(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110461363 B
(45)授权公告日 2024.04.02

(21)申请号 201880022534.0
(22)申请日 2018.03.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110461363 A
(43)申请公布日 2019.11.15
(30)优先权数据
62/472,275 2017.03.16 US
62/580,243 2017.11.01 US
62/584,060 2017.11.09 US
PCT/US18/013213 2018.01.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/022974 2018.03.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/170458 EN 2018.09.20

(73)专利权人 综合医院公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 M·V·毛斯 I·斯卡福
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 岑晓东 罗天乐

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 105749276 A,2016.07.13
US 2009274692 A1,2009.11.05
US 2015329640 A1,2015.11.19
WO 2016016344 A1,2016.02.04

审查员 李小晶

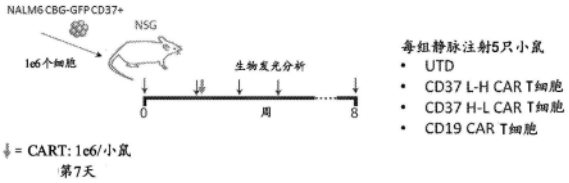
权利要求书2页 说明书33页
序列表14页 附图30页

(54)发明名称

靶向CD37的嵌合抗原受体

(57)摘要

本文描述了靶向CD37的嵌合抗原受体(CAR),以及相关的分子和方法。



CN 110461363 B

1.一种嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含:

a)结合CD37的细胞外结构域,其中该结合CD37的细胞外结构域包含如SEQ ID NO:4所示的抗体轻链可变域和如SEQ ID NO:2所示的抗体重链可变域;

b)跨膜结构域;以及

c)T细胞细胞内信号传导结构域。

2.如权利要求1所述的CAR多肽,其还包括共刺激结构域。

3.如权利要求1所述的CAR多肽,其中该结合CD37的细胞外结构域包含抗体试剂。

4.如权利要求3所述的CAR多肽,其中该抗体试剂包含单链抗体(scFv)。

5.如权利要求4所述的CAR多肽,其中该scFv包含在该抗体重链可变域的N-端的该抗体轻链可变域。

6.如权利要求4所述的CAR多肽,其中该scFv包含在该抗体轻链可变域的N-端的该抗体重链可变域。

7.如权利要求4所述的CAR多肽,其中该单链抗体(scFv)包含选自SEQ ID NO:1或5的序列。

8.如权利要求1所述的CAR多肽,其中该跨膜结构域包含来自CD8或4-1BB的跨膜结构域。

9.如权利要求8所述的CAR多肽,其中该跨膜结构域包含SEQ ID NO:12或18的序列。

10.如权利要求2所述的CAR多肽,其中该共刺激结构域包含4-1BB的共刺激结构域。

11.如权利要求10所述的CAR多肽,其中该共刺激结构域包含SEQ ID NO:13或19的序列。

12.如权利要求1所述的CAR多肽,其中该T细胞细胞内结构域包含CD3ζ细胞内信号传导结构域。

13.如权利要求12所述的CAR多肽,其中该CD3ζ细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:14或20的序列。

14.如权利要求12所述的CAR多肽,其中该CD3ζ细胞内信号传导结构域包含1、2或3个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),并且保留该一个或多个ITAM的天然酪氨酸残基。

15.如权利要求1所述的CAR多肽,其包含SEQ ID NO:9或15的序列。

16.一种哺乳动物细胞,其包含:

a)如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽;或

b)编码如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽的核酸。

17.如权利要求16所述的细胞,其中该细胞是T细胞。

18.如权利要求16所述的细胞,其中该细胞是人类细胞。

19.如权利要求16至18中任一项所述的细胞,其中该细胞是从患有或被诊断患有癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的个体获得的。

20.编码如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽的核酸制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括:

a)工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽;并

b)将工程化的T细胞给予该受试者。

21.如权利要求16至19中任一项所述的细胞制备供一种在有需要的受试者中治疗癌

症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括将如权利要求16至19中任一项所述的细胞给予该受试者。

22.如权利要求20或21所述的用途,其中该癌症是CD37+癌症。

23.如权利要求22所述的用途,其中该CD37+癌症是淋巴瘤或白血病。

24.如权利要求23所述的用途,其中该淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B细胞淋巴母细胞性淋巴瘤或T细胞淋巴瘤,或者该白血病是急性髓性白血病(AML)。

25.如权利要求24所述的用途,其中该T细胞淋巴瘤是外周T细胞淋巴瘤(PTCL)。

26.如权利要求25所述的用途,其中该PTCL是皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

27.如权利要求16至19中任一项所述的细胞制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括将如权利要求16至19中任一项所述的细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列,并且该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

28.编码如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽的核酸制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括:

a)选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;

b)工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽;并

c)将工程化的T细胞给予该受试者;

其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

29.如权利要求16至19中任一项所述的细胞制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括:

a)选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;并

b)将如权利要求16至19中任一项所述的细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列,并且该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

30.编码如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽的核酸制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括:

a)工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽;并

b)将工程化的T细胞给予该受试者;

其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

31.如权利要求16至19中任一项所述的细胞制备供一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法使用的药物的用途,该方法包括将如权利要求16至19中任一项所述的细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列;

其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

32.一种组合物,该组合物包含如权利要求1至15中任一项所述的CAR多肽或如权利要求16至19中任一项所述的细胞,被配制为用于治疗癌症。

33.如权利要求32所述的组合物,该组合物还包含药学上可接受的载体。

靶向CD37的嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本文所述的技术涉及免疫疗法。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(CAR)提供了一种将细胞毒性T细胞应答指向表达所选靶抗原(最常见的是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原)的靶细胞的方法。CAR是对T细胞受体的适应,其中抗原结合结构域被特异性结合衍生的靶抗原的抗体的抗原结合结构域替代。通过在T细胞(“CAR T细胞”或“CAR-T”)上表达的CAR使靶抗原接合在靶细胞表面上促进靶细胞的杀伤。

发明内容

[0003] 本发明提供嵌合抗原受体(CAR)多肽,各自包括:(a)包含CD37结合序列的细胞外结构域;(b)跨膜结构域;以及(c)T细胞细胞内信号传导结构域。这些CAR多肽可各自还包括任选的共刺激结构域。

[0004] 在各种实施例中,该CD37结合序列包括抗体试剂,例如像单链抗体(scFv)。该scFv可包括抗体重链N端的抗体轻链,或者该scFv可以包括抗体轻链N端的抗体重链。在具体实例中,该抗体轻链包括SEQ ID NO:4或6的序列或其变体,和/或该重链包括SEQ ID NO:2或8的序列或其变体。在其他具体实例中,该抗体试剂包含选自SEQ ID NO:1或5的序列或其变体。

[0005] 在各种实施例中,跨膜结构域包括CD8或4-1BB的跨膜结构域。在具体实例中,该跨膜结构域包括SEQ ID NO:12或18的序列或其变体。以下提供可包括在CAR多肽中的跨膜结构域的其他实例。

[0006] 在各种实施例中,该共刺激结构域包括4-1BB的共刺激结构域。在具体实例中,该共刺激结构域包括SEQ ID NO:13或19的序列或其变体。以下提供可包含在CAR多肽中的共刺激结构域的其他实例。

[0007] 在各种实施例中,该T细胞细胞内结构域包括CD3ζ细胞内信号传导结构域。在具体实例中,该CD3ζ细胞内信号传导结构域包括SEQ ID NO:14或20的序列或其变体。在具体实例中,该CD3ζ细胞内信号传导结构域包括1个、2个或3个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),并且保留该一个或多个ITAM的天然酪氨酸残基。

[0008] 在具体的实施例中,该CAR多肽包括SEQ ID NO:9或15的序列或其变体。

[0009] 本发明还提供哺乳动物细胞,其包含:(a)如上文或本文其他地方所述的CAR多肽,或(b)编码本文或本文其他地方所述的任何一种CAR多肽的核酸。

[0010] 在各种实施例中,该细胞是T细胞和/或人类细胞。在各种实施例中,该细胞(例如,T细胞)是从患有或被诊断患有癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的个体(例如,人)获得的。

[0011] 本发明还提供了在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法可包括:(a)工程化T细胞以在T细胞表面上包含或表达如上文或本文其他地方所述的CAR多肽;及(b)将工程化的T细胞给予受试者。

[0012] 本发明另外包括在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法可包括将如上文或本文其他地方所述的一种或多种细胞给予受试者。

[0013] 在上文和本文其他地方描述的方法的各种实施例中,该癌症是CD37+癌症。例如,该CD37+癌症可以是淋巴瘤或白血病。在具体实例中,该淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B细胞淋巴母细胞性淋巴瘤或T细胞淋巴瘤,或者该白血病是急性髓性白血病(AML)。在另一具体实例中,该T细胞淋巴瘤是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),例如,皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0014] 本发明还提供了在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法包括将如上文和本文其他地方所述的细胞给予受试者,其中该细胞包括含有细胞外结构域的CAR,所述细胞外结构域包含CD37结合序列(例如,如本文所述),并且该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0015] 此外,本发明提供了治疗有需要的受试者(例如,人类患者)中的癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法包括:(a)选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;(b)工程化T细胞以包含如上文或本文其他地方所述的CAR多肽;及(c)将工程化的T细胞给予受试者;其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0016] 本发明另外提供了在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法包括(a)选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;(b)将如上文或本文其他地方所述的细胞给予受试者,其中该细胞包括含有细胞外结构域的CAR,所述细胞外结构域包含CD37结合序列(例如,如本文所述);其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0017] 本发明还提供了在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法包括(a)工程化T细胞以在T细胞表面上包含或表达上文或本文其他地方描述的CAR多肽;以及(b)将工程化的T细胞给予受试者;其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0018] 本发明还提供了在有需要的受试者(例如,人类患者)中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法。这些方法包括将如上文或本文其他地方所述的细胞给予受试者,其中该细胞包括含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列(例如,如本文所述);其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0019] 本发明还提供包含一种或多种上文或本文其他地方所述的CAR多肽、核酸分子或细胞(例如,T细胞)的组合物,所述组合物配制用于癌症治疗。这些组合物可还包括药学上可接受的载体。

[0020] 本发明进一步提供本文所述的多肽、核酸分子、组合物和细胞在治疗或预防本文所述的疾病或病症中的用途,以及这些多肽、核酸分子、组合物和细胞在预防或治疗这些疾病或病症的药物的制备中的用途。

[0021] 定义

[0022] 为方便起见,下文提供说明书、实例和所附权利要求书中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或上下文中隐含的,否则以下术语和短语包括以下提供的含义。提供这些定义是为了帮助描述特定实施例,并且不旨在限制所要求保护的技术,因为本技术的

范围仅由权利要求限制。除非另外定义,否则所有在此使用的技术和科学术语具有与本技术所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的意思。若本领域术语的使用与本文提供的定义之间存在明显差异,则以本说明书中提供的定义为准。

[0023] 免疫学和分子生物学中常见术语的定义可以在The Merck Manual of Diagnosis and Therapy[默克诊断和疗法手册],第19版,Merck Sharp&Dohme Corp.[默沙东公司]出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3)中找到。Robert S.Porter等人(编),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine[分子细胞生物学和分子医学百科全书],Blackwell Science Ltd.[布莱克威尔科学有限公司]出版,1999-2012(ISBN9783527600908);及Robert A.Meyers(编),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference[分子生物学和生物技术:全面的案头参考],VCH Publishers,Inc.[VCH出版社有限公司]出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Werner Luttmann,Immunology[免疫学],Elsevier[爱思唯尔]出版,2006;Janeway著Immunobiology[免疫生物学],Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编),Taylor&Francis Limited(泰勒与弗朗西斯有限公司),2014(ISBN 0815345305,9780815345305);Lewin,Genes XI[基因XI],Jones&Bartlett Publishers[琼斯和巴特利特出版社]出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约州,美国(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学的基本方法],Elsevier Science Publishing,Inc.[爱思唯尔科学出版有限公司],纽约,美国(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA[酶学的实验室方法:DNA],Jon Lorsch(编),Elsevier(爱思唯尔),2013(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology(CPMB)[分子生物学实验指南(CPMB)],Frederick M.Ausubel(编),John Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],2014(ISBN 047150338X,9780471503385),Current Protocols in Protein Science(CPPS)[蛋白质科学实验指南(CPPS)],John E.Coligan(编),John Wiley and Sons,Inc.[约翰·威利父子出版公司],2005;及Current Protocols in Immunology(CPI)[免疫学实验指南(CPI)](John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe,(编)John Wiley and Sons,Inc.[约翰·威利父子出版公司],2003(ISBN 0471142735,9780471142737),各参考文献的内容通过引用以其全文并入本文。

[0024] 术语“降低(decrease)”、“减少(reduced/reduction)”或“抑制(inhibit)”在本文中均用于表示降低统计学上显著的量。在一些实施例中,“减少(reduce/reduction)”或“降低(decrease)”或“抑制(inhibit)”典型地意指与参考水平(例如,不存在给定的治疗或药剂)相比降低至少10%并且可以包括,例如,降低至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多。如本文所用,“减少(reduction)”或“抑制(inhibition)”不包括与参考水平相比完全抑制或减少。“完全抑制”是与参考水平相比100%抑制。在适用的情况下,降低可以优选地降至未患给定障碍的个体的正常范围内而被接受的水平。

[0025] 术语“增加(increased/increase)”、“增强(enhance)”或“活化(activate)”在本文中均用于表示增加统计学上显著的量。在一些实施例中,术语“增加的(increased/increase)”、“增强(enhance)”或“活化(activate)”可意指与参考水平相比增加至少10%,例如,增加至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或高达且包括100%的增加,或者与参考水平相比10%-100%之间的任何增加,或者与参考水平相比至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加,或2倍与10倍之间或更多的任何增加。在标记物或症状的背景下,“增加(increase)”是这种水平的统计学上的显著增加。

[0026] 如本文所用,“受试者”意指人或动物。通常该动物是脊椎动物,如灵长类动物、啮齿动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括,例如黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括,例如小鼠、大鼠、土拨鼠、白鼬、兔子和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括,例如牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物(例如家猫)、犬科动物(例如狗)、狐狸、狼,鸟类(例如鸡、鸸、鸵鸟)以及鱼类(例如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。在一些实施例中,该受试者是哺乳动物,例如灵长类动物(例如人)。本文中术语“个体”、“患者”和“受试者”可互换使用。

[0027] 优选地,该受试者是哺乳动物。该哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病(例如癌症)的动物模型的受试者。受试者可以是雄性或雌性。

[0028] 受试者可以是如下的受试者,其先前被诊断患有或被鉴定为遭受或患有需要治疗的病症(例如,白血病或其他类型的癌症等)或与这种病症相关的一种或多种并发症,并且任选地,已经进行了对该病症或与该病症有关的一种或多种并发症的治疗。可替代地,受试者也可以是先前未被诊断为患有这种病症或相关并发症的受试者。例如,受试者可以是展现出该病症一种或多种风险因素或与该病症相关的一种或多种并发症的的受试者,或未展现出风险因素的受试者。

[0029] 对特定病症的治疗“有需要的受试者”可以是患有该病症、被诊断为患有该病症或有患该病症的风险的受试者。

[0030] “疾病”是动物(例如,人)的如下健康状态,在这种状态中该动物不能维持体内平衡,并且在这种状态中如果疾病没有改善,则该动物的健康继续恶化。相反,动物中的“障碍”是如下健康状态,在这种状态中动物能够维持体内平衡,但在这种状态中动物的健康状况不如没有该障碍时的健康状态。如果不治疗,障碍不一定会导致动物的健康状态进一步降低。

[0031] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”和“癌抗原”可互换使用,是指由癌细胞差异化表达的抗原,并且从而可加以利用以靶向癌细胞。癌抗原是可以潜在地刺激明显肿瘤特异性免疫应答的抗原。这些抗原中的一些被正常细胞编码,但不一定被正常细胞表达。这些抗原可以表征为在正常细胞中通常沉默(即,不表达)的那些、仅在某些分化阶段表达的那些以及暂时表达的那些(如胚胎和胎儿抗原)。其他癌抗原由突变型细胞基因编码,如癌基因(例如,活化的ras癌基因)、抑制基因(例如,突变型p53)和由内部缺失或染色体易位导致的融合蛋白。仍其他的癌抗原可以由病毒基因编码,如RNA和DNA肿瘤病毒上携带的基因。已经从多种实体瘤角度定义了许多肿瘤抗原:MAGE 1、2和3,按免疫力定义;MART-1/Melan-A、gp100、癌胚抗原(CEA)、HER2、粘蛋白(即,MUC-1)、前列腺特异性抗原(PSA)和前列腺酸性磷

酸酶(PAP)。此外,已经显示病毒蛋白(如乙型肝炎病毒(HBV)、埃巴病毒(EBV)和人乳头瘤病毒(HPV)编码的一些病毒蛋白)分别在肝细胞癌、淋巴瘤和宫颈癌的发展中是重要的。

[0032] 如本文所用,术语“嵌合”是指至少两种或更多种不同多核苷酸分子的部分融合的产物。在一个实施例中,术语“嵌合”是指通过操纵已知元件或其他多核苷酸分子产生的基因表达元件。

[0033] 在一些实施例中,“活化”可以指已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。在一些实施例中,活化可以指诱导的细胞因子产生。在其他实施例中,活化可以指可检测的效应子功能。至少,如本文所用的“活化的T细胞”是增殖性T细胞。

[0034] 如本文所用,术语“特异性结合”(“specific binding”和“specifically bind”)是指两个分子、化合物、细胞和/或颗粒之间的物理相互作用,其中第一个实体与第二个实体(即靶标)的结合比其与非靶标的第三个实体的结合具有更大的特异性和亲和力。在一些实施例中,特异性结合可以指第一个实体对第二个实体(即靶标)的亲和力,该亲和力超过在相同条件下与第三个实体(非靶标)的亲和力的至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多。给定靶标的特异性试剂是在所用测定条件下对该靶标展现出特异性结合的试剂。非限制性实例包括抗体或配体,其识别同源结合配偶体(例如,存在于T细胞上的刺激和/或共刺激分子)蛋白质并与其结合。

[0035] 如本文所用,“刺激配体”是指当存在于抗原呈递细胞(APC,例如,巨噬细胞、树突细胞、B细胞、人工APC等)上时可以与T细胞上的同源结合配偶体(在本文中称为“刺激分子”或“共刺激分子”)特异性结合,从而介导T细胞的初次应答(包括但不限于增殖、活化、免疫应答的启动等)的配体。刺激配体是本领域熟知的,尤其包括载有肽的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。

[0036] 本文使用的术语“刺激分子”是指T细胞上与抗原呈递细胞上存在的同源刺激配体特异性结合的分子。

[0037] 本文使用的术语“共刺激配体”包括APC上的分子,其特异性结合T细胞上的同源共刺激分子,从而提供除了通过例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合提供的原始信号之外的信号,并介导T细胞应答,包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可包括但不限于4-1BBL、OX40L、CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、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、与Toll样受体结合的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还可包括但不限于与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,比如但不限于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和与CD83特异性结合的配体。

[0038] “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细胞的共刺激应答,比如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA、Toll样受体、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和CD83。

[0039] 在一个实施例中,如本文所用的术语“工程化的”及其语法等同物可以指核酸(例如,生物体基因组内的核酸)的一种或多种人类设计的改变。在另一个实施例中,工程化可以指基因的改变、添加和/或缺失。“工程化的细胞”可以指具有添加、缺失和/或改变的基因

的细胞。本文使用的术语“细胞”或“工程化的细胞”及其语法等同物可以指人或非人动物来源的细胞。

[0040] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指第一多核苷酸分子,例如启动子,其与第二可转录的多核苷酸分子(例如目的基因)连接,其中这些多核苷酸分子被安排以使第一多核苷酸分子影响第二多核苷酸分子的功能。这两个多核苷酸分子可以是或可以不是单个连续多核苷酸分子的一部分,并且可以相邻或不相邻。例如,如果一个启动子调节或介导细胞中目的基因的转录,则该启动子与目的基因可操作地连接。

[0041] 在本文所述的各种实施例中,进一步预期涵盖任何该特定多肽的变体(天然存在的或其他的)、等位基因、同源基因、保守修饰变体和/或保守的取代变体。关于氨基酸序列,普通技术人员将认识到改变编码序列中单个氨基酸或少量氨基酸的核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单个取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中这种改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代并保留所需的多肽活性。此类保守修饰的变体补充而不排除与本公开文本一致的多态变体、种间同源基因和等位基因。

[0042] 一种给定的氨基酸可以被具有相似生理化学特征的残基替代,例如,用一个脂肪族残基取代另一个(如Ile、Val、Leu或Ala彼此),或用一个极性残基取代另一个(如Lys和Arg之间;Glu和Asp之间;或Gln和Asn之间)。其他这样的保守取代,例如,具有相似疏水性特征的整个区域的取代,是众所周知的。可以在本文所述的任何一种测定中测试包含保守氨基酸取代的多肽,以确认保留了所需活性,例如,原生或参照多肽的配体介导的受体活性和特异性。

[0043] 氨基酸可根据其侧链性质的相似性进行分组(参见A.L.Lehninger,Biochemistry[生物化学],第二版,第73-75页,Worth Publishers[沃思出版公司],纽约(1975)):(1)非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);(4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。可替代地,基于共同的侧链特性可将天然存在的残基分组:(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Gln;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。非保守性取代将需要将这些类别之一的一个成员与另一个类别交换。特定的保守性取代包括,例如:Ala变为Gly或变为Ser;Arg变为Lys;Asn变为Gln或变为His;Asp变为Glu;Cys变为Ser;Gln变为Asn;Glu变为Asp;Gly变为Ala或变为Pro;His变为Asn或变为Gln;Ile变为Leu或变为Val;Leu变为Ile或变为Val;Lys变为Arg、变为Gln或变为Glu;Met变为Leu、变为Tyr或变为Ile;Phe变为Met、变为Leu或变为Tyr;Ser变为Thr;Thr变为Ser;Trp变为Tyr;Tyr变为Trp;和/或Phe变为Val、变为Ile或变为Leu。

[0044] 在一些实施例中,本文描述的多肽(或编码这种多肽的核酸)可以是本文描述的氨基酸序列之一的功能片段。如本文所用,“功能片段”是肽的片段或部分,其根据本领域已知的或本文下文所述的测定保留野生型参考多肽的至少50%的活性。功能片段可包含本文披露的序列的保守取代。

[0045] 在一些实施例中,本文描述的多肽可以是如本文所述的多肽或分子的变体。在一些实施例中,该变体是保守性修饰的变体。例如,可以通过原生核苷酸序列的突变获得保守取代变体。如本文所提及的“变体”是与原生或参考多肽基本上同源的多肽,但由于一个或

多个缺失、插入或取代而具有与原生或参考多肽不同的氨基酸序列。编码变体多肽的DNA序列包括与原生或参考DNA序列相比包含核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代,但是编码保留非变体多肽活性的变体蛋白或其片段的序列。多种基于PCR的位点特异性诱变方法是本领域已知的,并且可由普通技术人员应用。

[0046] 变体氨基酸或DNA序列可以与原生或参考序列至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高比例相同。可以确定原生序列和突变序列之间的同源性程度(同一性百分比),例如,通过使用在万维网上通常用于此目的的可免费获取的计算机程序(例如,BLASTp或BLASTn,默认设置)比较这两个序列。

[0047] 原生氨基酸序列的改变可以通过本领域技术人员已知的许多技术中的任何一种来完成。例如,通过合成含有突变序列的寡核苷酸,可以在特定基因座处引入突变,所述突变序列的侧翼是允许连接原生序列的片段的限制性位点。连接后,得到的重构序列编码具有所需氨基酸插入、取代或缺失的类似物。可替代地,可以采用寡核苷酸指导的位点特异性诱变程序来提供改变的核苷酸序列,所述核苷酸序列具有根据所需的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。用于进行这些改变的技术已经很成熟,并且包括,例如,Walder等人(Gene[基因]42:133,1986);Bauer等人(Gene[基因]37:73,1985);Craik(BioTechniques[生物技术],1985年1月,12-19);Smith等人(Genetic Engineering:Principles and Methods[基因工程:原理与方法],Plenum Press[普莱纽姆出版社],1981);以及美国专利号4,518,584和4,737,462中披露的那些,这些文献通过引用以其全文并入本文。任何不参与维持多肽的正确构象的半胱氨酸残基也可以被取代,通常被丝氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可以将一个或多个半胱氨酸键添加到多肽中以改善其稳定性或促进寡聚化。

[0048] 如本文所用,术语“DNA”的定义为脱氧核糖核酸。术语“多核苷酸”在本文中与“核酸”可互换使用,指示核苷的聚合物。典型地,多核苷酸由天然存在于通过磷酸二酯键连接的DNA或RNA(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)中的核苷组成。然而,该术语包括含有核苷或核苷类似物的分子,所述核苷或核苷类似物含有化学或生物学修饰的碱基、修饰的主链等,无论是否存在于天然存在的核酸中,并且这些分子对于某些应用可能是优选的。在本申请涉及多核苷酸的情况下,应理解,提供DNA和RNA两者,并且在每种情况下均提供单链和双链形式(以及每个单链分子的互补物)。如本文所用的“多核苷酸序列”可以指多核苷酸材料本身和/或生物化学上表征特定核酸的序列信息(即,用作碱基缩写的一连串字母)。除非另有指示,否则本文给出的多核苷酸序列以5’至3’方向呈现。

[0049] 如本文所用的术语“多肽”是指氨基酸的聚合物。本文中术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用。肽是相对较短的多肽,典型地长度为约2至60个氨基酸。本文使用的多肽典型地含有氨基酸,如蛋白质中最常见的20L-氨基酸。然而,可以使用本领域已知的其他氨基酸和/或氨基酸类似物。多肽中的一个或多个氨基酸可以被修饰,例如,通过添加化学实体,如碳水化合物基团,磷酸基团,脂肪酸基团,用于缀合、官能化等的接头。具有与其共价或非共价缔合的非多肽部分的多肽仍然被认为是“多肽”。示例性修饰包括糖基化和棕榈酰化。多肽可以从天然来源纯化,使用重组DNA技术产生或通过化学方法(如常规固相肽合成等)合

成。本文所用的术语“多肽序列”或“氨基酸序列”可以指该多肽材料本身和/或生物化学上表征多肽的序列信息(即,用作氨基酸名称缩写的一连串字母或三个字母代码)。除非另有指示,否则本文给出的多肽序列以N端至C端方向呈现。

[0050] 在一些实施例中,编码本文所述多肽的核酸(例如CAR多肽)由载体组成。在本文所述的一些方面中,编码如本文所述的给定多肽或其任何模块的核酸序列与载体可操作地连接。如本文所用,术语“载体”是指设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体可以是病毒的或非病毒的。术语“载体”包括当与适当的控制元件结合时能够复制并且可以将基因序列转移到细胞的任何遗传元件。载体可包括但不限于克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、人工染色体、病毒、病毒粒子等。

[0051] 如本文所用,术语“表达载体”是指指导RNA或多肽从与载体上的转录调节序列连接的序列表达的载体。表达的序列通常但不一定与细胞异源。表达载体可以包含其他元件,例如,该表达载体可以具有两个复制系统,从而允许其保持在两个生物体中,例如,在人细胞中用于表达,并且在原核宿主中用于克隆和扩增。术语“表达”是指参与产生RNA和蛋白质以及适当情况下分泌蛋白质的细胞过程,包括在适用的情况下,但不限于,例如,转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA,以及通过翻译从基因转录的mRNA获得的多肽。术语“基因”是指当与适当的调节序列可操作地连接时,在体外或体内转录(DNA)成RNA的核酸序列。该基因可以包括或不包括编码区之前和之后的区域,例如,5’非翻译(5’UTR)或“前导”序列和3’UTR或“尾随”序列,以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0052] 如本文所用,术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包含至少一个病毒来源的元件并且具有包装入病毒载体颗粒的能力。该病毒载体可含有编码本文所述多肽(代替非必需病毒基因)的核酸。该载体和/或颗粒可用于在体外或体内将核酸转移到细胞中的目的。许多形式的病毒载体是本领域已知的。

[0053] “重组载体”是指包含能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”的载体。应当理解,在一些实施例中,本文所述的载体可以与其他合适的组合物和疗法组合。在某些实施例中,该载体是附加型的。使用合适的附加型载体提供了维持受试者高拷贝数染色体外DNA中目的核苷酸的方法,从而消除了染色体整合的潜在影响。

[0054] 如本文所用,术语“治疗(treat/treatment/treating)”或“改善”是指疗法性治疗,其中目标是逆转、缓解、改善、抑制、减缓或阻止疾病或障碍相关的病症(例如,急性淋巴细胞白血病或其他癌症、疾病或障碍)的进展或严重性。术语“治疗”包括减少或缓解病症、疾病或障碍的至少一种不良作用或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,则治疗通常是“有效的”。可替代地,如果疾病的进展减慢或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括与没有治疗时的预期相比,症状进展或恶化的停止或至少是减缓。有益的或所希望的临床结果包括但不限于一种或多种症状的缓解、疾病程度的减轻、疾病的稳定化状态(即,未恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和、缓解(无论是部分还是全部)和/或降低的死亡率,无论是可检测的还是不可检测的。术语疾病的“治疗”还包括减轻疾病的症状或副作用(包括姑息治疗)。

[0055] 如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与药学上可接受的载体(例如通常用于制药行业的载体)的组合。本文使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的

范围,适合用于与人类和动物的组织接触而不产生过度毒性、刺激、过敏反应、或其他问题或并发症,同时具有相称的合理受益/风险比的那些化合物、材料、组合物、和/或剂型。在任何方面的一些实施例中,药学上可接受的载体可以是除水之外的载体。在任何方面的一些实施例中,药学上可接受的载体可以是乳膏、乳液、凝胶、脂质体、纳米颗粒和/或软膏。在任何方面的一些实施例中,药学上可接受的载体可以是人工或工程化的载体,例如,其中不会发现天然存在的活性成分的载体。

[0056] 如本文所用,术语“给予”是指将本文所披露的治疗组合物或药物组合物通过使该药剂在所需部位至少部分递送的方法或途径置于受试者体内。包含本文所披露的药剂的药物组合物可以通过任何合适的途径给予,从而在受试者中产生有效的治疗。

[0057] 术语“统计学上显著的”或“显著的”是指统计学显著性,并且通常表示两个标准偏差(2SD)或更大的差异。

[0058] 除了在操作实例中或另有指示的情况,本文所用的表示成分量或反应条件的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分比结合使用时,术语“约”可以表示±1%。

[0059] 如本文所用,术语“包含”是指除了所给出的限定元素之外还可以存在其他元素。“包含”的使用指示包括而不是限制。

[0060] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其各自的组分,其排除该实施例的说明中没有描述的任何元件。

[0061] 如本文所用,术语“基本上由.....组成”是指给定实施例所需的那些元件。该术语允许存在不会实质上影响本技术实施例的一个或多个基本和新颖或功能特征的附加元件。

[0062] 除非上下文中另外明确指示,单数术语“一个/一种(a/an)”和“该(the)”包括复数个指示物。类似地,词语“或”旨在包括“和”(并且反之亦然),除非上下文另外明确指示。尽管与本公开文本的实践或测试中可使用与本文所述的方法和材料相似或等效的方法和材料,下文描述了适宜的方法和材料。缩写词“例如(e.g.)”衍生自拉丁语“exempli gratia”,并且在本文中用于表示非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如(forexample)”同义。

[0063] 在任何方面的一些实施例中,本文所述的公开内容不涉及用于克隆人类的过程、用于修饰人类的种系遗传同一性的过程、人胚胎用于工业或商业目的的用途或用于修饰动物的遗传同一性的过程,这些过程可能导致它们对人或动物以及由这些过程产生的动物没有任何实质性医疗益处。

[0064] 在以下技术的各个方面和实施例的描述中定义了其他术语。

附图说明

[0065] 图1显示了指示细胞中的CD37表达。

[0066] 图2给出了抗CD37 CAR的示意图。

[0067] 图3给出了显示抗CD37 CAR表达的曲线和图

[0068] 图4给出了显示抗CD37 CAR T细胞扩增的图和曲线。

[0069] 图5给出了显示细胞毒性测定结果的图,证明抗CD37 CAR T细胞使CD37阳性T细胞裂解。

[0070] 图6给出了细胞毒性测定和靶克隆的表达分析的图。

[0071] 图7显示了用CD37刺激抗CD37 CAR T细胞后的细胞增殖。该测定在第17天开始并且使用了CAR+的FACS门控。

[0072] 图8给出了NSG小鼠中抗CD37 CAR T细胞植入和肿瘤清除的实验设计的示意图。

[0073] 图9给出了CAR设计的示意图。pMGH69(顶图构建体):具有轻链-重链构型的抗CD37scFv。pMGH70(底图构建体):具有重链-轻链构型的抗CD37scFv。

[0074] 图10显示了通过流式细胞术得到的癌细胞系上CD37的表达。Jeko-1(MCL)、RAJI(伯基特淋巴瘤)和OSU-CLL(CLL)明显地表达高水平的CD37。NALM6细胞(ALL)不表达CD37。

[0075] 图11证明了抗CD37 CAR T细胞的生成和扩增。左图显示抗CD37-CAR T细胞的生长曲线。从第0天开始,使用Dynabeads体外扩增T细胞直至第10天,然后用抗原刺激T细胞,在这种情况下,照射表达CD37和CD19的K562细胞。右边的曲线显示了在培养的第10天这一特定批次的CAR T细胞的转导效率(细胞总数的19.5%和23.5%是CAR T细胞)。左底图:三种不同正常供体的转导效率。

[0076] 图12是显示抗原特异性活化的图。用CD37-CAR构建体转导的Jurkat-NFAT报告细胞系在靶细胞(RAJI、OSU-CLL、Jeko-1、NALM-CD37)存在下被活化,但NALM6或单独的培养基的情况并没有。

[0077] 图13描绘了CAR T细胞的增殖能力。增殖测定:CAR细胞用细胞跟踪紫(Cell Trace Violet)标记,并在抗原存在或不存在下共培养。该图描绘了在存在CD37+细胞但不存在CD37阴性细胞的情况下的CAR T细胞扩增。

[0078] 图14证明了体外肿瘤细胞杀伤。当以不同的E:T比例与肿瘤细胞共培养时,CD37-CAR T、CD19-CAR或对照T细胞(UTD)在16小时时的细胞毒性。CD37-CAR T或CAR T-19的浓度增加导致了相似的靶细胞杀伤水平,而在对照组(UTD)中未观察到杀伤。

[0079] 图15证明了通过LUMINEX FLEXMAP 3D测定在培养物上清液中分析了以1:1的E:T比例与肿瘤细胞一起孵育16小时的CD37-CAR、CD19-CAR或UTD的细胞因子产生。技术重复(N=1个生物学重复)。

[0080] 图16描绘了实验示意图:给NSG小鼠注射1e6个肿瘤细胞(Jeko-1CBG-GFP,静脉内)。1周后,根据肿瘤负荷将小鼠随机分组,并注射1e6(左)或2e6(右)个阳性CAR T细胞或UTD细胞。每7天对小鼠成像,并通过测量生物发光分析肿瘤生长(以图呈现)。在两个实验中,用UTD治疗的小鼠显示出疾病进展(蓝线)。CAR T-19细胞能够在两种条件下诱导应答。

[0081] 图17证明了体内CAR功效。第二个实验的代表性小鼠显示在该图中。T细胞注射后14天外周血中CAR T细胞的存在:基于人CD3的表达对来自血液的细胞进行染色和门控。mCherry阳性细胞(CAR+)的百分比显示在图中。

[0082] 图18A和18B显示正常细胞(图18A)和肿瘤细胞(图18B)中的CD37蛋白表达。图18A:正常细胞上的CD37蛋白表达仅限于淋巴组织。图18B:肿瘤细胞系中CD37的表达。CD37在非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞淋巴瘤(JEKO-1)、伯基特淋巴瘤(RAJI)和B细胞慢性淋巴细胞白血病(OSU-CLL)中高度表达,但在急性淋巴细胞白血病细胞系(NALM6)中不存在。

[0083] 图19显示了示例性CAR-37T细胞设计。抗CD37第二代CAR的设计,由慢病毒载体编码并带有4-1BB共刺激结构域。人源化鼠抗体衍生的单链可变片段的两种不同取向:V_L-V_H(CAR-37L-H,顶图)或V_H-V_L(CAR-37H-L,底图)。

[0084] 图20A-20D显示CAR-37T细胞的生成和扩增。图20A.用CD3/CD28珠活化10天后,原代人T细胞转导效率的代表性流图。图20B.扩增的T细胞包括可变的CAR-37表达,均值为38％(L-H)和75％(H-L)(N＝3)。图20C.使用静态培养条件在健康供体中进行的CD3/CD28珠活化的T细胞的38天离体富集/扩增。图20D.用不同CAR构建体转导并与肿瘤细胞共培养的Jurkat报告(NFAT-Luc)T细胞的活化。16小时后测量荧光素酶活性(CD3-CD28珠;阳性对照)。

[0085] 图21A-21C显示CAR-37T细胞的体外细胞毒性活性。以指示的E:T比例与JEKO-1、表达CD19和CD37的K562(图21A)、OSU-CLL(图21B)和RAJI(图21C)共培养的CAR T细胞在16小时时的细胞毒性。CAR-37和CAR-19T细胞的浓度增加导致特异性杀伤,而在对照组(UTD)中未观察到杀伤。

[0086] 图22A-22C显示CAR-37T细胞的体外细胞因子产生。通过Luminex测定在培养物上清液中分析与JEKO-1(图22A)、RAJI(图22B)和OSU-CLL(图22C)细胞以1:1的E:T比例孵育24小时的CAR-37、CAR-19或UTDT细胞的细胞因子产生。

[0087] 图23A-23C显示CAR-37T细胞的体外效应子功能。图23A。实验示意图:给雌性NSG小鼠静脉内注射$1x10^6$个JEKO-1细胞(CBG-GFP+)。在第7天,基于肿瘤负荷(BLI)将小鼠随机分组以接受$2x10^6$个对照T细胞(UTD)、CAR-37或CAR-19(2个正常供体,N＝10)。图23B。JEKO-1随时间生长的代表性生物发光图像。图23C。显示来自每个治疗组的随时间的肿瘤生长曲线。统计分析:双因素方差分析($P<0.001$)。

[0088] 图24显示了肿瘤细胞中CD37的表达。顶图显示了通过流式细胞术评估的NALM6、CD19CD38K562、JEKO-1、RAJI和OSU-CLL细胞系中CD37和CD19的表达。底图显示了通过流式细胞术评估的MCL患者衍生的异种移植物(PDX)细胞系PDX_44685、PDX_98848和PDX_96069中CD37和CD17的表达。右底图上的图显示了MCL PDX细胞系中CD19和CD37的表达百分比。

[0089] 图25A-25C证明了CAR-37T细胞对MCL PDX肿瘤的体内功效。图25A描绘了实验示意图。在第-39天,给小鼠静脉内给予$1x10^6$个PDX_98848MCL PDX细胞。在第-28和第-14天进行流式细胞术。第-1天进行BLI。在第0天,将$3x10^6$个UTD(对照)或CAR T阳性细胞(CAR-37H-L或CAR-19)静脉内给予到小鼠中。在第3、7、10、14、17、21和35天对小鼠成像,并通过测量生物发光分析肿瘤生长(图25B和25C)。CAR-37T细胞对MCL PDX肿瘤具有较强的体内抗肿瘤功效。

[0090] 图26A显示了通过流式细胞术评估的外周T细胞淋巴瘤(PTCL)细胞系HUT78(皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL))(左图)和FEPD(间变性大细胞淋巴瘤(ALCL))(右图)中CD37的表达。图26B显示了通过流式细胞术评估的未刺激(unstim)和刺激的(stim)CAR T细胞中CD69的表达。左图显示通过流式细胞术评估的mCherry(CAR+)的表达。图26C显示用培养基、FEPD细胞、HUT78细胞或CDR-CD28珠刺激的CD69+UTD(对照)CAR-37L-H和CAR-37H-L细胞的百分比。

[0091] 图27显示了UTD(对照)、CAR-37L-H和CAR-37H-L T细胞对HUT78(CTCL)和FEPD(ALCL)PTCL细胞系的体外效应子功能。该图绘制了指示的E:T比例的特异性裂解百分比。

[0092] 图28显示了通过流式细胞术评估的AML细胞系TF1、MOM13和THP1中CD37的表达。

具体实施方式

[0093] 如本文所述,本发明提供了针对CD37的嵌合抗原受体(CAR)。此外,本发明提供了

表达这些CAR的细胞、编码它们的核酸分子、包括核酸分子的载体、使用和制备这些分子的方法、以及包含它们的试剂盒。这些CAR和相关分子可用于,例如,治疗和预防疾病,包括,例如癌症和自身免疫疾病。可使用本发明的CAR治疗或预防的癌症和自身免疫疾病类型的具体实例在下文中提供。采用本发明的CAR和相关分子的其他方法包括诊断和成像方法。在考虑制备和使用本技术的这些和其他方面之后,下面进一步描述本发明的CAR和相关分子和方法。

[0094] 嵌合抗原受体

[0095] 本文描述的技术提供用于免疫疗法的改善的CAR。以下讨论CAR和各种改善。

[0096] 本文所用的术语“嵌合抗原受体”或一个或多个“CAR”是指工程化的T细胞受体,其将配体或抗原特异性移植到T细胞上(例如,幼稚T细胞、中枢记忆性T细胞、效应记忆性T细胞或其组合)。CAR也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。

[0097] CAR放置嵌合细胞外靶标结合结构域,该结构域特异性结合在待靶向的细胞表面上表达的靶标(例如多肽),以使T细胞应答到包含T细胞受体分子的跨膜结构域和一个或多个细胞内结构域的构建体上。在一个实施例中,该嵌合细胞外靶标结合结构域包含抗体的一个或多个抗原结合结构域,所述抗体与在待靶向的细胞上表达以产生T细胞应答的抗原特异性结合。CAR的一个或多个细胞内信号传导结构域的特性可以如本领域已知的和本文披露的那样变化,但是当该靶标/抗原结合结构域与靶标细胞表面上的靶标/抗原结合时,该嵌合靶标/抗原结合结构域使受体对信号传导活化敏感。

[0098] 关于细胞内信号传导结构域,所谓的“第一代”CAR包括在抗原结合时仅提供CD3ζ(CD3zeta)信号的那些CAR。所谓的“第二代”CAR包括提供共刺激(例如,CD28或CD137)和活化(CD3ζ)结构域的那些CAR,并且所谓的“第三代”CAR包括提供多种共刺激(例如,CD28和CD137)结构域和活化结构域(例如,CD3ζ)的那些CAR。在各种实施例中,选择CAR以对靶标/抗原具有高亲和力或亲合力-例如,抗体衍生的靶标或抗原结合结构域通常对靶抗原具有比天然存在的T细胞受体更高的亲和力和/或亲合力。这一特性与可以选择的抗体的高特异性相结合,提供了CAR T细胞的高度特异性T细胞寻靶。

[0099] 如本文所用,“CAR T细胞”或“CAR-T”是指表达CAR的T细胞。当在T细胞中表达时,CAR具有以非MHC限制性方式利用单克隆抗体的抗原结合特性将T细胞特异性和反应性重定向到选定靶标的能力。非MHC限制性抗原识别使得表达CAR的T细胞能够识别独立于抗原加工的抗原,从而绕过肿瘤逃逸的主要机制。

[0100] 如本文所用,术语“细胞外靶标结合结构域”是指在细胞外部发现的足以促进与靶标结合的多肽。细胞外靶标结合结构域将特异性结合其结合配偶体,即靶标。作为非限制性实例,该细胞外靶结合结构域可包括抗体或配体的抗原结合结构域,其识别并结合同源结合配偶体(例如,CD37)蛋白。在本文中,配体是与蛋白质和/或受体的一部分特异性结合的分子。可用于本文所述方法和组合物的配体的同源结合配偶体通常可在细胞表面上找到。配体:同源配偶体结合可导致带有配体的受体的改变,或活化生理应答,例如,信号传导途径的活化。在一个实施例中,该配体可以是非基因组原生的。任选地,该配体在至少两个物种上具有保守的功能。在一个实施例中,该细胞外靶标结合结构域包含非抗体配体。

[0101] 抗体试剂

[0102] 在各种实施例中,本文所述的CAR包含抗体试剂或其抗原结合结构域作为细胞外

靶结合结构域。

[0103] 如本文所用,术语“抗体试剂”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列并且与给定抗原特异性结合的多肽。抗体试剂可包含抗体或含有抗体的抗原结合结构域的多肽。在任何方面的一些实施例中,抗体试剂可包含单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包括重(H)链可变区(本文中缩写为V_H)和轻(L)链可变区(本文中缩写为V_L)。在另一个实例中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体试剂”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体,Fab和sFab片段,F(ab')2,Fd片段,Fv片段,scFv,CDR和结构域抗体(dAb)片段(参见,例如,de Wildt等人,Eur J.Immunol.[欧洲免疫学杂志]26(3):629-639,1996;其通过引用以其全文并入本文)以及完整抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD或IgM的结构特征(以及亚型及其组合)。抗体可以来自任何来源,包括小鼠、兔、猪、大鼠和灵长类动物(人和非人灵长类动物)和灵长类化抗体。抗体还包括中间抗体、人源化抗体、嵌合抗体等。可以使用本领域普通技术人员已知的方法从例如噬菌体展示文库中选择完全人抗体结合结构域。

[0104] V_H和V_L区域可以进一步细分为具有高变性的区域,称为“互补决定区”(“CDR”),散布有更保守的区域,称为“框架区”(“FR”)。已经精确定义了框架区和CDR的范围(参见,Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第五版,U.S.Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部],NIH公开号91-3242,及Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917,1987;各文献通过引用以其全文并入本文)。每个V_H和V_L典型地由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0105] 在一个实施例中,该抗体或抗体试剂不是人抗体或抗体试剂(即,该抗体或抗体试剂是小鼠),但已经人源化。“人源化抗体或抗体试剂”是指在蛋白质序列水平上被修饰以增加其与人类天然产生的抗体或抗体试剂变体的相似性的非人抗体或抗体试剂。人源化抗体的一种方法采用将鼠或其他非人CDR移植到人抗体框架上。

[0106] 在一个实施例中,CAR的细胞外靶结合结构域包含或基本上由通过柔性接头肽融合抗体(通常是单克隆抗体)的V_H和V_L结构域产生的单链Fv(scFv)片段组成。在各种实施例中,该scFv与跨膜结构域和T细胞受体细胞内信号传导结构域融合,例如,本文所述的工程化细胞内信号传导结构域。

[0107] 抗体结合结构域及其选择和克隆方法是本领域普通技术人员所熟知的。在另一个实施例中,该抗体试剂是抗CD37抗体试剂并且具有选自SEQ ID NO:1或5的序列。在一个实施例中,该抗CD37抗体试剂对应于SEQ ID NO:1或5的序列;或包含SEQ ID NO:1或5的序列;或包含具有与SEQ ID NO:1或5的序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高序列同一性的序列。

[0108] 在一个实施例中,可用于本文所述技术的CAR包含至少两个抗原特异性寻靶区域、一个细胞外结构域、一个跨膜结构域和一个细胞内信号传导结构域。在此类实施例中,该两个或更多个抗原特异性寻靶区域靶向至少两个不同的抗原,并且可以串联排列并通过接头序列分开。在另一个实施例中,该CAR是双特异性CAR。双特异性CAR对两种不同的抗原具有特异性。

[0109] 靶标/抗原

[0110] 任何细胞表面部分都可以被CAR靶向。最常见的是,该靶标将是在希望靶向以产生T细胞应答的细胞上差异或优先表达的细胞表面多肽。在这方面,肿瘤抗原或肿瘤相关抗原提供有吸引力的靶标,提供靶向肿瘤细胞同时避免或至少限制对非肿瘤细胞或组织的附带损伤的手段。肿瘤抗原或肿瘤相关抗原的非限制性实例包括CD37、BCMA(肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17);NCBI基因ID:608;NCBI参考序列NP_001183.2)和mRNA(例如,NCBI参考序列NM_001192.2)、CEA、未成熟层粘连蛋白受体、TAG-72、HPV E6和E7、BING-4、钙活化的氯化物通道2、细胞周期蛋白B1、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、端粒酶、Mesotheliun、SAP-1、生存蛋白、BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、Gp100/pmel17、酪氨酸酶、TRP-1/-2、MC1R、BRCA1/2、CDK4、MART-2、p53、Ras、MUC1和TGF-βRII。

[0111] 如上所述,本发明的CAR分子的靶标是CD37。CD37是细胞表面蛋白,其含有四个疏水跨膜结构域。CD37仅在免疫细胞上表达。它在成熟B细胞上高度表达,并在T细胞和骨髓细胞上适度表达。CD37序列以许多种类而闻名,例如人CD37(NCBI基因ID:951)多肽(例如NCBI参考序列NP_001035120.1)和mRNA(例如NCBI参考序列NM_001040031.1)。CD37可以指人CD37,包括其天然存在的变体、分子和等位基因。在任何方面的一些实施例中,例如在兽医应用中,CD37可以指,例如狗、猫、牛、马、猪等的CD37。本领域技术人员可以容易地鉴定人CD37的同源物和/或直系同源物,例如,使用NCBI直系同源物搜索功能或搜索给定物种的与参考CD37序列相似的序列的可用序列数据。

[0112] 在一个实施例中,该CD37结合序列包含CD37的配体或与CD37特异性结合的抗体试剂。

[0113] 跨膜结构域

[0114] 如本文所述的每个CAR必然包括将细胞外靶标结合结构域连接至细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0115] 如本文所用,“跨膜结构域”(TM结构域)是指CAR的通常疏水性的区域,其穿过细胞的质膜。该TM结构域可以是跨膜蛋白(例如I型跨膜蛋白或其他跨膜蛋白)的跨膜区域或其片段、人工疏水序列或其组合。虽然本文提供了具体实例并且在实施例中使用,但是其他跨膜结构域对于本领域技术人员而言是显而易见的,并且可以与本技术的替代实施例结合使用。选择的跨膜区或其片段优选地不会干扰CAR的预期功能。如关于蛋白质或多肽的跨膜结构域所使用的,“其片段”是指足以将蛋白质锚定或附接于细胞表面的跨膜结构域的一部分。

[0116] 在一个实施例中,CAR的跨膜结构域或其片段衍生自或包含CD8的跨膜结构域。在一个备选实施例中,本文所述CAR的跨膜结构域或其片段包含选自如下的跨膜结构域:T细胞受体,CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7R a、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM

(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C的α、β或ζ链的跨膜结构域。

[0117] CD8是优先在细胞毒性T淋巴细胞的细胞表面上发现的抗原。CD8介导免疫系统内的细胞-细胞相互作用,并充当T细胞共同受体。CD8由α(CD8α)链和β(CD8β)链组成。CD8a序列对于许多物种是已知的,例如,人CD8a,(NCBI基因ID:925)多肽(例如,NCBI参考序列NP_001139345.1)和mRNA(例如NCBI参考序列NM_000002.12)。CD8可以指人CD8,包括其天然存在的变体、分子和等位基因。在任何方面的一些实施例中,例如在兽医应用中,CD8可以指,例如狗、猫、牛、马、猪等的CD8。本领域技术人员可以容易地鉴定人CD8的同源物和/或直系同源物,例如,使用NCBI直系同源物搜索功能或搜索给定物种的与参考CD8序列相似的序列的可用序列数据。

[0118] 共刺激结构域

[0119] 本文描述的每种CAR任选地包含共刺激分子的细胞内结构域,或者共刺激结构域。如本文所用,术语“共刺激结构域”是指共刺激分子的细胞内信号传导结构域。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子,其提供在与抗原结合后有效活化和T淋巴细胞功能所需的第二信号。这种共刺激分子的说明性实例包括CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM和ZAP70。在一个实施例中,该细胞内结构域是4-1BB的细胞内结构域。

[0120] 4-1BBL是属于TNF超家族的2型跨膜糖蛋白。4-1BBL在活化的T淋巴细胞上表达。4-1BBL序列对于许多物种是已知的,例如人4-1BBL,也称为TNFSF9(NCBI基因ID:8744)多肽(例如,NCBI参考序列NP_003802.1)和mRNA(例如,NCBI参考序列NM_003811.3)。4-1BBL可以指人4-1BBL,包括其天然存在的变体、分子和等位基因。在任何方面的一些实施例中,例如在兽医应用中,4-1BBL可以指,例如狗、猫、牛、马、猪等的4-1BBL。本领域技术人员可以容易地鉴定人4-1BBL的同源物和/或直系同源物,例如,使用NCBI直系同源物搜索功能或搜索给定物种的与参考4-1BBL序列相似的序列的可用序列数据。

[0121] 细胞内信号传导结构域

[0122] 如本文所述的CAR包含细胞内信号传导结构域。“细胞内信号传导结构域”是指CAR多肽的一部分,其参与将与靶标抗原结合的有效CAR的信息转导到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能,例如活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括细胞毒性因子释放到已与CAR结合的靶细胞,或抗原与细胞外CAR结构域结合后引发的其他细胞应答。在该技术中特别使用的含有ITAM的细胞内信号传导结构域的非限制性实例包括衍生自TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3θ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。

[0123] CD3是T细胞共同受体,其在同时参与适当的共刺激(例如,共刺激分子的结合)时促进T淋巴细胞活化。CD3复合物由4个不同的链组成;哺乳动物CD3由一个CD3γ链、一个CD3δ链和两个CD3ε链组成。这些链与被称为T细胞受体(TCR)的分子和CD3ζ结合,在T淋巴细胞中生成活化信号。完整的TCR复合物包含TCR、CD3ζ和完整的CD3复合物。

[0124] 在任何方面的一些实施例中,本文所述的CAR多肽包含细胞内信号传导结构域,其包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序或来自CD3ζ(CD3zeta)的ITAM。在任何方面的一些实

施例中,该ITAM包括CD3ζ(ITAM3)的ITAM的三个基序。在任何方面的一些实施例中,该CD3ζ的ITAM的三个基序未突变,因此包括原生序列或野生型序列。在一些实施例中,该CD3ζ序列包含SEQ ID NO:14或20的序列,如下所述。

[0125] CAR和CAR T细胞的更详细描述可见于Maus等人Blood[血液]2014 123:2624-35;Reardon等人Neuro-Oncology[神经肿瘤学]201416:1441-1458;Hoyos等人Haematologica[血液病学]2012 97:1622;Byrd等人J Clin Oncol[临床肿瘤学杂志]2014 32:3039-47;Maher等人Cancer Res[癌症研究]2009 69:4559-4562;及Tamada等人Clin Cancer Res[临床癌症研究]2012 18:6436-6445;其各自通过引用以其全文并入本文。

[0126] 在一个实施例中,该CAR还包含接头结构域。如本文所用,“接头结构域”是指长度为约2至100个氨基酸的寡肽或多肽区域,其将如本文所述的CAR的任何结构域/区域连接在一起。在一些实施例中,接头可包括或由柔性残基如甘氨酸和丝氨酸组成,以使相邻的蛋白质结构域相对于彼此自由移动。当希望确保两个相邻的结构域不在空间上彼此干扰时,可以使用更长的接头。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解接头的实例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等同物及其组合。在一个实施例中,该接头区是衍生自明脉扁刺蛾β四体病毒(Thosea asigna virus)的T2A。可用于本技术的接头的非限制性实例包括P2A和F2A。

[0127] 在一个实施例中,如本文所述的CAR还包含报告分子,例如,以允许非侵入性成像(例如,正电子发射断层摄影PET扫描)。在包含报告分子的双特异性CAR中,第一细胞外结合结构域和第二细胞外结合结构域可包括不同或相同的报告分子。在双特异性CAR T细胞中,第一CAR和第二CAR可以表达不同或相同的报告分子。在另一个实施例中,如本文所述的CAR还包含报告分子(例如潮霉素磷酸转移酶(hph)),其可以单独成像或与底物或化学物质(例如9-[4-[^{18}F]氟-3-(羟甲基)丁基]鸟嘌呤([^{18}F]FHBG))组合成像。在另一个实施例中,如本文所述的CAR还包含可以使用非侵入性技术(例如,用$^{64}Cu^{2+}$功能化的金纳米颗粒(GNP))容易地成像的纳米颗粒。用于非侵入性成像的CAR T细胞的标记的综述,例如Bhatnagar等人,Integr Biol.(Camb).[综合生物学(剑桥)]5(1):231-238,2013,以及Keu等人,Sci Transl.Med.[科学转化医学]18;9(373),2017,其内容通过引用以其全文并入本文。

[0128] GFP和mCherry在本文中被证明是可用于对在T细胞(例如,CART细胞)上表达的CAR进行成像的荧光标签。预期基本上本领域已知的任何荧光蛋白均可用作此目的的荧光标签。对于临床应用,该CAR不需要包括荧光标签或荧光蛋白。

[0129] 在一个实施例中,该CAR多肽序列对应于,或包含,或包含与选自SEQ ID NO:9或15的序列的具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的序列同一性的序列。在各种实施例中,此类CAR多肽的CD3ζ序列是原生或野生型序列。

[0130] 本文所述技术的一个方面涉及哺乳动物细胞,其包含本文所述的任何CAR多肽;或编码本文所述的任何CAR多肽的核酸。在一个实施例中,该哺乳动物细胞包含抗体、抗体试剂、其抗原结合部分、或本文所述的任何CAR、或编码这种抗体的核酸、抗体试剂、其抗原结合部分或任何本文描述的CAR。该哺乳动物细胞或组织可以来源于人、灵长类动物、仓鼠、兔、啮齿动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫,但也可以使用任何其他哺乳动物细胞。在任何方面的优选实施例中,该哺乳动物细胞是人。

[0131] 在一个实施例中,该细胞是T细胞。在任何方面的备选实施例中,该细胞是免疫细胞。如本文所用,“免疫细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞具有造血来源,并且包括淋巴细胞,如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;骨髓细胞,如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。在一些实施例中,该细胞是T细胞。NK细胞;NKT细胞;淋巴细胞,如B细胞和T细胞;以及骨髓细胞,如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0132] 在一个实施例中,该细胞是从患有或被诊断患有癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的个体获得的。

[0133] 如本文所用,“癌症”可指细胞的过度增殖,其独特性状、正常细胞控制的丧失导致不受调节的生长,缺乏分化,局部组织侵入和转移,并且可以是白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或实体瘤。白血病的非限制性实例包括急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一个实施例,该癌症是ALL或CLL。淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、毛细胞白血病(HCL)以及T细胞淋巴瘤(例如,外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)和间变性大细胞淋巴瘤(ALCL))。在一个实施例中,该癌症是DLBCL或滤泡性淋巴瘤。实体瘤的非限制性实例包括肾上腺皮质瘤、腺泡状软组织肉瘤、上皮癌、软骨肉瘤、结直肠癌、硬纤维瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、内分泌肿瘤、内胚窦瘤、上皮样血管内皮瘤、尤文肉瘤、生殖细胞肿瘤(实体瘤)、骨和软组织巨细胞瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、黑素瘤、肾瘤、神经母细胞瘤、非横纹肌肉瘤软组织肉瘤(NRSTS)、骨肉瘤、椎旁肉瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤和威尔姆斯瘤。实体瘤可以在骨骼、肌肉或器官中找到,并且可以是肉瘤或上皮癌。预期本文所述技术的任何方面均可用于治疗所有类型的癌症,包括本申请中未列出的癌症。如本文所用,术语“肿瘤”是指细胞或组织的异常生长,例如,恶性类型或良性类型。

[0134] 如本文所用,“自身免疫疾病或障碍”的特征在于一个人的免疫系统不能区分外来细胞和健康细胞。这导致一个人的免疫系统针靶向其健康细胞以造成程序性细胞死亡。自身免疫疾病或障碍的非限制性实例包括炎性关节炎、1型糖尿病、多发性硬化、牛皮癣、炎性肠病、SLE、以及血管炎、过敏性炎症(例如过敏性哮喘、特应性皮炎和接触性超敏反应)。自身免疫相关疾病或障碍的其他实例包括,但不应被解释为限于,类风湿性关节炎、多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病(甲状腺功能亢进)、桥本氏甲状腺炎(甲状腺功能低下)、乳糜泻、克罗恩病和溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征、原发性胆道硬化/肝硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、雷诺氏现象、硬皮病、肖格伦综合征、古德帕斯彻氏综合征、韦格纳肉芽肿、风湿性多肌痛、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、慢性疲劳综合征(CFS)、银屑病、自身免疫性艾迪生病、强直性脊柱炎、急性播散性脑脊髓炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力、眼球阵挛-肌阵挛综合征、视神经炎、奥德氏甲状腺炎、天疱疮、恶性贫血、狗多发性关节炎、赖特综合征、大动脉炎、温抗体型自身免疫性溶血性贫血和纤维肌痛(FM)。

[0135] 在一个实施例中,该哺乳动物细胞是对患有免疫系统障碍的患者获得的,该免疫系统障碍导致免疫系统的异常低活性,或免疫缺陷障碍,其阻碍一个人抵抗外来细胞(即,

病毒或细菌细胞)的能力。

[0136] 浆细胞是由B淋巴细胞产生的白细胞,其功能是生成和释放抗感染所需的抗体。如本文所用,“浆细胞障碍或疾病”的特征在于浆细胞的异常增殖。异常的浆细胞能够“排挤”健康的浆细胞,这导致对抗外来物体(例如病毒或细菌细胞)的能力降低。浆细胞障碍的非限制性实例包括淀粉样变性病、华氏巨球蛋白血症、骨硬化性骨髓瘤(POEMS综合征)、意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)和浆细胞骨髓瘤。

[0137] 可以使用本领域已知的标准技术从受试者中获得T细胞。例如,可以从取自供体或患者的外周血中分离T细胞。T细胞可以从哺乳动物中分离。优选地,T细胞是从人体中分离的。

[0138] 可以将细胞(例如T细胞)工程化以包含本文所述的任何CAR多肽;或编码本文所述的任何CAR多肽的核酸。在一个实施例中,本文所述的任何CAR多肽包含在慢病毒载体中。使用感染标准技术将慢病毒载体用于在细胞中表达CAR多肽。

[0139] 逆转录病毒(如慢病毒)为递送编码基因或目的嵌合基因的核酸序列提供了方便的平台。可以使用本领域已知的技术将选择的核酸序列插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并将其递送至细胞,例如体外或离体递送。逆转录病毒系统在本领域中是熟知的,其描述于,例如,美国专利号5,219,740;Kurth和Bannert(2010)“Retroviruses:Molecular Biology,Genomics and Pathogenesis”[逆转录病毒:分子生物学、基因组学和发病学]Calster Academic Press[卡尔斯特学术出版社](ISBN:978-1-90455-55-4);及Hu等人,Pharmacological Reviews[药理学综述]52:493-512,2000;这些文献通过引用以其全文并入本文。用于高效DNA递送的慢病毒系统可从傲锐基因(马里兰州罗克维尔市)购买。在替代实施例中,本文所述任何CARS的CAR多肽通过包含编码该CAR的核酸的表达载体的转染或电穿孔在哺乳动物细胞中表达。转染或电穿孔方法是本领域中已知的。

[0140] 可以使用检测编码该CAR的核酸的mRNA、DNA或基因产物的标准测定来评估本文所述的任何CAR多肽的CAR多肽高效表达。例如,RT-PCR、FACS、RNA印迹、蛋白印迹、ELISA或免疫组织化学法。

[0141] 在一个实施例中,本文所述的CAR多肽是组成性表达的。在一个实施例中,本文所述的CAR多肽由重组核酸序列编码。

[0142] 本文所述技术的一个方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:工程化T细胞以在T细胞表面上包含本文所述的任何CAR多肽;并将工程化的T细胞给予受试者。

[0143] 本文所述技术的一个方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:给予包含本文所述任何CAR多肽的任何哺乳动物细胞的细胞。

[0144] 簇分化(CD)分子是存在于白细胞上的细胞表面标志物。随着白细胞分化并成熟,其CD谱发生变化。在白细胞变成癌细胞(即淋巴瘤)的情况下,其CD谱在该疾病的诊断中是重要的。某些类型的癌症的治疗和预后依赖于确定癌细胞的CD谱。“CDX+”,其中“X”是CD标志物,指示CD标志物存在于癌细胞中,而“CDX-”指示该标志物不存在。本领域技术人员将能够使用标准技术评估存在于癌细胞上的CD分子,例如使用免疫荧光来检测市售的与CD分子

结合的抗体。

[0145] 在一个实施例中,该癌症表达CD和肿瘤抗原。在一个实施例中,该癌症是CD37+或BCMA+癌症。在一个实施例中,该CD37+癌症是淋巴瘤或白血病。在一个实施例中,淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B细胞淋巴母细胞淋巴瘤或T细胞淋巴瘤(例如,外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)和间变性大细胞淋巴瘤(ALCL))。

[0146] 本文所述技术的一个方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:工程化T细胞以在T细胞表面上包含本文所述的任何CAR多肽;将工程化的T细胞给予该受试者;其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0147] 癌细胞可响应于治疗而进化而改变其CD谱,以此来逃避所述治疗。例如,患有CD19+白血病的患者可以用抗CD19疗法治疗。治疗后,癌细胞可能复发,或在治疗后再次出现,并且不再表达CD19标志物,导致CD19-白血病。这种癌细胞将不再能通过抗CD19疗法靶向。在一个实施例中,该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答或抵抗。在一个实施例中,该受试者患有CD19-和/或CD20-的癌症。在一个实施例中,该受试者患有复发的并且不再表达CD19或CD20的癌症。

[0148] 本文所述技术的另一方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括将包含本文所述的任何CAR多肽的任何哺乳动物细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列;其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0149] 本文所述技术的另一方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;工程化T细胞以在T细胞表面上包含本文所述的任何CAR多肽;将工程化的CAR T细胞给予受试者;其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0150] 本文所述技术的另一方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;将包含本文所述任何CAR多肽的任何哺乳动物细胞给予受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列;其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0151] 本文所述技术的另一方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:工程化T细胞以在T细胞表面上包含本文所述的任何CAR多肽;将工程化的CAR T细胞给予受试者;其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0152] 本文所述技术的另一方面涉及在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括将包含本文所述的任何CAR多肽的任何哺乳动物细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列;其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0153] 在任何方面的一些实施例中,在给予受试者之前刺激和/或活化工程化的CAR-T细胞。

[0154] 给予

[0155] 在一些实施例中,本文所述的方法涉及用包含本文所述的任何CAR多肽、或编码本

文所述任何CAR多肽的核酸的哺乳动物细胞治疗患有或被诊断患有癌症、浆细胞病或障碍或自身免疫疾病或障碍的受试者。如本文所用,“如本文所述的CAR T细胞”是指哺乳动物细胞,其包含本文所述的任何CAR多肽,或编码本文所述的任何CAR多肽的核酸。如本文所用,“病症”是指癌症、浆细胞病或障碍、或自身免疫疾病或障碍。患有病症的受试者可以由医生使用现有诊断该病症的方法来鉴定。该病症的症状和/或并发症表征这些病症并有助于诊断,这些症状和/或并发症在本领域中是熟知的,包括但不限于疲劳、持续性感染和持续性出血。对于给定的病症,可帮助诊断(例如该病症)的测试包括但不限于血液筛查和骨髓测试,并且这些测试是本领域已知的。病症的家族史或暴露于病症的风险因素也可以帮助确定受试者是否可能患有该病症或帮助诊断该病症。

[0156] 本文所述的组合物可以给予患有或被诊断为患有病症的受试者。在一些实施例中,本文所述的方法包括向受试者给予有效量的本文所述的活化的CAR T细胞,以缓解该病症的症状。如本文所用,“缓解该病症的症状”是改善与该病症相关的任何病症或症状。与同等的未治疗的对照相比,用任何标准技术测量的这种减少为至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%或更高。用于向受试者给予本文所述组合物的多种方法是本领域技术人员已知的。在一个实施例中,本文所述的组合物是全身或局部给予的。在优选的实施例中,本文所述的组合物是静脉内给予的。在另一个实施例中,本文所述的组合物在肿瘤部位给予。

[0157] 如本文所用的术语“有效量”是指缓解疾病或障碍的至少一种或多种症状所需的活化CAR T细胞的量,并且涉及足以提供所需效果的细胞制剂或组合物的量。因此,术语“治疗有效量”是指当给予典型受试者时足以提供特定抗病症效果的活化CAR T细胞的量。在各种情况下,本文所用的有效量还包括足以延迟疾病症状发展、改变症状疾病进程(例如但不限于减缓病症的进展)、或扭转病症症状的量。因此,通常不可能指定一个精确的“有效量”。然而,对于任何给定的情况,一个适当的“有效量”可以由本领域普通技术人员仅仅使用常规实验来确定。

[0158] 可通过细胞培养物或实验动物中的标准药学程序评价有效量、毒性和治疗功效。该剂量可以取决于所采用的剂型以及使用的给予途径而变化。毒性与治疗功效之间的剂量比为治疗指数,并且可以被表示为比率LD50/ED50。展现出大治疗指数的组合物和方法是优选的。最初可以从细胞培养测定估计治疗有效剂量。此外,可以在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度范围,其包括在细胞培养中或者在适当的动物模型测定的IC50(即,实现症状的半数最大抑制的活化CAR T细胞的浓度)。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相色谱法。任何特定剂量的作用可以通过合适的生物测定来监测,例如,用于骨髓测试的测定等。剂量可由医生确定,并根据需要调整以适应观察到的治疗效果。

[0159] 在本技术的一个方面,本文描述的技术涉及一种药物组合物,其包含如本文所述的活化CAR T细胞,以及任选地药学上可接受的载体。该药物组合物的活性成分至少包含如本文所述的活化CAR T细胞。在一些实施例中,该药物组合物的活性成分基本上由如本文所述的活化CAR T细胞组成。在一些实施例中,药物组合物的活性成分由如本文所述的活化CAR T细胞组成。用于基于细胞的治疗配制品的药学上可接受的载体包括盐水和水性缓冲溶液、林格氏溶液和血清组分,例如血清白蛋白、HDL和LDL。诸如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等术语在本文中可互换使用。

[0160] 在一些实施例中,该包含如本文所述的活化CAR T细胞的药物组合物可以是肠胃外剂型。由于肠胃外剂型的给药典型地绕过患者对污染物的天然防御,因此除了CAR T细胞本身之外的组分优选地是无菌的或能够在给予患者之前进行灭菌。肠胃外剂型的实例包括但不限于即用型注射溶液、随时可溶解或悬浮在药学上可接受的注射用媒介物中的干燥产品,即用于注射的悬浮液和乳液。这些中的任何一种都可以在给予前添加到活化CAR T细胞制剂中。

[0161] 可用于提供如本文所披露的活化CAR T细胞的肠胃外剂型的合适媒介物是本领域技术人员熟知的。实例包括但不限于:盐水溶液;葡萄糖溶液;水性媒介物包括但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液以及乳酸林格氏注射液;可与水混溶的媒介物,比如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及非水性媒介物,比如但不限于玉米油、棉花籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。

[0162] 剂量

[0163] 本文使用的术语“单位剂型”是指适合一次给予的剂量。举例来说,单位剂型可以是布置在递送装置(例如,注射器或静脉内滴注袋)中的一定量的治疗剂。在一个实施例中,单位剂型以单次给予的形式给予。在另一个实施例中,可以同时给予多于一个单位剂型。

[0164] 在一些实施例中,本文所述的活化CAR T细胞作为单一疗法给予,即,对该病症的另一种治疗不同时给予受试者。

[0165] 包含本文所述T细胞的药物组合物通常可以以10^4到10^9个细胞/kg体重的剂量给予,在一些情况下,10^5到10^6个细胞/kg体重,包括这些范围内的所有整数值。如果需要,T细胞组合物也可以这些剂量多次给予。这些细胞可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来给予(参见,例如,Rosenberg等人,New Eng.J.Med.[新英格兰医学杂志]319:1676,1988)。

[0166] 在某些方面,可能需要将活化CAR T细胞给予受试者,然后随后重新抽取血液(或进行单采术),如本文所述从其中活化T细胞,并将这些活化和扩增的T细胞重新输注给患者。该过程可以每隔几周进行多次。在某些方面,T细胞可以从10cc至400cc的抽血中活化。在某些方面,T细胞从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中活化。

[0167] 给予方式可包括,例如静脉内(i.v.)注射或输注。本文所述的组合物可通过经动脉、肿瘤内、结节内或髓内给予患者。在一些实施例中,T细胞的组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。在一个实施例中,将本文所述的组合物给予到体腔或体液(例如,腹水、胸膜液、腹膜液或脑脊髓液)中。

[0168] 在一个特定的示例性方面,受试者可进行白细胞去除术,其中白细胞被离体收集、富集或耗尽以选择和/或分离目的细胞,例如,T细胞。可以通过与如本文所述的aAPC(例如,表达抗CD28和抗CD3CDR的aAPC)接触而扩增这些T细胞分离物,并且进行处理以使得可以引入该技术的一种或多种CAR构建体,从而产生CAR T细胞。有需要的受试者随后可以进行高剂量化学疗法的标准治疗,随后进行外周血干细胞移植。在移植之后或移植的同时,受试者可以接受扩增的CAR T细胞的输注。在一个实施例中,扩增的细胞在手术之前或之后给予。

[0169] 在一些实施例中,在给予如本文所述的一种或多种CAR T细胞之前,对受试者进行淋巴细胞清除。在此类实施例中,该淋巴细胞清除可包括给予美法仑、环磷酰胺、环磷酰胺和氟达拉滨中的一种或多种。

[0170] 应给予患者的上述治疗的剂量将因所治疗病症的确切性质和治疗的接受者而变化。可以根据本领域公认的实践来进行人类给予剂量的缩放。

[0171] 在一些实施例中,需要单一治疗方案。在其他实施例中,可以进行一种或多种后续剂量或治疗方案的给予。例如,在每两周一次的治疗持续三个月后,可以按每个月一次重复治疗,持续六个月或一年或更长。在一些实施例中,在初始治疗后不给予另外的治疗。

[0172] 如本文所述的组合物的剂量可由医生确定,并根据需要调整以适应观察到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生典型地会监测受试者以确定治疗何时提供治疗益处,并确定是否给予进一步的细胞、停止治疗、恢复治疗或对治疗方案做出其他改变。剂量不应大到引起不良副作用,例如细胞因子释放综合征。通常情况下,剂量将随患者的年龄、病症和性别而不同,并且可由本领域技术人员确定。在任何并发症的事件下,也可以由个别医师调整剂量。

[0173] 组合疗法

[0174] 本文所述的活化CAR T细胞可以与其他已知的药剂和疗法组合使用。在一个实施例中,进一步向受试者给予抗BCMA疗法。在一个实施例中,受试者对抗BCMA疗法具有抗性。如本文所用,“组合”给予是指在受试者患有疾病的过程中向受试者递送两种(或更多种)不同的治疗,例如,在受试者被诊断出患有该障碍后并且在该障碍被治愈或消除之前或治疗因其他原因停止治疗之前递送两种或更多种治疗。在一些实施例中,当第二次治疗的递送开始时仍在进行一种治疗的递送,从而在治疗给予方面存在重叠。这有时在本文中称为“同时(simultaneous)”或“同时递送(concurrent delivery)”。在其他实施例中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一种情况的一些实施例中,治疗由于组合给予而更有效。例如,第二次治疗更有效,例如,与没有第一次治疗的情况下给予第二次治疗相比,更少的第二次治疗观察到等同的作用,或者第二次治疗在更大程度上减轻了症状,或者观察到与第一次治疗时类似的情况。在一些实施例中,递送使得症状减轻或与障碍相关的其他参数的减小大于在没有一种治疗时递送的另一种治疗所观察到的。这两种治疗的作用可以是部分相加、完全相加或大于相加的作用。该递送可以使得当递送第二次治疗时仍然可以检测到递送的第一次治疗的作用。本文所述的活化CAR T细胞和至少一种另外的治疗剂可以同时给予、在相同或分开的组合物中给予或顺序给予。对于顺序给予,可以首先给予本文所述的CAR表达细胞,并且可以第二次给予另外的试剂,或者可以逆转给予顺序。CAR T疗法和/或其他治疗剂、程序或方式可以在活动性障碍期间或在缓解期或活动性较低的疾病期间给予。CAR T疗法可以在另一种治疗之前给予、与该治疗同时给予、治疗后给予或在障碍缓解期间给予。

[0175] 当组合给予时,活化CAR T细胞和另外的药剂(例如,第二或第三种药剂),或全部,可以以与每种药剂单独使用(例如,作为单一疗法)的量或剂量更高、更低或相同的量或剂量给予。在某些实施例中,活化CART细胞、另外的药剂(例如,第二或第三种药剂)或全部的给予量或剂量低于(例如,至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)单独使用的每种药剂的量或剂量。在其他实施例中,导致所需效果(例如,癌症治疗)的活化CAR T细胞、另外的药剂(例如,第二或第三种药剂)或全部的量或剂量低于(例如,低至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)实现相同治疗效果所需的单独的每种药剂的量或剂量。在进一步的实施例中,治疗方案中本文所述的活化CAR T细胞可以与外科手术、化疗、放射、mTOR途径抑制

剂、免疫抑制剂(例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体、或其他免疫清除剂(如CAMPATH)、抗CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子或肽疫苗(如Izumoto等人,J.Neurosurg[神经外科杂志]108:963-971,2008中描述的那些)一起使用。

[0176] 在一个实施例中,本文所述的活化CAR T细胞可以与检查点抑制剂组合使用。示例性检查点抑制剂包括抗PD-1抑制剂(纳武单抗、MK-3475、派姆单抗、吡地利单抗、AMP-224、AMP-514)、抗CTLA4抑制剂(伊匹单抗和替西木单抗)、抗PDL1抑制剂(阿特珠单抗、阿威罗单抗(Avelomab)、MSB0010718C、MEDI4736和MPDL3280A),以及抗TIM3抑制剂。

[0177] 在一个实施例中,本文所述的活化CAR T细胞可以与化学治疗剂组合使用。示例性化学治疗剂包括蒽环霉素(例如,多柔比星(例如,脂质体多柔比星))、长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨)、烷化剂(例如,环磷酰胺、氮烯咪胺、美法仑、异环磷酰胺、替莫唑胺)、免疫细胞抗体(例如,阿仑单抗、吉妥珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗)、抗代谢药(包括,例如,叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如,氟达拉滨))、mTOR抑制剂、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A、胶霉毒素或硼替佐米)、免疫调节剂(如沙利度胺或沙利度胺衍生物(例如,来那度胺))。考虑用于组合疗法的一般化疗药物包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博来霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、放线菌素(放线菌素D,Cosmegan)、盐酸柔红霉素(Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松、多西紫杉醇(Taxotere®)、盐酸多柔比星(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、替扎他滨、吉西他滨(二氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea ®)、去甲氧柔红霉素(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、吉妥单抗、紫杉醇(Taxol®)、菲尼克斯(phoenix)(Yttrium90/MX-DTPA)、喷司他丁、卡莫司汀聚苯丙生20植入片(Gliadel®)、柠檬酸他莫西芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-硫代鸟嘌呤、噻替哌、替拉扎明(Tirazone®)、注射用托泊替康盐酸盐(Hycamptin®)、长春碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)。示例性的烷基化剂包括但不限于氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯):乌拉莫司汀(Aminouracil Mustard®、Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen mustard®、Uracillost®、Uracilmostaza®、Uramustin®、Uramustine®)、盐酸氮芥(Mustargen®)、

环磷酰胺(Cytoxan®、Neosar®、Clafen®、Endoxan®、Procytox®、Revimmune™)、异环磷酰胺(Mitoxana®)、美法仑(Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、哌泊溴烷(Amedel®、Vercyte®)、三亚乙基三聚氰胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三亚乙基硫代磷胺、替莫唑胺(Temodar®)、噻替哌(Thioplex®)、白消安(Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(BiCNU®)、洛莫司汀(CeeNU®)、链脲佐菌素(Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。另外的示例性烷化剂包括但不限于奥沙利铂(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和Temodal®);更生霉素(也称为放线菌素-D,Cosmegen®);美法仑(也称为L-PAM、L-溶血素和苯丙氨酸氮芥、Alkeran®);六甲蜜胺(也称为六甲基三聚氰胺(HMM)、Hexalen®);卡莫司汀(BiCNU®);苯达莫司汀(Treanda®);白消安(Busulfex®和Myleran®);卡铂(Paraplatin®);洛莫司汀(也称为CCNU、CeeNU®);顺铂(也称为CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytoxan®和Neosar®);达卡巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺、DTIC-Dome®);六甲蜜胺(也称为六甲基三聚氰胺(HMM)、Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);泼尼莫司汀;甲苄肼(Matulane®);二氯甲基二乙胺(也称氮芥、芥酸和盐酸甲氯乙胺、Mustargen®);链脲佐菌素(Zanosar®);噻替哌(也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA、Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytoxan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®);和盐酸苯达莫司汀(Treanda®)。示例性的mTOR抑制剂包括,例如,替西罗莫司;地磷莫司(ridaforolimus,正式名称为deferolimus,(1R,2R,45)-4-[(2R)-2[(1R,95,125,15R,16E,18R,19R,21R,235,24E,26E,28Z,305,325,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧杂-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.04'9]三十六烷-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基亚膦酸盐,也称为AP23573和MK8669,并描述于PCT公开号WO 03/064383);依维莫司(Afinitor®或RAD001);雷帕霉素(AY22989,Sirolimus®);塞马莫德(CAS 164301-51-3);替西罗莫司,(5-{2,4-双[(3S,)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-(i]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[iraw5,-4-(2-羟乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-JJ嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502,CAS1013101-36-4);和N2-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酰基甘氨酰-L-a-天冬氨酰L-丝氨酸-内盐(SF1126,CAS 936487-67-1)和XL765。示例性免疫调节剂包括,例如,阿伏珠单抗(可从Roche®获得);培非格司亭(Neulasta®);来那度胺(CC-5013,Revlimid®);沙利度胺(Thalomid®)、阿替米德(actimid)(CC4047);和IRX-2(人细胞因子的混合物,包括白细胞介素1、白细胞介素2和干扰素γ,CAS 951209-71-5,可从IRX治疗公司(IRX Therapeutics)获得)。示例性的蒽环霉素包括,例如,多柔比星(Adriamycin®和Rubex®);博莱霉素(lenoxane®);柔红霉素(盐酸多柔比星、道诺霉素和盐酸鲁维多霉素,Cerubidine®);柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体,DaunoXome®);米托蒽醌(DHAD,Novantrone®);表柔比星(Ellence™);去甲氧柔红霉素(Idamycin®、IdamycinPFS®);丝裂霉素C(Mutamycin®);格尔德霉素;除莠霉素;拉维霉素;和去乙酰基拉维霉素。示例性的长春花

生物碱包括,例如,长春瑞滨酒石酸盐(Navelbine®)、长春新碱(Oncovin®)和长春地辛(Eldisine®));长春碱(也称为长春碱硫酸盐、长春花碱和VLB,Alkaban-AQ®和Velban®);和长春瑞滨(Navelbine®)。示例性蛋白酶体抑制剂包括硼替佐米(Velcade®);卡非佐米(PX-171-007,(S)-4-甲基-N-((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)-2-((S,)-2-(2-吗啉代乙酰氨基)-4-苯基丁酰胺基)-戊酰胺);玛丽佐米(marizomib)(NPT0052);柠檬酸艾沙佐米(MLN-9708);地兰佐米(delanzomib)(CEP-18770);和O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酰-O-甲基-N-[(1S')-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酰胺(ONX-0912)。

[0178] 本领域技术人员可以容易地鉴定使用的化学治疗剂(例如,参见Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2014[癌症化疗药物医生手册2014],Edward Chu,Vincent T.DeVita Jr.,Jones&Bartlett Learning[琼斯和巴特利特学习];Principles of Cancer Therapy[癌症治疗原理],Harrison,Principles of Internal Medicine[内科原理]第85章,第18版;Therapeutic Targeting of Cancer Cells:Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology[癌细胞治疗靶向:分子靶向药物和癌症药理学时代],Abeloff,Clinical Oncology[临床肿瘤学]第28-29章,2013Elsevier[爱思唯尔];以及Fischer D S(编):The Cancer Chemotherapy Handbook[癌症化疗手册],第4版St.Louis,Mosby-Year Book[年鉴],2003)。

[0179] 在一个实施例中,将本文所述的活化CAR T细胞与降低靶向GITR和/或调节GITR功能的分子的水平和/或活性的分子、降低Treg细胞群的分子、mTOR抑制剂、GITR激动剂、激酶抑制剂、非受体酪氨酸激酶抑制剂、CDK4抑制剂和/或BTK抑制剂组合给予受试者。

[0180] 功效

[0181] 活化CAR T细胞的功效,例如在本文所述病症的治疗中的功效,或诱导如本文所述的应答的功效(例如,癌细胞的减少),可由技术熟练的临床医生确定。然而,如本文所用的治疗被认为是"有效治疗"的术语,是指本文所述病症的一种或多种体征或症状以有益方式改变,其他临床上可接受的症状得到改善,或甚至是减轻,或者根据本文所述的方法治疗后诱导所需的应答,例如至少10%。例如,可以通过测量根据本文所述方法治疗的病症的标志物、指标、症状和/或发病率或任何其他适当的可测量参数来评估功效。根据本文描述的方法的治疗可以减少标志物的水平或病症的症状,例如,减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%或更多。

[0182] 通过住院、或医学干预的需要评估的个体恶化失败(即,疾病的进展停止)也可以测量功效。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中描述的。

[0183] 治疗包括对个体或动物的疾病的任何治疗(一些非限制性实例包括人或动物)并且包括:(1)抑制疾病,例如,预防症状恶化(例如,疼痛或炎症);或(2)缓解疾病的严重程度,例如,引起症状消退。用于治疗疾病的有效量是指当给予有需要的受试者时足以导致对该疾病如本文所定义的有效治疗时的量。可以通过评估病症或所需的应答的物理指标来确定药剂的功效。通过测量任何一个此类参数或任何参数组合来监测给药和/或治疗的功效,

这在本领域技术人员的能力范围之内。可以在本文所述病症的动物模型中评估给定方法的功效,例如ALL的治疗。当使用实验动物模型时,当观察到统计学上显著的标志物改变时治疗的效果得到证明。

[0184] 所有专利和其他公开;包括参考文献、已授权的专利、已公布的专利申请和共同未决的专利申请;在整个本申请中引用的内容通过引用明确地并入本文,用于描述和披露,例如,在这些公开中描述的方法,其可以与本文所述的技术结合使用。只提供在本申请的申请日之前披露的这些出版物。在此方面的所有内容都不应当解释为承认本发明人由于在先有技术或任何其他原因而无权先于这类公开内容。关于日期或关于这些文件内容的表述的所有陈述均基于申请人可获得的信息,并不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0185] 本公开文本的实施例的描述并不旨在是穷尽性的或旨在将本发明局限于披露的精确形式。虽然本文中出于说明性目的描述了本公开文本的特定实施例和实例,但是正如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开内容的范围内可以进行各种等同性修改。例如,虽然以给定顺序呈现方法步骤或功能,但是替代实施例可以以不同顺序执行功能,或者可以基本上同时执行功能。本文提供的本公开文本的传授内容可以适当地应用于其他程序或方法。可以将本文所述的不同实施例组合以提供进一步的实施例。如有必要,可以修改本公开文本的各方面,以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开文本的再进一步的实施例。此外,由于生物功能等效性考虑,可以在蛋白质结构中进行一些改变而不影响种类或数量的生物或化学作用。可以根据具体实施方式对本公开内容作出这些以及其他改变。所有这类修改旨在包括在所附权利要求书的范围内。

[0186] 任何前述实施例的具体元件可以进行组合或取代其他实施例中的元件。此外,虽然已经在这些实施例的上下文中描述了与本公开文本的某些实施例相关联的优势,但是其他实施例也可以展现出这样的优势,并且并非所有实施例都必须表现出这些优势方可落入本公开内容的范围内。

[0187] 通过以下实例来进一步说明本文所述的技术,这些实例绝不应被解释为进一步的限制。

[0188] 实例

[0189] 实例1

[0190] 本文描述了经基因修饰的表达抗CD37嵌合抗原受体(CAR)的T细胞用于治疗CD37阳性恶性肿瘤(包括,例如,B细胞-NHL)的用途。这些示例性CAR包括CD37结合结构域、CD8跨膜结构域、4-1BB共刺激信号传导区域和CD3ζ信号传导结构域。在其他实施例中,CD8跨膜结构域、4-1BB共刺激信号传导区域和/或CD3ζ结构域可以被替代为另一个对应的序列,例如,本文所述的那些。可以通过在原代人T细胞中引入包含CD37-CAR的慢病毒载体来生成CAR T细胞。本文描述的体外数据证明了抗CD37 CART细胞对CD37阳性癌细胞的特异性活化、增殖和杀伤。

[0191] CD37在某些癌症相关细胞系中是可检测的(图1)。构建了包括图2中所示组分的抗CD37 CAR。两种构建体之间的差异是CAR的单链抗体组分中重链和轻链的顺序。这些构建体在细胞中表达,通过检测标记蛋白mCherry分析这些细胞的CAR表达(图3)。测量转导的T细胞的扩增(图4),并且证明了它们裂解靶癌细胞的能力(图5)。抗CD37 CAR T细胞能够裂解

CD37转导的白血病细胞的混合群体,以及CD37的高表达子(克隆1)和CD37的较低表达子(克隆2)(图6)。抗CD37被证明在响应于CD37刺激时增殖(图7)。可以将抗CD37 CAR T细胞给予小鼠以证明体内肿瘤清除(图8)。

[0192] 实例2

[0193] 抗CD37嵌合抗原受体T细胞:B细胞恶性肿瘤的一种新的潜在治疗选择。

[0194] CD37是在成熟B细胞上表达的四次跨膜蛋白,但在早期祖细胞或终末分化的浆细胞上不存在。CD37在非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、伯基特淋巴瘤和B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL)中的恶性B细胞上高度表达。因此,CD37代表B细胞恶性肿瘤的有希望的靶标,特别是对于逃避靶向常见B细胞抗原CD19和CD20的现有疗法的变体而言。

[0195] 本文描述了用于治疗B细胞恶性肿瘤的抗CD37 CAR(CAR-37)。具体地,本文描述的是第二代CAR,其由慢病毒载体编码并带有4-1BB共刺激结构域。测试了人源化鼠抗体衍生的单链可变片段的两种不同取向(V_L-V_H或V_H-V_L),并且本文提供了临床前数据图。

[0196] 结果

[0197] 通过以不同的效应物与靶标比例共培养CAR T-37细胞与表达CD37的人肿瘤细胞系(RAJI,OSU-CLL和JEKO-1)来评价CAR T-37细胞的体外细胞毒性活性。CD37指导的CAR T细胞在多种B细胞恶性肿瘤模型中证明抗原特异性活化、增殖、细胞因子产生和体外细胞毒性活性。接下来,在套细胞淋巴瘤模型中评估体内抗淋巴瘤功效。CAR-37治疗在2周内消除了肿瘤细胞,并且小鼠维持持久的缓解。注射7天后,在小鼠的血液中可检测到CAR T细胞。正在进行的研究评价小鼠中CAR T细胞的长期持续性。

[0198] 综合起来,这些结果证明,表达抗CD37 CAR的T细胞针对B细胞恶性肿瘤具有体外和体内显著活性。这些发现指示CD37-CAR T细胞是用于治疗CD37表达肿瘤患者的新型潜在治疗剂。

[0199] 实例3

[0200] CD37在B细胞恶性肿瘤中高度表达(图10)。使用人源化抗CD37mAb BI836826(Boehringer Ingelheim(勃林格殷格翰公司))构建抗CD37CAR并克隆到慢病毒载体中。细胞内结构域是与CD3ζ连接的41BB(CD137)ICD。

[0201] 抗CD37 CAR T细胞被证明在刺激后扩增(图11)并活化(图12)。用靶标抗原刺激后抗CD37 CAR T细胞扩增(图13)。证明了抗CD37 CAR T细胞在体外裂解肿瘤细胞(图14),并且测量了各种细胞因子的产生(图15)。证明了抗CD37 CAR T的体内功效(图16和17)。

[0202] 实例4

[0203] scFv序列

[0204] CD37scFv VH-VL(SEQ ID NO:1)包含VH链(氨基酸1-116(SEQ ID NO:2))、接头区(氨基酸117-136(SEQ ID NO:3))和VL链(氨基酸137-244(SEQ ID NO:4))。

[0205]
AVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTTYNR
KFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSS
AKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 1)

[0206] VH链(SEQ ID NO:2(SEQ ID NO:1的氨基酸1-116)

AVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTTYNR

[0207] KFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

[0208] 接头区(SEQ ID NO:3(SEQ ID NO:1的氨基酸117-136)

[0209] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3)

[0210] VL链(SEQ ID NO:4(SEQ ID NO:1的氨基酸137-244)

[0211] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSSAKTLAEGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 4)

[0212] CD37scFv VL-VH(SEQ ID NO:5)包含VL链(氨基酸1-108(SEQ ID NO:6))、接头区(氨基酸109-128(SEQ ID NO:7))和VH链(氨基酸129-244(SEQ ID NO:8))。

[0213] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSSAKTLAEGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSAVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGT TYNRKFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

[0214] VL链(SEQ ID NO:6(SEQ ID NO:5的氨基酸1-108))

[0215] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSSAKTLAEGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 6)

[0216] 接头区(SEQ ID NO:7(SEQ ID NO:5的氨基酸109-128)

[0217] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 7)

[0218] VH链(SEQ ID NO:8(SEQ ID NO:5的氨基酸129-244))

AVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTTYNR

[0219] KFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)

[0220] 实例5

[0221] CAR序列

[0222] pMGH8-CD8前导/抗CD37L-H/CD8铰链+TM/4-1BB/CD3ζ(SEQ ID NO:9),其包含CD8前导序列(氨基酸1-21(SEQ ID NO:10));抗CD37L-H(氨基酸22-265(SEQ ID NO:11));CD8铰链和TM结构域(氨基酸266-334(SEQ ID NO:12));4-1BB(氨基酸335-376(SEQ ID NO:13));和CD3ζ(氨基酸377-488(SEQ ID NO:14))。

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPG
KAPKLLVSSAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTK
VEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWV
RQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS

[0223] VGPMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO: 9)

[0224] CD8前导序列(SEQ ID NO:10(SEQ ID NO:9的氨基酸1-21))

[0225] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 10)

[0226] 抗CD37L-H(SEQ ID NO:11(SEQ ID NO:9的氨基酸22-265))

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSSAKTLAEGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSG

[0227] GGGSAVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGT
TYNRKFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 11)

[0228] CD8铰链和TM结构域SEQ ID NO:12(SEQ ID NO:9的氨基酸266-334)

[0229] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYC (SEQ ID NO: 12)

[0230] 4-1BB(SEQ ID NO:13(SEQ ID NO:9的氨基酸335-376))

[0231] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 13)

[0232] CD3ζ(SEQ ID NO:14(SEQ ID NO:9的氨基酸377-488))

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL

[0233] QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:
14)

[0234] pMGH8-CD8前导/抗CD37H-L/CD8铰链+TM/4-1BB/CD3ζ(SEQ ID NO:15),其包含CD8前导序列(氨基酸1-21(SEQ ID NO:16));抗CD37H-L(氨基酸22-265(SEQ ID NO:17));CD8铰链和TM结构域(氨基酸266-334(SEQ ID NO:18));4-1BB(氨基酸335-376(SEQ ID NO:19));和CD3ζ(氨基酸377-488(SEQ ID NO:20))。

MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAP
GQGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPM
DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENV
YSYLAWYQQKPGKAPKLLVSSAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHH

[0235] SDNPWTFGQGTKVEIKRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
NO: 15)

[0236] CD8前导序列(SEQ ID NO:16(SEQ ID NO:15的氨基酸1-21))

[0237] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 16)

[0238] 抗CD37H-L(SEQ ID NO:17(SEQ ID NO:15的氨基酸22-265))

[0239] AVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWMGNIDPYYGGTTYNR KFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSVGPMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENVYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSS AKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHHSDNPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 17)

[0240] CD8铰链和TM结构域SEQ ID NO:18(SEQ ID NO:15的氨基酸266-334)

[0241] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYC (SEQ ID NO: 18)

[0242] 4-1BB(SEQ ID NO:19(SEQ ID NO:15的氨基酸335-376))

[0243] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 19)

[0244] CD3ζ(SEQ ID NO:20(SEQ ID NO:15的氨基酸377-488))

[0245] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 20)

[0246] 实例6

[0247] 对B细胞恶性肿瘤有效的抗CD37 CAR-T细胞

[0248] 如上所述,CD37是在成熟B细胞上表达的四次跨膜蛋白,但在早期祖细胞或终末分化的浆细胞上不存在。它在恶性B细胞上高度表达,并且它代表了代表B细胞恶性肿瘤的有希望的靶标,特别是对于逃避靶向常见B细胞抗原CD19和CD20的现有疗法的变体而言。我们设计了首个用于治疗B细胞恶性肿瘤的抗CD37 CAR(CAR-37)。通过以不同的效应物与靶标比例共培养CART-37细胞和表达CD37的人肿瘤细胞系来评价CART-37细胞的体外细胞毒性活性。CD37指导的CAR T细胞在多种B细胞恶性肿瘤模型中证明抗原特异性增殖、细胞因子产生和体外细胞毒性活性。我们在套细胞淋巴瘤模型中评估体内抗淋巴瘤功效。CAR-37治疗在2周内消除了肿瘤细胞,并且小鼠维持持久的缓解。这些结果共同显示,表达抗CD37 CAR的T细胞针对B细胞恶性肿瘤具有体外和体内显著活性。这些发现指示CD37-CAR T细胞是用于治疗CD37表达肿瘤患者的新型潜在治疗剂。

[0249] 在正常组织中,CD37表达局限于淋巴器官(图18A)。然而,它在B细胞白血病和淋巴瘤细胞中高度表达(图18B)。基于图19中所示的设计制备CAR-37T细胞。CAR-37T细胞能够离体增殖和扩增(图20A-20D)。表达抗CD37 CAR的T细胞对套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和B细胞淋巴母细胞白血病肿瘤细胞具有显著的体外活性(图21A-21D),并产生如图22A-22C所示的细胞因子。表达抗CD37 CAR的T细胞在套细胞淋巴瘤模型中具有强的体内抗肿瘤活性(图23A-23C)

[0250] 实例7

[0251] CD37和CD19在人肿瘤细胞系中的表达

[0252] 评价了人肿瘤细胞系中CD37和CD19的表达。图24的顶图重现了图18A所示的数据,并且显示CD37在非霍奇金淋巴瘤,包括MCL(JEKO-1)、伯基特淋巴瘤(RAJI)和B细胞慢性淋

巴细胞白血病(OSU-CLL)中高度表达,但在ALL细胞系NALM6中不存在。图24的底图显示了MCL患者衍生的异种移植物(PDX)系PDX_44685、PDX_98848和PDX_96069中CD37和CD19的表达,以及PDX细胞系中CD19和CD37的表达百分比。MCL PDX细胞系表达CD37和CD19两者。

[0253] 实例8

[0254] 抗CD37 CAR-T细胞对MCL PDX肿瘤有效

[0255] 评价了抗CD37 CAR-T细胞对MCL PDX细胞的体内功效。图25A显示了实验示意图;给NOD/SCID小鼠静脉内注射1x10^6个PDX_98848细胞。在第0天,小鼠接受3x10^6个对照T细胞(UTD)、CAR-37H-L或CAR-19。在第3天、第7天、第10天、第14天、第17天、第21天和第35天通过BLI评价肿瘤生长。PDX随时间生长的代表性生物发光图像显示在图25B中。表达抗CD37 CAR的T细胞对MCL PDX具有强的体内抗肿瘤活性(图25A-25C)。

[0256] 实例9

[0257] CD37在外周T细胞淋巴瘤(PTCL)中的表达

[0258] 在PTCL细胞系中评价CD37的表达,包括HUT78(皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL))和FEPD(间变性大细胞淋巴瘤(ALCL))(图26A)。CD37在两个细胞系中均表达。在CAR刺激后检查早期活化标志物CD69的表达(图26B和26C)。

[0259] 实例10

[0260] 抗CD37 CAR-T细胞针对PTCL细胞系具有体外细胞毒性活性

[0261] 评价抗CD37 CAR-T细胞对PTCL细胞系的体外细胞毒性活性(图27)。表达抗CD37 CAR的T细胞对PTCL细胞系(包括CTCL和ALCL肿瘤模型)具有显著的体外活性(图27)。这些发现证明CD37-CAR T细胞可用作治疗PTCL(包括CTCL和ALCL)患者的治疗剂。

[0262] 实例11

[0263] AML中的CD37表达

[0264] 已经在AML样品中检测到CD37表达(Pereira等人,Mol.Cancer Ther.[癌症分子治疗学]14(7):1650-1660,2015)。在AML细胞系TF1、MOLM13和THP中通过流式细胞术评价AML细胞系中CD37的表达(图28)。所有三个AML细胞系均表达CD37(图28)。这些发现证明CD37-CAR T细胞可用作治疗AML患者的治疗剂。

[0265] 在以下编号段落中进一步描述本发明:

[0266] 一种嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含:

[0267] a.包含CD37结合序列的细胞外结构域;

[0268] b.跨膜结构域;以及

[0269] c.T细胞细胞内信号传导结构域。

[0270] 如段落1所述的CAR多肽,还包含共刺激结构域。

[0271] 如段落1或2所述的CAR多肽,其中该CD37结合序列包含抗体试剂。

[0272] 如段落3所述的CAR多肽,其中该抗体试剂包含单链抗体(scFv)。

[0273] 如段落4所述的CAR多肽,其中该scFv包含抗体重链N端的抗体轻链。

[0274] 如段落4所述的CAR多肽,其中该scFv包含抗体轻链N端的抗体重链。

[0275] 如段落5或6所述的CAR多肽,该抗体轻链包括SEQ ID NO:4或6的序列或其变体,和/或该重链包括SEQ ID NO:2或8的序列或其变体。

[0276] 如段落3至7中任一项所述的CAR多肽,其中该抗体试剂包含选自SEQ ID NO:1或5

的序列或其变体。

[0277] 如段落1至7中任一项所述的CAR多肽,其中该跨膜结构域包含来自CD8或4-1BB的跨膜结构域。

[0278] 如段落8所述的CAR多肽,其中该跨膜结构域包含SEQ ID NO:12或18的序列或其变体。

[0279] 如段落2至8中任一项所述的CAR多肽,其中该共刺激结构域包含4-1BB的共刺激结构域。

[0280] 如段落11所述的CAR多肽,其中该共刺激结构域包含SEQ ID NO:13或19的序列或其变体。

[0281] 如段落1至12中任一项所述的CAR多肽,其中该T细胞细胞内结构域包含CD3ζ细胞内信号传导结构域。

[0282] 如段落13所述的CAR多肽,其中该CD3ζ细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:14或20的序列或其变体。

[0283] 如段落14所述的CAR多肽,其中该CD3ζ细胞内信号传导结构域包含1、2或3个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM),并且保留该一个或多个ITAM的天然酪氨酸残基。

[0284] 如段落14所述的CAR多肽,其中该CD3ζ细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:14或20的序列。

[0285] 如段落1-16中任一项所述的CAR多肽,其包含SEQ ID NO:9或15的序列或其变体。

[0286] 一种哺乳动物细胞,其包含:

[0287] a.如段落1至16中任一项所述的CAR多肽;或

[0288] b.编码如段落1至17中任一项所述的CAR多肽的核酸。

[0289] 如段落18所述的细胞,其中该细胞是T细胞。

[0290] 如段落18或19所述的细胞,其中该细胞是人类细胞。

[0291] 如段落18至20中任一项所述的细胞,其中该细胞是从患有或被诊断患有癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的个体获得的。

[0292] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:

[0293] a.工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如段落1至17中任一项所述的CAR多肽;

[0294] b.将工程化的T细胞给予该受试者。

[0295] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括将如段落18至21中任一项所述的细胞给予该受试者。

[0296] 如段落22或23所述的方法,其中该癌症是CD37+癌症。

[0297] 如段落24所述的方法,其中该CD37+癌症是淋巴瘤或白血病。

[0298] 如段落25所述的方法,其中该淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、B细胞淋巴母细胞性淋巴瘤或T细胞淋巴瘤,或者该白血病是急性髓性白血病(AML)。

[0299] 如段落26所述的方法,其中该T细胞淋巴瘤是外周T细胞淋巴瘤(PTCL)。

[0300] 如段落27所述的方法,其中该PTCL是皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0301] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括向该受试者给予如段落18至21中任一项所述的细胞,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列,并且该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0302] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:

[0303] a.选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;

[0304] b.工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如段落1至17中任一项所述的CAR多肽;

[0305] c.将工程化的T细胞给予该受试者;

[0306] 其中该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0307] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:

[0308] a.选择对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答的受试者;

[0309] b.将如段落18至21中任一项所述的细胞给予该受试者,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列,并且该受试者对抗CD19和/或抗CD20疗法无应答。

[0310] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括:

[0311] a.工程化T细胞以在该T细胞表面上包含如段落1至17中任一项所述的CAR多肽;

[0312] b.将工程化的T细胞给予该受试者;

[0313] 其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0314] 一种在有需要的受试者中治疗癌症、浆细胞障碍或自身免疫疾病的方法,该方法包括向该受试者给予如段落18至21中任一项所述的细胞,其中该细胞包含含有细胞外结构域的CAR,该细胞外结构域包含CD37结合序列;

[0315] 其中该受试者被同时给予抗CD19和/或抗CD20疗法。

[0316] 一种组合物,该组合物包含如段落1至17中任一项所述的CAR多肽或如段落18至21中任一项所述的细胞,被配制为用于治疗癌症。

[0317] 如段落34所述的组合物,该组合物还包含药学上可接受的载体。

[0318] 其他实施例在下面权利要求书的范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 综合医院公司(The General Hospital Corporation)

[0003] <120> 靶向CD37的嵌合抗原受体

[0004] <130> 51295-009WO2

[0005] <150> PCT/US18/13213

[0006] <151> 2018-01-10

[0007] <150> US 62/584,060

[0008] <151> 2017-11-09

[0009] <150> US 62/580,243

[0010] <151> 2017-11-01

[0011] <150> US 62/472,275

[0012] <151> 2017-03-16

[0013] <160> 20

[0014] <170> PatentIn 3.5版

[0015] <210> 1

[0016] <211> 244

[0017] <212> PRT

[0018] <213> 人工序列

[0019] <220>

[0020] <223> 合成构建体

[0021] <400> 1

[0022] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0023] 1 5 10 15

[0024] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

[0025] 20 25 30

[0026] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0027] 35 40 45

[0028] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe

[0029] 50 55 60

[0030] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0031] 65 70 75 80

[0032] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0033] 85 90 95

[0034] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0035] 100 105 110

[0036] Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0037] 115 120 125

[0038] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

[0039] 130 135 140

[0040] Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg

[0041] 145 150 155 160

[0042] Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

[0043] 165 170 175

[0044] Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu

[0045] 180 185 190

[0046] Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

[0047] 195 200 205

[0048] Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys

[0049] 210 215 220

[0050] Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

[0051] 225 230 235 240

[0052] Glu Ile Lys Arg

[0053] <210> 2

[0054] <211> 116

[0055] <212> PRT

[0056] <213> 人工序列

[0057] <220>

[0058] <223> 合成构建体

[0059] <400> 2

[0060] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0061] 1 5 10 15

[0062] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

[0063] 20 25 30

[0064] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0065] 35 40 45

[0066] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe

[0067] 50 55 60

[0068] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0069] 65 70 75 80

[0070] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0071] 85 90 95

[0072] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0073] 100 105 110

[0074] Thr Val Ser Ser

[0075] 115

[0076] <210> 3

[0077] <211> 20

[0078] <212> PRT

[0079] <213> 人工序列

[0080] <220>

[0081] <223> 合成构建体

[0082] <400> 3

[0083] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[0084] 1 5 10 15

[0085] Gly Gly Gly Ser

[0086] 20

[0087] <210> 4

[0088] <211> 108

[0089] <212> PRT

[0090] <213> 人工序列

[0091] <220>

[0092] <223> 合成构建体

[0093] <400> 4

[0094] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0095] 1 5 10 15

[0096] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

[0097] 20 25 30

[0098] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

[0099] 35 40 45

[0100] Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0101] 50 55 60

[0102] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0103] 65 70 75 80

[0104] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

[0105] 85 90 95

[0106] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

[0107] 100 105

[0108] <210> 5

[0109] <211> 244

[0110] <212> PRT

[0111] <213> 人工序列

[0112] <220>

[0113] <223> 合成构建体

[0114] <400> 5

[0115] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0116] 1 5 10 15

[0117] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
[0118] 20 25 30
[0119] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
[0120] 35 40 45
[0121] Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0122] 50 55 60
[0123] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0124] 65 70 75 80
[0125] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
[0126] 85 90 95
[0127] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly
[0128] 100 105 110
[0129] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0130] 115 120 125
[0131] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0132] 130 135 140
[0133] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[0134] 145 150 155 160
[0135] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0136] 165 170 175
[0137] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
[0138] 180 185 190
[0139] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0140] 195 200 205
[0141] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0142] 210 215 220
[0143] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0144] 225 230 235 240
[0145] Thr Val Ser Ser
[0146] <210> 6
[0147] <211> 108
[0148] <212> PRT
[0149] <213> 人工序列
[0150] <220>
[0151] <223> 合成构建体
[0152] <400> 6
[0153] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0154] 1 5 10 15
[0155] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

[0156] 20 25 30

[0157] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

[0158] 35 40 45

[0159] Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0160] 50 55 60

[0161] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0162] 65 70 75 80

[0163] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

[0164] 85 90 95

[0165] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

[0166] 100 105

[0167] <210> 7

[0168] <211> 20

[0169] <212> PRT

[0170] <213> 人工序列

[0171] <220>

[0172] <223> 合成构建体

[0173] <400> 7

[0174] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[0175] 1 5 10 15

[0176] Gly Gly Gly Ser

[0177] 20

[0178] <210> 8

[0179] <211> 116

[0180] <212> PRT

[0181] <213> 人工序列

[0182] <220>

[0183] <223> 合成构建体

[0184] <400> 8

[0185] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0186] 1 5 10 15

[0187] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

[0188] 20 25 30

[0189] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0190] 35 40 45

[0191] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe

[0192] 50 55 60

[0193] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0194] 65 70 75 80

[0195] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0196] 85 90 95
[0197] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0198] 100 105 110
[0199] Thr Val Ser Ser
[0200] 115
[0201] <210> 9
[0202] <211> 488
[0203] <212> PRT
[0204] <213> 人工序列
[0205] <220>
[0206] <223> 合成构建体
[0207] <400> 9
[0208] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0209] 1 5 10 15
[0210] His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
[0211] 20 25 30
[0212] Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu
[0213] 35 40 45
[0214] Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
[0215] 50 55 60
[0216] Pro Lys Leu Leu Val Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro
[0217] 65 70 75 80
[0218] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[0219] 85 90 95
[0220] Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His
[0221] 100 105 110
[0222] Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0223] 115 120 125
[0224] Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0225] 130 135 140
[0226] Gly Gly Gly Gly Ser Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
[0227] 145 150 155 160
[0228] Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0229] 165 170 175
[0230] Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
[0231] 180 185 190
[0232] Gly Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr
[0233] 195 200 205

[0234] Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0235] 210 215 220
[0236] Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
[0237] 225 230 235 240
[0238] Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly
[0239] 245 250 255
[0240] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[0241] 260 265 270
[0242] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[0243] 275 280 285
[0244] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[0245] 290 295 300
[0246] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
[0247] 305 310 315 320
[0248] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
[0249] 325 330 335
[0250] Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
[0251] 340 345 350
[0252] Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
[0253] 355 360 365
[0254] Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
[0255] 370 375 380
[0256] Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
[0257] 385 390 395 400
[0258] Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
[0259] 405 410 415
[0260] Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
[0261] 420 425 430
[0262] Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
[0263] 435 440 445
[0264] Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
[0265] 450 455 460
[0266] Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
[0267] 465 470 475 480
[0268] His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0269] 485
[0270] <210> 10
[0271] <211> 21
[0272] <212> PRT

[0273] <213> 人工序列

[0274] <220>

[0275] <223> 合成构建体

[0276] <400> 10

[0277] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

[0278] 1 5 10 15

[0279] His Ala Ala Arg Pro

[0280] 20

[0281] <210> 11

[0282] <211> 244

[0283] <212> PRT

[0284] <213> 人工序列

[0285] <220>

[0286] <223> 合成构建体

[0287] <400> 11

[0288] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0289] 1 5 10 15

[0290] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

[0291] 20 25 30

[0292] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

[0293] 35 40 45

[0294] Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0295] 50 55 60

[0296] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0297] 65 70 75 80

[0298] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp

[0299] 85 90 95

[0300] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly

[0301] 100 105 110

[0302] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[0303] 115 120 125

[0304] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0305] 130 135 140

[0306] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

[0307] 145 150 155 160

[0308] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0309] 165 170 175

[0310] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe

[0311] 180 185 190

[0312] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0313] 195 200 205
[0314] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0315] 210 215 220
[0316] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0317] 225 230 235 240
[0318] Thr Val Ser Ser
[0319] <210> 12
[0320] <211> 69
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 人工序列
[0323] <220>
[0324] <223> 合成构建体
[0325] <400> 12
[0326] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[0327] 1 5 10 15
[0328] Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[0329] 20 25 30
[0330] Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
[0331] 35 40 45
[0332] Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
[0333] 50 55 60
[0334] Ile Thr Leu Tyr Cys
[0335] 65
[0336] <210> 13
[0337] <211> 42
[0338] <212> PRT
[0339] <213> 人工序列
[0340] <220>
[0341] <223> 合成构建体
[0342] <400> 13
[0343] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
[0344] 1 5 10 15
[0345] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
[0346] 20 25 30
[0347] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
[0348] 35 40
[0349] <210> 14
[0350] <211> 112

[0351] <212> PRT

[0352] <213> 人工序列

[0353] <220>

[0354] <223> 合成构建体

[0355] <400> 14

[0356] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

[0357] 1 5 10 15

[0358] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

[0359] 20 25 30

[0360] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

[0361] 35 40 45

[0362] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

[0363] 50 55 60

[0364] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

[0365] 65 70 75 80

[0366] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

[0367] 85 90 95

[0368] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

[0369] 100 105 110

[0370] <210> 15

[0371] <211> 488

[0372] <212> PRT

[0373] <213> 人工序列

[0374] <220>

[0375] <223> 合成构建体

[0376] <400> 15

[0377] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

[0378] 1 5 10 15

[0379] His Ala Ala Arg Pro Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

[0380] 20 25 30

[0381] Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

[0382] 35 40 45

[0383] Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

[0384] 50 55 60

[0385] Gly Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr

[0386] 65 70 75 80

[0387] Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser

[0388] 85 90 95

[0389] Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

[0390] 100 105 110

[0391] Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly

[0392] 115 120 125

[0393] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0394] 130 135 140

[0395] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln

[0396] 145 150 155 160

[0397] Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

[0398] 165 170 175

[0399] Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp

[0400] 180 185 190

[0401] Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val Ser Ser Ala

[0402] 195 200 205

[0403] Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

[0404] 210 215 220

[0405] Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe

[0406] 225 230 235 240

[0407] Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly

[0408] 245 250 255

[0409] Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

[0410] 260 265 270

[0411] Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

[0412] 275 280 285

[0413] Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

[0414] 290 295 300

[0415] Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

[0416] 305 310 315 320

[0417] Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg

[0418] 325 330 335

[0419] Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro

[0420] 340 345 350

[0421] Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu

[0422] 355 360 365

[0423] Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala

[0424] 370 375 380

[0425] Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu

[0426] 385 390 395 400

[0427] Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly

[0428] 405 410 415

[0429] Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
[0430] 420 425 430
[0431] Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
[0432] 435 440 445
[0433] Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
[0434] 450 455 460
[0435] Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
[0436] 465 470 475 480
[0437] His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0438] 485
[0439] <210> 16
[0440] <211> 21
[0441] <212> PRT
[0442] <213> 人工序列
[0443] <220>
[0444] <223> 合成构建体
[0445] <400> 16
[0446] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0447] 1 5 10 15
[0448] His Ala Ala Arg Pro
[0449] 20
[0450] <210> 17
[0451] <211> 244
[0452] <212> PRT
[0453] <213> 人工序列
[0454] <220>
[0455] <223> 合成构建体
[0456] <400> 17
[0457] Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0458] 1 5 10 15
[0459] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[0460] 20 25 30
[0461] Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0462] 35 40 45
[0463] Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
[0464] 50 55 60
[0465] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0466] 65 70 75 80
[0467] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0468] 85 90 95

[0469] Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0470] 100 105 110

[0471] Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0472] 115 120 125

[0473] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

[0474] 130 135 140

[0475] Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg

[0476] 145 150 155 160

[0477] Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

[0478] 165 170 175

[0479] Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val Ser Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu

[0480] 180 185 190

[0481] Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

[0482] 195 200 205

[0483] Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys

[0484] 210 215 220

[0485] Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

[0486] 225 230 235 240

[0487] Glu Ile Lys Arg

[0488] <210> 18

[0489] <211> 69

[0490] <212> PRT

[0491] <213> 人工序列

[0492] <220>

[0493] <223> 合成构建体

[0494] <400> 18

[0495] Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

[0496] 1 5 10 15

[0497] Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

[0498] 20 25 30

[0499] Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

[0500] 35 40 45

[0501] Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

[0502] 50 55 60

[0503] Ile Thr Leu Tyr Cys

[0504] 65

[0505] <210> 19

[0506] <211> 42

[0507] <212> PRT

[0508] <213> 人工序列

[0509] <220>

[0510] <223> 合成构建体

[0511] <400> 19

[0512] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

[0513] 1 5 10 15

[0514] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

[0515] 20 25 30

[0516] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

[0517] 35 40

[0518] <210> 20

[0519] <211> 112

[0520] <212> PRT

[0521] <213> 人工序列

[0522] <220>

[0523] <223> 合成构建体

[0524] <400> 20

[0525] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

[0526] 1 5 10 15

[0527] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

[0528] 20 25 30

[0529] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

[0530] 35 40 45

[0531] Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

[0532] 50 55 60

[0533] Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

[0534] 65 70 75 80

[0535] Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

[0536] 85 90 95

[0537] Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

[0538] 100 105 110

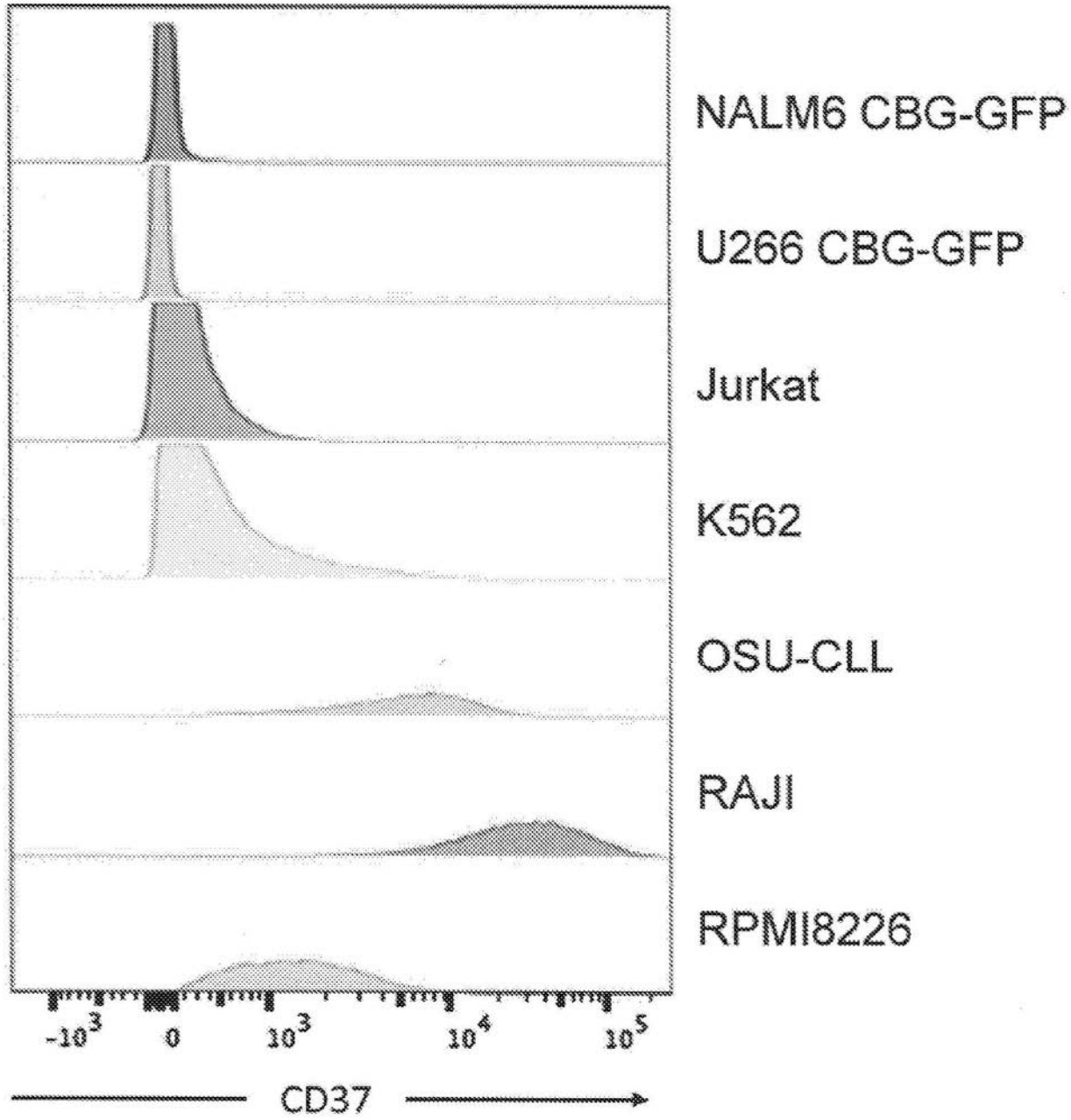

NALM6 CBG-GFP
U266 CBG-GFP
Jurkat
K562
OSU-CLL
RAJI
RPMI8226
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
CD37

图1

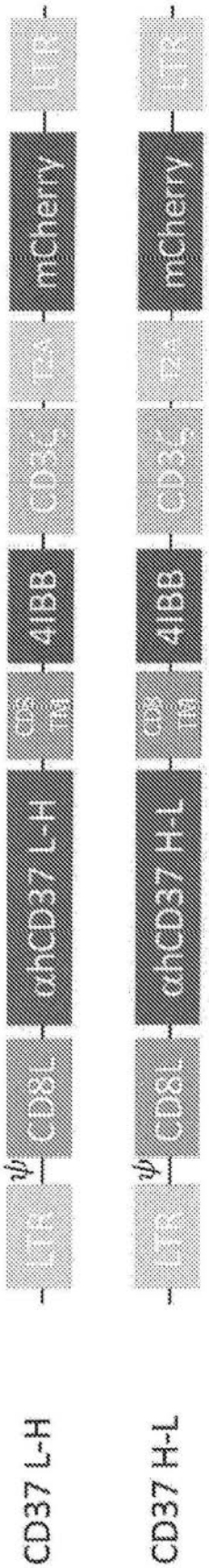

LTR
ψ
CD8L
αhCD37 L-H
CD3ζ TM
4IBB
CD3ζ
T2A
mCherry
LTR
CD37 L-H
LTR
ψ
CD8L
αhCD37 H-L
CD3ζ TM
4IBB
CD3ζ
T2A
mCherry
LTR
CD37 H-L

图2

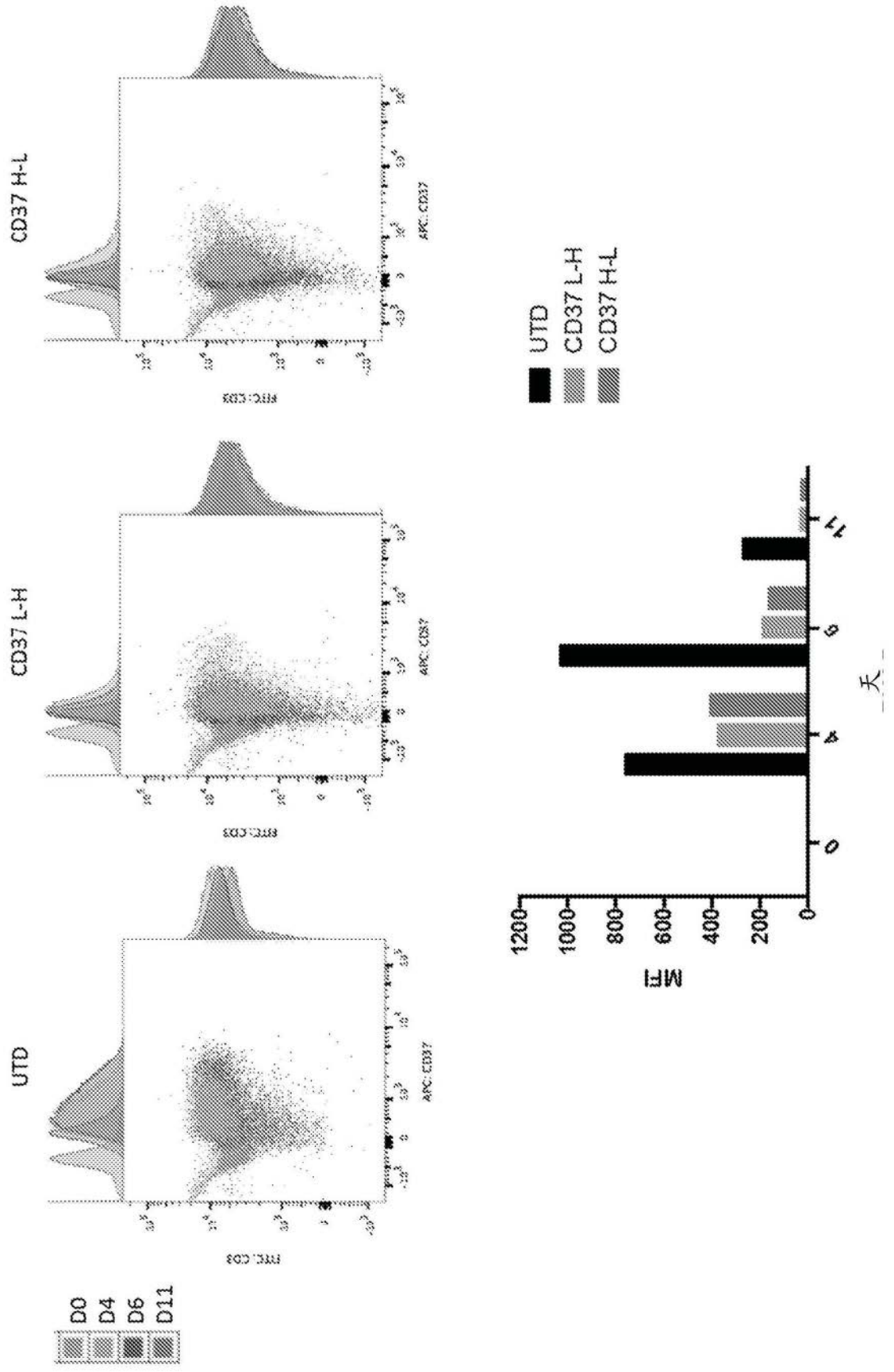

CD37 H-L
CD37 L-H
UTD
D0
D4
D6
D11
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
MFI
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
6
11
天

图3

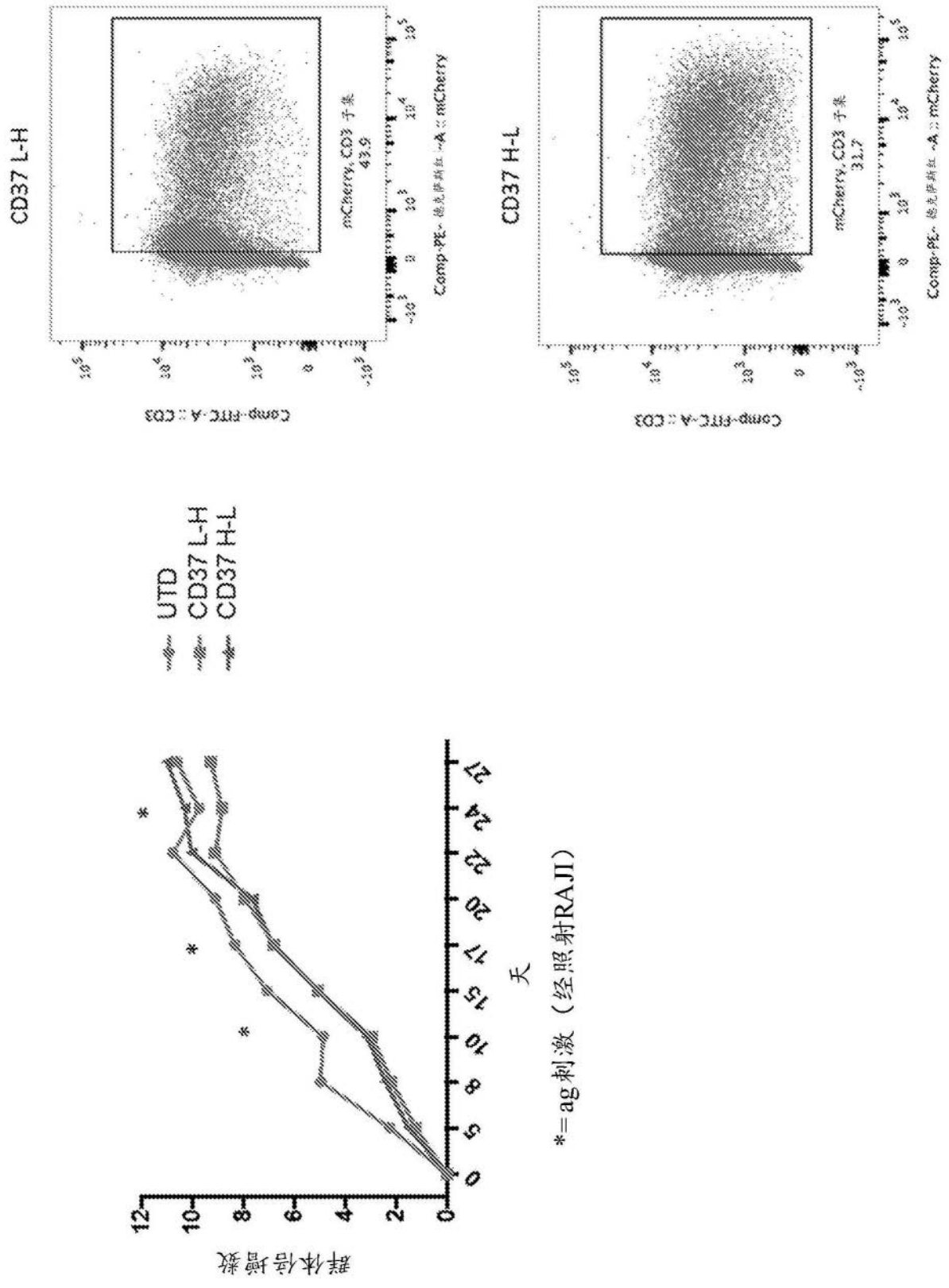

CD37 L-H
mCherry, CD3 子集
43.9
Comp-PE-德克萨斯红-A :: mCherry
Comp-FITC-A :: CD3
CD37 H-L
mCherry, CD3 子集
31.7
Comp-PE-德克萨斯红-A :: mCherry
Comp-FITC-A :: CD3
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
群体倍增数
天
*=ag刺激（经照射RAJI）

图4

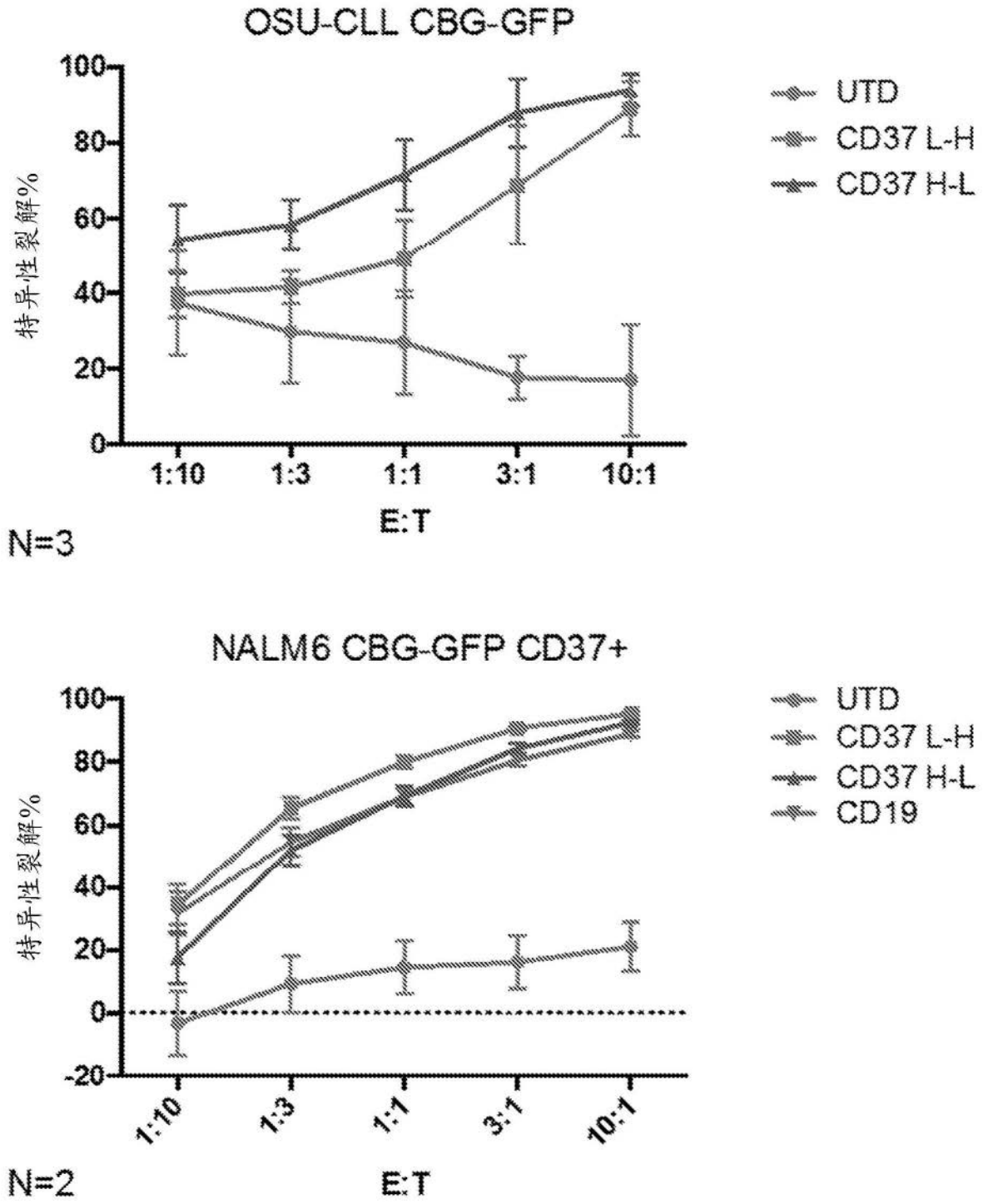

OSU-CLL CBG-GFP
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T
N=3
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
NALM6 CBG-GFP CD37+
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
-20
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T
N=2
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
CD19

图5

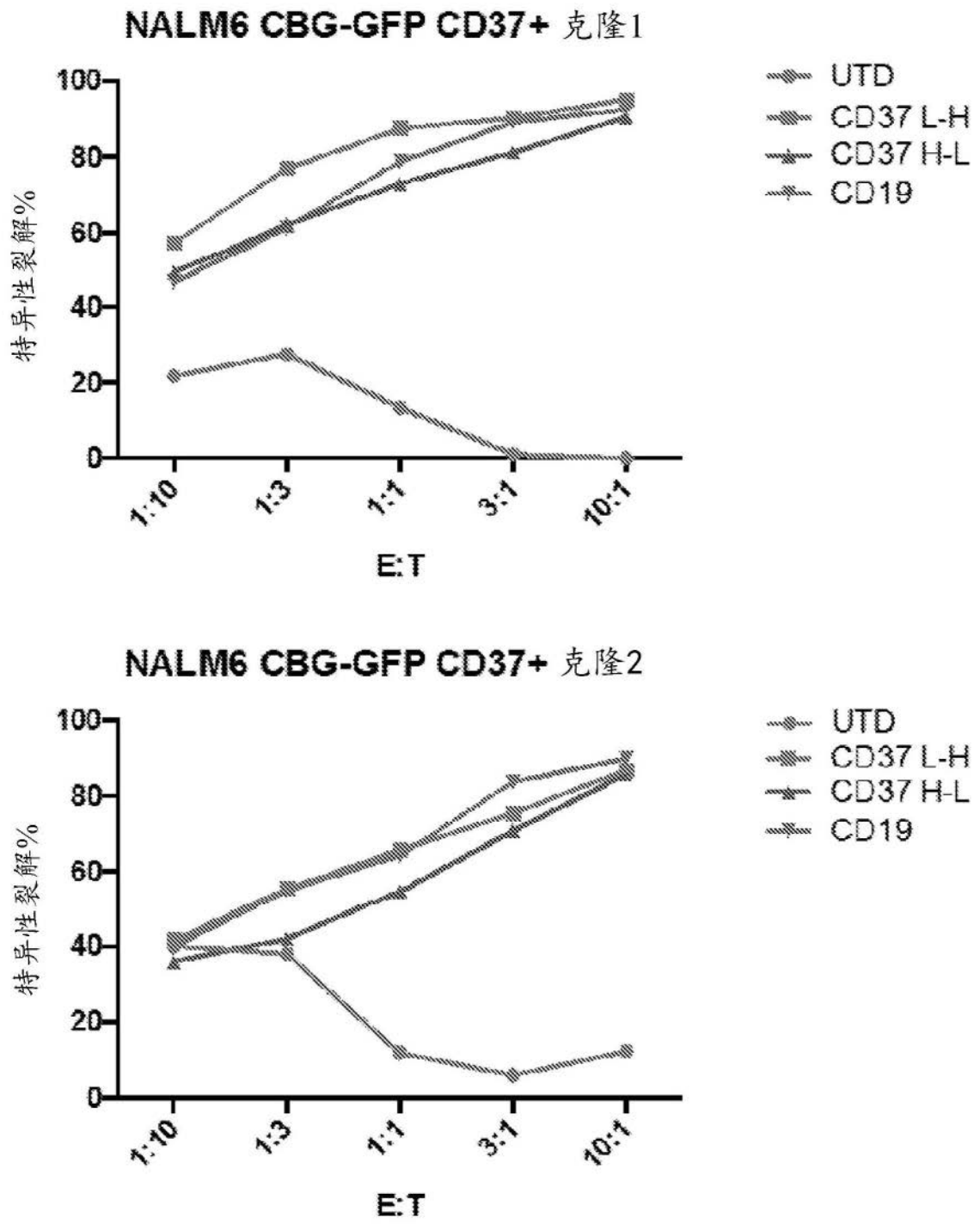

NALM6 CBG-GFP CD37+ 克隆1
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
CD19
NALM6 CBG-GFP CD37+ 克隆2
特异性裂解%
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
CD19

图5(续)

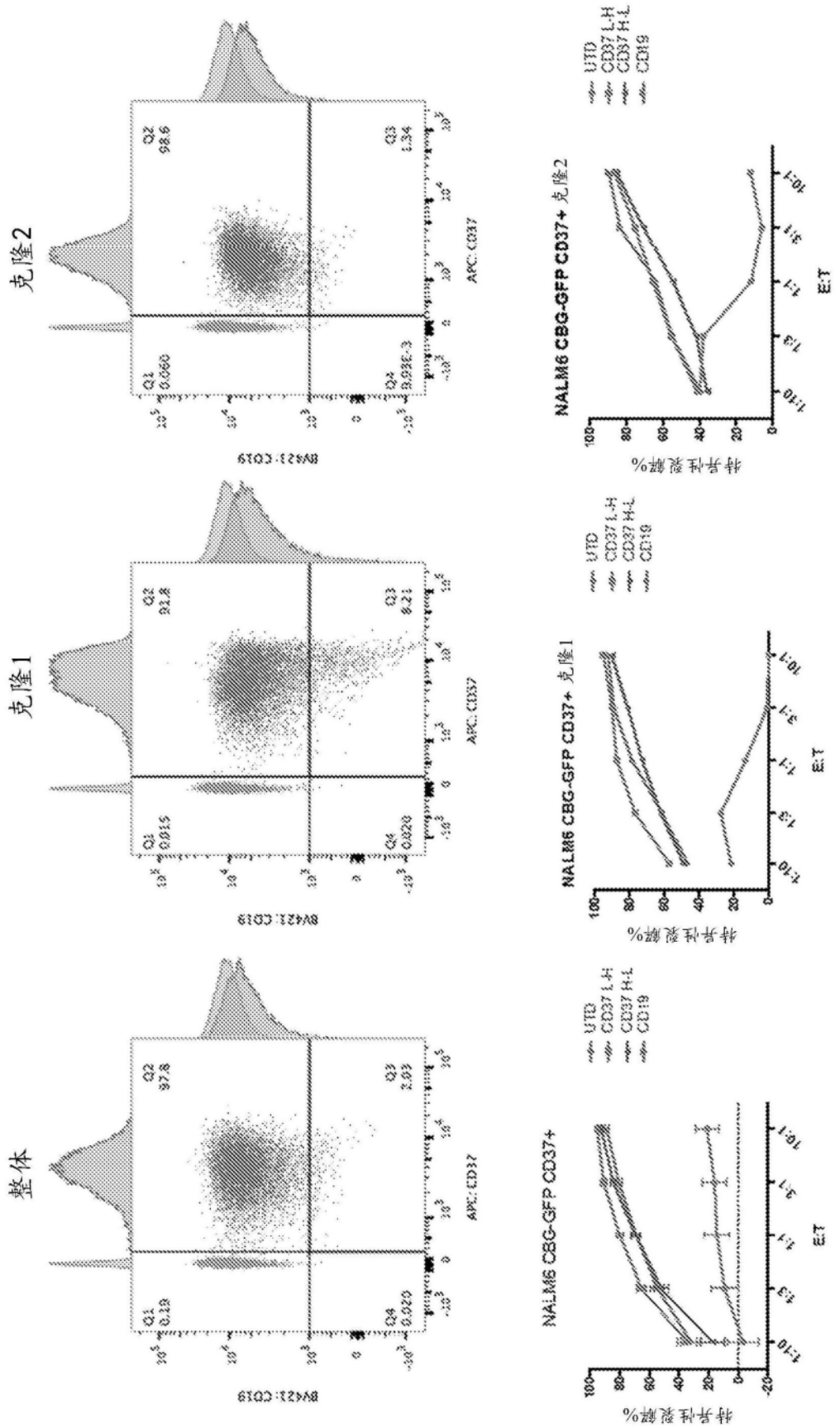

克隆2
克隆1
整体
BV421: CD19
APC: CD37
Q1
Q2
Q3
Q4
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
CD19
NALM6 CBG-GFP CD37+ 克隆2
NALM6 CBG-GFP CD37+ 克隆1
NALM6 CBG-GFP CD37+
特异性裂解%
E:T

图6

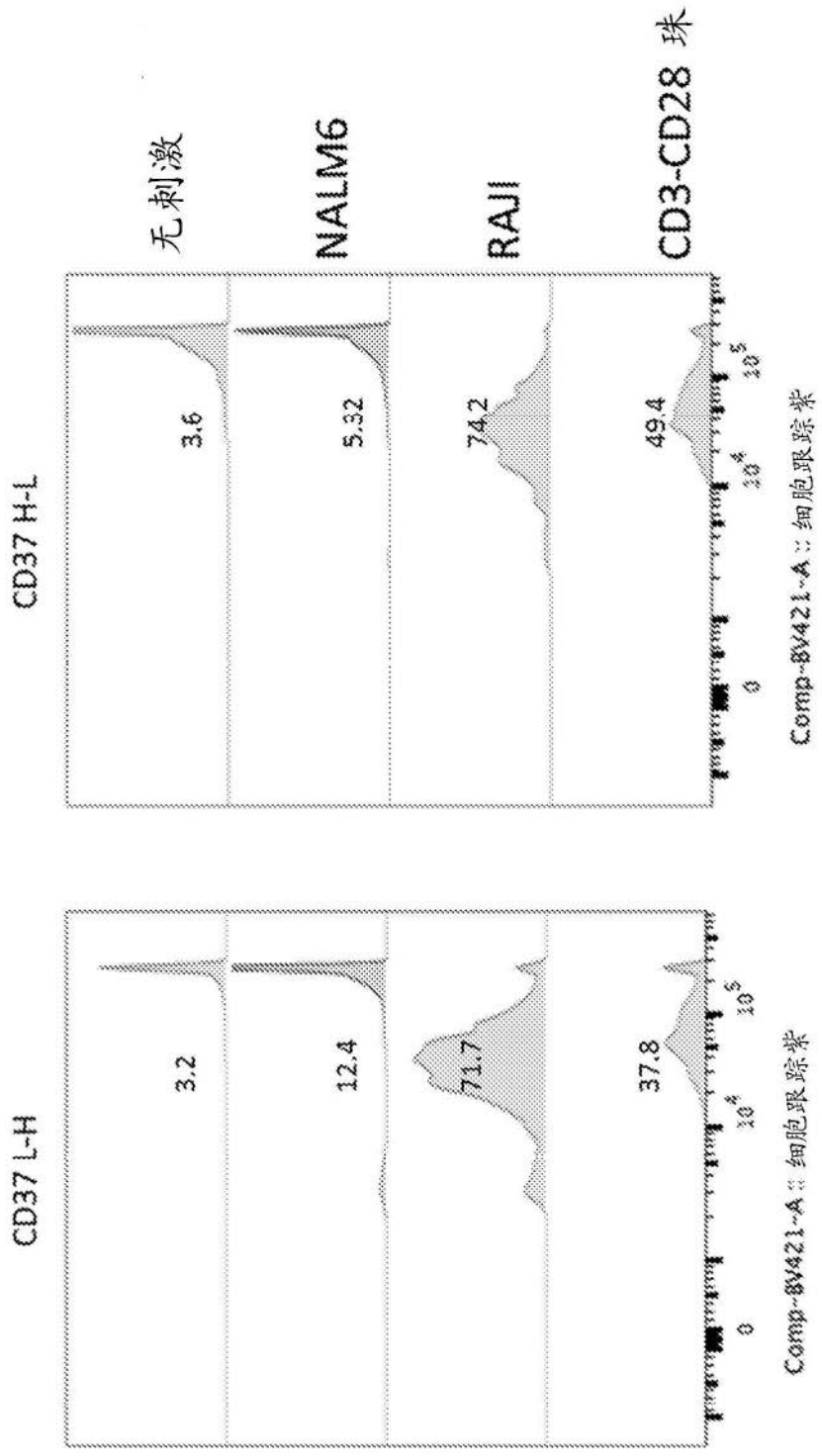

无刺激
NALM6
RAJI
CD3-CD28 珠
CD37 H-L
CD37 L-H
3.6
5.32
74.2
49.4
3.2
12.4
71.7
37.8
Comp-BV421-A :: 细胞跟踪紫
Comp-BV421-A :: 细胞跟踪紫

图7

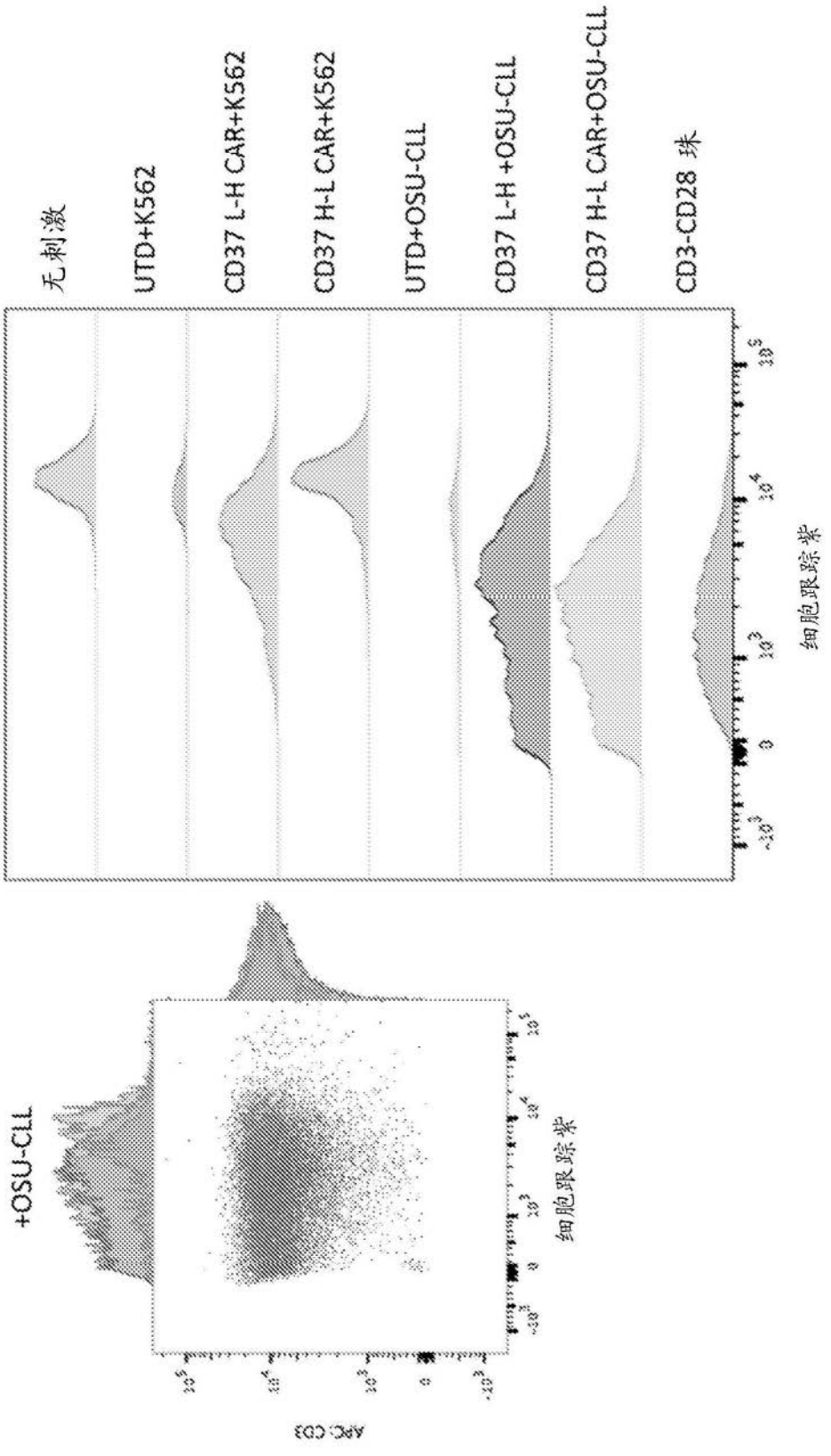

无刺激
UTD+K562
CD37 L-H CAR+K562
CD37 H-L CAR+K562
UTD+OSU-CLL
CD37 L-H +OSU-CLL
CD37 H-L CAR+OSU-CLL
CD3-CD28 珠
细胞跟踪紫
+OSU-CLL
APC-CD3
细胞跟踪紫

图7(续)

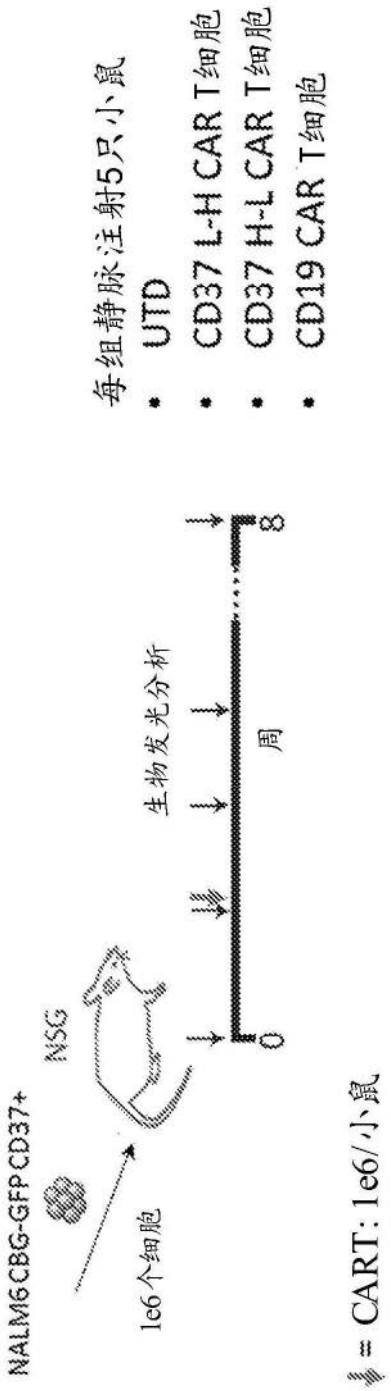

每组静脉注射5只小鼠
• UTD
• CD37 L-H CAR T细胞
• CD37 H-L CAR T细胞
• CD19 CAR T细胞
NALM6CBG-GFP CD37+
1e6个细胞
NSG
生物发光分析
0
周
8
= CART: 1e6/小鼠
第7天

图8

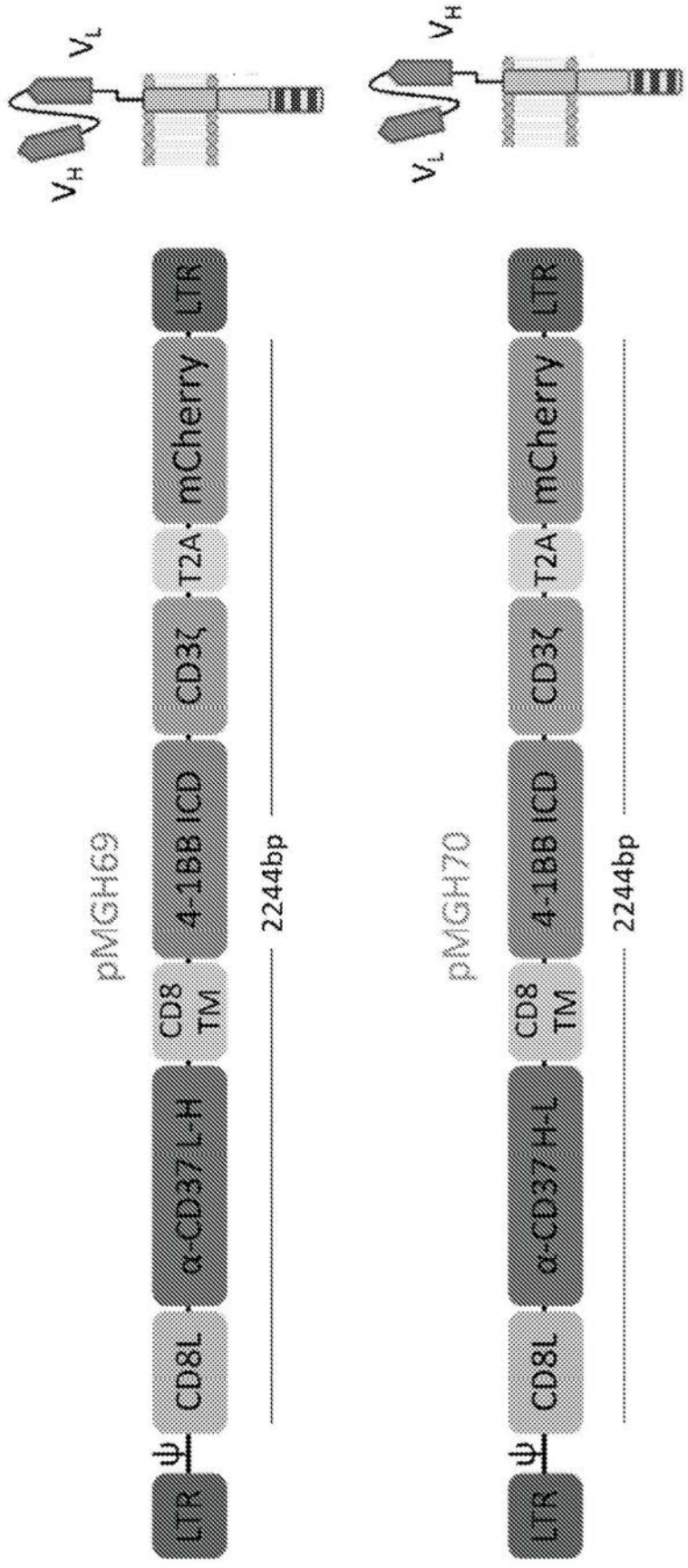

V_L
V_H
pMGH69
LTR
Ψ
CD8L
α-CD37 L-H
CD8 TM
4-1BB ICD
CD3ζ
T2A
mCherry
LTR
2244bp
V_H
V_L
pMGH70
LTR
Ψ
CD8L
α-CD37 H-L
CD8 TM
4-1BB ICD
CD3ζ
T2A
mCherry
LTR
2244bp

图9

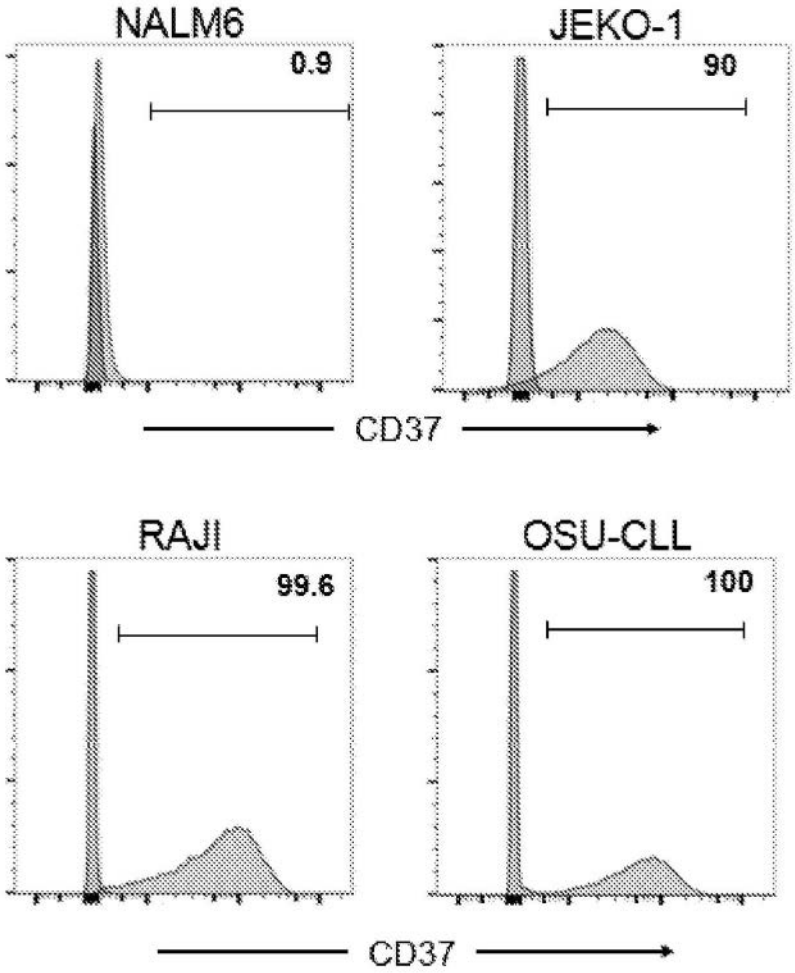


图10

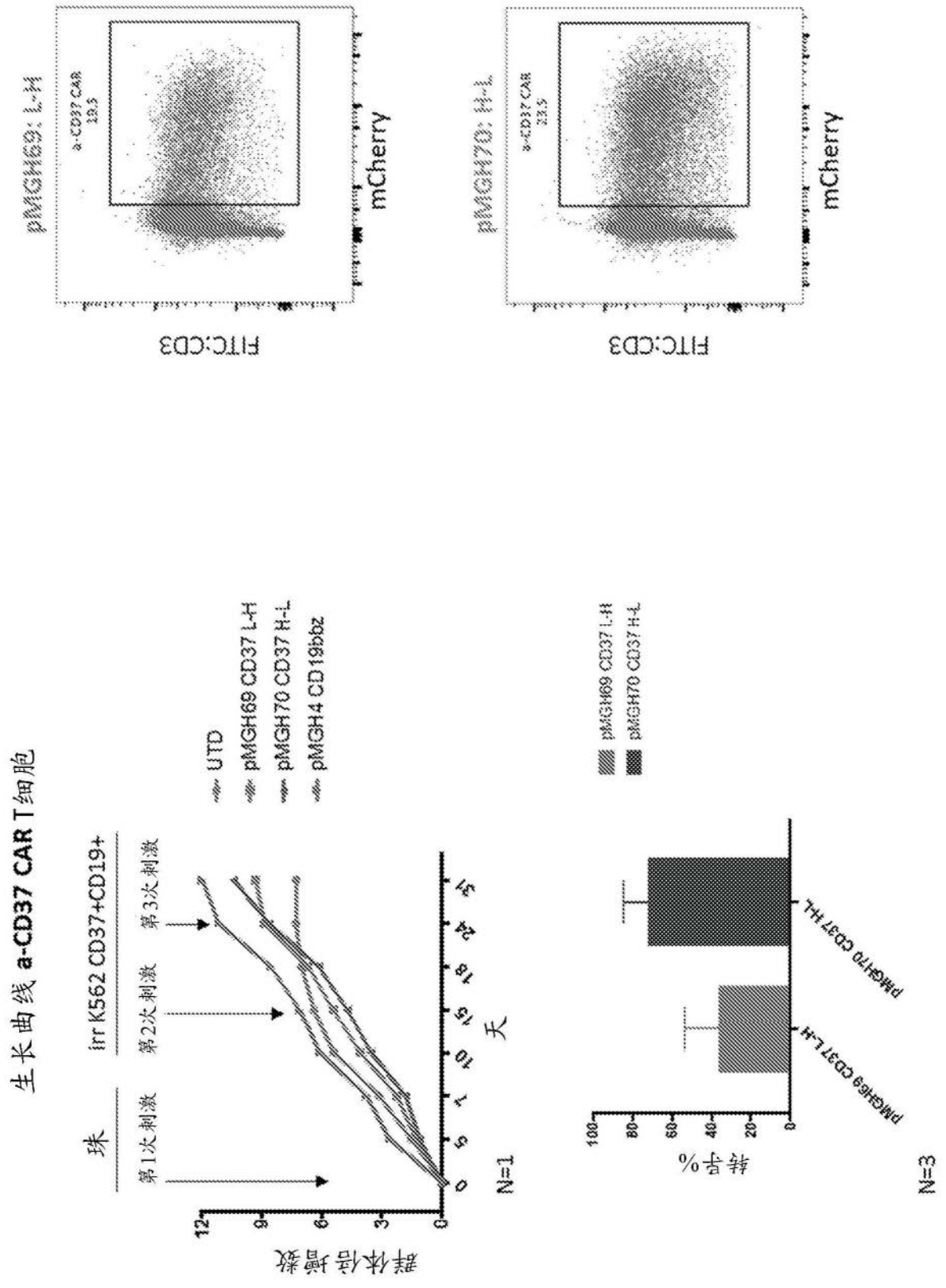

pMGH69; L-H
a-CD37 CAR
28.5
mCherry
FITC:CD3
pMGH70; H-L
a-CD37 CAR
23.5
mCherry
FITC:CD3
生长曲线 a-CD37 CAR T细胞
珠
第1次刺激
irr K562 CD37+CD19+
第2次刺激
第3次刺激
UTD
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
群体倍增数
天
N=1
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
转导%
N=3

图11

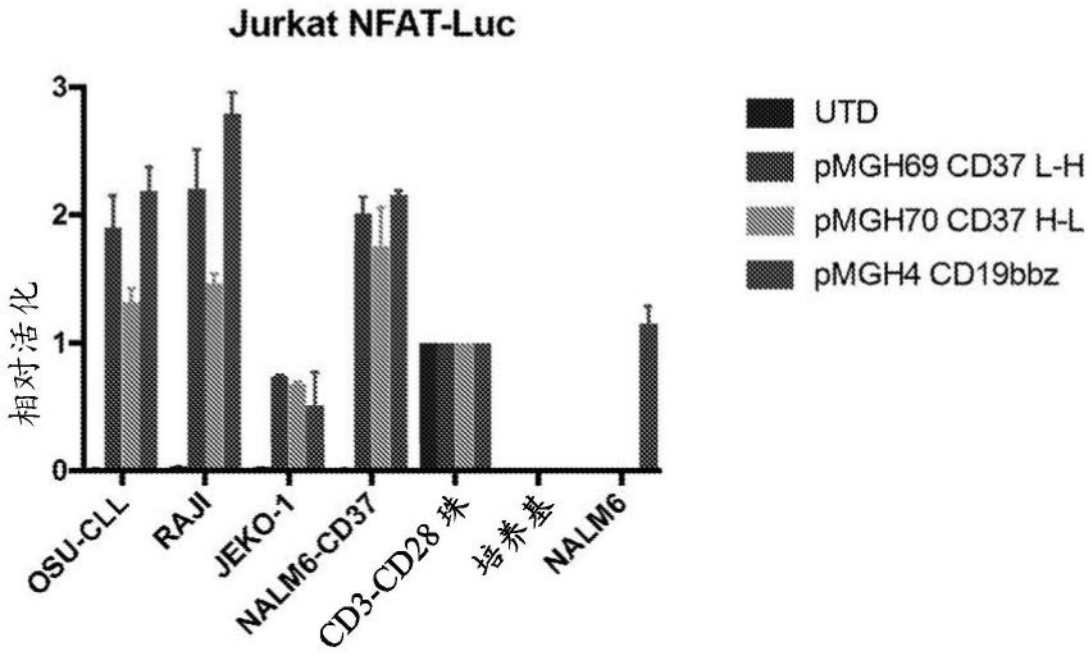

Jurkat NFAT-Luc
相对活化
3
2
1
0
UTD
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
OSU-CLL
RAJI
JEKO-1
NALM6-CD37
CD3-CD28 珠
培养基
NALM6

图12

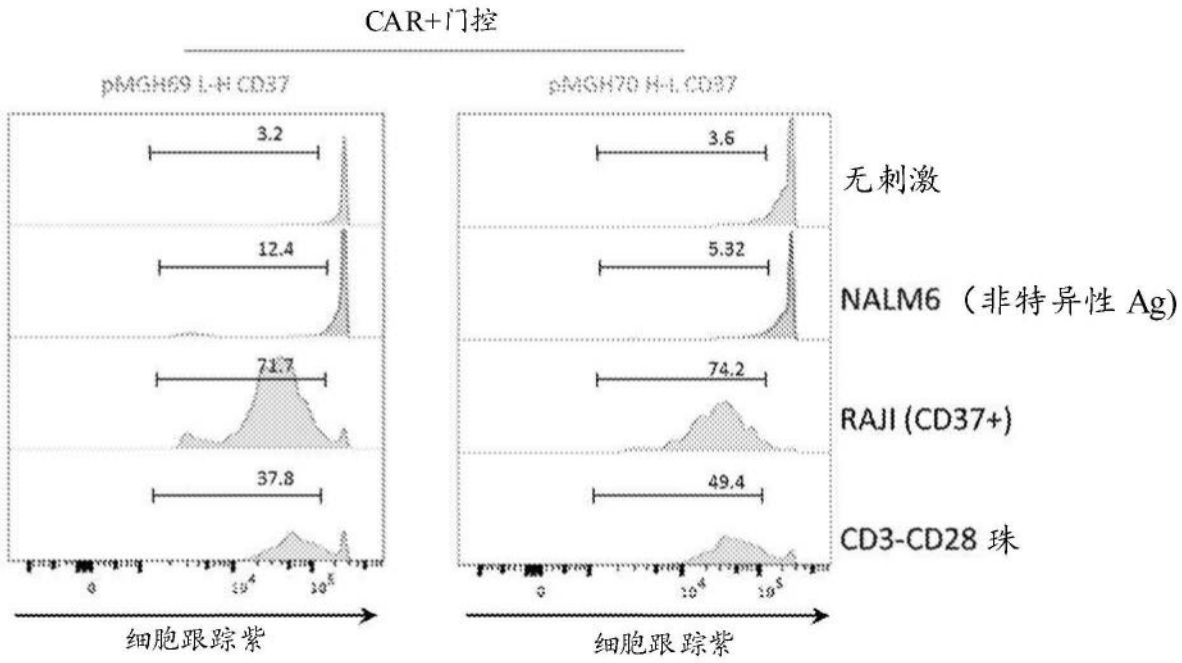

CAR+门控
pMGH69 L-H CD37
pMGH70 H-L CD37
3.2
12.4
71.7
37.8
3.6
5.32
74.2
49.4
无刺激
NALM6 （非特异性 Ag)
RAJI (CD37+)
CD3-CD28 珠
细胞跟踪紫
细胞跟踪紫

图13

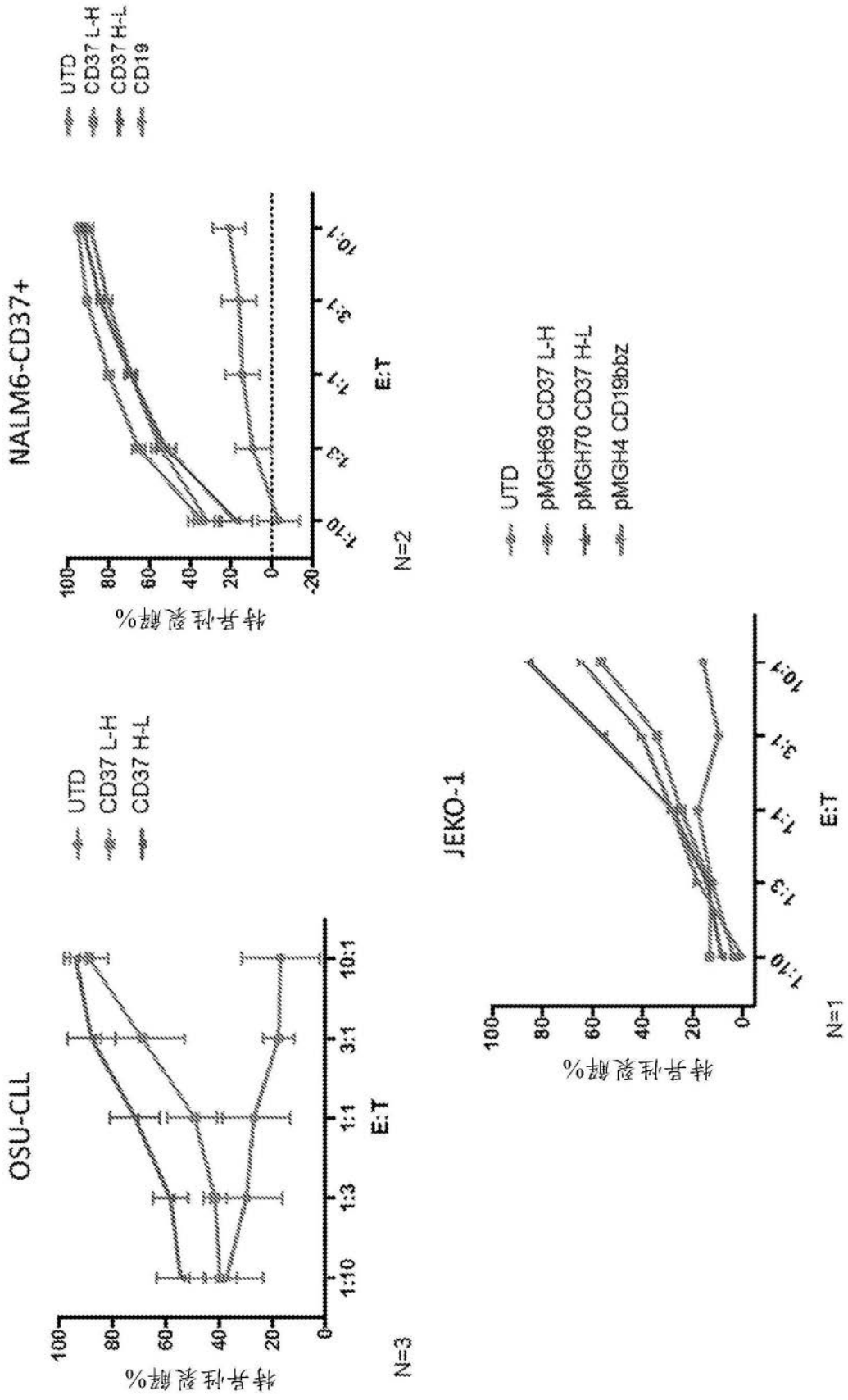

NALM6-CD37+
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
CD19
特异性裂解%
E:T
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
N=2
OSU-CLL
UTD
CD37 L-H
CD37 H-L
特异性裂解%
E:T
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
N=3
JEKO-1
UTD
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
特异性裂解%
E:T
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
N=1

图14

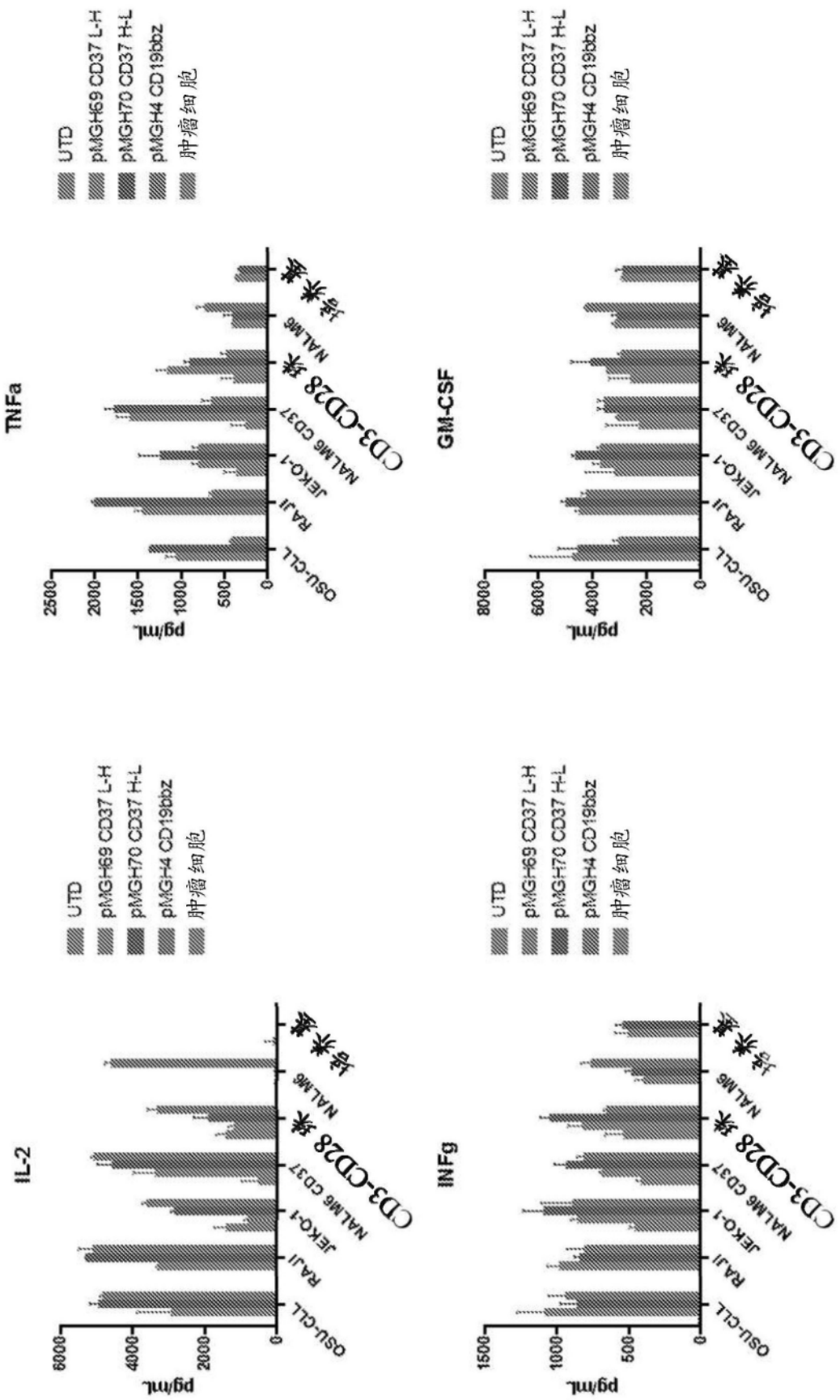

TNFa
GM-CSF
IL-2
iNFg
UTD
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
肿瘤细胞
pg/mL
OSU-CLL
RA.JI
JEKO-1
NALM6 CD37
CD3-CD28 珠
NALM6
培养基

图15

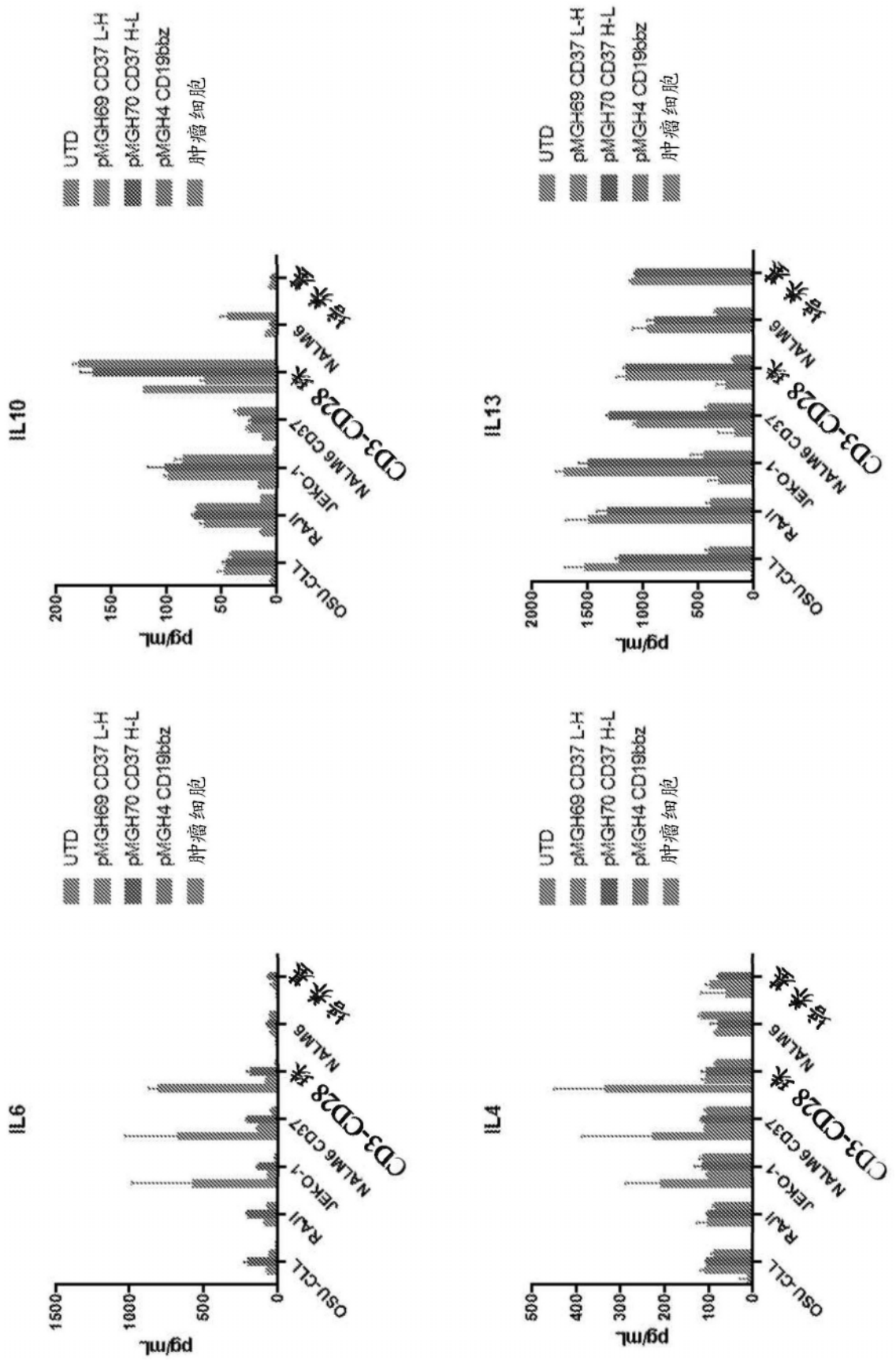

IL10
IL13
IL6
IL4
UTD
pMGH69 CD37 L-H
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
肿瘤细胞
pg/mL
OSU-CLL
RAJI
JEKO-1
NALM6 CD37
CD3-CD28 珠
NALM6
培养基

图15(续)

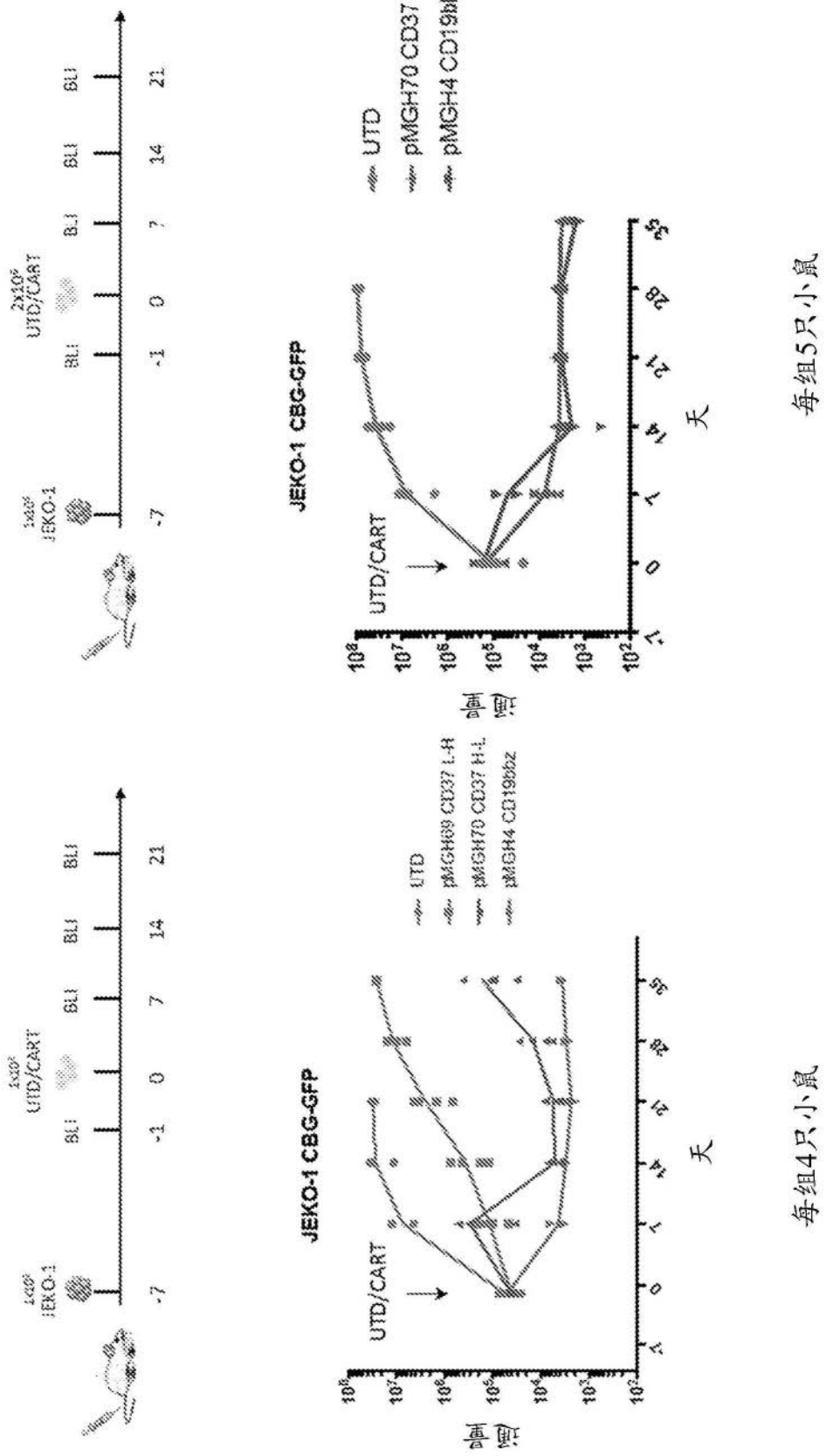

1x10⁶ JEKO-1
2x10⁶ UTD/CART
BLI
-7
-1
0
7
14
21
JEKO-1 CBG-GFP
UTD/CART
UTD
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
通量
天
每组5只小鼠
每组4只小鼠

图16

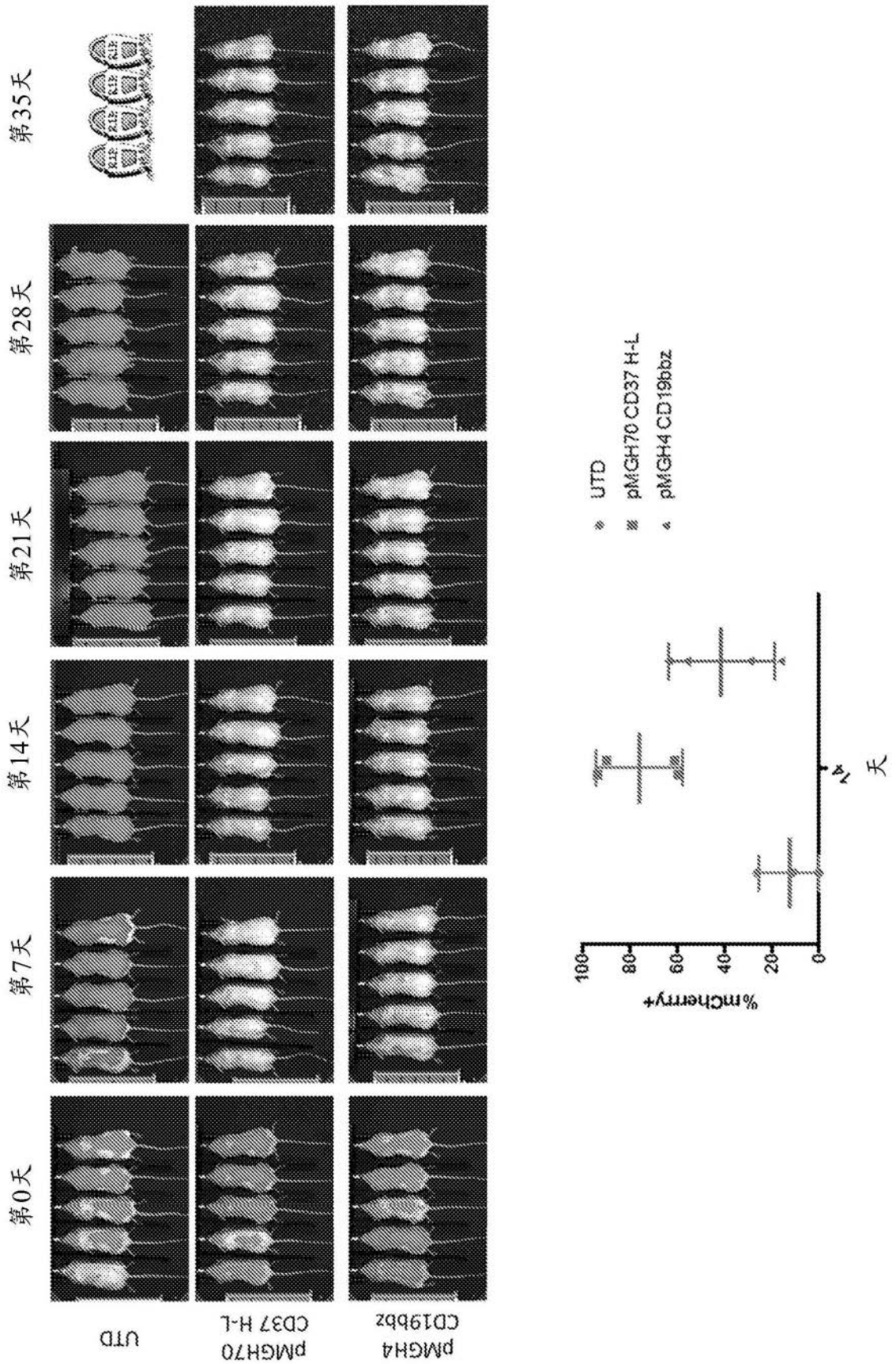

第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
UTD
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
UTD
pMGH70 CD37 H-L
pMGH4 CD19bbz
%mCherry+
100
80
60
40
20
0
天

图17

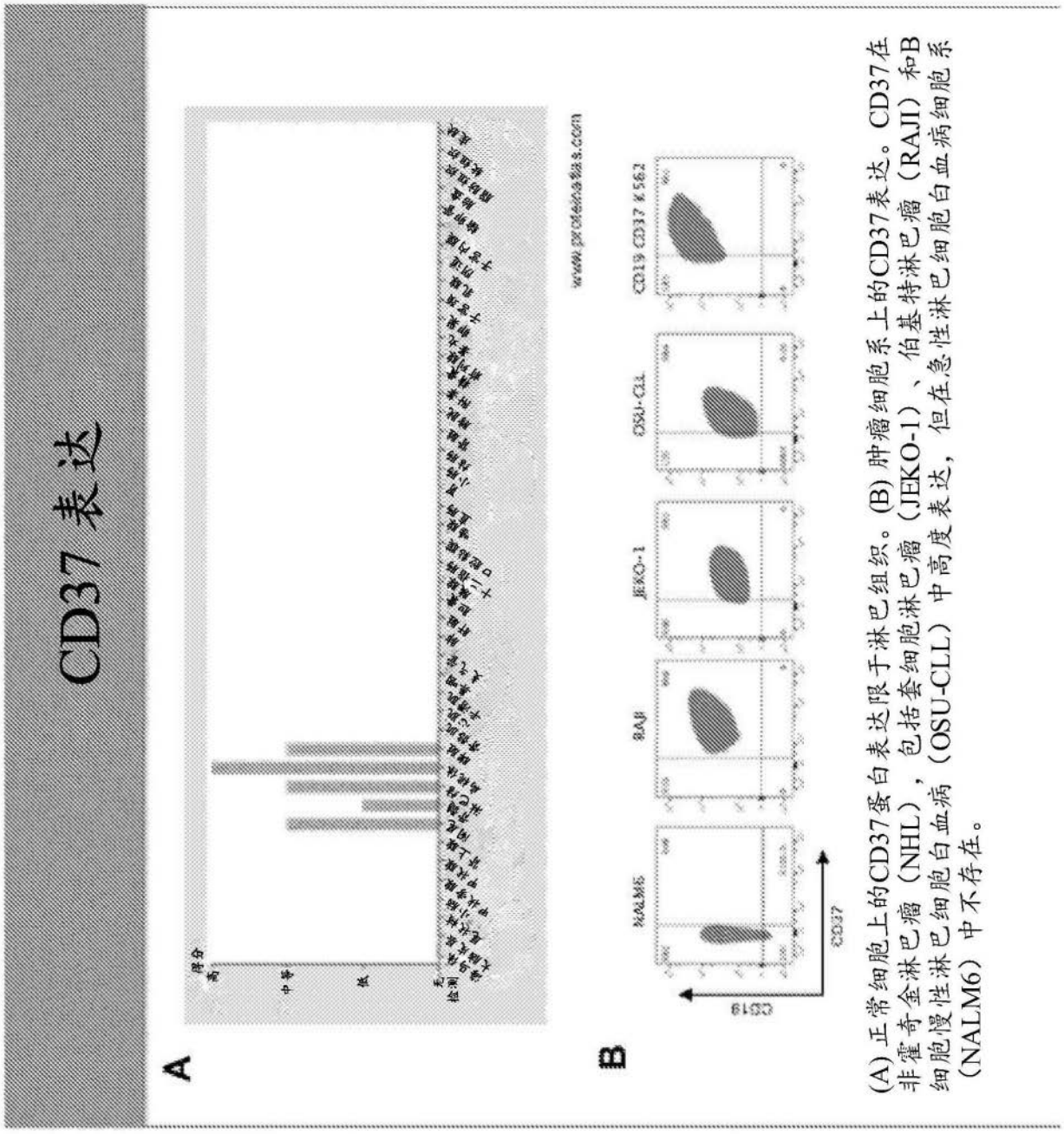

CD37表达
A
B
CD19
CD37
NALM6
RAJI
JEKO-1
OSU-CLL
CD19 CD37 K562
(A)正常细胞上的CD37蛋白表达限于淋巴组织。(B)肿瘤细胞系上的CD37表达。CD37在非霍奇金淋巴瘤（NHL），包括套细胞淋巴瘤（JEKO-1）、伯基特淋巴瘤（RAJI）和B细胞慢性淋巴细胞白血病（OSU-CLL）中高度表达，但在急性淋巴细胞白血病细胞系（NALM6）中不存在。

图18A-B

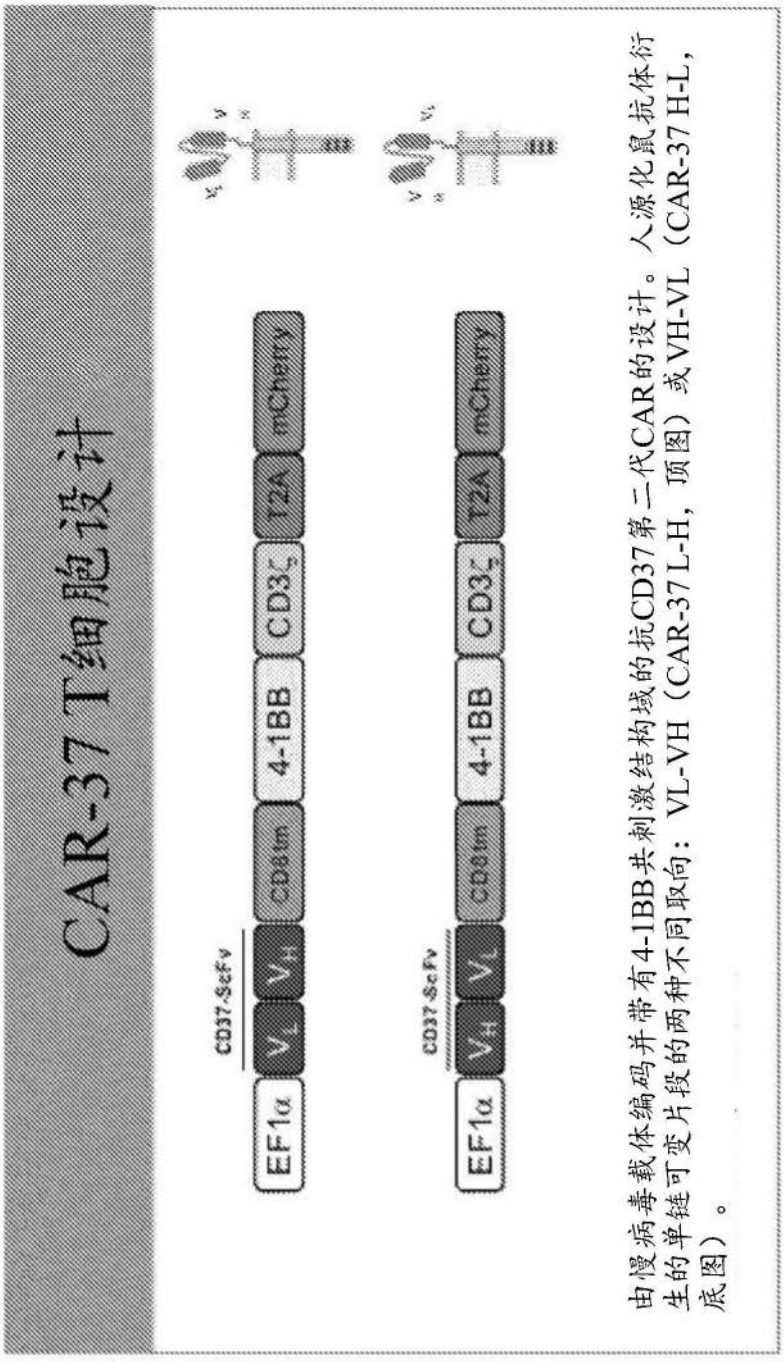
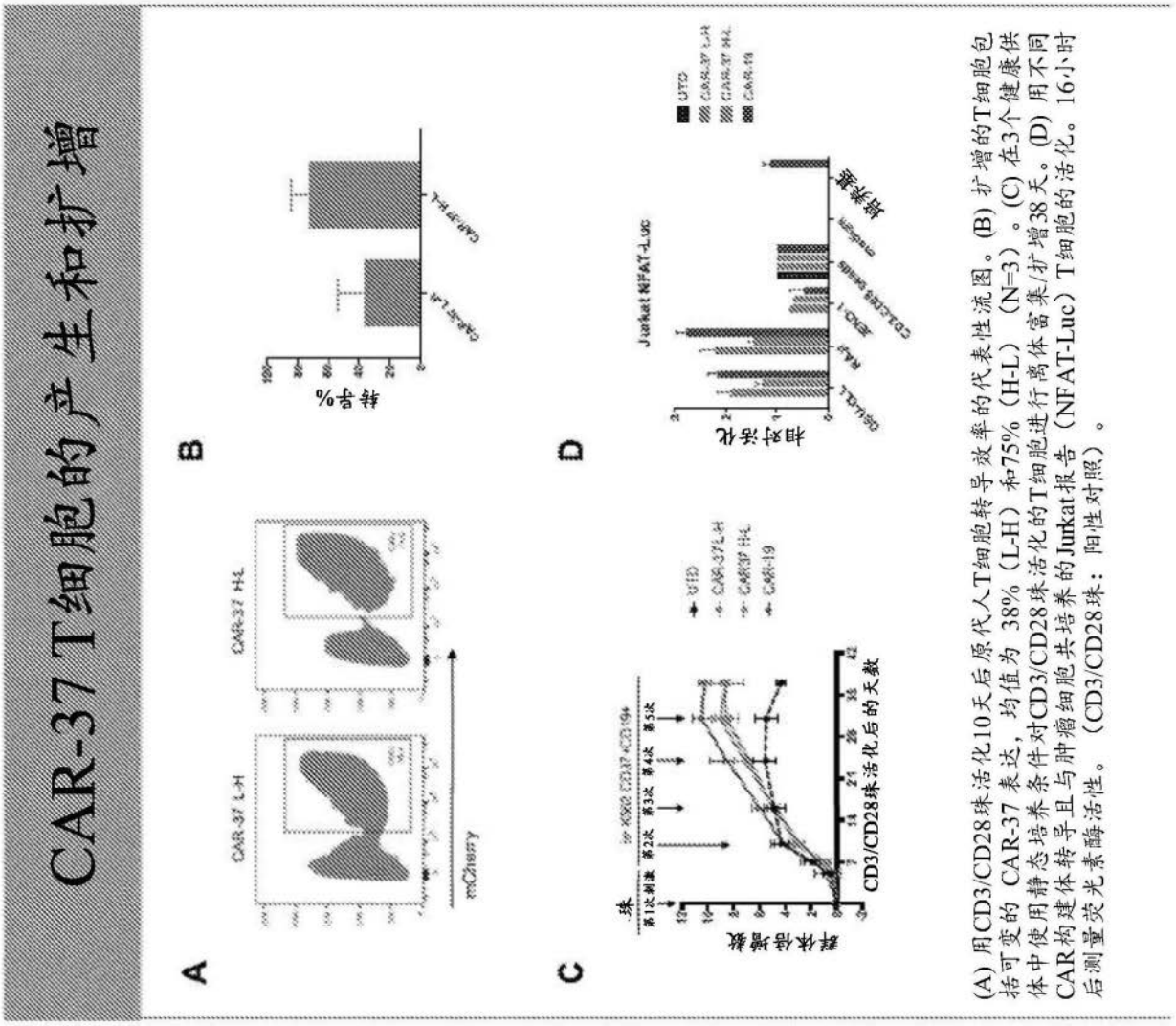

CAR-37 T细胞设计
CD37-ScFv
EF1α
VL
VH
CD8tm
4-1BB
CD3ζ
T2A
mCherry
CD37-ScFv
EF1α
VH
VL
CD8tm
4-1BB
CD3ζ
T2A
mCherry
由慢病毒载体编码并带有4-1BB共刺激结构域的抗CD37第二代CAR的设计。人源化鼠抗体衍生的单链可变片段的两种不同取向：VL-VH（CAR-37 L-H，顶图）或VH-VL（CAR-37 H-L，底图）。

图19



(A) 用CD3/CD28珠活化10天后原代人T细胞转导效率的代表性流图。(B) 扩增的T细胞包括可变的 CAR-37 表达，均值为 38%（L-H）和75%（H-L）（N=3）。(C) 在3个健康供体中使用静态培养条件对CD3/CD28珠活化的T细胞进行离体富集/扩增38天。(D) 用不同CAR构建体转导且与肿瘤细胞共培养的Jurkat报告（NFAT-Luc）T细胞的活化。16小时后测量荧光素酶活性。（CD3/CD28珠：阳性对照）。

图20A-20D

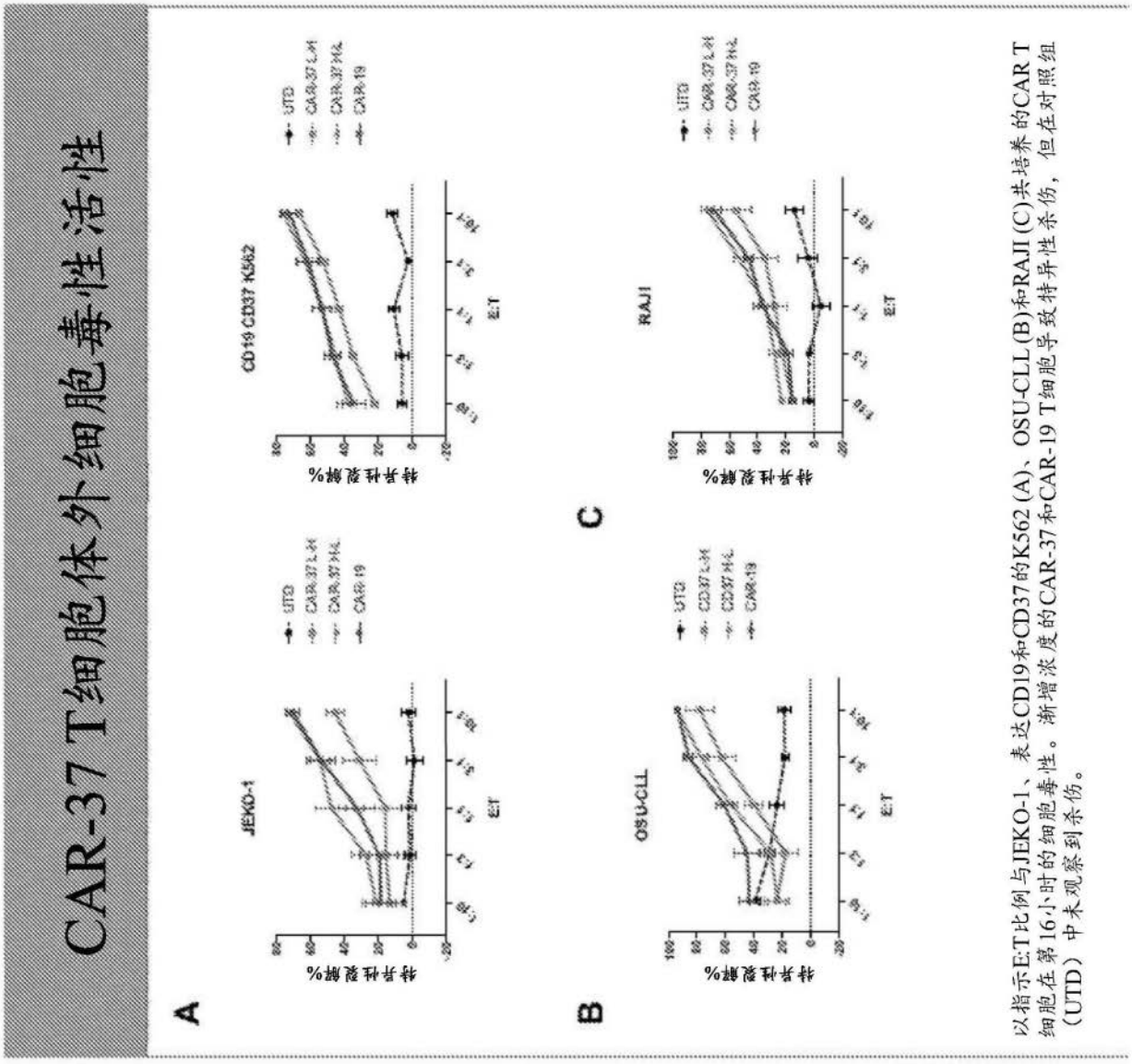

CAR-37 T细胞体外细胞毒性活性
A
JEKO-1
CD19 CD37 K562
B
OSU-CLL
C
RAJI
特异性裂解%
E:T
UTD
CAR-37 L-H
CAR-37 H-L
CAR-19
以指示E:T比例与JEKO-1、表达CD19和CD37的K562 (A)、OSU-CLL (B)和RAJI (C)共培养的CAR T细胞在第16小时的细胞毒性。渐增浓度的CAR-37和CAR-19 T细胞导致特异性杀伤，但在对照组（UTD）中未观察到杀伤。

图21A-21C

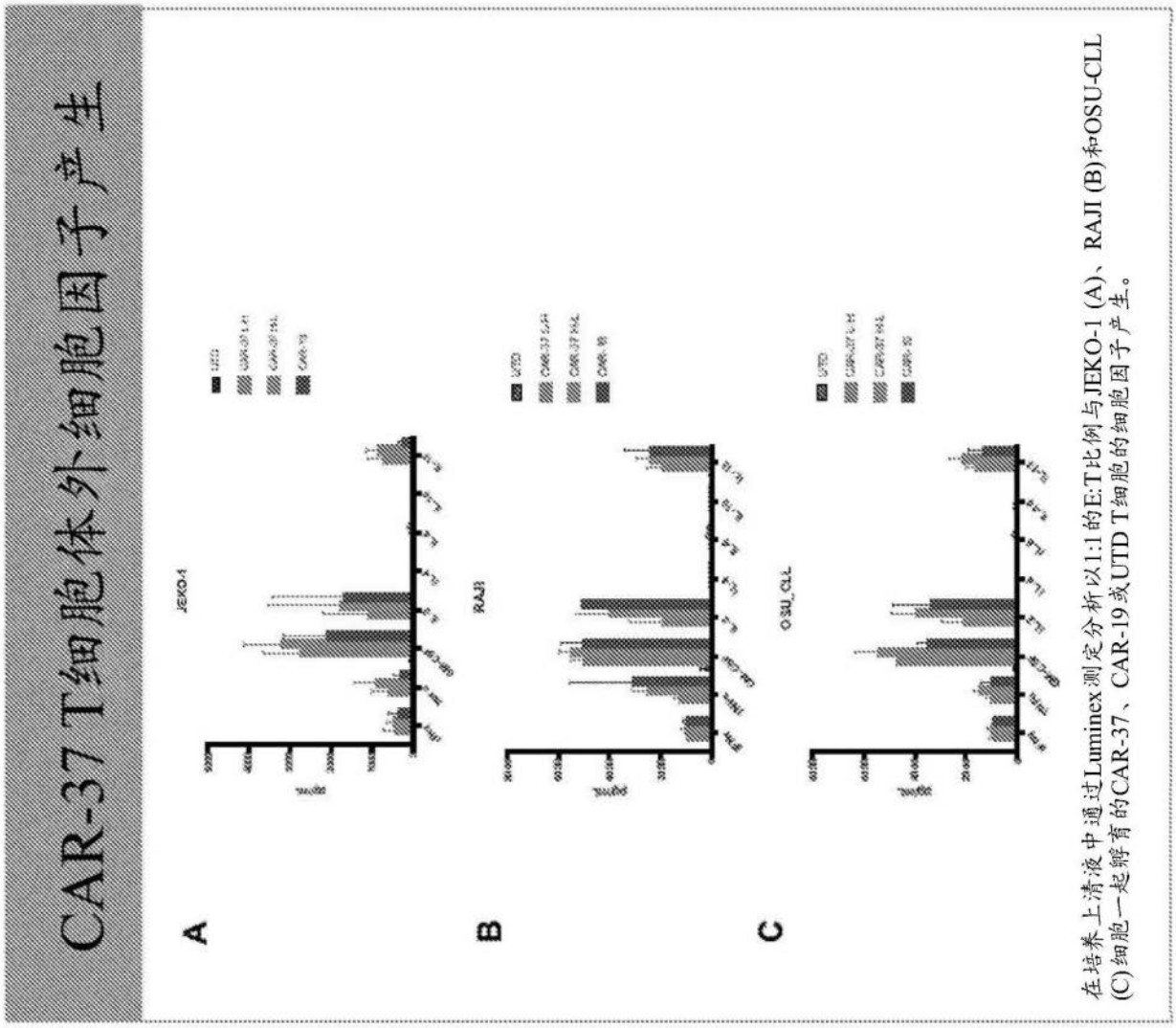

CAR-37 T细胞体外细胞因子产生
A
B
C
JEKO-1
RAJI
OSU_CLL
在培养上清液中通过Luminex测定分析以1:1的E:T比例与JEKO-1 (A)、RAJI (B)和OSU-CLL
(C)细胞一起孵育的CAR-37、CAR-19或UTD T细胞的细胞因子产生。

图22A-22C

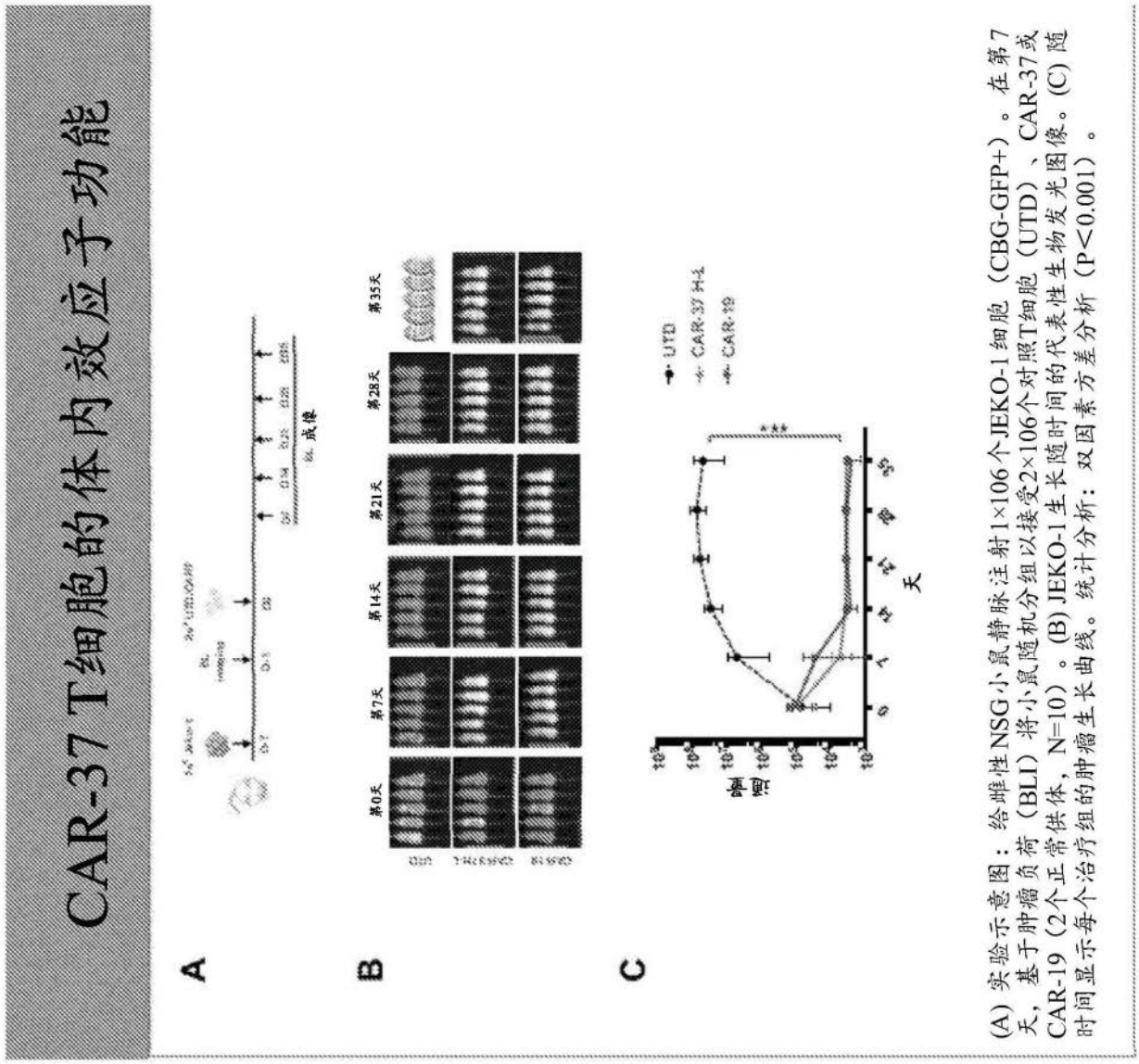

CAR-37 T细胞的体内效应子功能
A
B
C
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
UTD
CAR-37 H-L
CAR-19
***
天
(A) 实验示意图：给雌性NSG小鼠静脉注射1×106个JEKO-1细胞（CBG-GFP+）。在第7天，基于肿瘤负荷（BLI）将小鼠随机分组以接受2×106个对照T细胞（UTD）、CAR-37或CAR-19（2个正常供体，N=10）。(B) JEKO-1生长随时间的代表性生物发光图像。(C) 随时间显示每个治疗组的肿瘤生长曲线。统计分析：双因素方差分析（P<0.001）。

图23A-23C

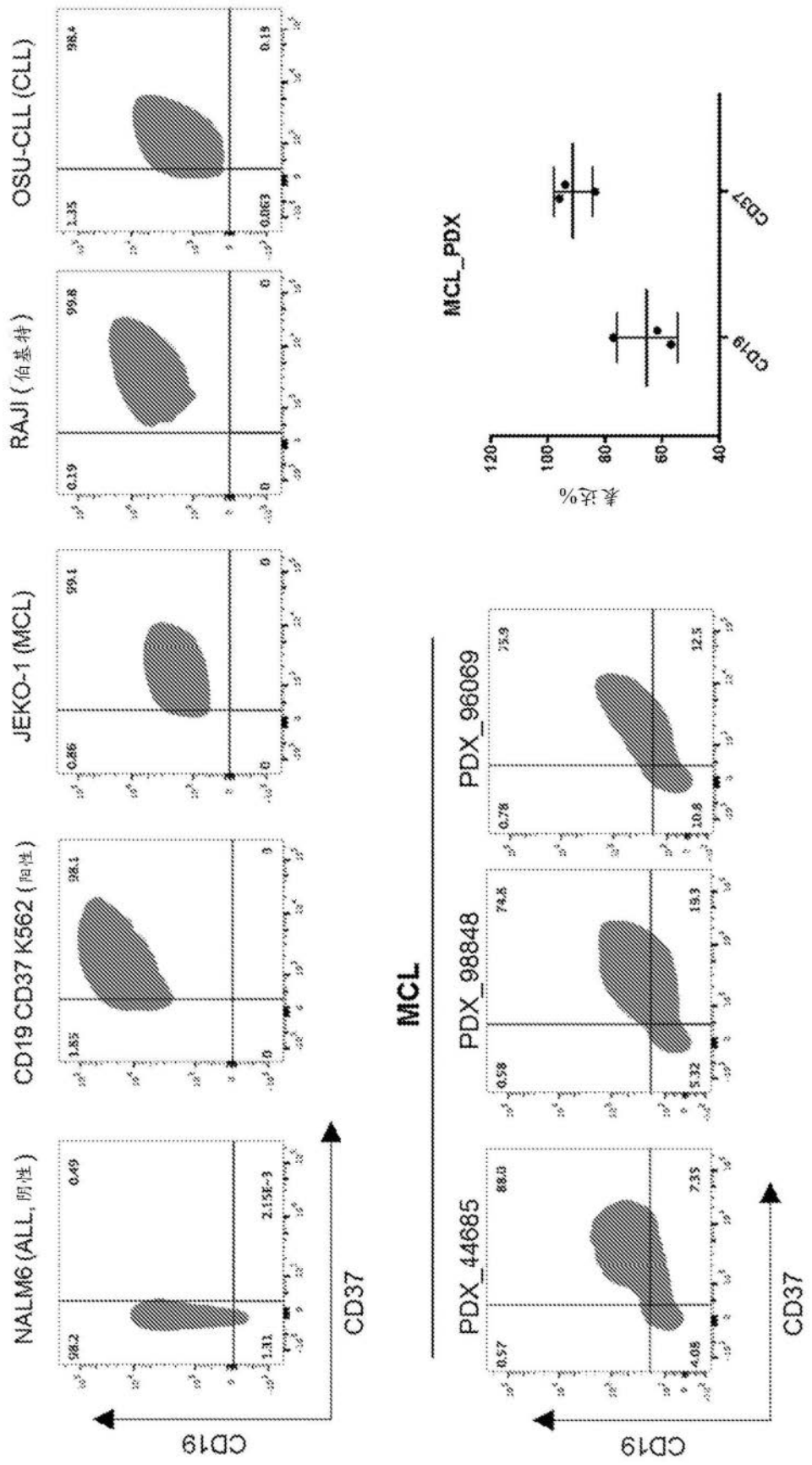

NALM6 (ALL, 阴性)
CD19 CD37 K562 (阳性)
JEKO-1 (MCL)
RAJI (伯基特)
OSU-CLL (CLL)
CD19
CD37
MCL
PDX_44685
PDX_98848
PDX_96069
MCL_PDX
表达%
CD19
CD37

图24

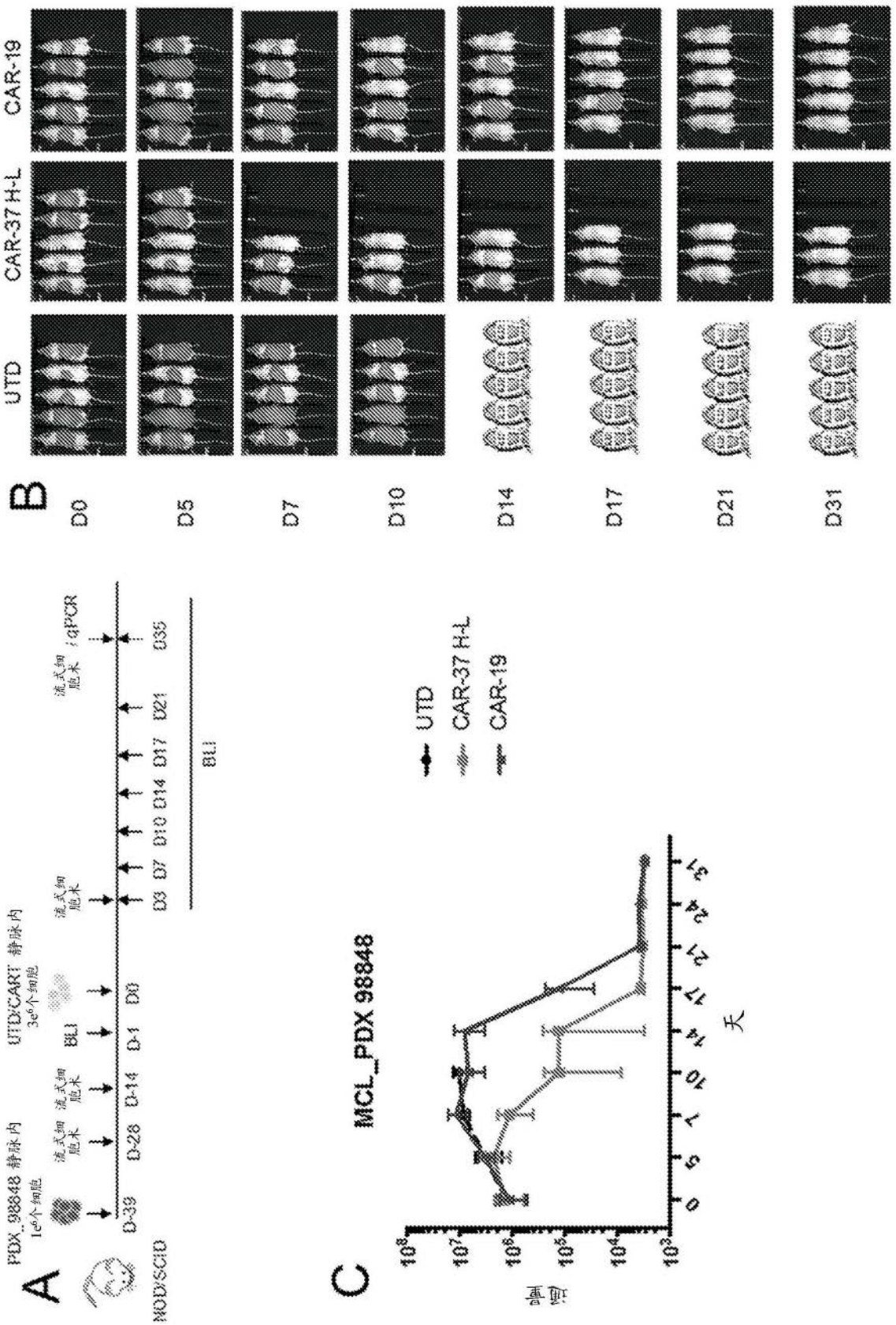

A
PDX 98848 静脉内
1e6个细胞
流式细胞术
BLI
UTD/CART 静脉内
3e6个细胞
流式细胞术
流式细胞术 /qPCR
D-39
D-28
D-14
D-1
D0
D3 D7 D10 D14 D17 D21 D35
BLI
NOD/SCID
B
UTD
CAR-37 H-L
CAR-19
D0
D5
D7
D10
D14
D17
D21
D31
C
MCL_PDX 98848
UTD
CAR-37 H-L
CAR-19
通量
天

图25A-25C

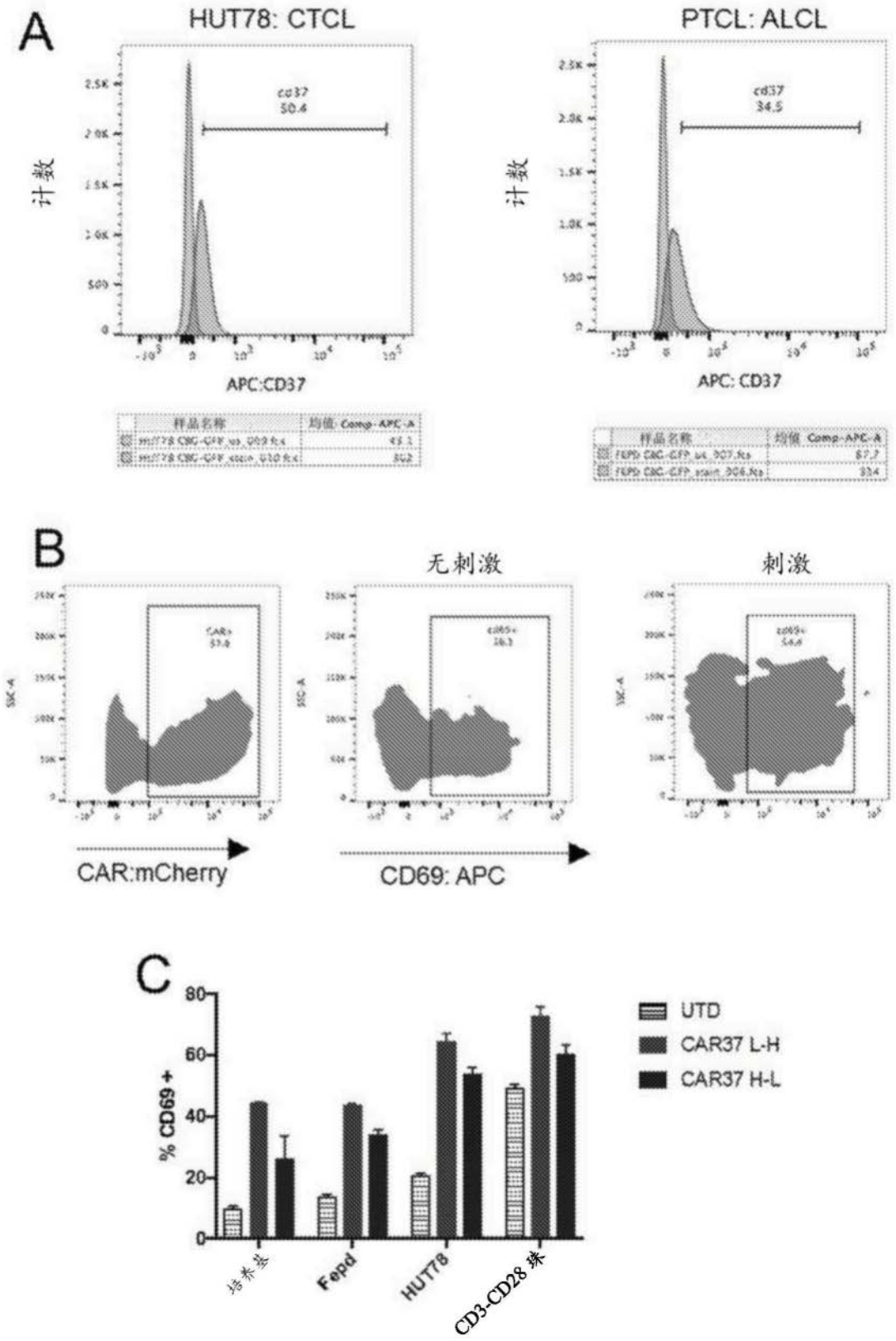

A
HUT78: CTCL
PTCL: ALCL
计数
APC:CD37
B
无刺激
刺激
CAR:mCherry
CD69: APC
C
% CD69 +
UTD
CAR37 L-H
CAR37 H-L
Fepd
HUT78
CD3-CD28 珠

图26A-26C

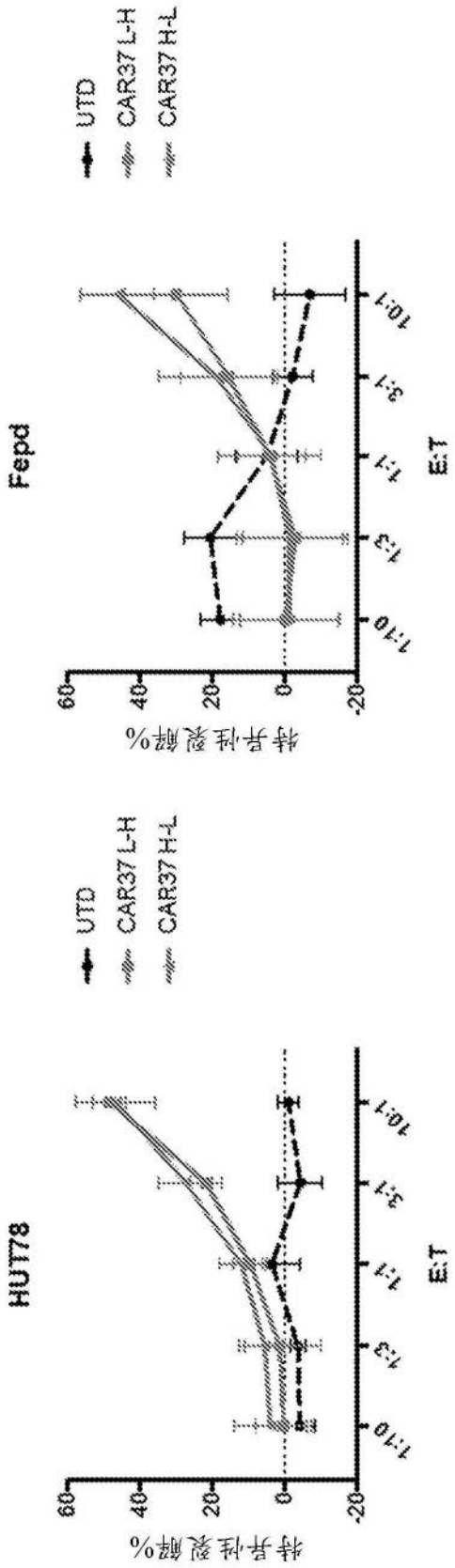

Fepd
UTD
CAR37 L-H
CAR37 H-L
特异性裂解%
60
40
20
0
-20
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T
HUT78
UTD
CAR37 L-H
CAR37 H-L
特异性裂解%
60
40
20
0
-20
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T

图27

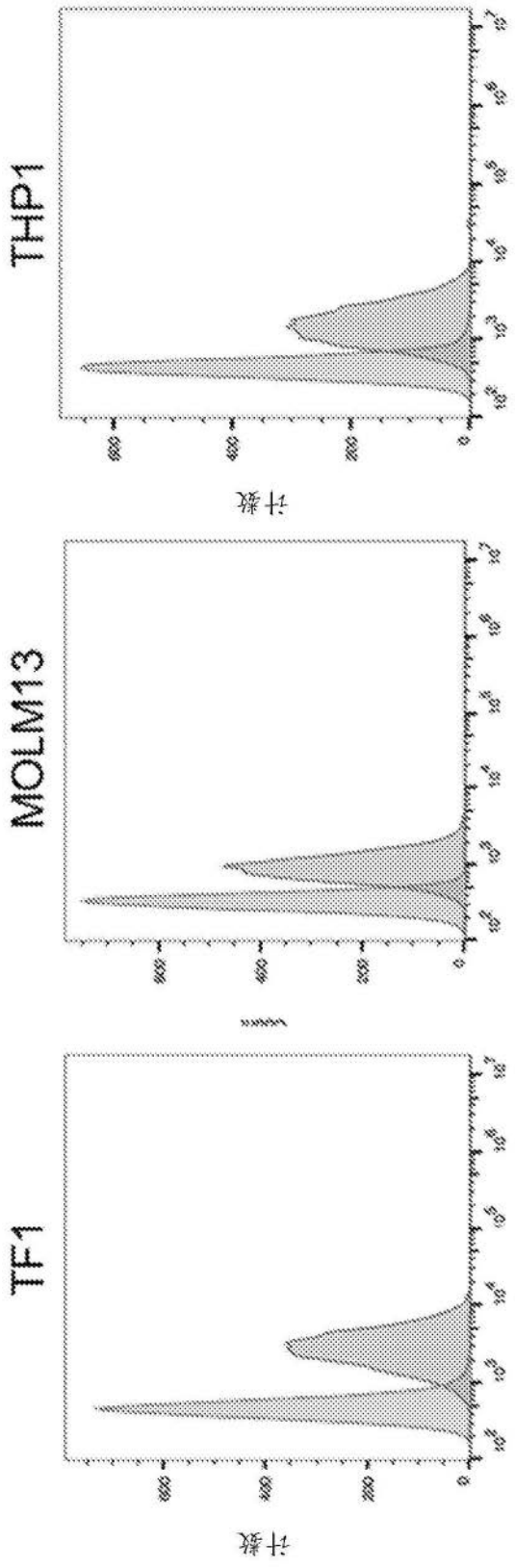


图28