



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110248669 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 08

(21) 申请号 201780085686.0	(72) 发明人 迈克尔·埃蒙·彼得·奥德怀尔
(22) 申请日 2017.12.11	(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110248669 A	专利代理师 蒋洪之 安玉
(43) 申请公布日 2019.09.17	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 62/432,302 2016.12.09 US	C12N 5/10 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.08.05	C12N 5/0783 (2010.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2017/082292 2017.12.11	A61K 35/15 (2015.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/104562 EN 2018.06.14	(56) 对比文件
(73) 专利权人 昂克医疗有限公司 地址 爱尔兰高威	CN 106132423 A, 2016.11.16
	CN 106029875 A, 2016.10.12
	杜庆华等. 多发性骨髓瘤 CD38及 CD56表达 的研究.《中国热带医学》.2006, 第1795-1796页.
	审查员 李煜
	权利要求书1页 说明书63页
	序列表13页 附图22页

(54) 发明名称  
工程化天然杀伤细胞及其用途

(57) 摘要  
本发明提供了经过修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的工程化天然杀伤细胞。该细胞任选地含有改善肿瘤特异性细胞毒性和归巢至肿瘤部位的其他修饰。本发明还考虑了使用工程化天然杀伤细胞治疗癌症患者的方法。

1. 一种表达针对CD38的嵌合抗原受体(CAR)的天然杀伤(NK)细胞,其中,与达雷木单抗(Daratumumab)对CD38的亲和力相比,所述CAR对CD38的亲和力低至少25%,其中所述CAR包含重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区的CDR1-3分别由SEQ ID NO:35,36和37表示,所述重链可变区的CDR1-3分别由SEQ ID NO:29、30和31表示。

2. 根据权利要求1所述的NK细胞,其中所述NK细胞表达E-选择素配体。

3. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中所述NK细胞结合HECA-452抗体。

4. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中所述NK细胞是KHYG-1细胞。

5. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中,所述CAR的重链可变区由SEQ ID NO:1表示。

6. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中,所述CAR的轻链可变区由SEQ ID NO:23表示。

7. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中,所述CAR包括一个或多个选自SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的共刺激结构域。

8. 根据权利要求1或2所述的NK细胞,其中所述NK细胞已被修饰以表达相对于野生型TRAIL对TRAIL死亡受体具有增加的亲和力的TRAIL变体。

9. 权利要求1所述的NK细胞在制备用于治疗表达CD38的癌症的药物中的用途。

10. 根据权利要求9所述的NK细胞的用途,其中所述表达CD38的癌症是血癌。

11. 根据权利要求9或10所述的NK细胞的用途,其中所述表达CD38的癌症为多发性骨髓瘤(MM)。

12. 一种组合物,其包含权利要求1所述的NK细胞。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中,所述NK细胞已被修饰以表达相对于野生型TRAIL对TRAIL死亡受体具有增加的亲和力的TRAIL变体。

14. 根据权利要求12或13所述的组合物,其中,所述CAR包括由SEQ ID NO:1表示的重链可变区和由SEQ ID NO:23表示的轻链可变区。

15. 根据权利要求12或13所述的组合物,其中,所述组合物是药物组合物。

## 工程化天然杀伤细胞及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用经修饰的天然杀伤(NK)细胞或NK细胞系治疗癌症的疗法。治疗方法和细胞的组合物也构成本发明的一部分,特别是在治疗血癌方面。

### 背景技术

[0002] 天然杀伤细胞(NK细胞)是在先天免疫功能中起作用的外周血淋巴细胞。NK细胞表达多种活化性受体和抑制性受体,这些受体负责辨别健康细胞、病毒感染细胞或转化(癌)细胞。与T细胞不同,NK细胞以抗原非依赖性方式对靶细胞发挥其细胞毒性作用。结果,NK细胞不需要抗原启动(priming)并且在不存在特异性抗原的情况下可以显示出强烈的细胞毒性。

[0003] 最近开发了嵌合抗原受体(CAR)以使细胞毒性T细胞靶向特定的细胞类型和组织。大多数CAR具有衍生自抗体的抗原识别结构域,以及衍生自参与T细胞信号转导的免疫信号蛋白的跨膜部分和细胞内部分,从而使T细胞的细胞毒性功能在与靶细胞群上表达的靶抗原结合时被激活。

[0004] 更详细地说,CAR是重组抗原受体,其将某种抗原特异性引入免疫效应细胞(在本发明中,为NK细胞)。CAR包含由已经引入免疫效应细胞的外源多核苷酸表达的确定的多肽序列。嵌合抗原受体包含前导序列、靶向结构域、跨膜结构域和一个或多个细胞内信号传导结构域。适宜地,靶向结构域衍生自抗体分子,并且包含来自抗体分子的一个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区赋予CAR抗原特异性。适宜地,用于本发明的工程化NK细胞的CAR的靶向结构域是单链可变片段(scFv)。scFv包含由柔性接头多肽隔开的免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链分子的可变链部分。柔性多肽接头使得重链和轻链彼此缔合并重构免疫球蛋白抗原结合结构域。

[0005] 需要使用NK-CAR细胞的替代性的且优选改进的癌症疗法。

[0006] 本发明的一个目的是提供NK-CAR细胞和NK-CAR细胞系,与仅依赖于NK细胞的疗法相比,NK-CAR细胞和NK-CAR细胞系可更有效地治疗癌症。更具体的实施方案旨在提供针对确诊的癌症(例如血癌)的治疗,同时规避基于细胞的疗法(例如,自我靶向)的常见问题。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了用于治疗表达CD38的癌症的、表达针对CD38的嵌合抗原受体(CAR)的天然杀伤(NK)细胞。

[0008] 本发明进一步提供了包含表达针对CD38的嵌合抗原受体(CAR)的KHYG-1细胞的组合物。

[0009] 本发明进一步提供了通过向患者施用表达针对CD38的嵌合抗原受体(CAR)的天然杀伤细胞来治疗表达CD38的癌症的方法。

[0010] 发明详述

[0011] 本发明提供了包含NK细胞的药物组合物,所述NK细胞的原代细胞和细胞系均已用

至少一种嵌合抗原受体进行了工程化改造。这些组合物可用于治疗癌症,包括实体瘤和血液(血)癌。还描述了使用以及制备这些组合物的方法。本文所述的药物组合物包含表达嵌合抗原受体的原代NK细胞和NK细胞系,例如KHYG-1。适宜地,CAR靶向癌症相关抗原。例如,癌症相关抗原可包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。在某些具体的实施方案中,嵌合抗原受体可以是CD38特异性的。任选地,NK细胞包含至少一种导致NK细胞的细胞毒活性增加的其他修饰。适宜地,所述修饰包括检查点抑制剂的表达缺失或减少,或TRAIL的表达增加或对TRAIL受体(例如DR4或DR5)具有更高的亲和力的TRAIL变体。有利地,本发明的工程化NK细胞显示出E-选择素(E-selectin)配体的表达增加,和/或TRAIL受体(例如DR4、DR5或两者)的表达降低。这些工程化NK细胞可通过静脉途径过继转移用于治疗被诊断患有癌症的个体。这些NK细胞可以用本领域已知的多种方法进行工程化改造,包括通过表达CAR的多核苷酸/载体和/或激活NK细胞的细胞毒活性的分子(例如变体TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)蛋白)的病毒转导或电穿孔,或通过siRNA、shRNA或CRISPR/Cas9靶向机制去除或减少抑制性受体表达的载体进行工程化改造。NK细胞可以是原代细胞或建立的NK细胞系,所述建立的NK细胞系保留原代NK细胞的一些功能和特征。在一个具体实施方案中,工程化NK细胞系是KHYG-1细胞,或具有与NK-92等常见细胞不同的特性(例如,E-选择素配体的高表达,以及TRAIL受体DR4和DR5的低表达)的KHYG-1样细胞。过继转移可使用自体(同系(syngenic))或异源(同种异体)NK细胞。

[0012] 本发明提供了包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中该工程化天然杀伤细胞表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达,其中该工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表达,其中TRAIL受体包括TNFRSF10A(DR4)或TNFRSF10B(DR5)。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞包括原代工程化天然杀伤细胞。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞包括转化的工程化天然杀伤细胞系。在某个实施方案中,转化的工程化天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。在某个实施方案中,转化的工程化天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。在某个实施方案中,CAR特异性结合癌症相关抗原。在某个实施方案中,癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地,癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地,血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。适宜地,血癌相关抗原包括CD38。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, 其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。在某个实施方案中, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含人CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地, CAR包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB多肽。适宜地, CAR包含人4-1BB多肽。适宜地, CAR包含人CD3 $\delta$ 多肽。适宜地, CAR包含衍生自抗体的靶向结构域, 与达雷木单抗相比, 所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面, 工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体, 该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。另一方面, 工程化天然杀伤细胞还包含突变的TNF相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 多肽, 其中该突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。适宜地, TRAIL配体包括TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。适宜地, 突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。适宜地, 突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。适宜地, CAR或突变的TRAIL多肽整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。适宜地, 工程化天然杀伤细胞还包含检查点抑制性受体活性的缺失或降低。适宜地, 检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。适宜地, 检查点抑制性受体包括CD96、CD152或CD328。适宜地, 检查点抑制性受体包括CD96。适宜地, 检查点抑制性受体包含CD152。适宜地, 检查点抑制性受体包含CD328。适宜地, 检查点抑制性受体全部或部分地从工程化天然杀伤细胞基因组中缺失, 或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。适宜地, 工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。适宜地, 药物组合物还包含药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂。适宜地, 配制药物组合物用于腹腔施用。适宜地, 配制药物组合物用于腹腔施用。适宜地, 该药物组合物用于治疗癌症。适宜地, 癌症包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。适宜地, 癌症包括多发性骨髓瘤。

[0013] 本发明提供治疗患有癌症的个体的方法, 该方法包括向个体施用包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物, 其中该工程化天然杀伤细胞表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达, 其中该工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体。在某个实施方案中, 工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。在某个实施方案中, 工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表

达,其中TRAIL受体包括TNFRSF10A(DR4)或TNFRSF10B(DR5)。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞包含原代工程化天然杀伤细胞。在某个实施方案中,工程化天然杀伤细胞包括转化的工程化天然杀伤细胞系。在某个实施方案中,转化的工程化天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。在某个实施方案中,转化的工程化天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。在某个实施方案中,CAR特异性结合癌症相关抗原。在某个实施方案中,癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地,癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地,血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL。适宜地,血癌相关抗原包括CD38。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。在某个实施方案中,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地,CAR包含DAP10、DAP12、2B4(CD244)或人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人CD3 $\delta$ 多肽。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体,该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含突变的TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL)多肽,其中该突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。适宜地,TRAIL配体包括TNFRSF10A(DR4)或TNFRSF10B(DR5)。适宜地,突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。适宜地,突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。适宜地,CAR或突变的TRAIL多肽整合到工程化

天然杀伤细胞的基因组中。适宜地,工程化天然杀伤细胞还包含检查点抑制性受体活性的缺失或降低。适宜地,检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。适宜地,检查点抑制性受体包括CD96、CD152或CD328。适宜地,检查点抑制性受体包括CD96。适宜地,检查点抑制性受体包含CD152。适宜地,检查点抑制性受体包含CD328。适宜地,检查点抑制性受体全部或部分地从工程化天然杀伤细胞基因组中缺失,或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。适宜地,从工程化天然杀伤细胞基因组中删除检查点抑制性受体。适宜地,药物组合物包含药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂。适宜地,配制药物组合物用于静脉内施用。适宜地,配制药物组合物用于腹膜内施用。适宜地,癌症包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。适宜地,癌症包括多发性骨髓瘤。适宜地,在施用蛋白酶体抑制剂期间或之后施用药物组合物。适宜地,在低剂量节律性环磷酸胺治疗方案之前,期间或之后施用药物组合物。

[0014] 本发明提供了制备包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体,其中该方法包括将天然杀伤细胞与编码CAR的多核苷酸一起温育。适宜地,所述多核苷酸包含病毒载体。适宜地,病毒载体是慢病毒。适宜地,病毒载体是逆转录病毒。适宜地,所述多核苷酸包含mRNA。适宜地,所述多核苷酸整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。适宜地,用化学品处理工程化天然杀伤细胞以增加工程化天然杀伤细胞的岩藻糖基化。适宜地,工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。适宜地,工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表达,其中TRAIL受体包括TNFRSF10A(DR4)或TNFRSF10B(DR5)。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含原代天然杀伤细胞。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含转化的天然杀伤细胞系。适宜地,转化的天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。适宜地,转化的天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。适宜地,CAR特异性结合癌症相关抗原。适宜地,癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地,癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地,血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。适宜地,血癌相关抗原包含CD38。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与

SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包括与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含人CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地,CAR包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244)或人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人CD3 $\delta$ 多肽。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体,该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含突变的TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL)多肽,其中该突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。适宜地,TRAIL配体包括TNFRSF10A (DR4)或TNFRSF10B (DR5)。适宜地,突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。适宜地,突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。适宜地,CAR或突变的TRAIL多核苷酸整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。适宜地,该方法还包括将工程化天然杀伤细胞与去除或降低检查点抑制性受体的活性的多核苷酸一起温育。适宜地,检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。适宜地,检查点抑制性受体包括CD96、CD152或CD328。适宜地,检查点抑制性受体包括CD96。适宜地,检查点抑制性受体包含CD152。适宜地,检查点抑制性受体包含CD328。适宜地,检查点抑制性受体全部或部分地从工程化天然杀伤细胞基因组中缺失,或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。适宜地,该方法还包括将工程化天然杀伤细胞与药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂混合。

[0015] 在某一方面,本文所述的是包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的高水平表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。适宜地,CAR特异性结合癌症相关抗原。适宜地,癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地,癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地,血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。适宜地,血癌相关抗原包含CD38。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,



CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含人CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地,CAR包含衍生自DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB多肽的细胞内结构域。适宜地,CAR包含衍生自人4-1BB多肽的细胞内结构域。适宜地,CAR包含衍生自人CD3 $\delta$ 多肽的细胞内结构域。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体,该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0016] 在某一方面,本文提供一种治疗患有癌症的个体的方法,该方法包括向个体施用包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的高水平表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体 (CAR)。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。适宜地,CAR特异性结合癌症相关抗原。适宜地,癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地,癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地,血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。适宜地,血癌相关抗原包含CD38。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR

包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地,CAR包含CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地,CAR包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人4-1BB多肽。适宜地,CAR包含人CD3 $\delta$ 多肽。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面,工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体,该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0017] 优选地,表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞,与它们对表达CD38的癌细胞的亲和力相比,对表达CD38的正常(非恶性)细胞的亲和力降低。这可能是由于,例如,癌细胞比正常细胞表达更高水平的CD38和/或由于CD38嵌合抗原受体对癌细胞上表达的特定形式的CD38具有增加的亲和力和/或对正常细胞上表达的特定形式的CD38具有降低的亲和力。与表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对正常细胞的亲和力相比,优选表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对癌细胞的亲和力增加至少10%,至少20%,至少50%,更优选至少100%。与表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对癌细胞的亲和力相比,优选表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对正常细胞的亲和力降低至少10%,至少20%,至少50%,更优选至少100%。与表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对正常细胞的亲和力相比,优选表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对癌细胞的亲和力增加至少1.5倍,至少2倍,至少5倍,至少10倍,至少100倍,更优选至少1000倍。与表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对癌细胞的亲和力相比,优选表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对正常细胞的亲和力降低至少1.5倍,至少2倍,至少5倍,至少10倍,至少100倍,更优选至少1000倍。优选地,表达CD38嵌合抗原受体的天然杀伤细胞对表达CD38的正常细胞具有低亲和力,其中“低亲和力”定义为亲和力高得足以对具有增加的CD38表达(相对于正常细胞)的靶癌细胞(例如多发性骨髓瘤细胞)有效地产生细胞毒性应答,但又低得足以避免对表达CD38的正常细胞产生细胞毒性反应。

[0018] 在某一方面,本文提供了一种制备包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的高水平表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR),其中该方法包括将天然杀伤细胞与编码CAR的多核苷酸一起温育。适宜地,工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。适

宜地, CAR特异性结合癌症相关抗原。适宜地, 癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。适宜地, 癌症相关抗原包括血癌相关抗原。适宜地, 血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。适宜地, 血癌相关抗原包含CD38。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, 其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。适宜地, CAR包含人CD8 $\alpha$ 多肽。适宜地, CAR包含DAP10、DAP12、2B4(CD244)或人4-1BB多肽。适宜地, CAR包含人4-1BB多肽。适宜地, CAR包含人CD3 $\delta$ 多肽。适宜地, CAR包含衍生自抗体的靶向结构域, 与达雷木单抗相比, 所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。另一方面, 工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体, 该第二嵌合抗原受体包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

## 附图说明

[0019] 图1A示出了本发明的嵌合抗原受体的非限制性示意图。该图未按比例表示。

[0020] 图1B示出了本发明的嵌合抗原受体的靶向结构域的非限制性示意图。该图未按比例表示。

[0021] 图2A-B示出了通过流式细胞术分析的HECA-452抗体与KHYG-1细胞(A)和NK-92细胞(B)的结合。

[0022] 图3示出了与NK-92细胞相比, KHYG-1细胞沿SDF-1梯度的迁移。

[0023] 图4A-B示出了来自观察流动池中KHYG-1细胞(A)和NK-92细胞(B)的迁移的视频的静止帧。停滞的或缓慢迁移的细胞标有星号。

[0024] 图5示出了用于靶向缺失CTLA4的gRNA构建体(表达载体)。

[0025] 图6示出了在用CRISPR/Cas9gRNA转染之前和之后亲本和突变的LIR2DNA的凝胶电泳条带。

[0026] 图7示出了在用CRISPR/Cas9gRNA转染之前和之后用于亲本和突变的CTLA4 DNA的凝胶电泳条带。

[0027] 图8A-B示出了通过流式细胞术分析的使用siRNA敲低KHYG-1细胞中的CD96。示出了两个独立的实验(A和B)。

[0028] 图9示出了在不同的效应物与靶标的比例下,由CD96减少的KHYG-1细胞进行的杀伤增加。

[0029] 图10示出了通过流式细胞术分析的使用siRNA敲低KHYG-1细胞中的CD328。

[0030] 图11示出了在不同的效应物与靶标的比例下,由CD328减少的KHYG-1细胞进行的杀伤增加。

[0031] 图12示出了如通过流式细胞术所分析的,KHYG-1细胞表现出低的或不存在的TRAIL表达。

[0032] 图13示出了通过流式细胞术所分析的用野生型和变体TRAIL转染的细胞中增加的细胞表面TRAIL表达。

[0033] 图14示出了通过流式细胞术分析的用野生型和变体TRAIL转染的细胞中增加的细胞表面107a表达。

[0034] 图15示出了用野生型或变体TRAIL转染的KHYG-1细胞的活力。

[0035] 图16示出了不同的NK细胞系上的TRAIL受体的表达;KHYG1(顶部四图),NK-92(底部四图)。

[0036] 图17示出了表达野生型TRAIL或变体TRAIL的KHYG-1细胞对K562细胞的细胞凋亡的影响。

[0037] 图18示出了表达野生型TRAIL或变体TRAIL的KHYG-1细胞对RPMI8226细胞的细胞凋亡的影响。

[0038] 图19示出了表达野生型TRAIL或变体TRAIL的KHYG-1细胞对MM1.S细胞的细胞凋亡的影响。

[0039] 图20分别示出了RPMI8226细胞和MM1.S细胞上DR5表达的FACS图,其中示出了硼替佐米处理对DR5表达的影响。

[0040] 图21示出了与具有(底部两图)或不具有(中间两图)TRAIL变体的KHYG-1细胞共培养的经硼替佐米预处理/未处理的MM1.S细胞中细胞凋亡的两个FACS图。

[0041] 图22示出了用各种低亲和力CD38 NK CAR处理多发性骨髓瘤细胞系UM9的效果。

[0042] 图23和24示出了用各种低亲和力CD38 NK CAR处理原发性多发性骨髓瘤细胞的效果。

[0043] 图25和26示出了根据它们的CD38和CD138的表达进行门控(gated)得到的细胞亚群FACS,表明低亲和力CD38 CAR有效靶向癌细胞但不靶向非癌细胞。

## 具体实施方式

### [0044] 某些定义

[0045] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。除非另有说明,否则本文对“或”的任何引用旨在涵盖“和/或”。

[0046] 如本文所用,术语“约”是指例如以10%、5%或1%接近所示出量的量。

[0047] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”和“患者”可互换使用,包括被诊断患有或怀疑患有癌症或其他肿瘤的人。

[0048] 在本文中,除非另有说明,否则提及的NK细胞包括NK细胞系和原代NK细胞。

[0049] 如本文所用,术语“NK细胞系”是指保留一种或多种天然杀伤细胞特性的任何转化的或永生化的细胞系。例如,在某些实施方案中,保留的一种或多种天然杀伤细胞特性是CD56表达、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)表达或针对靶细胞系(例如K562细胞)的抗原非依赖性细胞毒性。常见的NK细胞系是例如NK-92或KHYG-1细胞系。

### [0050] 天然杀伤细胞

[0051] 工程化天然杀伤细胞包括将它们与非工程化的天然杀伤细胞区分开的一种或多种处理。适宜地,所述工程化天然杀伤细胞的工程化设计在于,其包含编码嵌合体抗原受体、TRAIL变体、FUT6或FUT7蛋白中的任何一种或多种的多核苷酸,或者包含检查点抑制剂的表达的缺失或减少。本发明的工程化天然杀伤细胞(NK细胞)可以由包括原代细胞或已建立的细胞系的任何NK细胞群制备。适宜地,NK细胞是人NK细胞。人体中的原代天然杀伤细胞表达细胞表面标志物CD56,并且在某些实施方案中,工程化天然杀伤细胞可由CD56阳性细胞产生,如通过作为非限制性实例的流式细胞术所测定的那样。适宜地,天然杀伤细胞可以来自自体来源(源细胞和接受者的遗传背景相同),或来自异源来源(源细胞和接受者的遗传背景不同)。适宜地,使用诸如细胞分选或磁珠的方法从供体或待治疗个体的外周血中分离NK细胞。通过在白细胞介素-2和白细胞介素-15中培养超过7天,可以离体(ex vivo)扩增从供体分离的NK细胞。还可以使用本领域已知的方法在体外培养中由干细胞或祖细胞分化成NK细胞。适宜地,由源自骨髓的干细胞分化成NK细胞。适宜地,由成人多能细胞分化成NK细胞。适宜地,由胚胎干细胞分化成NK细胞。

[0052] 工程化NK细胞也可以由转化的NK细胞系制备。适宜地,转化的NK细胞系是人细胞系。可以使用的常见NK细胞系是NK-92细胞系(可从ATCC获得;CRL-2497)或KHYG-1细胞系。适宜地,工程化NK细胞系由KHYG-1细胞系制备。参见Yagita等,“A novel natural killer cell line(KHYG-1)from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53point mutation.”Leukemia 14(5):922-30。尽管常见的NK细胞系之间存在共性,例如CD56的表达,但不同的细胞系具有不同的表型和基因型特征,对于开发基于细胞的疗法(例如,表达变体TRAIL蛋白的CAR NK或NK细胞)而言,这些特征使得某种NK细胞系比其他NK细胞系更适合。适宜地,工程化NK细胞系不包含NK-92细胞系或衍生物。

[0053] 在某个实施方案中,本文所述的工程化NK细胞可用于治疗血液恶性肿瘤。为了使这种治疗更容易进行,在某些实施方案中,细胞表现出至骨髓的归巢增加。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体表达。E-选择素也称为:CD62抗原样家族成员E

(CD62E)、内皮细胞-白细胞粘附分子1(ELAM-1)或白细胞-内皮细胞粘附分子2(LECAM2)。E-选择素结合细胞表面上的E-选择素配体,所述E-选择素配体是表达四糖唾液酸化的路易斯抗原(Sialyl Lewis X(SLe<sup>x</sup>))的糖蛋白和/或糖脂。SLe<sup>x</sup>由 $\alpha$ -岩藻糖基转移酶、 $\alpha$ 2-3-唾液酸转移酶、 $\beta$ -半乳糖基转移酶和N-乙酰基- $\beta$ -葡萄糖胺基转移酶的组合作用合成。HECA-452抗体识别E-选择素配体。适宜地,工程化NK细胞包含工程化NK细胞群,其中至少25%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%或更多的细胞表现出HECA-452抗体染色阳性。适宜地,工程化NK细胞包含NK细胞群,其中至少50%或更多的细胞表现出HECA-452抗体染色阳性。适宜地,工程化NK细胞包含NK细胞群,其中至少75%或更多的细胞表现出HECA-452抗体染色阳性。适宜地,工程化NK细胞包含NK细胞群,其中至少80%或更多的细胞表现出HECA-452抗体染色阳性。适宜地,工程化NK细胞包含NK细胞群,其中至少90%或更多的细胞表现出HECA-452抗体染色阳性。例如,可以通过在体外用荧光缀合的HECA-452抗体对细胞进行染色,并通过流式细胞术,将HECA-452染色的细胞与同种型对照染色的细胞进行比较来分析是否是阳性的。适宜地,对表现出HECA-452阳性的工程化NK细胞群进行化学处理以增加细胞表面蛋白的岩藻糖基化。适宜地,化学处理包括GDP-岩藻糖底物和 $\alpha$ 1,3岩藻糖基转移酶-VI酶。

[0054] 适宜地,工程化NK细胞是糖工程化的。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比HECA-452抗体结合增加至少6倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少7倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少8倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少9倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少10倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少20倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少50倍,来表现高水平的E-选择素配体。适宜地,通过与同种型对照抗体结合相比,HECA-452抗体结合增加至少100倍,来表现高水平的E-选择素配体。例如,通过使用流式细胞术比较HECA-452抗体与同种型对照抗体结合的平均荧光强度,可以分析这种结合的增加。适宜地,表现出高水平的HECA-452抗体结合的NK细胞是KHYG-1细胞系。适宜地,表现出高水平的HECA-452结合的工程化NK细胞群已经过化学处理以增加细胞表面蛋白的岩藻糖基化或唾液酸化。适宜地,化学处理包括GDP-岩藻糖底物和 $\alpha$ 1,3岩藻糖基转移酶-VI酶。适宜地,NK细胞已经被工程化以通过表达FUT6、FUT7或两者而表现出高水平的HECA-452抗体结合。适宜地,通过将mRNA或DNA质粒或病毒载体导入表现出低水平的HECA-452抗体结合的NK细胞,例如NK-92细胞,来实现FUT6或FUT7表达。适宜地,永生化的NK细胞系,例如NK-92细胞,可以用编码FUT6、FUT7或两者的核酸稳定转染。适宜地,通过mRNA、蛋白质印迹或酶测定监测,FUT6或FUT7的高水平表达是FUT6或FUT7表达或活性增加至少2倍、5倍或10倍。适宜地,工程化NK细胞表达CD65。适宜地,工程化NK细胞表达多个CD65。

[0055] 适宜地,工程化NK细胞包含TRAIL受体的低水平的细胞表面表达。适宜地,TRAIL受体是DR4或DR5。适宜地,TRAIL受体的低水平的细胞表面表达包括没有可检测到的TRAIL受体活性。适宜地,TRAIL受体的低水平的细胞表面表达包含与同种型对照相当的、通过抗

TRAIL抗体反应性评价的水平。适宜地,TRAIL受体的低水平的细胞表面表达包含与同种型对照相比小于5倍的、通过抗TRAIL抗体反应性评价的水平。适宜地,TRAIL受体的低水平的细胞表面表达包含与同种型对照相比小于2倍的、通过抗TRAIL抗体反应性评价的水平。例如,使用如实施例中所详述的流式细胞术,可以量化细胞表面TRAIL受体表达。

#### [0056] 嵌合抗原受体

[0057] 嵌合抗原受体(CAR)是重组抗原受体,其旨在向免疫效应细胞引入某种抗原特异性。CAR包含由外源多核苷酸表达的确定的多肽序列,所述外源多核苷酸已被瞬时引入免疫效应细胞或整合到基因组中。通用CAR的示意图在图1A中示出。嵌合抗原受体包含前导序列101、靶向结构域102、跨膜结构域103和一个或多个细胞内信号传导结构域(104和105)。适宜地,靶向结构域衍生自抗体分子,并且包含来自抗体分子的一个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区赋予CAR抗原特异性。适宜地,用于本发明的工程化NK细胞的CAR的靶向结构域是单链可变片段(scFv),如图1B所示。scFv包含由柔性接头多肽107隔开的免疫球蛋白轻链106和免疫球蛋白重链分子108的可变链部分。重链和轻链的顺序不是限制性的,可以颠倒。柔性多肽接头使得重链和轻链彼此缔合并重构免疫球蛋白抗原结合结构域。适宜地,轻链可变区包含三个CDR,重链可变区包含三个CDR。适宜地,用于靶向结构域的CDR衍生自任何物种(例如,人类、小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊)的抗体分子,并且CDR之间的框架区是人源化的或包含与人类框架区至少85%、90%、95%或99%相同的序列。

[0058] 当CAR的靶向结构域包含scFv时,免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链通过各种长度的多肽接头连接。适宜地,多肽接头包含大于或等于10个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含大于10、15、20或25个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含小于或等于30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含小于15、20、25或30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含10至30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含10至25个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含10至20个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含10至15个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含15至30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含20至30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含25至30个氨基酸的长度。适宜地,多肽接头包含亲水性氨基酸。适宜地,多肽接头由亲水性氨基酸组成。适宜地,多肽接头包含氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG。适宜地,多肽接头包含G<sub>4</sub>S序列(GGGGS)。G<sub>4</sub>S接头允许接头具有柔韧性和蛋白酶抗性。适宜地,G<sub>4</sub>S接头在多肽接头中连续重复1、2、3、4、5、6、7或8次。

[0059] 本发明的CAR还包含NH<sub>2</sub>-末端前导序列101。前导序列(也称为信号肽)允许表达的CAR构建体进入内质网(ER)并靶向细胞表面。前导序列在ER中被切割,并且成熟细胞表面CAR不具有前导序列。通常,前导序列长度在5至30个氨基酸的范围内,并包含一段疏水性氨基酸。适宜地,前导序列包含大于5、10、15、20或25个氨基酸的长度。适宜地,前导序列包含小于10、15、20、25或30个氨基酸的长度。适宜地,前导序列包含衍生自任何分泌蛋白的序列。适宜地,前导序列包含衍生自CD8 $\alpha$ 前导序列的序列。

[0060] 本发明的CAR还包含跨膜结构域。参见图1A特征103。跨膜结构域包含疏水性氨基酸残基并允许CAR锚定在工程化NK细胞的细胞膜中。适宜地,跨膜结构域包含衍生自跨膜蛋白的氨基酸序列。适宜地,跨膜结构域包含衍生自T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\delta$ 链、CD27、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154的跨膜结构域的氨基酸序列。适宜地,CAR包含具有衍生自CD8的跨膜结构域的氨基酸序列的

跨膜结构域。适宜地, CAR包含具有衍生自人CD8 $\alpha$ 的跨膜结构域的氨基酸序列的跨膜结构域。

[0061] 本发明的CAR还包含一个或多个细胞内信号传导结构域。参见图1A特征104和105。细胞内信号传导结构域增加CAR的效力, 并且包含衍生自参与免疫细胞信号转导的蛋白的细胞内信号传导结构域。适宜地, 一个或多个细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 $\delta$ CD28、OX-40、4-1BB、DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 的细胞内信号传导结构域或其任何组合。适宜地, 一个或多个细胞内信号传导结构域包含衍生自CD3 $\delta$ CD28、OX-40、4-1BB、DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 中的任何两个的细胞内信号传导结构域或其任何组合。适宜地, CAR包含衍生自CD3 $\delta$ 和4-1BB的至少两个细胞内信号传导结构域。

[0062] 本发明的CAR还可包含位于靶向结构域和跨膜结构域之间的铰链区。铰链区包含亲水性氨基酸并且允许靶向结构域相对于细胞表面具有柔韧性。适宜地, 铰链区包含大于5、10、15、20、25或30个的氨基酸。适宜地, 铰链区包含少于10、15、20、25、30或35个的氨基酸。

[0063] 优选本发明的CD38 CAR具有包括含有SEQ ID NO:1的重链可变区的结合结构域。任选地, 重链可变区包含SEQ ID NO:7。优选CD38 CAR结合结构域包括含有SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:28的轻链可变区。

[0064] 优选的CD38 CAR实例具有结合结构域, 所述结合结构域包括含有SEQ ID NO:1的重链可变区和含有SEQ ID NO:23的轻链可变区。

[0065] 优选CD38 CAR结合结构域包含选自SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31的一个或多个或所有的重链CDR。任选地, CAR包含选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的一个或多个或所有的重链CDR。

[0066] 优选CD38 CAR结合结构域包含选自SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37, 或SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的一个或多个或所有的轻链CDR。

[0067] 优选地, 上述重链和轻链的片段和变体提供具有基本上相同的CD38结合活性的CAR结合结构域, 其中所述片段包括已被截短和/或具有缺失和/或修饰的氨基酸的肽。优选地, 根据本发明, 任何片段/变体保留优选CAR实例的结合活性的至少50%, 至少60%, 至少70%, 至少80%, 最优选至少90%。更优选, 根据本发明, 任何片段/变体具有的结合活性不比优选CAR的结合活性高大于10%, 大于20%, 大于50%, 优选不大于100%。

[0068] 优选CD38 CAR结合结构域包含与SEQ ID NO:1具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的重链可变区。任选地, CD38 CAR包含与SEQ ID NO:7具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的重链可变区。

[0069] 优选CD38 CAR结合结构域包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:28具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的轻链可变区。

[0070] 优选CD38 CAR结合结构域包含与SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31具有至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的一个或多个或所有的重链CDR。任选地, CD38 CAR包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34具有至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的一个或多个或所有的重链CDR。

[0071] 优选CD38 CAR结合结构域包含与SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37或



SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40具有至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的一个或多个或所有的轻链CDR。

[0072] 优选CD38 CAR包含选自SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的一个或多个共刺激结构域。优选CAR包含与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、更优选至少90%的序列同源性的共刺激结构域。

[0073] 优选CD38 CAR结合结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含为SEQ ID NO:1的片段的序列,该序列长度为至少60个氨基酸,至少70个氨基酸,至少80个氨基酸,至少90个氨基酸,至少100个氨基酸,至少110个氨基酸,更优选至少120个氨基酸。任选地,CD38 CAR包含重链可变区,所述重链可变区包含为SEQ ID NO:7的片段的序列,该序列长度为至少60个氨基酸,至少70个氨基酸,至少80个氨基酸,至少90个氨基酸,至少100个氨基酸,至少110个氨基酸,更优选至少120个氨基酸。

[0074] 优选CD38 CAR结合结构域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含为SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:28的片段的序列,该序列长度为至少50个氨基酸,至少60个氨基酸,至少70个氨基酸,至少80个氨基酸,至少90个氨基酸,更优选至少100个氨基酸。

[0075] CAR靶向结构域

[0076] 适宜地,本文提供的“癌症相关抗原”是指癌症的分子标志物,其由癌细胞表达的程度大于由正常细胞表达的程度。癌症相关抗原通常是蛋白质或由其衍生的多肽,但也可以是聚糖、脂质或其他小有机分子。此外,与正常细胞相比,通过癌细胞表现出的翻译后加工(例如蛋白糖基化、蛋白脂化、蛋白磷酸化或蛋白乙酰化)的增加或减少可以产生癌抗原。癌症相关抗原的非限制性实例包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1、HERV-K。

[0077] 适宜地,本文提供的“血癌相关抗原”是指癌症的分子标志物,其由白血病、淋巴瘤、骨髓瘤表达的程度大于在血液细胞上表达的程度。血癌相关抗原通常是蛋白质或由其衍生的多肽,但也可以是聚糖、脂质或其他小有机分子。此外,与正常细胞相比,通过白血病、淋巴瘤或骨髓瘤细胞表现出的翻译后加工(例如蛋白质糖基化、蛋白质脂化、蛋白质磷酸化或蛋白质乙酰化)的增加或减少,可以产生血癌抗原。血癌相关抗原的非限制性实例包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、GD2、CLL-1、HERV-K。血癌的非限制性实例包括急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、毛细胞白血病、T细胞前淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、轻链骨髓瘤或大颗粒淋巴细胞白血病。

[0078] 适宜地,工程化NK细胞包含具有特异性结合细胞表面蛋白的靶向结构域的CAR。适宜地,工程化NK细胞包含具有特异性结合两种或更多种不同的细胞表面蛋白的靶向结构域的两种或更多种CAR。适宜地,CAR靶向结构域特异性结合癌细胞细胞表面上的癌症相关抗原。适宜地,CAR特异性结合CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1、HERV-K。

[0079] CD38,也称为环状ADP核糖水解酶,是主要在免疫细胞上发现的细胞表面糖蛋白。

CD38参与细胞内钙的调节,并且在包括白血病、骨髓瘤和许多实体瘤的多种不同的癌症中过表达。适宜地,本发明的工程化NK细胞表达具有特异性针对CD38的靶向结构域102的CAR。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的序列相同的序列。

[0080] 适宜地,工程化NK细胞表达具有靶向结构域的CAR,所述靶向结构域包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列90%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列90%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列。适宜地,SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2通过柔性多肽接头连接。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:1所示多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:2所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:2所示多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:1所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。

[0081] 适宜地,工程化NK细胞表达具有靶向结构域的CAR,所述靶向结构域包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,和SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列90%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列90%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列。适宜地,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4通过柔性多肽接头连接。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:3所示多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:4所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:4所示的多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:3所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。

[0082] 适宜地,工程化NK细胞表达具有靶向结构域的CAR,所述靶向结构域包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列80%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列90%相同的氨基

酸序列,和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列90%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列95%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列98%相同的氨基酸序列。适宜地,CAR包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列99%相同的氨基酸序列。适宜地,SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6通过柔性多肽接头连接。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:5所示多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:6所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。适宜地,柔性多肽接头将SEQ ID NO:6所示多肽的COOH末端连接至SEQ ID NO:5所示多肽的NH<sub>2</sub>末端。

[0083] 本发明的工程化NK细胞可以包含CD38特异性CAR,其表现出为了获得最佳癌症反应而调整的亲和力,同时还使对在非癌细胞或非肿瘤细胞上表达的CD38的反应性最小化。达雷木单抗是一种对CD38受体具有高亲和力的单克隆抗体。适宜地,CAR包含靶向结构域,其衍生自对CD38的亲和力低于达雷木单抗的抗体。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38的亲和力低25%。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38的亲和力低50%。适宜地,CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,所述抗体对CD38的亲和力是达雷木单抗的1/2。可以例如通过使用表面等离子体共振(例如,Biacore)来测量抗体亲和力。

#### [0084] 双特异性CAR

[0085] 工程化NK细胞可以是双特异性的,即表达双特异性CAR或多种不同的CAR,其中它们对两种不同的配体/抗原具有亲和力。双特异性CAR-NK可用于增加癌细胞上的潜在结合位点的数量,或者用于将癌细胞定位于表达NK-CAR特异性配体的其他免疫效应细胞。为了用于癌症治疗,双特异性CAR可以结合靶肿瘤细胞和效应细胞,例如,T细胞、NK细胞或巨噬细胞。因此,例如,在多发性骨髓瘤的情况下,双特异性CAR可以结合T细胞抗原(例如CD3等)和肿瘤细胞标记物(例如CD38等)。双特异性CAR可以选择性地结合两个单独的肿瘤细胞标志物,从而增加NK细胞对靶肿瘤细胞的总体结合亲和力。这可以通过下调两种靶抗原中的一种来降低癌细胞产生抗性的风险。在这种情况下,在多发性骨髓瘤中的一个例子是与CD38和CS-1/SLAMF7二者结合的CAR。适合被CAR靶向的另一种肿瘤细胞标记物是肿瘤上的“不要吃我(don't eat me)”型标记物,例如CD47。

[0086] 本发明的工程化NK细胞可包含由相同的NK细胞表达的双特异性CAR或多种CAR。这使得NK细胞能同时靶向两种不同的抗原。适宜地,双特异性CAR对以下任何两种抗原具有特异性:CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、CD123/IL3-RA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1、CD123、HERV-K。适宜地,CAR NK细胞的双特异性可以允许结合肿瘤抗原和另一种免疫细胞,例如T细胞或树突细胞。适宜地,CAR NK细胞的双特异性可以允许结合检查点抑制剂,例如PDL-1或CD47。适宜地,第一CAR具有CD38特异性,第二CAR对SLAMF-7、BCMA、CD138、CD229、PDL-1或CD47中的任何一种具有特异性。适宜地,第一CAR对CD38具有特异性,第二CAR对SLAMF-7、BCMA、CD138、CD229具有特异性。适宜地,第一CAR对CD38具有特异性,第二CAR对SLAMF-7具有特异性。适宜地,第一CAR对CD38具有特异性,第二CAR对BCMA具有特异性。适宜地,第一CAR对CD38具有特异性,第二CAR对CD138具有特异性。

适宜地,第一CAR对CD38具有特异性,第二CAR对CD229具有特异性。

#### [0087] TNF相关的凋亡诱导配体

[0088] TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL),也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员10,是通过启动细胞凋亡诱导细胞死亡的蛋白质配体。通过TRAIL与TRAIL受体的结合启动细胞凋亡,所述TRAIL受体在许多不同类型的细胞(包括癌细胞)的细胞表面上表达。本发明的工程化NK细胞可以表达变体TRAIL多肽,该变体TRAIL多肽通过用至少一个氨基酸残基修饰野生型TRAIL蛋白序列以增加其对死亡诱导受体DR4、DR5或两者的结合亲和力,同时降低对诱饵受体(例如DcR1或DcR2)的结合亲和力而得到。适宜地,工程化NK细胞表达CAR和变体TRAIL多肽。适宜地,TRAIL变体显示出对一种或多种TRAIL受体的增加的结合亲和力。适宜地,TRAIL变体显示出对TRAIL受体DR4的增加的结合亲和力。适宜地,TRAIL变体显示出对TRAIL受体DR5的增加的结合亲和力。适宜地,TRAIL变体显示出对TRAIL受体DR4和DR5的增加的结合亲和力。通常已知野生型TRAIL对于DR4具有 $>2\text{nM}$ 的KD,对于DR5具有 $>5\text{nM}$ 的KD,对于诱饵受体DcR1具有 $>20\text{nM}$ 的KD(WO 2009/077857;通过表面等离子体共振测量),或对于DR4具有约50至100nM的KD,对于DR5具有1至10nM的KD,对于DcR1具有175至225nM的KD(Truneh,A. et al. 2000;通过等温滴定量热法和ELISA测量)。因此,对DR4的增加的亲和力分别适当地定义为 $<2\text{nM}$ 或 $<50\text{nM}$ 的KD,而对DR5的增加的亲和力分别适当地定义为 $<5\text{nM}$ 或 $<1\text{nM}$ 的KD。对诱饵受体DcR1的减少的亲和力分别适当地定义为 $>50\text{nM}$ 或 $>225\text{nM}$ 的KD。在任何情况下,TRAIL变体/突变体表现出的亲和力的增加或降低是相对于野生型TRAIL表现出的基线亲和力的增加或降低。适宜地,与野生型TRAIL相比,TRAIL变体对TRAIL受体的亲和力增加至少约10%,15%,20%,25%或50%。在某个实施方案中,与野生型相比,TRAIL变体增加细胞凋亡,如通过靶细胞中的胱天蛋白酶8活化所测量的。适宜地,与靶细胞中的野生型相比,TRAIL变体使胱天蛋白酶8活化增加至少2倍。适宜地,TRAIL受体变体包括人TRAIL的氨基酸突变,包括D269H、S159R、E195R、G131R、N199R、K201H或其任何组合。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,TRAIL受体变体包含D269H突变。适宜地,TRAIL受体变体包含E195R突变。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,突变TRAIL受体在原代T细胞或T细胞系上表达。适宜地,TRAIL受体由已经转染到T细胞系中的多核苷酸编码。

#### [0089] 检查点抑制性受体

[0090] 检查点抑制性受体在免疫效应细胞(例如T细胞和NK细胞)的表面上表达,并负调节这些细胞的细胞毒性。检查点抑制性受体的实例包括PD-1、CTLA-4和CD96,它们都在NK细胞上表达。适宜地,工程化NK细胞包含降低的检查点抑制性受体功能或不存在检查点抑制性受体功能。适宜地,具有降低功能的或功能缺失的检查点抑制性受体包括CD96(TACTILE)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG-3)、CD279(PD-1)、CD328(SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT和/或TIM-3中的一种或多种或全部。适宜地,检查点抑制性受体包括CD96(TACTILE)、CD152(CTLA4)或CD328(SIGLEC7)中的一种或多种。适宜地,对于两种或更多种检查点抑制受体,NK细胞包含降低或不存在的检查点抑制受体功能。适宜地,两种或更多种检查点抑制性受体包括CD96(TACTILE)、CD152(CTLA4)或CD328(SIGLEC7)。适宜地,NK细胞对三种检查点抑制性受体表现出降低的检查点抑制性受体功能或不存在检查点抑制性受体功能。适宜地,三种检查点抑制性受体包括CD96(TACTILE)、CD152(CTLA4)或CD328(SIGLEC7)。适宜地,工

程化NK细胞包含CD38 CAR以及检查点抑制性受体的缺失或减少。适宜地,工程化NK细胞包含CD38 CAR、变体TRAIL蛋白以及缺失或减少的检查点抑制性受体。

[0091] 适宜地,通过CRISPR/Cas9或TALEN机制通过遗传缺失修饰工程化NK细胞以减少检查点抑制性受体。适宜地,工程化NK细胞包括CD96 (TACTILE) 的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞包含CD328 (SIGLEC7) 的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞包含CD152 (CTLA4) 的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞包含CD279 (PD-1) 的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞包括CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CD152 (CTLA4) 或CD279 (PD-1) 中的任何两种或更多种的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞包含CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CD152 (CTLA4) 或CD279 (PD-1) 中的任何三种或更多种的遗传缺失。适宜地,工程化NK细胞已被修饰以通过siRNA、shRNA或反义RNA来降低检查点抑制性受体表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD96 (TACTILE) 的降低的表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD328 (SIGLEC7) 的降低的表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD152 (CTLA4) 的降低的表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD279 (PD-1) 的降低的表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CD152 (CTLA4) 或CD279 (PD-1) 中的任何两种或更多种的降低的表达。适宜地,工程化NK细胞包含CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CD152 (CTLA4) 或CD279 (PD-1) 中的任何三种或更多种的降低的表达。

[0092] 适宜地,如上所述,通过结合HECA-452抗体而被证实表达高水平E-选择素配体的工程化NK细胞包含CD38 CAR、TRAIL变体多肽或缺失或减少的检查点抑制性受体。适宜地,表达高水平E-选择素配体的工程化NK细胞包含CD38 CAR和TRAIL变体多肽。适宜地,表达高水平E-选择素配体的工程化NK细胞包含CD38 CAR和缺失或减少的检查点抑制性受体。适宜地,表达高水平E-选择素配体的工程化NK细胞包含CD38 CAR、TRAIL变体多肽以及缺失或减少的一种或多种检查点抑制剂。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少80%相同的靶向结构域序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少90%相同的靶向结构域序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少95%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少98%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少99%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列相同的序列。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,TRAIL受体变体包含D269H突变。适宜地,TRAIL受体变体包含E195R突变。适宜地,检查点抑制性受体是CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT和/或TIM-3中的一种或多种或全部。

[0093] 适宜地,通过结合HECA-452抗体而证明表达高水平E-选择素配体的工程化NK细胞是KHYG-1细胞。适宜地,KHYG-1细胞包含CD38 CAR、TRAIL变体多肽或缺失或减少的检查点抑制性受体功能。适宜地,KHYG-1细胞包含CD38 CAR和TRAIL变体多肽。适宜地,KHYG-1细胞包含CD38 CAR以及缺失或减少的检查点抑制性受体功能。适宜地,KHYG-1细胞包含CD38 CAR、TRAIL变体多肽以及缺失或减少的检查点抑制性受体功能。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少80%相同的靶向结构域序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少90%相同的靶向结构域序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少95%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包

含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少98%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列至少99%相同的序列。适宜地,CD38 CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的序列相同的序列。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,TRAIL受体变体包含人TRAIL的三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,TRAIL受体变体包含D269H突变。适宜地,TRAIL受体变体包含E195R突变。适宜地,检查点抑制性受体是CD96 (TACTILE)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG-3)、CD279 (PD-1)、CD328 (SIGLEC7)、SIGLEC9、TIGIT和/或TIM-3中的一种或多种或全部。

#### [0094] 制备工程化天然杀伤细胞的方法

[0095] 可以使用本领域已知的几种不同的技术制备工程化天然杀伤细胞。适宜地,CD38 CAR或TRAIL变体蛋白由插入病毒载体中的多核苷酸编码。适宜地,病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒或逆转录病毒。适宜地,病毒载体包括慢病毒或逆转录病毒。适宜地,病毒载体包括慢病毒。适宜地,病毒载体包括逆转录病毒。病毒载体可用于转导原代NK细胞或NK细胞系。适宜地,病毒载体可用于转导原代NK细胞。适宜地,病毒载体可用于转导NK细胞系。适宜地,病毒载体可用于转导NK-92细胞。适宜地,病毒载体可用于转导KHYG-1细胞。适宜地,可以使用任何上述方法(例如电穿孔)、病毒载体或与体内使用相容的基于脂质的转染试剂瞬时转染细胞。

[0096] 适宜地,CD38 CAR或TRAIL变体蛋白由多核苷酸编码。适宜地,多核苷酸是DNA质粒或线性化的DNA多核苷酸。适宜地,多核苷酸是mRNA分子。可以通过电穿孔将这些多核苷酸中的任何一种引入原代NK细胞群或NK细胞系中。例如,MaxCyte流式电穿孔平台可用于产生工程化NK细胞。

[0097] 可以使用本领域已知的几种不同的技术制备包含缺失或减少的检查点抑制性受体表达的工程化天然杀伤细胞。可以使用CRISPR/Cas9靶向机制(使用gRNA靶向核苷酸)删除或减少受体。可以将gRNA转染到原代NK细胞或细胞系中。适宜地,将gRNA转染到原代NK细胞或原代细胞群中,从而导致群体中检查点抑制性受体的表达降低。适宜地,将gRNA转染到NK细胞系中。适宜地,将gRNA转染到KHYG-1细胞系中,并选择包含检查点抑制性受体的纯合性缺失的克隆。

#### [0098] 施用天然杀伤细胞的方法

[0099] 本发明设想了包含适于静脉内施用于个体的工程化NK细胞制剂的药物组合物。本发明的药物组合物包含表达CAR的一种NK细胞或多种NK细胞。任选地,NK细胞可包括TRAIL变体或缺失的检查点抑制剂。适宜地,将表达CAR的NK细胞与可接受的载体、稀释剂或赋形剂一起配制用于施用。此类组合物可包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、生理盐水或磷酸盐缓冲盐水。适宜地,药物组合物可包含碳水化合物,例如葡萄糖、右旋糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、蔗糖或甘露糖醇。适宜地,药物组合物包含蛋白质、多肽或氨基酸,例如甘氨酸。适宜地,药物组合物包含其他的稳定剂和防腐剂,例如抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA或EGTA或谷胱甘肽。适宜地,NK细胞由低温(例如低于-70℃)保存在甘油中的冷冻原液扩增。适宜地,使用细胞因子(例如白细胞介素-2和白细胞介素-15)使NK细胞扩增,并培养一周或更长时间。

[0100] 适宜地,施用的NK细胞和细胞系在施用于接受细胞的个体之前进行 $\gamma$ 照射。适宜地,照射细胞以防止细胞在体内生长和分裂。适宜地,以至少5Gy、10Gy、20Gy、30Gy、40Gy、50Gy或更高的剂量照射细胞。适宜地,以不超过20Gy、30Gy、40Gy、50Gy、60Gy的剂量照射细

胞。适宜地,处理细胞使得它们的体内半衰期小于约7、6、5、4、3、2或1天。适宜地,细胞和细胞系包含表达蛋白的自杀基因,所述蛋白防止细胞分裂或对细胞有毒,使得半衰期缩短,或者在施用化合物后杀死细胞。常见的自杀基因的实例包括疱疹胸苷激酶和诱导型半胱天冬酶9。包含疱疹胸苷激酶的细胞可以使用抗疱疹抗病毒药(例如阿昔洛韦或更昔洛韦)杀死。

[0101] 作为本发明主题的工程化NK细胞可以以足以防止特定癌症或肿瘤发展或诱导其缓解的量施用。适宜地,工程化NK细胞的施用量大于约 $1 \times 10^6$ 个细胞/ $m^2$ ,约 $1 \times 10^7$ 个细胞/ $m^2$ ,约 $1 \times 10^8$ 个细胞/ $m^2$ ,约 $1 \times 10^9$ 个细胞/ $m^2$ 和约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/ $m^2$ 。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^9$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^8$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。适宜地,工程化NK细胞以约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^9$ 个细胞/ $m^2$ 的量施用。工程化NK细胞可以每天、每周或每月施用。适宜地,每周施用细胞,施用两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周、十周、十一周、十二周或更长时间。适宜地,在每周施用后,可以每月施用工程化NK细胞用于维持。可以以适合于所治疗的癌症的方式施用细胞。例如,对于血液癌症,可以静脉内施用细胞。例如,对于实体组织癌,可以瘤内或腹膜内施用细胞。

#### [0102] 治疗佐剂

[0103] 在施用工程化NK细胞之前,期间或之后施用治疗佐剂可以提高治疗效果。适宜地,佐剂包括白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素8(IL-8)、白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-15(IL-15)或蛋白酶体抑制剂。适宜地,蛋白酶体抑制剂是硼替佐米、卡非佐米、伊沙唑啉或其组合。适宜地,IL-2、IL-8、IL-12、IL-15或蛋白酶体抑制剂中的任何一种可以在施用工程化NK细胞之前施用于患者。适宜地,IL-2、IL-8、IL-12、IL-15或蛋白酶体抑制剂中的任何一种可在施用工程化NK细胞期间施用于患者。适宜地,IL-2、IL-8、IL-12、IL-15或蛋白酶体抑制剂中的任何一种可在施用工程化NK细胞后施用于患者。适宜地,IL-2、IL-8、IL-12、IL-15对IL-2、IL8、IL-12和IL-15受体的活性可由非白细胞介素激动剂提供。例如,白细胞介素-12激动剂可以是ALT-803或ALT-801。白细胞介素-15激动剂可以是NIZ985。

[0104] 适宜地,在施用工程化NK细胞之前,可以将工程化NK细胞与白细胞介素-12、白细胞介素-15或蛋白酶体抑制剂一起温育。适宜地,在施用之前,可以将CD38 CAR NK细胞与白细胞介素-12、白细胞介素-15或硼替佐米一起温育。适宜地,在施用之前,可以将TRAIL变体NK细胞与IL-2、IL-8、IL-12、IL-15或蛋白酶体抑制剂一起温育。适宜地,温育至少4、6、8、12或24小时。

[0105] 本发明的治疗方法设想施用低剂量环磷酰胺作为佐剂以改善使用工程化NK细胞的治疗。环磷酰胺可以口服或静脉内施用。适宜地,环磷酰胺以节律方式施用,例如持续低剂量的环磷酰胺。适宜地,环磷酰胺以每天或每隔一天约100mg至约25mg的剂量口服施用一周、两周、三周、四周或更多周。适宜地,环磷酰胺以每天约50mg的剂量口服施用一周、两周、三周、四周或更多周。适宜地,环磷酰胺以每周约1000mg至约250mg的剂量静脉内施用一周、两周、三周、四周或更多周。适宜地,环磷酰胺以每周约750mg、500mg、250mg或更少的剂量静脉内施用一周、两周、三周、四周或更多周。适宜地,在施用工程化NK细胞之前施用环磷酰胺,并且一旦施用工程化NK细胞就中断环磷酰胺的施用。适宜地,施用环磷酰胺与施用工程

化NK细胞重叠一个、两个、三个、四个、五个或六个月。适宜地，环磷酰胺与工程化NK细胞同时施用。

[0106] 本发明的治疗方法设想施用金属蛋白酶抑制剂作为佐剂以改善使用工程化NK细胞的治疗。适宜地，金属蛋白酶抑制剂是四环素抗生素，例如，强力霉素、米诺环素、替加环素、地美环素、甲烯土霉素、金霉素、土霉素、赖甲环素、甲氯环素或吡甲四环素。适宜地，四环素抗生素是强力霉素。适宜地，用本发明的工程化NK细胞治疗的个体使用浓度为每天约50mg至约300mg或者浓度为每天约100mg至200mg的强力霉素进行预处理或同时治疗。强力霉素可以口服或静脉内施用。适宜地，可以同时使用工程化NK细胞和强力霉素治疗个体。

[0107] 本发明的治疗方法还设想了使细胞对工程化NK细胞的杀伤敏感，并且可以与工程化NK细胞一起或单独施用于患者的佐剂。例如，癌细胞可能对TRAIL诱导的细胞凋亡具有抗性。适宜地，佐剂是恢复对TRAIL诱导的细胞凋亡的敏感性的小分子。适宜地，该化合物是SMAC模拟物，例如TL32711、LCL161、GDC-0917、HGS1029；NF- $\kappa$ B抑制剂，例如(-)-DHMEQ、PBS-1086、IT-603或IT-901；类泛素化修饰抑制剂，例如MLN4924；组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂，例如帕比司他、伏立诺他、罗米地新、西达本胺、贝利司他、丙戊酸、mocetinostat、abexinostat、etinostat、SB939、givinostat、quisinostat、resminostat。还设想了一种治疗佐剂，其是凋亡抑制蛋白的抑制剂，例如：BCL-2抑制剂，例如，维奈托克(ABT-199)或奥巴克拉(GX15-070)；生存素抑制剂，例如YM15或shepherdin。适宜地，在施用工程化NK细胞之前施用佐剂。适宜地，佐剂与工程化NK细胞同时施用。

#### [0108] 治疗适应症

[0109] 本发明的表达CD38 CAR的工程化天然杀伤细胞可用于癌症的治疗。适宜地，癌症包括血液(血)癌。适宜地，血液癌包括多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤或轻链骨髓瘤。适宜地，血液癌是白血病。适宜地，白血病包括急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、毛细胞白血病、T细胞前淋巴细胞性白血病或大颗粒淋巴细胞白血病。

[0110] 适宜地，待治疗的癌症是实体组织肿瘤。适宜地，实体组织肿瘤是肝肿瘤，包括肝细胞癌；肺肿瘤；非小细胞肺癌；胰腺肿瘤，包括胰腺腺癌或胰腺腺泡细胞癌；结肠癌；胃癌；肾癌，包括肾细胞癌(RCC)和移行细胞癌(TCC，也称为尿路上皮细胞癌)；卵巢癌；前列腺癌；乳腺癌；或宫颈癌。

#### [0111] 一般的CAR

[0112] 适宜地，本文描述的是工程化NK细胞。适宜地，工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地，与NK-92细胞相比，表现出高水平的E-选择素配体结合的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地，工程化NK细胞包含嵌合抗原受体。适宜地，包含嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地，包含嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子，其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变：G131R，N199R和K201H。适宜地，包含嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子，其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变：D269H和E195R。适宜地，包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地，包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96(TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地，包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包含CD328(SIGLEC7)表



达的缺失或减少。适宜地,包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包含CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包含CD279(PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包含选自CD96(TACTILE)、CD328(SIGLEC7)、CTLA-4和CD279(PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0113] 癌症相关抗原

[0114] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96(TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328(SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279(PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合癌症相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96(TACTILE)、CD328(SIGLEC7)、CTLA-4和CD279(PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0115] 血癌相关抗原

[0116] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体结合的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96(TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328(SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异

性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合血癌相关抗原的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0117] CD319

[0118] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD319/SLAMF-7的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0119] TNFRSF17

[0120] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的HECA E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括

CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合TNFRSF17/BCMA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0121] CD123

[0122] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD123/IL3-RA的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0123] CD138

[0124] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合SYND1/CD138的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子

的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0125] CD229

[0126] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD229的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0127] CD47

[0128] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD47的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0129] CD20

[0130] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体结合。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD20的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0131] CD19

[0132] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1)表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD19的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1)的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0133] CD22

[0134] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体。

适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD22的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0135] MUC1

[0136] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0137] MUC16

[0138] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性

结合MUC16的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合MUC16的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0139] Her2/Neu

[0140] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合Her2/Neu的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0141] 表皮生长因子受体 (EGFR)

[0142] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人



TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合EGFR的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0143] 间皮素

[0144] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合间皮素的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

#### [0145] CLL-1

[0146] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人



TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CLL-1的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0147] CD38

[0148] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0149] CD38 (SEQ ID NO:1和2)

[0150] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细

胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0151] CD38 (SEQ ID NO:3和4)

[0152] 适宜地,本文描述的是工程化NK细胞。适宜地,工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地,与NK-92细胞相比,表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地,工程化NK细胞包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域,该靶向结构域包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变:G131R、N199R和K201H。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子,其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变:D269H和E195R。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地,包含特异性结合CD38的嵌合抗原受

体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0153] CD38 (SEQ ID NO:5和6)

[0154] 适宜地, 本文描述的是工程化NK细胞。适宜地, 工程化NK细胞表现出高水平的E-选择素配体。适宜地, 与NK-92细胞相比, 表现出高水平的E-选择素配体的工程化NK细胞表现出更高水平的HECA-452结合。适宜地, 工程化NK细胞包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞包含CAR靶向结构域, 该靶向结构域包含与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列, 和与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含三个氨基酸突变: G131R、N199R和K201H。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体的工程化NK细胞还包含变体人TRAIL分子, 其中变体人TRAIL分子包含两个氨基酸突变: D269H和E195R。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括检查点抑制剂分子表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD96 (TACTILE) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD328 (SIGLEC7) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CTLA-4表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括CD279 (PD-1) 表达的缺失或减少。适宜地, 包含特异性结合CD38的嵌合抗原受体和变体人TRAIL分子的工程化NK细胞还包括选自CD96 (TACTILE)、CD328 (SIGLEC7)、CTLA-4和CD279 (PD-1) 的至少两种检查点抑制剂的表达的缺失或减少。

[0155] 本发明尤其提供了以下实施方案：

[0156] 1. 一种包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物，其中所述工程化天然杀伤细胞优选表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达，其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0157] 2. 根据实施方案1所述的药物组合物，其中所述工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。

[0158] 3. 根据实施方案1所述的药物组合物，其中所述工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表达，其中TRAIL受体包括TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。

[0159] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的药物组合物，其中所述工程化天然杀伤细胞包括原代天然杀伤细胞。

[0160] 5. 根据实施方案1至3中任一项所述的药物组合物，其中所述工程化天然杀伤细胞包括转化的天然杀伤细胞系。

[0161] 6. 根据实施方案5所述的药物组合物，其中转化的天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。

[0162] 7. 根据实施方案5所述的药物组合物，其中转化的天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。

[0163] 8. 根据实施方案1至7中任一项所述的药物组合物，其中CAR特异性结合癌症相关抗原。

[0164] 9. 根据实施方案8所述的药物组合物，其中癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0165] 10. 根据实施方案8所述的药物组合物，其中癌症相关抗原包含血癌相关抗原。

[0166] 11. 根据实施方案10所述的药物组合物，其中血癌相关抗原包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0167] 12. 根据实施方案10所述的药物组合物，其中血癌相关抗原包含CD38。

[0168] 13. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0169] 14. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0170] 15. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0171] 16. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0172] 17. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0173] 18. 根据实施方案12所述的药物组合物，其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

- [0174] 19. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0175] 20. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0176] 21. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0177] 22. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0178] 23. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0179] 24. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0180] 25. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0181] 26. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0182] 27. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0183] 28. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0184] 29. 根据实施方案12所述的药物组合物,其中CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。
- [0185] 30. 根据实施方案1至29中任一项所述的药物组合物,其中CAR包含衍生自人CD8 $\alpha$ 蛋白的跨膜结构域。
- [0186] 31. 根据实施方案1至30中任一项所述的药物组合物,其中CAR包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB蛋白。
- [0187] 32. 根据实施方案1至31中任一项所述的药物组合物,其中CAR包含人4-1BB蛋白。
- [0188] 33. 根据实施方案1至32中任一项所述的药物组合物,其中CAR包含人CD3 $\delta$ 蛋白。
- [0189] 34. 根据实施方案1至33中任一项所述的药物组合物,其中CAR包含衍生自抗体的靶向结构域,与达雷木单抗相比,所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。
- [0190] 35. 根据实施方案1至34中任一项所述的药物组合物,其还包含第二嵌合抗原受体,所述第二嵌合抗原受体包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。
- [0191] 36. 根据实施方案1至35中任一项所述的药物组合物,其还包含突变的TNF相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 多肽,其中所述突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。
- [0192] 37. 根据实施方案36所述的药物组合物,其中所述TRAIL配体包括TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。

- [0193] 38. 根据实施方案36所述的药物组合物,其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。
- [0194] 39. 根据实施方案36所述的药物组合物,其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。
- [0195] 40. 根据实施方案1至39中任一项所述的药物组合物,其中所述CAR或突变的TRAIL多肽被整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。
- [0196] 41. 根据实施方案1至40中任一项所述的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞还包含检查点抑制性受体活性的缺失或降低。
- [0197] 42. 根据实施方案41所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。
- [0198] 43. 根据实施方案42所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体包括CD96、CD152或CD328。
- [0199] 44. 根据实施方案42所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体包括CD96。
- [0200] 45. 根据实施方案42所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体包括CD152
- [0201] 46. 根据实施方案42所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体包括CD328。
- [0202] 47. 根据实施方案41至46中任一项所述的药物组合物,其中所述检查点抑制性受体全部或部分地从工程化天然杀伤细胞基因组中缺失,或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。
- [0203] 48. 根据实施方案41至46中任一项所述的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。
- [0204] 49. 根据实施方案1至48中任一项所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂。
- [0205] 50. 根据实施方案49所述的药物组合物,其中配制所述药物组合物用于腹膜内施用。
- [0206] 51. 根据实施方案49所述的药物组合物,配制所述药物组合物用于静脉内施用。
- [0207] 52. 根据实施方案1至51中任一项所述的药物组合物,其用于治疗癌症。
- [0208] 53. 根据实施方案52所述的药物组合物,其中所述癌症包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
- [0209] 54. 根据实施方案52所述的药物组合物,其中所述癌症包括多发性骨髓瘤。
- [0210] 55. 一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向所述个体施用包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。
- [0211] 56. 根据实施方案55所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。
- [0212] 57. 根据实施方案55所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表达,其中所述TRAIL受体包括TNFRSF10A(DR4)或TNFRSF10B(DR5)。
- [0213] 58. 根据实施方案55至57中任一项所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞包含原代天然杀伤细胞。
- [0214] 59. 根据实施方案55至57中任一项所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞包

含转化的天然杀伤细胞系。

[0215] 60. 根据实施方案59所述的方法, 其中所述转化的天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。

[0216] 61. 根据实施方案59所述的方法, 其中所述转化的天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。

[0217] 62. 根据实施方案55至61中任一项所述的方法, 其中所述CAR特异性结合癌症相关抗原。

[0218] 63. 根据实施方案62所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0219] 64. 根据实施方案62所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括血癌相关抗原。

[0220] 65. 根据实施方案64所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0221] 66. 根据实施方案64所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包括CD38。

[0222] 67. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0223] 68. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0224] 69. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0225] 70. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0226] 71. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0227] 72. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0228] 73. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0229] 74. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0230] 75. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0231] 76. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0232] 77. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0233] 78. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0234] 79. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0235] 80. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0236] 81. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0237] 82. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0238] 83. 根据实施方案66所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0239] 84. 根据实施方案55至83中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含衍生自人CD8蛋白的跨膜结构域。

[0240] 85. 根据实施方案55至84中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB蛋白。

[0241] 86. 根据实施方案55至85中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含人4-1BB蛋白。

[0242] 87. 根据实施方案55至86中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含人CD3 $\delta$ 蛋白。

[0243] 88. 根据实施方案55至87中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含衍生自抗体的靶向结构域, 与达雷木单抗相比, 所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。

[0244] 89. 根据实施方案55-88中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞还包含第二嵌合抗原受体, 所述第二嵌合抗原受体包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体 (EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0245] 90. 根据实施方案55至89中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞还包含突变的TNF相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 多肽, 其中所述突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。

[0246] 91. 根据实施方案90所述的方法, 其中所述TRAIL配体包含TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。

[0247] 92. 根据实施方案90所述的方法, 其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。

[0248] 93. 根据实施方案90所述的方法, 其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。

[0249] 94. 根据实施方案55至93中任一项所述的方法, 其中所述CAR或突变体TRAIL多肽被整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。

[0250] 95. 根据实施方案55至94中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞还包含检查点抑制性受体活性的缺失或降低。

[0251] 96. 根据实施方案95所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。

[0252] 97. 根据实施方案96所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD96、CD152或CD328。



- [0253] 98. 根据实施方案97所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD96。
- [0254] 99. 根据实施方案97所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD152。
- [0255] 100. 根据实施方案97所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD328。
- [0256] 101. 根据实施方案41或46所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体全部或部分地从所述工程化天然杀伤细胞基因组中缺失, 或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。
- [0257] 102. 根据实施方案95至101中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。
- [0258] 103. 根据实施方案95至102中任一项所述的方法, 其中从所述工程化天然杀伤细胞基因组中删除所述检查点抑制性受体。
- [0259] 104. 根据实施方案55至103中任一项所述的方法, 其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂。
- [0260] 105. 根据实施方案104所述的方法, 其中配制所述药物组合物用于静脉内施用。
- [0261] 106. 根据实施方案104所述的方法, 其中配制所述药物组合物用于腹膜内施用。
- [0262] 107. 根据实施方案55至106中任一项所述的方法, 其中所述癌症包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
- [0263] 108. 根据实施方案55至107中任一项所述的方法, 其中所述癌症包括多发性骨髓瘤。
- [0264] 109. 根据实施方案55至108中任一项所述的方法, 其中在施用蛋白酶体抑制剂期间或之后施用所述药物组合物。
- [0265] 110. 根据实施方案55至108中任一项所述的方法, 其中在低剂量节律性环磷酰胺治疗方案之前, 期间或之后施用所述药物组合物。
- [0266] 111. 一种制备包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞表现出高水平的E-选择素配体的细胞表面表达, 其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR), 其中所述方法包括将天然杀伤细胞与编码CAR的多核苷酸一起温育。
- [0267] 112. 根据实施方案111所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞包括对被HECA-452抗体结合的抗原具有大于25%的阳性的多种工程化天然杀伤细胞。
- [0268] 113. 根据实施方案111所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞表现出TRAIL受体的低水平的细胞表面表达, 其中所述TRAIL受体包括TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。
- [0269] 114. 根据实施方案111-113中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞包含原代天然杀伤细胞。
- [0270] 115. 根据实施方案111-113中任一项所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞包含转化的天然杀伤细胞系。
- [0271] 116. 根据实施方案115所述的方法, 其中所述转化的天然杀伤细胞系是NK-92细胞系或KHYG-1细胞系。
- [0272] 117. 根据实施方案115所述的方法, 其中所述转化的天然杀伤细胞系是KHYG-1细胞系。
- [0273] 118. 根据实施方案111至117中任一项所述的方法, 其中所述CAR特异性结合癌症

相关抗原。

[0274] 119. 根据实施方案118所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0275] 120. 根据实施方案118所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括血癌相关抗原。

[0276] 121. 根据实施方案120所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0277] 122. 根据实施方案120所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包含CD38。

[0278] 123. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0279] 124. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0280] 125. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0281] 126. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0282] 127. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0283] 128. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0284] 129. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0285] 130. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0286] 131. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0287] 132. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0288] 133. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0289] 134. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0290] 135. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0291] 136. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0292] 137. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的

氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0293] 138. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0294] 139. 根据实施方案122所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0295] 140. 根据实施方案111至139中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含衍生自人CD8 $\alpha$ 多肽的跨膜结构域。

[0296] 141. 根据实施方案111-140中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含细胞内结构域, 所述细胞内结构域包含DAP10、DAP12、2B4 (CD244) 或人4-1BB蛋白。

[0297] 142. 根据实施方案111至141中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含人4-1BB多肽

[0298] 143. 根据实施方案111-142中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含人CD38多肽。

[0299] 144. 根据实施方案111-143中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含衍生自抗体的靶向结构域, 与达雷木单抗相比, 所述抗体对CD38表现出更低的亲和力。

[0300] 145. 根据实施方案111-144中任一项所述的方法, 其进一步包括将工程化天然杀伤细胞与编码第二嵌合抗原受体的多核苷酸一起温育, 所述第二嵌合抗原受体包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0301] 146. 根据实施方案111-145中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述工程化天然杀伤细胞与编码突变的TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL) 多肽的多核苷酸一起温育, 其中所述突变的TRAIL多肽诱导增加的信号传导或具有对TRAIL配体的增加的结合亲和力。

[0302] 147. 根据实施方案146所述的方法, 其中所述TRAIL配体包含TNFRSF10A (DR4) 或TNFRSF10B (DR5)。

[0303] 148. 根据实施方案146所述的方法, 其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的D269H/E195R突变。

[0304] 149. 根据实施方案146所述的方法, 其中所述突变的TRAIL多肽包含人TRAIL的G131R/N199R/K201H突变。

[0305] 150. 根据实施方案111-149中任一项所述的方法, 其中所述CAR或突变的TRAIL多核苷酸被整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。

[0306] 151. 根据实施方案111-150中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述工程化天然杀伤细胞与删除或降低检查点抑制性受体的活性的多核苷酸一起温育。

[0307] 152. 根据实施方案151所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包括CD85d、CD85j、CD96、CD152、CD159a、CD223、CD279、CD328、SIGLEC9、TIGIT或TIM-3。

[0308] 153. 根据实施方案151所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包含CD96、CD152或CD328。

[0309] 154. 根据实施方案153所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包含CD96。

[0310] 155. 根据实施方案153所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包含CD152。

[0311] 156. 根据实施方案153所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体包含CD328。

[0312] 157. 根据实施方案111-156中任一项所述的方法, 其中所述检查点抑制性受体全

部或部分地从所述工程化天然杀伤细胞基因组中缺失,或者通过在染色体水平插入或缺失一个或多个核苷酸而被破坏。

[0313] 158.根据实施方案111-157中任一项所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞包含靶向检查点抑制性受体的siRNA。

[0314] 159.根据实施方案111-158中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸包含病毒载体。

[0315] 160.根据实施方案159所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒。

[0316] 161.根据实施方案159所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒。

[0317] 162.根据实施方案111-161中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸包含mRNA。

[0318] 163.根据实施方案111-162中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸被整合到工程化天然杀伤细胞的基因组中。

[0319] 164.根据实施方案111-163中任一项所述的方法,其中用化学品处理细胞以增加工程化天然杀伤细胞的岩藻糖基化。

[0320] 165.根据实施方案111-163中任一项所述的方法,其还包括将工程化天然杀伤细胞与药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂混合。

[0321] 166.一种包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0322] 167.根据实施方案166所述的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。

[0323] 168.根据实施方案166所述的药物组合物,其中所述CAR特异性结合癌症相关抗原。

[0324] 169.根据实施方案167所述的药物组合物,其中所述癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0325] 170.根据实施方案167所述的药物组合物,其中所述癌症相关抗原包含血癌相关抗原。

[0326] 171.根据实施方案170所述的药物组合物,其中所述血癌相关抗原包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0327] 172.根据实施方案170所述的药物组合物,其中所述血癌相关抗原包含CD38。

[0328] 173.根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0329] 174.根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0330] 175.根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0331] 176.根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0332] 177. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一个所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0333] 178. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0334] 179. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0335] 180. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0336] 181. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0337] 182. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0338] 183. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0339] 184. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0340] 185. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0341] 186. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0342] 187. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0343] 188. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0344] 189. 根据实施方案172所述的药物组合物,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0345] 190. 一种治疗患有癌症的个体的方法,其包括向所述个体施用包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。

[0346] 191. 根据实施方案190所述的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。

[0347] 192. 根据实施方案190所述的方法,其中所述CAR特异性结合癌症相关抗原。

[0348] 193. 根据实施方案192所述的方法,其中所述癌症相关抗原包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0349] 194. 根据实施方案192所述的方法,其中所述癌症相关抗原包含血癌相关抗原。

[0350] 195. 根据实施方案194所述的方法,其中所述血癌相关抗原包含CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或

CLL-1。

[0351] 196. 根据实施方案195所述的方法,其中所述血癌相关抗原包含CD38。

[0352] 197. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0353] 198. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0354] 199. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0355] 200. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0356] 201. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0357] 202. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0358] 203. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0359] 204. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0360] 205. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0361] 206. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0362] 207. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0363] 208. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0364] 209. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0365] 210. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0366] 211. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0367] 212. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0368] 213. 根据实施方案196所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0369] 214. 一种制备包含工程化天然杀伤细胞的药物组合物的方法,其中所述工程化天然杀伤细胞表现出FUT6或FUT7蛋白的表达,其中所述工程化天然杀伤细胞包含嵌合抗原受体(CAR),其中所述方法包括将天然杀伤细胞与编码CAR的多核苷酸一起温育。

[0370] 215. 根据实施方案214所述的方法, 其中所述工程化天然杀伤细胞包含编码FUT6或FUT7蛋白的外源多核苷酸。

[0371] 216. 根据实施方案214所述的方法, 其中所述CAR特异性结合癌症相关抗原。

[0372] 217. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、Her2/Neu、表皮生长因子受体(EGFR)、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22、间皮素、EpCAM、MUC1、MUC16、Tn抗原、NEU5GC、NeuGcGM3、GD2、CLL-1或HERV-K。

[0373] 218. 根据实施方案216所述的方法, 其中所述癌症相关抗原包括血癌相关抗原。

[0374] 219. 根据实施方案218所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包括CD38、CD319/SLAMF-7、TNFRSF17/BCMA、SYND1/CD138、CD229、CD47、CD123/IL3-RA、CD19、CD20、CD22或CLL-1。

[0375] 220. 根据实施方案218所述的方法, 其中所述血癌相关抗原包含CD38。

[0376] 221. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少80%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0377] 222. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0378] 223. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0379] 224. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0380] 225. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1-6中任一所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0381] 226. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0382] 227. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0383] 228. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0384] 229. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:1和2中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0385] 230. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0386] 231. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0387] 232. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0388] 233. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:3和4中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0389] 234. 根据实施方案220所述的方法, 其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的

氨基酸序列至少90%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0390] 235. 根据实施方案220所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少95%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0391] 236. 根据实施方案220所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列至少98%相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0392] 237. 根据实施方案220所述的方法,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:5和6中所示的氨基酸序列相同的靶向结构域氨基酸序列。

[0393] 实施例

[0394] 现在参考附图在实施例中说明本发明。

[0395] 实施例1与NK-92细胞系相比,NK细胞系KHYG-1表现出E-选择素配体的更高水平的表达

[0396] 为了确定E-选择素配体在不同NK细胞系上的表达,我们在补充有10ng/ml的10% FBS和IL-2的RPMI 1640培养基中培养NK-92细胞和KHYG-1细胞。从培养物中取出细胞,洗涤,并用PE缀合的HECA-452抗体或PE-同种型对照染色。然后在流式细胞仪上运行细胞,并与对照相比较,测定每种细胞系的平均荧光强度(MFI)。图2A是代表性实验并且示出了当与同种型对照201相比时,KHYG-1细胞表现出高得多的HECA-452反应性202(2772对221的MFI)。图2B示出了相反的结果,当与同种型对照203相比时,NK-92细胞表现出低的HECA-452反应性204(545对121的MFI)。

[0397] 实施例2NK细胞系KHYG-1表现出减少的E-选择素配体的体外表型

[0398] 为了确定这种增加的HECA-452反应性是否转化为KHYG-1细胞和NK-92细胞迁移的表型差异,在体外进行了检测。首先,检测沿基质细胞衍生因子-1(SDF-1)梯度的迁移。图3示出了与NK-92细胞(右侧条)相比,KHYG-1细胞(左侧条)的迁移增加约6倍。此外,监测E-选择素包被的流动池中的迁移。图4A和图4B示出了在流动池测定期间拍摄的视频的静止帧照片。图4A显示许多KHYG-1细胞在流动池测定中是不动的或表现出非常缓慢的运动(星号)。相反,图4B显示NK-92细胞在流动池的框架中畅通无阻地流动。

[0399] 迁移试验

[0400] 采集对数期NK-92细胞或KHYG1细胞,洗涤并悬浮于含有10ng/mL的IL-2的无血清培养基(对于KHYG1,采用RPMI1640,对于NK-92,采用aMEM)中饥饿培养4小时。向每个孔(12孔板)中加入600μL含有100ng/mL SDF1和10ng/mL IL-2的无血清培养基,然后将100μL经饥饿培养的细胞悬浮液加载到孔径大小为5.0μm的上部迁移室中(Costar;Corning)。然后将细胞在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养4小时。4小时后,收集下部隔室(含有迁移的细胞)中的培养基,并使用BD Accuri™ C6流式细胞仪对细胞数目进行计数。

[0401] 流动池/滚动测定

[0402] 使用Mirus Evo NanoPump(Cellix Limited)在8通道微流体生物芯片(Cellix Limited,都柏林,爱尔兰)中进行滚动测定(rolling assay)。生物芯片的通道Vena8Fluoro+(Cellix Limited)用在补加有1mM CaCl<sub>2</sub>的Tris/HCl(pH 7.4)中的15μg/mL E-选择素(PeProtech,罗基希尔,美国)包被,并在4°C下温育过夜。每个通道用1%BSA(牛血清白蛋白)封闭或用15μg/mL抗E-选择素封闭抗体(Clone BBIG-E1,R&D System;明尼阿波利斯,美国)封闭,并在测定之前在37°C下温育1小时。洗涤细胞并以2×10<sup>6</sup>个细胞/ml重悬于滚动测



定缓冲液(不含酚红的RPMI 1640培养基,补加有1%热灭活的FBS(胎牛血清)、5mM HEPES和1mM  $\text{CaCl}_2$ )中。将80 $\mu\text{L}$ 细胞悬浮液加载到微通道上,并在室温下以0.5达因/ $\text{cm}^2$ 进行滚动测定。使用AX10Vert.A1显微镜(Carl Zeiss Microscopy GmbH)的A-Plan10X/0.25物镜(Carl Zeiss Microscopy GmbH;耶拿,德国)沿着通道在5个不同位置监测细胞。使用01QIClick F-M-12Mono 12位相机(QImaging;素里,加拿大)以0.5秒的间隔收集每个位置的30帧图像。使用Vena Flux测定软件(Cellix Limited)获取图像,并使用Image-Pro Premiere软件(Media Cybernetics;罗克维尔,美国)进行分析。滚动细胞被定义为行进距离大于其直径的细胞。计算每个通道的5个不同位置处的总细胞数,然后计算所有通道的平均数。

[0403] 实施例3NK细胞系KHYG-1的体内归巢

[0404] 在体内小鼠模型中,我们将追踪NK细胞到远处骨髓壁龛(niche)的归巢。这将通过对骨髓使用体内共聚焦显微镜或流式细胞术分析来完成。用于骨髓归巢分析的细胞系是KHYG-1(高HECA-452结合)和NK-92(低HECA-452结合)。将两种细胞系注射到相同的小鼠中,但用两种不同的荧光团标记以进行竞争性骨髓归巢分析。我们一个时间点,例如4、8、12或24小时,进行查看。

[0405] 用荧光染料(钙黄绿素AM或CellTracker染料)标记NK细胞。然后使用Zeiss 710共聚焦系统(Carl Zeiss Microimaging, Jena, 德国Germany)对到BM的归巢进行体内成像,或使用FACS Aria II流式细胞仪进行量化。在共聚焦中,在小鼠的头皮上制作皮瓣以暴露下面的背侧颅骨表面。使用体内共聚焦显微镜在大约1小时的时间段内捕获肿瘤的图像。使用10x0.45NA Plan-Apo物镜(Carl Zeiss Microimaging),通过完整的小鼠颅骨在距离颅骨表面高达250 $\mu\text{m}$ 的深度处获得具有细胞细节的图像。将获取多个成像深度,并且将在图像J中执行最大强度z投影以合并图像。将使用氩激光器的488nm谱线激发绿色荧光蛋白(GFP)。使用用633nm激光激发的Evans Blue (Sigma-Aldrich, 圣路易斯, 密苏里州)对血管进行成像。Zeiss内部共焦Quasar探测器将收集发射信号。

[0406] 实施例4表达CD38 CAR的NK细胞对多发性骨髓瘤的体内功效

[0407] 用高、中和低亲和力的CD38 CAR转导KHYG-1细胞

[0408] 产生具有不同亲和力(高、中和低)的靶向结构域的第二代CD38 CAR构建体。CAR还包含CD3 $\delta$ 和4-1BB共刺激结构域,并通过2A序列与作为转导标记隔开的 $\Delta$ NGFR(将用于追踪CAR转导的细胞的标记基因)连接。不同亲和力的CD38 CAR将作为慢病毒或逆转录病毒构建体产生,因为尚不清楚哪种类型的构建体将更好地转导KHYG-1细胞。我们将使用衍生自SEQ ID NO:1-6的CAR靶向结构域的序列。根据我们解决该问题的先导实验的结果,我们将用不同的CD38 CAR构建体转导KHYG-1细胞并选择以获得高纯度从而测试它们对多发性骨髓瘤(MM)细胞系的功能效力,如下所述。

[0409] 在功能测试阶段,我们将在第0天、第1、3和6周(扩增结束时)监测CAR转导的KHYG-1细胞的增殖和扩增(细胞计数),CD16、CD56、CD3、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR3DL1和NKG2A表达。还将研究凋亡标记物膜联蛋白-V的表达。另一个重要的表型参数是CD38的表达,因为我们观察到CAR T细胞不表达CD38,尽管它们处于激活状态。我们随后将评估CAR T细胞针对CD38+MM细胞的CD38依赖性增殖和细胞因子( $\text{IFN } \gamma$  和 $\text{TNF } \alpha$ )分泌能力(CFSE检测)。基于BLI的细胞毒性检测将用于测量CD38 CAR NK细胞对各种荧光素酶转导的MM细胞系的细胞毒活性。我们还将使用NK细胞敏感的K562细胞系作为靶细胞。

[0410] 通过使用流式细胞术分析  $\Delta$  NGFR阳性CAR NK细胞表面上CD107a的上调,分析用UM9(高CD38)和U266(CD38阴性)刺激后NK细胞的CD38依赖性脱粒。如前面所述,使用来自患者的BMMNC,在基于FACS的细胞毒性检测中评估针对原代MM细胞的细胞毒性反应性。简而言之,将CD38 CAR NK细胞与含有5-50%MM细胞的BMMNC以不同的效应物与靶标比共培养。在24至48小时之后,通过使用定量流式细胞术对CD138阳性浆细胞进行计数来评估MM细胞的存活。如前面所述,将根据这些存活数据推导出细胞毒活性。

[0411] 在该研究阶段,确定针对非恶性CD38阳性造血细胞的反应性也是重要的。这将通过使用健康个体或患者的PBMC或BMMNC的基于FACS的细胞毒性检测来评估。将CD38 CAR NK细胞与PBMC或BMMNC共温育24至48小时后,在单平台定量FACS分析中确定非恶性造血细胞(包括CD34+造血祖细胞(仅在BMMNC样品中)、CD3+T细胞、CD14+单核细胞、CD56+NK细胞、CD19/20+B细胞)的存活。在所有这些检测中, mock-载体转导的NK细胞将用作阴性对照,早期构建的CD38 CART细胞将用作阳性对照。

[0412] 用TRAIL变体 (TRAIL<sub>v</sub>) 和TRAIL野生型 (TRAIL<sub>wt</sub>) 转导最优的CD38 CAR NK-92细胞。

[0413] 用TRAIL<sub>v</sub>和TRAIL<sub>wt</sub>转导最优的CD38 CAR KHYG-1细胞

[0414] 选择在不影响正常CD38+细胞的情况下最能杀死MM细胞的CD38CAR NK细胞,并进一步用野生型TRAIL和TRAIL变体构建体转导。在与上述类似的设置中,将针对DR5+CD38+、DR5+CD38-、DR5-CD38+、DR5-、CD38-MM细胞系测试这些细胞,以比较它们的CD38和DR-5依赖性细胞毒活性并比较它们的靶细胞特异性。还将研究原代MM细胞对这些细胞的易感性。为了产生可诱导的TRAIL<sub>v</sub>构建体,我们将在最小(m) CMV启动子和NFAT转录应答元件(TRE)的串联重复的控制下,在复制缺陷型VSV-g假型自失活慢病毒构建体中克隆TRAIL<sub>v</sub>基因。通过这种方式,我们将能够在CAR触发时快速诱导TRAIL<sub>v</sub>,其在NFAT控制下诱导基因表达。因此,在CAR触发后,CD38结构域激活NFAT,然后NFAT诱导TRAIL<sub>v</sub>的快速转录和随后的表达。首先评估所产生的细胞的CD38 CAR依赖性TRAIL<sub>v</sub>表达。在研究了这种诱导型基因的开/关动力学后,将在与上述类似的设置中研究细胞杀死DR5+CD38+、DR5+CD38-、DR5-CD38+、DR5-、CD38-MM细胞系和原代MM细胞的能力。

[0415] 评估最佳CD38 CAR体内抗MM功效以及辨别MM与正常造血细胞的能力

[0416] 在该阶段,我们将确定体外功能最佳的CD38 CAR NK细胞的体内安全性和抗MM功效。用最佳CD38 CAR (和TRAIL<sub>v</sub>) 转导的NK细胞的体内活性将在我们最近开发的基于Rag2-/-  $\gamma$  c-/-的异种移植模型中进行评估,在该模型中,人MM肿瘤在人源化微环境中生长,该环境是通过皮下接种涂有人骨髓来源的MSC的支架而产生的。简而言之,在该模型中,将在人源化BM微环境中构建CD38阳性UM-9和CD38阴性U266MM肿瘤。在通过BLI证明在人源化支架中植入MM肿瘤后(通常在接种后1-2周),将用iCasp9-CD38 CAR NK细胞治疗小鼠。细胞将以递增剂量进行静脉注射或支架内注射(静脉注射总剂量为3、6和30 $\times 10^6$ 个细胞/小鼠;支架内注射为1、5、3、9 $\times 10^6$ 个细胞)。将总的CAR NK细胞剂量分成三份,每份剂量以一周的间隔施用。将通过BLI监测肿瘤负荷。 mock转导的NK细胞和CD38 CART细胞将分别用作阴性对照和阳性对照。

[0417] 实施例5通过CD38 CAR NK细胞受体进行的多发性骨髓瘤治疗方案

[0418] 如上所述,CD38 CAR NK细胞可以施用于患有不同类型癌症的个体。制作了以下方

案用于治疗多发性骨髓瘤患者。在诊断患者患有CD38阳性癌症(例如多发性骨髓瘤)后,在施用于患者之前,可以解冻和培养一部分经修饰的NK细胞。或者,如本文所述,可以使用携带编码CD38 CAR的多核苷酸的慢病毒或用编码CAR的mRNA进行电穿孔来进行瞬时转染。对于电穿孔,MaxCyte Flow Electroporation平台提供了一种合适的解决方案,可在临床中实现快速大规模转染。在转染表达CD38 CAR的NK细胞后,进行培养以表达CAR,然后静脉注射施用于患者。

[0419] 实施例6表达TRAIL变体的NK细胞对多发性骨髓瘤和急性髓性白血病的体外功效

[0420] 多发性骨髓瘤(MM)、急性髓性白血病(AML)和肾细胞癌(RCC)是使人衰弱且常常致命的恶性肿瘤。通过包括NK细胞TRAIL在内的多种效应途径,RCC、MM和AML对NK细胞的细胞毒性敏感。用硼替佐米治疗恶性细胞可上调许多恶性肿瘤中的DR5表达,并增强其对TRAIL介导的细胞凋亡的易感性。重要的是,使用EBV-LCL体外扩增的NK细胞明显上调了TRAIL的表面表达,进一步增强NK细胞介导的对暴露于硼替佐米的肿瘤的杀伤作用。因此,对NK细胞进行基因修饰以表达全长突变的DR5特异性TRAIL变体可以增强NK细胞的肿瘤特异性细胞毒性,而与颗粒介导的细胞毒性无关。此外,预测暴露于上调DR5的硼替佐米的肿瘤对这些基因修饰的NK细胞的杀伤会变得非常敏感。

[0421] 体外实验计划

[0422] 将检测经基因修饰以表达DR-5特异性重组TRAIL(rhTRAIL D269H/E195R)的体外扩增的NK细胞(使用GMP条件和SMI-LCL饲养细胞系扩增的NK细胞),以观察它们是否能在体外增强针对RCC、AML和MM肿瘤靶标的NK细胞介导的杀伤作用,此外,是否可以通过用硼替佐米预处理肿瘤靶标来改善肿瘤杀伤作用。肿瘤细胞毒性实验将在体外进行,使用铬释放分析(CRA)和NK细胞脱粒分析(CD107a),用体外扩增的NK细胞对抗一组已知表达DR-5的肿瘤细胞系,可用硼替佐米处理来上调DR-5。为了鉴别在NK细胞群之间NK细胞肿瘤杀伤作用是否受到不同影响,将进行使用不同的NK细胞制剂的肿瘤细胞毒性检测。所述细胞群包括:a)新分离的NK细胞;b) IL-2过夜激活的NK细胞;c)使用EBV-LCL饲养细胞进行了14天体外扩增的NK细胞;d)使用Maxcyte GT系统mRNA电穿孔且进行了14天体外扩增的NK细胞,以表达DR-5特异性重组TRAIL;e)使用慢病毒载体(LV)转导且进行了14天体外扩增的NK细胞,以表达DR-5特异性重组TRAIL。

[0423] 将测试各种转导MOI以优化TRAIL表面表达。目标是:a)确定NK细胞转导后4周内TRAIL表面表达的动力学(体外);b)确定NK细胞转导后多个时段内通过TRAIL的NK细胞肿瘤杀伤的动力学;c)评估DR-5特异性TRAIL转导对NK细胞的表型、细胞因子分泌潜能和功能性细胞毒性的影响;评估DR-5特异性TRAIL转导对体外NK细胞增殖的影响;和d)评估DR-5特异性TRAIL转导对NK细胞活力的影响

[0424] 将测试各种浓度的编码DR-5特异性重组TRAIL的mRNA以优化NK细胞的转染从而表达重组TRAIL(体外)。目标是:a)确定mRNA转染后4-7天重组TRAIL表达的动力学;b)将TRAIL表达的动力学与用编码表面表达的CD34的mRNA转染的NK细胞作为对照进行比较;c)确定用DR-5重组TRAIL转染NK细胞一周后通过TRAIL的NK细胞肿瘤杀伤的动力学;d)评估DR-5特异性TRAIL mRNA转染对NK细胞的表型、细胞因子分泌潜能和功能性细胞毒性的影响;e)评估DR-5特异性TRAIL mRNA转染对体外NK细胞增殖的影响;和f)评估DR-5特异性TRAIL mRNA转染对NK细胞活力的影响。我们还将使NK细胞(经基因操纵的与野生型)靶向用硼替佐米预处

理以上调DR5受体的肿瘤表面表达的RCC、MM和AML肿瘤靶标+/-。

[0425] 体内实验计划

[0426] 接下来,将检测经基因修饰以表达DR-5特异性重组TRAIL的体外扩增的NK细胞,以观察它们是否能在体内增强针对RCC、AML和MM肿瘤靶标的NK细胞杀伤作用。将经基因修饰以表达DR-5特异性重组TRAIL的体外扩增的NK细胞过继注入携带MM1S肿瘤的小鼠(NSG)中,以使用生物发光成像(BLI)比较未处理的和经处理的小鼠的结果。条件包括新鲜的、IL-2活化的和扩增的NK细胞以及通过病毒转导和mRNA转染经基因修饰以表达DR-5特异性重组TRAIL的扩增的NK细胞。将在带有SAUJ-Luc的RCC和携带MOLM14-Luc肿瘤的小鼠的AML中评估同样的方法。荧光素酶转导的肿瘤靶标使我们能够使用BLI成像来评估这些模型中的肿瘤负荷。

[0427] 将研究治疗的时机是否会影响结果。在mRNA转染后立即输注NK细胞,相对于在mRNA转染后延迟输注NK细胞直至TRAIL的表面表达达到峰值。还将研究外源IL-2和/或IL-15施用对体内NK细胞肿瘤杀伤作用的影响。将研究用硼替佐米预处理动物对经基因修饰以表达重组DR-5特异性TRAIL的NK细胞的肿瘤杀伤作用的影响。我们还将评估MM和AML中的上述体内实验,其中体外扩增的NK细胞经遗传修饰以使用扩增的NK细胞群表达DR-5,所述NK细胞群已经历过以下操作:a)基因修饰;b)培养修饰;或c)体外操作以改善到骨髓的归巢。

[0428] 实施例7抑制性受体功能的敲除

[0429] CRISPR/Cas9

[0430] 如下制备抑制性受体功能已被去除的细胞。设计并制备gRNA构建体以靶向NK细胞的人基因组中编码“经典”抑制性受体LIR2和“检查点”抑制性受体CTLA4的基因。然后使用CRISPR/Cas9基因组编辑来敲除LIR2和CTLA4靶基因。

[0431] 针对每种靶基因选择两种gRNA候选物,并测定它们在K562细胞中的切割功效。gRNA候选物的序列示于表1中。

表 1. gRNA 候选物和序列		
基因	质粒名称	序列
hLIR2	SM682.LIR2.g9	GAGTCACAGGTGGCATTGCGG (SEQ ID NO: 24)
	SM682.LIR2.g18	CGAATCGCAGGTGGTCGCACAGG (SEQ ID NO: 25)
hCTLA4	SM683.CTLA4.g7	CACTCACCTTTGCAGAAGACAGG (SEQ ID NO: 26)
	SM683.CTLA4.g15	CCTTGCGCCGCTGAAATCCAAGG (SEQ ID NO: 27)

[0433] 用制备的gRNA构建体转染K562细胞(图5),随后收集K562细胞用于PCR扩增。GFP表达的存在用于报告gRNA构建体成功掺入K562细胞中。这证实了Cas9基因的表达,因此具有敲除LIR2和CTLA4基因的表达的能力。使用体外错配检测测定法测定gRNA构建体的切割活

性。T7E1内切核酸酶I识别并切割非完全匹配的DNA,使得能够将亲本LIR2和CTLA4基因与CRISPR/Cas9转染和非同源末端连接(NHEJ)后的突变基因进行比较。

[0434] 图6示出了在用g9和g18gRNA序列敲除LIR2基因后琼脂糖凝胶电泳后得到的条带。与每个突变相对应的三个条带与亲本基因(601)和在检测到转染后DNA序列中的错配后产生的两条链(602和603)有关。g9gRNA序列得到11%的转染成功率,而g18gRNA得到10%的转染成功率。

[0435] 图7示出了在用g7和g15gRNA序列敲除CTLA4基因后琼脂糖凝胶电泳后得到的条带。701表示亲本条带,702和703表示错配检测后得到的两个条带。g7gRNA序列得到32%的转染成功率,而g15gRNA得到26%的转染成功率。

[0436] 在K562细胞中成功敲除LIR2和CTLA4后,用gRNA构建体转染KHYG-1细胞。选择具有纯合缺失的KHYG-1衍生克隆。为此目的使用Cas9/嘌呤霉素乙酰转移酶(PAC)表达载体。基于细胞对抗生素嘌呤霉素的抗性,选择成功转染的细胞。

#### [0437] Cas9RNP

[0438] 用于敲除NK细胞中检查点抑制性受体的另一种方案是Cas9RNP转染的方案。使用该方案的一个优点是与使用CRISPR/Cas9方案的DNA质粒相比,可实现相似的转染效率,但毒性明显降低。每次转染实验收集 $1 \times 10^6$ 个KHYG1细胞。用PBS洗涤细胞并在离心机中离心。然后弃去上清液。然后如下所述制备CRISPR RNP(RNA结合蛋白)材料:(1)制备20 $\mu$ M所需的合成的crRNA和tRNA(购自Dharmacon)的溶液;(2)将4 $\mu$ l crRNA(20 $\mu$ M)和4 $\mu$ l tRNA(20 $\mu$ M)混合在一起;(3)然后将混合物加入2 $\mu$ l Cas9蛋白(5 $\mu$ g/ $\mu$ l)中;(4)将所有组分混合并在室温下温育10分钟。遵照Neon®转染系统,将细胞与Cas9RNP混合,并使用以下参数进行电穿孔:电压:1450v;脉冲宽度,30ms;脉冲数:1。然后将细胞转移到含有生长培养基(包括IL-2和IL-15)的12孔板的一个孔中。48-72小时后收集细胞,以通过T7核酸内切酶测定和/或Sanger测序确定基因编辑效率。证实了插入缺失(indel)的存在,表明在KHYG1细胞中成功敲除了CTLA4、PD1和CD96。

#### [0439] 位点特异性核酸酶

[0440] 用于敲除NK细胞中的检查点抑制性受体的另一种方案是XTN TALEN转染的方案。使用该方案的优点是野生型CRISPR相比可实现特别高水平的特异性

#### [0441] 步骤1:制备试剂

[0442] 测定KHYG-1细胞的某些属性,包括转染效率、单细胞克隆效率和核型/拷贝数。然后根据供应商的建议培养细胞。根据被敲除的检查点抑制性受体,通过定制设计至少2对XTN TALEN来制备核酸酶。定制设计的步骤包括评估基因位点、拷贝数和功能评估(即同系物,脱靶评估)。

#### [0443] 第2步:细胞系工程化

[0444] 用步骤1的核酸酶转染细胞;该步骤重复最多3次以获得高水平的切割,并且在每次转染之前分离培养物并保持中间培养物。每次转染后过几天进行初步筛选;通过Ce1-1测定法测试细胞池的切割效率。在重复转染后切割水平达到可接受的水平或稳定状态后,认为细胞已准备好进行单细胞克隆。将合并的细胞在96孔板中分选为每孔一个细胞;每个池的平板数取决于步骤1中测定的单细胞克隆效率。平板培养3-4周。

#### [0445] 第3步:筛选和扩增

[0446] 一旦细胞在96孔板中汇合,将培养物合并并分入96孔板中,一式三份;将一个平板冷冻作为备用,重新铺板一个平板以继续扩增克隆,并将最后一个平板用于基因型确认。分析基因型板中的每个克隆的qPCR信号缺失(表明所有等位基因都已被修饰)。对阴性克隆进行PCR扩增和克隆以确定插入缺失的性质以及缺乏任何野生型或框内插入缺失(in-frame indel)。将确认敲除的克隆合并到不超过一个24孔板中并进一步扩增;通常5-10个冷冻小瓶,每个小瓶含有 $1 \times 10^6$ 个细胞,每次敲除产生最多5个单独的克隆。

[0447] 第4步:验证

[0448] 细胞在无菌条件下储存。所有储存细胞的基本放行标准包括活细胞数(冷冻前和解冻后)、通过STR确认的同一性、保证基本无菌和支原体检测;必要时应用其他放行标准(核型、表面标志物表达、高水平无菌,转录物或蛋白的敲除评估等)。

[0449] 实施例8通过RNAi敲低检查点抑制性受体CD96功能

[0450] 通过电穿孔进行KHYG-1细胞中CD96的siRNA敲低。Nucleofection试剂盒与购自龙沙(Lonza)的Amaxa Nucleofector II一起使用,因为Amaxa Nucleofector II适合与细胞系一起使用,并且可以成功转染分裂和非分裂细胞,并实现高达90%的转染效率。对照siRNA(目录号:sc-37007)和CD96 siRNA(目录号:sc-45460)购自Santa Cruz Biotechnology。含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺的无抗生素RPMI-1640用于核转染后培养。从Biolegend购得小鼠抗人CD96-APC(目录号:338409)用于染色。

[0451] 制备20 $\mu$ M的siRNA原液。对于FITC-对照/对照-siRNA,将冻干siRNA双链体重悬于33 $\mu$ l不含RNA酶的水(siRNA稀释缓冲液:sc-29527),对于靶基因siRNA(siRNA CD96),将冻干的siRNA双链体重悬于165 $\mu$ l不含RNA酶的水。将管加热至90 $^{\circ}$ C保持1分钟,然后在37 $^{\circ}$ C下温育60分钟。然后在-20 $^{\circ}$ C储存siRNA原液直至需要时。

[0452] 由于细胞必须处于对数生长期,因此在核转染前一至两天将KHYG-1细胞传代。将Nucleofector溶液温热至室温(每个样品100 $\mu$ l)。将一份含有血清和补充剂的培养基也在37 $^{\circ}$ C下在50ml管中预热。通过加入1.5ml含有血清和补充物的培养基来制备6孔板。将板在加湿的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中预温育。将100 $\mu$ l核转染溶液中的 $2 \times 10^6$ 个细胞与4 $\mu$ l 20 $\mu$ M siRNA溶液(1.5 $\mu$ g siRNA)轻轻混合。混合期间避免气泡。将混合物转移到经Amaxa认证的比色皿中并置于Nucleofector比色皿支架中,选择程序U-001。使程序完成,并立即取出比色皿中的样品。然后将500 $\mu$ l预平衡的培养基加入每个比色皿中。然后将每个比色皿中的样品轻轻转移到已制备的6孔板的相应孔中,以确立每孔2ml的最终体积。然后将细胞在加湿的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中温育直至进行转染分析。在电穿孔后16-24小时进行流式细胞术分析,以测量CD96表达水平。该电穿孔方案进行多次。图8A和图8B示出了该方案与用对照siRNA转染的KHYG-1细胞802(8A中的平均荧光强度为2409;8B中的为3002)相比产生可靠的CD96敲低801(8A中的平均荧光强度为1107;8B中的为810)。同种型由800 802表示(8A中的平均荧光强度为90;8B中的为76)。

[0453] 实施例9具有CD96敲低的NK细胞的增强的细胞毒性

[0454] 将具有和不具有敲低的CD96的KHYG-1细胞与K562细胞以不同的效应物:靶标(E:T)比进行共培养。共培养后4小时,使用PerkinElmer的DELFI A EuTDA细胞毒性试剂盒(目录号:AD0116)测量细胞毒性。在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和抗生素的RPMI-1640培养基中培养靶细胞K562。从SARSTEDT购买96孔V-底板(目录号:83.3926)。使用Eppendorf离心机

5810R (带有板转子) 使板旋转。使用VARIOSKAN FLASH (使用ScanIt软件2.4.3) 测量裂解的K562细胞产生的荧光信号。用培养基洗涤K562细胞, 用培养基将细胞数调整至 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。将2-4mL细胞加入5 $\mu$ l BATDA试剂中并在37℃下温育10分钟。在细胞内, 酯键被水解形成亲水配体, 其不再通过膜。将细胞以1500rpm离心5分钟以洗涤加载的K562细胞。用含有1mM丙磺舒(Sigma P8761)的培养基重复3-5次。最后一次洗涤后, 将细胞沉淀重悬于培养基中并调整至约 $5 \times 10^4$ 个细胞/mL。设置孔用于检测背景、自发释放和最大释放。将100 $\mu$ L加载的靶细胞(5,000个细胞)转移至V-底板中的孔中, 并以不同的细胞浓度加入100 $\mu$ L效应细胞(KHYG-1细胞), 以产生范围为1:1-20:1的效应物与靶标比。将板以 $100 \times g$ 离心1分钟, 并在加湿的5%CO<sub>2</sub>气氛中于37℃温育4小时。对于最大释放孔, 在收集培养基前15分钟向每个孔中加入10 $\mu$ L裂解缓冲液。将板以 $500 \times g$ 离心5分钟。将20 $\mu$ L上清液转移至平底96孔板中, 加入200 $\mu$ L预热过的铈溶液。使用板振荡器将其在室温下温育15分钟。当K562细胞被KHYG-1细胞裂解时, 它们将配体释放到培养基中。然后该配体与铈溶液反应形成荧光螯合物, 其与裂解细胞的量直接相关。然后通过使用VARIOSKAN FLASH在时间分辨荧光计中测量荧光。使用以下公式计算特异性释放: %特异性释放 = 实验释放 - 自发释放 / 最大释放 - 自发释放。使用Graphpad Prism 6.04软件进行统计学分析。使用配对t检验比较siRNA CD96敲低的KHYG-1细胞和对照组(n=3)之间的差异。发现在含有CD96敲低的KHYG-1细胞的共培养物中特异性释放明显增加。所有E:T比都是这种情况(见图9)。由于荧光与细胞裂解直接相关, 因此证实敲低KHYG-1细胞中的CD96表达导致其杀死K562癌症靶细胞的能力增加。

[0455] 实施例10具有敲低的CD328(Siglec-7)的NK细胞的增强的细胞毒性

[0456] NK-92细胞中SiRNA介导的CD328的敲低

[0457] 材料、试剂和仪器

[0458] 对照siRNA(目录号:sc-37007)和CD328siRNA(目录号:sc-106757)购自Santa Cruz Biotechnology。为了使用Nucleofector™装置(Nucleofector II, Lonza)在NK-92细胞中实现高达90%的高细胞活力(>75%)的转染效率, 使用购自Lonza的Nucleofector™试剂盒T。使用含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺, 不含抗生素的RPMI-1640进行核转染后培养。从Biolegend购买小鼠抗人CD328-APC(目录号:339206)。

[0459] 方案

[0460] 制备10 $\mu$ M的siRNA原液。对于FITC-对照/对照-siRNA, 将冻干的siRNA双链体重悬浮于66 $\mu$ l不含RNA酶的水(siRNA稀释缓冲液:sc-29527)中, 对于用于靶基因siRNA(siRNA CD328), 将冻干的siRNA双链体重悬浮于330 $\mu$ l不含RNA酶的水中。将管加热至90℃保持1分钟。在37℃下温育60分钟。如果不直接使用, 将siRNA原液在-20℃下储存。一个核转染样品包含(对于100 $\mu$ l标准比色皿): 细胞数: $2 \times 10^6$ 个细胞, siRNA:4 $\mu$ l 10 $\mu$ M原液, Nucleofector溶液:100 $\mu$ l。

[0461] 核转染

[0462] 培养所需数量的细胞。(在核转染前一天或两天传代, 细胞必须处于对数生长期)。为每个样品准备siRNA。将Nucleofector溶液预热至室温(每个样品100 $\mu$ l)。将一份份含有血清和补充剂的培养基在37℃下在50ml管中预热。通过填充含有血清和补充剂的1.5ml培养基制备6孔板, 并将板在加湿的37℃/5%CO<sub>2</sub>培养箱中预温育。取一份细胞培养物并对细胞计数以确定细胞密度。将所需数量的细胞以1500rpm离心5分钟。完全弃去上清液, 使残留

的培养基不会覆盖细胞沉淀。将细胞沉淀重悬于室温Nucleofector溶液中至终浓度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/100 $\mu$ l。避免将细胞悬浮液在Nucleofector溶液中储存超过15-20分钟,因为这会降低细胞活力和基因转移效率。将100 $\mu$ l细胞悬浮液与siRNA混合。将样品转移到Amaxa认证的比色皿中。确保样品覆盖比色皿底部,移液时避免产生气泡。用蓝色盖子盖上比色皿。选择合适的Nucleofector程序(对于NK-92细胞,使用A-024)。将比色皿插入比色皿支架(Nucleofector II:将转盘顺时针旋转到最终位置),按下“x”按钮启动程序。为避免损伤细胞,在程序完成后(显示“OK”)立即从比色皿中取出样品。将500 $\mu$ l预热的培养基加入比色皿中,并将样品转移到准备好的6孔板中。将细胞在加湿的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中温育。16-24小时后进行流式细胞术分析和细胞毒性测定。

#### [0463] 结果

[0464] 我们遵循上述方案并对NK-92细胞中的CD328表达水平进行流式细胞术分析。一个代表性实验的结果示于图10中,证实成功的敲低(对照siRNA 1001的平均荧光强度为3048;CD328siRNA 1002的为679)。

#### [0465] 敲低CD328可增强细胞毒性

##### [0466] 材料、试剂和仪器

[0467] 基于荧光增强配体(目录号:AD0116)的DELFI A EuTDA细胞毒性试剂盒购自PerkinElmer。在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和抗生素的RPMI-1640培养基中培养靶细胞K562。从SARSTEDT购买96孔V-底板(目录号:83.3926)。使用Eppendorf离心机5810R(带有板转子)使板旋转。使用VARIOSKAN FLASH(使用ScanIt软件2.4.3)测量裂解的K562细胞产生的荧光信号。

##### [0468] 方案

[0469] 用荧光增强配体DELFI A BATDA试剂加载靶K562细胞,用培养基洗涤K562细胞,用培养基将细胞数调整至 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。将2-4mL细胞加入5 $\mu$ l BATDA试剂中,37 $^{\circ}$ C下温育10分钟。以1500rpm旋转5分钟,用含有1mM丙磺舒(Sigma P8761)的培养基洗涤加载的K562细胞3-5次。最后一次洗涤后,将细胞沉淀重悬于培养基中并调整至约 $5 \times 10^4$ 个细胞/mL。

##### [0470] 细胞毒性测定

[0471] 设置孔用于检测背景、自发释放和最大释放。将100 $\mu$ L加载的靶细胞(5,000个细胞)转移至V-底板。加入100 $\mu$ L不同细胞浓度的效应细胞(NK-92)。效应物与靶标比范围为1:1-20:1。在100 $\times$ g RCF(相对离心力)下将板旋转1分钟。在加湿的5%CO<sub>2</sub>气氛中于37 $^{\circ}$ C温育2小时。对于最大释放孔,在收获培养基前15分钟向每个孔中加入10 $\mu$ L裂解缓冲液。将板以500 $\times$ g旋转5分钟。将20 $\mu$ L上清液转移至平底96孔板,加入200 $\mu$ L预热的铕溶液,使用板振荡器在室温下温育15分钟。使用VARIOSKAN FLASH在时间分辨荧光计中测量荧光。使用以下公式计算特异性释放:%特异性释放=实验释放-自发释放/最大释放-自发释放。

#### [0472] 结果

[0473] 我们按照以上所述确定了CD328敲低对细胞毒性的影响。一个代表性实验的结果示于图11中。如图所示,在具有CD328敲低的细胞中,针对靶细胞的细胞毒性增加。

##### [0474] 实施例11通过敲低/敲除检查点抑制性受体进行的血癌治疗方案

[0475] 如以上实施例中所证明的,可以以多种方式敲低或敲除检查点抑制性受体功能。制作以下方案用于治疗患有血癌的患者:在诊断患有适合用本发明治疗的癌症的患者后,



可以在施用于患者之前将一份经修饰的NK细胞解冻并进行培养。或者,如上所述,可以使用例如siRNA,在一天或两天内进行瞬时突变。MaxCyte流式电穿孔平台为在临床实现快速大规模转染提供了合适的解决方案。去除某些检查点抑制性受体可能比去除其他受体更有益。这取决于患者和癌症。出于这个原因,对癌症任选地进行活组织检查,并且使癌细胞在体外培养中生长。因此可以测试具有不同检查点抑制性受体修饰的一系列NK细胞对特定癌症的细胞毒性。该步骤可用于选择最合适的NK细胞或其衍生物用于治疗。在成功修饰后,将细胞重悬于合适的载体(例如盐水)中,用于静脉内和/或肿瘤内注射到患者体内。

[0476] 实施例12TRAIL/TRAIL变体的KAILG-1敲入

[0477] 用TRAIL和TRAIL变体转染KHYG-1细胞,以评估它们在转染后的存活力和杀死癌细胞的能力。使用的TRAIL变体是WO 2009/077857中描述的变体。它由含有D269H/E195R突变的野生型TRAIL基因编码。该突变明显增加TRAIL变体对DR5的亲合力,同时降低对两种诱饵受体(DcR1和DcR2)的亲合力。

[0478] 基线TRAIL表达

[0479] 使用流式细胞术测定KHYG-1细胞中的基线TRAIL (CD253) 表达。使用小鼠抗人CD253-APC (Biolegend目录号:308210) 和同种型对照 (Biolegend目录号:400122) 对细胞样品进行染色,并在BD FACS Canto II流式细胞仪上分析。在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、青霉素(100U/mL)/链霉素(100mg/mL) 和IL-2(10ng/mL)的RPMI 1640培养基中培养KHYG-1细胞。离心(1500rpm×5分钟)收集 $0.5-1.0 \times 10^6$ 个细胞/测试,吸出上清液。用4mL冰冷的FACS缓冲液(PBS、0.5-1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>叠氮化钠)洗涤细胞(单细胞悬浮液)。将细胞重悬于100μL冰冷的FACS缓冲液中,向每个管中加入5μL抗体并在冰上温育30分钟。通过以1500rpm离心5分钟洗涤细胞3次。然后将细胞重悬于500μL冰冷的FACS缓冲液中并暂时在黑暗中于冰上保存。随后在流式细胞仪(BD FACS Canto II)上分析细胞,并使用FlowJo 7.6.2软件处理产生的数据。如图12中可见,FACS分析显示TRAIL在KHYG-1细胞表面上的弱基线表达。

[0480] 通过电穿孔进行TRAIL/TRAIL变体敲入

[0481] 由TriLink BioTechnologies合成野生型TRAIL mRNA和TRAIL变体(D269H/195R) mRNA,等分并在-80℃下储存。小鼠抗人CD253-APC (Biolegend目录号:308210) 和同种型对照 (Biolegend目录号:400122) 以及小鼠抗人CD107a-PE (eBioscience目录号:12-1079-42) 和同种型对照 (eBioscience目录号:12-4714) 抗体用于对细胞样品进行染色,并在BD FACS Canto II流式细胞仪上分析。使用DNA染料SYTOX-绿 (Life Technologies目录号:S7020; 5mM DMSO溶液)。为了使用Nucleofector™装置(Nucleofector II, Lonza) 在KHYG-1细胞中实现高达90%的高细胞活力的转染效率,使用购自Lonza的Nucleofector™试剂盒T。使用含有10%FBS、L-谷氨酰胺(2mM) 和IL-2(10ng/mL) 的不含抗生素的RPMI 1640进行核转染后培养。

[0482] 由于细胞必须处于对数生长期,因此在核转染前一天或两天将KHYG-1细胞和NK-92细胞传代。将Nucleofector溶液预热至室温(每个样品100μl),将一份含有血清和补充剂的培养基也在37℃下在50mL管中预热。通过填充含有血清和补充物的1.5mL培养基制备6孔板,并将板在加湿的37℃/5%CO<sub>2</sub>培养箱中预温育。制备一份细胞培养物并对细胞计数以确定细胞密度。将所需数量的细胞以1500rpm离心5分钟,然后完全弃去上清液。将细胞沉淀

重悬于室温Nucleofector溶液中至终浓度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/100 $\mu$ l (悬浮液中的最长时间=20分钟)。将100 $\mu$ l细胞悬浮液与10 $\mu$ g mRNA (RNA体积<10 $\mu$ L) 混合。将样品转移到经Amaza认证的比色皿中(确保样品覆盖在比色皿的底部并避免气泡)。选择合适的Nucleofector程序(即对于KHYG-1细胞,使用U-001)。然后将比色皿插入比色皿支架中。将500 $\mu$ l预热的培养基加入到比色皿中,并在程序完成后立即将样品转移到准备好的6孔板中,以避免对细胞的损伤。将细胞在加湿的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中温育。在电穿孔后12-16小时进行流式细胞术分析和细胞毒性测定。如上进行流式细胞术染色。如图13和图14所示,TRAIL/TRAIL变体和CD107a(NK活化标记物)的表达在转染后增加,证实TRAIL基因成功敲入KHYG-1细胞。

[0483] 图15提供了通过电穿孔转染之前和之后KHYG-1细胞活力的证据。可以看出,在用TRAIL/TRAIL变体转染细胞后,未观察到细胞活力的统计学显著差异,证实野生型或变体TRAIL的表达对细胞无毒。该观察结果与NK-92细胞中的相应发现相矛盾,所述相应发现表明TRAIL变体基因敲入对NK-92细胞有毒(未示出数据)。然而,这可能通过NK-92细胞表面上TRAIL受体DR4和DR5的相对高表达水平来解释(参见图16)。

#### [0484] TRAIL/TRAIL变体对KHYG-1细胞的细胞毒性的影响

[0485] 使用小鼠抗人CD2-APC抗体(BD Pharmingen目录号:560642)。使用膜联蛋白V-FITC抗体(ImmunoTools目录号:31490013)。使用DNA染料SYTOX-绿(Life Technologies目录号:S7020)。使用24孔细胞培养板(SARSTEDT AG目录号:83.3922)。将髓性白血病细胞系K562、多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226和MM1.S用作靶细胞。将K562、RPMI8226、MM1.S在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和青霉素(100U/mL)/链霉素(100mg/mL)的RPMI 1640培养基中培养。如上所述,用TRAIL/TRAIL变体转染KHYG-1细胞。洗涤靶细胞并通过以1500rpm离心5分钟进行沉淀。将转染的KHYG-1细胞稀释至 $0.5 \times 10^6$ /mL。然后在预热的RPMI 1640培养基中调整靶细胞密度,以产生1:1的效应物:靶标(E:T)比。然后将0.5mL KHYG-1细胞和0.5mL靶细胞在24孔培养板中混合,并于加湿的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中放置12小时。然后使用流式细胞术分析来测定KHYG-1细胞的细胞毒性;洗涤共培养的细胞(在不同时间点),然后使用膜联蛋白V结合缓冲液用CD2-APC抗体(5 $\mu$ L/测试)、膜联蛋白V-FITC(5 $\mu$ L/测试)和SYTOX-绿(5 $\mu$ L/测试)染色。使用FlowJo 7.6.2软件进一步分析数据。设置CD2阳性门控(gate)和CD2阴性门控,其分别代表KHYG-1细胞群和靶细胞群。然后分析CD2阴性群中的膜联蛋白V-FITC和SYTOX-Green阳性细胞的TRAIL诱导的细胞凋亡。

[0486] 图17、图18和图19示出了表达TRAIL或TRAIL变体的KHYG-1细胞对三种靶细胞系的凋亡的影响:K562(图17),RPMI8226(图18)和MM1.S(图19)。对于所有靶细胞群而言,与正常KHYG-1细胞(未用TRAIL转染)相比,KHYG-1细胞上的TRAIL表达增加细胞凋亡的水平是显而易见的。此外,与用野生型TRAIL转染的KHYG-1细胞相比,KHYG-1细胞上的TRAIL变体表达进一步增加了所有靶细胞系中的细胞凋亡。

[0487] 由于对死亡受体DR5表现出更高的亲和力,表达TRAIL变体的本发明的细胞在癌症治疗中提供明显优势。当受到本发明的这些细胞的挑战时,癌细胞被阻止形成通过某种途径规避死亡的防御策略。因此,通过上调TRAIL诱饵受体,癌症不能有效地避免TRAIL诱导的细胞死亡,因为本发明的细胞被修饰,使得它们在那样的情况下保持细胞毒性。

#### [0488] 实施例13使用具有敲入的TRAIL变体的NK细胞进行血癌治疗的方案

[0489] 如上文实施例6中所述,用TRAIL变体转染KHYG-1细胞。制作以下方案用于治疗患

有血癌的患者：

[0490] 在诊断患有适合用本发明治疗的癌症的患者后，在施用经修饰的NK细胞之前施用DR5诱导剂，例如硼替佐米，因此在低剂量下用于上调DR5在癌症上的表达，使得经修饰的NK细胞疗法更有效。然后将一份经修饰的NK细胞解冻，培养并施用于患者。由于用于治疗的NK细胞表达的TRAIL变体与野生型TRAIL相比对诱饵受体的亲和力更低，因此死亡受体在癌细胞表面上的结合增加，因此导致更多的癌细胞凋亡。在实施上述方案之前，另一种选择是活检癌症和体外培养癌细胞。该步骤可用于鉴别表达特别高水平的诱饵受体和/或低水平的死亡受体的那些癌症，以帮助确定DR5诱导剂是否适合于特定患者。该步骤也可以在用上述方案治疗期间进行，因为特定的癌症可能能够适应例如降低其DR5的表达，因此其可能适合于通过疗法半途用DR5诱导剂治疗。

[0491] 实施例14蛋白酶体抑制对NK细胞TRAIL介导的细胞毒性的影响

[0492] 硼替佐米(Bt)是可用于治疗多发性骨髓瘤(MM)的蛋白酶体抑制剂(化疗类药物)。已知硼替佐米能上调几种不同类型的癌细胞(包括MM细胞)上的DR5表达。如上文实施例12中所述，在暴露或不暴露于硼替佐米的情况下，在用于靶向MM细胞之前，用TRAIL变体转染KHYG-1细胞。

[0493] 硼替佐米诱导的DR5表达

[0494] 硼替佐米购自Millennium Pharmaceuticals。从BD Pharmingen购买小鼠抗人DR5-AF647(目录号:565498)。在BD FACS Canto II上分析染色的细胞样品。所涉及的方案：(1) MM细胞系RPMI8226和MM1.S于37℃下在5%CO<sub>2</sub>气氛中，在补充有2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、24mM碳酸氢钠、0.01%的抗生素和10%胎牛血清(Sigma, 圣路易斯, 密苏里州, 美国)的RPMI1640培养基(Sigma, 圣路易斯, 密苏里州, 美国)中生长。(2) 将MM细胞以1×10<sup>6</sup>/mL, 2mL/孔接种于6孔板中。(3) 然后将MM细胞用不同剂量的硼替佐米处理24小时。(4) 然后通过流式细胞术分析硼替佐米处理/未处理的MM细胞中的DR5表达(图20)。如图20所示，发现低剂量硼替佐米处理增加两种MM细胞系中的DR5表达：在RPMI 8226细胞(上图)中，硼替佐米为10nM时，MFI为273至679；在MM1.S细胞(下图)中，硼替佐米为2.5nM时，MFI为214至662。DR5上调与细胞凋亡的轻微诱导相关(数据未示出)。然而，发现高剂量硼替佐米不能上调DR5表达，因为高毒性导致大多数MM细胞死亡。

[0495] 硼替佐米诱导的癌细胞敏感化

[0496] 如上文实施例12中所述，用TRAIL变体(TRAIL D269H/E195R)转染KHYG-1细胞。该方案包括以下步骤(1)将硼替佐米处理/未处理的MM1.S细胞用作靶细胞。用2.5nM硼替佐米(右栏)或载体(左栏)处理MM1.S细胞24小时。(2) TRAIL变体mRNA电穿孔后6小时，将KHYG-1细胞与MM细胞一起在12孔板中培养。洗涤后，将细胞浓度调节至1×10<sup>6</sup>/mL，然后以1:1的比例混合KHYG-1细胞和MM1.S细胞进行12小时的培养。(3) 进行KHYG-1细胞的细胞毒性的流式细胞术分析。收集共培养的细胞，洗涤，然后使用膜联蛋白V结合缓冲液用CD2-APC抗体(5uL/测试)、膜联蛋白V-FITC(5uL/测试)和SYTOX-绿(5uL/测试)染色。(4) 使用FlowJo 7.6.2软件进一步分析数据。CD2阴性群代表MM1.S细胞。KHYG-1细胞对CD2呈强阳性。最后，分析了CD2阴性群中的膜联蛋白V-FITC和SYTOX-Green阳性细胞。在与用/不用TRAIL变体电穿孔的KHYG-1细胞共培养的硼替佐米预处理/未处理的MM1.S细胞中进行细胞凋亡的流式细胞术分析。如图21所示，发现硼替佐米诱导的MM细胞对表达TRAIL变体的KHYG-1细胞的敏

感性(47.9%的杀伤至70.5%的杀伤)远大于对表达野生型TRAIL的细胞的敏感性(41.8%的杀伤至51.4%的杀伤)。因此,该数据表明诱导DR5表达的试剂在增加对癌细胞的细胞毒性方面在模型中是有效的,因此可用于增强本发明的癌症治疗。

[0497] 实施例15CAR构建体的产生

[0498] 在基于pcDNA3.3 (Invitrogen)的载体p33Glf和p33Kappa中分别克隆可变重链和可变轻链编码区。所有低亲和力抗体都是在无血清条件下,通过使用293fectin (Invitrogen)单独共转染来自高亲和力CD38抗体的重链(SEQ ID No 1)(描述于W02011154453和W02006099875中)和来自HEK293F细胞中随机种系轻链表达载体的轻链而产生的,如前所述(Vink et al.2014)。收集不含细胞的上清液,通过Octet IgG定量测定抗体浓度(ForteBio)。与达雷木单抗相比,这种轻链交换产生对CD38具有降低的亲力的抗体(在这种情况下为scFv)。

[0499] 在Octet HTX仪器(ForteBio)上使用生物层干涉测量法测量亲和力并分级。将含有针对CD38的不同重链和轻链组合的人IgG 1型(hIgG1)加载抗人IgG Fc Capture生物传感器(ForteBio)1,000秒。在基线(100秒)后,测定样品稀释剂(ForteBio)中N末端His标记的CD38(His-CD38,100nM)的细胞外结构域的结合(1,000s)和解离(1,000s)。为便于计算,使用基于氨基酸序列的His-CD38的理论分子量,即30.5kDa。在1,000rpm和30℃下振荡的同时进行实验。使用数据分析软件v8.0(ForteBio)使用1:1模型和局部完全拟合分析数据,结合时间为1000s,解离时间为250s。通过减去加载有IgG1-3003-028WT并仅与样品稀释剂一起温育的四个参考生物传感器的平均值来校正数据痕迹(data trace)。将y轴与基线的最后5s对齐,并应用级间校正以及Savitzky-Golay滤波。

[0500] 使用Tecan Evo 200液体处理器以剂量响应的方式在1,536孔微量滴定板中进行人CD38特异性抗体的均相结合测定。用二级多克隆山羊IgG抗人IgG(Fc)-Alexa Fluor 647缀合物(Jackson ImmunoResearch)检测IgG1抗体与瞬时表达人CD38的CHO细胞、CHO wt背景对照和用纯化的生物素化的his-标记的人CD38包被的链霉亲和素珠的结合。同时,还使用单价二级山羊Fab抗人IgG(H+L)-DyLight 649缀合物(Jackson ImmunoResearch)评估IgG1抗体与包被有纯化的生物素化的his-标记的人CD38的链霉亲和素珠的结合。将IgG1样品标准化并在Freestyle 293表达培养基(GIBCO)中稀释。将2mL稀释的样品分别加入到含有200ng/mL IgG缀合物或300ng/mL Fab缀合物的二级缀合物的5mL细胞悬浮液或珠悬浮液中。在FMAT缓冲液(PBS,0.1%BSA和0.02%叠氮化钠)+0.075%普兰尼克F-68中制备细胞悬浮液。在HBB(10mM HEPES[pH 7.4],150mM NaCl,5mM KCl,1mM MgCl<sub>2</sub>,1.8mM CaCl<sub>2</sub>,0.5%BSA和0.01%叠氮化钠+0.075%普兰尼克F-68)中制备珠悬浮液。在室温(RT)下在黑暗中温育8小时后,使用Applied Biosystems 8200细胞检测系统(ThermoFisher Scientific)记录荧光信号,应用50计数截止值。使用ActivityBase软件(IDBS)处理并显现获得的总荧光强度数据。

[0501] 使用含有同源臂的引物(SEQ ID NO:8-22)通过PCR扩增所选的可变轻链B1(SEQ ID NO:23)和可变重链(SEQ ID NO:1),并用Gibson组装(NEB)组合与G4S接头连接的两条链。将产生的scFv克隆到SFG逆转录病毒载体中,接着是CD8a跨膜结构域和下述共刺激结构域中的一个,如Zhao等(2015)中关于T细胞的描述。CAR构建体通过2A序列与截短的NGFR或dsRed序列连接(Kim等2011)。

[0502] 实施例16逆转录病毒颗粒的产生

[0503] 用CAR构建体、gag-pol (pHIT60) 和包膜 (pCOLT-GALV) 载体 (Roche) 转染Phoenix-Ampho包装细胞。转染后2天和3天,收集含有逆转录病毒颗粒的不含细胞的上清液并直接用于转导。

[0504] 在重组人纤维连接蛋白 (retronectin) (Takara) 包被的板上使用旋转接种逆转录病毒转导KHYG-1细胞。16小时后进行第二次转导。转导后72小时,通过流式细胞术测定CD38表达。培养转导的KHYG-1细胞。1周后,用经辐照 (5Gy) 的UM9细胞 (效应物与靶标比 [E:T] 为1:3) 刺激CAR转导的NK细胞或对CAR转导的NK细胞进行功能测试。

[0505] 实施例17来自MM患者和健康个体的原代细胞

[0506] 通过Ficoll-Paque密度离心从MM患者的BM抽吸物中分离含有5%-40%恶性浆细胞的BM-单核细胞 (MNC), 并直接使用或在液氮中冷冻保存直至使用。通过Ficoll-Paque密度离心从健康血库献血者的血沉棕黄层 (Buffy coat) 中分离PBMC/MNC。所有原代样品均经过医学伦理委员会的知情同意和批准后获得。

[0507] 实施例18表达CD38-CAR的NK细胞的增强的细胞毒性

[0508] 具有和不具有针对CD38的低亲和力嵌合抗原受体 (CD38-CAR) 的KHYG-1细胞与UM9细胞以不同的效应物:靶标比 (E:T) 进行共培养。测试了CD38-CAR KHYG-1细胞的三种变体:BBz B1、28z B1和28z BBL B1;这些变体分别对应于共刺激结构域41BB-CD3 $\delta$ 、CD28-CD3 $\delta$  $\alpha$ 和CD28/4-1BB及配体 (41BB=SEQ ID NO:42;CD3 $\delta$ =SEQ ID NO:41;CD28=SEQ ID NO:43)。

[0509] 使用购自PerkinElmer的DELFLIA EuTDA细胞毒性试剂盒 (目录号:AD0116) 在共培养后4小时测量细胞毒性。在含有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和抗生素的RPMI-1640培养基中培养靶细胞UM9。从SARSTEDT购买96孔V-底板 (目录号:83.3926)。使用Eppendorf离心机5810R (带有板转子) 使板旋转。使用VARIOSKAN FLASH (使用ScanIt软件2.4.3) 测量裂解的UM9细胞产生的荧光信号。用培养基洗涤UM9细胞,用培养基将细胞数调节至 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。将2-4mL细胞加入5 $\mu$ L BATDA试剂中并在37 $^{\circ}$ C下温育10分钟。在细胞内,酯键被水解形成亲水配体,其不再通过膜。将细胞以1500rpm离心5分钟以洗涤加载的UM9细胞。用含有1mM丙磺舒 (Sigma P8761) 的培养基重复洗涤3-5次。最后一次洗涤后,将细胞沉淀重新悬浮在培养基中并调节至约 $5 \times 10^4$ 个细胞/mL。设置孔用于检测背景、自发释放和最大释放。将100 $\mu$ L加载的靶细胞 (5,000个细胞) 转移到V-底板中的孔中,并以不同的细胞浓度加入100 $\mu$ L效应细胞 (KHYG-1细胞),以产生范围为0.5:1-2:1的E:T比。将板以 $100 \times g$ 离心1分钟,并在加湿的5%CO<sub>2</sub>气氛中于37 $^{\circ}$ C温育4小时。对于最大释放孔,在收集培养基前15分钟向每个孔中加入10 $\mu$ L裂解缓冲液。将板以 $500 \times g$ 离心5分钟。将20 $\mu$ L上清液转移至平底96孔板中,加入200 $\mu$ L预热过的铈溶液。使用板振荡器将其在室温下温育15分钟。当UM9细胞被KHYG-1细胞裂解时,它们将配体释放到培养基中。然后该配体与铈溶液反应形成荧光螯合物,其与裂解细胞的量直接相关。然后通过使用VARIOSKAN FLASH在时间分辨荧光计中测量荧光。使用以下公式计算特异性释放:%特异性释放=实验释放-自发释放/最大释放-自发释放。使用Graphpad Prism 6.04软件进行统计学分析。使用配对t检验比较CD38-CAR KHYG-1细胞和对照组之间的差异。

[0510] 基于生物发光成像的细胞毒性测定

[0511] 通过CD38测定Luc-GFP转导的人恶性细胞系的裂解

[0512] 转导后7-10天,将CAR NK细胞、mock或CD38-CAR NK细胞的连续稀释液与恶性细胞系共温育。在加入125mg/mL甲虫荧光素(Promega)后15分钟内用GloMax 96微板发光计(Promega)在16-24小时后测定由存活的恶性细胞产生的荧光素酶信号。裂解细胞% = 1(经处理的孔中的生物发光成像[BLI]信号/未处理的孔中的BLI信号)100%。

[0513] 发现在含有CD38-CAR KHYG-1细胞的共培养物中特异性释放明显增加,尽管仅有约50%的细胞被成功转导。除了具有41BB-CD3 $\delta$ 共刺激结构域的CD38-CAR KHYG-1细胞的E:T比为0.5:1的情况之外,所有E:T比的情况都是如此(参见图22)。在携带CD38-CAR的效应细胞的较高纯度样品中预期会产生更有效的细胞毒性作用。由于荧光与细胞裂解直接相关,因此证实KHYG-1细胞中的CD38-CAR表达导致其杀死UM9癌症靶细胞的能力增加。

#### [0514] 基于流式细胞术的细胞毒性测定

[0515] 转导后7-10天,CD38-CAR-KHYG-1细胞的连续稀释液与紫色示踪剂(Thermo Fisher)标记的BM-MNC或PBMC一起温育14小时。加入流式计数荧光微球(Beckman 7547053)后,收集细胞并对针对CD38和/或CD138进行染色。然后通过流式计数均衡测量定量分析活细胞。仅当在未处理的样品中被分析的靶细胞群含有大于500个活细胞时,如下计算细胞裂解百分比:裂解细胞% = 1(经处理的孔中活的靶细胞的绝对数量/未处理的孔中活的靶细胞的绝对数量)100%。

[0516] 使用两种类型的门控来分析原代MM细胞:相对于所有的CD138+/CD38细胞非常明亮的CD138+/CD38+细胞(参见图25和图26)。子集之间的结果存在最小的非显著差异。原代MM细胞对CD38-CAR-KHYG-1诱导的细胞死亡敏感。如图23和图24所示,当使用含有CD28-CD3 $\delta$ (28z B1)的CAR时,观察到最明显的原代MM细胞杀伤。观察到对CD38+/CD138-细胞(正常的非恶性的表达CD38的细胞)的最小的杀伤或没有杀伤(参见图25和图26),因此该细胞似乎不是CAR-NK细胞的靶标。

[0517] 因此,已经表明“低亲和力”CD38 CAR-NK细胞具有靶向和杀死表达CD38的癌细胞的能力,而不会在表达CD38的正常非恶性细胞中引起不利的靶向/脱靶(on-target off-cancer)效应。

[0518] 虽然本文已经示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以举例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员将想到许多变化、改变和替换方式。应该理解的是,本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。

[0519] 序列ID

[0520]

SEQ ID NO	氨基酸或 DNA 序列
1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAFGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGRIIRFLGI ANYAQKFQGRVTLIADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGERDPDAVDIWGQ GTMVTVSS
2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGGTFRSY AISWVRQAPGQGLEWMGRIIVFLG KVNYAQRFFQGRVTLTADKSTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCTGEPGARDPDAFDIWG QGTMVTVSS
4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKVEIK
5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAFGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGRIIRFLG KTNHAQKFQGRVTLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGDRDPDAVDIW GQGTMTVTVSS
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
7	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPHDS DARYSPSFQGQVTFSDAKSISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARHVGWGSRYWYFDL WGRGTLTVTVSS

[0521]

8	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGACATCCAGATGACCCAGAGC
9	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGACATCCAGCTGACCCAGAGC
10	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGCCATCCAGCTGACCCAGAGC
11	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGTGATCTGGATGACCCAGAGC
12	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGAGATCGTGCTGACCCAGAGC
13	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGAGATCGTGATGACCCAGAGC
14	CTGCTGCTGCATGCGGCGCGCCCGGACATCGTGATGACCCAGAGC
15	GCGGCGGAGGATCTGGGGGAGGCGGCTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCG
16	GCGGCGGAGGATCTGGGGGAGGCGGCTCTGAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
17	CAGATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATCTCCACCTTGGTGCC
18	CAGATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATTTCAGCTTGGTGCC
19	CAGATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATGTCCACCTTGGTGCC
20	CAGATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTCCGCCCTTGATTTCAGCCGGGTGCC
21	GGGGCGGGTGTAGGCGGCCGCGGAGCTGGTGTTGTTGTGCTGGACACGGTGACC ATTGTG
22	GGGGCGGGTGTAGGCGGCCGCGGAGCTGGTGTTGTTGTGCTAGACACGGTCACG AGGGTG
23	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVP SRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIK
24	GAGTCACAGGTGGCATTGGCGG
25	CGAATCGCAGGTGGTCGCACAGG
26	CACTCACCTTTGCAGAAGACAGG
27	CCTTGTCGCGCTGAAATCCAAGG
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
29	FGGTFSSYAI
30	IIRFLGIANY
31	CAGEPGERDPDAVDIW
32	SGYSFSNYWI
33	IIYPHDSARY
34	CARHVGWGSRYWYFDL
35	QSIGSSL
36	LIKYASQSF
37	HQSSSLPYTF
38	QGISNYL
39	LIYAASSLQ
40	QQYNSYPYTF
41	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
42	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGG QRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGAS



[0522]

	SVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
<b>43</b>	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHK GLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFC KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0001]	序列表																
[0002]	<110>	昂克免疫有限公司															
[0003]	<120>	工程化天然杀伤细胞及其用途															
[0004]	<130>	P40307W0															
[0005]	<160>	43															
[0006]	<170>	PatentIn 3.5版本															
[0007]	<210>	1															
[0008]	<211>	121															
[0009]	<212>	PRT															
[0010]	<213>	智人(Homo sapiens)															
[0011]	<400>	1															
[0012]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser																
[0013]	1	5	10	15													
[0014]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr																
[0015]	20	25	30														
[0016]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																
[0017]	35	40	45														
[0018]	Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe																
[0019]	50	55	60														
[0020]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Ile Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr																
[0021]	65	70	75	80													
[0022]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																
[0023]	85	90	95														
[0024]	Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly																
[0025]	100	105	110														
[0026]	Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser																
[0027]	115	120															
[0028]	<210>	2															
[0029]	<211>	107															
[0030]	<212>	PRT															
[0031]	<213>	智人(Homo sapiens)															
[0032]	<400>	2															
[0033]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly																
[0034]	1	5	10	15													
[0035]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp																
[0036]	20	25	30														
[0037]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile																
[0038]	35	40	45														

[0039]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0040]	50 55 60
[0041]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0042]	65 70 75 80
[0043]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
[0044]	85 90 95
[0045]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0046]	100 105
[0047]	<210> 3
[0048]	<211> 121
[0049]	<212> PRT
[0050]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0051]	<400> 3
[0052]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0053]	1 5 10 15
[0054]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr
[0055]	20 25 30
[0056]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0057]	35 40 45
[0058]	Gly Arg Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Val Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
[0059]	50 55 60
[0060]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
[0061]	65 70 75 80
[0062]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0063]	85 90 95
[0064]	Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
[0065]	100 105 110
[0066]	Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[0067]	115 120
[0068]	<210> 4
[0069]	<211> 107
[0070]	<212> PRT
[0071]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0072]	<400> 4
[0073]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0074]	1 5 10 15
[0075]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
[0076]	20 25 30
[0077]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

[0078]	35	40	45
[0079]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0080]	50	55	60
[0081]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0082]	65	70	75
[0083]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu		
[0084]	85	90	95
[0085]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0086]	100	105	
[0087]	<210> 5		
[0088]	<211> 121		
[0089]	<212> PRT		
[0090]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0091]	<400> 5		
[0092]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0093]	1	5	10
[0094]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0095]	20	25	30
[0096]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0097]	35	40	45
[0098]	Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Thr Asn His Ala Gln Lys Phe		
[0099]	50	55	60
[0100]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr		
[0101]	65	70	75
[0102]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0103]	85	90	95
[0104]	Ala Gly Glu Pro Gly Asp Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly		
[0105]	100	105	110
[0106]	Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[0107]	115	120	
[0108]	<210> 6		
[0109]	<211> 107		
[0110]	<212> PRT		
[0111]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0112]	<400> 6		
[0113]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0114]	1	5	10
[0115]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp		
[0116]	20	25	30

[0117]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	
[0118]			35					40						45			
[0119]	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
[0120]			50				55						60				
[0121]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
[0122]	65					70					75					80	
[0123]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	
[0124]					85					90						95	
[0125]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
[0126]					100					105							
[0127]	<210>	7															
[0128]	<211>	122															
[0129]	<212>	PRT															
[0130]	<213>	智人(Homo sapiens)															
[0131]	<400>	7															
[0132]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
[0133]	1				5					10					15		
[0134]	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Asn	Tyr	
[0135]					20					25					30		
[0136]	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0137]			35					40						45			
[0138]	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	His	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
[0139]			50					55						60			
[0140]	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0141]	65					70					75					80	
[0142]	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
[0143]						85					90					95	
[0144]	Ala	Arg	His	Val	Gly	Trp	Gly	Ser	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	
[0145]					100					105					110		
[0146]	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0147]					115					120							
[0148]	<210>	8															
[0149]	<211>	45															
[0150]	<212>	DNA															
[0151]	<213>	智人(Homo sapiens)															
[0152]	<400>	8															
[0153]	ctgctgctgc	atgcggcgcg	cccggacatc	cagatgaccc	agagc												45
[0154]	<210>	9															
[0155]	<211>	45															

[0156]	<212>	DNA	
[0157]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0158]	<400>	9	
[0159]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggacatc cagctgaccc agagc		45
[0160]	<210>	10	
[0161]	<211>	45	
[0162]	<212>	DNA	
[0163]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0164]	<400>	10	
[0165]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggccatc cagctgaccc agagc		45
[0166]	<210>	11	
[0167]	<211>	45	
[0168]	<212>	DNA	
[0169]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0170]	<400>	11	
[0171]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggtgatc tggatgaccc agagc		45
[0172]	<210>	12	
[0173]	<211>	45	
[0174]	<212>	DNA	
[0175]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0176]	<400>	12	
[0177]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggagatc gtgctgaccc agagc		45
[0178]	<210>	13	
[0179]	<211>	45	
[0180]	<212>	DNA	
[0181]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0182]	<400>	13	
[0183]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggagatc gtgatgaccc agagc		45
[0184]	<210>	14	
[0185]	<211>	45	
[0186]	<212>	DNA	
[0187]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0188]	<400>	14	
[0189]	ctgctgctgc atgcggcgcg cccggacatc gtgatgaccc agagc		45
[0190]	<210>	15	
[0191]	<211>	51	
[0192]	<212>	DNA	
[0193]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0194]	<400>	15	

[0195]	gcggcggagg atctggggga ggcggctctc aggtgcagct ggtgcagagc g	51
[0196]	<210> 16	
[0197]	<211> 52	
[0198]	<212> DNA	
[0199]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0200]	<400> 16	
[0201]	gcggcggagg atctggggga ggcggctctg aagtgcagct ggtgcagtct gg	52
[0202]	<210> 17	
[0203]	<211> 52	
[0204]	<212> DNA	
[0205]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0206]	<400> 17	
[0207]	cagatcctcc gccgccagat ccgcctccgc ccttgatctc caccttggtg cc	52
[0208]	<210> 18	
[0209]	<211> 52	
[0210]	<212> DNA	
[0211]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0212]	<400> 18	
[0213]	cagatcctcc gccgccagat ccgcctccgc ccttgatttc cagcttggtg cc	52
[0214]	<210> 19	
[0215]	<211> 52	
[0216]	<212> DNA	
[0217]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0218]	<400> 19	
[0219]	cagatcctcc gccgccagat ccgcctccgc ccttgatgtc caccttggtg cc	52
[0220]	<210> 20	
[0221]	<211> 52	
[0222]	<212> DNA	
[0223]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0224]	<400> 20	
[0225]	cagatcctcc gccgccagat ccgcctccgc ccttgatttc cagccgggtg cc	52
[0226]	<210> 21	
[0227]	<211> 60	
[0228]	<212> DNA	
[0229]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0230]	<400> 21	
[0231]	ggggcgggtg taggcggccg cggagctggt gttgttgtgc tggacacggt gaccattgtg	60
[0232]	<210> 22	
[0233]	<211> 60	

[0234]	<212>	DNA	
[0235]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0236]	<400>	22	
[0237]	ggggcgggtg taggcggccg cggagctggt gttgttgtgc tagacacggt cacgagggtg	60	
[0238]	<210>	23	
[0239]	<211>	107	
[0240]	<212>	PRT	
[0241]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0242]	<400>	23	
[0243]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys		
[0244]	1 5 10 15		
[0245]	Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser		
[0246]	20 25 30		
[0247]	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0248]	35 40 45		
[0249]	Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0250]	50 55 60		
[0251]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala		
[0252]	65 70 75 80		
[0253]	Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr		
[0254]	85 90 95		
[0255]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0256]	100 105		
[0257]	<210>	24	
[0258]	<211>	23	
[0259]	<212>	DNA	
[0260]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0261]	<400>	24	
[0262]	gagtcacagg tggcatttgg cgg	23	
[0263]	<210>	25	
[0264]	<211>	23	
[0265]	<212>	DNA	
[0266]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0267]	<400>	25	
[0268]	cgaatcgcag gtggtcgcac agg	23	
[0269]	<210>	26	
[0270]	<211>	23	
[0271]	<212>	DNA	
[0272]	<213>	智人(Homo sapiens)	



[0273]	<400>	26	
[0274]	cactcacctt tgcagaagac agg		23
[0275]	<210>	27	
[0276]	<211>	23	
[0277]	<212>	DNA	
[0278]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0279]	<400>	27	
[0280]	ccttgtgccg ctgaaatcca agg		23
[0281]	<210>	28	
[0282]	<211>	107	
[0283]	<212>	PRT	
[0284]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0285]	<400>	28	
[0286]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0287]	1	5	10 15
[0288]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr		
[0289]		20	25 30
[0290]	Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
[0291]		35	40 45
[0292]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0293]		50	55 60
[0294]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0295]		65	70 75 80
[0296]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr		
[0297]		85	90 95
[0298]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0299]		100	105
[0300]	<210>	29	
[0301]	<211>	10	
[0302]	<212>	PRT	
[0303]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0304]	<400>	29	
[0305]	Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile		
[0306]	1	5	10
[0307]	<210>	30	
[0308]	<211>	10	
[0309]	<212>	PRT	
[0310]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0311]	<400>	30	

[0312]	Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala Asn Tyr
[0313]	1 5 10
[0314]	<210> 31
[0315]	<211> 16
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0318]	<400> 31
[0319]	Cys Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp
[0320]	1 5 10 15
[0321]	<210> 32
[0322]	<211> 10
[0323]	<212> PRT
[0324]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0325]	<400> 32
[0326]	Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr Trp Ile
[0327]	1 5 10
[0328]	<210> 33
[0329]	<211> 11
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0332]	<400> 33
[0333]	Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr
[0334]	1 5 10
[0335]	<210> 34
[0336]	<211> 16
[0337]	<212> PRT
[0338]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0339]	<400> 34
[0340]	Cys Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
[0341]	1 5 10 15
[0342]	<210> 35
[0343]	<211> 7
[0344]	<212> PRT
[0345]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0346]	<400> 35
[0347]	Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu
[0348]	1 5
[0349]	<210> 36
[0350]	<211> 9

[0351]	<212>	PRT
[0352]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0353]	<400>	36
[0354]	Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe	
[0355]	1	5
[0356]	<210>	37
[0357]	<211>	10
[0358]	<212>	PRT
[0359]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0360]	<400>	37
[0361]	His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Thr Phe	
[0362]	1	5 10
[0363]	<210>	38
[0364]	<211>	7
[0365]	<212>	PRT
[0366]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0367]	<400>	38
[0368]	Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu	
[0369]	1	5
[0370]	<210>	39
[0371]	<211>	9
[0372]	<212>	PRT
[0373]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0374]	<400>	39
[0375]	Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln	
[0376]	1	5
[0377]	<210>	40
[0378]	<211>	10
[0379]	<212>	PRT
[0380]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0381]	<400>	40
[0382]	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe	
[0383]	1	5 10
[0384]	<210>	41
[0385]	<211>	164
[0386]	<212>	PRT
[0387]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0388]	<400>	41
[0389]	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	

[0390]	1	5					10					15				
[0391]	Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys
[0392]	20					25					30					
[0393]	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala
[0394]	35					40					45					
[0395]	Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr
[0396]	50					55					60					
[0397]	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg
[0398]	65	70					75					80				
[0399]	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met
[0400]	85					90					95					
[0401]	Gly	Gly	Lys	Pro	Gln	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn
[0402]	100					105					110					
[0403]	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met
[0404]	115					120					125					
[0405]	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly
[0406]	130					135					140					
[0407]	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala
[0408]	145	150					155					160				
[0409]	Leu	Pro	Pro	Arg												
[0410]	<210>	42														
[0411]	<211>	255														
[0412]	<212>	PRT														
[0413]	<213>	智人(Homo sapiens)														
[0414]	<400>	42														
[0415]	Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Tyr	Asn	Ile	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Leu
[0416]	1	5					10					15				
[0417]	Asn	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro
[0418]	20					25					30					
[0419]	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys
[0420]	35					40					45					
[0421]	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile
[0422]	50					55					60					
[0423]	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser
[0424]	65	70					75					80				
[0425]	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly
[0426]	85					90					95					
[0427]	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu
[0428]	100					105					110					

[0429]	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln
[0430]			115					120					125			
[0431]	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys
[0432]			130					135					140			
[0433]	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro
[0434]	145						150				155					160
[0435]	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala
[0436]					165					170					175	
[0437]	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu
[0438]				180					185					190		
[0439]	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu
[0440]			195					200					205			
[0441]	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
[0442]		210					215					220				
[0443]	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
[0444]	225					230				235						240
[0445]	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	
[0446]				245					250					255		
[0447]	<210>	43														
[0448]	<211>	220														
[0449]	<212>	PRT														
[0450]	<213>	智人(Homo sapiens)														
[0451]	<400>	43														
[0452]	Met	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Pro	Ser	Ile	Gln	Val
[0453]	1			5					10					15		
[0454]	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Met	Leu	Val	Ala	Tyr
[0455]			20					25					30			
[0456]	Asp	Asn	Ala	Val	Asn	Leu	Ser	Cys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Leu	Phe	Ser
[0457]			35					40					45			
[0458]	Arg	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	His	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Glu
[0459]		50					55					60				
[0460]	Val	Cys	Val	Val	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser
[0461]	65					70				75					80	
[0462]	Lys	Thr	Gly	Phe	Asn	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser	Val	Thr
[0463]				85					90					95		
[0464]	Phe	Tyr	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	Val	Asn	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	Cys
[0465]			100						105				110			
[0466]	Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser
[0467]			115					120					125			

[0468]	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro
[0469]		130					135					140				
[0470]	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
[0471]	145					150					155					160
[0472]	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
[0473]					165					170					175	
[0474]	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met
[0475]				180					185					190		
[0476]	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro
[0477]			195					200					205			
[0478]	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser				
[0479]		210					215					220				

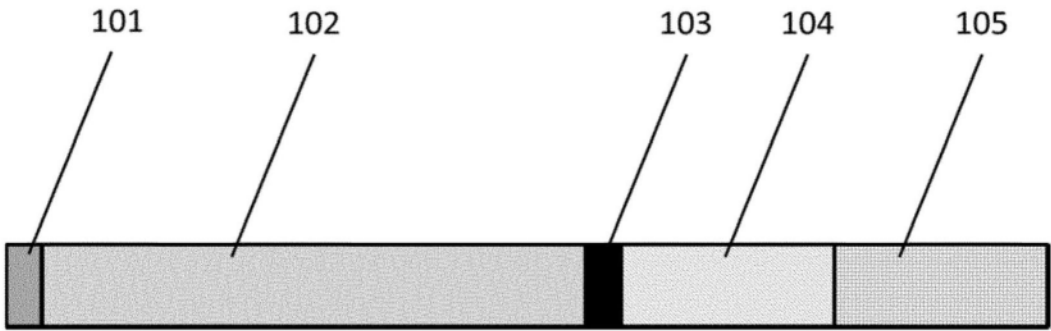


图1A

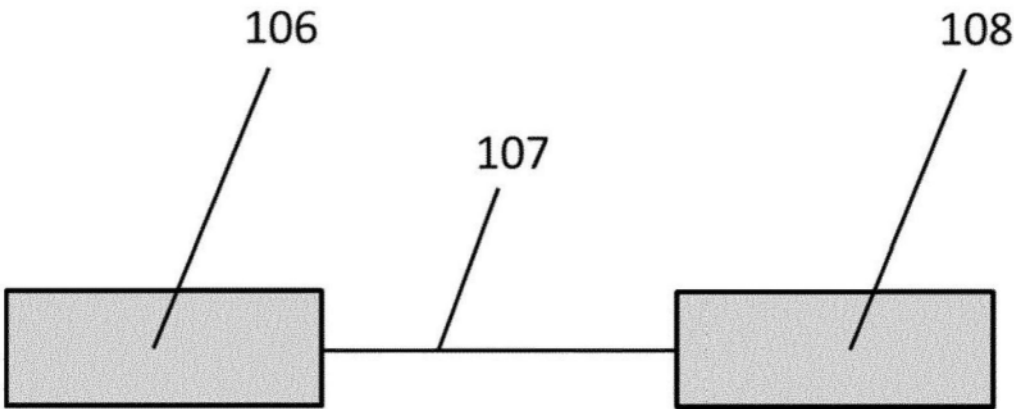


图1B

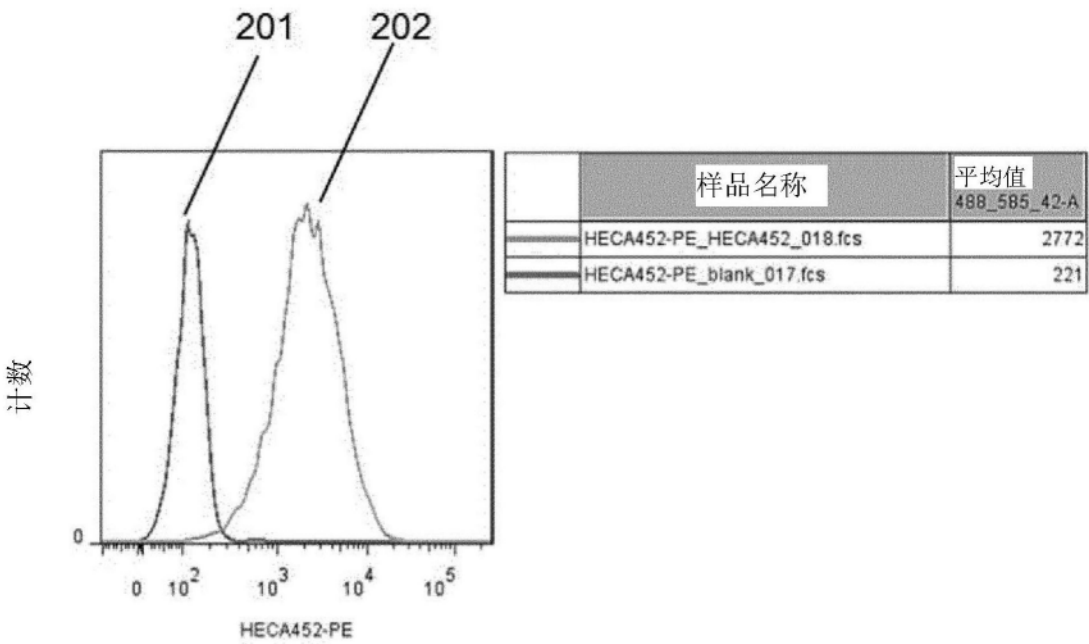


图2A

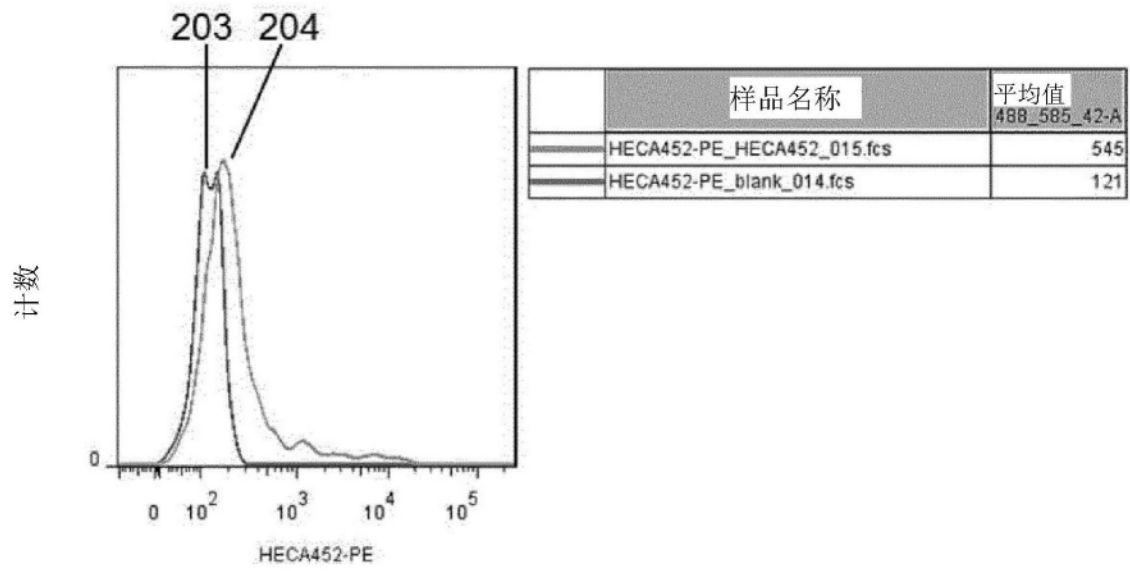


图2B

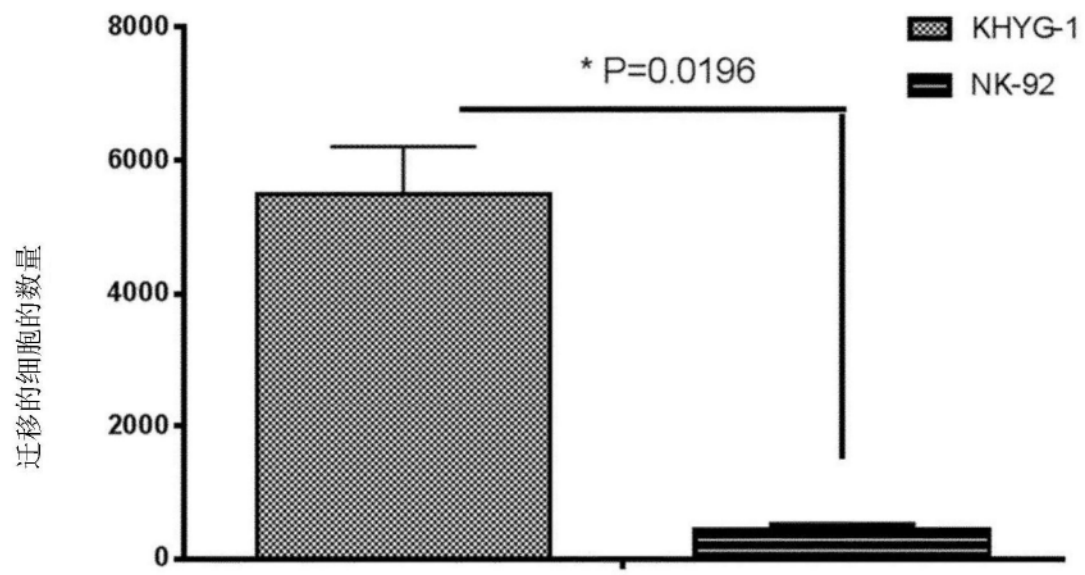


图3



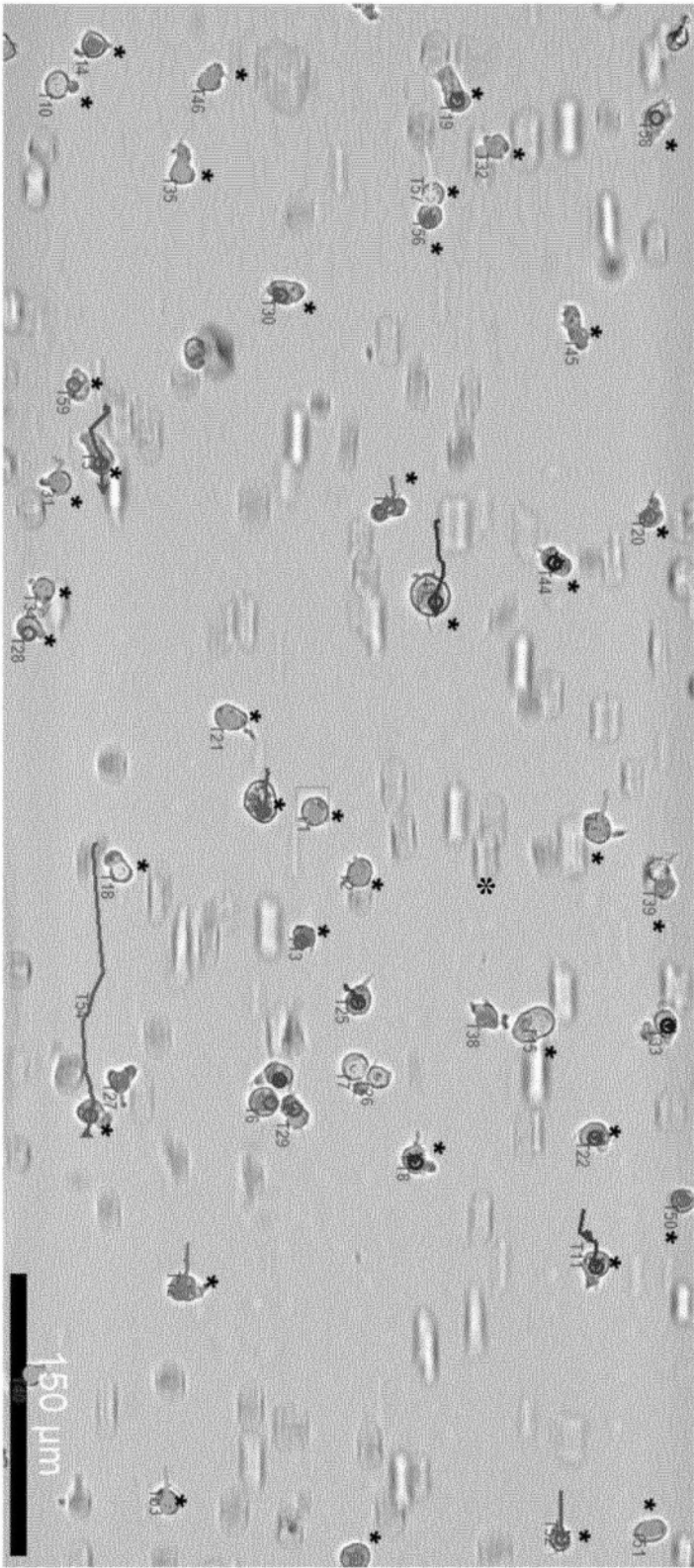


图4A

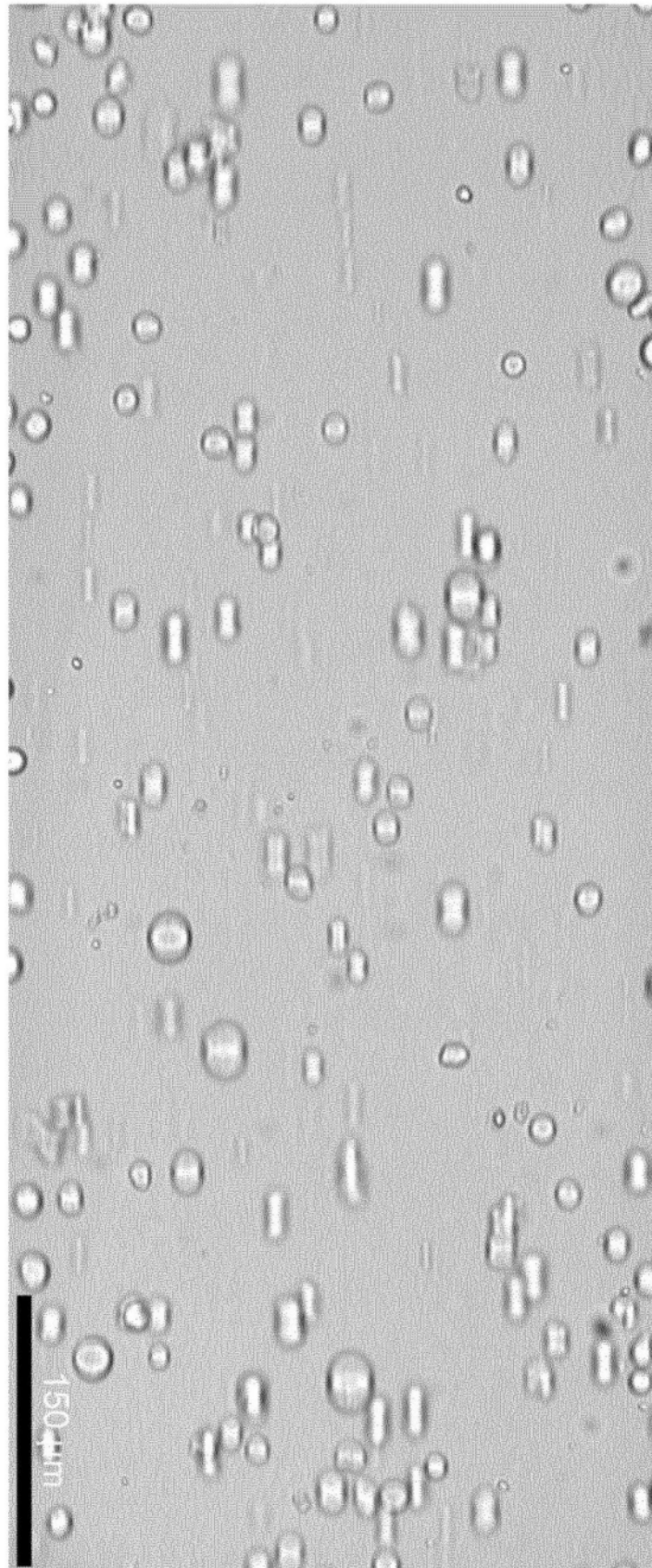


图4B

## 嵌合 gRNA+hSpCas9 共表达载体

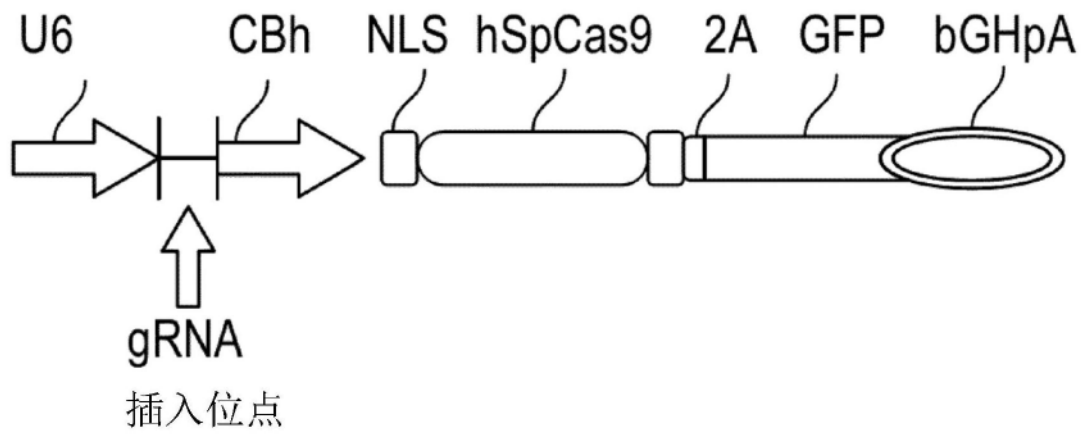


图5

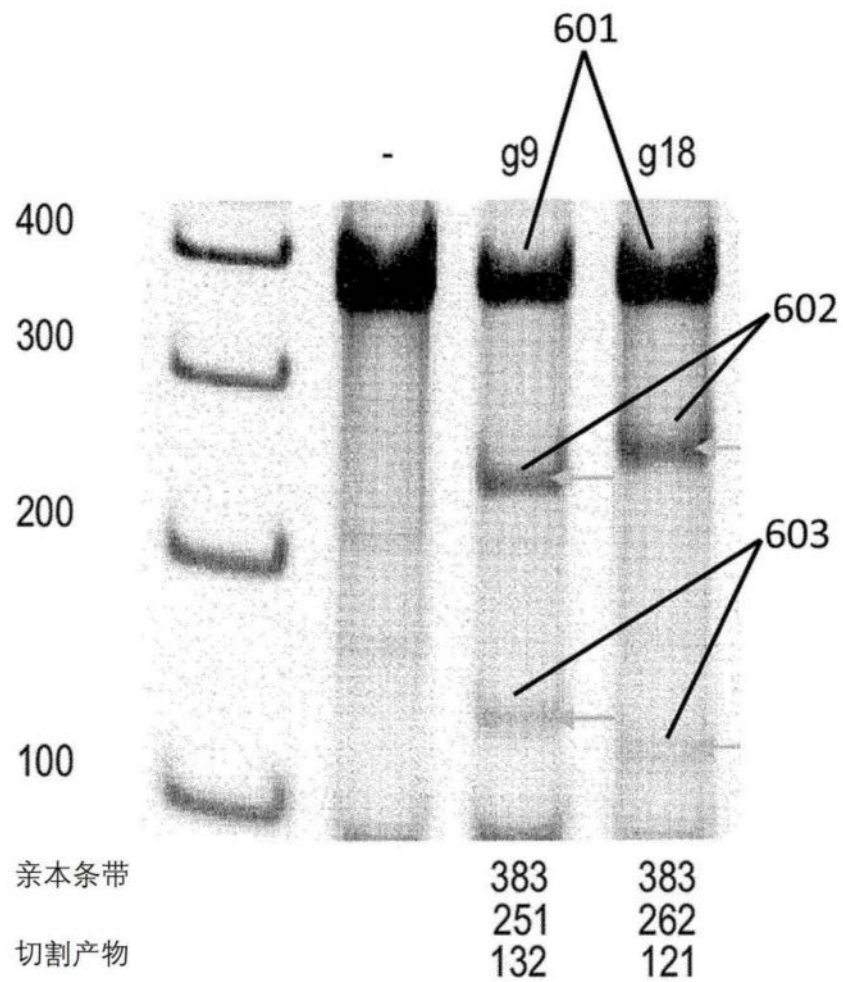


图6

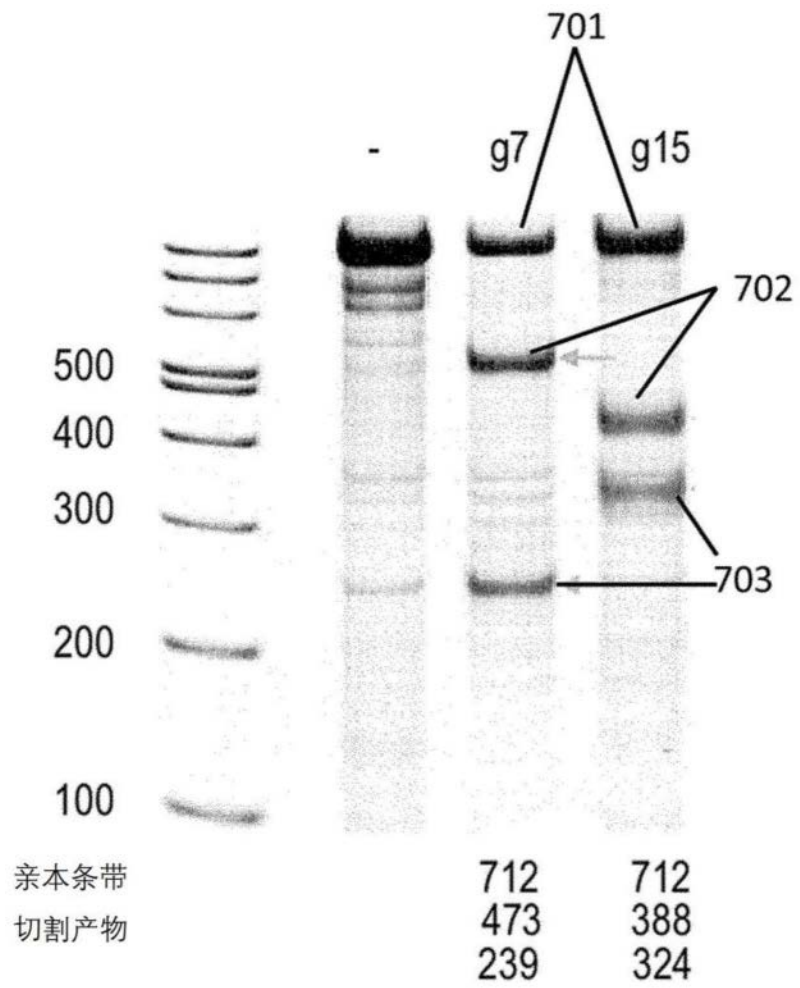


图7

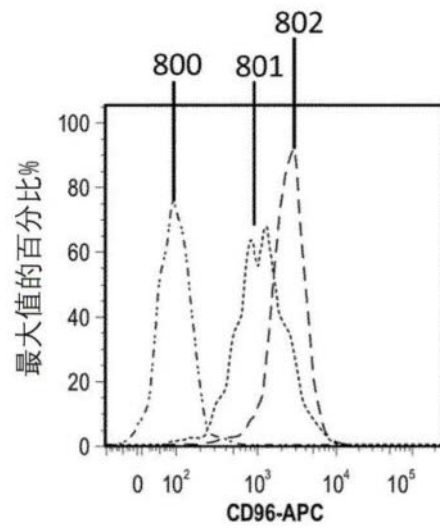


图8A

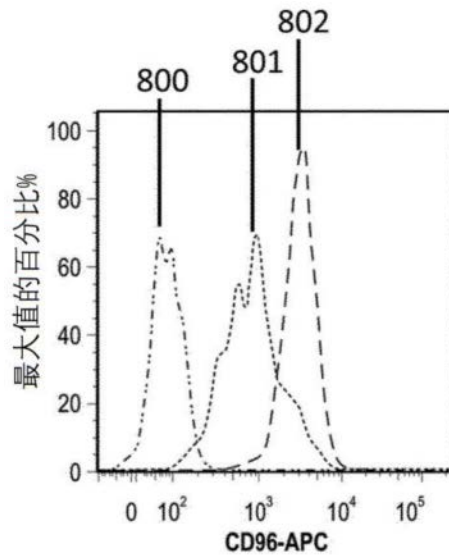


图8B

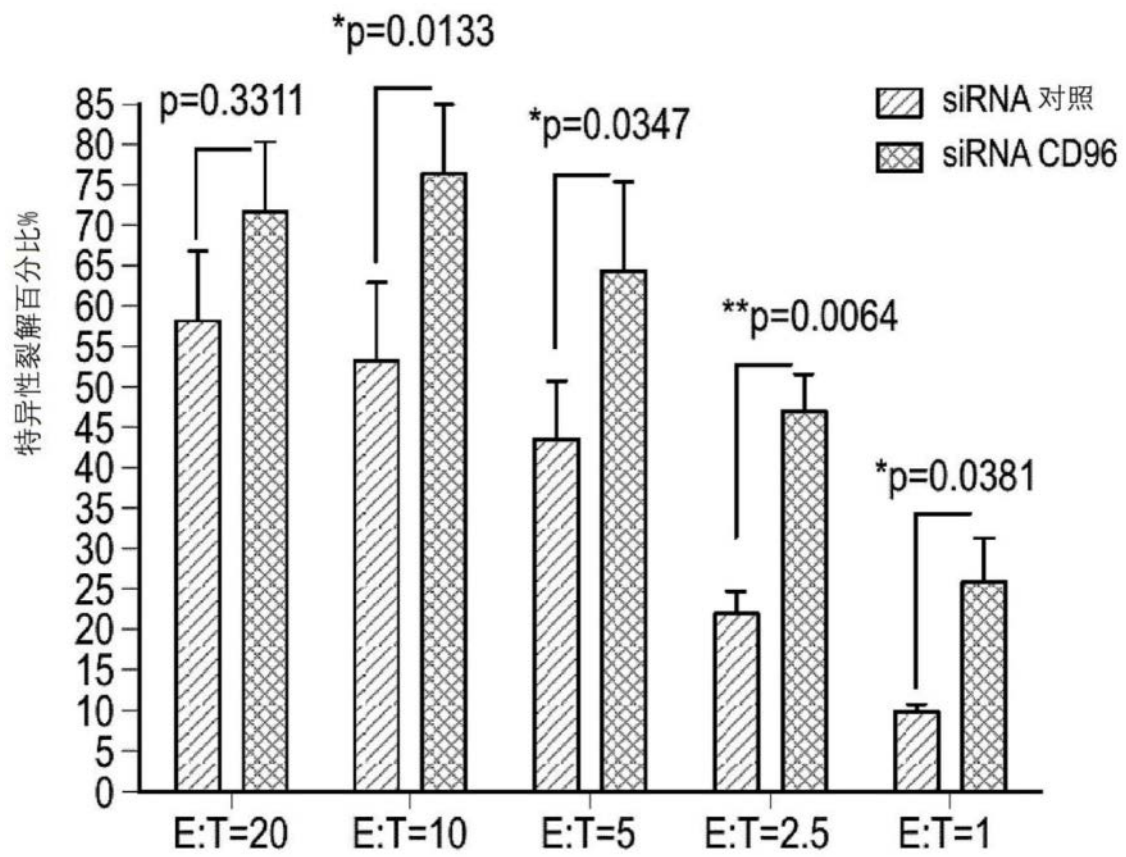


图9



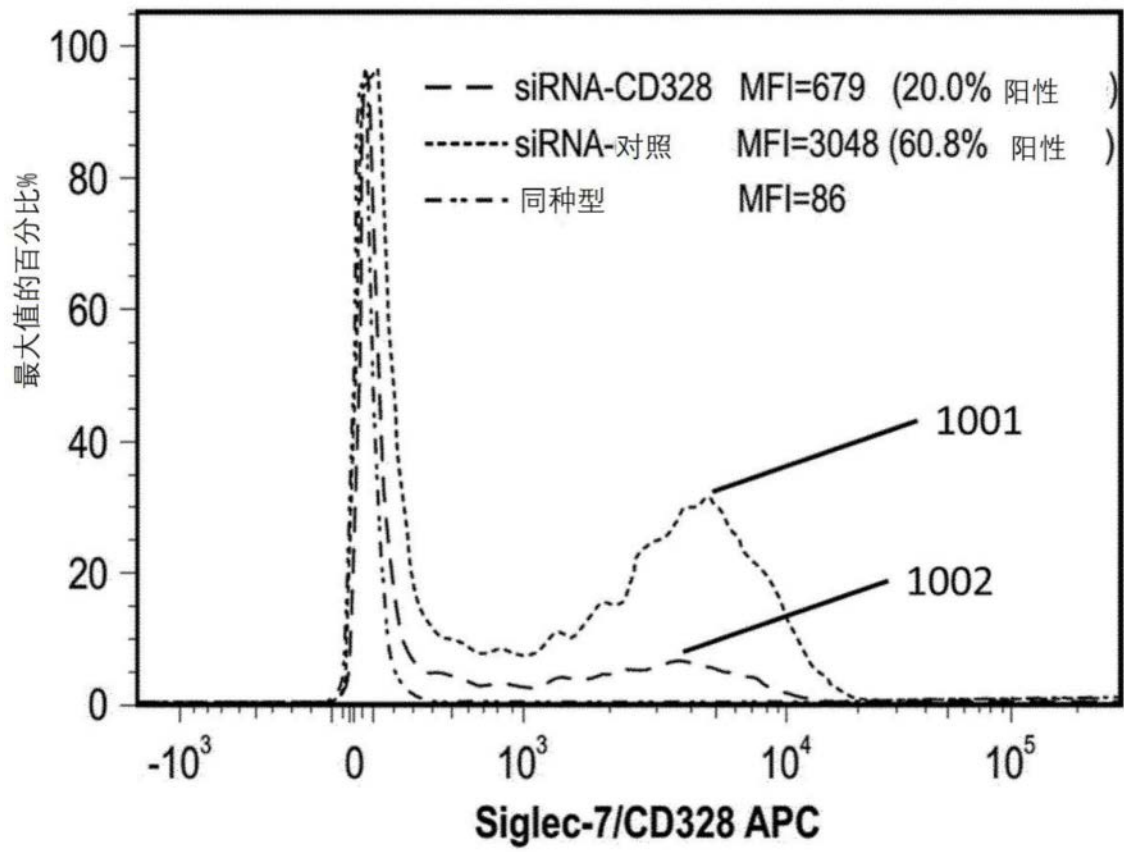


图10

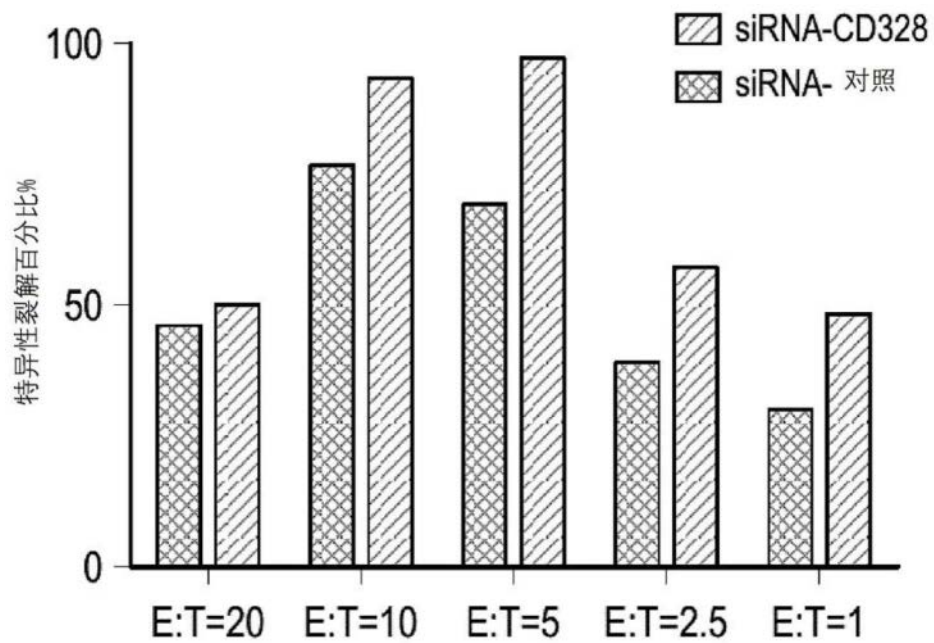


图11

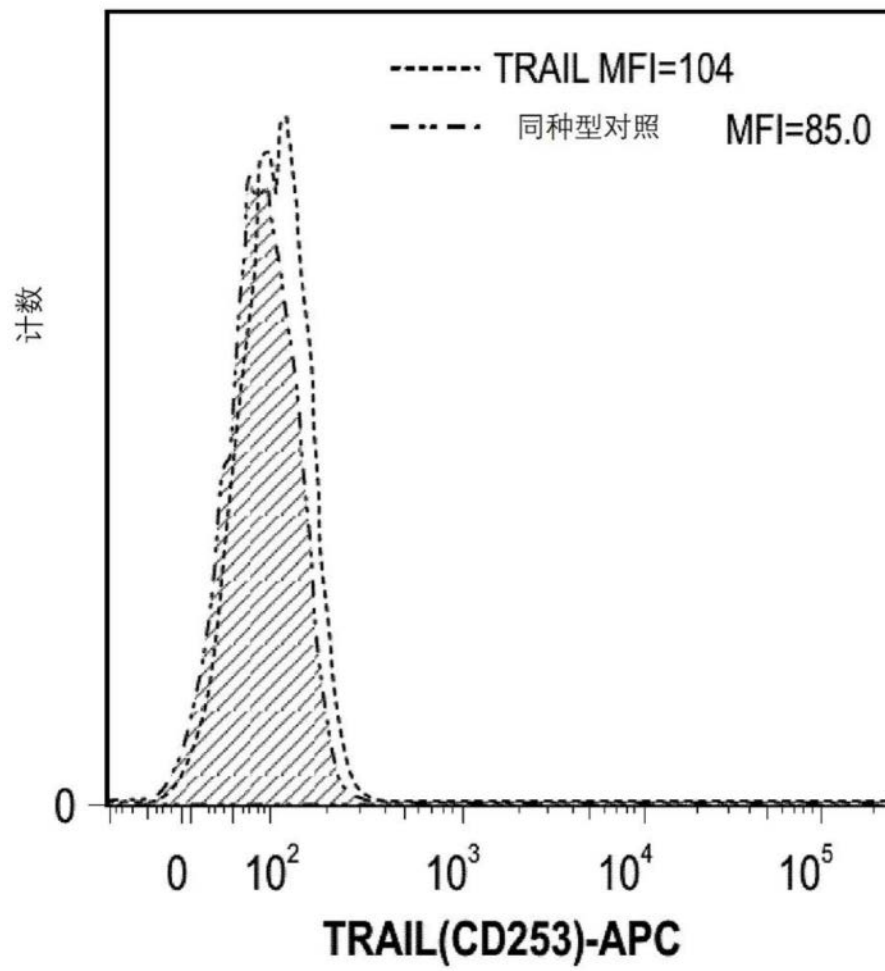


图12

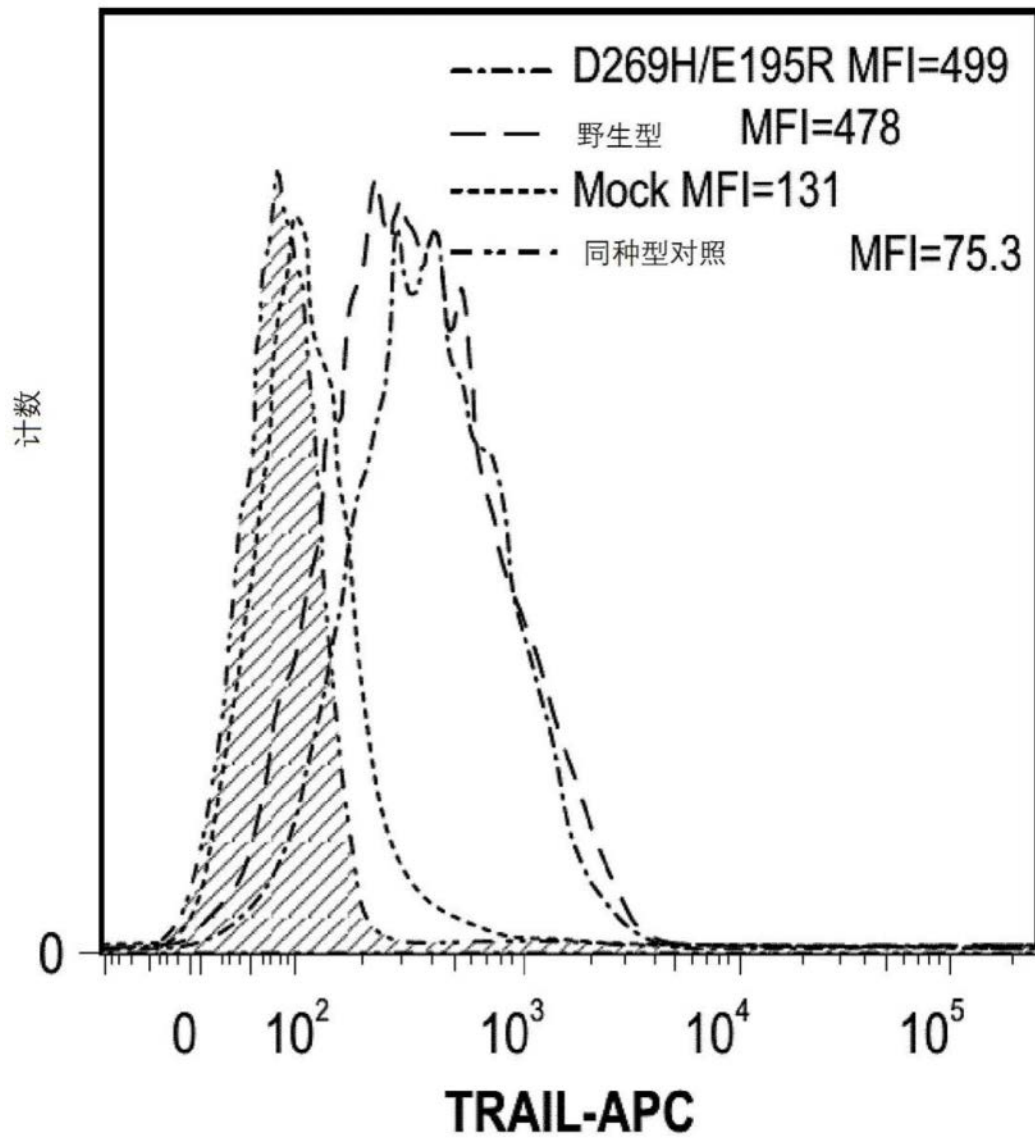


图13



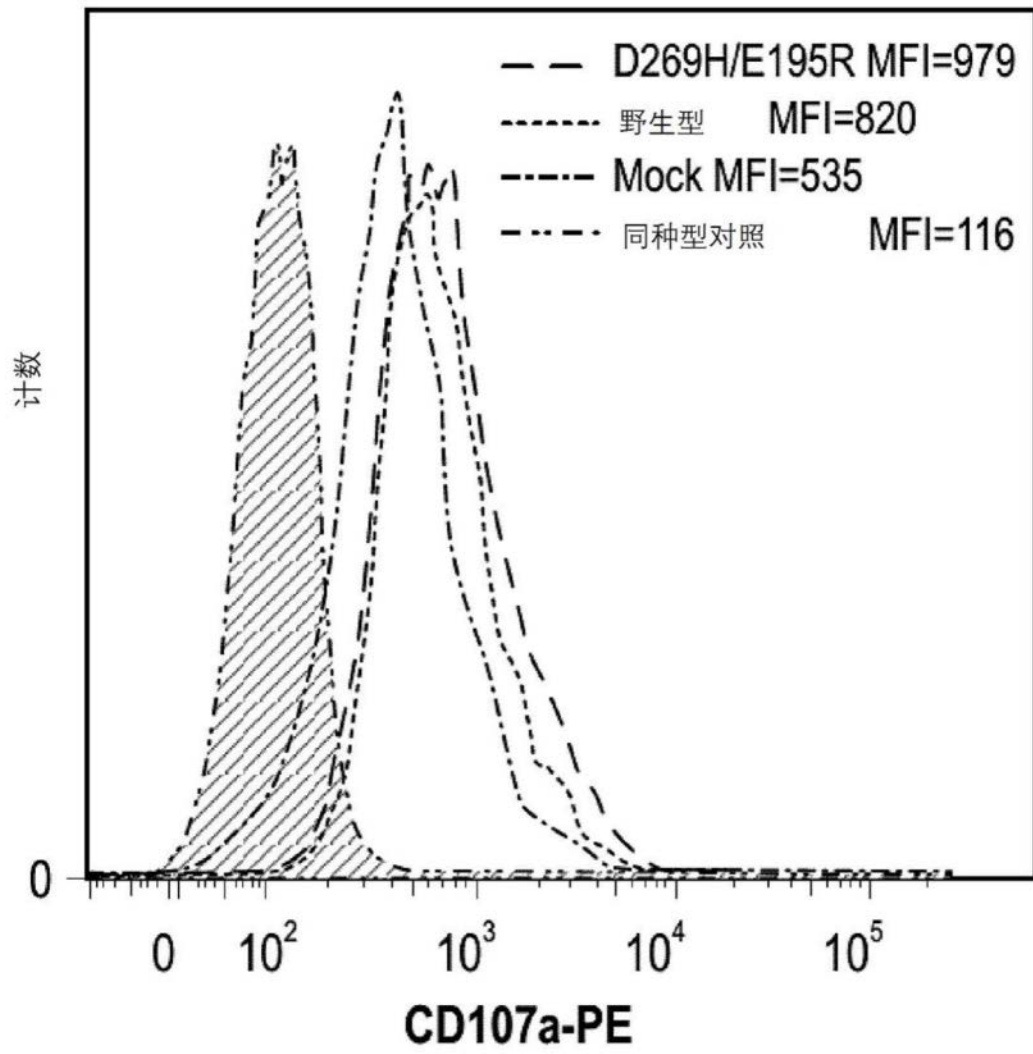


图14

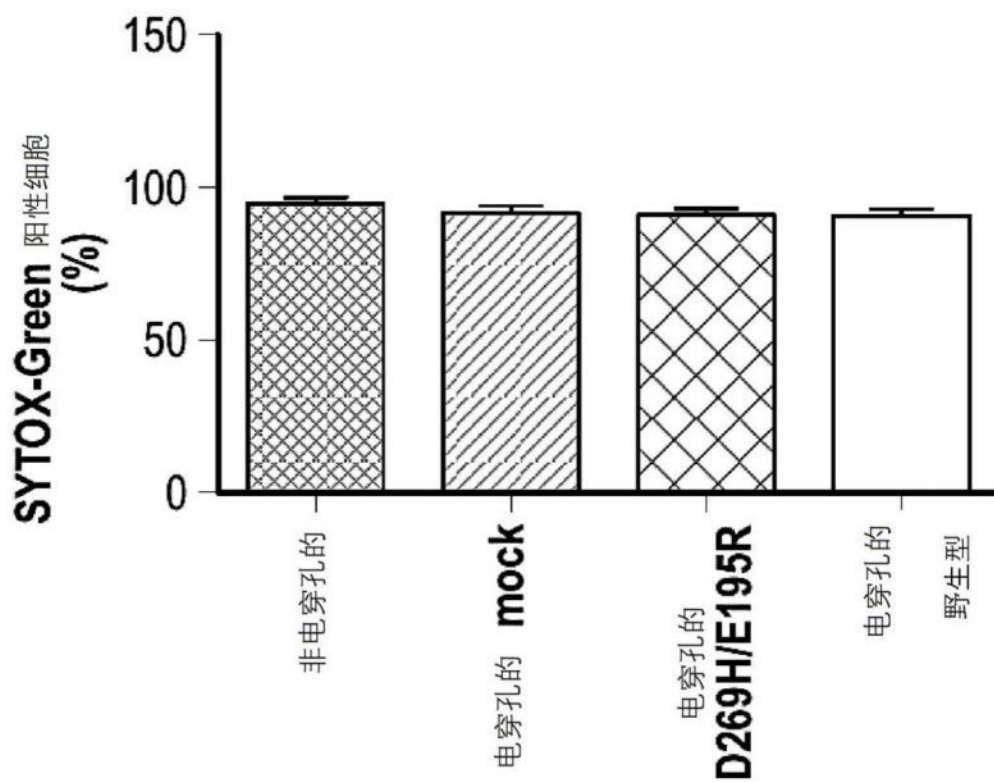


图15

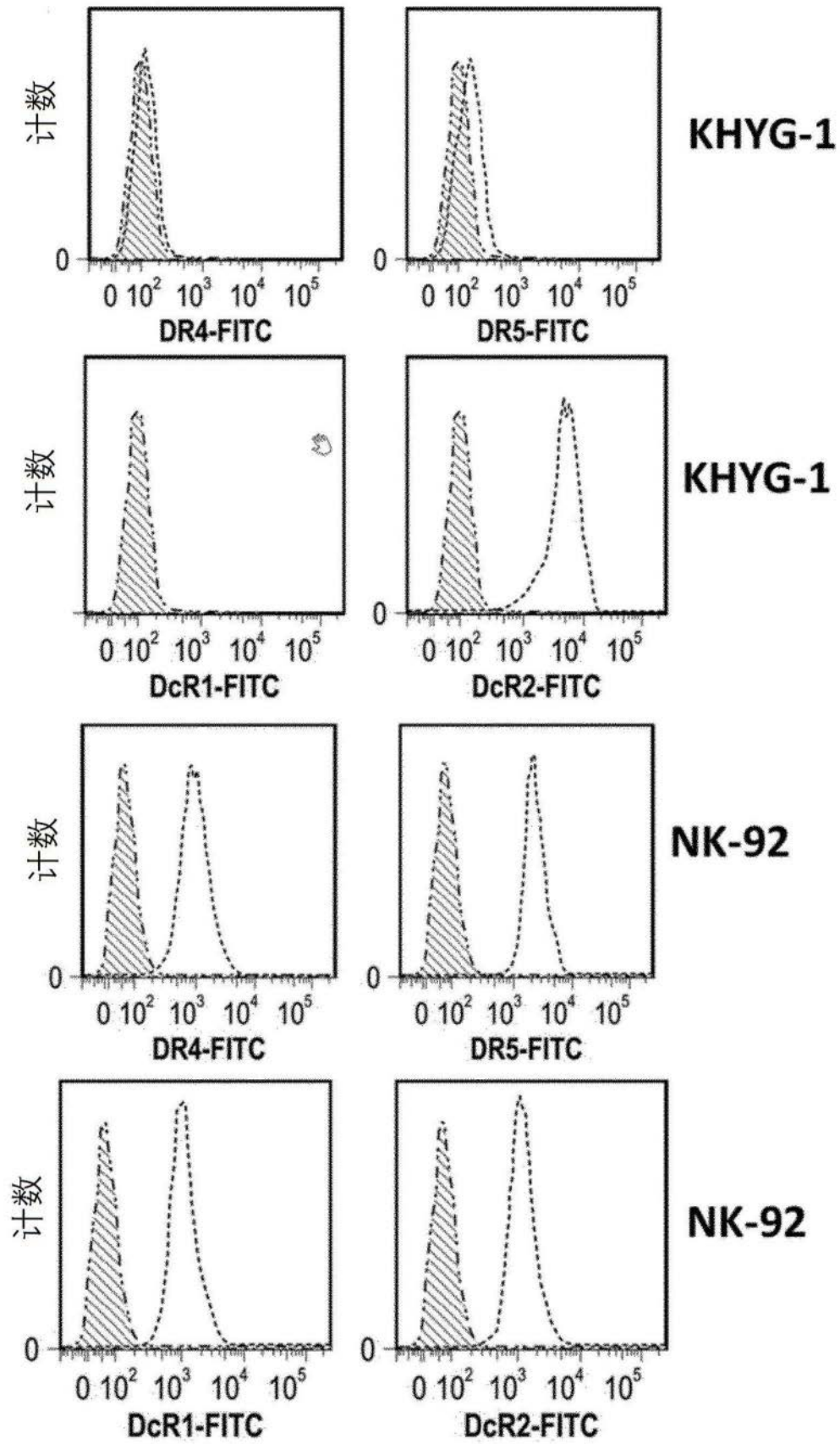


图16

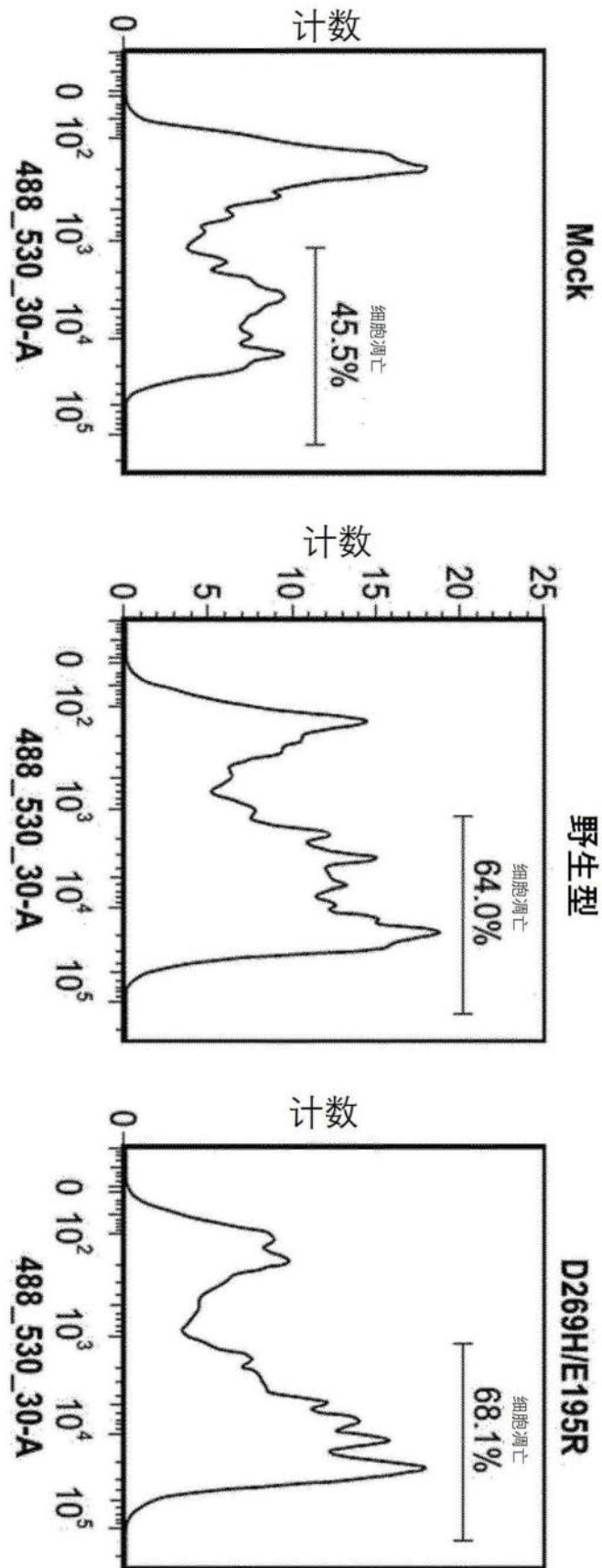


图17

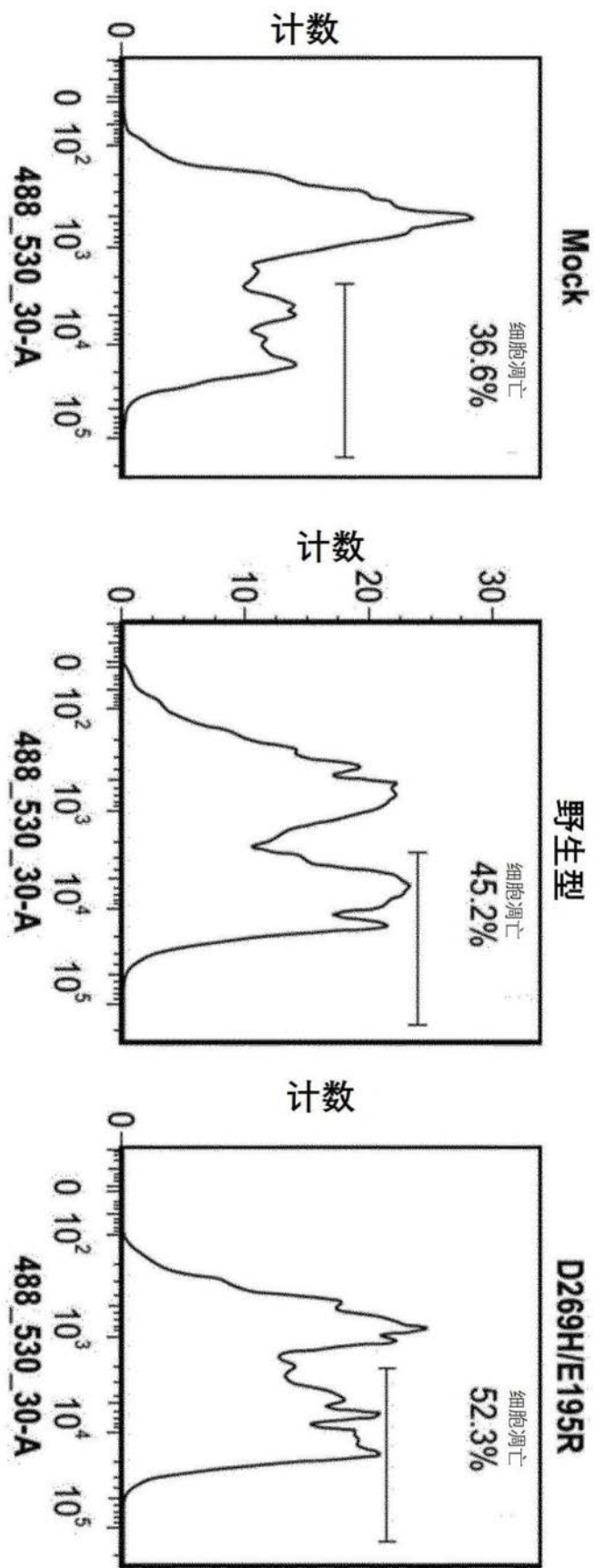


图18

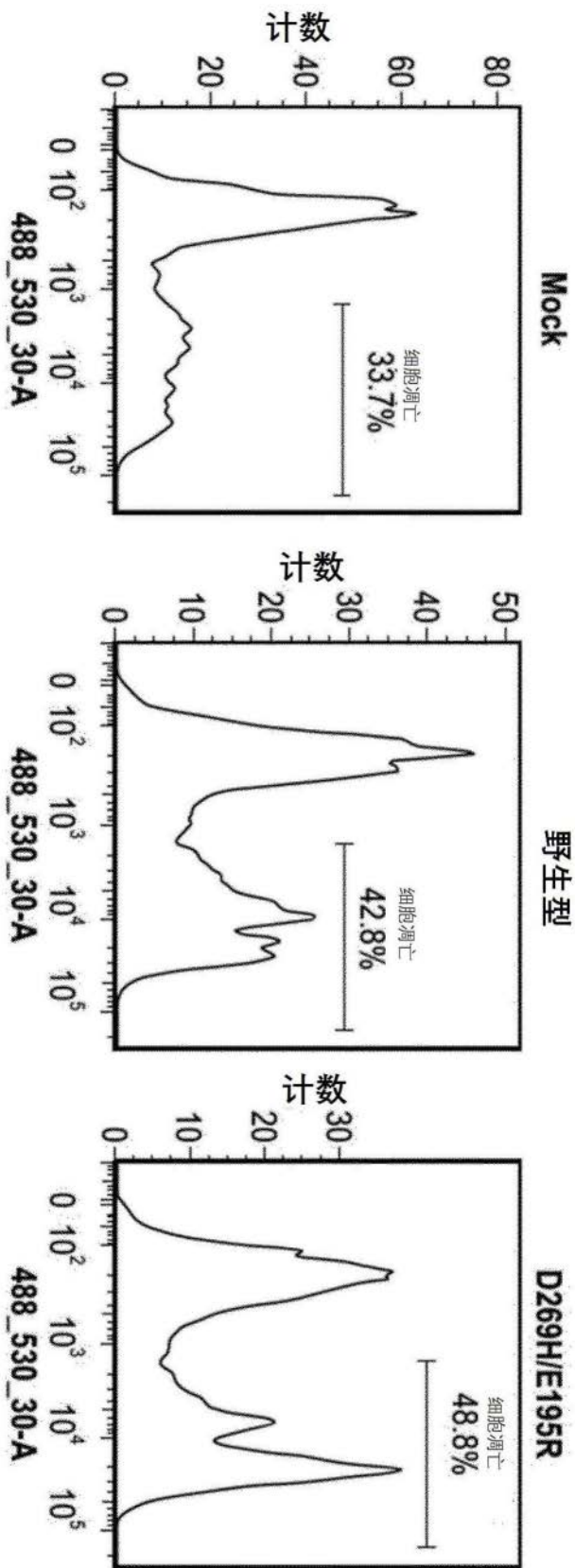


图19

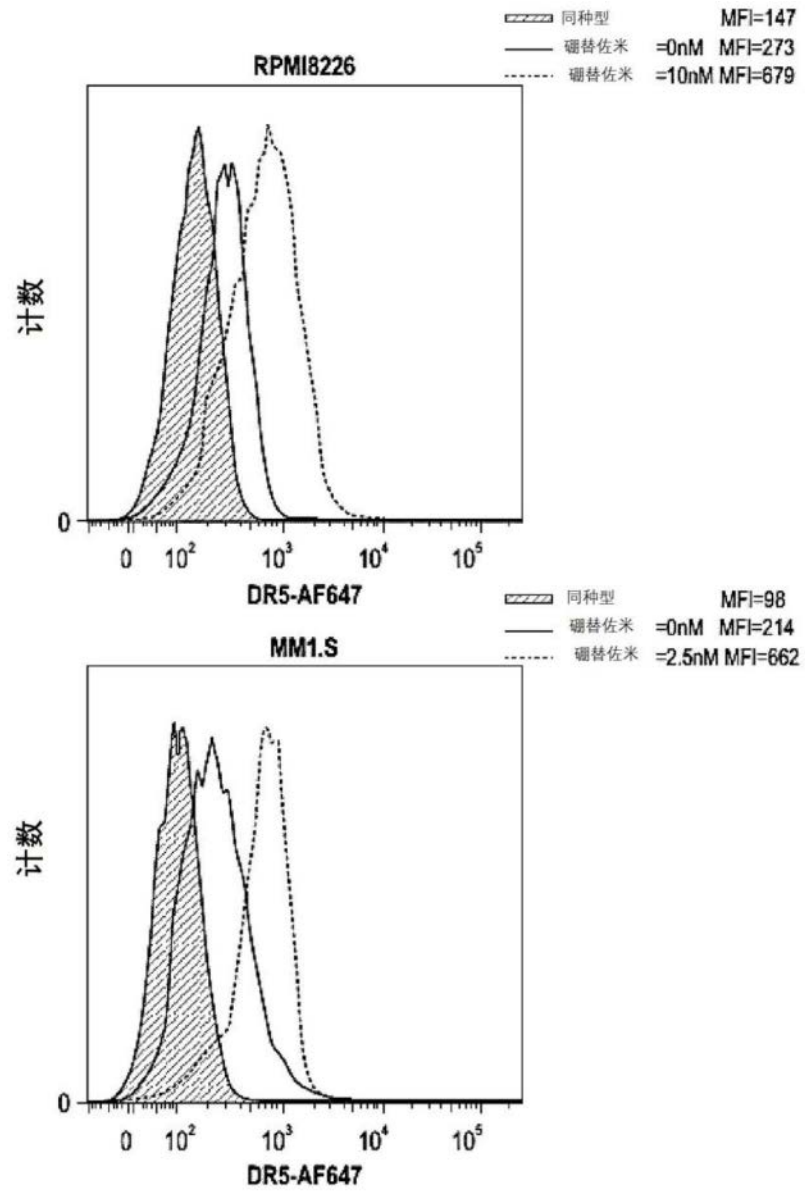


图20



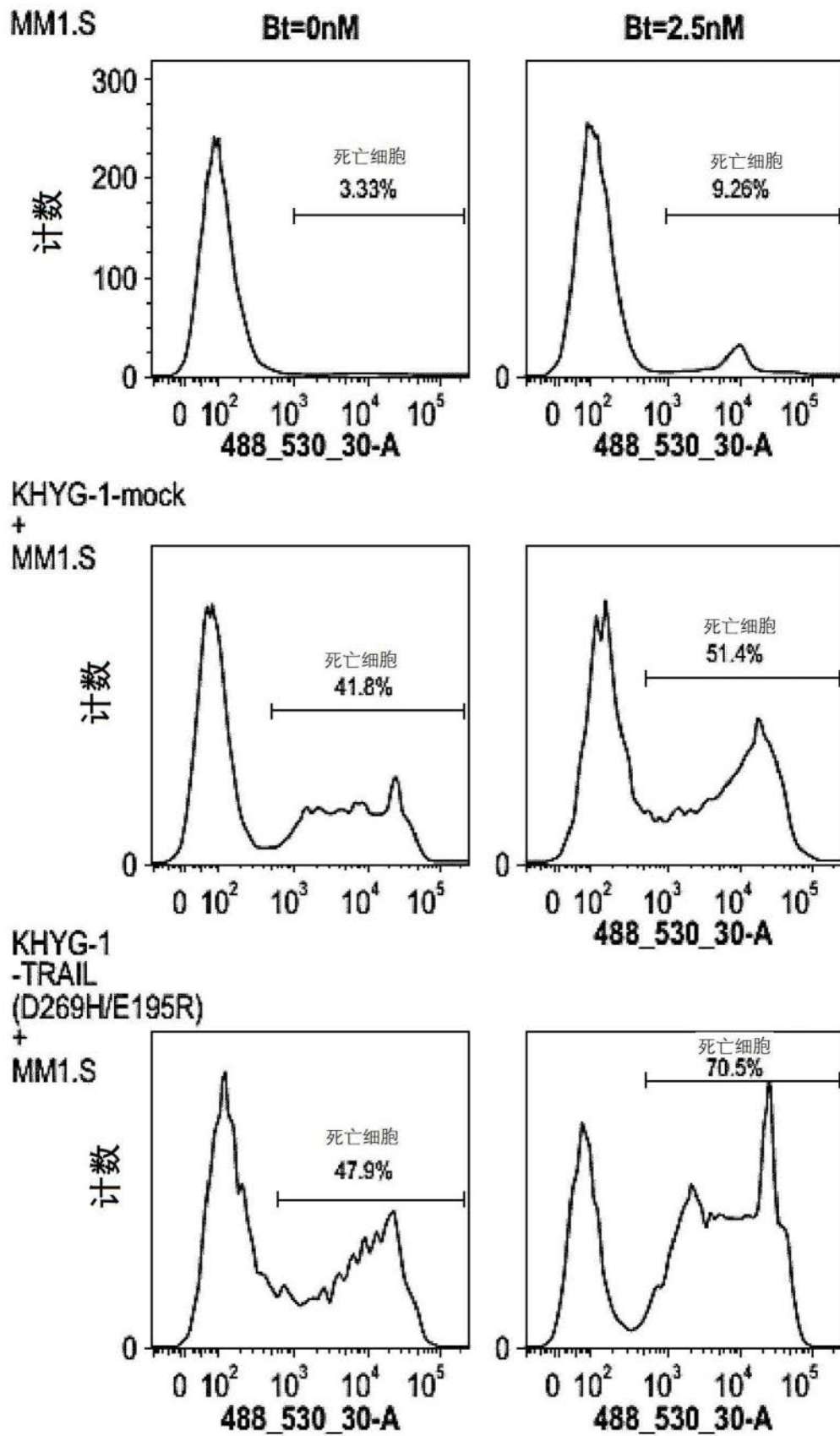


图21



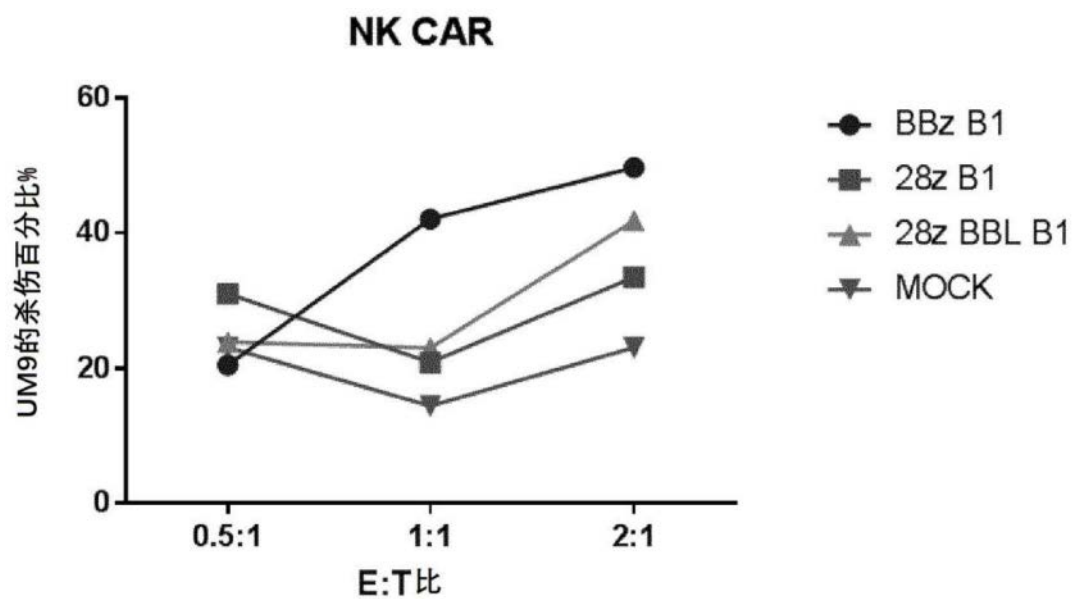


图22

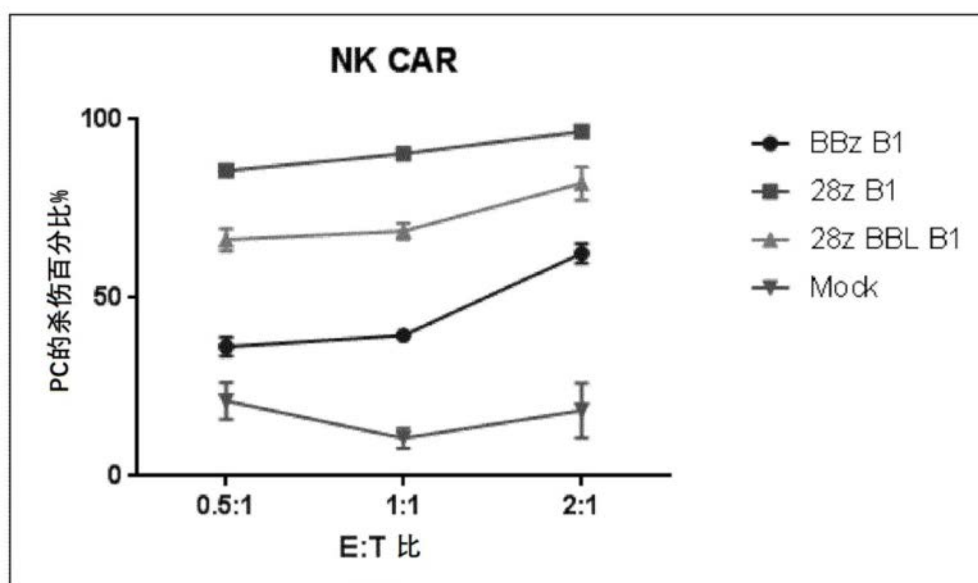


图23

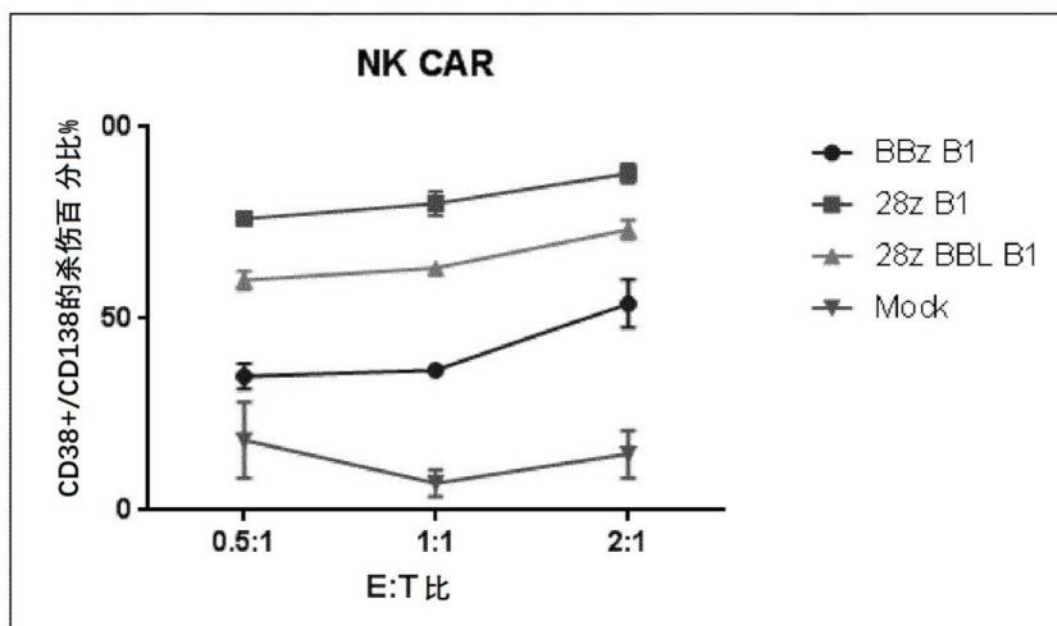


图24

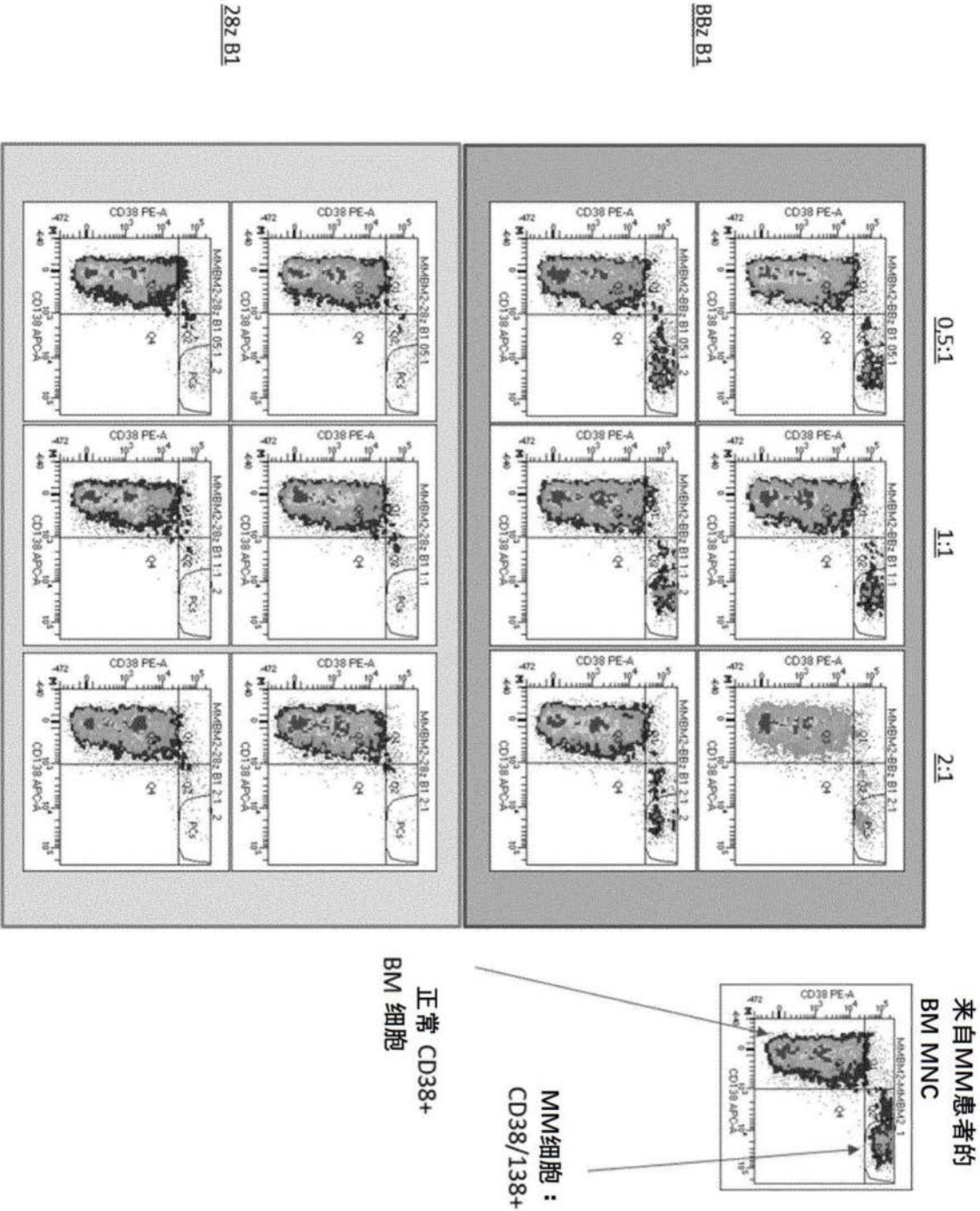


图25

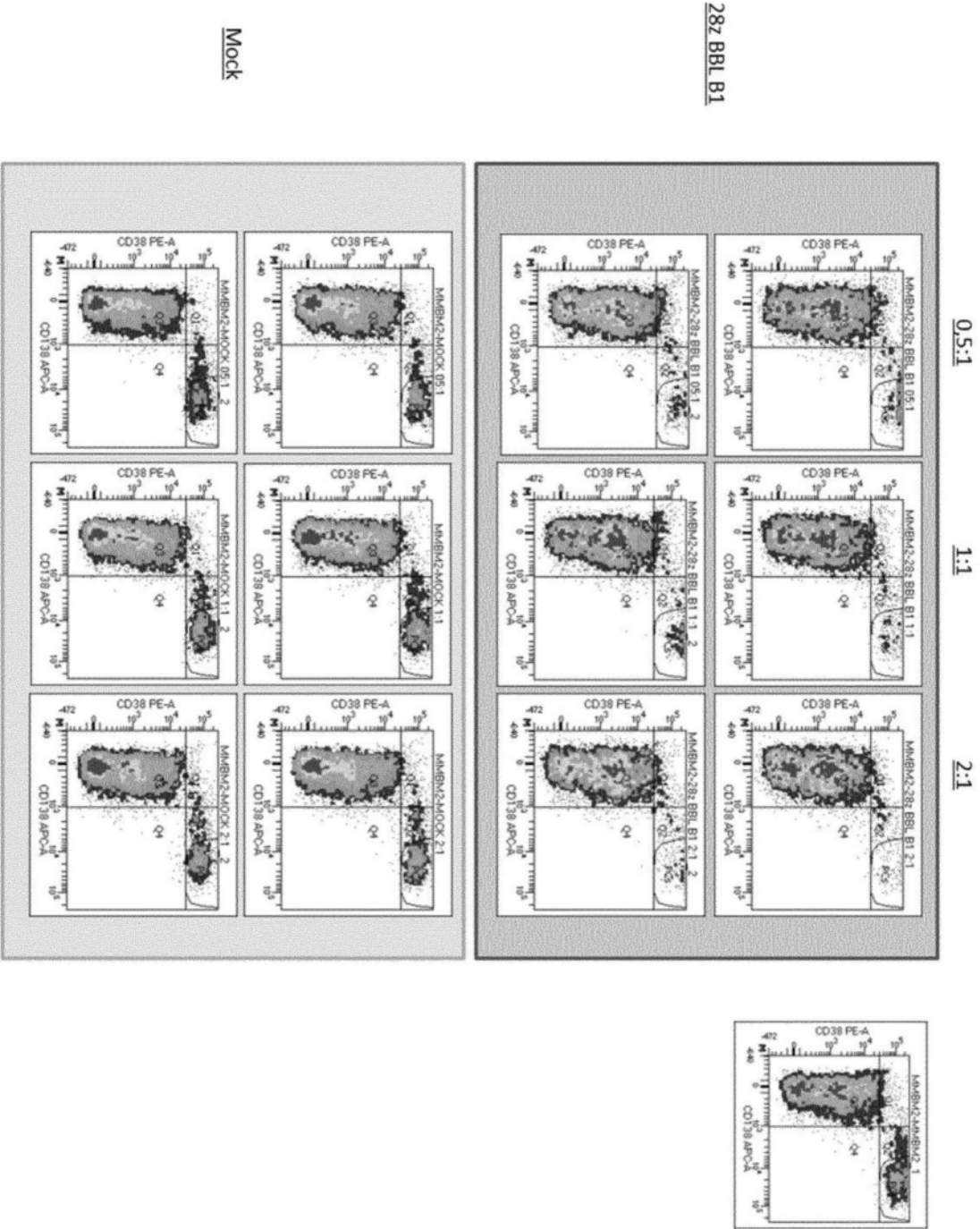


图26