



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074975 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580057728.0

(22)申请日 2015.08.27

(30)优先权数据

62/043,067 2014.08.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/047197 2015.08.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/033331 EN 2016.03.03

(71)申请人 生物蛋白有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 杰·M·肖特

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 赵爱玲 崔龙铉

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

G12N 5/0783(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

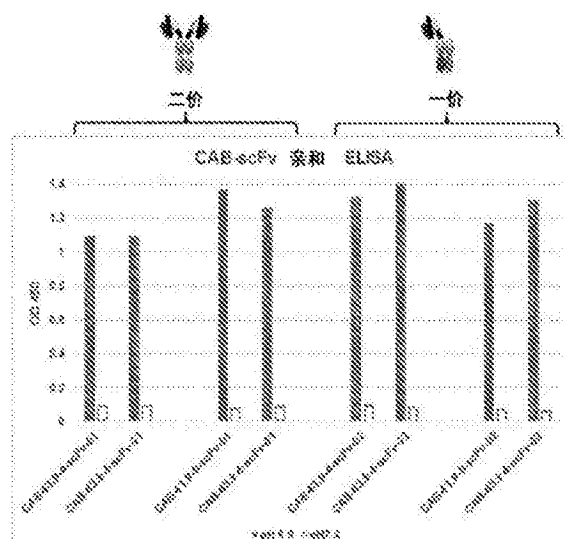
权利要求书4页 说明书58页 附图5页

(54)发明名称

用于修饰的T细胞的条件活性嵌合抗原受体

(57)摘要

本发明涉及用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体。该嵌合抗原受体包含至少一个从野生型蛋白或其结构域演变的抗原特异性靶向区,并且该抗原特异性靶向区具有以下特性中的至少一种:(a)在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降,以及(b)在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。还提供了用于产生该嵌合抗原受体的方法和表达该嵌合抗原受体的细胞毒性细胞。



1. 一种用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体,其包含:
 - i. 至少一个抗原特异性靶向区,其演变自野生型蛋白或其结构域,并且具有以下特性中的至少一种:(a) 在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降,以及(b) 在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强;
 - ii. 跨膜结构域;和
 - iii. 胞内信号传导结构域。
2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原特异性靶向区在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的嵌合抗原受体,其被构造为使得含有所述抗原受体的蛋白与野生型蛋白或其结构域相比表达水平提高。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的嵌合抗原受体,其还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述至少一个抗原特异性靶向区包含两个抗原特异性靶向区,并且每个抗原特异性靶向区结合不同的靶抗原或相同靶抗原的不同表位。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述至少一个抗原特异性靶向区选自抗体、配体、配体的受体结合结构域、受体、受体的配体结合结构域和亲和体。
9. 根据权利要求8所述的嵌合抗原受体,其中所述抗体选自全长抗体、单链抗体、Fab片段、Fab'片段、(Fab')₂片段、Fv片段和二价单链抗体或双抗体。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述胞外间隔结构域选自抗体的Fc片段、抗体的铰链区、抗体的CH₂区、抗体的CH₃区、人工间隔序列及其组合。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述跨膜结构域选自人工疏水序列以及I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154的跨膜结构域。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述共刺激结构域选自TNFR超家族中的蛋白、CD28、CD137、CD134、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS LIGHT、NKG2C和B7-H3的共刺激结构域。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述胞内信号传导结构域选自人CD3 ζ 链、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受体的胞质尾区、具有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的细胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的细胞质信号传导结构域。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述靶抗原位于癌细胞的表面上。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述靶抗原选自4-1BB、

5T4、腺癌抗原、甲胎蛋白、BAFF、B-淋巴瘤细胞、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9 (CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受体)、CD28、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白外结构域-B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人分散因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因子I受体、整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、N-羟乙酰神经氨酸、NPC-1C、PDGF-R a、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、腱生蛋白C、TGF β 2、TGF- β 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2和波形蛋白。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中所述正常生理条件选自正常生理温度、pH、渗透压、重量摩尔渗透压浓度、氧化应激和电解质浓度中的一种或多种。

17. 根据权利要求16所述的嵌合抗原受体, 其中所述正常生理条件为温度; 并且其中所述条件活性生物蛋白在正常生理温度下基本上无活性, 在低于正常生理温度的异常温度下有活性。

18. 一种表达载体, 其包含编码权利要求1-17中任一项所述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列。

19. 根据权利要求18所述的表达载体, 其中所述表达载体选自慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程化杂交病毒和转座子介导的载体。

20. 一种基因工程化细胞毒性细胞, 其包含编码权利要求1-17中任一项所述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列。

21. 根据权利要求20所述的基因工程化细胞毒性细胞, 其中所述细胞毒性细胞为T细胞。

22. 根据权利要求21所述的基因工程化细胞毒性细胞, 其中所述T细胞选自初始T细胞、中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞。

23. 根据权利要求20所述的基因工程化细胞毒性细胞, 其中所述细胞毒性细胞选自自然杀伤细胞、活化的NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B细胞、巨噬细胞和淋巴因子活化的杀伤细胞。

24. 根据权利要求20-23中任一项所述的基因工程化细胞毒性细胞, 其中所述多核苷酸序列被整合到细胞毒性细胞的基因组中。

25. 根据权利要求20-24中任一项所述的基因工程化细胞毒性细胞, 其中所述细胞毒性细胞产生足够用于治疗用途的量的嵌合抗原受体。

26. 一种药物组合物, 其包含:

a. 权利要求1-17中任一项所述的嵌合抗原受体, 权利要求18-19中任一项所述的表达载体和权利要求20-25中任一项所述的基因工程化细胞毒性细胞中的一种或多种; 和

b. 药学上可接受的赋形剂。

27. 一种用于生产包含至少一个抗原特异性靶向区、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合抗原受体的方法, 所述方法包括以下步骤:

通过以下步骤从与靶抗原特异性结合的野生型蛋白或其结构域产生所述至少一个抗

原特异性靶向区：

i. 使用一种或多种演变技术演变编码所述野生型蛋白或其结构域的DNA以产生突变DNA；

ii. 表达突变DNA以获得突变多肽；

iii. 对突变多肽和野生型蛋白或其结构域进行正常生理条件下的测定和异常条件下的测定；以及

iv. 从步骤(iii)中表达的突变多肽中选择条件活性抗原特异性靶向区，其表现出以下特性中的至少一种：(a) 在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降，以及(b) 在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。

28. 根据权利要求27所述的方法，其中所述抗原特异性靶向区在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低。

29. 根据权利要求27-28中任一项所述的方法，其中所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。

30. 根据权利要求27-29中任一项所述的方法，其中所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。

31. 根据权利要求27-30中任一项所述的方法，其被构造为使得含有所述抗原受体的蛋白质与野生型蛋白或其结构域相比表达水平提高。

32. 根据权利要求30-31中任一项所述的方法，其中所述正常生理条件选自正常生理温度、pH、渗透压、重量摩尔渗透压浓度、氧化应激和电解质浓度中的一种或多种。

33. 根据权利要求30-31中任一项所述的方法，其中所述正常生理条件为温度；并且其中所述条件活性生物蛋白在正常生理温度下基本上无活性，并且在低于正常生理温度的异常温度下有活性。

34. 根据权利要求30-33中任一项所述的方法，其中所述演变步骤包括选自PCR、易错PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、装配PCR、有性PCR诱变、体内诱变、盒式诱变、递归整体诱变、指数整体诱变、位点特异性诱变、基因再组装、基因位点饱和诱变、体外诱变、连接酶链反应、寡核苷酸合成及其组合。

35. 一种用于治疗个体中的癌症的方法，包括以下步骤：

a. 将包含编码权利要求1-17中任一项所述的嵌合抗原受体的多核苷酸序列的表达载体引入到从所述个体获得的细胞毒性细胞中以产生基因工程化细胞毒性细胞；以及

b. 向所述个体施用基因工程化细胞毒性细胞。

36. 根据权利要求35所述的方法，其中所述表达载体选自慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程化杂交病毒和转座子介导的载体。

37. 根据权利要求35所述的方法，其中所述细胞毒性细胞为T细胞。

38. 根据权利要求37所述的方法，其中所述T细胞选自初始T细胞、中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞。

39. 根据权利要求35所述的方法，其中所述细胞毒性细胞选自自然杀伤细胞、活化NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B细胞、巨噬细胞和淋巴因子活化的杀伤

细胞。

40. 根据权利要求35-39中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸序列被整合到细胞毒性细胞的基因组中。

41. 根据权利要求35-40中任一项所述的方法, 其中所述细胞毒性细胞产生足够用于治疗用途的量的嵌合抗原受体。

42. 根据权利要求35-41中任一项所述的方法, 其中所述癌症为选自下述的实体瘤: 纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑素瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤(menangioma)、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述癌症为选自下述的血液肿瘤: 白血病、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

44. 一种用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体, 其包含:

i. 用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体(CAR), 其包含演变自野生型蛋白或其结构域的至少一个抗原特异性靶向区, 所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强;

ii. 跨膜结构域; 和

iii. 胞内信号传导结构域。

用于修饰的T细胞的条件活性嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质演变领域。具体来说,本发明涉及由野生型蛋白产生条件活性嵌合抗原受体的方法。条件活性嵌合抗原受体在野生型正常生理条件下可逆地或不可逆地失活,但在异常条件下有活性。

背景技术

[0002] 有大量文献描述了演变蛋白,特别是例如酶的各种特性的潜力。例如,为了在不同条件下(如升高的温度下)操作,可以对酶进行演变以使其稳定。在升高的温度下活性增强的情况下,该增强中的大部分归因于通常用Q10律描述的较高的动力活性,对于酶来说评估为温度每增加10℃,其转换率增加一倍。

[0003] 此外,还存在自然突变的例子,其使蛋白在正常工作条件变得不稳定。某些突变体可以在较低温度下具有活性,但较野生型蛋白活性水平降低。这通常也被描述为受Q10或类似规则支配的活性下降。

[0004] 人们期望获得有用的有条件地被激活的分子。例如期望获得这样的分子,其在野生型工作条件下几乎无活性,但在除野生型工作条件之外的条件下具有活性,且其活性水平与在野生型工作条件下的活性相同或更高,或者其在特定微环境中被激活或被失活,或者其经过一段时间后被激活或被失活。除了温度,其它能够使蛋白演变或优化的条件包括pH、渗透压、重量摩尔渗透压浓度(osmolality)、氧化应激和电解质浓度。其它在演变过程中能够被优化的目标特性包括耐化学性和耐蛋白水解性。

[0005] 已公布了许多演变或工程化分子的策略。然而,将蛋白工程化或演变为在野生型工作条件下无活性或几乎无活性(小于10%活性,优选小于1%活性),而在除野生型工作条件之外的条件下保持与其对应的野生型蛋白相当的活性或比其对应的野生型蛋白更高的活性,需要失稳突变(destabilizing mutations)与不对抗该失稳效应(destabilizing effect)的活性增强突变共存。据预期,失稳降低的该蛋白的活性会比标准规则如Q10所预测的影响大,因此,通过演变出例如在相应野生型蛋白的正常工作条件下失活但在低温下有效工作的蛋白的能力,可制备一类意想不到的新的蛋白。

[0006] 已将嵌合抗原受体用于治疗癌症。US 2013/0280220公开了提供编码对两种或更多种抗原(包括肿瘤抗原)具有特异性的嵌合抗原受体的改良细胞的方法和组合物。表达嵌合抗原受体的细胞可用于细胞疗法。尽管在具体实施方案中这种细胞疗法是用于癌症(包括涉及实体瘤的癌症),但该细胞疗法可适用于任何医学病症。

[0007] 本发明提供了在正常生理条件下无活性或活性较低但在异常生理条件下有活性的工程化条件活性嵌合抗原受体。

[0008] 在本申请中,根据作者和日期引用了各种出版物。为了更充分地描述本领域技术人员已知的这些公开物的日期和请求保护的权利要求中所描述的本领域状况,将这些出版物通过引用整体并入本申请。

附图说明

[0009] 图1描绘了根据本发明的一个实施方案的嵌合抗原受体的示意图。ASTR为抗原特异性靶向区,L为接头,ESD为胞外间隔结构域,TM为跨膜结构域,CSD为共刺激结构域,ISD为胞内信号传导结构域。

[0010] 图2和3显示将实施例6的条件活性抗体表达为二价或一价抗体不会显著改变这些抗体在pH 6.0和pH 7.4以上的选择性。

[0011] 图4为表明实施例7的条件活性抗体不聚集的尺寸排阻色谱的谱图。

[0012] 图5显示了通过表面等离子体共振 (SPR) 测定法测量的实施例7的条件活性抗体的结合和解离速率。

[0013] 图6A-6B显示了通过实施例7的SPR测定法测量的条件活性抗体的选择性。

发明内容

[0014] 在一个方面,本发明提供了用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR),其包含至少一个抗原特异性靶向区,该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域,并且具有以下特性中的至少一种:(a) 在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降,以及 (b) 在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0015] 嵌合抗原受体可包括在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低的抗原特异性靶向区。

[0016] 嵌合抗原受体可包括抗原特异性靶向区,该抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强,并且在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低。

[0017] 在任何上述的嵌合抗原受体中,抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。

[0018] 可将任何上述的嵌合抗原受体构造为使得含有该抗原受体的蛋白质与野生型蛋白或其结构域相比表达水平提高。

[0019] 在替代实施方案中,本发明提供了用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR),其包含至少一个抗原特异性靶向区,该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域,并且在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0020] 另一方面,本发明提供了表达载体,其包含编码本发明的嵌合抗原受体的多核苷酸序列。该表达载体选自慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程化杂交病毒和转座子介导的载体。

[0021] 另一方面,本发明提供了基因工程化细胞毒性细胞,其包含编码本发明的嵌合抗原受体的多核苷酸序列。细胞毒性细胞可以为T细胞,并且可以选自初始T细胞、中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞。

[0022] 另一方面,本发明提供了包含本发明的嵌合抗原受体、表达载体和/或基因工程化细胞毒性细胞以及药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0023] 另一方面,本发明提供了用于生产包含至少一个抗原特异性靶向区,跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合抗原受体的方法。所述方法包括通过以下步骤从与靶抗原特异性结合的野生型蛋白或其结构域产生所述至少一个抗原特异性靶向区的步骤:使用一种或多种演变技术演变编码所述野生型蛋白或其结构域的DNA以产生突变DNA;表达突变DNA以获得突变多肽;对突变多肽和野生型蛋白或其结构域进行正常生理条件下的测定和异常条件下的测定;以及从突变多肽中选择条件活性抗原特异性靶向区,其表现出以下特性中的至少一种:(a)在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降,以及(b)在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。

[0024] 通过该方法产生的嵌合抗原受体可以包括在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低的抗原特异性靶向区。

[0025] 通过该方法产生的嵌合抗原受体可包括抗原特异性靶向区,该抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强,并且在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲和力降低。

[0026] 在通过所述方法产生的任何上述嵌合抗原受体中,所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。

[0027] 通过所述方法产生的任何上述嵌合抗原受体可以被构造为使得含有该抗原受体的蛋白与野生型蛋白或其结构域相比表达水平增强。

[0028] 在该方法的可选实施方案中,通过该方法产生的用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体(CAR)包含至少一个抗原特异性靶向区,该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域,并且在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0029] 另一方面,本发明提供了用于治疗个体中的癌症的方法,该方法包括将包含编码本发明的嵌合抗原受体的多核苷酸序列的表达载体引入到从所述个体获得的细胞毒性细胞中以产生基因工程化细胞毒性细胞;以及向个体施用基因工程化细胞毒性细胞。

[0030] 定义

[0031] 为了便于理解本文提供的实例,将对一些频繁出现的方法和/或术语在本文中进行定义。

[0032] 本文中使用的与测定量有关的术语“约”是指测定量的正常变化,其可由本领域熟练技术人员进行测量和实施与测量目的和测量仪器精度相称的关注等级(level of care)所预料。除非另有说明,“约”是指所提供值的变化为 $\pm 10\%$ 。

[0033] 本文中使用的术语“试剂”是指一种化合物、化合物的混合物、空间定位化合物系列(例如,VLSIPS肽系列、多核苷酸系列和/或组合小分子系列)、生物大分子、噬菌体肽展示文库、噬菌体抗体(例如,scFv)展示文库、多核糖体肽展示文库或从生物材料,如细菌、植物、真菌或动物(特别是哺乳动物)的细胞或组织中获得的提取物。在下面描述的筛选试验

中评价试剂的潜在酶活性。在下面描述的筛选试验中评价试剂作为条件活性生物治疗性酶的潜在活性。

[0034] 本文中使用的术语“氨基酸”是指含有氨基(-NH₂)和羧基(-COOH)的任何有机化合物;优选作为游离基团或在缩合之后作为肽键的一部分。“二十个形成天然编码多肽的α-氨基酸”在本领域中被理解为指:丙氨酸(ala或A)、精氨酸(arg或R)、天冬酰胺(asn或N)、天冬氨酸(asp或D)、半胱氨酸(cys或C)、谷氨酸(glu或E)、谷氨酰胺(gln或Q)、甘氨酸(gly或G)、组氨酸(his或H)、异亮氨酸(ile或I)、亮氨酸(leu or L)、赖氨酸(lys或K)、甲硫氨酸(met或M)、苯丙氨酸(phe或F)、脯氨酸(pro或P)、丝氨酸(ser或S)、苏氨酸(thr或T)、色氨酸(trp或W)、酪氨酸(tyr或Y)和缬氨酸(val或V)。

[0035] 本文中使用的术语“扩增”是指多核苷酸的拷贝数增加。

[0036] 本文中使用的术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白分子,以及免疫球蛋白分子的片段,例如能够结合抗原的表位的Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv和SCA片段。这些抗体片段保留一些选择性结合衍生其的抗体的抗原(例如多肽抗原)的能力,可以使用本领域熟知的方法制备(参见例如Harlow和Lane,同上),并进一步描述如下。可以使用抗体通过免疫亲和层析分离制备量的抗原。此类抗体的各种其它用途为诊断和/或疾病分期(例如,瘤形成)和治疗疾病的治疗应用,例如:瘤形成、自身免疫疾病、AIDS、心血管疾病、感染等。嵌合的、人样的、人源化的或完全人类的抗体特别用于人类患者施用。

[0037] Fab片段由抗体分子的单价抗原结合片段组成,并且可以通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体分子以产生由完整轻链和部分重链组成的片段而制备。

[0038] 抗体分子的Fab'片段可以通过用胃蛋白酶处理整个抗体分子,然后还原得到由完整轻链和部分重链组成的分子而获得。从以这种方式处理的每个抗体分子获得两个Fab'片段。

[0039] 抗体的(Fab')₂片段可以通过用胃蛋白酶处理完整抗体分子但不进行随后的还原而获得。(Fab')₂片段为通过两个二硫键保持在一起的两个Fab'片段的二聚体。

[0040] Fv片段定义为含有表达为两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段。

[0041] 本文中使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引发免疫应答的分子。这种免疫应答可参与抗体产生或特异性免疫活性细胞的活化或两者。本领域技术人员将理解,包括几乎所有蛋白质或肽在内的任何大分子可以用作抗原。此外,抗原可以衍生自重组或基因组DNA。本领域技术人员将理解,包含编码引发免疫应答的蛋白的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码本文中使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫应答。此外,技术人员将理解抗原根本不需要由“基因”编码。很明显,抗原可以由生物样品产生、合成,或可以衍生自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0042] 本文所用的“抗原丧失逃逸变体”是指表现出对靶抗原的表达降低或丧失的细胞,本发明的CAR靶向所述抗原。

[0043] 本文中使用的术语“自身免疫性疾病”定义为由自身免疫应答引起的病症。自身免疫性疾病是对自身抗原的不适当和过度应答的结果。自身免疫性疾病的实例包括但不限于Addison病、斑秃(alopecia areata)、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性胰腺

炎、克罗恩病、糖尿病(1型)、营养不良性大疱性表皮松解、附睾炎、肾小球肾炎、Graves病、吉兰-巴雷综合征、桥本病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常性天疱疮、牛皮癣、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、Sjogren氏综合征、脊柱关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液性水肿、恶性贫血、结肠炎等。

[0044] 本文中使用的术语“自体的”是指衍生自个体的任何材料,而且该材料随后被重新引入该相同个体。例如,来自患者的T细胞可以被分离,基因工程化以表达CAR,然后重新引入患者。

[0045] 本文中使用的术语“B细胞相关疾病”包括与B细胞(包括淋巴瘤和/或白血病)相关的B细胞免疫缺陷、自身免疫疾病和/或过度/不受控制的细胞增殖。本发明的双特异性CAR可用于其治疗方法的疾病的实例包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、糖尿病、类风湿性关节炎(RA)、反应性关节炎、多发性硬化(MS)、寻常型天疱疮、乳糜泻、克罗恩病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、自身免疫性甲状腺疾病、X-连锁性无丙种球蛋白血症、前B急性淋巴细胞白血病、系统性红斑狼疮、普通变异型免疫缺陷、慢性淋巴细胞白血病、与选择性IgA缺乏和/或IgG亚类缺陷相关的疾病、B谱系淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤和/或非霍奇金淋巴瘤)、具有胸腺瘤的免疫缺陷、短暂性低丙种球蛋白血症和/或高IgM综合征,以及病毒介导的B细胞疾病(如EBV介导的淋巴增殖性疾病)和在病理生物学的角度上B细胞参与的慢性感染。

[0046] 术语“血-脑屏障”或“BBB”是指外周循环与脑和脊髓之间的生理屏障,其通过脑毛细血管内皮细胞质膜内的紧密连接形成,产生限制将分子,甚至非常小的分子(例如尿素(60道尔顿))运送至脑的致密屏障。脑内的血-脑屏障、脊髓内的血-脊髓屏障和视网膜内的血-视网膜屏障是中枢神经系统(CNS)内的连续毛细血管屏障,并且在本文中统称为“血脑屏障”或“BBB”。BBB还包括血-脑脊髓液屏障(脉络丛),其中屏障由室管膜细胞而不是毛细血管内皮细胞组成。

[0047] 本文使用的术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于B细胞淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤和/或非霍奇金淋巴瘤)、脑肿瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌、黑素瘤、头颈癌、脑癌和前列腺癌(包括但不限于雄激素依赖性前列腺癌和雄激素非依赖性前列腺癌)。

[0048] 本文中使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指将抗原特异性移植到诸如T细胞、NK细胞和巨噬细胞的细胞毒性细胞上的工程化受体。本发明的CAR可以包含至少一个抗原特异性靶向区(ASTR)、胞外间隔结构域(ESD)、跨膜结构域(TM)、一个或多个共刺激结构域(CSD)和胞内信号传导结构域(ISD)。在一个实施方案中,ESD和/或CSD是任选的。在另一个实施方案中,CAR为双特异性CAR,其对两种不同的抗原或表位具有特异性。在ASTR特异性结合靶抗原后,ISD激活细胞内信号传导。例如,ISD可以以非MHC限制的方式将T细胞特异性和反应性重定向至选择的靶标,从而开发抗体的抗原结合特性。非MHC限制性抗原识别使得表达CAR的T细胞具有独立于抗原加工地识别抗原的能力,从而绕过肿瘤逃避的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源性T细胞受体(TCR) α 和 β 链二聚化。

[0049] 本文中使用的术语“共表达”是指两个或更多个基因的同时表达。基因可以是编码例如单个蛋白或作为单条多肽链的嵌合蛋白的核酸。例如,本发明的CAR可以与治疗对照(例如截短的表皮生长因子(EGFRt))共表达,其中CAR由第一多核苷酸链编码,并且治疗对

照由第二多核苷酸链编码。在一个实施方案中,第一和第二多核苷酸链通过编码可切割接头的核酸序列连接。或者,CAR和治疗对照由两条不同的多核苷酸编码,该多核苷酸不通过接头连接但是由例如两种不同的载体编码。

[0050] 本文中使用的术语“同源(cognate)”是指物种间的进化和功能相关的基因序列。例如,但不限于,在人类基因组中人CD4基因是小鼠3d4基因的同源基因,因为这两个基因的序列和结构表明,它们具有较高的同源性,两个基因都编码一种在通过MHC II类限制抗原识别而传递T细胞激活信号中发挥作用的蛋白。

[0051] 术语“条件活性生物蛋白(conditionally active biologic protein)”是指野生型蛋白的变体或突变,其在一种或多种正常生理条件下较亲本野生型蛋白活性高或低。这种条件活性蛋白还在身体的选定区域表现出活性,和/或在异常或允许的生理条件下表现出增加的或下降的活性。正常生理条件是温度、pH、渗透压、渗量、氧化应激和电解质浓度,它们在个体的给药部位或在个体作用部位的组织或器官中被认为是在正常范围内的。异常条件是指偏离了正常可接受范围的条件。在一个方面,条件活性生物蛋白在野生型条件下几乎是无活性的,但在除野生型条件之外是有活性的,其活性与野生型条件的活性相同或高于野生型条件的活性。例如,在一个方面,演变的条件活性生物蛋白在体温下几乎无活性,但在较低温度下有活性。在另一方面,条件活性生物蛋白在野生型条件下是可逆或不可逆失活的。在另一方面,野生型蛋白是一种治疗性蛋白。在另一个方面,条件活性生物蛋白用作药物或治疗剂。在另一个方面,所述蛋白在高含氧血液,例如,在流经肺后或在肾脏中发现的较低pH环境中,或多或少有活性。

[0052] “保守氨基酸替换”是指具有相似侧链残基的可互换性。例如,一组具有脂肪族侧链的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;一组具有脂肪族羟基侧链的氨基酸:丝氨酸和苏氨酸;一组具有含酰胺侧链的氨基酸:天冬酰胺和谷氨酰胺;一组具有芳香侧链的氨基酸:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;一组具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及一组具有含硫侧链的氨基酸:半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸替换组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0053] 本文中使用的术语“对应于”是指多核苷酸序列与全部或部分参考多核苷酸序列同源(即,是相同的、非严格进化相关的),或多肽序列与参考多肽序列是相同的。相比之下,本文中使用的术语“互补”是指其互补序列与全部或部分参考核苷酸序列同源。例如,核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”,与参考序列“GTATA”互补。

[0054] 本文中使用的术语“共刺激配体”包括特异性结合T细胞上的同源共刺激分子的、抗原呈递细胞(例如树突细胞、B细胞等)上的分子,由此除了例如通过TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合提供的第一信号之外还提供介导T细胞应答(包括但不限于增殖、活化、分化等)的信号。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合T_H1配体受体的激动剂或抗体以及特异性结合B7-H3的配体。共刺激配体还包括尤其特异性结合存在于T细胞上的共刺激分子的抗体,例如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特

异性结合的配体。

[0055] 本文中使用的术语“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合从而介导T细胞的共刺激反应,例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC1类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0056] 如本文中使用的术语“共刺激信号”是指与第一信号(例如TCR/CD3连接)联合导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0057] 本文中使用的术语“细胞毒性细胞”是指可以损伤或破坏侵入的微生物、肿瘤细胞或其他患病组织细胞的细胞。该术语意在包括自然杀伤(NK)细胞、活化的NK细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B细胞、巨噬细胞和淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞等细胞类型。细胞毒性细胞通过抗体、受体、配体或其片段/衍生物与靶细胞结合以形成稳定的复合物,并刺激细胞毒性细胞以破坏靶细胞。

[0058] 细胞毒性细胞还可以包括具有肿瘤溶解能力的其它免疫细胞,包括但不限于自然杀伤T细胞(Heczey等人,“Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy,”Blood,第124卷,第2824-2833页,2014)和粒细胞。此外,细胞毒性细胞可包括具有吞噬能力的免疫细胞,包括但不限于巨噬细胞和粒细胞;具有干细胞和/或祖细胞特性的细胞,包括但不限于造血干/祖细胞(Zhen等人,“HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells,”Mol Ther.,第23卷,第1358-1367页,2015)、胚胎干细胞(ESC)、脐带血干细胞和诱导多能干细胞(iPSC)(Themeli等人,“New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy,”Cell Stem Cell.,第16卷,第357-366页,2015)。另外,细胞毒性细胞包括“合成细胞”,例如iPSC衍生的T细胞(TiPSC)(Themeli等人,“Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy,”Nat Biotechnol.,第31卷,第928-933页,2013)或iPSC衍生的NK细胞。

[0059] 术语“降解有效”量是指与不接触酶的底物相比,加工至少50%底物所需的酶量。

[0060] 术语“定向连接”是指其中多核苷酸的5'端和3'端不同的连接,足以确定较佳的连接方向。例如,具有两个钝末端的未经处理的和未消化的PCR产物,在连接至经消化的多克隆位点处形成钝末端的克隆载体中时,一般没有较佳的连接方向;因而,在这些情况下一般不会出现定向连接。相比之下,一般在具有用EcoR I处理的5'端和用BamH I处理的3'端的经消化的PCR产物连接至多克隆位点用EcoR I和BamH I消化的克隆载体中时,出现定向连接。

[0061] 本文中使用的术语“基因修饰的细胞毒性细胞靶向的疾病”包括本发明基因修饰的细胞对以任何方式参与任何疾病的任何细胞的靶向,而不管该基因修饰的细胞是靶向患病细胞还是健康细胞以实现治疗有益结果。基因修饰的细胞包括但不限于基因修饰的T细胞、NK细胞和巨噬细胞。基因修饰的细胞表达本发明的CAR,所述CAR可靶向靶细胞表面上表达的任何抗原。可靶向的抗原的实例包括但不限于在B细胞上表达的抗原;在癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤和胚细胞瘤上表达的抗原;在各种免疫细胞上表达的抗原;和在与各种血液病、自身免疫疾病和/或炎症疾病相关的细胞上表达的抗原。可被靶向的其他抗原对于本领域技术人员是显而易见的,并且可以被本发明的CAR连同其替代实施方案靶向。

[0062] 本文中使用的术语“基因修饰的细胞”、“重定向的细胞”、“基因工程化的细胞”或“修饰的细胞”是指表达本发明CAR的细胞。

[0063] 本文中使用的术语“DNA改组 (shuffling)”是指基本上同源但不完全相同的序列之间的重组,在一些实施方案中,DNA改组可包括通过非同源重组交叉 (crossover),如通过 cer/lox和/或 flp/frt 系统等。DNA改组可以是随机或者非随机的。

[0064] 术语“药物”或“药物分子”是指包括一种将其对人体或动物体给药时对人体或动物体产生有利效果的物质的治疗剂。优选地,所述治疗剂包括可以治疗、治愈或缓解人体或动物体中一种或多种症状、疾病或异常情况的物质或可以增进人体或动物体健康的物质。

[0065] “有效量”是指向活的有机体给药一段时间,对于治疗或预防活的有机体内疾病有效的条件活性生物蛋白或片段的量,例如在所需的给药间隔期内,提供治疗的效果。

[0066] 本文中使用的术语“电解质”的含义为在血液或其它体液中带有电荷的矿物质 (mineral)。例如,在一个方面,正常生理条件和异常条件可以是“电解质浓度”的条件。在一个方面,待测电解质浓度选自一种或多种离子化的钙、钠、钾、镁、氯、碳酸氢盐和磷酸盐浓度。例如,在一个方面,血清钙的正常范围为8.5至10.2mg/dL。在这方面,异常的血清钙浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个实例中,在一个方面,血清氯的正常范围是每升96-106毫当量 (mEq/L)。在这方面,异常的血清氯浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个实例中,在一个方面,血清镁的正常范围是从1.7-2.2mg/dL。在这方面,异常的血清镁浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个实例中,在一个方面,血清磷的正常范围是从2.4mg/dL到4.1mg/dL。在这方面,异常的血清磷浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个实例中,在一个方面,正常的血清或血液中钠的范围是从135mEq/L到145mEq/L。在这方面,异常的血清或血液中钠浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个实例中,在一个方面,正常的血清或血液中钾的范围是从3.7mEq/L到5.2mEq/L。在这方面,异常的血清或血液中钾浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在另一个方面,正常的血清碳酸氢盐范围是从20mEq/L到29mEq/L。在这方面,异常的血清或血液中碳酸氢盐的浓度可以在高于或低于正常范围内选择。在一个不同的方面,碳酸氢盐水平可以用来指示血液中酸度的正常水平 (pH)。术语“电解质浓度”也可以用来定义除血液或血浆以外的组织或体液中特定电解质的条件。在这种情况下,正常生理条件被认为是该组织或液体的临床正常范围。在这方面,异常的组织或体液的电解质浓度可以在高于或低于正常范围内选择。

[0067] 本文中使用的术语“抗原表位”是指抗原如酶多肽上的抗原决定簇,抗体互补位如酶的特异性抗体结合到抗原决定簇上。抗原决定簇通常是由分子的化学活性表面组合如氨基酸或糖侧链组成的,可具有特定的三维结构特点以及特定的电荷特性。本文中使用的“抗原表位”是指能够形成相互结合作用 (binding interaction) 的抗原或其它大分子的那部分,其与抗体的可变区结合体相互作用。通常情况下,这种相互结合作用表现为与CDR的一个或多个氨基酸残基的分子间接触。

[0068] 本文中使用的术语“演变 (evolution)”或“演变 (evolving)”是指使用一种或多种诱变方法,产生编码新多肽的新多核苷酸,新多肽本身就是一种改进的生物分子和/或有助于另一种改进的生物分子的生成。在一个特定的非限制性方面,本发明涉及从亲本野生型蛋白中演变出条件活性生物蛋白。例如,在一个方面,演变涉及采用美国专利申请公开号 2009/0130718 (通过参考并入于此) 中公开的非随机的多核苷酸嵌合 (chimerization) 和非

随机的定点诱变的方法。更具体地,本发明提供在正常生理条件下较野生型酶亲本分子表现出活性下降,而在一种或多种异常条件下较野生型酶的抗原特异性靶向区表现出活性增强的条件活性生物酶的演变方法。

[0069] 当术语“片段”、“衍生物”和“类似物”对照参考多肽时,包括保留至少一种至少在本质上与参考多肽相同的生物功能或活性的多肽。此外,术语“片段”、“衍生物”或“类似物”的实例是分子的“前体形式”,如低活性蛋白原(proprotein),其可通过切割修饰而产生具有显著高活性的成熟酶。

[0070] 本文中使用的术语“基因”是指参与产生多肽链的DNA片段;它包括编码区之前和之后的区域(前导区和拖尾区)以及各编码片段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0071] 本文中使用的术语“异源”是指一条单链核酸序列无法与另一条单链核酸序列或其互补序列进行杂交。因而,异源区是指多核苷酸区或多核苷酸的序列中具有无法与另一条核酸或多核苷酸进行杂交的区或区域。这种区域或区例如为突变区。

[0072] 本文中使用的术语“同源(homologous)”或“部分同源(homeologous)”是指一条单链核酸序列可以与单链核酸序列的互补序列进行杂交。杂交的程度可能取决于许多因素,包括序列之间同一性数量和杂交条件如稍后讨论的温度和盐浓度。优选地,同一性区大于约5bp,更优选地,同一性区大于约10bp。

[0073] 本发明的益处延伸到“工业应用”(或工业生产过程),该术语用于包括在商业性工业中适当的应用(或简称工业)以及非商业性的工业应用(例如在非营利机构的生物医学研究中)。相关的应用包括那些诊断、医药、农业、制造业和学术界领域。

[0074] 本文中使用的术语“免疫细胞”是指哺乳动物免疫系统的细胞,包括但不限于抗原呈递细胞、B细胞、嗜碱性粒细胞、细胞毒性T细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、粒细胞、辅助T细胞、白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、肥大细胞、记忆细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、吞噬细胞、浆细胞和T细胞。

[0075] 本文中使用的术语“免疫应答”是指包括但不限于先天免疫、体液免疫、细胞免疫、免疫、炎症反应、获得性(适应性)免疫、自身免疫和/或过度免疫的免疫。

[0076] 本文中使用的术语“分离的”是指该物质被从原来的环境(例如,自然环境,如果它是天然存在的)中移出。例如,存在于活体动物中自然产生的核苷酸或酶是未分离的,但从天然系统中共存的部分或全部物质中分离出的相同的核苷酸或酶是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分,和/或这种多核苷酸或酶可以是组合物的一部分,由于这种载体或组合物不是其天然环境的一部分,其仍然是分离的。

[0077] 本文中使用的术语“分离的核酸”用来定义与5'和3'侧翼序列不紧密连接的核酸,例如DNA或RNA分子,而在衍生其的有机体中天然产生的基因组中通常是紧密连接的。因而,该术语描述为,例如,整合至载体如质粒或病毒载体中的核酸;整合至异源细胞基因组(或同源细胞基因组,但位点不同于其天然发生的位点)中的核酸;以及作为单独分子存在的核酸,例如通过PCR扩增或限制酶切产生的DNA片段,或通过体外转录产生的RNA分子。该术语还描述了形成编码其它多肽序列的杂交基因一部分的重组核苷酸,该其它多肽可用于例如产生融合蛋白。

[0078] 本文中使用的术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒中是独特的,其能够感染非分裂细胞;它们可以将大量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,

因此它们是递送基因递送载体的最有效方式之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。来源于慢病毒的载体提供在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0079] 本文中使用的术语“配体”是指可被特定受体识别的分子,如随机肽或可变区序列。本领域的熟练技术人员应知道,分子(或大分子复合物)既可以是受体也可以是配体。在一般情况下,具有较小分子量的结合体是指配体,具有较大分子量的结合体是指受体。

[0080] 本文中使用的术语“连接”是指两条双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程(Sambrook等人,(1982).分子克隆:分子克隆手册,冷泉港实验室(Molecular Cloning:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbour Laboratory),Cold Spring Harbor,NY.,p.146;Sambrook等人,分子克隆:分子克隆手册,第二版(Molecular Cloning:a laboratory manual,2nd Ed.),Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)。除另有规定外,连接可采用已知的缓冲液和条件来完成,用10个单位的T4DNA连接酶(“连接酶”)连接每0.5微克约等摩尔量的DNA片段。

[0081] 本文中使用的术语“接头”或“间隔子”是指连接两个分子如DNA结合蛋白和随机肽的分子或分子组合,以使两个分子处于较佳的构型,例如,以使随机肽以最小空间位阻与DNA结合蛋白的受体结合。本文中使用的“接头”(L)或“接头结构域”或“接头区域”是指长度约为1至100个氨基酸的寡肽或多肽区,其将本发明CAR的任何结构域/区域连接在一起。接头可以由柔性残基如甘氨酸和丝氨酸组成,使得相邻的蛋白结构域相对于彼此自由移动。当需要确保两个相邻结构域不会彼此空间干扰时,可以使用更长的接头。接头可以是可切割的或不可切割的。可切割接头的实例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等同物及其组合。在一些实施方案中,接头包括小核糖核酸病毒2A样接头、猪捷申病毒(P2A)的CHYSEL序列、明脉扁刺蛾β四体病毒(*Thosea asigna virus*,T2A)或其组合、变体和功能等同物。其它接头对于本领域技术人员将是显而易见的,并且可以与本发明的替代实施方案结合使用。

[0082] 本文中使用的术语“哺乳动物细胞表面展示”是指出于筛选目的将蛋白质或抗体或抗体的一部分在哺乳动物宿主细胞表面上表达并展示的技术;例如通过磁珠和荧光活化细胞分选的组合筛选特异性抗原结合。一方面,哺乳动物表达载体用于同时表达分泌形式和细胞表面结合形式的免疫球蛋白,如在DuBridge等人,US 2009/0136950中所述,该文献通过引用并入本文。另一方面,所述技术用于筛选编码抗体或抗体片段文库的病毒载体,所述抗体或抗体片段在细胞中表达时展示在细胞膜上,如Gao等人,US 2007/0111260中所述,该文献通过引用并入本文。哺乳动物细胞上的全IgG表面展示是已知的。例如,Akamatsu等人开发了一种哺乳动物细胞表面展示载体,适合基于其抗原结合亲和力和生物活性直接分离IgG分子。使用Epstein-Barr病毒衍生的附加型载体,将抗体文库作为完整的IgG分子展示在细胞表面上,并通过磁珠和荧光活化细胞分选的组合筛选特异性抗原结合。从分选的细胞中回收编码具有所需结合特征的抗体的质粒,并将其转化为适于产生可溶性IgG的形式。参见Akamatsu等人J.Immunol.Methods,第327卷,第40-52页,2007,该文献通过引用并入本文。Ho等人将广泛用于瞬时蛋白表达的人胚肾293T细胞用于单链Fv抗体的细胞表面展示以进行亲和力成熟。从表达具有稍低的亲和力的WT抗体的大量过量的细胞中通过单程细胞分选将表达具有更高亲和力的稀有突变体抗体的细胞富集240倍。此外,在组合文库的单一选择使内在抗体热点随机化后,获得对CD22具有增强的结合亲和力的高度富集的突变

体。参见Ho等人,“Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells (通过人细胞上的Fv展示分离具有高亲和性的抗-CD22Fv)”Proc Natl Acad Sci U S A,第103卷,第9637-9642页,2006,该文献通过引用并入本文。

[0083] 也可以使用对抗原具有特异性的B细胞。这样的B细胞可以直接从人供体的外周血单核细胞(PBMC)中分离。从该B细胞库产生重组的抗原特异性单链Fv(scFv)文库,并使用Sindbis病毒表达系统通过哺乳动物细胞表面展示进行筛选。从阳性克隆和作为完整IgG或Fab片段产生的重组全人抗体中分离重链(HC)和轻链(LC)的可变区(VR)。以这种方式,分离了几种结合Q β 病毒样颗粒(VLP)的超突变高亲和力抗体、模型病毒抗原以及对尼古丁具有特异性的抗体。参见Beerli等人,“Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display (通过哺乳动物细胞展示分离人单克隆抗体)”,Proc Natl Acad Sci U S A,第105卷,第14336-14341页,2008,该文献通过引用并入本文。

[0084] 酵母细胞表面展示也可以用于本发明,例如,参见Kondo and Ueda,“Yeast cell-surface display-applications of molecular display (分子展示的酵母细胞表面展示应用)”,Appl. Microbiol. Biotechnol.,第64卷,第28-40页,2004,其描述了例如使用酿酒酵母的细胞表面工程系统。用于在酿酒酵母中表达的几种代表性展示系统描述于Lee et al,“Microbial cell-surface display (微生物细胞表面展示)”,TRENDS in Biotechnol.,第21卷,第45-52页,2003;以及Boder和Witttrup,“Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries (用于筛选组合多肽文库的酵母细胞展示)”,Nature Biotechnol.,第15卷,第553页,1997。

[0085] 本文中使用的术语“生产”是指以足够的量产生蛋白质,该量足以允许治疗性蛋白的至少I期临床测定或足以用于诊断性蛋白质的监管批准。

[0086] 本文中使用的术语“微环境”是指与身体的组织或区的其它区域具有持续的或暂时的、生理的或化学的组织的身体或身体的任何部位或区域。

[0087] 本文中使用的术语“要被演变的分子特性”包括含有多核苷酸序列的分子,含有多肽序列的分子,含有部分多核苷酸和部分多肽序列的分子。与被演变的分子特性特别相关的,但绝不限于以下实例,包括:特定条件下蛋白的活性,如涉及温度;盐度;渗透压;pH;氧化应激以及甘油、二甲基亚砷、去污剂和/或在反应环境中接触的任何其它分子种类的浓度。其它的与被演变的分子特性特别相关的,但绝不限于以下实例,包括稳定性,例如在经过暴露于特定环境一段时间后表现出的剩余的分子特性,如在存储过程中会遇到的情况。

[0088] 本文中使用的术语“突变(mutation)”是指在野生型核酸序列中序列的变化或在肽序列中序列的变化。这种突变可以是点突变,如转换或颠换。所述突变可以是缺失、插入或重复。

[0089] 本文中使用的术语“多特异性抗体”是对至少两个不同表位具有结合亲和力的抗体。可以将多特异性抗体作为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)进行制备。工程化抗体可以结合两个、三个或更多个(例如四个)抗原(参见例如US 2002/0004587 A1)。可以将一个条件性活性抗体工程化为多特异性抗体,或者将两个抗体工程化以包含结合两个抗原的异源二聚体。多特异性抗体也可以是多功能的。

[0090] 本文中使用的简并“N,N,G/T”核苷序列代表32种可能的三联体,其中“N”可以是A、C、G或T。

[0091] 本文中使用的术语“天然存在”所适用的对象所指事实为可以在自然界中发现的对象。例如,存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然存在的,其可以从自然的来源中分离,且未在实验室中被人为地有意改造过。一般而言,术语天然存在是指对象存在于非病理(未病变)的个体中,这在物种中是普遍存在的。

[0092] 本文中使用的“正常生理条件”或“野生型工作条件”是指那些在个体的给药部位或在个体作用部位将被考虑的正常范围内的条件:温度、pH、渗透压、重量摩尔渗透压浓度、氧化应激和电解质浓度。

[0093] 本文中使用的术语“核酸分子”由至少一个碱基或一个碱基对组成,这取决于它是否分别是单链或双链。此外,核酸分子可能唯一地(exclusively)或嵌合地(chimerically)属于任一组含有核苷的分子,作为实例但不限于以下组的核酸分子:RNA、DNA、基因组核酸、非基因组核酸、天然存在的和非天然存在的核酸以及合成的核酸。通过非限制性举例的方式,这包括与任何细胞器如线粒体、核糖体RNA和由不随天然存在的成分一起天然存在的一种或多种成分嵌合组成的核酸分子相关的核酸。

[0094] 此外,“核酸分子”可部分包含一种或多种基于非核苷的成分,作为实例但不限于氨基酸和糖类。因而,通过举例的方式,但不限于此,核酶是部分基于核苷和部分基于蛋白,被认为是“核酸分子”。

[0095] 本文中使用的术语“编码…的核酸序列”或“…的DNA编码序列”或“编码…的核苷酸序列”是指当被置于适当的调控序列(如启动子)控制下时,DNA序列被转录并翻译成酶。“启动子”是能够在胞内结合RNA聚合酶并启动下游(3'方向)编码序列的转录的DNA调控区。启动子是DNA序列的一部分。在该序列的3'端具有起始密码子。该启动子序列包括最低数目的碱基,这种组成对于以高于背景的可检测到的水平起始转录是必需的。然而,在RNA聚合酶结合该序列且从起始密码子(启动子的3'端)开始转录之后,转录朝着下游的3'方向进行。在该启动子序列内会找到转录起始位点(可方便地由核酸酶S1图谱确定)以及负责结合RNA聚合酶的蛋白结合域(共有序列)。

[0096] 术语“寡核苷酸”(或同义地“寡核苷酸”)是指可以化学合成的单链聚脱氧核苷酸或两个互补的聚脱氧核苷酸链。这样的合成寡核苷酸可以具有或不具有5'磷酸。那些不具有5'磷酸的寡核苷酸不会在激酶存在下在不添加磷酸和ATP的情况下与另一种寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸将连接到未脱磷酸化的片段。

[0097] 本文中使用的术语“可操作连接的”是指功能关系中的多核苷酸元件之间的连接。当核酸被置于与另一条核酸序列的功能关系中时,它是“可操作连接的”。例如,如果启动子或增强子影响到编码序列的转录,则它与该编码序列是可操作连接的。可操作连接是指被连接的DNA序列通常是连续的,且在需要连接两个蛋白质编码区时是连续的并位于阅读框内。

[0098] 编码序列“可操作连接至”另一条编码序列,则RNA聚合酶转录这两条编码序列为一条mRNA,然后其被翻译成一条含有来自两条编码序列的氨基酸的多肽。只要表达的序列被最终加工成所需的蛋白,编码序列不必与另一条编码序列是连续的。

[0099] 本文中使用的术语“亲本多核苷酸组合”是由一种或多种不同的核苷酸组成的组合。通常该词用于关于优选通过诱变处理亲本组合获得的后代多核苷酸组合,在这种情况下,术语“亲本”、“起始物”和“模板”可互换使用。

[0100] 术语“患者”或“个体”是指作为治疗对象的动物，例如哺乳动物如人。所述个体或患者，可能是雄性或雌性。

[0101] 本文中使用的术语“生理条件”是指温度、pH、渗透压、离子强度、粘度等生化参数，其与活有机体相容和/或通常存在于活的酵母培养细胞或哺乳动物细胞的细胞内。例如，在典型的实验室培养条件下生长的酵母细胞的胞内条件是生理条件。用于体外转录混合物(cocktails)的合适体外反应条件一般是生理条件。通常体外生理条件包括50-200mM NaCl或KCl, pH6.5-8.5, 20-45°C和0.001-10mM二价阳离子(例如 Mg^{++} 、 Ca^{++})；优选约150mM NaCl或KCl, pH 7.2-7.6, 5mM二价阳离子，而且往往包括0.01-1.0%的非特异性蛋白(例如，牛血清白蛋白(BSA))。往往存在非离子型去污剂(吐温、NP-40、Triton X-100)，通常约0.001-2%，典型地为0.05-0.2% (v/v)。特定的水溶液条件由医生按常规方法选择。对于一般性的指导，以下缓冲的水溶液条件可以适用：10-250mM NaCl, 5-50mM Tris HCl, pH5-8，任选加入二价阳离子和/或金属螯合剂和/或非离子型去污剂和/或膜组分和/或消泡剂和/或闪烁材料(scintillant)。在一些实施方案中，缓冲液可含有BSA、碳酸盐、碳酸氢盐、氯化物盐等中的至少一个。正常生理条件是指病人或个体体内给药部位或作用部位处的温度、pH、渗透压、重量摩尔渗透压浓度、氧化应激和电解质的浓度，其被认为是在病人体内的正常范围内。

[0102] 本文中采用标准惯例(Standard convention) (5'到3')来描述双链多核苷酸的序列。

[0103] 本文中使用的术语“群(population)”是指如多核苷酸、多核苷酸的部分或多核苷酸或蛋白成分的集合。“混合的群”是指属于相同的核酸或蛋白家族(即，是相关的)但序列不同(即，不同源)因而生物活性不同的成分的集合。

[0104] 具有“前体形式”的分子是指经过一种或多种共价和非共价化学修饰(例如糖基化、蛋白水解裂解、二聚化或寡聚化、温度诱导或pH诱导的构象变化、与辅因子相连等)的任何组合的分子，从而获得较参考前体分子更成熟的性质不同(例如活性增加)的分子形式。当两种或两种以上的化学修饰(例如两种蛋白水解裂解或一种蛋白水解裂解和一种去糖基化)能够被区分，从而产生成熟的分子，所述参考前体分子可被称为“原前体形式(pre-pro-form)”的分子。

[0105] 本文中使用的术语“受体”是指对给定的配体具有亲和力的分子。受体可以是自然产生或人工合成的分子。受体可以其未改变的状态或与其它种类形成聚集体而应用。受体可直接或通过特定的结合物质共价或非共价连接于结合单元。受体的实例包括但不限于抗体，其包括单克隆抗体且能够与特定的抗原决定簇(如位于病毒、细胞或其它材料上)发生抗血清反应，细胞膜受体、碳水化合物和糖蛋白的复合物、酶和激素受体。

[0106] 本文中使用的术语“还原重组(Reductive reassortment)”是指通过由重复序列介导的缺失(和/或插入)事件而产生的分子多样性的增加。

[0107] 本文中使用的术语“限制位点”是指显示限制酶发生作用所必需的识别序列，其包括催化切割位点。可知切割位点可包含于或不包含于含有低多义性序列(low ambiguity sequence) (即含有限制位点出现频率的主要决定因素的序列)的限制位点的一部分中。当提到酶(例如限制酶)“切割”多核苷酸时，它被理解为限制性酶催化或促进多核苷酸的裂解。

[0108] 在本文中使用的术语“单链抗体”是指包含多肽连接的VH结构域和VL结构域的多肽，VH结构域和VL结构域通常通过间隔肽连接，并且其可以在氨基末端和/或羧基末端包含其他的氨基酸序列。例如，单链抗体可以包含用于连接编码多核苷酸的系链区段。作为实例，scFv为单链抗体。单链抗体通常是由一个或多个具有至少10个连续氨基酸的多肽区段组成的蛋白质，该连续氨基酸基本上由免疫球蛋白超家族的基因编码（例如，参见The Immunoglobulin Gene Superfamily（免疫球蛋白基因超家族），A.F.Williams and A.N.Barclay, in Immunoglobulin Genes, T.Honjo, F.W.Alt, and THE.Rabbits, eds., (1989) Academic press: San Diego, Calif., pp.361-368, 该文献通过引用并入本文），最常由啮齿类、非人灵长类、禽、猪、牛、绵羊、山羊或人重链或轻链基因序列编码。功能性单链抗体通常含有足够部分的免疫球蛋白超家族基因产物，以便保持与特异性靶分子（通常为受体或抗原（表位））结合的性质。

[0109] 如果它们彼此结合的亲和力要高于与其它非特异性分子的亲和力，则该分子对（例如，抗体-抗原对和配体-受体对）的成员被描述为彼此“特异性结合”。例如，对抗抗原的抗体与该抗原的结合比非特异性的蛋白更有效，可以描述为抗体特异性地结合抗原。

[0110] 如本文中使用的术语“刺激”是指通过刺激分子（例如，TCR/CD3复合物）与其同源配体结合诱导初级应答，从而介导信号转导事件，所述事件例如但不限于通过TCR/CD3复合物的信号转导。刺激可介导某些分子的表达改变，例如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0111] 本文中使用的术语“刺激分子”是指与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0112] 本文中使用的术语“刺激配体”是指当存在于抗原呈递细胞（例如树突细胞，B细胞等）上时可与T细胞上的同源结合配偶体（在本文中称为“刺激分子”）特异性结合从而介导T细胞的初级应答的配体，初级应答包括但不限于激活、免疫应答的启动，增殖等。刺激配体是本领域公知的，并且尤其包括负载有肽的MHC I类分子、抗CD3抗体、超级激动剂抗CD28抗体和超级激动剂抗CD2抗体。

[0113] 本文使用的术语“靶细胞”是指涉及疾病并且可以被本发明的基因修饰的细胞毒性细胞（包括但不限于基因修饰的T细胞、NK细胞和巨噬细胞）靶向的细胞。其它靶细胞对本领域技术人员是显而易见的，并且可以与本发明的替代实施方案结合使用。

[0114] 术语“T细胞”和“T淋巴细胞”可互换，并且在本文中作为同义语使用。实例包括但不限于初始T细胞、中枢记忆性T细胞、效应记忆性T细胞及其组合。

[0115] 如本文中使用的术语“转导”是指使用病毒载体将外源核酸引入细胞中。本文中使用的“转染”是指使用重组DNA技术将外源核酸引入细胞中。术语“转化”是指向宿主细胞引入“外源”（即外部或胞外）基因、DNA或RNA序列，使得宿主细胞表达引入的基因或序列以产生所需物质，例如由引入的基因或序列编码的蛋白质或酶。引入的基因或序列也可称为“克隆”或“外源”基因或序列，可包括调节或控制序列，例如起始序列、终止序列、启动子序列、信号序列、分泌序列或细胞遗传机制使用的其它序列。基因或序列可以包括非功能性序列或无已知功能的序列。接受并表达引入的DNA或RNA的宿主细胞是已经被“转化”的并且是“转化体”或“克隆”。引入宿主细胞的DNA或RNA可以来自任何来源，包括与宿主细胞相同的属或种的细胞，或不同属或种的细胞。

[0116] 术语“治疗”包括：(1) 预防或延缓发生于动物体内的状态(state)、疾病或病症的临床症状出现,该动物可能患有或易感于该状态、疾病或病症但尚未经历或表现出该状态、疾病或病症的临床或亚临床症状；(2) 抑制该状态、疾病或病症(即,阻止、减少或延缓疾病的发展,或维持治疗情况下疾病的复发,或至少一种临床或亚临床症状)；和/或(3) 减轻病症(即,引起该状态、疾病或病症的衰退或引起至少其一种临床或亚临床症状的衰退)。对将要进行治疗的病人的好处是在统计学上显著,或至少对病人或医生的好处是可察觉到的。

[0117] 本文中使用的“肿瘤”是指所有赘生细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌性细胞和组织。

[0118] 本文中使用的术语“肿瘤微环境”是指肿瘤环境的任何和所有元素,包括为恶性过程产生结构和/或功能环境以存活和/或扩张和/或扩散的元素。

[0119] 本文中使用的术语“可变区段(variable segment)”是指包括随机的、伪随机的或确定的核心序列的新生肽的一部分。“可变区段”是指包括随机的、伪随机的或确定的核心序列的新生肽的一部分。可变区段可包括可变的或不可变的残基位,可变的残基位上的残基可变程度可能是有限的:两种选择由医生定夺。通常情况下,可变区段长约5至20个氨基酸残基(例如,8至10),尽管可变区段可以更长,并可能包括抗体部分或受体蛋白,如抗体片段、核酸结合蛋白、受体蛋白等

[0120] 本文中使用的“载体”、“克隆载体”和“表达载体”是指可以将多核苷酸序列(例如外源基因)引入宿主细胞中以便转化宿主并促进引入序列的表达(例如转录和翻译)。载体包括质粒、噬菌体、病毒等。

[0121] 本文中使用的术语“野生型”是指不包括任何突变的多核苷酸。“野生型蛋白(wild type protein)”、“野生-型蛋白(wild-type protein)”、“野生-型生物蛋白(wild-type biologic protein)”或“野生型生物蛋白(wild type biologic protein)”是指可以从自然界中分离的在自然条件下具有一定水平活性的且包含在自然条件下发现的氨基酸序列的蛋白。术语“亲本分子”和“目标蛋白”也指野生型蛋白。“野生型蛋白”优选具有一些期望的性质(例如更高的结合亲和力和/或酶活性),其可以通过在蛋白质文库中筛选所需性质获得,所需性质包括在不同温度和/或pH下更好的稳定性、改善的选择性和/或溶解性。

[0122] 术语“工作”,如在“工作样本”中,例如,仅简单地指一个用于工作的样本。同样,“工作分子”,例如,是指用于工作的分子。

[0123] 详细描述

[0124] 为了说明的目的,通过参考各种示例性实施方案来描述本发明的原理。尽管本文具体描述了本发明的某些实施方案,但是本领域普通技术人员将容易认识到相同的原理同样适用于并且可以用于其他系统和方法。在详细说明本发明所公开的实施方案之前,应当理解,本发明的应用不限于所示的任何特定实施方案的细节。另外,本文使用的术语是为了描述的目的,而不是限制的目的。此外,尽管参考本文以特定顺序呈现的步骤描述了某些方法,但在许多情况下,这些步骤可以以本领域技术人员可以理解的任何顺序执行。因此,该新方法不限于本文公开的步骤的特定布置。

[0125] 必须注意,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一种(a、an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。此外,术语“一种(a、an)”、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可以互换使用。术语“包含”、“包括”、“具有”和“由…构成”也可以互

换使用。

[0126] 本发明涉及用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR)，其包含至少一个抗原特异性靶向区，该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域，并且具有以下特性中的至少一种：(a) 在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降，以及 (b) 在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强；跨膜结构域；和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0127] 本发明的CAR具有以下特性中的至少一种：(1) 在正常生理条件下与不具有条件活性抗原特异性靶向区的相同CAR相比它们对靶抗原的亲合力可逆地或不可逆地降低，以及 (2) 在异常条件下与不具有条件活性抗原特异性靶向区的相同CAR相比亲合力增强。这些CAR可以将细胞毒性细胞导向存在异常条件的患病部位，例如肿瘤微环境或滑液。作为这些性质的结果，因为CAR对正常组织的亲合力低，CAR可优先将细胞毒性细胞导向患病部位。这样的CAR可以显著减少副作用并允许使用更高剂量的治疗剂来增强治疗功效。CAR对于开发被要求在个体体内停留较短或有限时间的新型治疗剂特别有价值。有益应用的实例包括高剂量的全身治疗以及高浓度的局部治疗。

[0128] 嵌合抗原受体可包括在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲合力降低的抗原特异性靶向区。

[0129] 嵌合抗原受体可包括抗原特异性靶向区，该抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强，并且在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲合力降低。

[0130] 在任何上述的嵌合抗原受体中，抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。

[0131] 可将任何上述的嵌合抗原受体构造为使得含有该抗原受体的蛋白与野生型蛋白或其结构域相比表达水平提高。

[0132] 在替代实施方案中，本发明提供了用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR)，其包含至少一个抗原特异性靶向区，该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域，并且在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强；跨膜结构域；和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0133] 本发明还涉及演变野生型蛋白或其结构域以产生条件活性蛋白的方法，所述条件活性蛋白具有以下特性中的至少一种：(a) 在正常生理条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性下降，以及 (b) 在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强。条件活性蛋白可以被工程化为CAR。

[0134] 通过该方法产生的嵌合抗原受体可以包括在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲合力降低的抗原特异性靶向区。

[0135] 通过该方法产生的嵌合抗原受体可包括抗原特异性靶向区，该抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比活性增强，并且在正常生理条件下与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比对靶抗原的结合亲合力降低。

[0136] 在通过所述方法产生的任何上述嵌合抗原受体中,所述抗原特异性靶向区在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强。

[0137] 通过所述方法产生的任何上述嵌合抗原受体可以被构造为使得含有该抗原受体的蛋白与野生型蛋白或其结构域相比表达水平提高。

[0138] 在该方法的可选实施方案中,通过该方法产生的用于与靶抗原结合的嵌合抗原受体(CAR)包含至少一个抗原特异性靶向区,该至少一个抗原特异性靶向区演变自野生型蛋白或其结构域,并且在异常条件下的测定中与野生型蛋白或其结构域的抗原特异性靶向区相比选择性增强;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体还包含胞外间隔结构域或至少一个共刺激结构域。

[0139] 嵌合抗原受体

[0140] 哺乳动物特别是人的免疫系统具有用于靶向和破坏患病组织和/或病原体的细胞毒性细胞。使用这些细胞毒性细胞以除去诸如肿瘤的不想要的组织(即靶组织)是有前景的治疗方法。可被靶向除去的其它组织包括腺(例如前列腺)增生、疣和不想要的脂肪组织。然而,这种相对较新的治疗方法迄今仅取得有限的成功。例如,因为癌细胞可以通过降低表面抗原的表达而适应新疗法以降低该疗法的有效性,所以使用T细胞靶向并破坏肿瘤的长期益处相对较低。癌细胞甚至可以去分化以逃避响应于肿瘤特异性T细胞的检测。参见Maher, "Immunotherapy of Malignant Disease Using Chimeric Antigen Receptor Engrafted T Cells," ISRN Oncology, 第2012卷, article ID 278093, 2012。

[0141] 表达嵌合抗原受体的细胞毒性细胞可以显著改善这些细胞毒性细胞的特异性和敏感性。例如,表达CAR的T细胞(CAR-T细胞)能够使用CAR将T细胞导向表达特异性结合CAR的细胞表面抗原的目标肿瘤细胞。这种CAR-T细胞可以将细胞毒性剂更有选择性地递送至肿瘤细胞。CAR-T细胞可以直接识别靶分子,因此通常不受多态呈递元件(例如人白细胞抗原(HLA))的限制。这种CAR靶向策略的优点有三个。首先,由于CAR-T细胞功能不依赖于HLA状态,所以基于相同的CAR的方法原则上可以用于患有表达相同靶表面抗原的肿瘤所有患者。第二,抗原加工和呈递机制的讹误是肿瘤细胞的共同属性,并且可以助长免疫逃逸。然而,这不提供针对CAR-T细胞的保护。第三,可以使用该系统靶向一系列大分子,包括蛋白、碳水化合物和糖脂。

[0142] 本发明的嵌合抗原受体为包含至少一个抗原特异性靶向区(ASTR)、跨膜结构域(TM)和胞内信号传导结构域(ISD)的嵌合人工蛋白。在一些实施方案中,CAR还可以包括胞外间隔结构域(ESD)和/或共刺激结构域(CSD)。参见图1。

[0143] ASTR是CAR的胞外区,用于结合特异性靶抗原,包括蛋白质、碳水化合物和糖脂。在一些实施方案中,ASTR包含抗体,特别是单链抗体或其片段。ASTR可以包含全长重链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段、二价单链抗体或双抗体,其中每一个对靶抗原是特异性的。

[0144] ASTR还可以包含另一个蛋白功能结构域以识别和结合靶抗原。因为靶抗原可以具有其他生物学功能,例如作为受体或配体,ASTR可以备选地包含用于与抗原特异性结合的功能结构域。具有功能结构域的蛋白质的一些实例包括连接的细胞因子(其导致具有细胞因子受体的细胞的识别)、亲和体、来自天然存在的受体的配体结合结构域、受体的可溶性蛋白质/肽配体,例如在肿瘤细胞上。事实上,如本领域技术人员将理解的,几乎任何能够以高亲和力结合给定抗原的分子都可用于ASTR。

[0145] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含至少两个靶向至少两种不同抗原或相同抗原上的两种表位的ASTR。在实施方案中,CAR包含三个或更多个靶向至少三种或更多种不同抗原或表位的ASTR。当在CAR中存在多个ASTR时,ASTR可以串联排列并且可以通过连接肽分开(图1)。

[0146] 在一个实施方案中,如果单独的V_H结构域足以赋予抗原特异性(“单结构域抗体”),则ASTR包含对靶抗原具有特异性并且具有V_H结构域、CH1结构域、铰链结构域以及CH2和CH3(Fc) Ig结构域的全长IgG重链。如果产生完全活性的ASTR需要V_H结构域和V_L结构域两者,则将含有V_H的CAR和全长λ轻链(IgL)引入相同的细胞毒性细胞中以产生活性ASTR。在另一个实施方案中,CAR的每个ASTR包含至少两个单链抗体可变片段(scFv),每个对不同的靶抗原具有特异性。已经开发了其中一个可变结构域(V_H或V_L)的C末端通过多肽接头连接到另一个可变结构域(分别为V_L或V_H)的N末端的scFv,而没有显著破坏抗原结合或结合的特异性(Chaudhary等人,“A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin(由抗Tac可变区和截短的白喉毒素组成的重组单链免疫毒素),”*Proc. Natl. Acad. Sci.*,第87卷,第9491页,1990;Bedzyk等人,“Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody(高亲和力抗荧光素单链抗体的免疫学表征和结构表征),”*J. Biol. Chem.*,第265卷,第18615页,1990)。这些scFv缺少存在于天然抗体的重链和轻链中的恒定区(Fc)。对至少两种不同抗原具有特异性的scFv串联排列。在一个实施方案中,细胞外间隔结构域可以连接在ASTR和跨膜结构域之间。

[0147] 在另一个实施方案中,scFv片段可以与重链的恒定结构域的全部或部分融合。在另一个实施方案中,CAR的ASTR包含二价单链可变片段(di-scFv、bi-scFv)。在包含di-scFv的CAR中,各自对抗原具有特异性的两个scFv连接在一起以形成具有两个V_H区和两个V_L区的单个肽链(Xiong等人,“Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding(肿瘤靶向抗MUC-1多聚体的开发:di-scFv未配对半胱氨酸位置对PEG化和肿瘤结合的影响),”*Protein Engineering Design and Selection*,19卷,359-367页,2006;Kufer等人,“A revival of bispecific antibodies(双特异性抗体的复活),”*Trends in Biotechnology*,第22卷,第238-244页,2004)。

[0148] 在另一个实施方案中,ASTR包含双抗体。在双抗体中,scFv产生时使用这样的接头肽:接头肽太短以至于两个可变区不能折叠在一起,使得scFv二聚化。更短的接头(一个或两个氨基酸)导致形成三聚体,即所谓的三抗体。四抗体也可用于ASTR。

[0149] 当CAR中存在两个或更多个ASTR时,ASTR在单个多肽链上通过寡肽或多肽接头、Fc铰链或膜铰链区彼此共价连接。

[0150] CAR靶向的抗原存在于靶向除去的组织(例如肿瘤、腺体(例如前列腺)增生、疣和不想要的脂肪组织)中的细胞表面或内部。虽然CAR的ASTR更加高效地识别和结合表面抗原,但CAR也可靶向细胞内抗原。在一些实施方案中,靶抗原优选对癌症、炎症性疾病、神经元疾病、糖尿病、心血管疾病或传染病具有特异性。靶抗原的实例包括被各种免疫细胞、癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤、母细胞瘤和与各种血液病、自身免疫疾病和/或炎症性疾病相关的细胞表达的抗原。

[0151] ASTR靶向的癌症特异性抗原包括4-IBB、5T4、腺癌抗原、甲胎蛋白、BAFF、B-淋巴瘤细胞、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9 (CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受体)、CD28、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白外结构域B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人分散因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、LI-CM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因子I受体、整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、N-羟乙酰神经氨酸、NPC-1C、PDGF-R α 、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、腱生蛋白C、TGF- $\beta 2$ 、TGF- β 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2或波形蛋白中的一个或多个。

[0152] ASTR靶向的炎症疾病特异性抗原包括A0C3 (VAP-1)、CAM-3001、CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子-1)、CD125、CD147 (基础免疫球蛋白)、CD154 (CD40L)、CD2、CD20、CD23 (IgE受体)、CD25 (IL-2受体的链)、CD3、CD4、CD5、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc区、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受体、整联蛋白 $\alpha 4$ 、整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 、美洲驼 (Lama glama)、LFA-1 (CD11a)、MEDI-528、肌肉生长抑制素、OX-40、rhuMAb $\beta 7$ 、壳硬蛋白 (scleroscin)、SOST、TGF $\beta 1$ 、TNF- α 或VEGF-A中的一个或多个。

[0153] 本发明ASTR靶向的神经元疾病特异性抗原包括 β 淀粉样蛋白或MABT5102A中的一种或多种。本发明ASTR靶向的糖尿病特异性抗原包括L-IB或CD3中的一种或多种。本发明ASTR靶向的心血管疾病特异性抗原包括C5、心肌肌球蛋白、CD41 (整联蛋白 $\alpha 11b$)、纤维蛋白II、 β 链、ITGB2 (CD18) 和鞘氨醇-1-磷酸酯中的一种或多种。

[0154] 本发明ASTR靶向的感染病特异性抗原包括炭疽毒素、CCR5、CD4、聚集因子A、巨细胞病毒、巨细胞病毒糖蛋白B、内毒素、大肠杆菌、乙型肝炎表面抗原、乙型肝炎病毒、HIV-1、Hsp90、甲型流感血凝素、脂磷壁酸、铜绿假单胞菌、狂犬病病毒糖蛋白、呼吸道合胞病毒和TNF- α 中的一种或多种。

[0155] 靶抗原的其它实例包括在癌细胞上发现的特异性或扩增形式的表面蛋白，例如，B细胞淋巴瘤的IL-14受体、CD19、CD20和CD40，多种癌的Lewis Y和CEA抗原，乳腺癌和结肠直肠癌的Tag72抗原，肺癌的EGF-R，叶酸结合蛋白和通常在人乳腺癌和卵巢癌中扩增的HER-2蛋白；或病毒蛋白，例如HIV的gp120和gp41包膜蛋白、来自乙型和丙型肝炎病毒的包膜蛋白、来自人巨细胞病毒的糖蛋白B和其他包膜糖蛋白、以及来自癌病毒如卡波西肉瘤相关的疱疹病毒的包膜蛋白。其它潜在的靶抗原包括CD4，其中配体为HIV gp120包膜糖蛋白；和其它病毒受体，例如为人鼻病毒的受体的ICAM，以及脊髓灰质炎病毒的相关受体分子。

[0156] 在另一个实施方案中，CAR可靶向与癌症治疗细胞 (例如NK细胞和本文提及的其它细胞) 接合 (engage) 的抗原，以通过充当免疫效应细胞来活化癌症治疗细胞。这种情况的一个实例为靶向CD16A抗原以使NK细胞与表达CD30的恶性肿瘤斗争的CAR。双特异性、四价AFM13抗体是可以递送该效应的抗体的实例。这种类型的实施方案的进一步细节可以在例如以下文献中找到：Rothe, A., 等人, "A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma," Blood, 第125卷, 第26期, 4024-4031页, 2015。

[0157] CAR的胞外间隔结构域是位于ASTR和跨膜结构域之间的亲水区。在一些实施方案

中,该结构域有利于CAR的适当蛋白折叠。胞外间隔结构域是CAR的任选组分。胞外间隔结构域可以包含选自抗体的Fc片段、抗体的铰链区、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工间隔序列或其组合的结构域。胞外间隔结构域的实例包括CD8a铰链、由可以小至三个甘氨酸(Gly)的多肽组成的人工间隔区以及IgG(例如人IgG4)的CH1和CH3结构域。

[0158] CAR的跨膜结构域是能够跨越细胞毒性细胞的质膜的区域。跨膜结构域选自跨膜蛋白的跨膜区,例如I型跨膜蛋白、人工疏水序列或其组合。跨膜结构域的实例包括T细胞受体、CD8、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的 α 链、 β 链或 ζ 链的跨膜区域。合成的跨膜结构域可以包含苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度为2至10个氨基酸)可形成CAR的跨膜结构域和胞内信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸二联体在跨膜结构域和胞内信号传导结构域之间提供特别合适的接头。

[0159] 本发明的CAR还包含胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域转导效应子功能信号并指导细胞毒性细胞进行其专门功能,即损害和/或破坏靶细胞。胞内信号传导结构域的实例包括T细胞受体复合物的 ζ 链或其任何同源物,例如 η 链、Fc ϵ R1 γ 和 β 链、MB1(Ig α)链、B29(Ig)链等、人CD3 ζ 链、CD3多肽(δ 、 δ 和 ϵ)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和参与T细胞转导的其他分子,例如CD2、CD5和CD28。具体地,胞内信号传导结构域可以为CD3 ζ 链、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受体的胞质尾区、携带基于免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的细胞质受体及其组合。

[0160] 在CAR中使用的胞内信号传导结构域可以包括几种类型的各种其它免疫信号传导受体的胞内信号传导结构域,包括但不限于第一、第二和第三代T细胞信号传导蛋白,包括CD3受体、B7家族共刺激受体和肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族受体(Park等人,“Are all chimeric antigen receptors created equal?”J Clin Oncol.,第33卷,第651-653页,2015)。另外,胞内信号传导结构域包括NK和NKT细胞所使用的信号传导结构域(Hermanson,等人,“Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity,”Front Immunol.,第6卷,第195页,2015),例如NKp30(B7-H6)(Zhang等人,“An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy in vivo,”J Immunol.,第189卷,第2290-2299页,2012)和DAP12(Topfer等人,“DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy,”J Immunol.,第194卷,第3201-3212页,2015)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10和CD3 ζ 的信号传导结构域。另外,胞内信号传导结构域还包括人免疫球蛋白受体的信号传导结构域,其包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),例如Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、FcRL5(Gillis等人,“Contribution of Human Fc γ Rs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies,”Front Immunol.,第5卷,第254页,2014)。

[0161] 在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞质信号传导结构域。特别优选的是,CAR中的胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。

[0162] 本发明的CAR可以包含共刺激结构域,其具有增强细胞增殖、细胞存活和针对表达CAR的细胞毒性细胞的记忆细胞形成的功能。本发明的CAR可以包含一个或多个共刺激结构

域,其选自TNFR超家族中的蛋白、CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD7、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、PD-1、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS LIGHT、NKG2C、B7-H3或其组合中的共刺激结构域。如果CAR包含多于一个共刺激结构域,则这些结构域可以串联布置,任选地通过接头分开。共刺激结构域是可位于CAR中的跨膜结构域和胞内信号传导结构域之间的细胞内结构域。

[0163] 在一些实施方案中,本发明的CAR的两个或更多个组分通过一个或多个接头分开。例如,在包含至少两个ASTR的CAR中,两个ASTR可以通过接头分开。接头是长度为约1至100个氨基酸的寡肽或多肽区。在一些实施方案中,接头的长度可以是例如5-12个氨基酸,5-15个氨基酸或5至20个氨基酸。接头可以由柔性残基如甘氨酸和丝氨酸组成,使得相邻的蛋白结构域相对于彼此自由移动。更长的接头,例如比100个氨基酸更长的接头,可以与本发明的替代实施方式结合使用,并且可以选择这样的接头以例如确保两个相邻结构域不会彼此空间干扰。可用于本发明的接头的实例包括但不限于2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等同物。

[0164] 具有条件活性的抗原特异性靶向区

[0165] CAR为通过将上述所有不同结构域融合在一起以形成融合蛋白而产生的嵌合蛋白。CAR通常由包含编码CAR的不同结构域的多核苷酸序列的表达载体产生。能够识别并结合靶细胞上的抗原的本发明的ASTR具有条件活性。具体地,与相应野生型蛋白的ASTR相比,本发明的ASTR在正常生理条件下与靶抗原结合的活性较小或无活性,并且在异常条件下具有与靶抗原结合的活性。本发明提供了从野生型蛋白或其结合结构域(野生型ASTR)产生条件活性ASTR的方法。

[0166] 适合全部或部分地用于至少靶抗原的结合结构域(作为本发明中的ASTR)的野生型蛋白可以通过产生蛋白文库并筛选文库以获得具有所需的对靶抗原的结合亲和力的蛋白而发现。野生型蛋白可以通过筛选cDNA文库发现。cDNA文库是插入宿主细胞集合中的克隆的cDNA(互补DNA)片段的组合,其一起构成生物体的转录组的一部分。cDNA由完全转录的mRNA产生,因此含有生物的表达蛋白的编码序列。cDNA文库中的信息是一个强大且有用的工具,该工具用于通过筛选文库以获得具有所需的对靶抗原的结合亲和力的蛋白来发现具有所需性质的蛋白。

[0167] 在一些实施方案中,野生型蛋白为抗体,可以通过产生和筛选抗体文库来发现野生型抗体。抗体文库可以是多克隆抗体文库或单克隆抗体文库。针对靶抗原的多克隆抗体文库可以通过将抗原直接注射到动物中或通过将抗原施用于非人动物来产生。如此获得的抗体代表与抗原结合的多克隆抗体文库。对于单克隆抗体文库的制备,可以使用提供由连续细胞系培养产生的抗体的任何技术。实例包括杂交瘤技术、三源杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和EBV杂交瘤技术(参见例如Cole(1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。所述用于产生单链抗体的技术(参见例如美国专利号4,946,778)可适于产生单链抗体文库。

[0168] 还存在其他用于生成和筛选抗体文库用于发现野生型抗体的方法。例如,可以利用全人抗体展示文库。这样的文库是展示在宿主细胞表面上的抗体群。优选地,抗体文库代表人抗体所有组成成分,它们具有广泛的结合大范围抗原的能力。因为抗体在细胞表面展示,所以文库中每种抗体的有效亲和力(由抗体亲抗原性引起)增加。不同于其它流行文库

类型(例如噬菌体展示文库,其中不太需要用于筛选和鉴定目的的抗体亲抗原性),在本发明中需要通过细胞表面展示提供极好的抗体亲抗原性。细胞表面展示文库使得能够鉴定具有低、中和和高结合亲和力的抗体,以及在筛选或选择步骤中鉴定非免疫原性弱表位。

[0169] 由亲本分子产生演变分子

[0170] 野生型蛋白或其结合结构域(野生型ASTR)经历诱变过程以产生突变多肽群,然后对突变多肽群进行筛选以鉴定具有以下性质的突变ASTR:在异常条件下与野生型ASTR相比与靶抗原的结合亲和力增强,以及任选地,在正常生理条件下与野生型ASTR相比与靶抗原的结合亲和力基本相同或降低。

[0171] 任何化学合成方法或重组诱变方法可用于产生突变多肽群。除非另有说明,实践本发明可以使用在本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术。这样的技术在文献中得到了充分解释。参见,例如,Molecular Cloning A Laboratory Manual (分子克隆A实验室手册),2nd Ed.,主编 Sambrook,Fritsch和Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989);DNA Cloning (DNA克隆),第I卷和第II卷(D.N.Glover ed.,1985);Oligonucleotide Synthesis (寡核苷酸合成)(M.J.Gait ed.,1984);Mullis等人美国专利号4,683,195;Nucleic Acid Hybridization (核酸杂交)(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984);Transcription And Translation (转录和转译)(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984);Culture Of Animal Cells (动物细胞培养)(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes (固定的细胞和酶)(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning (分子克隆的实践指南)(1984);the treatise,Methods In Enzymology (专著-酶学中的方法)(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (哺乳动物细胞的基因转移载体)(J.H.Miller和M.P.Cabs eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Methods In Enzymology (酶学中的方法),第154和第155卷(Wu等人eds.),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (细胞和分子生物学中的免疫化学方法)(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology (试验免疫学手册),第1-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell,eds.,1986);Manipulating the Mouse Embryo (小鼠胚胎操作),(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)。

[0172] 本发明提供生产编码条件活性突变多肽的核酸突变体的方法,该方法包括:修饰核酸,通过(i)将一个或多个核苷酸替换成不同的核苷酸,其中所述核苷酸包括自然的或非自然的核苷酸,(ii)缺失一个或多个核苷酸,(iii)添加一个或多个核苷酸,或(iv)它们的任意组合。在一个方面,非自然的核苷酸包括肌苷。在另一个方面,该方法进一步包括检测由修饰的核酸编码的多肽的改变的酶活性,以确定该编码具有改变的酶活性的修饰的核酸。在一个方面,修饰的步骤(a)由PCR、易错PCR、改组、寡核苷酸定向诱变、装配PCR、有性PCR诱变、体内诱变、盒式诱变、循环总体诱变、指数总体诱变、位点特异性诱变、基因再组装、基因位点饱和诱变、连接酶链式反应、体外诱变、连接酶链式反应、寡核苷酸合成、任何生成DNA的技术和它们的任意组合构成。在另一个方面,该方法进一步包括至少一个修饰步骤的重复。

[0173] 本发明进一步提供一种从两个或两个以上的核酸生成多核苷酸的方法,该方法包

括：(a) 确定两个或两个以上的核酸之间的相同部分和不同部分，其中至少一个核酸包括本发明的核酸；(b) 提供一组与两个或两个以上核酸中的至少两个序列相关的寡核苷酸；以及(c) 用聚合酶延伸该寡核苷酸，由此生成多核苷酸。

[0174] 任何诱变技术可用于本发明的各种实施方案中。随机的 (Stochastic) 或随机 (random) 诱变例举亲本分子突变 (修饰的或改变的) 情形，产生一组具有预先不确定突变的后代分子。因而，在体外随机诱变反应中，例如没有意向中产量的具体预定的产物；有关获得的突变的确切性质，还有有关生成的产物是不确定的，因此是随机的。随机诱变出现于例如易错PCR和随机改组的方法中，其中获得的突变是随机的和预先不确定的。变体形式可由易错转录如易错PCR产生，或使用缺少纠错功能的聚合酶 (见Liao (1990) Gene 88:107-111)，第一变体形式，或通过在致突变菌株 (mutator strain) (致突变宿主细胞将在下面作进一步详细讨论，其通常是众所周知) 中复制该第一变体形式。致突变菌株可包括在任何错配修复功能受损的生物体中的任何突变。这些突变包括mutS、mutT、mutH、mutL、ovrD、dcm、vsr、umuC、umuD、sbcB、recJ等的突变基因产物。损伤是通过加入试剂，如小化合物或表达的反义RNA或其它技术产生的基因突变、等位基因置换、选择性抑制而获得的。损伤可以是基因的损伤，或任何生物体同源基因的损伤。

[0175] 其他诱变方法包括寡核苷酸定向诱变技术、易错聚合酶链式反应 (易错PCR) 和盒式诱变，其中亲本多核苷酸的特定区域被合成诱变的寡核苷酸替代。在这些情况下，在亲本序列中的某些位点周围产生许多突变位点。

[0176] 在寡核苷酸定向诱变中，短序列被合成的诱变寡核苷酸替换。在寡核苷酸定向诱变中，使用限制性酶消化，从多核苷酸中去掉多核苷酸的短序列，且其被合成的其中多个碱基相对于起始序列发生变化的多核苷酸替换。多核苷酸序列也可以通过化学诱变改变。化学诱变剂包括，例如，亚硫酸氢钠、亚硝酸、羟胺、肼或甲酸。核苷酸前体的类似物的其它试剂包括亚硝基胍、5-溴尿嘧啶、2-氨基嘌呤或吡啶。一般来说，这些试剂被添加到PCR反应中替换核苷酸前体，从而使序列突变。也可使用插入剂如普罗黄素、吡啶黄、奎纳克林等。多核苷酸序列的随机突变也可通过X射线或紫外线照射获得。一般来说，如此诱变的质粒多核苷酸被引入大肠杆菌中并作为杂种质粒的池 (pool) 或文库扩繁。

[0177] 易错PCR使用低精确度 (low-fidelity) 聚合作用条件在长序列上引入低水平的随机点突变。在未知序列的片段的混合物中，可使用易错PCR诱变该混合物。

[0178] 在盒式诱变中，单模板的序列块通常由 (部分) 随机序列替换。Reidhaar-Olson J F和Sauer R T: 作为蛋白序列信息内容探针的组合盒式诱变 (Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences); Science 241 (4861):53-57, 1988。

[0179] 可选地，任何非随机的 (non-stochastic) 或非随机 (non-random) 诱变技术可用于本发明的各种实施方案中。非随机诱变的示例情况为如亲本分子被突变 (被修饰或改变)，从而产生具有一个或多个预定突变的后代分子。可以理解，现实是在许多发生分子加工的反应中存在一定量的背景产物，这些背景产物的存在不影响具有预定产物的诱变方法的非随机性质。定点饱和诱变和合成连接重组是目标产物确切化学结构预定的诱变技术的实例。

[0180] 一种定点饱和突变的方法公开于美国专利申请公开第2009/0130718号，通过参考

并入于此。该方法提供了与模板多核苷酸的密码子对应的一套简并引物,进行聚合酶延伸产生包含对应于该简并引物的序列的多核苷酸后代。可表达和筛选该多核苷酸后代以用于定向演变。具体来说,这是产生一组后代多核苷酸的方法,包括步骤(a)提供模板多核苷酸拷贝,各含有大量编码模板多肽序列的密码子;以及(b)对各模板多核苷酸的密码子进行如下步骤:(1)提供一套简并引物,其中各引物含有与模板多核苷酸的密码子对应的简并密码子和至少一个与模板多核苷酸密码子的毗邻序列同源的毗邻序列;(2)提供条件使引物与模板多核苷酸的拷贝退火结合;以及(3)从引物开始沿着模板进行聚合酶延伸反应;由此产生多核苷酸后代,各多核苷酸后代含有与退火引物的简并密码子对应的序列;由此生成一组多核苷酸后代。定点饱和诱变涉及核酸的定向演变和筛选含有演变的核酸的克隆以获得目标结合活性。

[0181] 定点饱和诱变一般涉及方法1)制备分子后代(包括由多核苷酸序列组成的分子,由多肽序列组成的分子,以及由部分多核苷酸序列和部分多肽序列组成的分子),从一个或多个祖先或亲代模板,诱变以获得至少一个点突变、添加、缺失和/或嵌合;2)筛选后代分子-优选采用高通量法-以获得所需的对靶抗原的结合亲和性;3)任选地获得和/或编目结构和/或与亲代和/或后代分子有关的功能性信息;以及4)任选地重复步骤1)-步骤3)的任何步骤。

[0182] 在定点饱和诱变中,产生(例如从亲代多核苷酸模板)称为“密码子定点饱和诱变”的多核苷酸后代,各多核苷酸后代含有一套至少多达三个连续的点突变(即含有新密码子的不同碱基),从而每个密码子(或每个编码相同氨基酸的简并密码子家族)在每个密码子位置被代表。对应于和由该多核苷酸后代编码,也产生一套多肽后代,各自具有至少一个单独的氨基酸点突变。在一个优选的方面,产生所称的“氨基酸定点饱和诱变”,一种突变的多肽,各19个自然编码的多肽,沿着该多肽在每个氨基酸位置上形成 α -氨基酸替换。如果其它氨基酸被用于替代或加入到20个自然编码的氨基酸中,这产生了(在沿着亲代多肽的每个氨基酸位置上)总计20个不同的多肽后代,其包括原始的氨基酸或潜在的 ≥ 21 个不同的多肽后代。

[0183] 也可采用其它诱变技术,包括重组和更具体的通过含有部分同源区的多核苷酸序列的体内重排的方法来制备编码多肽的多核苷酸的方法,重组该多核苷酸以生成至少一个多核苷酸,并筛选该多核苷酸以产生具有有用属性的多肽。

[0184] 另一个方面,诱变技术利用细胞的自然属性,以重组分子和/或介导降低序列复杂性和重复或连续的具有同源区的序列范围的还原过程。

[0185] 各种诱变技术,可单独使用或组合使用,提供制备编码生物活性的杂种多肽的杂种多核苷酸的方法。在实现这些和其它目标中,按照本发明的一个方面,提供了向合适的宿主细胞中引入多核苷酸并使该宿主细胞在产生杂种多肽的条件下生长的方法。

[0186] 通过使用由限制性酶产生的相容粘末端连接2个多核苷酸片段生成嵌合基因,其中各片段来自单独的祖先(或亲代)分子。另一个实例是亲代多核苷酸的单一密码子位置的诱变(即获得密码子替换、添加或缺失),以产生编码单位点诱变的多肽的单一多核苷酸后代。

[0187] 此外,已采用体内位点特异性重组系统产生基因杂种,以及体内重组中的随机方法,和同源的但在质粒中截短的基因之间的重组。也有报道通过重叠延伸和PCR产生诱变。

[0188] 非随机的方法已被用来获得大量的点突变和/或嵌合(chimerization),例如全面或详尽的方法已被用来在特定的突变组中产生所有分子,功能归于模板分子中的特定结构群(例如特定的单一氨基酸位置或由两个或两个以上氨基酸位置构成的序列),用以分类和比较特定的突变组。

[0189] 这些或其它演变方法中的任一种方法可用于本发明中,从野生型蛋白产生新的突变多肽群(文库)。

[0190] 演化分子的表达

[0191] 从演变步骤产生的突变多核苷酸可以根据公开的方案在琼脂糖凝胶上进行大小分级或可以不进行该步骤,插入表达载体中,并转染到合适的宿主细胞中以产生突变多肽(表达)。该表达可以使用常规分子生物学技术。因此,表达步骤可以使用各种已知的方法。

[0192] 例如,简单地说,随后采用标准的分子生物技术来消化演变步骤中产生的突变多核苷酸并连接至表达载体,如质粒DNA。然后采用标准方法(protocol)将载体转化至细菌或其它细胞中。可在多孔板,如96-孔板的单个孔中进行高通量表达和筛选。重复该方法获得各突变多核苷酸。

[0193] 将所述筛选和分离的多核苷酸引入合适的宿主细胞内。合适的宿主细胞是任何能够促进重组和/或还原重组的细胞。筛得的多核苷酸优选已存在于载体中,该载体包括适当的调控序列。宿主细胞可以是高等的真核细胞如哺乳动物细胞,或低等的真核细胞如酵母细胞,或优选地,宿主细胞可以是原核细胞如细菌细胞。将构建体引入宿主细胞内可以是磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导转染或电穿孔(例如Ecker和Davis,1986,通过表达反义RNA抑制基因在植物细胞中的表达(Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA),Proc Natl Acad Sci USA,83:5372-5376)。

[0194] 作为有代表性的实例,可使用的表达载体,可提及的是病毒颗粒、杆状病毒、噬菌体、质粒、噬菌粒、粘粒、养粒(fosmids)、细菌人工染色体、病毒DNA(如牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病和SV40的衍生物)、基于P1的人工染色体、酵母质粒、酵母人工染色体和其它任何特定的目的宿主(如芽孢杆菌、黑曲霉和酵母菌)。因而,例如,DNA可包括于任一种用于表达多肽的表达载体中。这种载体包括染色体的、非染色体的和人工合成的DNA序列。大量合适的载体是本领域众所周知的且可市售获得。以下载体通过举例的方式提供;细菌:pQE载体(Qiagen)、pBluescript质粒、pNH载体、 λ -ZAP载体(Stratagene);ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia);真核:pXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、PMSG、pSVLSV40(Pharmacia)。然而,可使用任何其它质粒或其它载体,只要它们是在宿主中可复制且存活的。本发明中可采用低拷贝量或高拷贝量载体。

[0195] 表达载体中的突变多核苷酸序列可操作地连接至适当的表达调控序列(启动子)来指导RNA的合成。特殊命名的细菌启动子包括lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ PR、PL和trp。真核启动子包括CMV早期(immediate early)、HSV胸苷激酶、早期和晚期SV40、来自逆转录病毒的LTR和小鼠金属硫蛋白-1。合适的载体和启动子的选择是本领域的普通技术水平。表达载体还含有用于翻译起始和转录终止的核糖体结合位点。载体还包括适当的用于扩增表达的序列。用氯霉素转移酶(CAT)载体或其它具有筛选标记的载体,可以从任何目标基因中筛选出启动子区。此外,优选表达载体含有一个或多个选择标记基因,以提供用于筛选转化的宿主细胞的表型性状,如用于真核细胞培养物的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,或如在大肠

杆菌中的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0196] 可以通过将增强子序列插入表达载体中来增加真核DNA转录。增强子是通过启动子增强转录的10-300bp的顺式作用序列。当在转录单元的5'或3'方向时,增强子可以有效地增强转录。如果位于内含子内或编码序列本身内,增强子也是有效的。通常使用病毒增强子,包括SV40增强子、巨细胞病毒增强子、多瘤增强子和腺病毒增强子。来自哺乳动物系统的增强子序列也是常用的,例如小鼠免疫球蛋白重链增强子。

[0197] 哺乳动物表达载体系统通常还包括选择性标记基因。合适的标记的实例包括二氢叶酸还原酶基因(DHFR)、胸苷激酶基因(TK)或赋予药物抗性的原核基因。前两个标记基因优选使用在不向生长培养基中加入胸苷的情况下缺乏生长能力的突变细胞系。然后通过转化的细胞在非补充培养基上生长的能力鉴定转化的细胞。用作标记的原核药物抗性基因的实例包括赋予对G418、霉酚酸和潮霉素的抗性的基因。

[0198] 根据细胞生产宿主的类型,可以通过公知的方法将含有目的DNA区段的表达载体转移到宿主细胞中。例如,氯化钙转染通常用于原核宿主细胞,而磷酸钙处理、脂质转染或电穿孔可用于真核宿主细胞。用于转化哺乳动物细胞生产宿主的其它方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射(一般参见Sambrook等人,同上)。

[0199] 一旦表达载体已被引入合适的宿主,则将宿主保持在适于高水平表达引入的突变多核苷酸序列的条件下以产生突变多肽。这些表达载体通常在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体DNA的组成部分可复制。通常,表达载体将含有选择标记,例如四环素或新霉素,以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞(参见例如美国专利号4,704,362,其通过引用并入本文)。

[0200] 因此,在本发明的另一个方面,可通过还原重组的方法产生突变多核苷酸。该方法包括制备含有连续序列(原始编码序列)的构建体,将它们插入合适的载体,随后将它们引入到合适的宿主细胞中。通过在具有同源区的构建体中的连续序列之间或在准重复单元之间的组合方法产生单独分子识别(molecular identity)的重排。重排方法重组和/或降低了重复序列的复杂性和规模,并产生了新的分子。可采用各种处理来增强重组率。这些可能包括使用紫外光或破坏DNA的化学品和/或使用显示更高水平的“遗传不稳定”的宿主细胞。因而,重组方法可包括同源重组或指导自身演变的准重复序列的自然属性。

[0201] 然后扩繁细胞和进行“还原重组”。如果需要,可通过引入DNA损伤来刺激还原重组率。体内重组集中于“分子间”的方法统称为“重组”,其在细菌中一般被视为“RecA-依赖”现象。本发明依靠宿主细胞的重组来重组和重排序列,或依靠细胞的能力来介导还原过程,以通过缺失降低细胞中准重复序列的复杂性。这种“还原重组”过程通过“分子内”,RecA-非依赖的方法发生。最终的结果是分子重组至所有可能的组合中。

[0202] 在一个方面,宿主生物体或细胞包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌或真核有机体。在本发明的另一个方面,革兰氏阴性菌包括大肠杆菌或荧光假单胞菌。在本发明的另一个方面,革兰氏阳性菌包括*Streptomyces diversa*、格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、乳脂链球菌(*Lactococcus cremoris*)或枯草芽孢杆菌。在本发明的另一个方面,真核有机体包括酿酒酵母、裂殖酵母、毕赤酵母、乳酸克鲁维酵母、汉逊酵母或黑曲霉(*Aspergillus niger*)。作为合适宿主的有代表性的实例,可提及的是:细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌;真菌细胞,如酵母;昆虫细胞,如果蝇

S2和夜蛾Sf9;动物细胞如CHO、COS或人黑色素瘤(Bowes melanoma);腺病毒和植物细胞。选择合适的宿主被认为属于本领域熟练技术人员教导的范围。

[0203] 除了真核微生物例如酵母外,哺乳动物组织细胞培养物也可用于表达本发明的突变多肽(参见Winnacker,“From Genes to Clones(从基因到克隆),”VCH Publishers, N.Y.,N.Y.(1987),其通过引用并入本文)。真核细胞是优选的,因为本领域已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适的宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、B细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子、增强子(Queen等人,Immunol.Rev.,第89卷,第49页,1986)和必要的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是来源于免疫球蛋白基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。

[0204] 在一个实施方案中,真核宿主细胞选自CHO、HEK293、IM9、DS-1、THP-1、Hep G2、COS、NIH 3T3、C33a、A549、A375、SK-MEL-28、DU 145、PC-3、HCT 116、Mia PACA-2、ACHN、Jurkat、MM1、Ovar 3、HT 1080、Panc-1、U266、769P、BT-474、Caco-2、HCC 1954、MDA-MB-468、LnCAP、NRK-49F和SP2/0细胞系;和小鼠脾细胞以及兔PBMC。在一个方面,哺乳动物宿主细胞选自CHO或HEK293细胞系。在一个具体方面,哺乳动物宿主细胞为CHO-S细胞系。在另一个具体方面,哺乳动物系统为HEK293细胞系。在另一个实施方案中,真核细胞宿主为酵母细胞系统。在一个方面,真核宿主选自酿酒酵母细胞或毕赤酵母细胞。

[0205] 在另一个实施方案中,哺乳动物宿主细胞可以由合同研究或定制制造组织在商业上创建。例如,对于重组抗体或其他蛋白,Lonza(龙沙基团有限公司,巴塞尔,瑞士)可采用GS基因表达系统™技术用CHOK1SV或NS0细胞生产宿主产生表达这些产物的载体。含有目标多核苷酸的宿主细胞可以在经过修饰的适合于激活启动子、筛选转化子或扩增基因的常规营养培养基中培养。培养条件,如温度、pH等,是以前所用的筛选宿主细胞表达的条件,这对本领域熟练的技术人员而言是明显的。

[0206] 如上所述,条件活性ASTR的表达优化可以通过所使用的载体(载体组分,例如启动子、剪接位点、5'和3'末端和侧翼序列)的优化、宿主细胞的基因修饰以减少基因缺失和重排、通过体内或体外演变相关基因的方法进行的宿主细胞基因活性的演变、通过相关基因的演变进行的宿主糖基化酶的优化,和/或通过染色体水平上的宿主细胞诱变和选择策略选择具有增强的表达能力的细胞来实现。

[0207] 蛋白表达可通过各种已知的方法诱导,许多遗传系统已被公开用来诱导蛋白表达。例如,使用合适的系统,添加诱导剂可诱导蛋白表达。然后离心沉淀细胞,弃上清液。将细胞与DNA酶、RNA酶和溶菌酶孵育,富集周质蛋白。离心后,将含有新蛋白的上清液转移至新的多孔板中,检测前贮存。

[0208] 一般通过离心收集细胞,通过物理或化学方法破坏细胞,所得的粗提物用于进一步纯化。用于表达蛋白的微生物细胞可通过任何方便的方法破坏,包括冻融循环、超声,机械破碎或细胞裂解液的使用。此类方法是本领域熟练的技术人员所熟知的。采用包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水层析、亲和层析、羟基磷灰石色谱和凝集素层析的方法,可从重组细胞培养物中回收和纯化表达的多肽或其片段。必要时可使用蛋白复性的步骤,来完成多肽的构型。如果需要,可采用高效液相色谱法(HPLC)作为最后的纯化步骤。条件活性ASTR的筛选可通过使用方便的高通量筛选或选择

的方法来辅助实现。可以使用细胞表面展示表达和筛选技术(例如,如上所定义的)来筛选突变蛋白以获得条件活性ASTR。

[0209] 筛选突变体以确定可逆或不可逆突变

[0210] 确定目标分子主要是通过通过在允许的条件和野生型条件下测定蛋白活性来直接实现的。然后可筛选出活性比(允许/野生型)最大的突变体并采用标准方法通过单个突变的组合生成点突变的排列(permutation)。然后筛选该组合的排列蛋白文库得到在允许和野生型条件之间显示出最大活性差异的蛋白。

[0211] 可采用多种方法筛选上清液的活性,例如采用高通量活性测定,如荧光检测,鉴定出对想要的特征(温度、pH等)敏感的蛋白突变体。例如,筛选温度敏感的突变体,使用市售底物,在较低温度(如25℃)和原始蛋白功能的温度(如37℃)下测定各突变体的酶活性或抗体活性。筛选可以在多种培养基中进行,例如血清和BSA等。反应最初可以是多孔检测的形式,如96-孔检测,采用不同的形式,如14ml管的形式进行验证。

[0212] 在一个方面,该方法还包括在测定具有条件生物活性的候选多肽之前,修饰至少一种核酸或多肽。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:检测在宿主细胞或宿主生物体中多肽的增加表达。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约pH3-约pH12的pH范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约pH5-约pH10的pH范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约pH6-约pH8的pH范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在pH6.7和pH7.5下检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约4℃-约55℃的温度范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约15℃-约47℃的温度范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约20℃-约40℃的温度范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在约25℃-约37℃的温度范围内检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在正常渗透压和异常(正的或负的)渗透压的条件下检测酶活性。在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:在正常电解质浓度和异常(正的或负的)电解质浓度的条件下检测酶活性。受试电解质浓度选自钙、钠、钾、镁、氯、碳酸氢盐和磷酸盐浓度中的一种,在另一个方面,测定步骤(c)进一步包括:检测形成稳定反应产物的酶活性。

[0213] 在另一个方面,本发明提供特异结合本发明具有酶活性的多肽或其片段的纯化的抗体。在一个方面,本发明提供特异结合具有酶活性的多肽的抗体片段。

[0214] 抗体和基于抗体的筛选方法

[0215] 本发明提供特异结合本发明酶的分离的或重组抗体。这些抗体可用于分离、鉴定或定量本发明的酶或相关多肽。这些抗体可用于在本发明范围内分离其它多肽或其它相关的酶。所述抗体可被设计用来结合酶的活性位点。因而,本发明提供使用本发明的抗体抑制酶的方法。

[0216] 所述抗体可用于免疫沉淀、染色、免疫亲和柱等。如果需要,编码特定抗原的核酸序列的生成,可通过免疫后进行多肽或核酸的分离、扩增或克隆以及将多肽固定于本发明的阵列(array)。或者,本发明的方法可用于修饰由待修饰细胞产生的抗体的结构,例如,抗体的亲和力可增加或减少。而且,制备或修饰抗体的能力可为通过本发明的方法改造至细胞的表型。

[0217] 免疫方法、制备和分离抗体(多克隆的和单克隆的)的方法是本领域熟练的技术人

员已知的,并描述于科学和专利文献中,见例如Coligan,免疫学流行手册(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY),Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) 基础和临床免疫学(第7版)(BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY) (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. ("Stites"); Goding, 单克隆抗体:原理及操作(第2版)(MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE) (2d ed.) Academic Press, New York, N.Y. (1986); Kohler (1975) "分泌特异性抗体的融合细胞的连续培养物(Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity)", Nature 256:495; Harlow (1988) 抗体,实验室手册(ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL), Cold Spring Harbor Publications, New York. 除了传统在动物体内的方法以外,抗体也可在体外产生,例如使用重组抗体结合位点表达噬菌体展示库。见例如, Hoogenboom (1997) "生产高亲和力抗体的文库筛选策略的设计和优化(Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies)", Trends Biotechnol. 15:62-70; and Katz (1997) "通过噬菌体展示技术发现或改造的配体亲和力和特异性的结构和机械确定(Structural and mechanistic determinants of affinity and specificity of ligands discovered or engineered by phage display)", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45。

[0218] 多肽或肽可用于制备特异结合多肽,例如本发明酶的抗体。得到的抗体可用于免疫亲和色谱法以分离或纯化多肽或确定是否多肽存在于生物样本中。在该方法中,蛋白试剂,如提取物或生物样本与能够特异结合本发明的一种多肽的抗体接触。

[0219] 在免疫亲和法中,所述抗体附着在固体支持物,如珠或其它柱形基质上。所述蛋白试剂在抗体能够特异结合本发明的一种多肽的条件下与抗体接触。洗涤后去除非特异结合的蛋白,洗脱特异结合的多肽。

[0220] 生物样本中蛋白结合抗体的能力可采用任何一种本领域熟练的技术人员所熟悉的方法来确定。例如,结合可通过用可检测标记,如荧光剂、酶标物或放射性同位素标记抗体而确定。或者,抗体结合样本的能力可利用带有可检测标记的二级抗体来测定。特定的检测包括ELISA检测、双抗体夹心法、放射免疫分析和Western印迹。

[0221] 产生的作用于本发明多肽的多克隆抗体可通过向动物体内直接注射多肽或通过非人类的动物施用多肽而获得。然后获得的抗体结合多肽自身。在这种方式下,即使仅编码多肽片段的序列也可用于产生可结合于整个原生多肽的抗体。然后该抗体可用于从表达该多肽的细胞中分离多肽。

[0222] 为了制备单克隆抗体,可采用任何由连续细胞株培养产生抗体的技术。实例包括杂交瘤技术、单克隆抗体的制备,可使用提供由连续的细胞株培养产生的抗体的任何技术。实例包括杂交瘤技术,三体杂交瘤技术、人类B细胞杂交瘤技术和EB病毒杂交瘤技术(见例如, Cole (1985年), 单克隆抗体和癌症治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。

[0223] 所述用于生产单链抗体的技术(见例如,美国专利第4946778号)可适用于生产作用于本发明多肽的单链抗体。或者,可用转基因小鼠表达作用于这些多肽或其片段的人源化的抗体。产生的作用于本发明多肽的抗体可用于从其它生物体和样本中筛选类似的多肽(例如,酶)。在这些技术中,来自于生物体的多肽与抗体接触,检测到那些特异结合抗体的

多肽。任何以上描述的方法可用于检测抗体结合。

[0224] 筛选方法和“在线”检测装置

[0225] 在本发明方法的操作中,可使用多种仪器和方法用于本发明的多肽和核酸,例如,为了筛选具有酶活性的多肽,为了筛选作为潜在的调节剂,例如酶活性的激活剂或抑试剂的化合物,为了筛选结合本发明多肽的抗体,为了筛选与本发明核酸杂交的核酸,为了筛选表达本发明的多肽的细胞等。

[0226] 阵列或“生物芯片”

[0227] 本发明的核酸或多肽可以被固定于或应用到阵列上。阵列可用于筛选或监测组合物(例如,小分子、抗体、核酸等)文库,针对它们结合或调节本发明核酸或多肽的活性的能力。例如,在本发明的一个方面,监测的参数是酶基因的转录表达。细胞的一种或多种或所有转录物可通过含有细胞转录物,或细胞转录物的核酸代表或其互补核酸的样本的杂交来测定,通过与固定于阵列或“生物芯片”上的核酸杂交来测定。通过使用微芯片上的核酸“阵列”,一些或全部细胞转录物可同时被定量。或者,含有基因组核酸的阵列也可用于测定通过本发明方法新改造的细胞株的基因型。多肽“阵列”也可用于同时定量多种蛋白。本发明可利用任何已知的“阵列”,还被称作“微阵列”或“核酸阵列”或“多肽阵列”或“抗体阵列”或“生物芯片”或它们的变体来操作。一般地,阵列是大量的“点”或“靶元件”,各靶元件包括确定量的一种或多种生物分子,例如,寡核苷酸,固定于底物表面的特定区,用于特异结合样本分子,例如,mRNA转录物。

[0228] 在本发明方法的操作中,任何已知的阵列和/或制作和使用阵列的方法或它们的变体可全文或部分并入于此,描述于例如,美国专利号6277628、6277489、6261776、6258606、6054270、6048695、6045996、6022963、6013440、5965452、5959098、5856174、5830645、5770456、5632957、5556752、5143854、5807522、5800992、5744305、5700637、5556752、5434049;也见,例如,WO 99/51773、WO 99/09217、WO 97/46313、WO 96/17958;也见,例如,Johnston(1998)“基因芯片:了解基因调控的希望阵列(Gene chips:Array of hope for understanding gene regulation)”,Curr.Biol.8:R171-R174;Schummer(1997)“用于构建高密度核酸阵列的廉价手持装置(Inexpensive Handheld Device for the Construction of High-Density Nucleic Acid Arrays)”,Biotechniques 23:1087-1092;Kern(1997)“在高密度网格cDNA过滤检测中基因组大克隆插入的直接杂交(Direct hybridization of large-insert genomic clones on high-density gridded cDNA filter arrays)”,Biotechniques 23:120-124;Solinas-Toldo(1997)“用于基因组失衡筛查的生物芯片:基于基质的比较基因组杂交(Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization:Biochips to Screen for Genomic Imbalances)”,Genes,Chromosomes&Cancer 20:399-407;Bowtell(1999)“通过微阵列用于获得从起始到终止的表达数据的选择(Options Available--From Start to Finish--for Obtaining Expression Data by Microarray)”,Nature Genetics Supp.21:25-32。也见公开的美国专利申请号20010018642、20010019827、20010016322、20010014449、20010014448、20010012537、20010008765。

[0229] 毛细管阵列

[0230] 毛细管阵列,如GIGAMATRIX™ Diversa Corporation, San Diego, Calif可用于本

发明的方法中。本发明的核酸或多肽可固定于或应用阵列上,包括毛细管阵列。阵列可用于筛选或监测组合物(例如,小分子、抗体、核酸等)文库,针对它们结合或调节本发明核酸或多肽活性的能力。毛细管阵列提供另一个捕捉(holding)和筛选样本的系统。例如样本筛选装置可包括大量毛细管形成相邻的毛细血管阵列,其中各毛细管包括至少一个壁,其限定腔用于保留样本。所述装置可进一步包括置于阵列相邻的毛细管之间的间质材料,并在间质材料内形成一种或多种参考标记。用于筛选样本的毛细管,其中所述毛细管适合于结合在毛细管阵列中,可包括第一个壁,其限定的腔用于保留样本,以及第二壁,其由过滤材料形成,过滤激发能量提供给腔以激发样品。多肽或核酸,例如配体可被引入第一组件中到至少毛细管阵列的一个毛细管的一部分中。毛细管阵列的各毛细管可包括至少一个壁,其限定的腔用于保留第一组件。气泡可被引入在第一组件后面的毛细管中。第二组件可被引入毛细管中,其中第二组件通过气泡与第一组件分开。目标样本可作为用可检测粒子标记的第一液引入毛细管阵列的毛细管中,其中毛细管阵列的各毛细管包括至少一个壁,其限定的腔用于保留第一液和可检测粒子,其中至少一个壁包被有用于使可检测粒子结合到至少一个壁的结合物质。该方法可进一步包括从毛细管中去掉第一液,其中结合的可检测粒子保留在毛细管内,并向毛细管中引入第二液。所述毛细管阵列可包括许多含有至少一个限定腔的外壁的单个毛细管。毛细管外壁可以是一个或多个融合在一起的壁。同样地,所述壁可限定的腔是圆柱形、方形、六角形或任何其它几何形状,只要壁形成保留液体或样本的腔。毛细管阵列的毛细管可以靠近在一起,形成一个平面结构。毛细管可结合在一起,通过融合(例如,其中的毛细血管是由玻璃制成)、粘合、键合或侧壁-侧壁夹紧。毛细管阵列可由任何数量的单个毛细管组成,例如,范围从100到4,000,000的毛细管。毛细管阵列可由约100,000或更多单个毛细管结合在一起形成微滴度板。

[0231] 工程化条件活性抗体

[0232] 可以将条件活性抗体工程化以产生多特异性条件活性抗体。多特异性抗体可以是具有多表位特异性的抗体,如WO 2013/170168中所述,该文献通过引用整体并入本文。多特异性抗体包括但不限于包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的抗体,其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性;具有两个或更多个 V_L 和 V_H 结构域的抗体,其中每个 V_HV_L 单元结合不同的表位;具有两个或更多个单可变结构域的抗体,其中每个单可变结构域结合不同的表位;包含一个或多个抗体片段的抗体;以及包含已共价或非共价连接的抗体片段的抗体。

[0233] 为了构建包括双特异性抗体在内的多特异性抗体,获得了具有至少一个游离巯基的抗体片段。抗体片段可以从全长条件活性抗体获得。可以将条件活性抗体酶促消化以产生抗体片段。示例性酶消化方法包括但不限于胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和Lys-C。示例性抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、双抗体(Db);串联双抗体(taDb)、线性抗体(参见美国专利号5,641,870;Zapata等人,Protein Eng.,第8卷,第1057-1062页,(1995));单臂抗体、单可变结构域抗体、微抗体(Olafsen等人(2004)Protein Eng.Design&Sel.,第17卷,第315-323页)、单链抗体分子、Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗Id)抗体、互补决定区(CDR)和表位结合片段。抗体片段也可以使用DNA重组技术产生。编码抗体片段的DNA可以克隆到质粒表达载体或噬菌粒载体中并直接在大肠杆菌中表达。抗体酶消化方法、DNA克隆和重组蛋白表达方法是本领域技术人员熟知的。

[0234] 抗体片段可以使用常规技术纯化,并且可以进行还原以产生游离巯基。具有游离

硫醇基的抗体片段可以与交联剂例如双马来酰亚胺反应。这样的交联的抗体片段被纯化，然后与具有游离硫醇基团的第二抗体片段反应。将两个抗体片段交联的终产物纯化。在某些实施方案中，每个抗体片段为Fab，并且其中两个Fab通过双马来酰亚胺连接的最终产物在本文中被称为双马来酰亚胺-(硫-Fab)₂或双Fab。可利用此类多特异性抗体和抗体类似物(包括双Fab)快速合成大量抗体片段组合或天然抗体的结构变体或特定抗体/片段组合。

[0235] 多特异性抗体可以用改性交联剂合成，使得其他功能部分可以连接到多特异性抗体。改性交联剂允许任何巯基反应性部分的连接。在一个实施方案中，N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)连接到双马来酰亚胺以形成双马来酰亚胺基-乙酰基硫代乙酸酯(BMata)。在掩蔽的硫醇基去保护之后，具有巯基反应性部分的任何官能团可以连接到多特异性抗体。

[0236] 示例性的硫醇反应性试剂包括多功能接头试剂、捕获剂(即亲和性标记试剂，例如生物素-接头试剂)、检测标记(例如荧光团试剂)、固相固定试剂(例如SEPHAROSETM、聚苯乙烯或玻璃)或药物-接头中间体。硫醇反应性试剂的一个实例是N-乙基马来酰亚胺(NEM)。这种具有改性交联剂的多特异性抗体或抗体类似物可以进一步与药物部分试剂或其它标记物反应。多特异性抗体或抗体类似物与药物-接头中间体的反应分别提供多特异性抗体-药物缀合物或抗体类似物-药物缀合物。

[0237] 用于制备多特异性抗体的许多其它技术也可用于本发明中。描述这些技术的参考文献(通过引用并入本文)包括：(1) Milstein and Cuello, Nature, 第305卷, 第537页(1983), WO 93/08829, 和Traunecker等人, EMBO J., 第10卷, 第3655页(1991), 关于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达；(2) 美国专利号5,731,168, 关于杵臼工程化；(3) WO 2009/089004A1, 关于用于制备抗体Fc异源二聚体分子的工程化静电转向效应；(4) 美国专利号4,676,980, 和Brennan等人, Science, 第229卷, 第81页(1985), 关于交联两个或多个抗体或片段；(5) Kostelny等人, J. Immunol., 第148卷, 第1547-1553页(1992), 关于使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体；(6) Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第90卷, 第6444-6448页(1993), 关于使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段；(7) Gruber等人, J. Immunol., 第152卷, 第5368页(1994), 关于使用单链Fv(sFv)二聚体；(8) Tutt等人, J. Immunol. 147:60(1991), 关于制备三特异性抗体；和(9) US 2006/0025576A1和Wu等人, Nature Biotechnology, 第25卷, 第1290-1297页(2007), 关于具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体，包括“章鱼抗体”或“双可变结构域免疫球蛋白”(DVD)。

[0238] 本发明的多特异性抗体也可以按照WO/2011/109726中所述产生，该文献通过引用整体并入本文。

[0239] 在一个实施方案中，用于穿过血脑屏障(BBB)的条件活性抗体被工程化以制备多特异性抗体(例如双特异性抗体)。该多特异性抗体包含结合BBB-R的第一抗原结合位点和结合脑抗原的第二抗原结合位点。至少BBB-R的第一抗原结合位点是条件活性的。脑抗原是在脑中表达的抗原，其可以被抗体或小分子靶向。这种抗原的实例包括但不限于：β-分泌酶1(BACE1)、淀粉样蛋白β(Aβ)、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)、Tau、载脂蛋白E4(ApoE4)、α-突触核蛋白、CD20、亨廷顿蛋白、朊病毒蛋白(PrP)、富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)、帕金森蛋白、早老蛋白1、早老蛋白2、γ分泌酶、死亡受体6(DR6)、淀粉

样蛋白前体蛋白 (APP)、p75神经营养因子受体 (p75NTR) 和半胱天冬酶6。在一个实施方案中,抗原为BACE1。

[0240] BBB具有由BBB受体 (BBB-R) 介导的内源性转运系统, BBB受体 (BBB-R) 为允许大分子转运穿过BBB的特异性受体。例如, 使用内源性转运系统可以将结合BBB-R的抗体转运穿过BBB。这样的抗体可以用作通过使用穿过BBB的内源性BBB受体介导的转运系统将药物或其他药剂转运通过BBB的载体。这样的抗体不需要对BBB-R具有高亲和力。不是条件活性抗体但对BBB-R具有低亲和力的抗体已被描述为比高亲和力抗体更高效地穿过BBB, 如US2012/0171120 (通过引用并入本文) 中所述。

[0241] 用于工程化抗体进入脑的另一种方法是工程化抗体以使其通过中枢神经系统淋巴管被递送到脑。因此, 抗体可以被工程化以结合或模拟免疫细胞, 例如T细胞或通过淋巴管运输到中枢神经系统的滑液或脑脊液。中枢神经系统的淋巴管的细节描述于例如Louveau, A., 等人, “Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels,” *Nature* 523, pp.337-341, 2015年7月16日, 以及引用该文章的且在本申请的申请日前公众可获得的文章中, 所有这些文献的全部内容通过引用并入本文, 用于提供中枢神经系统淋巴系统和在该系统中运行的流体和细胞的细节。

[0242] 与传统抗体不同, 条件活性抗体不需要对BBB-R具有低亲和力以穿过BBB并保留在脑内。条件活性抗体可以对BBB的血液侧上的BBB-R具有高亲和力, 而对BBB的脑侧有很少的亲和力或没有亲和力。药物 (例如药物缀合物) 可以偶联到条件活性抗体, 以与抗体一起穿过BBB并被转运到脑中。

[0243] BBB-R是在脑内皮细胞上表达的跨膜受体蛋白, 其能够跨越血脑屏障转运分子。BBB-R的实例包括转铁蛋白受体 (TfR)、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体 (IGF-R)、低密度脂蛋白受体 (包括但不限于低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (LRP1) 和低密度脂蛋白受体相关蛋白8 (LRP8)) 和肝素结合表皮生长因子样生长因子 (HB-EGF)。本文中的示例性BBB-R为转铁蛋白受体 (TfR)。TfR是由二硫键连接的两个亚单位 (每个表观分子量为约90,000) 组成的跨膜糖蛋白 (分子量为约180,000), 其在脊椎动物中参与铁摄取。

[0244] 在一些实施方案中, 本发明提供由针对BBB-R的亲本或野生型抗体产生的条件活性抗体。条件活性抗体结合BBB血液侧上的BBB-R, 并且与亲本或野生型抗体相比, 对BBB脑侧上的BBB-R具有较低的亲和力。在一些其他实施方案中, 与野生型或亲本抗体相比, 条件活性抗体对BBB血液侧上的BBB-R有亲和力, 对BBB脑侧上的BBB-R没有亲和力。

[0245] 血浆是与脑细胞外液 (ECF) 非常不同的体液。如Somjen (“Ions in the Brain: Normal Function, Seizures, and Stroke,” Oxford University Press, 2004, 16和33页) 和Redzic (“Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences,” *Fluids and Barriers of the CNS*, 8:3卷, 2011) 所述, 脑细胞外液具有比血浆显著更少的 K^+ 、更多的 Mg^{2+} 和 H^+ 。血浆和脑ECF之间的离子浓度的差异导致两种流体之间渗透压和重量摩尔渗透压浓度的显著差异。表1显示了血浆和脑ECF中常见离子的毫摩尔浓度。

[0246] 表1. 血浆 (动脉血浆) 和脑细胞外液 (CSF) 中的常见离子

	动脉血浆		CSF	
	人	大鼠	人	大鼠
Na^+	150	148	147	152
K^+	4.6	5.3	2.9	3.4
Ca, 总计	2.4	3.1	1.14	1.1
[0247] Ca^{2+} , 游离的	1.4	1.5	1.0	1.0
pCa				
Mg, 总计	0.86	0.8	1.15	1.3
Mg^{2+} , 游离的	0.47	0.44	0.7	0.88
H^+	0.000039	0.000032	0.000047	0.00005
pH	7.41	7.5	7.3	7.3
Cl^-	99		119	
HCO_3^-	26.8	31	23.3	28

[0248] 脑ECF还包含比血浆显著更多的乳酸,并且比血浆显著更少的葡萄糖 (Abi-Saab等人, “Striking Differences in Glucose and Lactate Levels Between Brain Extracellular Fluid and Plasma in Conscious Human Subjects: Effects of Hyperglycemia and Hypoglycemia,” Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 第22卷, 第271-279页, 2002)。

[0249] 因此,存在几种生理条件,其在BBB的两侧之间存在不同,例如pH、各种物质(例如乳糖、葡萄糖、 K^+ 、 Mg^{2+})的浓度、渗透压和重量摩尔渗透压浓度。对于pH的生理条件,人血浆具有比人脑ECF更高的pH。对于 K^+ 浓度的生理条件,脑ECF具有比人血浆更低的 K^+ 浓度。对于 Mg^{2+} 浓度的生理条件,人脑ECF具有比人血浆显著更多的 Mg^{2+} 。对于渗透压的生理条件,人脑ECF具有不同于人血浆的渗透压。在一些实施方案中,脑ECF的生理条件可以是具有特定神经病症的患者的脑ECF的组成、pH、渗透压和重量摩尔渗透压浓度,其可以不同于一般人群的脑ECF的生理条件。

[0250] 因此,本发明提供了一种用于演变编码针对BBB-R的模板抗体的DNA以产生突变DNA文库的方法。然后表达突变DNA文库以获得突变抗体。筛选突变抗体以获得具有以下特性的条件活性抗体:在至少一种血浆生理条件下与BBB-R结合,并且在脑ECF中的至少一种脑生理条件下对BBB-R的亲合力较模板抗体低或没有亲合力。因此,所选择的突变抗体在血浆侧对BBB-R具有低或高亲合力,而在脑ECF侧对BBB-R具有低亲合力或无亲合力。该选择的突变抗体可用作用于跨BBB转运的条件活性抗体。

[0251] 这样的条件活性抗体有利于穿过BBB并保留在脑ECF中。对脑侧的BBB-R的低亲合力降低了条件活性抗体相对于模板抗体被转运穿过BBB至脑外并返回到血液中的速率(或移除)。

[0252] 在一些其它实施方案中,本发明提供了用于演变编码针对BBB-R的模板抗体的DNA以产生突变DNA文库的方法。然后表达突变DNA文库以获得突变抗体。筛选突变抗体以获得具有以下特性的条件活性抗体:在至少一种血浆生理条件下与BBB-R结合,并且在至少一种脑生理条件下对BBB-R有很少的亲合力或没有亲合力。因此,所选择的突变抗体对血浆侧的BBB-R有亲合力,并且对脑ECF侧的BBB-R有很少的亲合力或没有亲合力。该选择的突变抗体为条件活性抗体。

[0253] 这样的条件活性抗体在穿过BBB并保留在脑ECF方面是有利的。在血浆侧与BBB-R

结合后,条件活性抗体被转运通过BBB,在脑ECF侧对BBB-R有很少的亲和力或没有亲和力意味着条件活性抗体不可能被转运出大脑。

[0254] 条件活性抗体对BBB-R的亲和力可以通过其半数最大抑制浓度(IC₅₀)来测量,所述半数最大抑制浓度(IC₅₀)是需要多少抗体来抑制50%的已知BBB-R配体与BBB-R的结量的量度。常见的方法是进行竞争性结合测定,例如竞争性ELISA测定。测量TfR(一种BBB-R)的IC₅₀的示例性竞争性ELISA测定法为其中增加浓度的抗TfR抗体与生物素化TfR^A竞争结合TfR的竞争ELISA测定法。抗TfR抗体竞争性ELISA可以在包被有2.5μg/ml纯化的鼠TfR胞外结构域的PBS溶液的Maxisorp板(Neptune, N.J.)中于4℃下进行一整夜。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,并使用PBS中的Superblock封闭缓冲液(Thermo Scientific, Hudson, 新罕布什尔州)封闭板。将每种单独的抗TfR抗体(1:3连续稀释)的滴定与生物素化的抗TfR^A(0.5nM最终浓度)组合,并在室温下加入板1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,向板中加入HRP-链霉亲和素(Southern Biotech, 伯明翰市),并在室温下温育1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,使用TMB底物(BioFX Laboratories, 奥因斯米尔斯)检测结合到板上的生物素化的抗TfR^A。

[0255] 高IC₅₀表示需要更多的条件活性抗体来抑制BBB-R的已知配体的结合,因此抗体对该BBB-R的亲和力相对较低。相反,低IC₅₀表示需要较少的条件活性抗体来抑制已知配体的结合,因此抗体对该BBB-R的亲和力相对较高。

[0256] 在一些实施方案中,来自血浆中BBB-R的条件活性抗体的IC₅₀可以为约1nM至约100μM,或约5nM至约100μM,或约50nM至约100μM,或约100nM至约100μM,或约5nM至约10μM,或约30nM至约1μM,或约50nM至约1μM。

[0257] 用于滑液的条件活性生物蛋白

[0258] 在工业化国家,关节疾病是残疾和提前退休的主要原因。关节疾病常常在难以修复的关节处导致损伤。滑液是在人或动物体的关节(例如,膝、髌、肩)的滑膜腔中在面向关节形成表面的软骨和滑膜之间发现的体液。滑液为软骨提供营养并且还用作关节的润滑剂。软骨和滑膜的细胞分泌流体,所述流体在关节形成表面之间用作润滑剂。人类滑液包含约85%的水。它源自血浆的透析液,其本身由水、溶解的蛋白质、葡萄糖、凝血因子、矿物离子、激素等组成。蛋白质例如白蛋白和球蛋白存在于滑液中,并且被认为在润滑关节区域中起重要作用。在人滑液中还发现了一些其它蛋白,包括糖蛋白,例如α-1-酸性糖蛋白(AGP)、α-1-抗胰蛋白酶(A1AT)和润滑素。

[0259] 滑液具有与身体的其他部分非常不同的组成。因此,滑液具有不同于身体其他部分(例如血浆)的生理条件。例如,滑液具有小于约10mg/dL的葡萄糖,而人血浆中的平均正常葡萄糖水平为约100mg/dL,一天中在70-100mg/dL之间的范围内波动。此外,滑液中的总蛋白水平约为血浆蛋白水平的三分之一,因为大分子例如蛋白质不容易通过滑膜进入滑液。还已经发现人体滑液的pH高于人血浆中的pH(Jebens等人,“On the viscosity and pH of synovial fluid and the pH of blood,”The Journal of Bone and Joint Surgery, 第41B卷,第388-400页,1959;Farr等人,“Significance of the hydrogen ion concentration in synovial fluid in Rheumatoid Arthritis,”Clinical and Experimental Rheumatology, 第3卷,第99-104页,1985)。

[0260] 因此,滑液具有与身体其他部分的生理条件(例如血浆中的生理条件)不同的若干

生理条件。滑液具有高于身体其他部分(特别是血浆)的pH。滑液具有比身体其他部分(例如血浆)更低的葡萄糖浓度。滑液也具有比身体其他部分(例如血浆)更低的蛋白浓度。

[0261] 已经使用几种抗体通过将抗体引入滑液来治疗关节疾病。例如,已知受伤关节中的滑液含有对骨关节炎的进展有影响的许多因素(参见例如Fernandes,等人,“The Role of Cytokines in Osteoarthritis Pathophysiology”,*Biorheology*,第39卷,第237-246页,2002)。已知由活化的滑膜细胞产生的细胞因子(例如白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α))上调基质金属蛋白酶(MMP)基因表达。MMP的上调导致关节中基质和非基质蛋白的降解。中和细胞因子的抗体可以阻止骨关节炎的进展。

[0262] 使用抗体作为药物是治疗关节疾病的有前途的策略。例如,已经开发了抗体(例如抗聚集蛋白聚糖或聚集蛋白聚糖酶的抗体)以治疗骨关节炎,所述骨关节炎迄今是关节疾病中最普遍的(WO1993/022429A1)。已经开发了针对乙酰化高迁移率族蛋白1(HMGB1)的抗体用于诊断或治疗关节疾病,该关节疾病为炎性、自身免疫、神经变性或恶性疾病/病症,例如关节炎。该抗体可用于检测滑液中HMGB1的乙酰化形式(WO 2011/157905A1)。也已经开发另一种抗体(CD20抗体)用于治疗关节的结缔组织和软骨的损伤。

[0263] 然而,这些抗体的抗原通常在携带重要生理功能的身体的其它部分表达。针对这些抗原的抗体尽管在治疗关节疾病方面是有效的,但也可以显著干扰这些抗原在身体其他部分的正常生理功能。因此,患者可能经历严重的副作用。因此,期望开发治疗剂,例如针对细胞因子或其它抗原的抗体,其可以在滑液中以更高的亲和力优先结合其抗原(蛋白或其它大分子),而不结合或仅弱结合身体其他部分的相同抗原以减少副作用。

[0264] 这种条件活性生物蛋白可以是条件活性抗体。在一些实施方案中,本发明还提供作为除抗体之外的蛋白的条件活性生物蛋白。例如,可以通过本发明开发条件活性免疫调节剂用于优先调节滑液中的免疫应答,其可以对身体其他部分的免疫应答产生较小的影响或无影响。

[0265] 条件活性生物蛋白可以是条件活性的细胞因子信号传导抑制剂(SOCS)。这些SOCS中的许多参与抑制JAK-STAT信号传导途径。条件活性的细胞因子信号传导抑制剂可以优先抑制滑液中的细胞因子信号传导,而不抑制或在较小程度上抑制身体其他部分的细胞因子信号传导。

[0266] 在一些实施方案中,本发明提供了衍生自野生型生物蛋白的条件活性生物蛋白。条件活性生物蛋白在身体的某些部分(例如血浆中)中的至少一种生理条件下比野生型生物蛋白具有更低的活性,并且在滑液中的至少一种生理条件下具有比野生型生物蛋白更高的活性。这种条件活性生物蛋白可以优先在滑液中起作用,但不能或较小程度地作用于身体的其他部分。因此,这种条件活性生物蛋白可能具有减少的副作用。

[0267] 在一些实施方案中,条件活性生物蛋白是针对滑液中或暴露于滑液的抗原的抗体。尽管抗原通常是细胞因子,但这样的抗原可以是参与关节疾病中的免疫应答/炎症的任何蛋白。该条件活性抗体在身体其他部分(例如血浆)中的至少一种生理条件下对该抗原的亲和力比野生型抗体对相同抗原的亲和力更低,而在滑液的至少一种生理条件下其对该抗原的亲和力比野生型抗体更高。这样的条件活性抗体可以与身体其他部分中的抗原弱结合或完全不结合,但是在滑液中结合(例如强烈地和紧密地结合或者更强地结合)抗原。

[0268] 用于肿瘤的条件活性生物蛋白

[0269] 实体瘤中的癌细胞能够在其周围形成肿瘤微环境以支持癌细胞的生长和转移。肿瘤微环境是肿瘤存在的细胞环境,包括周围的血管、免疫细胞、成纤维细胞、其他细胞、可溶性因子、信号传导分子、细胞外基质和可促进肿瘤转化、支持肿瘤生长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、培养治疗抗性并为休眠转移茁壮成长提供微环境的机械因子(mechanical cue)。肿瘤及其周围的微环境密切相关,不断交互。肿瘤可以通过释放细胞外信号、促进肿瘤血管生成和诱导外周免疫耐受来影响它们的微环境,而微环境中的免疫细胞可以影响癌细胞的生长和演变。参见warts等人“Tumor Microenvironment Complexity:Emerging Roles in Cancer Therapy,”*Cancer Res*,72卷,第2473-2480页,2012。

[0270] 肿瘤微环境通常是缺氧的。随着肿瘤块增加,肿瘤内部生长远离现有血液供应,这导致难以将氧完全供应到肿瘤微环境。与血浆中约40mm Hg的氧分压相比,在超过50%的局部晚期实体肿瘤中,肿瘤环境中的氧分压低于5mmHg。相反,身体的其他部分不是缺氧的。缺氧环境导致基因不稳定性,其通过下调核苷酸切除修复和错配修复的途径与癌症进展相关。缺氧还引起缺氧诱导因子1 α (HIF1- α)的上调,其诱导血管生成,并且与较差的预后以及与转移相关的基因的激活相关。参见Weber等人,“The tumor microenvironment,”*Surgical Oncology*,第21卷,172-177页,2012 and Blagosklonny,“Antiangiogenic therapy and tumor progression,”*Cancer Cell*,第5卷,第13-17页,2004。

[0271] 此外,肿瘤细胞往往依赖不需要氧的乳酸发酵产生的能量。因此,肿瘤细胞不太可能使用需要氧气的正常有氧呼吸。使用乳酸发酵的结果是肿瘤微环境为酸性(pH 6.5-6.9),与身体的其它部分相比,身体的其它部分通常是中性或微碱性的。例如,人血浆的pH为约7.4。参见Estrella等人,“Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion,”*Cancer Research*,第73卷,第1524-1535页,2013。由于与位于身体其他部分的细胞相比,增殖性癌细胞的营养需求相对较高,因此肿瘤微环境中的营养物利用度也较低。

[0272] 此外,肿瘤微环境还包含在身体的其他部分中通常不存在的许多不同的细胞类型。这些细胞类型包括内皮细胞及其前体、周细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、癌相关的成纤维细胞、成肌细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞、自然杀伤细胞和抗原呈递细胞(APC)(例如巨噬细胞和树突细胞)(Lorusso等人,“The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis,”*Histochem Cell Biol*,第130卷,第1091-1103页,2008)。

[0273] 因此,肿瘤微环境具有不同于身体其他部分的生理条件(例如血浆中的生理条件)的至少几种生理条件。肿瘤微环境的pH(酸性)低于身体的其他部分,特别是血浆(pH 7.4)。肿瘤微环境具有比身体其他部分(例如血浆)更低的氧浓度。此外,肿瘤微环境具有比身体其他部分(特别是血浆)更低的营养利用度。肿瘤微环境也具有一些不同的细胞类型,这些细胞类型在身体的其他部分(特别是血浆)中不常见。

[0274] 一些癌症药物包括可以穿透到肿瘤微环境中并作用于其中的癌细胞的抗体。基于抗体的癌症治疗已经成熟,并且已经成为用于治疗患有血液恶性肿瘤和实体瘤的患者的最成功和重要的策略之一。存在一系列被人癌细胞表达的细胞表面抗原,与在正常组织中相比,在癌细胞中该细胞表面抗原被过表达、突变或选择性表达。这些细胞表面抗原是抗体癌症治疗的优良靶标。

[0275] 可被抗体靶向的癌细胞表面抗原分为几个不同的类别。造血分化抗原是通常与分化簇(CD)分组相关的糖蛋白,并且包括CD20、CD30、CD33和CD52。细胞表面分化抗原是在正常细胞和肿瘤细胞表面上发现的糖蛋白和碳水化合物的不同组。参与生长和分化信号传导的抗原通常是生长因子和生长因子受体。作为癌症患者中抗体靶标的生长因子包括CEA2、表皮生长因子受体(EGFR;也称为ERBB1) 12、ERBB2(也称为HER2) 13、ERBB3(REF.18)、MET(也称为HGFR) 19、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R) 20、肝配蛋白受体A3(EPHA3) 21、肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体受体1(TRAILR1;也称为TNFRSF10A)、TRAILR2(也称为TNFRSF10B)和核因子 κ B配体的受体激活剂(RANKL;也称为TNFSF11) 22。参与血管生成的抗原通常是支持新微血管系统形成的蛋白或生长因子,包括血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)、整联蛋白 α V β 3和整联蛋白 α 5 β 1(REF.10)。肿瘤基质和细胞外基质是肿瘤不可或缺的支持结构。作为治疗靶标的基质抗原和细胞外基质抗原包括成纤维细胞激活蛋白(FAP)和腱生蛋白。参见Scott等人,“Antibody therapy of cancer,”Nature Reviews Cancer,第12卷,第278-287页,2012。

[0276] 除了抗体之外,其他生物蛋白也有望用于癌症治疗。实例包括肿瘤抑制剂例如成视网膜细胞瘤蛋白(pRb)、p53、pVHL、APC、CD95、ST5、YPEL3、ST7和ST14。也可以将一些诱导癌细胞凋亡的蛋白引入肿瘤以缩小肿瘤的尺寸。有至少两种可以诱导肿瘤凋亡的机制:肿瘤坏死因子诱导的机制和Fas-Fas配体介导的机制。参与两种凋亡机制中的任一种的至少一些蛋白可以被引入肿瘤用于治疗。

[0277] 癌症干细胞是能够产生在特定癌症样品中发现的所有细胞类型的癌细胞,因此是肿瘤形成细胞。它们可以通过自我更新并分化成多种细胞类型的干细胞过程产生肿瘤。认为癌症干细胞作为独特的群体在肿瘤中存留,并通过产生新的肿瘤而引起复发和转移。开发靶向癌症干细胞的特异疗法可以提高癌症患者的存活并改善生活质量,特别是对于转移性疾病的患者。

[0278] 这些用于治疗肿瘤的药物通常干扰除了肿瘤之外的身体其他部分的正常生理功能。例如,诱导肿瘤凋亡的蛋白也可以诱导身体某些其它部分的细胞凋亡,从而引起副作用。在使用抗体治疗肿瘤的实施方案中,抗体的抗原也可以在其执行正常生理功能的身体的其它部分表达。例如,单克隆抗体贝伐单抗(靶向血管内皮生长因子)防止肿瘤血管生长。该抗体还可以阻止身体其他部分的血管生长或修复,从而导致出血、伤口愈合不良、血凝块和肾损伤。更有效的肿瘤治疗非常需要开发主要或单独靶向肿瘤的条件活性生物蛋白。

[0279] 在一些实施方案中,本发明提供了由野生型生物蛋白产生的条件活性生物蛋白,所述野生型生物蛋白可以是肿瘤治疗的候选物。条件活性生物蛋白在除了肿瘤微环境之外的身体部分(例如血浆)中的至少一种生理条件下较野生型生物蛋白具有更低的活性,而在肿瘤微环境中的至少一种生理条件下较野生型生物蛋白具有更高的活性。这种条件活性生物蛋白可优先作用于肿瘤微环境中的癌细胞以治疗肿瘤,因此不太可能引起副作用。在生物蛋白为针对肿瘤细胞表面上的抗原的抗体且在肿瘤细胞中该抗原暴露于肿瘤微环境的实施方案中,在身体的其它部分(例如非肿瘤微环境)中,条件活性抗体对抗原的亲和力低于野生型抗体,而在肿瘤微环境中其对抗原的亲和力高于野生型抗体。这样的条件活性抗体可以在体内其它部分与抗原弱结合或完全不结合,但在肿瘤微环境中与抗原更好地结合或与抗原强力紧密地结合。

[0280] 在一些实施方案中,条件活性抗体是针对免疫检查点蛋白的抗体,导致对免疫检查点的抑制。此类条件活性抗体具有以下特性的至少一种:(1)与作为条件活性抗体来源的野生型抗体相比,在肿瘤微环境中其对免疫检查点蛋白的结合亲和力增强,和(2)与作为条件活性抗体的来源的野生型抗体相比,在非肿瘤微环境中对免疫检查点蛋白的结合亲和力降低。

[0281] 免疫检查点用作免疫系统的内源抑制途径以维持自身耐受性并调节对抗原刺激(即外源分子、细胞和组织)的免疫应答的持续时间和程度。参见Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷,第252-264页,2012。通过抑制一个或多个检查点蛋白来抑制免疫检查点可以引起免疫系统(特别是T细胞)的超活化,从而诱导免疫系统攻击肿瘤。适用于本发明的检查点蛋白包括CTLA4及其配体CD80和CD86、PD1及其配体PDL1和PDL2、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白-3 (TIM3) 及其配体GAL9、B和T淋巴细胞衰减子 (BTLA) 及其配体HVEM(疱疹病毒进入介质)、受体如杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、淋巴细胞活化基因-3 (LAG3) 和腺苷A2a受体 (A2aR)、以及配体B7-H3和B7-H4。其它合适的免疫检查点蛋白描述于Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷,第252-264页,2012和Nirschl&Drake, *Clin Cancer Res*, 第19卷,第4917-4924页,2013,其公开内容通过引用并入本文。

[0282] CTLA-4和PD1是两个最知名的免疫检查点蛋白。CTLA-4可以下调T细胞活化的途径(Fong等人, *Cancer Res.* 69 (2):609-615,2009;和Weber, *Cancer Immunol. Immunother.* 58:823-830,2009)。阻滞CTLA-4已被证明增强T细胞活化和增殖。CTLA-4的抑制剂包括抗CTLA-4抗体。抗CTLA-4抗体结合CTLA-4并阻断CTLA-4与其配体CD80或CD86的相互作用,从而阻断由CTLA-4与其配体的相互作用引发的免疫应答的下调。

[0283] 已知检查点蛋白PD1在对感染产生炎症反应时抑制外周组织中T细胞的活性并限制自身免疫。响应于特异性抗原靶标或同种异体细胞在混合淋巴细胞反应中的刺激,体外PD1阻滞可以增强T细胞增殖和细胞因子产生。已证明PD1表达和降低的免疫应答之间的强相关性是由PD1的抑制功能引起,即通过诱导免疫检查点(Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 12:252-264,2012)。PD1阻滞可以通过多种机制实现,包括结合PD1或其配体PDL1或PDL2的抗体。

[0284] 过去的研究已经发现了针对几个检查点蛋白(CTLA4、PD1、PD-L1)的抗体。这些抗体通过抑制免疫检查点从而超激活免疫系统(特别是T细胞)用于攻击肿瘤,从而有效治疗肿瘤(超激活免疫系统)(Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, 第12卷,第252-264页,2012)。然而,超激活的T细胞也可以攻击宿主细胞和/或组织,导致对患者身体的附带损伤。因此,基于使用这些已知抗体来抑制免疫检查点的治疗是难以控制的,并且对患者的风险也是一个严重的问题。例如,FDA批准的针对CTLA-4的抗体由于其高毒性而带有黑盒警告。

[0285] 本发明通过提供针对免疫检查点蛋白的条件活性抗体解决了超激活T细胞的附带损伤的问题。这些条件活性抗体优先激活肿瘤微环境中的免疫检查点。同时,条件活性抗体不抑制或较少抑制在非肿瘤微环境(例如,正常身体组织)中的免疫检查点,使得在非肿瘤微环境中减少对身体造成附带损伤的可能性。这个目标是通过将条件活性抗体工程化为在肿瘤微环境中比在非肿瘤微环境中更活跃来实现的。

[0286] 在一些实施方案中,针对免疫检查点蛋白的条件活性抗体在肿瘤微环境中与免疫检查点蛋白的结合活性与在非肿瘤微环境中与相同免疫检查点蛋白的结合活性的比例至

少为约1.1,或至少约1.2,或至少约1.4,或至少约1.6,或至少约1.8,或至少约2,或至少约2.5,或至少约3,或至少约5,或至少约7,或至少约8,或至少约9,或至少约10,或至少约15,或至少约20。测量抗体的结合活性的典型测定法为ELISA测定。

[0287] 高度致免疫肿瘤(例如恶性黑素瘤)最易受到通过免疫系统操作获得的超激活免疫系统的攻击。因此,针对免疫检查点蛋白的条件活性抗体对于治疗这种高度致免疫肿瘤特别有效。然而,其他类型的肿瘤也易受超激活免疫系统的攻击。

[0288] 在一些实施方案中,针对免疫检查点蛋白的条件活性抗体可以用于联合疗法。例如,联合疗法可包括针对肿瘤细胞表面分子(肿瘤特异性抗原)的条件活性抗体和针对免疫检查点蛋白的条件活性抗体。在一个实施方案中,条件活性抗体对肿瘤细胞表面分子的结合活性和条件活性抗体对免疫检查点蛋白的结合活性可存在于单个蛋白,即本文公开的双特异性条件活性抗体中。在一些另外的实施方案中,联合疗法可以包括针对肿瘤细胞表面分子(肿瘤特异性抗原)的条件活性抗体和针对两种或更多种不同免疫检查点蛋白的两种或更多种条件活性抗体。在一个实施方案中,所有这些结合活性可以存在于单个蛋白,即本文公开的多特异性抗体中。

[0289] 因为条件活性抗体在肿瘤微环境中的活性比作为条件活性抗体来源的野生型抗体针对相同肿瘤细胞表面分子或检查点蛋白的活性更高,所以这些联合疗法可提供增强的功效和显著降低的毒性。这些条件活性抗体(特别是针对免疫检查点蛋白的抗体)的降低的毒性能够使有效抗体例如本文所述的ADC抗体以及更高剂量的抗体得以安全使用。

[0290] 在一些实施方案中,针对检查点蛋白的条件活性抗体可以是前药形式。例如,条件活性抗体在被切割并变成药物形式之前可以是没有所需药物活性的前药。或者因为催化这种切割的酶优先存在于肿瘤微环境中或者因为条件活性抗体使得切割位点在肿瘤微环境中较在非肿瘤微环境中的切割位点更容易接近,前药可以优先在肿瘤微环境中被切割。

[0291] 用于包括肿瘤干细胞在内的干细胞龛的工程化条件活性生物蛋白

[0292] 干细胞存在于体内称为干细胞龛的环境中,其构成组织生理学的基本单位,整合介导干细胞对生物体需要的反应的信号。然而,龛还可以通过对干细胞或其他靶标施加异常功能来诱导病理。干细胞和它们的龛之间的相互作用产生了维持组织所需的以及干细胞疗法的最终设计所需的动态系统(Scadden,“The stem-cell niche as an entity of action,”*Nature*,第441卷,第1075-1079页,2006)。脊椎动物中的常见干细胞龛包括生殖系干细胞龛、造血干细胞龛、毛囊干细胞龛、肠干细胞龛和心血管干细胞龛。

[0293] 干细胞龛是不同于身体其他部分(例如血浆)的专用环境(Drummond-Barbosa,“Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network,”*Genetics*,第180卷,第1787-1797页,2008;Fuchs,“Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche,”*Cell*,第116卷,第769-77页,2004)。干细胞龛是缺氧的,其中氧化性DNA损伤减少。氧水平的直接测量结果已经显示,与血浆相比骨髓通常是相当缺氧的($\sim 1\% - 2\% O_2$) (Keith等人,“Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer,”*Cell*,第129卷,第465-472页,2007;Mohyeldin等人,“Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche,”*Cell Stem Cell*,第7卷,第150-161页,2010)。此外,干细胞龛需要具有几种其他因素来调节龛内的干细胞特征:细胞外基质组分、生长因子、细胞因子和环境的物理化学性质的因素,包括pH、离子强度(例如

Ca²⁺浓度)和代谢物。

[0294] 因此,干细胞龛具有不同于身体其他部分的生理条件(例如血浆中的生理条件)的至少几种生理条件。干细胞龛具有比身体的其他部分(特别是血浆)更低的氧浓度(1-2%)。干细胞龛的包括pH和离子强度在内的其它生理条件也可以不同于身体的其他部分。

[0295] 干细胞疗法是将新的成体干细胞引入受损组织以便治疗疾病或损伤的介入策略。这种策略取决于干细胞的自我更新和随后产生具有不同程度分化能力的后代的能力。干细胞疗法提供了组织再生的巨大潜力,而再生的组织可以潜在地代替身体中的患病和受损区域,排斥和副作用的风险最小。因此,将药物(生物蛋白(例如抗体)或化学化合物)递送至干细胞龛以影响干细胞的更新和分化是干细胞疗法的重要部分。

[0296] 存在关于干细胞龛如何影响哺乳动物中干细胞的更新和/或分化的若干实例。第一种是在皮肤中,其中已知 β -1整联蛋白在原发细胞上差异表达,并通过与基质糖蛋白配体的相互作用参与干细胞群体的约束定位。第二,在神经系统中,腱生蛋白C的缺乏改变了脑室下区的神经干细胞数量和功能。腱生蛋白C似乎调节干细胞对成纤维细胞生长因子2(FGF2)和骨形态发生蛋白4(BMP4)的敏感性,导致干细胞倾向性增强。第三,另一种基质蛋白,即含Arg-Gly-Asp的唾液酸蛋白(骨桥蛋白(OPN))现在已被证明有助于造血干细胞调节。OPN与已知在造血干细胞、CD44和 α 4和 α 5 β 1整联蛋白上的几种受体相互作用。OPN的产生变化明显,特别是在成骨细胞激活的情况下。因为OPN的缺乏导致刺激条件下的超生理性干细胞扩增,所以缺乏OPN的动物具有增加的HS细胞数。因此,OPN似乎作为对造血干细胞数量的约束条件,限制了在稳态条件下或具有刺激的条件下的干细胞的数量。参见Scadden, "The stem-cell niche as an entity of action," Nature, 第441卷,第1075-1079页, 2006。

[0297] Xie等人"Autocrine signaling based selection of combinatorial antibodies that transdifferentiate human stem cells," Proc Natl Acad Sci U S A, 第110卷,第8099-8104页, 2013公开了使用抗体影响干细胞分化的方法。该抗体是粒细胞集落刺激因子受体的激动剂。与激活细胞沿着预定途径分化的天然粒细胞集落刺激因子不同,分离的激动剂抗体将人类髓系CD34+骨髓细胞转分化为神经祖细胞。Melidoni等人("Selecting antagonistic antibodies that control differentiation through inducible expression in embryonic stem cells," Proc Natl Acad Sci U S A, 第110卷,第17802-17807页, 2013)还公开了使用抗体干扰FGF4与其受体FGFR1 β 之间的相互作用,因此阻断自分泌FGF4介导的胚胎干细胞分化。

[0298] 对干细胞分化中配体/受体功能的了解使得能够实现应用生物蛋白干扰这些配体/受体以调节或甚至指导干细胞分化的策略。通过将抗体施用到干细胞龛中控制未经基因修饰的人干细胞的分化能力可以为基于干细胞的治疗剂提供新的离体或体内方法。在一些实施方案中,本发明提供了由野生型生物蛋白产生的条件活性生物蛋白,其能够进入包括癌干细胞的干细胞龛以调节干细胞或肿瘤发展。条件活性生物蛋白在身体其他部分的至少一种生理条件下较野生型生物蛋白具有更低的活性,而在干细胞龛的至少一种生理条件(例如癌症干细胞环境)下较野生型生物蛋白具有更高的活性。这种条件活性生物蛋白不太可能引起副作用,并且优先作用于干细胞龛以调节干细胞的更新和分化。在一些实施方案中,条件活性生物蛋白为抗体。这样的条件活性抗体可以与身体的其它部分的抗原弱结合

或完全不结合,但是与干细胞龕中的抗原牢固且紧密结合。

[0299] 本发明的用于滑液、肿瘤微环境和干细胞龕的条件活性蛋白是通过演变编码野生型生物蛋白的DNA以产生突变DNA文库的方法产生的。然后表达突变DNA文库以获得突变蛋白。对突变蛋白进行筛选以获得具有以下特性的条件活性生物蛋白:在选自滑液、肿瘤微环境和干细胞龕的身体第一部分的至少一种生理条件下,其具有比野生型生物蛋白更高的活性,并且在不同于身体第一部分的第二部分的至少一种生理条件下,具有比野生型生物蛋白更低的活性。身体第二部分可以是血浆。这种选择的突变生物蛋白是条件活性生物蛋白,其在身体第一部分具有高活性,而在身体第二部分具有低活性。

[0300] 这种条件活性生物蛋白在降低野生型蛋白的副作用方面是有利的,因为条件活性生物蛋白在其不打算作用的身体其他部分具有较低的活性。例如,如果条件活性生物蛋白被有目的地引入肿瘤微环境,则条件活性生物蛋白在除了肿瘤微环境以外的身体部分具有低活性的事实意味着,这样的条件活性生物蛋白不太可能干扰除了肿瘤微环境之外的身体部分的正常生理功能。同时,条件活性生物蛋白在肿瘤微环境中具有高活性,这使得条件活性生物蛋白在治疗肿瘤方面具有更高的疗效。

[0301] 由于副作用降低,与野生型生物蛋白相比,条件活性生物蛋白将允许安全使用显著更高剂量的蛋白。这对于针对细胞因子或生长因子的抗体是特别有益的,因为针对细胞因子或生长因子的抗体可能干扰身体其他部分中细胞因子或生长因子的正常生理功能。通过使用具有降低的副作用的条件活性生物蛋白,可以使用更高的剂量以实现更高的功效。

[0302] 用于在滑液、肿瘤微环境或干细胞龕之一中起作用的条件活性生物蛋白还使得能够使用新的药物靶标。使用传统的生物蛋白作为治疗剂可能导致不可接受的副作用。例如,表皮生长因子受体(EGFR)的抑制可以非常有效地抑制肿瘤生长。然而,抑制EGFR的药物也会抑制皮肤和胃肠(GI)道的生长。副作用使得EGFR不适合作为肿瘤药物靶标。使用仅在肿瘤微环境中以高亲和力结合EGFR但在体内任何其他部分不具有或具有非常低的亲和力的条件活性抗体将显著降低副作用,并同时抑制肿瘤生长。在这种情况下,EGFR可以通过使用条件活性抗体成为有效的新的肿瘤药物靶标。

[0303] 在另一个实例中,抑制细胞因子通常有益于修复关节损伤。然而,抑制体内其他部分的细胞因子也可能抑制身体的免疫应答,引起免疫缺陷。因此,滑液中的细胞因子不是开发用于治疗关节损伤的传统抗体药物的理想靶标。然而,通过使用优先结合滑液中的细胞因子同时不结合或仅弱结合体内其他部分中的相同细胞因子的条件活性抗体,可以显著降低免疫缺陷的副作用。因此,滑液中的细胞因子通过使用条件活性抗体可以成为修复关节损伤的合适靶标。

[0304] 条件活性病毒颗粒

[0305] 病毒颗粒长期以来被用于将蛋白、核酸分子、化学化合物或放射性同位素转运到靶细胞或组织的递送载体。通常用作递送载体的病毒颗粒包括逆转录酶病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒和腺相关病毒。通常在配体-受体结合系统中,病毒颗粒通过表面蛋白识别它们的靶细胞,所述表面蛋白作为识别蛋白用于特异性结合作为靶细胞的靶蛋白的细胞蛋白(Lentz, "The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents," J. of Gen. Virol., 第71卷, 第751-765页, 1990, 通过引用并入本文)。例如,病毒识别蛋白可以是靶细胞上的受体的配体。配体和受体之间的特异性

允许病毒颗粒特异性识别并将其内容物递送至靶细胞。

[0306] 从野生型病毒开发人工病毒颗粒的技术是本领域技术人员公知的。作为递送载体,已知人工病毒颗粒包括基于以下病毒的人工病毒颗粒:逆转录病毒(参见例如WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利号5,219,740;WO 93/11230;WO 93/10218;美国专利号4,777,127;英国专利号2,200,651;EP 0 345 242;和WO 91/02805)、甲病毒(例如,辛德毕斯(Sindbis)病毒载体、塞姆利基(Semliki)森林病毒(ATCC VR-67;ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373;ATCC VR-1246)、委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923;ATCC VR-1250;ATCC VR 1249;ATCC VR-532))和腺相关病毒(参见例如WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655)。

[0307] 通常,通过将外源识别蛋白插入病毒颗粒中来构建人工病毒颗粒,该外源识别蛋白通常通过重组技术代替天然识别蛋白。外源识别蛋白可以是例如抗体、受体、配体或胶原结合结构域。本发明提供条件活性识别蛋白,其在正常生理条件下没有与细胞结合的活性或活性较低,并且在异常条件下具有与细胞结合的活性或活性较高。因此条件活性识别蛋白可以基于患病组织和/或患病部位处异常条件的存在优先结合患病组织和/或患病部位处的靶细胞,并避免或仅最低限度地结合存在正常生理条件的正常组织的细胞。条件活性识别蛋白可被表达并展示在病毒颗粒的表面上。

[0308] 在一些实施方案中,本发明提供了一种演变野生型识别蛋白和筛选条件活性识别蛋白的方法。条件活性识别蛋白在正常生理条件下比野生型识别蛋白具有更低的结合细胞的活性,并且在异常条件下比野生型识别蛋白具有更高的结合细胞的活性。这种条件活性识别蛋白可以通过公知的重组技术插入病毒颗粒中以产生条件活性病毒颗粒。

[0309] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含条件活性识别蛋白的条件活性病毒颗粒,条件活性识别蛋白使得条件活性病毒颗粒识别并结合患病组织的或位于患病部位的靶细胞,而不识别和结合正常组织细胞。这种条件活性病毒颗粒可优先将病毒颗粒内的治疗剂递送到患病组织或患病部位,而条件活性病毒颗粒较少递送或不递送治疗剂到正常组织的细胞。

[0310] 在一些实施方案中,与健康的或不患有特定疾病或疾病状态的身体其他部分中的pH或温度相比,患病部位的靶细胞处于具有异常pH(例如,pH 6.5)或异常温度的区域或微环境内。在该实施方案中,正常生理pH或温度下,条件活性识别蛋白在与靶细胞的靶蛋白结合方面比野生型识别蛋白的活性更低,并且在异常pH或温度下在与靶细胞的靶蛋白结合方面比野生型识别蛋白的活性更高。以这种方式,识别蛋白将在遭遇异常pH 或温度的部位优先结合,由此将治疗剂递送到患病部位。

[0311] 在一个实施方案中,病毒颗粒可以包含本发明的条件活性抗体,特别是抗体的可变区(例如Fab、Fab'、Fv)。这种条件活性抗体可以在正常生理条件下以低于野生型抗体的亲和力结合靶细胞的靶蛋白(作为抗原),所述正常生理条件可在具有正常组织的位置处遇到,并且在异常生理条件下以高于野生型抗体的亲和力结合靶细胞的靶蛋白,所述异常生理条件可在患病部位或患病组织中遇到。可以根据本发明的方法由野生型抗体衍生条件活性抗体。

[0312] 在一个实施方案中,靶细胞上的靶蛋白包括在例如许多肿瘤中的细胞表面上过表达的酪氨酸激酶生长因子受体。示例性的酪氨酸激酶生长因子为VEGF受体、FGF受体、PDGF

受体、IGF受体、EGF受体、TGF- α 受体、TGF- β 受体、HB-EGF受体、ErbB2受体、ErbB3受体和ErbB4受体。

[0313] 条件活性DNA/RNA修饰蛋白

[0314] 已经发现DNA/RNA修饰蛋白作为新的基因组工程化工具的形式,特别是称为CRISPR的一种形式,其可以允许研究人员对基因进行显微手术,精确地并且容易地在染色体上的精确位置改变DNA序列(genome editing,Mali等人,“Cas9 as a versatile tool for engineering biology,”*Nature Methods*,第10卷,第957-963页,2013)。例如,镰状细胞性贫血由单碱基突变引起,其可通过使用DNA/RNA修饰蛋白被校正。该技术甚至可以通过改变单个碱基对来精确地删除或编辑染色体的位(Makarova等人,“Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems,”*Nature Reviews Microbiology*,第9卷,第467-477页,2011)。

[0315] 用CRISPR进行的基因组编辑能够快速地对细胞进行多基因改变。包括心脏病、糖尿病和神经疾病在内的许多人类疾病受到多个基因突变的影响。这种基于CRISPR的技术具有逆转引起疾病的突变和治疗这些疾病或至少降低这些疾病的严重性的潜力。基因组编辑依赖于用于切割基因组DNA的CRISPR相关(Cas)蛋白(酶家族)。通常,Cas蛋白由小的导向RNA引导至基因组中的靶区域,其中该导向RNA与靶区域匹配。因为Cas蛋白具有很少的序列特异性或没有序列特异性,所以导向RNA充当Cas蛋白的指针以实现精确的基因组编辑。在一个实施方案中,一种Cas蛋白可与多种导向RNA一起使用以同时校正多个基因突变。

[0316] 存在许多Cas蛋白。实例包括Cas1、Cas2、Cas3'、Cas3”、Cas4、Cas5、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3和Csf4(Makarova等人,“Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems,”*Nature Reviews Microbiology*,第9卷,第467-477页,2011)。

[0317] 为了进行基因组编辑,Cas蛋白必须进入靶细胞。个体中的细胞可以在细胞内部具有不同的细胞内pH。患病组织中的一些细胞具有异常的细胞内pH。例如,一些肿瘤细胞往往具有约7.12-7.65的碱性细胞内pH,而正常组织中的细胞具有在6.99-7.20范围内的中性细胞内pH(参见Cardone等人,“The role of disturbed pH dynamics and the Na(+)/H(+) exchanger in metatasis,”*Nat.Rev.Cancer*,第5卷,第786-795页,2005)。在慢性缺氧中,患病组织中的细胞具有约7.2-7.5的细胞内pH,也高于正常组织的细胞内pH(Rios等人,“Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells,”*American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*,第289卷,第L867-L874页,2005)。此外,在缺血细胞中,细胞内pH通常在6.55-6.65的范围内,其低于正常组织的细胞内pH(Haqberg,“Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle:relationship to membrane potential,extracellular pH,tissue lactic acid and ATP,”*Pflugers Arch.*,第404卷,第342-347页,1985)。在Han等人的“Fluorescent Indicators for Intracellular pH,”*Chem Rev.*,第110卷,第2709-2728页,2010中讨论了患病组织中异常细胞内pH的更多实例。

[0318] 本发明提供了一种从野生型Cas蛋白产生条件活性Cas蛋白的方法,其中条件活性Cas蛋白具有以下特性的至少一种:(1)在正常细胞内的正常生理条件下,相对于野生型Cas蛋白具有降低的酶活性,和(2)在靶细胞(例如上述的一种疾病细胞)内的异常条件下,相对于野生型Cas蛋白具有提高的酶活性。在一些实施方案中,正常生理条件为约中性的细胞内pH,异常条件为高于或低于中性的不同的细胞内pH。在一个实施方案中,异常条件是细胞内pH为7.2-7.65或细胞内pH为6.5-6.8。

[0319] 在一些实施方案中,可以使用本发明的条件活性病毒颗粒将条件活性Cas蛋白递送至靶细胞。条件活性病毒颗粒包含条件活性Cas蛋白和至少一个导向RNA,该导向RNA用于将Cas蛋白引导至Cas蛋白将要编辑的基因组DNA的位置。

[0320] 多特异性抗体具有高选择性以优先靶向含有多特异性抗体可结合的所有或大多数靶(抗原)的组织。例如,与仅可以表达两种抗原之一的非靶细胞相比,双特异性抗体可以通过对表达由双特异性抗体识别的两种抗原的靶细胞显示出更大的偏好性来提供对靶细胞的选择性。因此,由于系统的动力学,在平衡时,结合靶细胞的双特异性抗体比结合非靶细胞的双特异性抗体多。

[0321] 本文中工程化的多特异性抗体或其抗原识别片段可用作本发明嵌合抗原受体中的ASTR。

[0322] 工程化细胞毒性细胞

[0323] 一旦通过筛选步骤鉴定了条件活性ASTR,可通过连接编码各个结构域的多核苷酸序列以形成单个多核苷酸序列(编码条件活性CAR的CAR基因)来组装嵌合抗原受体。各个结构域包括条件活性ASTR、TM和ISD。在一些实施方案中,还可以在CAR中引入其他结构域,包括ab ESD和CSD(图1)。如果条件活性CAR是双特异性CAR,则CAR基因在N末端至C末端方向上可以是例如以下构型:N末端信号序列-ASTR 1-接头-ASTR 2-胞外间隔结构域-跨膜结构域-共刺激结构域-胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,这样的CAR基因可以包含两个或更多个共刺激结构域。

[0324] 或者,编码条件活性CAR的多核苷酸序列可以在N末端至C末端方向上具有以下构型:N末端信号序列-ASTR 1-接头-ASTR 2-跨膜结构域-共刺激结构域-胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,这样的CAR可以包含两个或更多个共刺激结构域。如果CAR包含多于两个ASTR,则编码CAR的多核苷酸序列在N末端至C末端方向上可以是以下构型:N末端信号序列-ASTR 1-接头-ASTR 2-接头-(抗原特异性靶向区)_n-跨膜结构域-共刺激结构域-胞内信号传导结构域。这样的CAR可以进一步包含胞外间隔结构域。每个ASTR可以通过接头隔开。在一个实施方案中,这样的CAR可以包含两个或更多个共刺激结构域。

[0325] 通过表达载体将条件活性CAR引入细胞毒性细胞。本文还提供了包含编码本发明的条件活性CAR的多核苷酸序列的表达载体。合适的表达载体包括慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、工程化杂交病毒、裸DNA,包括但不限于转座子介导的载体,例如Sleeping Beauty、Piggybak、整合酶(如Phi31)。一些其它合适的表达载体包括单纯疱疹病毒(HSV)表达载体和逆转录病毒表达载体。

[0326] 腺病毒表达载体基于腺病毒,其具有低的整合至基因组DNA的能力但具有高的转染宿主细胞的效率。腺病毒表达载体含有足以:(a)支持表达载体的包装和(b)最终在宿主细胞中表达CAR基因的腺病毒序列。腺病毒基因组是36kb的线性双链DNA,其中可以插入外

源DNA序列(例如CAR基因)以取代大片腺病毒DNA,以制备本发明的表达载体(Grunhaus and Horwitz,“Adenoviruses as cloning vectors,”*Seminars Virol.*,第3卷,第237-252页,1992)。

[0327] 另一种表达载体基于腺相关病毒(AAV),其利用腺病毒偶联系统。这种AAV表达载体具有高的整合到宿主基因组中的频率。它甚至可以感染非分裂细胞,因此使其可用于例如在组织培养物中或在体内将基因递送到哺乳动物细胞中。AAV载体的感染性具有广泛的宿主范围。关于AAV载体的产生和使用的细节描述于美国第5,139,941号和第4,797,368号专利中,上述每篇文献通过引用并入本文。

[0328] 逆转录病毒表达载体能够整合到宿主基因组中,递送大量的外源遗传物质,感染大范围的物种和细胞类型并包装在特殊的细胞系中。通过在某些位置将核酸(例如,编码CAR的核酸)插入病毒基因组中以产生复制缺陷性的病毒来构建逆转录病毒载体。虽然逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型,但是CAR基因的整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂。

[0329] 慢病毒载体衍生自慢病毒,慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,其还含有具有调节或结构功能的其它基因(美国第6,013,516号和第5,994,136号专利)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。通过多次减弱HIV毒力基因产生慢病毒载体,例如,使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失以使载体在生物学上是安全的。慢病毒载体能够感染非分裂细胞,并且可用于体内和离体基因转移和CAR基因的表达(美国第5,994,136号专利,该文献通过引用并入本文)。

[0330] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法将包含条件活性CAR基因的表达载体引入宿主细胞。如果需要,表达载体可以包括用于转染的病毒序列。或者,可以通过融合、电穿孔、基因枪(biolistics)、转染、脂质转染等引入表达载体。宿主细胞可以在导入表达载体之前在培养物中生长和扩增,然后进行适当的处理以引入和整合载体。然后借助载体中存在的标记物扩增和筛选宿主细胞。可以使用的多种标记物包括hprt、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。本文中使用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换使用。在一些实施方案中,宿主细胞为T细胞、NK细胞和NKT细胞。

[0331] 在另一方面,本发明还提供了包含并稳定表达本发明的条件活性CAR的基因工程化细胞毒性细胞。在一个实施方案中,基因工程化细胞包括T淋巴细胞(T细胞)、初始T细胞(T_N)、记忆T细胞(例如中枢记忆性T细胞(TC_M)、效应记忆性T细胞(TE_M)、自然杀伤细胞和能够产生治疗相关后代的巨噬细胞。在另一个实施方案中,基因工程化细胞是自体细胞。合适的T细胞的实例包括CD4⁺/CD8⁻、CD4⁻/CD8⁺、CD4⁻/CD8⁻或CD4⁺/CD8⁺T细胞。T细胞可以是CD4⁺/CD8⁻和CD4⁻/CD8⁺细胞的混合群或单个克隆的群。当在体外与表达靶抗原的细胞(例如CD20⁺和/或CD19⁺肿瘤细胞)共培养时,本发明的CD4⁺T细胞还可以产生IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和其它T细胞效应细胞因子。本发明的CD8⁺T细胞可以溶解表达靶抗原的细胞。在一些实施方案中,T细胞可以是CD45RA⁺CD62L⁺初始细胞、CD45RO⁺CD62L⁻中枢记忆细胞、CD62L⁺效应记忆细胞或其组合中的任何一种或多种(Berger等人,“Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity(病毒特异性和肿瘤特异性T细胞免疫的过继转移),”*Curr.Opin.Immunol.*,第21卷,第224-232页,2009)。

[0332] 可以通过用包含本发明的CAR基因的表达载体稳定转染细胞产生基因工程化细胞

毒性细胞。使用表达载体基因工程化细胞的其它方法包括化学转化方法(例如,使用磷酸钙、树枝状大分子、脂质体和/或阳离子聚合物)、非化学转化方法(例如电穿孔、光学转化、基因电转移和/或水动力递送)和/或基于颗粒的方法(例如,使用基因枪和/或磁转染的刺穿感染(impalefection))。证明存在单个整合的未重排载体并表达条件活性CAR的转染细胞可以离体扩增。

[0333] 用于将表达载体引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见,例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。用于将表达载体引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束,混合胶束和脂质体。

[0334] 无论在基因修饰细胞毒性细胞以表达期望的条件活性CAR之前还是在此之后,可以使用例如在下述文献中描述的方法活化和扩增细胞: 美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和US20060121005。例如,本发明的T细胞可以通过与其上附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂并附着有刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触而扩增。具体地,可以通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触或通过结合有钙离子载体的蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)接触来刺激T细胞群。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适于刺激T细胞增殖的条件下使T细胞与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3和XR-CD28(法国贝桑松Diacclone公司),并且这些可以用于本发明,本领域通常已知的其它方法也可用于本发明(Berg等人, *Transplant Proc.* 30 (8):3975-3977,1998;Haanen等人, *J. Exp. Med.* 190 (9):1319-1328,1999;Garland等人, *J. Immunol. Meth.* 227 (1-2):53-63,1999)。

[0335] 在各种实施方案中,本发明提供了包含药学上可接受的赋形剂和治疗有效量的本发明的条件活性CAR的药物组合物。组合物中的条件活性CAR可以是编码CAR的多核苷酸、包含条件活性CAR的蛋白或表达CAR蛋白的基因修饰的细胞中的任何一种或多种。该CAR蛋白可以是药学上可接受的盐的形式。药学上可接受的盐是指可以在制药工业中作为治疗性蛋白的盐使用的盐,包括例如钠、钾、钙等的盐,以及普鲁卡因、二苄基胺、乙二胺、乙醇胺、甲基葡糖胺、牛磺酸等的铵盐,以及酸加成盐如盐酸盐和碱性氨基酸等。

[0336] 药学上可接受的赋形剂可包括用于制备药物组合物的任何赋形剂,其通常是安全的、无毒的且可取的,并且包括兽医用途以及人用药物可接受的赋形剂。这样的赋形剂可以为固体、液体、半固体,或者在气溶胶组合物的情况下为气态。一种类型的赋形剂包括药学上可接受的载体,其可以被添加以增强或稳定组合物,或者便于组合物的制备。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、甘油、盐水、醇和水。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙、二水合物、白土、硬脂酸镁或硬脂酸、滑石、果胶、阿拉伯胶、琼脂和明胶。载体还可以包括缓释材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,其可单独使用或与蜡一起使用。

[0337] 药学上可接受的载体部分地由施用的特定组合物以及施用该组合物所用的特定

方法来确定。因此,本发明药物组合物具有多种合适的制剂。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的并且通常没有不希望的物质。这些组合物可以通过常规的公知的灭菌技术灭菌。组合物可含有近似生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的CAR浓度可以广泛变化,且主要基于液体体积、粘度和体重并根据所选择的以及患者所需的具体给药模式来选择CAR浓度。

[0338] 在各种实施方案中,可以对本发明的药物组合物进行配制以通过任何合适的给药途径递送。“给药途径”可以指本领域已知的任何给药途径,包括但不限于气雾剂、经鼻给药、口服给药、静脉内给药、肌内给药、腹膜内给药、吸入、经粘膜给药、经皮给药、胃肠外给药、可植入泵、连续输注、局部施用、胶囊和/或注射剂。

[0339] 可以将本发明的药物组合物装入胶囊、压片或制备成用于口服给药的乳剂或糖浆剂。按照药学的常规技术制备药物组合物,该常规技术对于片剂形式而言包括研磨、混合、制粒和压片(当需要时);或对于硬胶囊形式而言包括研磨、混合和填充。当使用液体载体时,制剂可以为糖浆、酏剂、乳剂或水性或非水性悬浮液的形式。这种液体制剂可以直接口服给药或填充到软明胶胶囊中。

[0340] 可以将药物组合物配制为:(a) 液体溶液,例如悬浮在稀释剂(例如水、盐水或PEG 400中)中的有效量的封装的核酸;(b) 胶囊、小药囊或片剂,各含有预定量的活性成分,如液体、固体、颗粒或明胶;(c) 在适当液体中的悬浮液;和(d) 合适的乳液。特别地,合适的剂型包括但不限于片剂、丸剂、粉末、糖衣丸、胶囊、液体、锭剂、凝胶、糖浆剂、浆剂、混悬剂等。

[0341] 固体制剂包含合适的固体赋形剂,例如碳水化合物或蛋白填充剂,包括例如糖,如乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;来自玉米、小麦、稻、马铃薯或其他植物的淀粉;纤维素如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羧甲基纤维素钠;和树胶,包括阿拉伯胶和黄蓍胶;以及蛋白,例如明胶和胶原。可以加入崩解剂或增溶剂,例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐,例如藻酸钠。片剂形式可包括乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、黄蓍胶、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂和药学上可接受的载体。

[0342] 液体悬浮液包含条件活性CAR,与适于制备水性悬浮液的赋形剂混合。这样的赋形剂包括悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶,以及分散剂或湿润剂,例如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七乙烯氧基鲸蜡醇(heptadecaethylene oxycetanol))、环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯)或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯(例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯)的缩合产物。液体悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂,例如蔗糖、阿斯巴甜或糖精。可以调节制剂的重量摩尔渗透压浓度。

[0343] 锭剂形式可包括有风味的活性成分,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶,以及含有在惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶乳液、凝胶等中的锭剂,除了活性成分之外,还

含有本领域已知的载体。已知当口服给药条件活性CAR时,必须使其免于消化。这一般是通过将条件活性CAR与可使其抵抗酸或酶的水解的组合物混合或将条件活性CAR包被于合适的抵抗载体如脂质体中而实现的。使蛋白免于消化的方法是本领域众所周知的。药物组合物可被封装,例如,在脂质体中,或在制剂中,使活性成分缓慢释放。

[0344] 药物组合物可以配制成气雾剂(例如,它们可被“雾化”)以通过吸入给药。气雾剂可被放入加压的可接受的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。适合的直肠给药试剂包括,例如,由栓剂基质包封的核酸组成的栓剂。适合的栓剂基质包括天然或合成的甘油三酸脂或石蜡烃。此外,也有可能使用由基质包封的核酸的组合物组成的明胶直肠胶囊,所述基质包括,例如液体甘油三酸脂、聚乙二醇和石蜡烃。

[0345] 可以配制药组合物以用于肠胃外给药,例如,通过关节内(关节中)、静脉、肌肉、皮内、腹膜内,及皮下途径,包括水性和非水性的等渗无菌注射液,它可包含抗氧化剂、缓冲液、硫双二氯酚和使制剂与接受的血液等渗的溶质,以及水性和非水性的无菌悬浮液,其可包括悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在本发明的操作中,组合物可通过,例如静脉输液、口服、外用、腹膜内、膀胱内或鞘内给药。在一个方面,肠外给药模式是施用含有CAR蛋白和基因工程化细胞毒性细胞的组合物的优选的给药方法。所述组合物可方便地以单位剂量形式给药并可通过制药领域任何众所周知的方法来制备,例如,描述于“Remington药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”,Mack Publishing Co.Easton Pa.,18th Ed.,1990。静脉给药制剂可含有药用载体如无菌水或盐水,聚烷撑二醇如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。

[0346] 药物组合物可以通过至少一种选自下组的模式给药:肠外、皮下、肌肉、静脉、关节内、支气管内、腹腔内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜腔内、胸内、胎儿宫内、膀胱内、药丸、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮给药。该方法可任选地进一步包括在施用条件活性CAR之前、同时或之后,施用至少一种组合物,该组合物含有有效量的至少一种选自以下物质的化合物或蛋白:可检测标记或报告因子、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛剂、麻醉药、非类固醇消炎药(NSAK)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗菌剂、抗牛皮癣剂、皮质类固醇、合成代谢类固醇、促红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑试剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药物、兴奋剂、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或其类似物、细胞毒性剂或其它抗癌剂、抗代谢药,如甲氨蝶呤或抗增殖剂。

[0347] 用本发明的基因工程化细胞毒性细胞或药物组合物治疗的癌症的类型包括癌、母细胞瘤和肉瘤,以及某些白血病或淋巴样恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤(benign and malignant tumors)和恶性肿瘤(malignancies),例如肉瘤、癌和黑色素瘤。癌症可以是非实体瘤(例如血液肿瘤)或实体瘤。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。

[0348] 血液癌症是血液或骨髓的癌症。血液学(或血液性)癌症的实例包括白血病,白血病包括急性白血病(例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性白血病、早幼粒细胞白血病、骨髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞性白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(无痛形式和高级形式)、多发性骨

髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和骨髓增生异常。

[0349] 实体瘤是通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性的或恶性的。按照形成实体瘤的细胞类型命名了不同类型的实体瘤(例如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤如肉瘤和癌的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(例如神经胶质瘤(如脑干胶质瘤和混合型胶质瘤)、成胶质细胞瘤(glioblastoma,也称为glioblastoma multiforme)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0350] 本发明还提供了一种医疗装置,其包含至少一种CAR蛋白、编码CAR的多核苷酸序列或表达CAR的宿主细胞,其中所述装置适于通过选自以下方式的至少一种方式施用所述至少一种条件活性CAR:胃肠外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜腔内、胸内、胎儿宫内、膀胱内、药丸(bolus)、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮方式。

[0351] 在另一方面,本发明提供了试剂盒,其包含第一容器中的冻干形式的至少一种CAR蛋白、编码CAR的多核苷酸序列或表达CAR的宿主细胞,以及任选的第二容器,其包含无菌水、无菌缓冲水或至少一种防腐剂,其选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、亚硝酸苯汞、苯氧乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁、烷基对羟基苯甲酸酯、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或在水性稀释剂中的混合物。一方面,在试剂盒中,使用第二容器的内容物将第一容器中的条件活性CAR或特定部分或变体的浓度复原(reconstituted)为约0.1mg/ml至约500mg/ml的浓度;另一方面,第二容器还包含等渗剂。另一方面,第二容器还包含生理学上可接受的缓冲液。一方面,本发明提供了治疗至少一种野生型蛋白介导的病症的方法,包括向有需要的患者施用试剂盒中提供的并在施用前复原的制剂。

[0352] 还提供了用于人制药用途或诊断用途的制品,其包含包装材料和容器,所述容器包含至少一种CAR蛋白、编码CAR的多核苷酸序列或表达CAR的宿主细胞的溶液或冻干形式。所述制品可任选地包括将所述容器作为下述递送装置或系统的组件:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈管内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜腔内、胸内、胎儿宫内、膀胱内、药丸、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮递送装置或系统。

[0353] 在一些实施方案中,本发明提供了一种方法,其包括从个体中取得细胞毒性细胞,通过将本发明的CAR基因引入该细胞毒性细胞基因来工程化该细胞毒性细胞,并将经基因工程化的细胞毒性细胞施用于个体。在一些实施方案中,细胞毒性细胞选自T细胞、初始T细胞、记忆T细胞、效应T细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞。在一个实施方案中,细胞毒性细胞为

T细胞。

[0354] 在一个实施方案中，T细胞获自个体。T细胞可以从许多来源获得，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的某些实施方案中，可以使用本领域可用的任何数量的T细胞系。在本发明的某些实施方案中，可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术（例如Ficoll™分离）从获自个体的血液中获得T细胞。

[0355] 在一个优选的实施方案中，来自个体的循环血液的细胞通过单采术 (apheresis) 获得。单采术产物通常含有淋巴细胞，包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方案中，可以洗涤通过单采术采集的细胞以除去血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于随后的处理步骤。在本发明的一个实施方案中，用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞。在替代实施方案中，洗涤溶液缺乏钙并且可缺乏镁或可缺乏许多（如果不是全部）二价阳离子。此外，令人惊讶地，在不存在钙的情况下的初始活化步骤导致放大的活化。如本领域普通技术人员容易理解的，洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法，例如通过使用半自动“流通”离心机（例如Cobe 2991细胞处理器，Baxter CytoMate或血细胞回输仪 (Haemonetics Cell Saver) 5）并按照制造商的说明书进行。洗涤后，可以将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液中，例如不含Ca²⁺且不含Mg²⁺的PBS、勃脉力A或者含或不含缓冲液的另一种盐溶液。或者，可以除去单采术样品的不期望的组分，并将细胞直接重悬浮在培养基中。

[0356] 在另一个实施方案中，通过溶解红细胞并排除单核细胞（例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流淘析离心法）从外周血分离T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群，例如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如，通过阴性选择富集T细胞群可以用针对阴性选择的细胞所特有的表面标志物的抗体的组合来实现。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行的细胞分选和/或选择，其使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。为了通过阴性选择来富集CD4⁺细胞，单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中，可能需要富集或阳性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺和FoxP3⁺的调节性T细胞。

[0357] 例如，在一个实施方案中，通过与CD3抗体/CD28抗体（即3×28）缀合的珠（例如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T）孵育足以阳性选择所需T细胞的一段时间来分离T细胞。在一个实施方案中，该时间段为约30分钟。在另一个实施方案中，该时间段范围为30分钟至36小时或更长，以及其间的所有整数值。在另一个实施方案中，所述时间段为至少1、2、3、4、5或6小时。在另一个优选的实施方案中，所述时间段为10-24小时。在一个优选的实施方案中，孵育时间段为24小时。为了从患有白血病的患者中分离T细胞，使用更长的孵育时间（例如24小时）可以增加细胞得率。在与其他细胞类型相比T细胞较少的任何情况下，例如从肿瘤组织或免疫受损个体分离肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 时，可以使用更长的孵育时间来分离T细胞。此外，使用更长的孵育时间可以提高捕获CD8⁺T细胞的效率。因此，通过简单地缩短或延长T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或通过增加或减少珠与T细胞的比例（如在本文中进一步描述的），在培养开始时或在过程中的其它时间点可以优先选择针对的T细胞亚群。此外，通过增加或降低珠或其它表面上的CD3抗体和/或CD28抗体的比例，在培养开始

时或在其它所需的时间点可以优先选择针对的T细胞亚群。技术人员会认识到本发明的情况下也可采用多轮选择。在某些实施方案中,可期望执行选择过程并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。也可以使“未选择的”细胞经历其他轮的选择。

[0358] 然后对获得的细胞毒性细胞进行如本文所述的基因工程化。将编码条件活性CAR的多核苷酸(通常位于表达载体中)引入细胞毒性细胞中,使得细胞毒性细胞将表达,优选稳定表达CAR。通常将编码CAR的多核苷酸整合到细胞毒性细胞宿主基因组中。在一些实施方案中,多核苷酸引入不需要导致整合,而是仅仅瞬时保持所引入的多核苷酸就足够了。以这种方式,可以具有短期效应,其中细胞毒性细胞可以被引入宿主中,然后在预定时间之后开启,例如,在细胞已经能够迁移到特定治疗部位之后开启。

[0359] 根据细胞毒性细胞的性质和待治疗的疾病,可以以各种各样的方式将基因工程化的细胞毒性细胞引入个体(例如,哺乳动物)。可以在肿瘤部位引入基因工程化细胞毒性细胞。在一个实施方案中,基因工程化的细胞毒性细胞导向癌症或被修饰以导向癌症。使用的基因工程化细胞毒性细胞的数量将取决于许多因素,例如环境、引入的目的、细胞的寿命、所使用的方案(例如,施用次数)、细胞增殖的能力和重组构建体的稳定性。基因工程化的细胞毒性细胞可以作为分散体施用,通常在感兴趣的位点处或附近注射。细胞可以在生理上可接受的培养基中。

[0360] 应当理解,治疗方法受许多变量的影响,例如对CAR的细胞应答、细胞毒性细胞表达CAR的效率以及,视情况而定,分泌水平、表达的CAR的活性、个体的特定需要(其可随时间和情况而变化)、基因工程化的细胞毒性细胞丧失或个体细胞的表达活性丧失引起的细胞活性丧失的速率,等等。因此,期望对每个个体患者,即使存在可以对整个群体施用的通用细胞,对每个患者进行针对个体的适当剂量方面的监测,并且这种监测患者的实践在本领域中是常规的。

[0361] 以下实施例是对本发明方法的说明而不是限制。在本领域中通常遇到的并且对于本领域技术人员而言显而易见的对各种条件和参数进行的其它合适的修改和调整在本发明的范围内。

实施例

[0362] 实施例1:用于温度突变的多壁检测(例如,96-孔检测)概述

[0363] 荧光底物被添加到多壁板的每一个孔中,在野生型或新的较低反应温度(例如,上述的37℃或25℃)下保持适当的时间。通过在荧光酶标仪中在适合的激发和发射光谱(例如,320nm激发/405nm发射)下测定荧光来检测荧光。测定相对荧光单位(RFU)。从野生型分子和质粒/载体转化的细胞中获得的上清液作为阳性和阴性对照。对每个样品,各反应温度下,以及阳性和阴性对照进行重复反应。

[0364] 在较低的温度下有活性(例如,突变体在25℃有活性),且在野生型温度下活性下降(例如,在37℃下活性下降10%、20%、30%、40%或更多),因而活性比高于或等于约1.1或以上(例如,在25℃或37℃下的活性比(25℃/37℃)高于或等于1.1或以上)的突变体,可被视为推测的主要温度敏感型苗头突变体(hit)。然后采用相同的检测方法,重新筛选这些推测的主要温度敏感型苗头突变体,以验证任何主要的苗头突变体(primary hit)。

[0365] 实施例2:用于确定温度突变体活性的不同的检测方法(例如,14-mL检测)概述

[0366] 将确定的主要温度敏感型苗头的突变体在14ml培养试管中表达,并在野生型(例如,37℃)和较低的温度(例如,25℃)下测定它们的酶活性。按照上述多壁法表达蛋白并纯化,除了表达是在不同的形式(14ml试管)中进行,而不是多壁(96-孔板)形式。

[0367] 各突变体的上清液被转移至多壁板中,例如96-孔板。在指定的反应温度(野生型,较低温度)下向各管中加入荧光底物,保持所需的一段时间。野生型分子用作阳性对照,来自细胞的仅用载体转化的上清液用作阴性对照。通过在荧光酶标仪中在适合的激发和发射光谱(例如,320nm激发/405nm发射)下测定荧光来检测荧光。测定相对荧光单位(RFU)。对每个样品,各反应温度下,以及阳性和阴性对照进行重复反应。

[0368] 在较低温度(例如,25℃)下有活性,但在野生型(例如,37℃)下显示出活性下降至少30%或以上,因而在较低温度(例如,25℃)下与在野生型温度(例如,37℃)下的活性比等于或高于1.5的突变体,被确定为温度敏感型苗头突变体。

[0369] 将突变体在较低温度(例如,25℃)下的活性与野生型分子在野生型温度(例如,37℃)下的活性进行比较。如果分子较野生型分子在较低温度(例如,25℃)下的活性高,其表示为剩余活性>1,优选为2或高于2,如果突变体在野生型温度(37℃)下较野生型分子显示出总体的活性下降,可确定突变体的表型为温度敏感的突变体。

[0370] 实施例3:所发现的苗头突变体的进一步演变概述

[0371] 如果需要,由前面确定的所有或筛选的突变型产生新的组合变体库。新的文库可被设计成含有各筛选突变体的每个可能的氨基酸变体的组合,并如前述重筛得到新的苗头突变体。

[0372] 实施例4:温度下降后酶活性的可逆性概述

[0373] 通过将突变体暴露于高温下然后返回到较低温度(例如,25℃)下,可进一步检测温度敏感的演变的突变体,以确定是否酶活性在较低温度(例如,25℃)下是可逆的或不可逆的。温度敏感的突变体表达于任何需要的形式中,例如前面所述的14ml培养试管中。检测突变体在几种条件下的活性,包括野生型温度(例如,37℃)以及其它温度,随后再暴露于必须的低温(例如,25℃)。在较低温度下有活性的突变体,当温度上升或升至野生型温度时活性下降(即,在较低和较高温度下的活性比相同或高于1、1.5或2或更高),当再次降至较低温度时显示出基线(baseline)活性,被评分为“可逆型”。在较低温度下有活性的突变体,当温度上升或升高至野生型温度时显示出活性下降(即,在较低和较高温度下的活性比相同或高于1、1.5或2或更高),当温度再次下降至较低温度时显示出至少等量下降的活性,被评分为“不可逆型”。

[0374] 实施例5:筛选条件活性血管抑素变体的材料和方法

[0375] 筛选条件活性血管抑素变体的材料和方法可适用Chi and Pizzo,“在胞外低pH值下血管抑素对肿瘤细胞的直接细胞毒性:依赖于细胞表面相关的ATP合酶的机制(Angiosatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase)”,Cancer Res.2006;66(2):875-882,通过参考并入于此。

[0376] 材料。来自于人纤溶酶原的野生型血管抑素因子1-3,可从Calbiochem(Darmstadt,德国)获得并在无菌PBS中重新配制。直接作用于有催化活性的ATP合酶β亚单位的多克隆抗体可以制备得到,牛F1 ATP合酶亚单位可如前述方法进行纯化(Moser等人,

“血管抑素结合人内皮细胞表面的ATP合酶 (Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells)”, Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2811-6; Moser等人, “内皮细胞表面的F1-F0 ATP合酶在ATP合成中是有活性的并受到血管抑素的抑制 (Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin)”, Proc Natl Acad Sci U S A; 2001;98:6656-61)。卡立泊来德 (Cariporide) 可溶解于无菌水中并进行无菌过滤。

[0377] 细胞培养。A549 (来自肺癌组织的人上皮细胞株) 或其它癌细胞株 (DU145、LNCaP或PC-3细胞) 可以从例如, ATCC获得。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 可以从人脐静脉中分离得到, 如所述 (Grant等人, “在分化中的内皮细胞以基质胶诱导胸腺素h4基因 (Matrigel induces thymosin h 4 gene in differentiating endothelial cells)”, J Cell Sci 1995;108:3685-94)。HUVEC细胞可用来作为在细胞表面表达ATP合酶的细胞系的阳性对照。细胞可培养于含有1%青霉素链霉素和10%血清替代培养基3 (Sigma, St. Louis, MO) 的DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) 中, 以尽量减少纤溶酶原的存在。低pH (6.7) 培养基可通过在5%CO₂条件下减少碳酸氢钠至10mmol/L, 并补充34mmol/L NaCl以保持渗透压, 或在17%CO₂条件下孵育22mmol/L碳酸氢钠培养基来制备。使用的低pH的方法可根据试验限制和检测而不同。

[0378] 流式细胞实验。为了保证ATP合酶在肿瘤细胞株的细胞表面发挥功能, 可采用流式细胞实验。例如, A549细胞株可培养于不同pH培养基 (10、22和44mmol/L碳酸氢钠的DMEM) 中, 在缺氧 (0.5%O₂、5%CO₂, N₂平衡) 与常氧 (21%O₂、5%CO₂) 的条件下培养1、12、24、48和72小时。活细胞可以被阻滞, 与抗β-亚单位抗体孵育, 洗涤、阻滞, 与羊抗兔FITC标记的二抗 (Southern Biotech, Birmingham, AL) 孵育, 再次洗涤, 所有步骤于4℃下进行。碘化丙啶 (BD Biosciences, San Jose, CA) 可包含于所有样本中以区别具有受损细胞膜的细胞。10,000个细胞FITC的平均荧光强度可通过FACSCalibur流式细胞仪 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 进行定量, 摄入碘化丙啶的细胞可以被排除, 以消除线粒体ATP合酶在CellQuest软件 (BD Biosciences) 中的检测。

[0379] 细胞表面ATP生成检测。96-孔板中的A549或1-LN细胞 (每孔60,000个细胞) 可加入新鲜的培养基并用血管抑素、血管抑素变体、抗β-亚单位抗体、兔抗牛血清白蛋白IgG (Organon Teknika, West Chester, PA)、芪类化合物 (piceatannol) (已知的ATP合酶F1的抑试剂作为阳性对照, Sigma) 处理, 或单独将培养基置于37℃, 5%CO₂中30分钟。然后细胞与0.05mmol/L ADP孵育20秒。移走上清液, 采用如 (23) 描述的CellTiterGlo发光检测 (Promega, Madison, WI) 检测产生的ATP。细胞裂解液可进行类似的分析以确定细胞内的ATP池在任何条件下无差异。可通过Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) 进行记录。数据是基于各独立试验的标准测定, 以每个细胞ATP的摩尔数来表示。

[0380] 细胞增殖检测。血管抑素对癌细胞株的影响可用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐、内盐 (inner salt) (MTS) 在无血清培养基中的增殖检测来评价。在37℃, 5%CO₂中孵育20小时后, 在存在或不存在血管抑素情况下, 96-孔板的各孔中的相对细胞数可按照制造商的方案 (protocol) 采用Aqueous单细胞增殖检测 (Promega) 来测定。培养基的pH值可在5%CO₂条件下通过改变碳酸氢盐浓度来调节。

[0381] 细胞的细胞毒性评估。为了量化细胞死亡和细胞裂解, 从细胞质释放到上清液中

的乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性,可用细胞毒性检测试剂盒 (Roche, Indianapolis, IN) 进行测定。用血管抑素、血管抑素变体,抗 β -亚单位抗体、兔IgG、卡立泊来德 (cariporide) 和 Triton X (用于透化细胞的去污剂) 处理的癌细胞 (例如A549细胞) (每孔5,000个细胞) 可分别在37℃, 5%CO₂或17%CO₂, 中性和低pH条件下孵育15小时。细胞毒性指数可用四份处理样本的平均吸收度除以对应于相同pH培养基的四份未处理样本的平均吸收度计算得到。细胞坏死和凋亡的评价。为了确定血管抑素诱导的细胞坏死模式,可进行组蛋白-DNA ELISA。血管抑素、血管抑素变体、抗 β -亚单位抗体、兔IgG和卡立泊来德 (cariporide) 对A549细胞的影响 (每孔5,000个细胞) 可采用ELISA细胞凋亡和坏死检测 (Roche) 来确定,取决于核外组蛋白-DNA片段的检测。细胞凋亡或坏死可分别由在含或不含试剂的条件下,在37℃孵育15小时之后四份样本的细胞裂解液或上清液来确定。细胞凋亡或坏死指数可通过四份处理样本的平均吸收度除以对应于相同pH值培养基的四份未处理样本的平均吸收度来计算得到。培养基的pH值可由在5%CO₂或17%CO₂条件下进行孵育来调节。

[0382] 细胞内pH值 (pHi) 测定。pHi可根据带有盖玻片的35mm微孔盘 (MatTek, Ashland, MA) 中细胞的荧光来测定。细胞可被置于细胞生长因子减少的、不含酚红的Matrigel (BD Biosciences) 中。过夜生长后,更换培养基,并向细胞中加入pH敏感的荧光染料cSNARF (Molecular Probes, Eugene, OR), 15分钟后置于新鲜的培养基中20分钟恢复。然后细胞被放入37℃, 5%CO₂的显微镜平台 (stage) 上1小时,收集发射光谱,从各含7个细胞和15个细胞之间的区域中计算得到pHi (Wahl ML, Grant DS. “胞外pH值的微环境和胞外基质蛋白对血管抑素活性和胞内pH值的影响 (Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin's activity and on intracellular pH)”, Gen Pharmacol 2002;35:277-85)。在开始收集光谱时,从盘中去掉培养基,将细胞置于1mL含或不含pH抑试剂血管抑素、抗 β -亚单位、兔IgG或卡立泊来德 (cariporide) ——一种钠氢交换抑试剂的新鲜培养基中。培养基的pH值可在如上所述固定的5%CO₂条件下通过改变碳酸氢盐浓度来调节。

[0383] 实施例6:scFv条件活性抗体的产生

[0384] 药物靶X的两种条件活性抗体 (CAB-scFv-63.9-4和CAB-scFv-63.9-6) 表达为具有野生型人IgG1 Fc的同源二聚体 (产生图2-3所示的二价抗体CAB-scFv-63.9-4-01和CAB-scFv-63.9-6-01) 以及在“杵臼”体系中表达为异源二聚体,产生单价scFv (产生图2-3中的单价抗体scFv CAB-scFv-63.9-4-02和CAB-scFv-63.9-6-02)。

[0385] 通过ELISA测定测量这些抗体在pH 6.0和pH 7.4下对药物靶X的结合亲和力。如图2所示,scFv抗体在pH 6.0和pH 7.4下都显示出对药物靶X的亲和力,这与全二价 (full bivalent antibodies) 抗体相当。此外,如图3所示的这些scFv抗体在pH 6.0和pH 7.4下的选择性也与全二价抗体相当。该实施例证明本发明的条件活性抗体具有与scFv抗体或全二价抗体相当的亲和力和选择性。因此,本发明的条件活性抗体可以作为单个DNA链插入在本发明的CAR-T平台中编码CAR的DNA分子中。

[0386] 实施例7:CAR-T细胞

[0387] 根据本发明的一个实施方案,通过同时筛选在pH 6.0和pH 7.4下的选择性和亲和力以及表达水平产生药物靶X的条件活性抗体。使用FLAG标签在血清中进行筛选,因为在血清中存在可能导致假阳性筛选的人抗体。筛选缓冲液为碳酸盐缓冲液 (具有Ringer-标准缓

冲液的krebs缓冲液,但不同于PBS)。发现所产生的条件活性抗体在pH 6.0下与野生型抗体相比对药物靶X具有更高的亲和力,但是在pH 7.4下与野生型抗体相比对相同的药物靶X具有更低的亲和力。此外,这些条件活性抗体都具有如下表2所示的高表达水平,其中“克隆”列显示抗体,表达水平“mg/ml”显示在第二列中。

[0388] 将这些抗体的克隆以及所要求的表达水平(“订购量(amount ordered)”,预期表达水平)发送给服务提供商。然而,这些抗体的实际表达水平(“交付量”)非常高并且超过预期的表达水平。

[0389] 表2高表达水平的条件活性抗体

[0390]

克隆	mg/ml	订购量	交付量
BAP063.6-hum10F10-FLAG	7	150	294
BAP063.6-HC-H100Y-FLAG	6.6	150	238
BAP063.8-LC046HC04-FLAG	7	200	332.5
BAP063.8-LC062HC02-FLAG	5.8	200	220.4
BAP063.9-13-1-FLAG	5.3	50	123
BAP063.9-29-2-FLAG	4.9	50	102
BAP063.9-45-2-FLAG	5.4	50	129
BAP063.9-13-3-FLAG	5.9	50	130
BAP063.9-21-3-FLAG	5.3	50	117
BAP063.9-21-4-FLAG	7	50	176
BAP063.9-29-4-FLAG	8.2	50	196
BAP063.9-48-3-FLAG	7	50	125
BAP063.9-49-4-FLAG	5.3	50	126
BAP063.9-61-1-FLAG	5.1	50	97
BAP063.9-61-2-FLAG	5	50	92

[0391] 以BAP063.9-13-1抗体为例,条件活性抗体在缓冲液中不显示聚集,如图4所示。通过尺寸排阻色谱分析BAP063.9-13-1抗体。在图4中,仅检测到一个峰,表明抗体很少聚集或没有聚集。

[0392] 也使用表面等离子体共振 (SPR) 测定条件活性抗体以测量它们对药物靶X的结合和解离速率。已知SPR测定用于测量条件活性抗体的结合和解离速率。在碳酸氢盐存在下进行SPR测定。条件活性抗体的体内结合和解离速率(在动物和人中)是条件活性抗体的非常重要的特征。

[0393] 观察到,与阴性对照(BAP06310F10,其在pH 6.0和pH 7.4下具有相似的结合速率)相比,条件活性抗体在pH 6.0下具有快的结合速率,在pH 7.4下具有更慢的结合速率(图5)。此外,将温度从室温升至60℃不会显著改变SPR测定结果(图5)。SPR测定还显示,与pH 7.4相比,这些条件活性抗体在pH 6.0下是高度选择性的(图6A-6B显示了一种抗体作为实例)。

[0394] 将条件活性生物抗体总结于表3中。所述抗体中的两种表达为scFv (BAP063.9-13.3和BAP063.9-48.3),其准备被插入至CAR-T平台中的CAR中。将抗体在60℃孵育1小时未改变大多数抗体的亲和力(“热稳定性”)。在使用SPR于pH 6.0和pH 7.4下测量结合活性的两列报告数据中(表3的最后两列),与“BAP063.6-hum10F10-FLAG”(阴性对照,表3第二行)进行了对比。这些抗体的选择性可以通过最后两列中的数据之间的差异来确定。两种scFv抗体具有非常高的选择性(与pH 7.4下的0%相比,在pH 6下的选择性为75%和50%)。

[0395]

表3 条件活性抗体总结

克隆	CAR scFv	mg/ml	聚集 (PS, pH 7.4)	热稳定性 (1 h 60 °C)	热处理后 pH 7.4 处 的结合强度	K _a [M]	K _d s ⁻¹	K _D [M] pH 6.0	SPR 活性 pH 6.0	SPR 活性 pH 7.4
BAP063.6-hum10F10-FLAG		7	0	100%	0	5.34E+06	8.38E+04	1.63E+10	100%	100%
BAP063.6-8C-H10Y-FLAG		6.6	N.D.			2.41E+06	5.13E+03	2.13E+09	80%	40%
BAP063.9-13-3-FLAG	Δ	5.3	0	100%	0	1.98E+06	2.58E+03	1.46E+09	100%	75%
BAP063.9-29-2-FLAG		4.9	0	100%	0	1.39E+06	2.14E+03	1.79E+09	90%	50%
BAP063.9-45-2-FLAG		5.4	0	0%	0	1.53E+06	2.33E+03	1.51E+09	75%	25%
BAP063.9-13-3-FLAG	Δ	5.9	0	100%	0	1.42E+06	1.82E+03	1.28E+09	75%	0%
BAP063.9-21-3-FLAG		5.3	0	100%	0	1.53E+06	4.13E+03	2.68E+09	50%	25%
BAP063.9-21-4-FLAG		7	0	100%	0	1.03E+06	3.28E+03	3.36E+09	50%	0%
BAP063.9-29-2-FLAG		8.2	0	100%	0	1.48E+06	2.21E+03	1.59E+09	75%	0%
BAP063.9-48-3-FLAG	Δ	7	45%	0%	0	8.92E+05	2.34E+03	2.61E+09	50%	0%

[0396] 本文提及的所有文献通过引用整体并入本文,或者提供它们特别依赖的公开内容。

[0397] 应当理解,尽管在前面的描述中已经阐述了本发明的众多特征和优点以及本发明的结构和功能的细节,但是该公开仅是说明性的,且可以在由所附权利要求表达的、术语的宽泛一般含义所指示的全部范围内,在本发明的原理下进行详细的改变,尤其是对部件的形状、尺寸和布置进行该改变。

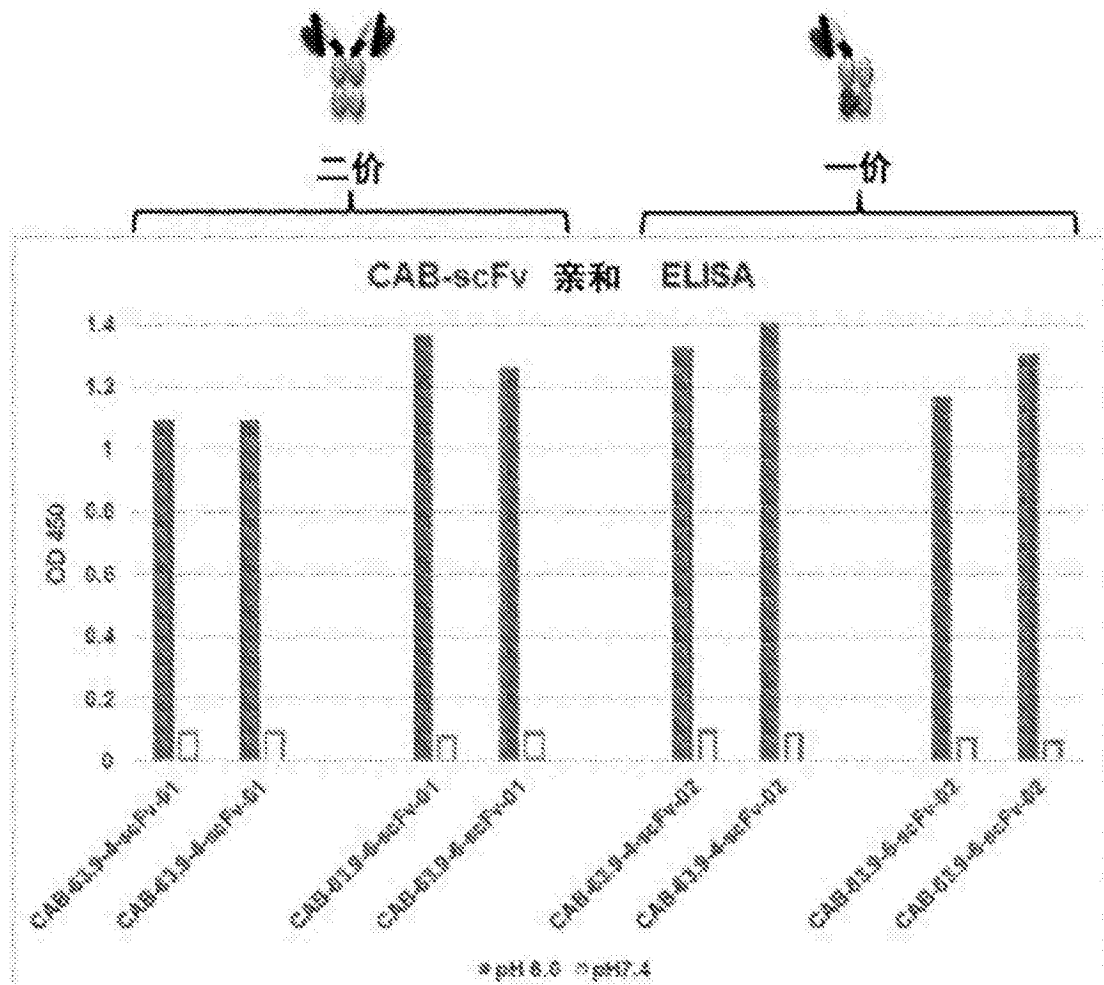


图2

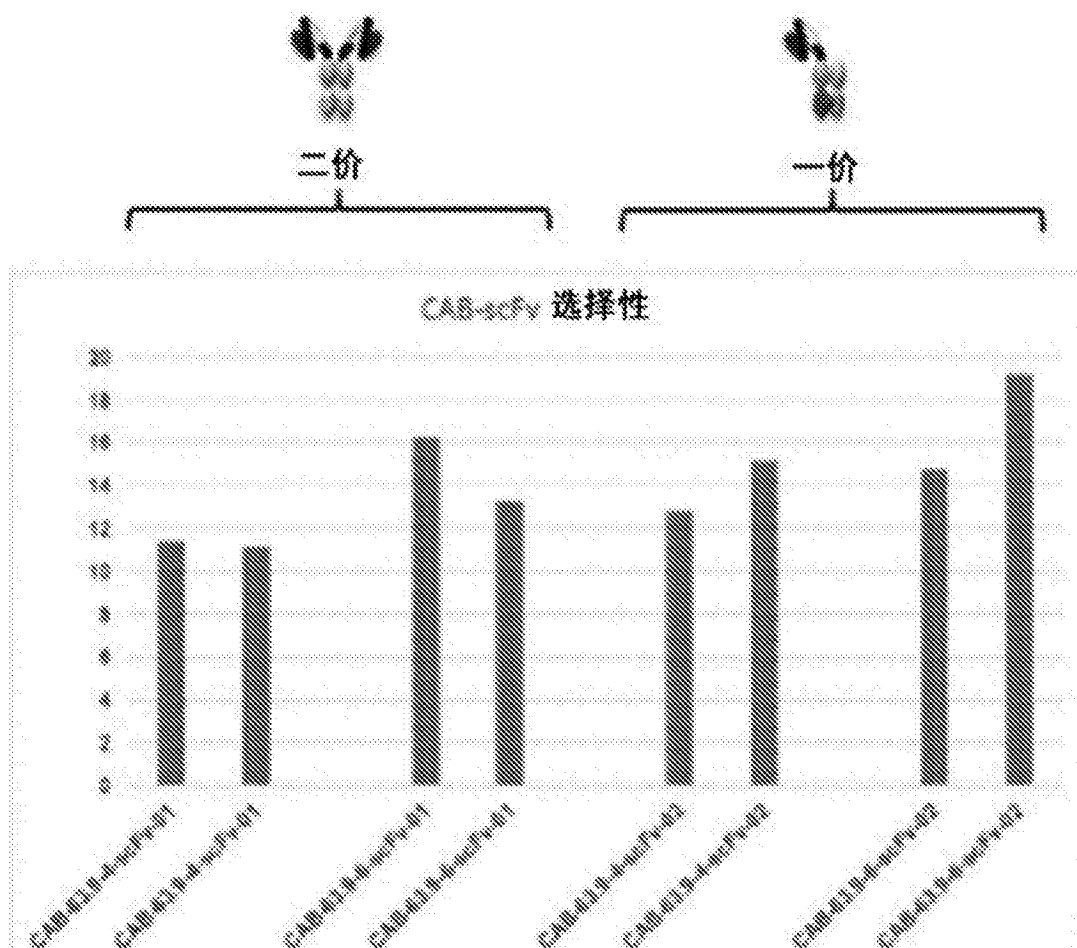


图3

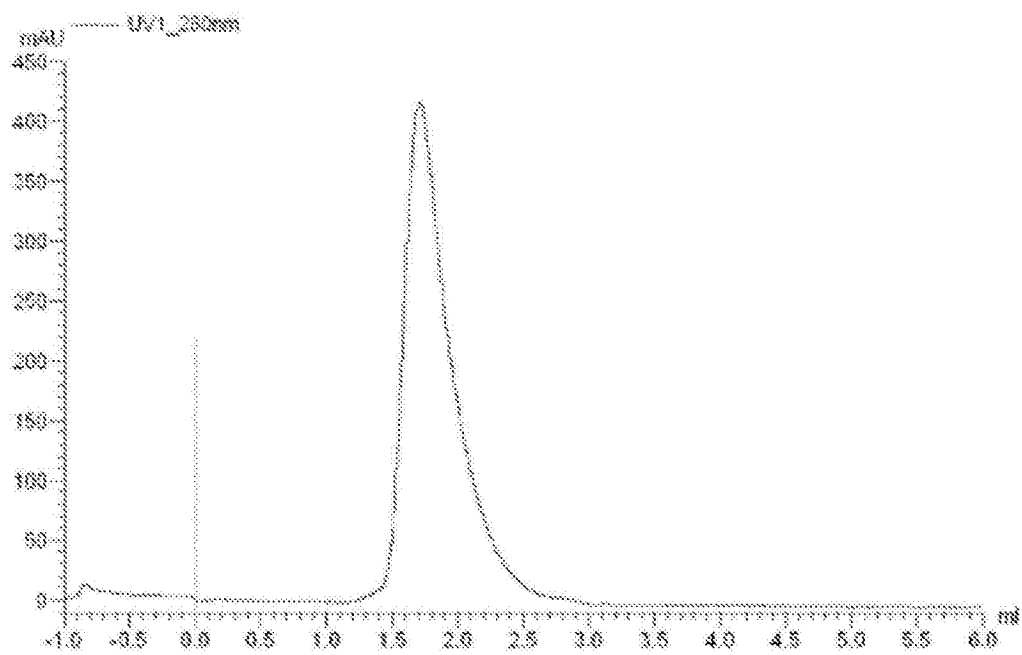


图4

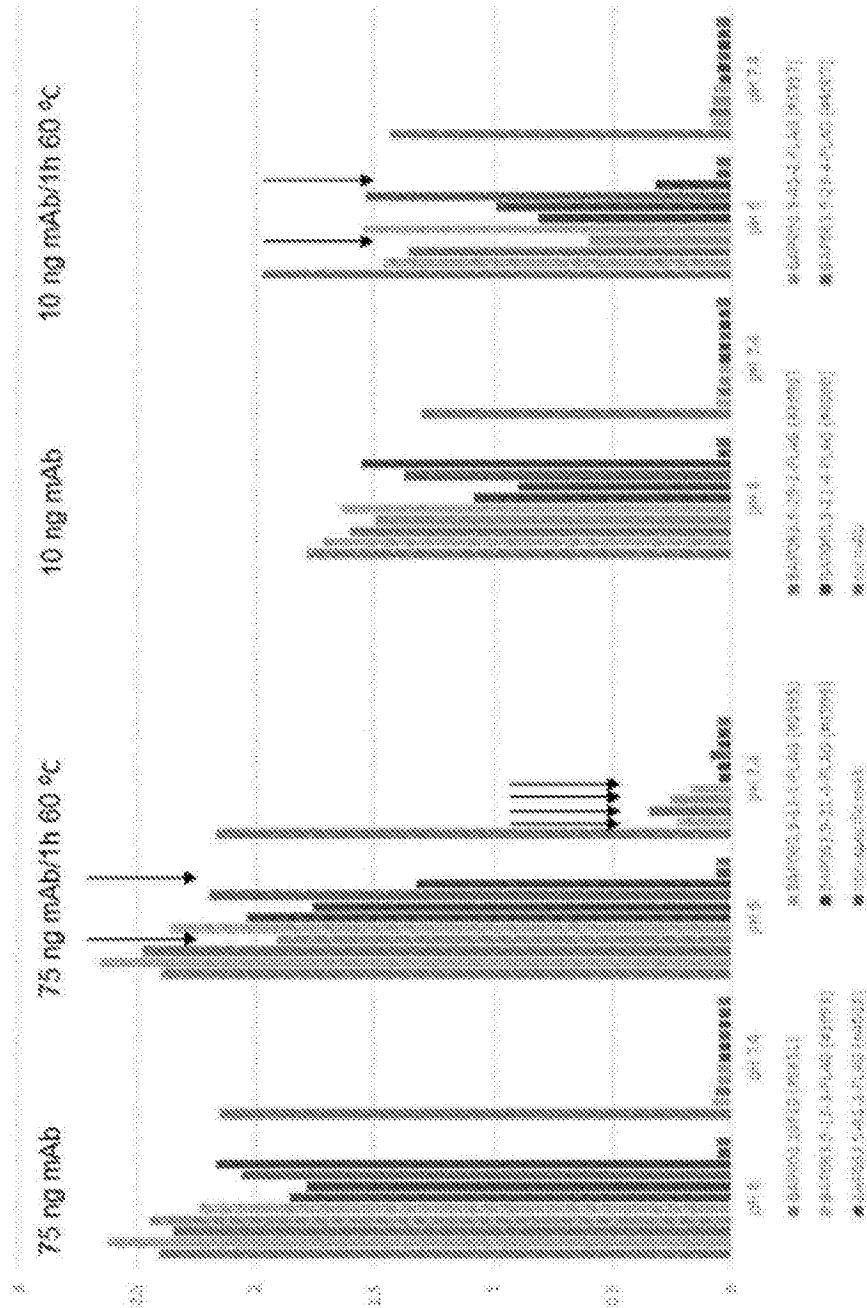


图5

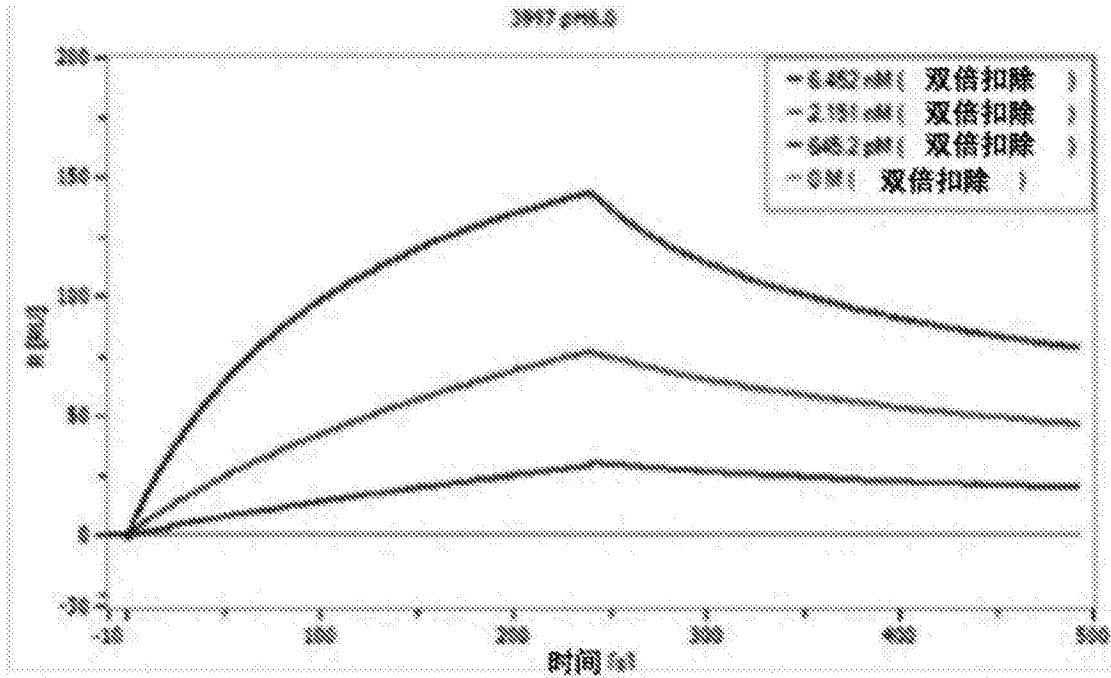


图6A

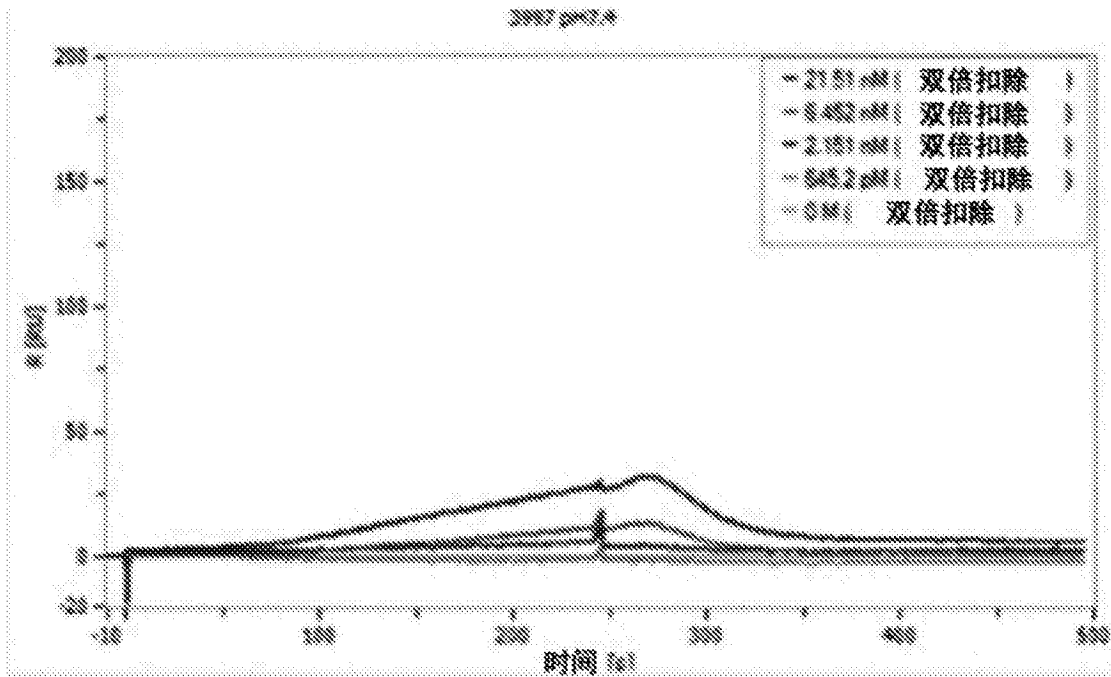


图6B