细胞或其子代(例如,体内、离体或体外源性)。当施用当前公开的组合物(例如,包括当前公开的细胞的药物组合物)时,所述组合物可以被调配成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0335] 当前公开的细胞和组合物可以通过本领域已知的任何方法施用,包含但不限于口服施用、静脉内施用、皮下施用、结内施用、瘤内施用、鞘内施用、玻璃体内施用、胸膜内施用、骨内施用、腹膜内施用、胸膜施用和向受试者的直接施用。

[0336] 5.8. 治疗方法

[0337] 当前公开的细胞和包括其的组合物可以用于治疗或改善受试者的疾病或病症。在某些实施例中,所述疾病或病症与uPAR相关。在某些实施例中,所述疾病或病症与uPAR的过表达相关。在某些实施例中,所述疾病或病症选自以下组成的组:肿瘤、衰老相关病理和与衰老相关的组织衰退。衰老相关病理的非限制性实例包含肺纤维化、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病、糖尿病、骨关节炎、肝纤维化、慢性肾病、心脏纤维化和帕金森氏病。

[0338] 在某些实施例中,所述方法包括向有需要的受试者施用当前公开的细胞或包括其的组合物。在某些实施例中,所述细胞是T细胞。所述T细胞可以是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞。在某些实施例中,所述T细胞是CD4⁺ T细胞。

[0339] 为了治疗,所施用的量是有效产生期望效应的量。可以以一次施用或一系列施用提供有效量。可以以团注或通过连续灌注来提供有效量。

[0340] 在某些实施例中,所述疾病或病症是肿瘤。在某些实施例中,当前公开的细胞和组合物可以减少肿瘤负荷、减少肿瘤细胞的数量、减小肿瘤大小、和/或根除受试者体内的肿瘤和/或增加或延长受试者的存活期。

[0341] 肿瘤的非限制性实例包含乳腺癌(包含三阴性乳腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胃癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、胰腺癌、血癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌(例如,胆管癌、肝细胞癌和纤维瘤肝细胞癌)、尿路上皮癌、黑色素瘤和脑癌(包含多形性胶质母细胞瘤)。在某些实施例中,所述血癌选自以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合征和红白血病。在某些实施例中,所述肿瘤是癌症。在某些实施例中,所述癌症是复发性或难治性癌症。在某些实施例中,所述癌症对癌症疗法,例如化疗有抗性。

[0342] 此外,当前公开的主题提供了增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的方法。在某些实施例中,所述方法包括向所述受试者施用当前公开的细胞和组合物。免疫激活细胞因子的非限制性实例包含粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)、CCL1、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL16、CXCL1、CXCL3、CXCL5、CXCL9、CXCL10和其组合。

[0343] 在某些实施例中,所述疾病或病症是衰老相关病理。在某些实施例中,与在健康对照受试者中观察到的相比,受试者表现出衰老细胞积累增加。在某些实施例中,所述衰老相关病理选自以下组成的组:肺纤维化、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病、糖尿病、肝纤维化、慢性肾病、骨关节炎、心脏纤维化和帕金森氏病。在某些实施例中,衰老细胞表现出衰老相关分泌表型(SASP)。衰老相关分泌表型可以由复制、癌基因(例如,HRASG12D、NRASG12D、NRASG12D等)、放射、化疗或药物(例如,Cdk4/6抑制剂、MEK抑制剂、化疗药物等)诱导。MEK抑制剂的非限制性实例包含曲美替尼、考比替尼、贝美替尼、司美替尼、PD-325901、TAK-733、CI-1040(PD 184352)、PD0325901、MEK162、AZD8330、GDC-0623、瑞法替尼、哌吗色替、R04987655、R05126766、WX-554、HL-085、CInQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、R05068760、U0126和SL327。CDK4/6抑制剂的非限制实例包含帕博西尼(palbociclib)、瑞博西尼(ribociclib)和阿贝西尼(abemaciclib)。化疗药物的非限制性实例包含顺铂、多柔比星、环磷酰胺和依托泊苷。

[0344] 在某些实施例中,当前公开的用于治疗或改善疾病或病症的方法进一步包括向受试者施用肿瘤特异性单克隆抗体,其中所述受试者正在接受/已经接受衰老诱导疗法(例如,化疗)。在某些实施例中,在施用细胞或包括其的组合物之后施用肿瘤特异性单克隆抗体。特定衰老诱导疗法的非限制性实例包含多柔比星、电离辐射疗法、使用MEK抑制剂和CDK4/6抑制剂的组合疗法、使用CDC7抑制剂和mTOR抑制剂的组合疗法等。CDK4/6抑制剂的实例包含帕博西尼、瑞博西尼和阿贝西尼。MEK抑制剂的非限制性实例包含曲美替尼、考比替尼、贝美替尼、司美替尼、PD-325901、TAK-733、CI-1040(PD184352)、PD0325901、MEK162、AZD8330、GDC-0623、瑞法替尼、哌吗色替、R04987655、R05126766、WX-554、HL-085、CInQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、R05068760、U0126和SL327。mTOR抑制剂的非限制性实例包含雷帕霉素(rapamycin)、舍曲林(sertraline)、西罗莫司(sirolimus)、依维莫司(everolimus)、替西罗莫司(temsirolimus)、地磷莫司(ridaforolimus)和德福莫司(deforolimus)。CDC7抑制剂的实例包含TAK-931、PHA-767491、XL413、1H-吡咯并[2,3-b]吡啶、2,3-二氢噻吩并[3,2-d]嘧啶-4(1H)-酮、呋喃酮衍生物、三取代的噻唑、吡咯并吡啶酮等。

[0345] 在某些实施例中,在施用细胞或包括其的组合物之后施用肿瘤特异性单克隆抗体。

[0346] 在某些实施例中,受试者是人。

[0347] 在某些实施例中,当前公开的用于治疗或改善疾病或病症的方法进一步包括向受试者施用癌症疗法。在某些实施例中,所述癌症疗法选自由以下组成的组:化学疗法、放射疗法、免疫疗法、单克隆抗体、抗癌核酸或蛋白、抗癌病毒或微生物以及其任何组合。

[0348] 在某些实施例中,当前公开的用于治疗或改善疾病或病症的方法进一步包括向受试者施用细胞因子。在某些实施例中,在施用细胞或包括其的组合物之前、期间或之后施用细胞因子。在某些实施例中,所述细胞因子选自由以下组成的组:干扰素 α 、干扰素(3、干扰素 γ 、补体C5a、IL-2、TNF- α 、CD40L、IL12、IL-23、IL15、IL17、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14-1、CCL14-2、CCL14-3、CCL15-1、CCL15-2、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23-1、CCL23-2、CCL24、CCL25-1、CCL25-2、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL3L1、CCL4、CCL4L1、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCR10、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCRL1、CCRL2、CX3CL1、CX3CR、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL9、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7和XCL2。

[0349] 在某些实施例中,化疗进一步包括所述向受试者施用化学治疗剂。化学治疗剂的非限制性实例包含氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环类药物、紫杉烷、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代脲、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮抑素、紫杉醇、喜树碱、SN-38、多柔比星、多柔比星类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR抑制剂、热休克蛋白(HSP90)抑制剂、蛋白体抑制剂、HDAC抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤和CPT-11。

[0350] 在某些实施例中,所述疾病或病症是肺纤维化,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:吡非尼酮

(pirfenidone)、尼达尼布(nintedanib)、氧气疗法、皮质类固醇(例如,泼尼松)、吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)/霉酚酸(mycophenolic acid)和硫唑嘌呤(azathioprine)。

[0351] 在某些实施例中,所述疾病或病症是动脉粥样硬化,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:他汀类药物(例如,阿托伐他汀(Atorvastatin)、氟伐他汀(Fluvastatin)、洛伐他汀(Lovastatin)、匹伐他汀(Pitavastatin)、普伐他汀(Pravastatin)、罗苏伐他汀钙(Rosuvastatin calcium)、辛伐他汀(Simvastatin))、贝特类药物(例如,吉非贝齐(Gemfibrozil)、非诺贝特(Fenofibrate))、烟酸、依泽替米贝(ezetimibe)、胆汁酸螯合剂(例如,考来烯胺(cholestyramine)、考来替泊(colestipol)、考来维仑(colesevelam))、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9型(PCSK9)抑制剂、抗血小板药物(例如,阿司匹林(aspirin)、氯吡格雷(Clopidogrel)、替卡格雷(Ticagrelor)、华法林(warfarin)、普拉格雷(prasugral))、 β 阻断剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、钙通道阻断剂和利尿剂。

[0352] 在某些实施例中,所述疾病或病症是阿尔茨海默氏病,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:多奈哌齐(donepezil)、加兰他敏(galantamine)、美金刚(memantine)、利斯的明(rivastigmine)、美金刚缓释和多奈哌齐(Namzaric)、阿杜卡奴单抗(aducanumab)、索拉珠单抗(solanezumab)、胰岛素、维罗司他(verubecestat)、AADvac1、CSP-1103和因替啉(intepirdine)。

[0353] 在某些实施例中,所述疾病或病症是糖尿病,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:胰岛素、二甲双胍、胰淀素类似物、胰高血糖素、磺脲类药物(例如,格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)、格列本脲(格列本脲)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、甲苯磺丁脲(tolbutamide))、美格列奈(meglitinide)(例如,那格列奈(nateglinide)、瑞格列奈(repaglinide))、噻唑烷二酮(thiazolidinedione)(例如,吡格列酮(pioglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone))、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如,阿卡波糖(acarbose)、米格列醇(miglitol))、二肽基肽酶(DPP-4)抑制剂(例如,阿格列汀(alogliptin)、林格列汀(linagliptin)、西格列汀(sitagliptin)、沙格列汀(saxagliptin))、钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂(例如,卡格列净(canagliflozin)、达格列净(dapagliflozin)、恩格列净(empagliflozin)、埃格列净(ertugliflozin))和肠促胰岛素模拟物(例如,艾塞那肽(exenatide)、利拉鲁肽(liraglutide)、度拉糖肽(dulaglutide)、利西拉肽(lixisenatide)、塞马格鲁肽(semaglutide))。

[0354] 在某些实施例中,所述疾病或病症是骨关节炎,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:镇痛药(例如,对乙酰氨基酚(acetaminophen)、曲马多(tramadol)、羟考酮(oxycodone)、氢可酮(hydrocodone))、非甾体抗炎药(例如,阿司匹林、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、塞来昔布(celecoxib))、环加氧酶-2抑制剂、皮质类固醇和透明质酸。

[0355] 在某些实施例中,所述疾病或病症是肝纤维化,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自由以下组成的组的疗法:ACE抑制剂(例如,贝那

普利(benazepril)、赖诺普利(Lisinopril)、雷米普利(Ramipril))、 α -生育酚、干扰素- α 、PPAR拮抗剂、秋水仙碱、皮质类固醇、内皮素抑制剂、白介素-10、己酮可可碱(pentoxifylline)、磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)、S-腺苷-甲硫氨酸和TGF-131抑制剂。

[0356] 在某些实施例中,所述疾病或病症是慢性肾病,并且所述方法进一步包括依次、单独或同时向所述受试者施用至少一种选自以下组成的组的疗法:ACE抑制剂(例如,贝那普利、赖诺普利、雷米普利)、他汀类药物(例如,阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀钙、辛伐他汀)、呋塞米(furosemide)、促红细胞生成素、磷酸盐结合剂(例如,乙酸钙、碳酸钙)、胆骨化醇、麦角钙化醇和环磷酰胺。

[0357] 进一步修饰可以引入到表达uPAR特异性CAR的工程化免疫细胞(例如,T细胞),以避免或最小化免疫并发症(被称为“恶性T细胞转化”),例如移植物抗宿主病(GvHD)的风险。工程化免疫细胞的修饰可以包含将自杀基因工程化到表达uPAR特异性CAR的T细胞中。合适的自杀基因包含但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型胱天蛋白酶9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施例中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可以通过施用抗EGFR单克隆抗体(例如,西妥昔单抗(cetuximab))来实现T细胞清除。EGFRt可以与uPAR特异性CAR的胞内结构域的C末端共价接合。自杀基因可以包含在包括编码当前公开的uPAR特异性CAR的核酸的载体中。将自杀基因整合到当前公开的uPAR特异性CAR中增加了安全性水平,其中能够在非常短的时间段内消除大多数CAR T细胞。当前公开的整合有自杀基因的工程化免疫细胞(例如,T细胞)可在CAR T细胞输注后的给定时间点被预先消除,或在最早的毒性迹象时被根除。

[0358] 5.9. 试剂盒

[0359] 当前公开的主题提供了用于改善受试者的疾病或病症的试剂盒。在某些实施例中,所述试剂盒包括当前公开的细胞或包括其的组合物。在某些实施例中,所述试剂盒包括无菌容器;此类容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。此类容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于容纳药物的其它材料制成。在某些非限制性实施例中,所述试剂盒包含编码当前公开的uPAR靶向抗原识别受体(例如,CAR)的核酸分子。

[0360] 如果期望的话,将细胞和/或核酸分子与用于将细胞或核酸分子施用于患有或有风险患上疾病或病症的受试者的说明书一起提供。说明书通常包含关于使用组合物治疗和/或预防肿瘤或赘生物的信息。在某些实施例中,说明书包含以下中的至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防肿瘤或赘生物的剂量表和施用;注意事项;警告;适应症;禁忌症;过量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考文献。这些说明书可以直接打印在容器上(如果存在的话),或者作为施加到容器上的标签或者作为与容器一起提供或提供在容器中的单独的纸页、小册子、卡片或文件夹打印。

[0361] 5.10. 示例性实施例

[0362] A1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种抗原识别受体,所述抗原识别受体包括胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中所述胞外抗原结合结构域与uPAR特异性结合。

[0363] A2. 根据A1所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是单链可变

片段(scFv)。

[0364] A3.根据A2所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是人scFv。

[0365] A4.根据A1所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是Fab,所述Fab任选地被交联。

[0366] A5.根据A1所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。

[0367] A6.根据A2至A5中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述scFv、Fab和F(ab)₂中的一个或多个包括在具有异源序列的融合蛋白中以形成所述胞外抗原结合结构域。

[0368] A7.根据A1至A6中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括:(a)包括SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(b)包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(c)包括SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(d)包括SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(e)包括SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者(f)包括SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0369] A8.根据A1至A7中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括:(a)包括SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(b)包括SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:12或其保守修饰的CDR3;(c)包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(d)包括SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:23或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;(e)包括SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3;或者(f)包括SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR1、包括SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR2和包括SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列或其保守修饰的CDR3。

[0370] A9.根据A1至A8中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a)重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:3中所示

的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列的CDR3; (b) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3; (c) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的CDR3; (d) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列的CDR3; (e) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列的CDR3;或者(f) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列的CDR3,所述轻链可变区包括包含SEQ ID NO:52中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:54中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0371] A10.根据A9所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的CDR3;以及包含SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列的CDR3。

[0372] A11.根据A1至A10中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

[0373] A12.根据A1至A11中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列。

[0374] A13.根据A1至A12中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约

81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

[0375] A14.根据A1至A13中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

[0376] A15.根据A1至A14中任一项所述的抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a)重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的所选氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列至少约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源或相同的氨基酸序列。

[0377] A16.根据A1至A15中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a)重链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

[0378] A17.根据A16所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括:(a)包括SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的轻链可变区;(b)包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列的轻链可变区;(c)包括SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列的轻链可变区;(d)包括SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列的轻链可变区;(e)包括SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列的轻链可变区;或者(f)包括SEQ ID NO:55中所示的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0379] A18.根据A17所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0380] A19.根据A1至A18中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括所述胞外抗原结合结构域的重链可变区与轻链可变区之间的接头。

[0381] A20.根据A19所述的前述抗原识别受体,其中所述接头由SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67中所示的氨基酸序列组成。

[0382] A21.根据A1至A20中任一项所述的前述抗原识别受体,其中所述胞外抗原结合结构域包括与所述胞外抗原结合结构域的5'末端共价接合的信号肽。

[0383] A22.根据A1至A21中任一项所述的抗原识别受体,其中所述跨膜结构域包括CD8多

肽、CD28多肽、CD3 ζ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽或其组合。

[0384] A23. 根据A1至A22中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽。

[0385] A24. 根据A1至A23中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述胞内信号传导结构域进一步包括至少一个共刺激信号传导区。

[0386] A25. 根据A24所述的前述抗原识别受体, 其中所述至少一个共刺激信号传导区包括CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽或其组合。

[0387] A26. 根据A1至A25中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是嵌合抗原受体 (CAR)、T细胞受体 (TCR) 或T细胞样融合蛋白。

[0388] A27. 根据A1至A26中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是CAR。

[0389] A28. 根据A1至A27中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体是重组表达的。

[0390] A29. 根据A1至A28中任一项所述的前述抗原识别受体, 其中所述抗原识别受体由载体表达。

[0391] A30. 根据A29所述的前述抗原识别受体, 其中所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

[0392] B1. 在某些非限制性实施例中, 当前公开的主题提供了一种细胞, 所述细胞包括根据A1至A30中任一项所述的抗原识别受体。

[0393] B2. 根据B1所述的前述细胞, 其中所述细胞用所述抗原识别受体转导。

[0394] B3. 根据B1或B2所述的前述细胞, 其中所述抗原识别受体在所述细胞的表面上组成性地表达。

[0395] B4. 根据B1至B3中任一项所述的前述细胞, 其中所述细胞是免疫应答细胞。

[0396] B5. 根据B1至B4中任一项所述的前述细胞, 其中所述细胞是淋巴系的细胞或髓系的细胞。

[0397] B6. 根据B1至B5中任一项所述的前述细胞, 其中所述细胞选自以下组成的组: T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞和干细胞, 可以从所述干细胞分化淋巴样细胞。

[0398] B7. 根据B1至B6中任一项所述的前述细胞, 其中所述细胞是T细胞。

[0399] B8. 根据B6或B7所述的前述细胞, 其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 或调节性T细胞。

[0400] B9. 根据B6所述的前述细胞, 其中所述干细胞是多能干细胞。

[0401] B10. 根据B9所述的前述细胞, 其中所述多能干细胞是胚胎干细胞或诱导多能干细胞。

[0402] C1. 在某些非限制性实施例中, 当前公开的主题提供了一种核酸, 所述核酸编码A1至A30中任一项所述的抗原识别受体。

[0403] D1. 在某些非限制性实施例中, 当前公开的主题提供了一种载体, 所述载体包括根据C1所述的核酸。

[0404] D2. 根据D1所述的前述载体, 其中所述载体是 γ 逆转录病毒载体。

[0405] E1. 在某些非限制性实施例中, 当前公开的主题提供了一种宿主细胞, 所述宿主细

胞表达根据C1所述的核酸或根据D1或D2所述的载体。

[0406] E2. 根据E1所述的前述宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞。

[0407] F1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种组合物,所述组合物包括根据B1至B10中任一项所述的细胞。

[0408] F2. 根据F1所述的前述组合物,其是进一步包括药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0409] G1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种治疗或改善受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用当前公开的根据B1至B10中任一项所述的细胞或根据权利要求F1或F2所述的组合物。

[0410] G2. 根据G1所述的前述方法,其中所述疾病或病症选自由以下组成的组:肿瘤、衰老相关病理和与衰老相关的组织衰退。

[0411] G3. 根据G2所述的前述方法,其中所述疾病或病症是衰老相关病理。

[0412] G4. 根据G3所述的前述方法,其中所述衰老相关病理选自由以下组成的组:肺纤维化、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病、糖尿病、骨关节炎、肝纤维化、慢性肾病、心脏纤维化和帕金森氏病。

[0413] G5. 根据G1所述的前述方法,其中所述疾病或病症是肿瘤。

[0414] G6. 根据G5所述的前述方法,其中所述肿瘤选自由以下组成的组:乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、胰腺癌、血癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、尿路上皮癌、黑色素瘤和脑癌。

[0415] G7. 根据G6所述的前述方法,其中所述血癌选自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓细胞性白血病(AML)、骨髓纤维化、真性红细胞增多症、骨髓增生异常综合征和红白血病。

[0416] G8. 根据权利要求G5至G7中任一项所述的前述方法,其中所述肿瘤是癌症。

[0417] H1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据B1至B10中任一项所述的细胞或根据F1或F2所述的组合物。

[0418] H2. 根据H1所述的前述方法,其中所述免疫激活细胞因子选自由以下组成的组:粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-8、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素调节因子7(IRF7)、CCL1、CCL2、CCL3、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL16、CXCL1、CXCL3、CXCL5、CXCL9、CXCL10和其组合。

[0419] H3. 根据G1至H2中任一项所述的前述方法,其中所述受试者是人。

[0420] I1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种用于治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的试剂盒,所述试剂盒包括B1至B10中任一项所述的细胞、根据权利要求C1所述的核酸或根据权利要求F1或F2所述的组合物。

[0421] I2. 根据I1所述的前述试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于使用所述细胞或所述组合物来治疗或改善受试者的疾病或病症和/或增加受试者体内响应于肿瘤细胞的免疫激活细胞因子的产生的书面说明。

[0422] J1. 在某些非限制性实施例中,当前公开的主题提供了一种用于产生靶向uPAR的

根据A1至A30中任一项所述的抗原识别受体的方法,所述方法包括将编码所述抗原识别受体的核酸引入到细胞中。

[0423] 6. 实例

[0424] 提出以下实例,以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用当前公开的主题的细胞和包括其的组合物以及方法的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人认为的当前公开的主题的范围。应当理解,鉴于上文提供的一般描述,可以实践各个其它实施例。

[0425] 实例1——抗uPAR scFv的产生

[0426] 来自R&D(https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-upar-protein_807-uk)的重组uPAR用于产生本文公开的scFv。此重组uPAR是具有C末端6-his标签的人uPAR蛋白(Leu23-Arg303)。产生了六个克隆8B1、11E10、17C9、19D7、6C8和14C5。

[0427] 实例2——CAR T细胞的体外研究

[0428] 测量表达H.19-H.28z的人RD114细胞中LNGFR和四种当前公开的靶向uPAR的CAR的表达水平,以及这四种CAR。这四种CAR是包括11E10 scFv、包含CD28多肽的跨膜结构域、包含CD3 ζ 多肽的胞内结构域和包含CD28多肽的共刺激信号传导区的CAR(命名为“11E10 CAR”);包括17C9 scFv、包含CD28多肽的跨膜结构域、包含CD3 ζ 多肽的胞内结构域和包含CD28多肽的共刺激信号传导区的CAR(命名为“17C9CAR”);包括8B1 scFv、包含CD28多肽的跨膜结构域、包含CD3 ζ 多肽的胞内结构域和包含CD28多肽的共刺激信号传导区的CAR(命名为“8B1 CAR”);或包括19D7 scFv、包含CD28多肽的跨膜结构域、包含CD3 ζ 多肽的胞内结构域和包含CD28多肽的共刺激信号传导区的CAR(命名为“19D7 CAR”)。将表达水平与未经转导的RD114细胞进行比较。H.19-H.28z用作阳性对照。采用流式细胞术来测量表达水平。进行了两个独立的实验。图1中示出了结果。如图1所示,所有四种测试的靶向uPAR的CAR在人RD114细胞上表达。

[0429] 此外,测量表达H.19-H.28z、11E10 CAR、17C9 CAR、8B1 CAR或19D7 CAR的人T细胞中LNGFR的表达水平,并且与未经转导的人T细胞进行比较。进行了两个独立的实验。图2中示出了结果。如图2所示,所有四种测试的靶向uPAR的CAR在人T细胞上表达。

[0430] 接下来,测量11E10 CAR、17C9 CAR、8B1 CAR和19D7 CAR的细胞毒性活性。用H.19-H.28z、11E10 CAR、17C9 CAR、8B1 CAR或19D7 CAR转导NALM6-人uPAR和NALM6野生型细胞。采用18小时生物发光测定来检测和测量作为靶细胞的表达FFL的NALM6野生型或过表达人uPAR的NALM6细胞中的萤火虫荧光素酶(FFL)信号。在技术上一式三份地进行两个独立的实验。结果在图3A(针对NALM6-人uPAR细胞)和图3B(针对NALM6野生型细胞)中示出。如图3A和3B所示,与NALM6野生型相比,11E10 CAR、17C9 CAR和19D7 CAR显示出NALM6过表达人uPAR的细胞毒性增加。

[0431] 当前公开的主题的实施例

[0432] 根据前面的描述,显而易见的是,可以对当前公开的主题进行变化和修改,以使其适用于各种用途和条件。此类实施例也在以下权利要求的范围内。

[0433] 在本文中的变量的任何定义中对要素的列表的详述包含作为任何单个要素或所列要素的组合(或子组合)的变量的定义。针对本文的实施例的详述包含作为任何单个实施例或与任何其它实施例或其部分的组合的实施例。

[0434] 本说明书中所提及的所有专利和公开通过引用并入本文中,其程度如同每个独立

的专利或公开被专门地且单独地指示通过引用并入。

序列表

- <110> 纪念斯隆凯特琳癌症中心 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER)
斯隆凯特琳癌症研究所 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH)
癌症和同类疾病纪念医院 (MEMORIAL HOSPITAL FOR CANCER AND ALLIED DISEASES)
- <120> 靶向uPAR的抗原识别受体和其用途
- <130> 072734.1361
- <150> US 63/209,940
- <151> 2021-06-11
- <160> 87
- <170> PatentIn第3.5版
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 1
- Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 2
- Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
- 1 5 10 15
- Gly
- <210> 3
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的
- <400> 3

Tyr Glu Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile Thr

1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Ala Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Gly Gly Tyr Tyr Asp Phe Asp Phe Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

Asp Asp Gly Phe Tyr Ala Trp Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr Trp Ile Glu

1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1	5	10	15
Gly			
<210>	21		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	21		
Gly Asn Gly Leu Arg Arg Tyr Ala Met Asp Tyr			
1	5	10	
<210>	22		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	22		
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Thr			
1	5	10	
<210>	23		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	23		
Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr			
1	5		
<210>	24		
<211>	9		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	24		
Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Phe Thr			
1	5		
<210>	25		

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Gly Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ala

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp

	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 27			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 27			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Val Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Ala Lys Phe			
	50	55	60
Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Asp Phe Asp Phe Phe Ala Met Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 28			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 28			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asp Gly Phe Tyr Ala Trp Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser			
20	25	30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
85	90	95	
Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Leu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr			
20	25	30	
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Asn Gly Leu Arg Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

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

<210> 33

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

cagatccagt	tgggtgcagtc	tggacctgag	ctgaagaagc	ctggagagac	agtcaagatc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	taccttcaca	aactatggaa	tgaactgggt	gaagcaggct	120
ccaggaaagg	gtttaaagtg	gatgggctgg	ataaacacca	acactggaga	gccaacatat	180
gctgaagagt	tcaagggacg	gtttgccttc	tctttggaaa	cctctgccag	cactgcctat	240
ttgcagatca	acaacctcaa	aaatgaggac	acggctacat	atttctgtgg	ggattacgag	300
tttgcttact	ggggccaagg	gactctgggc	actgtctctg	ca		342

<210> 34

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

gacatccaga	tgactcagtc	tccagcctcc	ctatctgtat	ctgtgggaga	aactgtcacc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag	120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct	240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321
<210> 35	
<211> 366	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 35	
caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
tcttgcaaga cttctggata cacattcact gactatgtta taacctgggt gaagcagaga	120
actggacagg gccttgaatg gattggagag atttatectc gaagtggtaa tacttactac	180
aatgcgaagt tcaggggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc tagagggggc	300
tactatgatt tcgacttctt tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	360
tcctca	366
<210> 36	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 36	
gatattgtga tgactcaggc tgcacctct gtacctgtca ctcttgaga gtcagtatcc	60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg	120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatata atcgatgtc caaccttgcc	180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc	240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg	300
tacacgttcg gaggggggac caagttggaa ataaaa	336
<210> 37	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 37	

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc tgtcttgggt tcgccagtct	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagaa attagtagtg gtggtactta cacctactat	180
ccagacactg tgacggggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagggatgat	300
ggtttctacg cctggtttgg ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca	357
<210> 38	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 38	
gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgtta ccattggaca accagcctcc	60
atctcttgca cgtcaagtca gagcctctta gatagtgat gaaagacata tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttcct	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336
<210> 39	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 39	
caggttcagc tgcagctgtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt acctactgga tagagtgggt aaaacagagg	120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtag tactaactac	180
aatgagaaaat tcaaaggcaa ggccacattc actgctgata catcctccaa cacagcctac	240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagagggaac	300
ggattacgac ggtatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca	360
<210> 40	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 40	

```

agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtct cagcaggaga cagggttacc      60
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtaa cttggtacca acagaagcca      120
gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccctgat      180
cgcttcaactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct      240
gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccattcac gttcggctcg      300
gggacaaagt tggaataaaa a                                              321

```

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Thr Thr Asn Ser Asn Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

Asp Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asp Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Thr Thr Asn Ser Asn Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Ser Ser	Leu Lys Ser Glu Asp Thr	Ala Met Tyr Phe Cys	
	85	90	95
Thr Arg Asp Arg Asp	Tyr Tyr Gly Gly	Ser Met Asp Tyr	Trp Gly Gln
	100	105	110
Gly Thr Ser Val Thr	Val Ser Ser		
	115	120	

<210> 48

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 48

Asp Ile Val Met Ser	Gln Ser Pro Ser	Ser Leu Ala Val	Ser Val Gly
1	5	10	15
Glu Arg Val Ser Met	Ser Cys Lys Ser	Ser Gln Ser Leu	Leu Tyr Ser
	20	25	30
Ser Asp Gln Lys Asn	Tyr Leu Ala Trp	Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Gln
	35	40	45
Ser Pro Glu Leu Leu	Ile Tyr Trp Ala	Ser Thr Arg Glu	Ser Gly Val
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr	Gly Ser Gly Ser	Gly Thr Asp Phe	Thr Leu Thr
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Lys	Ala Glu Asp Leu	Ala Ile Tyr Tyr	Cys Gln Gln
	85	90	95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro	Phe Thr Phe Gly	Ser Gly Thr Lys	Leu Glu Ile
	100	105	110

Lys

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 49

Gly Phe Ser Leu Thr	Ser Tyr Gly Val	His
1	5	10

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

Val Leu Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

Gly Gly Leu Arg Gln Val Phe Ala Tyr

1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Leu Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Leu Arg Gln Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105 110

<210> 57

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaaatc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcact aactatggca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaaca actaatagta atggtggtgc cacctattat	180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctacaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt atttctgtac aagagatcga	300
gattactacg ggggggtctat ggactactgg ggtcaggga cctcagtcac cgtctcctca	360

<210> 58

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cggttggaga gagggtttct	60
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagcg atcaaaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct gaactgctga ttactgggc ttccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca atttattact gtcagcaata ttatagttat	300
ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa	339

<210> 59

<211> 247

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 59

```

ctgggttcgc cagcctccag gaaagggctct ggagtggctg ggagttttat gggctggtgg      60
aagcacagat tataattcgg ctctcatgtc cagactgagc atcagcaaag acaactccaa      120
gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat gacacagcca tgtactactg      180
tgccagaggg ggattacgac aggtgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt      240
ctctgca                                           247

```

<210> 60

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 60

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta tatagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg      300
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa atgaaa                                           336

```

<210> 61

<211> 335

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 61

```

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

```

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

<210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 62

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
1	5	10
		15

Gly Gly Ser

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 63

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

1 5 10 15

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 64

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

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 65

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20

25

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 66

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp

85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

	165		170		175
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr					
	180		185		190
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His					
	195		200		205
Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser					
	210		215		220
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val					
225		230		235	
<210>	69				
<211>	247				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	69				
Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met					
1	5		10		15
Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Lys Pro Gln Ala Pro					
	20		25		30
Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys					
	35		40		45
Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser					
	50		55		60
Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val					
65		70		75	80
Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu					
	85		90		95
Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr					
	100		105		110
Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe					
	115		120		125
Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro					
	130		135		140
Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr					
145		150		155	160
Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu					
	165		170		175
Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala					

	180					185					190						
Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Pro		
	195					200					205						
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Ile	Thr	Leu	Ile	Cys	Tyr	His	Arg	Ser	Arg	Lys		
	210					215					220						
Arg	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Pro	Leu	Val	Arg	Gln	Glu	Gly	Lys	Pro		
225						230					235					240	
Arg	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	Val											
	245																
<210>	70																
<211>	220																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的																
<400>	70																
Met	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Pro	Ser	Ile	Gln	Val		
1				5					10						15		
Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Met	Leu	Val	Ala	Tyr		
	20					25					30						
Asp	Asn	Ala	Val	Asn	Leu	Ser	Cys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Leu	Phe	Ser		
	35					40					45						
Arg	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	His	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Glu		
	50					55					60						
Val	Cys	Val	Val	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser		
65					70				75				80				
Lys	Thr	Gly	Phe	Asn	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser	Val	Thr		
	85					90					95						
Phe	Tyr	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	Val	Asn	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	Cys		
	100					105					110						
Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser		
	115					120					125						
Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro		
	130					135					140						
Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly		
145					150				155				160				
Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile		
	165					170					175						
Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met		

	180		185		190
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro					
195		200		205	
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser					
210		215		220	
<210> 71					
<211> 218					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成的					
<400> 71					
Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Ser Val Gln					
1	5		10		15
Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val					
20		25		30	
Asp Ser Asn Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu					
35		40		45	
Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val					
50		55		60	
Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg					
65		70		75	80
Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val					
85		90		95	
Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe					
100		105		110	
Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg					
115		120		125	
Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr					
130		135		140	
Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val					
145		150		155	160
Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp					
165		170		175	
Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met					
180		185		190	
Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala					
195		200		205	
Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro					

210	215
<210> 72	
<211> 164	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 72	
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	
1 5 10 15	
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys	
20 25 30	
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala	
35 40 45	
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr	
50 55 60	
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg	
65 70 75 80	
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met	
85 90 95	
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn	
100 105 110	
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met	
115 120 125	
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly	
130 135 140	
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala	
145 150 155 160	
Leu Pro Pro Arg	
<210> 73	
<211> 255	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 73	
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu	
1 5 10 15	
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro	

20	25	30
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys		
35	40	45
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile		
50	55	60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser		
65	70	75
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly		
85	90	95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu		
100	105	110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln		
115	120	125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys		
130	135	140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro		
145	150	155
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala		
165	170	175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu		
180	185	190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu		
195	200	205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe		
210	215	220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly		
225	230	235
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
245	250	255
<210> 74		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 74		
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
1	5	10
Asp Val Leu Asp Lys Arg		

20

<210> 75

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 75

cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 60

aagaga 66

<210> 76

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 76

Gln Asn Gln Leu Phe Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Phe

1 5 10 15

Asp Val Leu Asp Lys Arg

20

<210> 77

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 77

cagaaccagc tctttaacga gctcaatcta ggacgaagag aggagttcga tgttttggac 60

aagaga 66

<210> 78

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 78

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

20

<210> 79

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 79

caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt 60

gggatgaaa 69

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 80

Gln Glu Gly Leu Phe Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala

1

5

10

15

Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys

20

<210> 81

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 81

caggaaggcc tgttcaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggcctt cagtgagatt 60

gggatgaaa 69

<210> 82

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 82

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

1	5	10	15
Asp Ala Leu His Met Gln			
20			
<210> 83			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 83			
cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac			60
atgcag			66
<210> 84			
<211> 22			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 84			
His Asp Gly Leu Phe Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Phe			
1	5	10	15
Asp Ala Leu His Met Gln			
20			
<210> 85			
<211> 66			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 85			
cacgatggcc ttttccaggg gctcagtaca gccaccaagg acaccttcga cgcccttcac			60
atgcag			66
<210> 86			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 86			

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
1				5				10					15		
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
		50				55					60				
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Phe	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65				70				75						80	
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Phe	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85				90						95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Phe	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
			100					105					110		

<210> 87

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

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

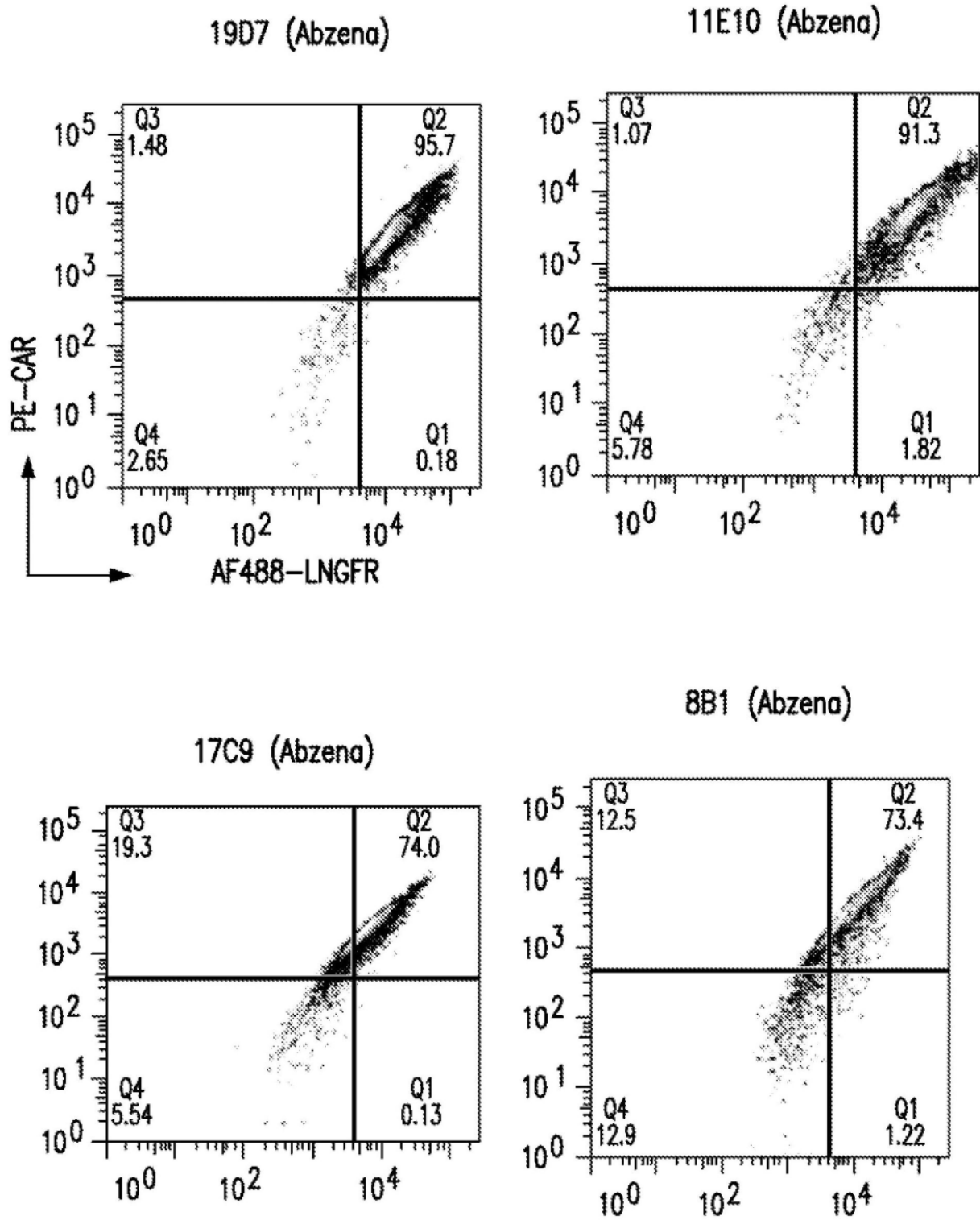


图1

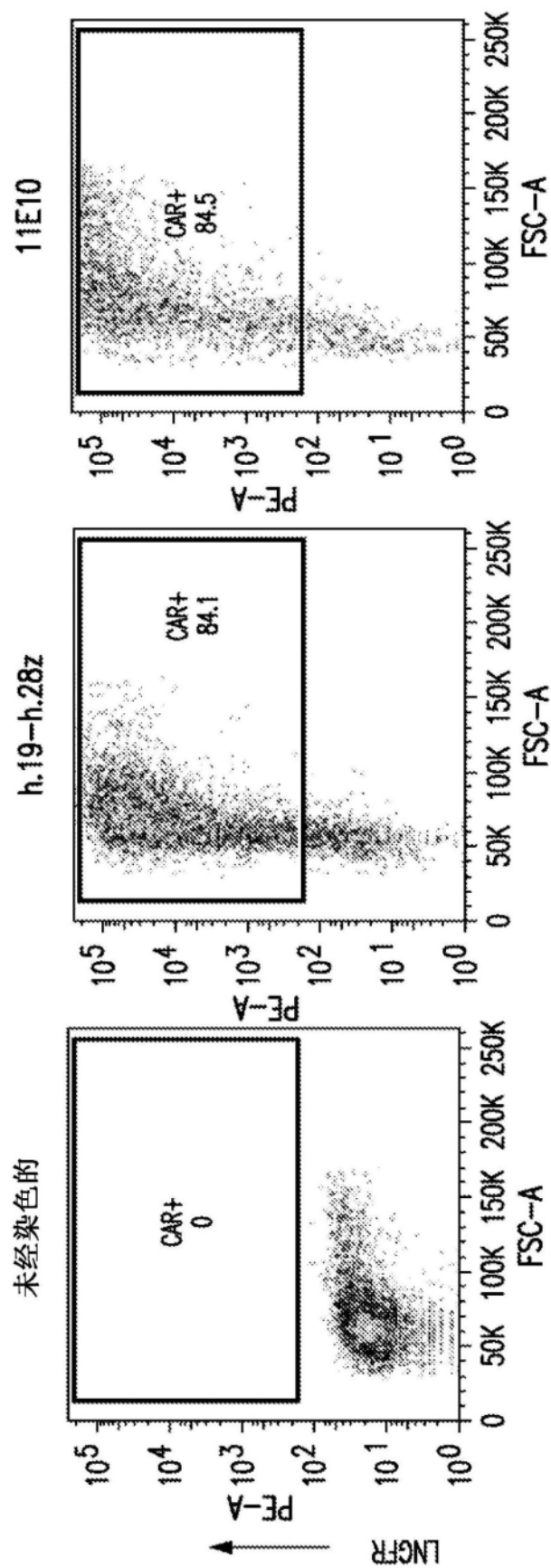


图2

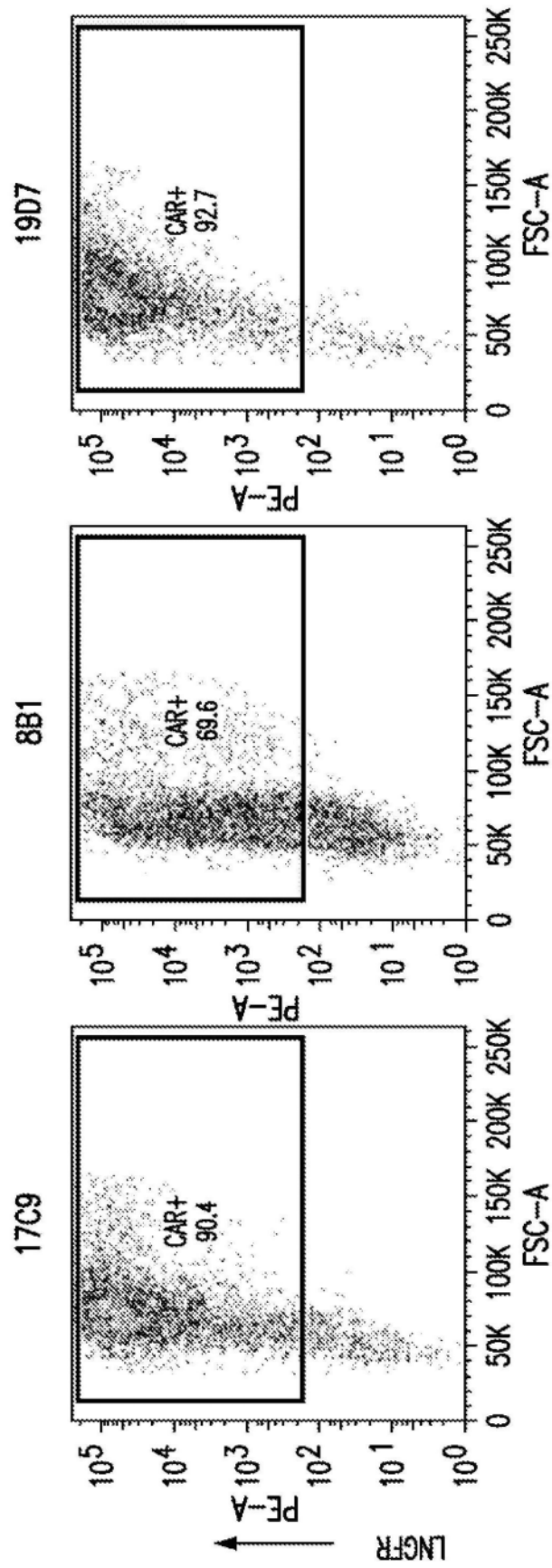


图2续

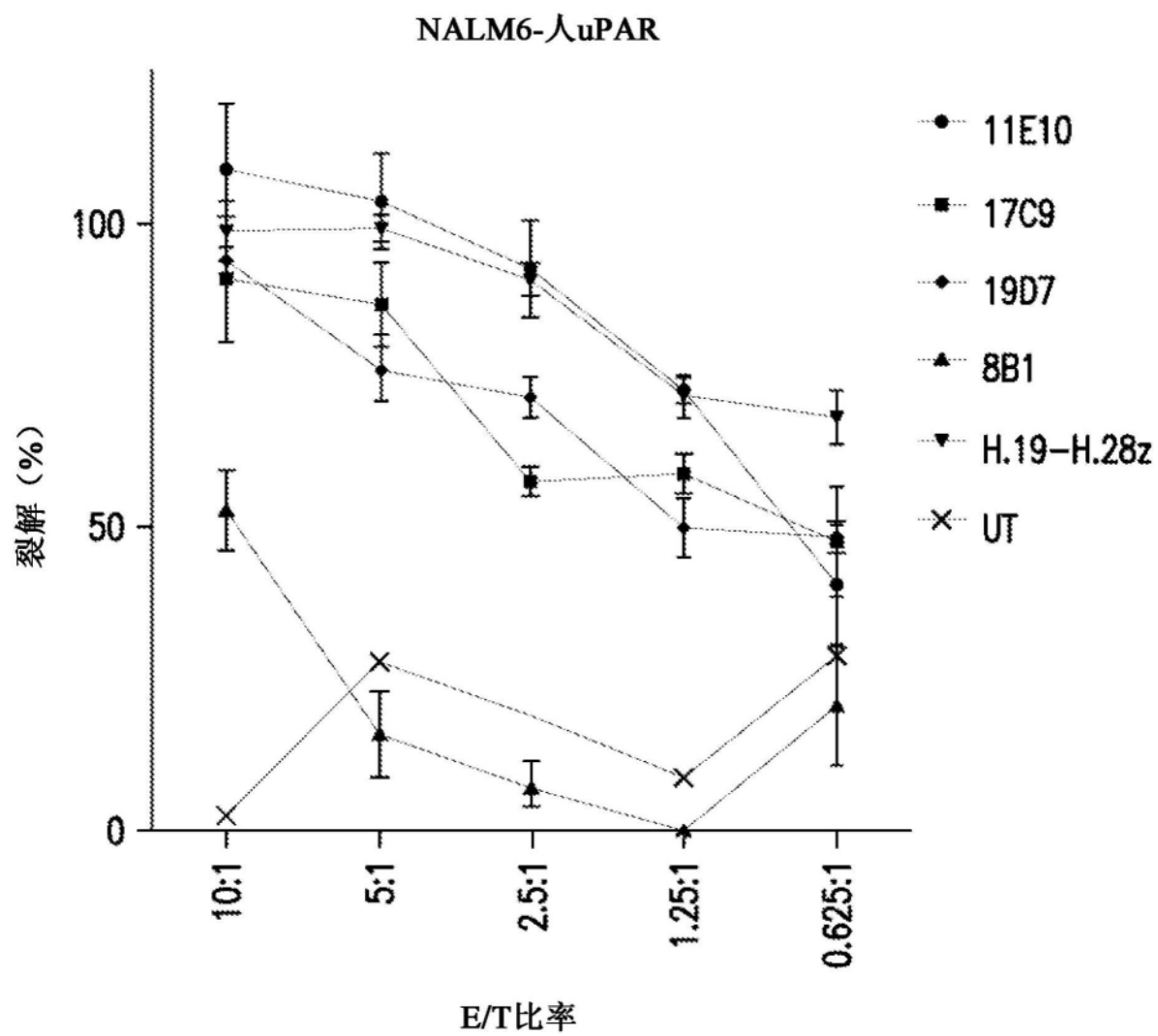


图3A

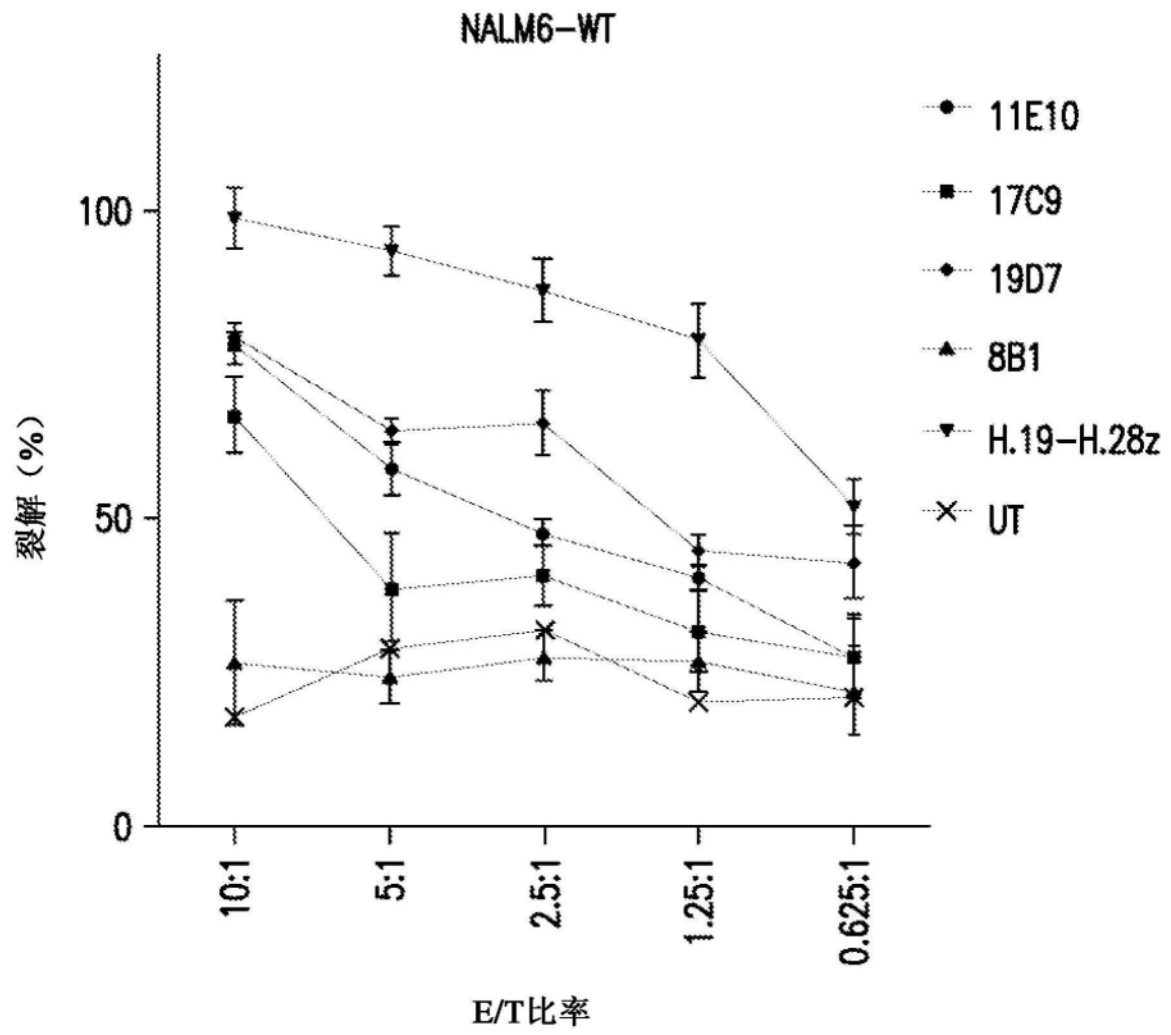


图3B