



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115551891 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202180032322.2

(22) 申请日 2021.03.02

(30) 优先权数据

62/984,139 2020.03.02 US

63/084,138 2020.09.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/020511 2021.03.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/178430 EN 2021.09.10

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伊冯娜·于-轩·陈 陈希敏

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书17页 说明书89页 附图71页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的嵌合抗原受体及相关方法和组合物

(57) 摘要

本公开内容的一些方面涉及新的scFv分子，其可用于并入至具有增强抗肿瘤活性的新的嵌合抗原受体中。另一些方面涉及包含CAR的多肽，所述CAR以从氨基近端到羧基近端的顺序包含scFv、跨膜结构域、扭转接头和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区，其中扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。还描述了包含编码本公开内容的多肽的序列的核酸、载体（例如包含本公开内容的核酸的慢病毒载体）、包含和/或表达本公开内容的核酸和/或多肽的细胞以及包含本公开内容的细胞实施方案的细胞群体。还提供了制备表达多肽的细胞的方法以及用本公开内容的多肽和细胞组合物治疗患者的方法。

1. 包含抗CD20单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

2. 包含抗CD20单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:6的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

3. 权利要求1或2所述的多肽,其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:5的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

4. 权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11的氨基酸序列。

5. 包含抗CD20 scFv的多肽,其包含:

轻链可变区,其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3和LFR4;和

重链可变区,其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3和HFR4;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

6. 包含抗CD20单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

7. 权利要求5或6所述的多肽,其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

8. 权利要求5至7中任一项所述的多肽,其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23的氨基酸序列。

9. 权利要求1至4中任一项所述的多肽,其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

10. 权利要求9所述的多肽,其中VL包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

11. 权利要求5至8中任一项所述的多肽,其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

12. 权利要求11所述的多肽,其中VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

13. 包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:136、137、138、139、113、114和115具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:132、133、134、135、110、111和112

具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

14. 包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

15. 权利要求13至14中任一项所述的多肽,其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

16. 权利要求13至15中任一项所述的多肽,其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:141具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:140具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

17. 权利要求16所述的多肽,其中VL包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列。

18. 包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:120、121、122、123、129、130和131具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:116、117、118、119、126、127和128具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

19. 包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列；并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

20. 权利要求13至14中任一项所述的多肽，其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

21. 权利要求18至20中任一项所述的多肽，其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:144具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:143具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

22. 权利要求21所述的多肽，其中VL包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列。

23. 权利要求1至22中任一项所述的多肽，其中所述多肽包含在所述VH和VL之间的接头。

24. 权利要求23所述的多肽，其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

25. 权利要求23所述的多肽，其中所述接头包含至少4个甘氨酸和/或丝氨酸残基。

26. 权利要求23至25中任一项所述的多肽，其中所述接头包含(GGGGS)_n，其中n为1、2、3、4、5或6。

27. 权利要求24至26中任一项所述的多肽，其中所述接头包含GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO:32)。

28. 权利要求23或24所述的多肽，其中所述接头包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成：(EAAAK)_n，其中n为1、2、3、4、5或6。

29. 权利要求24至26中任一项所述的多肽，其中所述接头包含GGGGS。

30. 权利要求23至26中任一项所述的多肽，其中所述接头是(GGGGS)₄。

31. 权利要求1至30中任一项所述的多肽，其中所述VH在所述VL的氨基近端。

32. 权利要求1至30中任一项所述的多肽，其中所述VH在所述VL的羧基近端。

33. 权利要求1至32中任一项所述的多肽，其中所述多肽包含嵌合抗原受体(CAR)，所述嵌合抗原受体(CAR)包含所述scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区。

34. 权利要求1至32中任一项所述的多肽，其中所述多肽包含单个跨膜结构域和/或包含含有初级胞内信号传导结构域的单个胞质区。

35. 权利要求33或34所述的多肽，其中所述多肽以从氨基近端到羧基近端的顺序包含所述scFv、所述跨膜结构域和所述包含初级胞内信号传导结构域的胞质区。

36. 权利要求33或34所述的多肽，其中所述CAR是单特异性的。

37. 权利要求33至36中任一项所述的多肽，其中所述CAR还包含在所述跨膜结构域和所述scFv之间的胞外间隔区。

38. 权利要求37所述的多肽，其中所述胞外间隔区的长度为8至1000个氨基酸。

39. 权利要求38所述的多肽，其中所述胞外间隔区的长度为8至500个氨基酸。

40. 权利要求39所述的多肽，其中所述胞外间隔区的长度为100至300个氨基酸。

41. 权利要求39所述的多肽,其中所述胞外间隔区具有少于100个氨基酸。
42. 权利要求37至41中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区是IgG4铰链、CD8 α 铰链、IgG1铰链、CD34铰链、或其片段。
43. 权利要求42所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含IgG4铰链或其片段。
44. 权利要求37至43中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含或还包含CH1区、CH2区和/或CH3区。
45. 权利要求44所述的多肽,其中所述间隔区包含IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区或由IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区组成。
46. 权利要求44或45所述的多肽,其中所述CH2区包含L235E和/或N297Q替换。
47. 权利要求42至46中任一项所述的多肽,其中所述间隔区包含与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。
48. 权利要求33至47中任一项所述的多肽,其中所述跨膜结构域是T细胞受体的 α 或 β 链,CD28、CD3 ϵ (epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。
49. 权利要求48所述的多肽,其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。
50. 权利要求48所述的多肽,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。
51. 权利要求33至50中任一项所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域是CD3- ζ 。
52. 权利要求51所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。
53. 权利要求33至51中任一项所述的多肽,其中所述胞质区还包含一个或更多个共刺激结构域。
54. 权利要求33至53中任一项所述的多肽,其中所述胞质区包含两个共刺激结构域。
55. 权利要求53或54所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自4-1BB (CD137)、CD28、IL-15R α 、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) 和/或ICOS (CD278) 中的一个或更多个的共刺激结构域。
56. 权利要求55所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自CD28的共刺激结构域。
57. 权利要求56所述的多肽,其中所述共刺激结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。
58. 权利要求33至57中任一项所述的多肽,其中所述多肽还包含在所述跨膜结构域和所述胞质区之间的扭转接头。
59. 权利要求58所述的多肽,其中所述扭转接头包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基。
60. 权利要求59所述的多肽,其中所述氨基酸残基包含丙氨酸残基或由其组成。
61. 权利要求59所述的多肽,其中所述扭转接头由2或4个丙氨酸残基组成。
62. 包含CAR的多肽,所述CAR以从氨基近端到羧基近端的顺序包含scFv、跨膜结构域、扭转接头和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区,其中所述扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。

酸残基。

63. 权利要求62所述的多肽,其中所述扭转接头包含2或4个丙氨酸残基或者由2或4个丙氨酸残基组成。

64. 权利要求62或63所述的多肽,其中所述scFv包含VH和VL,并且其中在所述VH和VL之间存在接头。

65. 权利要求64所述的多肽,其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

66. 权利要求64所述的多肽,其中所述接头包含至少4个甘氨酸和/或丝氨酸残基。

67. 权利要求64至66中任一项所述的多肽,其中所述接头包含(GGGGS)_n,其中n为1、2、3、4、5或6。

68. 权利要求65至66中任一项所述的多肽,其中所述接头包含GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO:32)。

69. 权利要求64或65所述的多肽,其中所述接头包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:(EAAAK)_n,其中n为1、2、3、4、5或6。

70. 权利要求65至67中任一项所述的多肽,其中所述接头包含GGGGS。

71. 权利要求64至67中任一项所述的多肽,其中所述接头是(GGGGS)₄。

72. 权利要求62至71中任一项所述的多肽,其中所述VH在所述VL的氨基近端。

73. 权利要求62至71中任一项所述的多肽,其中所述VH在所述VL的羧基近端。

74. 权利要求62至73中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含单个跨膜结构域和/或包含含有初级胞内信号传导结构域的单个胞质区。

75. 权利要求62至74中任一项所述的多肽,其中所述CAR是单特异性的。

76. 权利要求62至74中任一项所述的多肽,其中所述CAR是双特异性的。

77. 权利要求62至76中任一项所述的多肽,其中所述CAR还包含在所述跨膜结构域和所述scFv之间的胞外间隔区。

78. 权利要求77所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为8至1000个氨基酸。

79. 权利要求78所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为8至500个氨基酸。

80. 权利要求79所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为100至300个氨基酸。

81. 权利要求79所述的多肽,其中所述胞外间隔区具有少于100个氨基酸。

82. 权利要求77至81中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区是IgG4铰链、CD8α铰链、IgG1铰链、CD34铰链、或其片段。

83. 权利要求82所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含IgG4铰链或其片段。

84. 权利要求77至83中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含或还包含CH1区、CH2区和/或CH3区。

85. 权利要求84所述的多肽,其中所述间隔区包含IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区或由IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区组成。

86. 权利要求84或85所述的多肽,其中所述CH2区包含L235E和/或N297Q替换。

87. 权利要求82至86中任一项所述的多肽,其中所述间隔区包含与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

88. 权利要求62至87中任一项所述的多肽,其中所述跨膜结构域是T细胞受体的α或β链,CD28、CD3ε (epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、

CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

89. 权利要求88所述的多肽,其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

90. 权利要求89所述的多肽,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

91. 权利要求62至90中任一项所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域是CD3- ζ 。

92. 权利要求91所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

93. 权利要求62至92中任一项所述的多肽,其中所述胞质区还包含一个或更多个共刺激结构域。

94. 权利要求62至93中任一项所述的多肽,其中所述胞质区包含两个共刺激结构域。

95. 权利要求93或94所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自4-1BB (CD137)、CD28、IL-15R α 、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) 和/或ICOS (CD278) 中的一个或更多个的共刺激结构域。

96. 权利要求95所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自CD28的共刺激结构域。

97. 权利要求96所述的多肽,其中所述共刺激结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

98. 权利要求62至97中任一项所述的多肽,其中所述scFv是杂合scFv,其包含框架区 (FR) 和互补决定区 (CDR),所述框架区 (FR) 和互补决定区 (CDR) 来源于结合同一抗原的不同抗原结合区或抗体。

99. 权利要求98所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于源自同一物种的抗原结合区或抗体。

100. 权利要求98或99所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于人的抗原结合区或抗体。

101. 权利要求98至100中任一项所述的多肽,其中包含所述杂合scFv的多肽的免疫原性与包含非杂合scFv的多肽的免疫原性相比没有显著差异,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,或者其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

102. 权利要求98至101中任一项所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于具有不同强直信号传导强度的抗原结合区或抗体。

103. 权利要求102所述的多肽,其中所述FR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述CDR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

104. 权利要求102所述的多肽,其中所述CDR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述FR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

105. 权利要求98至104中任一项所述的多肽,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

106. 权利要求98至105中任一项所述的多肽,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相

比具有提高的肿瘤细胞清除活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

107. 权利要求62至106中任一项所述的多肽,其中所述scFv包含抗CD20 scFv。

108. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

109. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:6的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

110. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:24、13和25的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:9、10和23的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

111. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:3的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:4的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

112. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区,其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3和LFR4;和

重链可变区,其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3和HFR4;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23具有至少90%序列同

一性的氨基酸序列。

113. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

114. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:9、10和11的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

115. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:1的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:2的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

116. 权利要求62至97中任一项所述的多肽,其中所述scFv包含抗GD2 scFv。

117. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:136、137、138、139、113、114和115具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:132、133、134、135、110、111和112具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

118. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:140的可变区的

HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

119. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:120、121、122、123、129、130和131具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:116、117、118、119、126、127和128具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

120. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区(VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和

重链可变区(VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

121. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:129、130和131的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:126、127和128的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

122. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:125的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:124的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

123. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:113、114和115的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:110、111和112的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

124. 权利要求116所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:109的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:108的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

125. 包含CAR的多肽,所述CAR以从氨基近端到羧基近端的顺序包含:包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导的胞质区;其中所述scFv是杂合scFv,其包含框架区(FR)和互补决定区(CDR),所述框架区(FR)和互补决定区(CDR)来源于结合同一抗原的不同抗原结合区或抗体。

126. 权利要求125所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于源自同一物种的抗原结合区或抗体。

127. 权利要求125或126所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于人或人源化的抗原结合区或抗体。

128. 权利要求125至127中任一项所述的多肽,其中包含所述杂合scFv的多肽的免疫原性与包含非杂合scFv的多肽的免疫原性相比没有显著差异,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,或者其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

129. 权利要求125至128中任一项所述的多肽,其中所述FR和CDR来源于具有不同强直信号传导强度的抗原结合区或抗体。

130. 权利要求129所述的多肽,其中所述FR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述CDR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

131. 权利要求129所述的多肽,其中所述CDR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述FR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

132. 权利要求125至131中任一项所述的多肽,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

133. 权利要求125至132中任一项所述的多肽,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤细胞清除活性,其中所述非杂合scFv于所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

134. 权利要求125至133中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含在所述跨膜结构域和所述胞质区之间的扭转接头,并且其中所述扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。

135. 权利要求134所述的多肽,其中所述扭转接头包含2或4个丙氨酸残基或者由2或4个丙氨酸残基组成。

136. 权利要求134或135所述的多肽,其中所述scFv包含VH和VL,并且其中在所述VH和VL之间存在接头。

137. 权利要求136所述的多肽,其中所述接头的长度为4至40个氨基酸。

138. 权利要求137所述的多肽,其中所述接头包含至少4个甘氨酸和/或丝氨酸残基。

139. 权利要求136至138中任一项所述的多肽,其中所述接头包含 $(GGGGS)_n$, 其中n为1、2、3、4、5或6。

140. 权利要求136至139中任一项所述的多肽,其中所述接头包含GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO:32)。

141. 权利要求125至140中任一项所述的多肽,其中所述VH在所述VL的氨基近端。

142. 权利要求125至140中任一项所述的多肽,其中所述VH在所述VL的羧基近端。

143. 权利要求125至142中任一项所述的多肽,其中所述CAR是单特异性的。

144. 权利要求125至142中任一项所述的多肽,其中所述CAR是双特异性的。

145. 权利要求125至144中任一项所述的多肽,其中所述CAR还包含在所述跨膜结构域

和所述scFv之间的胞外间隔区。

146. 权利要求145所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为8至1000个氨基酸。

147. 权利要求145所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为8至500个氨基酸。

148. 权利要求145所述的多肽,其中所述胞外间隔区的长度为100至300个氨基酸。

149. 权利要求145所述的多肽,其中所述胞外间隔区具有少于100个氨基酸。

150. 权利要求145至149中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区是IgG4铰链、CD8 α 铰链、IgG1铰链、CD34铰链、或其片段。

151. 权利要求150所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含IgG4铰链或其片段。

152. 权利要求145至152中任一项所述的多肽,其中所述胞外间隔区包含或还包含CH1区、CH2区和/或CH3区。

153. 权利要求152所述的多肽,其中所述间隔区包含IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区或由IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区组成。

154. 权利要求152或153所述的多肽,其中所述CH2区包含L235E和/或N297Q替换。

155. 权利要求154中任一项所述的多肽,其中所述间隔区包含与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

156. 权利要求125至155中任一项所述的多肽,其中所述跨膜结构域是T细胞受体的 α 或 β 链,CD28、CD3 ϵ (epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

157. 权利要求156所述的多肽,其中所述跨膜结构域是CD28跨膜结构域。

158. 权利要求157所述的多肽,其中所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

159. 权利要求125至158中任一项所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域是CD3- ζ 。

160. 权利要求159所述的多肽,其中所述初级胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

161. 权利要求125至160中任一项所述的多肽,其中所述胞质区还包含一个或更多个共刺激结构域。

162. 权利要求125至161中任一项所述的多肽,其中所述胞质区包含两个共刺激结构域。

163. 权利要求161或162所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自4-1BB (CD137)、CD28、IL-15R α 、OX40、CD2、CD27、CD28、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) 和/或ICOS (CD278) 中的一个或更多个的共刺激结构域。

164. 权利要求161至163中任一项所述的多肽,其中所述一个或更多个共刺激结构域包含来自CD28的共刺激结构域。

165. 权利要求164所述的多肽,其中所述共刺激结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。

166. 权利要求125至165中任一项所述的多肽,其中所述scFv包含抗CD20 scFv。

167. 权利要求166所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL), 其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 轻链框

架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4); 和

重链可变区 (VH), 其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14具有至少90%序列同一性的氨基酸序列; 并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

168. 权利要求166所述的多肽, 其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL), 其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4); 和

重链可变区 (VH), 其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列; 并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:6的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

169. 权利要求166所述的多肽, 其中所述scFv包含: VL, 其包含分别SEQ ID NO:24、13和25的LCDR1、LCDR2和LCDR3; 以及VH, 其包含分别SEQ ID NO:9、10和23的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

170. 权利要求166所述的多肽, 其中所述scFv包含VL和VH, 所述VL包含SEQ ID NO:3的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3, 所述VH包含SEQ ID NO:4的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

171. 权利要求166所述的多肽, 其中所述scFv包含:

轻链可变区, 其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3和LFR4; 和

重链可变区, 其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3和HFR4;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25具有至少90%序列同一性的氨基酸序列; 并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

172. 权利要求166所述的多肽, 其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL), 其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4); 和

重链可变区 (VH), 其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含: 重链框

架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4) ;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

173. 权利要求166所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:9、10和11的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

174. 权利要求166所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:1的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:2的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

175. 权利要求125至165中任一项所述的多肽,其中所述scFv包含抗GD2 scFv。

176. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4) ;和

重链可变区 (VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4) ;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:136、137、138、139、113、114和115具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:132、133、134、135、110、111和112具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

177. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4) ;和

重链可变区 (VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4) ;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

178. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4) ;和

重链可变区 (VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框

架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4) ;

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:120、121、122、123、129、130和131具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:116、117、118、119、126、127和128具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

179. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:

轻链可变区 (VL),其以从所述轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4);和

重链可变区 (VH),其以从所述重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);

其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

180. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:129、130和131的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:126、127和128的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

181. 权利要求107所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:125的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:124的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

182. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含:VL,其包含分别SEQ ID NO:113、114和115的LCDR1、LCDR2和LCDR3;以及VH,其包含分别SEQ ID NO:110、111和112的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

183. 权利要求175所述的多肽,其中所述scFv包含VL和VH,所述VL包含SEQ ID NO:109的可变区的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述VH包含SEQ ID NO:108的可变区的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

184. 核酸,其包含编码权利要求1至183中任一项所述的多肽的序列。

185. 权利要求184所述的核酸,其中所述核酸是表达构建体。

186. 权利要求185所述的核酸,其中所述表达构建体是病毒载体。

187. 权利要求186所述的核酸,其中所述病毒载体包含来源于逆转录病毒的逆转录病毒载体。

188. 权利要求187所述的核酸,其中所述病毒载体是慢病毒载体或来源于慢病毒的载体。

189. 慢病毒载体,其包含编码权利要求1至183中任一项所述的多肽的序列。

190. 细胞,其包含权利要求184至189中任一项所述的核酸。

191. 细胞,其包含权利要求190所述的核酸,其中所述病毒载体已整合至所述细胞的基

基因组中。

192. 细胞,其表达权利要求1至183中任一项所述的多肽。

193. 权利要求190至192中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、造血干细胞或祖细胞(HSPC)、脐带血细胞或诱导多能干细胞(iPS细胞)。

194. 权利要求193所述的细胞,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

195. 权利要求194所述的细胞,其中所述T细胞包含初始记忆T细胞。

196. 权利要求195所述的细胞,其中所述初始记忆T细胞包含CD4⁺或CD8⁺T细胞。

197. 细胞群体,其包含权利要求190至196中任一项所述的细胞。

198. 权利要求197所述的细胞群体,其中所述群体包含 10^3 至 10^8 个细胞。

199. 组合物,其包含权利要求1至183中任一项所述的多肽、权利要求184至189中任一项所述的核酸、权利要求190至196中任一项所述的细胞、或者权利要求197或198所述的细胞群体。

200. 制备表达多肽的细胞的方法,其包括将权利要求184至189中任一项所述的核酸引入到细胞中。

201. 制备CAR的方法,其包括将扭转接头引入到CAR的跨膜结构域与胞质结构域之间;其中所述扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。

202. 制备具有杂合scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区的CAR的方法,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和所述第二抗原结合区或抗体结合同一抗原。

203. 权利要求202所述的方法,其中所述FR和CDR来源于源自同一物种的抗原结合区或抗体。

204. 权利要求202或203所述的方法,其中所述FR和CDR来源于人的抗原结合区或抗体。

205. 权利要求202至204中任一项所述的方法,其中所述FR和CDR来源于具有不同强直信号传导强度的抗原结合区或抗体。

206. 权利要求205所述的方法,其中所述FR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述CDR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

207. 权利要求205所述的方法,其中所述CDR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于所述FR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。

208. 权利要求202至207中任一项所述的方法,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

209. 权利要求202至208中任一项所述的方法,其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤细胞清除活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中所述多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中所述非杂合scFv与所述杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。

210. 权利要求200至209中任一项所述的方法,其中所述细胞被编码所述多肽的病毒感

染。

211. 权利要求210所述的方法,其中所述病毒包含慢病毒或者慢病毒来源的病毒或载体。

212. 权利要求200至211中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(iPS细胞)。

213. 权利要求212所述的方法,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

214. 权利要求213所述的方法,其中所述T细胞包含初始记忆T细胞。

215. 权利要求214所述的方法,其中所述初始记忆T细胞包含CD4+或CD8+T细胞。

216. 权利要求213至215中任一项所述的方法,其中所述细胞还不是T细胞或NK细胞,所述方法还包括在促进所述细胞分化成T细胞或NK细胞的条件下培养所述细胞。

217. 权利要求200至216中任一项所述的方法,其还包括在将所述核酸引入所述细胞之前和或之后在扩增所述细胞的条件下培养所述细胞。

218. 权利要求217所述的方法,其中将所述细胞用无血清培养基培养。

219. 细胞,其通过权利要求200或203至218中任一项所述的方法来制备。

220. CAR,其通过权利要求201至218中任一项所述的方法来制备。

221. 用于筛选CAR的方法,其包括:

提供具有杂合scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区的CAR,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和所述第二抗原结合区或抗体结合同一抗原;以及评价所述CAR的功能。

222. 权利要求221所述的方法,其中评价所述CAR的功能包括评价所述CAR的强直信号传导强度。

223. 权利要求222所述的方法,其中评价所述强直信号传导强度包括通过针对激活标志物的抗体染色进行的表达评价和/或CDV稀释测定。

224. 权利要求221至223中任一项所述的方法,其中评价所述CAR的功能包括确定肿瘤杀伤效力、肿瘤清除效力、体内存活、体内肿瘤清除、体内肿瘤负荷降低中的一种或更多种。

225. 权利要求221至224中任一项所述的方法,其中所述方法包括或还包括制备具有杂合scFv的CAR,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和所述第二抗原结合区或抗体结合同一抗原。

226. 治疗患有癌症的患者的方法,其包括向所述患者施用有效量的权利要求199所述的组合物。

227. 权利要求226所述的方法,其中所述方法用于在患有癌症的患者中治疗癌症。

228. 权利要求226或227所述的方法,其中所述方法还包括向所述患者施用另外的治疗。

229. 权利要求228所述的方法,其中所述另外的治疗包含免疫治疗。

230. 权利要求226至229中任一项所述的方法,其中所述癌症包含淋巴瘤或神经母细胞瘤。

用于治疗癌症的嵌合抗原受体及相关方法和组合物

[0001] 背景

[0002] 本申请要求2020年3月2日提交的美国临时申请No.62/984,139和2020年9月28日提交的美国临时申请No.63/084,138的优先权权益,其在此通过引用其整体并入。

I. 发明领域

[0003] 本发明一般性地涉及分子生物学和免疫治疗的领域。

II. 背景技术

[0004] CD20是针对B细胞恶性病的经临床经验验证的靶标。靶向CD20的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)-T细胞已经过临床测试,并且被证明是安全的,但不如针对B细胞淋巴瘤的CD19 CAR-T细胞治疗有效。先前的数篇出版物记明,CD19 CAR独特效力的主要原因是其缺乏强直信号传导。具体地,已经认为即使在不存在抗原刺激的情况下大多数CAR也表现出基本的信号传导,该“强直信号传导”行为引发过早的T细胞功能障碍,以及CD19 CAR具有独特的效力是因为其不进行强直信号传导,并因此不引起过早的T细胞功能障碍。此外还提出了,CAR强直信号传导是CAR分子在T细胞表面上的抗原非依赖性簇聚的结果,并且这种簇聚行为是CAR的scFv结构域的特定序列的结果。存在对改善的CAR的需要,所述改善的CAR潜在地通过调节CAR的强直信号传导行为来支持稳健的T细胞介导的抗肿瘤功能。

[0005] 发明概述

[0006] 一些实施方案涉及包含嵌合抗原受体、编码嵌合抗原受体的核酸和能够表达嵌合抗原受体的细胞的组合物,以及工程化和/或产生嵌合抗原受体的方法和使用这些组合物的方法。因此,本公开内容的组合物和方法提供了用于重新设计具有提高的体内效力的CAR的方法和可用于本公开内容的另外的方法中的所得的CAR。

[0007] 本公开内容的一些方面涉及包含抗CD20单链可变片段(single chain variable fragment,scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(light chain variable region,VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(light chain framework region 1,LFR1)、轻链互补决定区1(light chain complementarity-determining region 1,LCDR1)、轻链框架区2(light chain framework region 2,LFR2)、轻链互补决定区2(light chain complementarity-determining region 2,LCDR2)、轻链框架区3(light chain framework region 3,LFR3)、轻链互补决定区3(light chain complementarity-determining region 3,LCDR3)和轻链框架区4(light chain framework region 4,LFR4);以及重链可变区(heavy chain variable region,VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(heavy chain framework region 1,HFR1)、重链互补决定区1(heavy chain complementarity-determining region 1,HCDR1)、重链框架区2(heavy chain framework region 2,HFR2)、重链互补决定区2(heavy chain complementarity-determining region 2,HCDR2)、重链框架区3(heavy chain framework

region 3,HFR3)、重链互补决定区3 (heavy chain complementarity-determining region 3,HCDR3) 和重链框架区4 (heavy chain framework region 4,HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0008] 另一些方面涉及包含抗CD20 scFv的多肽,其包含:轻链可变区,其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3和LFR4;和重链可变区,其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3和HFR4;其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0009] 另一些方面涉及包含抗CD20单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:6的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0010] 还描述了包含抗CD20单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框架区2(HFR2)、重链互补决定区2(HCDR2)、重链框架区3(HFR3)、重链互补决定区3(HCDR3)和重链框架区4(HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0011] 另一些方面涉及包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1(LFR1)、轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链框架区2(LFR2)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链框架区3(LFR3)、轻链互补决定区3(LCDR3)和轻链框架区4(LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1(HFR1)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链框

架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:136、137、138、139、113、114和115具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:132、133、134、135、110、111和112具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0012] 还描述了包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0013] 另一些方面涉及包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:120、121、122、123、129、130和131具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:116、117、118、119、126、127和128具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0014] 还描述了包含抗GD2单链可变片段(scFv)的多肽,其包含:轻链可变区(VL),其以从轻链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:轻链框架区1 (LFR1)、轻链互补决定区1 (LCDR1)、轻链框架区2 (LFR2)、轻链互补决定区2 (LCDR2)、轻链框架区3 (LFR3)、轻链互补决定区3 (LCDR3) 和轻链框架区4 (LFR4);和重链可变区(VH),其以从重链可变区的氨基近端到羧基近端的顺序包含:重链框架区1 (HFR1)、重链互补决定区1 (HCDR1)、重链框架区2 (HFR2)、重链互补决定区2 (HCDR2)、重链框架区3 (HFR3)、重链互补决定区3 (HCDR3) 和重链框架区4 (HFR4);其中LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0015] 本公开内容的一些方面还涉及包含CAR的多肽,所述CAR以从氨基近端到羧基近端的顺序包含:包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的scFv、跨膜结构域和包含初级胞内

信号传导结构域的胞质区;其中scFv是杂合scFv,其包含来源于结合同一抗原的不同的抗原结合区或抗体的框架区(frame region,FR)和互补决定区(complementarity-determining region,CDR)。

[0016] 另一些方面涉及包含CAR的多肽,所述CAR以从氨基近端到羧基近端的顺序包含scFv、跨膜结构域、扭转接头和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区,其中所述扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。

[0017] 本公开内容的一些方面涉及制备CAR的方法,其包括将扭转接头引入至CAR的跨膜结构域和胞质结构域之间;其中所述扭转接头包含1至12个丙氨酸残基。还描述了制备具有杂合scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区的CAR的方法,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和第二抗原结合区或抗体结合同一抗原。产生这些CAR的方法可包括或可还包括使包含编码一种或更多种这些经设计CAR的核酸的细胞增殖。在一些实施方案中,CAR包含来自强直信号传导强度不同的抗体或抗原结合区的FR和CDR。

[0018] 还描述了包含编码本公开内容的多肽的序列的核酸、载体(例如包含本公开内容的核酸的慢病毒载体)、包含和/或表达本公开内容的核酸和/或多肽的细胞,以及包含本公开内容的细胞实施方案的细胞群体。另一些实施方案涉及包含本公开内容的多肽、核酸、细胞和细胞群体的组合物和可药用制剂。还提供了制备表达多肽的细胞的方法,该方法包括将本公开内容的核酸引入到细胞中。还描述了通过本公开内容的方法制备的细胞、多肽和CAR。又一些方面涉及治疗患有癌症的患者,其包括向患者施用有效量的本公开内容的组合物。

[0019] 另一些方面涉及用于筛选CAR的方法,其包括:提供具有杂合scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区的CAR,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和第二抗原结合区或抗体结合同一抗原;以及评价、确定或测量CAR的功能。

[0020] 在一些实施方案中,评价、确定或测量CAR的功能包括评价CAR的强直信号传导强度。在一些实施方案中,评价、确定或测量强直信号传导强度包括通过针对激活标志物的抗体染色进行的表达评价和/或CDV稀释测定。在一些实施方案中,评价、确定或测量CAR的功能包括确定肿瘤杀伤效力、肿瘤清除效力、体内存活、体内肿瘤清除、体内肿瘤负荷减少中的一种或更多种。在一些实施方案中,所述方法可包括或可还包括制备具有杂合scFv的CAR,其包括将来源于第一抗原结合区或抗体的CDR与来源于第二抗原结合区或抗体的FR组合,其中所述第一抗原结合区或抗体和第二抗原结合区或抗体结合同一抗原。

[0021] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、

76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3包含分别与SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列;并且其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3包含分别与SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0023] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域的至少一部分,例如各自的CDR,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方案中,预期scFv包含重链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3以及轻链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3。还预期CDR1、CDR2或CDR3可包含本文提供的以SEQ ID NO列出的分别作为CDR1、CDR2或CDR3的序列或由其组成。CDR还可包含在特定CDR序列的一侧或两侧侧翼的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、16、18、19、20、21、22、23个或更多个连续氨基酸残基(或其中可推导出的任何范围);因此,在特定CDR序列的N端或C端可存在一个或更多个另外的氨基酸,例如SEQ ID NO:9至14、23、24、25、110至115和126至131中所示的那些。在一些实施方案中,还预期scFv包含重链可变区的HFR1、HFR2、HFR3和/或HFR4以及轻链可变区的LFR1、LFR2、LFR3和/或LFR4。FR是在CDR侧翼的区域。例如,scFv可包含重链可变区,其从氨基端到羧基端包含HFR1、HCDR1、HFR2、HCDR2、HFR3、HCDR3和HFR4。类似地,scFv可包含轻链可变区,其从氨基端到羧基端包含LFR1、LCDR1、LFR2、LCDR2、LFR3、LCDR3和LFR4。还预期HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR2或LFR4可包含本文中提供的以SEQ ID NO列出的分别作为HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR2或LFR4的序列或由其组成。FR还可包含在特定FR序列的一侧或两侧侧翼的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、16、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续氨基酸残基(或其中可推导出的任何范围);因此,在特定FR序列的N端或C端可存在一个或更多个另外的氨基酸,例如SEQ IDNO:15至22、26至31、116至123和132至139中所示的那些。

[0024] 在一些实施方案中,LFR1包含与SEQ ID NO:29具有、具有至少、至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR2包含与SEQ IDNO:30具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、

88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR3包含与SEQ ID NO:31具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR4包含与SEQ ID NO:22具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR1包含与SEQ ID NO:12具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR2包含与SEQ ID NO:13具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR3包含与SEQ ID NO:14具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR1包含与SEQ ID NO:26具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR2包含与SEQ ID NO:27具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR3包含与SEQ ID NO:28具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR4包含与SEQ ID NO:18具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推

导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR1包含与SEQ ID NO:9具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR2包含与SEQ ID NO:10具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR3包含与SEQ ID NO:11具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:29、30、31、22、12、13和14的氨基酸序列,并且HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:26、27、28、18、9、10和11的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:19、20、21、22、24、13和25的氨基酸序列;并且HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:15、16、17、18、9、10和23的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一些的实施方案中,VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,LFR1包含与SEQ ID NO:19具有至少、至多、正好或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR2包含与SEQ ID NO:20具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR3包含与SEQ ID NO:21具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR4包含与SEQ ID NO:22具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)序列同一性的氨基酸序列。在一些

实施方案中,LCDR1包含与SEQ ID NO:24具有、具有至少或具有至多60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LCDR2包含与SEQ ID NO:13具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LCDR3包含与SEQ ID NO:25具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR1包含与SEQ ID NO:15具有至少、至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR2包含与SEQ ID NO:16具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR3包含与SEQ ID NO:17具有、具有至少或具有至多60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR4包含与SEQ ID NO:18具有、具有至少或具有至多60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR1包含与SEQ ID NO:9具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR2包含与SEQ ID NO:10具有、具有至少或具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR3包含与SEQ ID NO:23具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、

65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:5具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列,并且重链可变区包含与SEQ ID NO:6具有、具有至少或具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少、至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列,并且重链可变区包含与SEQ ID NO:8具有、具有至少或具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,LFR1包含与SEQ ID NO:136具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR2包含与SEQ ID NO:137具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LFR3包含与SEQ ID NO:138具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,

LFR4包含与SEQ ID NO:139具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LCDR1包含与SEQ ID NO:113具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LCDR2包含与SEQ ID NO:114具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,LCDR3包含与SEQ ID NO:115具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR1包含与SEQ ID NO:132具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR2包含与SEQ ID NO:133具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR3包含与SEQ ID NO:134具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HFR4包含与SEQ ID NO:135具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR1包含与SEQ ID NO:110具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,HCDR2包含与SEQ ID NO:111具有、具有至少、具有至多或约60%、

61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HCDR3包含与SEQ ID NO:112具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中, LFR1包含与SEQ ID NO:120具有、具有至少、至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR2包含与SEQ ID NO:121具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR3包含与SEQ ID NO:122具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR4包含与SEQ ID NO:123具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR1包含与SEQ ID NO:129具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR2包含与SEQ ID NO:130具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, LCDR3包含与SEQ ID NO:131具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR1包含与SEQ ID NO:116具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、

64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR2包含与SEQ ID NO:117具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR3包含与SEQ ID NO:118具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HFR4包含与SEQ ID NO:119具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HCDR1包含与SEQ ID NO:126具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HCDR2包含与SEQ ID NO:127具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中, HCDR3包含与SEQ ID NO:128具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中, LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:136、137、138、139、113、114和115的氨基酸序列, 并且HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:132、133、134、135、110、111和112的氨基酸序列。在一些实施方案中, LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3分别包含SEQ ID NO:120、121、122、123、129、130和131的氨基酸序列; 并且HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3分别包含SEQ ID NO:116、117、118、119、126、127和128的氨基酸序列。在一些实施方案中, VL包含SEQ ID NO:141的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列。在另一些实施方案中, VL包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列并且VH包含SEQ ID NO:143的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方案中, 轻链可变区包含与SEQ ID NO:141具有至少90%序列同一性

的氨基酸序列,并且重链可变区包含与SEQ ID NO:140具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:141具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列,并且重链可变区包含与SEQ ID NO:140具有、具有至少或具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:144具有至少90%序列同一性的氨基酸序列并且重链可变区包含与SEQ ID NO:143具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:144具有、具有至少、具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列,并且重链可变区包含与SEQ ID NO:143具有、具有至少、或具有至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其中可推导出的任何范围) 序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:5的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列,和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:5的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:7的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列,和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:8的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:141的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列,和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:140的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方案中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3包含来自SEQ ID NO:144的可变区的LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3的氨基酸序列,和/或者其中HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3包含来自SEQ ID NO:143的可变区的HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、HCDR1、HCDR2和/或HCDR3的氨基酸序列。

[0038] 本公开内容的scFv可以是杂合scFv。术语“杂合”是指scFv具有来自一种抗原结合区或抗体(例如scFv的抗原结合区、抗体、纳米抗体或其他抗体来源的抗原结合片段)的

LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、HFR1、HFR2、HFR3和HFR4,并具有来自不同抗原结合区或抗体(例如 scFv 的抗原结合区、抗体、纳米抗体或其他抗体来源的抗原结合片段)的LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3。在杂合scFv中,LFR1、LFR2、LFR3、LFR4、HFR1、HFR2、HFR3和HFR4来自第一抗原结合区,并且LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3来自第二抗原结合区。因此,一种抗原结合分子的CDR区以其相应的顺序接枝到另一种抗原结合分子的FR上。这通过本文的实施方案进一步例证,该实施方案表明将一种抗体的VH和VL区的FR与另一种抗体的VH和VL区的CDR组合。CDR和FR不需要直接来源于抗体,但是可来源于包含VH和VL区的任何抗原结合片段,例如另一种scFv、纳米抗体、TCR以及本领域已知的和本文描述的其他抗原结合区。在杂合CAR的FR或CDR中,所述杂合体还可包含、包含至多或包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个替换(或其中可推导出的任何范围)。本公开内容的杂合scFv是结合同一抗原的两种不同的抗原结合区或抗体的杂合体。在一些实施方案中,两种不同的抗原结合区或抗体结合同一抗原上的不同表位。在一些实施方案中,两种不同的抗原结合区或抗体结合同一抗原上的重叠表位。在一些实施方案中,两种不同的抗原结合区或抗体结合抗原上的同一表位。杂合scFv可以是来自同一物种的两种不同抗原结合区或抗体的杂合体。在一些实施方案中,CDR来源于来自人抗体的抗原结合区或抗体,并且FR来源于同样来自人抗体的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,CDR来源于来自非人抗体的抗原结合区或抗体,并且FR来源于同样来自非人抗体的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,CDR来源于来自小鼠抗体的抗原结合区或抗体,并且FR来源于同样来自小鼠抗体的抗原结合区或抗体。在一个实施方案中,CDR来源于来自人或人源化的抗体或抗原结合区的抗原结合区或抗体,并且FR来源于非人(例如小鼠)来源的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,杂合scFv来源于已经被确定为具有降低的、低的或不显著的免疫原性的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,杂合scFv来源于已经批准用于人用途的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,本公开内容的杂合scFv不包括人源化scFv。抗原结合区或抗体的其他合适的来源包括山羊、大鼠、马、兔、哺乳动物和非人灵长类。在一些实施方案中,CDR和/或FR在人中是无免疫原性或免疫原性降低的。在一些实施方案中,杂合scFv和/或包含杂合scFv的多肽在人中的免疫原性潜力与非杂合scFv和/或包含非杂合scFv的多肽相比无统计学差异。非杂合scFv可以是充当杂合scFv中CDR的来源的scFv或抗原结合区,或者非杂合scFv可以是充当杂合scFv中FR的来源的scFv或抗原结合区。相对于CDR的来源抗体或抗原结合区的CDR,杂合scFv的CDR可包含、包含至少或包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30(或其中可推导出的任何范围)个替换、缺失或添加。相对于FR的来源抗体或抗原结合区的FR,杂合scFv的FR可包含、包含至少或包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30(或其中可推导出的任何范围)个替换、缺失或添加。

[0039] 在一些实施方案中,存在由来自一种抗体或抗原结合区的FR和来自不同的抗体或抗原结合区的CDR构成的多肽,其中差异是因为序列而不是因为其识别/结合不同的表位和/或抗原。FR和CDR可来源于具有不同强直信号传导强度的抗原结合区或抗体。在一些实施方案中,FR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于CDR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强度。在一些实施方案中,CDR来源于这样的抗原结合区或抗体,所述抗原结合区或抗体具有高于FR的来源抗原结合区或抗体的强直信号传导强

度。当在本文中使用时,术语“强直信号传导强度”或“强直信号传导”是指在不存在抗原刺激的情况下的CAR信号传导的刺激水平。强直信号传导可通过以下来确定:通过针对激活标志物例如CD137和/或CTLA-4的抗体染色进行的抗原非依赖性激活标志物表达评价(在实施例3中描述)和/或CTV稀释测定(在实施例3中描述)。在一些实施方案中,在具有来源于与杂合scFv的FR或CDR相同的抗原结合区或抗体的非杂合scFv的细胞中,与杂合scFv相比,CTV稀释测定中的中位荧光强度(medium fluorescence intensity,MFI)为至少1.5、2、2.5、3、3.5、4或5倍(或其中可推导出的任何范围)高。在一些实施方案中,与来源于与FR或CDR相同的抗原结合区或抗体的非杂合scFv相比,在具有杂合scFv的细胞中的CD137+表达为至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高。在一些实施方案中,与来源于与FR或CDR相同的抗原结合区或抗体的非杂合scFv相比,在具有杂合scFv的细胞中的CTLA-4+表达为至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高。此外,杂合scFv可包含具有不同强直信号传导强度的CDR和FR。例如,CDR可来源于在CTV稀释测定中与FR的来源CAR相比表现出至少1.5、2、2.5、3、3.5、4或5倍(或其中可推导出的任何范围)MFI的CAR。在一些实施方案中,CDR可来源于在CTV稀释测定中与CDR的来源CAR相比表现出至少1.5、2、2.5、3、3.5、4或5倍(或其中可推导出的任何范围)MFI的CAR。在一些实施方案中,CDR可来源于与CDR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的CD137+表达的CAR。在一些实施方案中,FR可来源于与FR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的CD137+表达的CAR。在一些实施方案中,CDR可来源于与CDR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的CTLA4+表达的CAR。在一些实施方案中,FR可来源于与FR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的CTLA4+表达的CAR。在一些实施方案中,CDR可来源于与CDR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的激活标志物表达的CAR。在一些实施方案中,FR可来源于与FR的来源CAR相比表现出至少2、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍(或其中可推导出的任何范围)高的激活标志物表达的CAR。多肽可以是被进一步限定为与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性的多肽,其中非杂合scFv与杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中多肽与具有非杂合scFv的CAR相比具有提高的肿瘤杀伤活性,其中非杂合scFv与杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。例如,在至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天的共培养之后,包含杂合scFv的CAR T细胞可显示出靶细胞倍数变化至少显著小于来源于与FR或CDR相同的抗原结合区或抗体的非杂合scFv,或是后者的至少二分之一、三分之一、四分之一或五分之一。在一些实施方案中,与具有非杂合scFv的CAR相比,多肽具有提高的肿瘤细胞清除活性,其中非杂合scFv与杂合scFv的FR来源于相同的抗原结合区或抗体,和/或者其中与具有非杂合scFv的CAR相比,多肽具有提高的肿瘤杀伤活性,其中非杂合scFv与杂合scFv的CDR来源于相同的抗原结合区或抗体。例如,在T细胞注射之后至少20、40、60、80、100、120、140、160或180天之后,包含杂合scFv的CAR T细胞可显示出肿瘤细胞清除倍数变化至少显著大于(如标志细胞的平均辐射度的降低所示)来源于与FR或CDR相同的抗原结合区或抗体的非杂合scFv,或者是后者的至少2、3、4、5、10、20、50、100、500或1000倍。在一些实施方案

中,杂合CAR的CDR或FR来自这样的CAR的非杂合scFv,所述CAR已表明不具有任何显著的肿瘤杀伤活性、肿瘤细胞清除或体内效力,如体内肿瘤清除或与阴性对照相比存活率的提高所示。

[0040] 在一些实施方案中,多肽包含在VH和VL之间的接头。在一些实施方案中,接头长度为4至40个氨基酸。在一些实施方案中,接头长度为、为至少、为至多或为约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50(或其中可推导出的任何范围)个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头包含至少4个甘氨酸和/或丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头包含至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50(或其中可推导出的任何范围)个甘氨酸和/或丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头包含(GGGGS)_n,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,接头包含GSTSGGSGGGSGGGSS(SEQ ID NO:32)或接头与SEQ ID NO:32具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)的序列同一性。在一些实施方案中,接头包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:(EAAAK)_n,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,接头包含GGGGS。在一些实施方案中,接头为(GGGGS)₄。

[0041] 在一些实施方案中,VH邻近VL的氨基。在一些实施方案中,VH邻近VL的羧基。当第一区域与第二区域的羧基末端连接时,第一区域邻近第二区域的羧基。在第一和第二区域之间可存在另外的插入氨基酸残基。因此,除非特别指明不具有插入氨基酸残基,否则所述区域不需要紧邻。术语“氨基近端”被类似地定义为当第一区域与第二区域的氨基末端连接时,第一区域邻近第二区域的氨基。类似地,除非另有说明,否则在第一和第二区域之间可存在另外的插入氨基酸残基。

[0042] 在一些实施方案中,所述多肽包含嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包含scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区。在一些实施方案中,本文讨论的CAR分子具有CAR分子的三个主要区域,其是:与一个或多个靶分子结合的胞外结构域、包含初级胞内信号传导结构域的胞质区、以及在胞外结构域和胞质结构域之间的跨膜区域。一些CAR分子具有位于胞外结构域和跨膜结构域之间的间隔区。此外,一个或多个接头可被包含在CAR分子中的一个或多个区域之间或之内,例如在胞外结构域内的不同结合区之间或在结合区内,例如在轻链可变(VH)区和重链可变(VL)区之间。关于特定区域的任何实施方案可相对于本文公开的任何其他特定区域来实施。这些区域中的任何一个根据其功能可在另一个区域的N端侧或C端侧紧邻,但也预期可具有、具有至少、或具有至多至少或至多

[0043] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,或99个插入在连续区域之间的氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,所述多肽包

含单个跨膜结构域和/或包含初级胞内信号传导结构域的单个胞质区。在一些实施方案中,所述多肽以从氨基近端到羧基近端的顺序包含scFv、跨膜结构域和包含初级胞内信号传导结构域的胞质区。在一些实施方案中,CAR是单特异性的。在一些实施方案中,CAR是双特异性的。在一些实施方案中,CAR还包含在跨膜结构域和scFv之间的胞外间隔区。在一些实施方案中,胞外间隔区的长度为8至1000个氨基酸。在一些实施方案中,胞外间隔区的长度为8至500个氨基酸。在一些实施方案中,胞外间隔区的长度为100至300个氨基酸。在一些实施方案中,胞外间隔区具有少于100个氨基酸。在一些实施方案中,胞外间隔区为至少、至多、恰好或约

[0044] 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,49³,494,495,496,497,498,499,或500个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,胞外间隔区是或包含IgG4铰链、CD8α铰链、IgG1铰链、CD34铰链、或其片段。在一些实施方案中,胞外间隔区包含IgG4铰链或其片段。在一些实施方案中,胞外间隔区包含或还包含CH1区、CH2区和/或CH3区。在一些实施方案中,间隔区包含IgG4铰链多肽、CH2区和CH3区或由其组成。在一些实施方案中,CH2区包含L235E和/或N297Q替换。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:36具有、具有至少、具有

至多或约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%序列同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或其片段。

[0045] 在一些实施方案中,跨膜结构域为T细胞受体的 α 或 β 链,CD28、CD3 ϵ (epsilon)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD123、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含或为CD28跨膜结构域或者来源于CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:37具有、具有至少、具有至多或具有约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%序列同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或其片段。

[0046] 在一些实施方案中,初级胞内信号传导结构域为或包含CD3- ζ 或者来源于CD3- ζ 的胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。在一些实施方案中,初级胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:39具有、具有至少、具有至多或具有约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%序列同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或其片段。

[0047] 在一些实施方案中,胞质区还包含一个或更多个共刺激结构域。在一些实施方案中,胞质区包含两个共刺激结构域。在一些实施方案中,一个或更多个共刺激结构域包含来自4-1BB (CD137)、CD28、IL-15R α 、OX40、CD2、CD27、CD28、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) 和/或ICOS (CD278) 中的一个或更多个的共刺激结构域。在一些实施方案中,一个或更多个共刺激结构域包含来自CD28的共刺激结构域或来源于CD28的共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的多肽或其片段。在一些实施方案中,共刺激结构域包含与SEQ ID NO:38具有、具有至少、具有至多或具有约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%序列同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或其片段。

[0048] 在一些实施方案中,多肽还包含在跨膜结构域和胞质区之间的扭转接头。在一些实施方案中,扭转接头包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基(或其中可推导出的任何范围)或由其组成。在一些实施方案中,氨基酸残基包含丙氨酸残基或由其组成。在一些实施方案中,扭转接头包含至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)个丙氨酸残基。在一些实施方案中,扭转接头包含至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)个连续的丙氨酸残基。在一些实施方案中,扭转接头由2或4个丙氨酸残基组成。在一些实施方案中,扭转接头包含2个丙氨酸残基。在一些实

施方案中,扭转接头包含3个丙氨酸残基。在一些实施方案中,扭转接头包含4个丙氨酸残基。在一些实施方案中,扭转接头包含至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)个连续的丙氨酸残基。在一些实施方案中,扭转接头由2个丙氨酸残基组成。

[0049] 在一些实施方案中,scFv包含抗CD20 scFv。在一些实施方案中,scFv包含抗GD2 scfv。在一些实施方案中,scFv包含抗BCMA、抗CD123、抗CD138、抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗CD38、抗CD5、抗Ig κ 链、抗LeY、抗NKG2D、抗ROR1、抗WT1、抗C-Met、抗CAIX、抗CD133、抗CD171、抗CD70、抗CEA、抗EGFR、抗EGFRvIII、抗Ep-CAM、抗EphA2、抗FAP、抗GD2、抗GPC3、抗Her2、抗HPV16-E6、抗IL13Ra2、抗MAGEA3、抗MAGEA4、抗MART1、抗间皮素、抗MUC1、抗MUC6、抗NY-ESO-1、抗PD-L1、抗PSCA、抗PSMA、抗ROR1或抗VEGFR2的scFv。

[0050] 在一些实施方案中提供了核酸,所述核酸包含序列,所述序列编码本文公开的多肽,及其一部分。核酸可包含RNA或DNA。在某些实施方案中,核酸是表达构建体。在一些实施方案中,表达构建体是载体。在某些实施方案中,载体是病毒载体。在一些具体实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体或来源于逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒载体包含慢病毒载体或来源于慢病毒。注意到,在某些实施方案中,病毒载体是整合核酸。另外,核酸可以是参与基因编辑的分子,使得编码CAR的核酸(例如指导RNA)用于将CAR编码序列并入基因组(例如TRAC基因)的特定基因座中。在一些实施方案中,这涉及基因编辑系统,例如CRISPR/Cas9。核酸、多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)相对于另一序列具有一定百分比(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%——或其中可推导出的任何范围)的“序列同一性”或“同源性”,意味着在比对时,在比较两个序列时该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。可使用本领域已知的软件程序确定该比对和百分比同源性或序列同一性,所述软件程序例如在Ausubel et al.eds.(2007) Current Protocols in Molecular Biology中描述的那些。预期核酸可与本文提供的任何核酸SEQ ID NO具有这样的序列同一性或同源性。

[0051] 在另一些实施方案中,存在这样的细胞或细胞群体,其包含编码本文讨论的任何多肽的全部或一部分的核酸。在某些实施方案中,细胞或细胞群体在其基因组内包含编码本文所述的任何多肽的序列。这包括但不限于已整合到细胞基因组中的慢病毒或逆转录病毒。在一些实施方案中,细胞或细胞群体表达本文讨论的任何CAR的全部或一部分,包括但不限于具有SEQ ID NO:1至144中任一个的氨基酸序列的那些。其中引入了编码多肽的核酸的细胞之后代(F1、F2及以后)包括在本文公开的细胞或细胞群体中。在一些实施方案中,细胞或细胞群体是T细胞、自然杀伤(natural killer,NK)细胞、自然杀伤T细胞(natural killer T cell,NKT)、恒定自然杀伤T细胞(invariant natural killer T cell,iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)、造血干细胞和祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cell,HSPC)、造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)、CD34+细胞、外周血干细胞(peripheral blood stem cell,PBSC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPS细胞)。一些具体实施方案涉及是T细胞或NK细胞的细胞。在一些实施方案中,T细胞包含初始记忆T细胞(**naïve** memory T cell)。在一些实施方案中,初始记忆T细胞包含CD4+或CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞是包含CD4+和CD8+T细胞二者

的细胞群体。在一些实施方案中,细胞是包含初始记忆T细胞的细胞群体,所述初始记忆T细胞包含CD4⁺和CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,T细胞包含来自CD14耗竭、CD25耗竭和/或CD62L富集的PBMC的群体的T细胞。

[0052] 在一些方面中,本公开内容涉及包含一种或更多种本文所述的多肽的细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是祖细胞或干细胞。在一些实施方案中,祖细胞或干细胞在体外分化为免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD4⁺或CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,细胞是自然杀伤细胞。在一些实施方案中,细胞是离体的。术语免疫细胞包含免疫系统的细胞,其参与机体针对感染性疾病和外来物质二者的防御。免疫细胞可包括例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞、淋巴细胞(例如B细胞和T细胞)和单核细胞。T细胞可包括,例如CD4⁺、CD8⁺、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、抑制性T细胞和自然杀伤T细胞。在一个具体实施方案中,T细胞是调节性T细胞。

[0053] 在一些实施方案中,细胞群体包含 10^3 至 10^8 个细胞。在一些实施方案中,群体为约、为至少约或为至多约 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 个细胞(或其中可推导出的任何范围)。在某些实施方案中,细胞对于将接受它们的患者而言是自体的。在另一些实施方案中,细胞不是自体的并且可以是同种异体的。

[0054] 在本公开内容的一些实施方案中,方法方面涉及其中细胞被编码本公开内容的多肽的病毒感染。在一些实施方案中,病毒包含慢病毒或慢病毒来源的病毒或载体。在一些实施方案中,细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)、干细胞、淋巴样祖细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、骨髓细胞、胎儿肝细胞、胚胎干细胞、脐带血细胞、诱导多能干细胞(iPS细胞)。在一些实施方案中,细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,T细胞包含初始记忆T细胞。在一些实施方案中,初始记忆T细胞包含CD4⁺或CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,细胞还不是T细胞或NK细胞,所述方法还包括在促进细胞分化为T细胞或NK细胞的条件下培养细胞。

[0055] 在一些实施方案中,所述方法还包括在将核酸引入细胞之前和或之后在扩增细胞的条件下培养细胞。在一些实施方案中,将细胞用无血清培养基培养。

[0056] 另外的方法涉及治疗患有癌症的患者,其包括向患者施用有效量的组合物,所述组合物包含表达本公开内容的多肽的细胞群体。在一些实施方案中,患者患有复发性或复现性癌症。另一些实施方案包括向患者施用另外的治疗的步骤。在一些实施方案中,患者先前已经针对癌症进行治疗。在一些实施方案中,患者已经确定对先前的治疗有抗性。先前的治疗可以是本文所述的癌症治疗剂,例如描述为另外的治疗的那些。另一些实施方案包括向患者施用化学治疗和/或放射的步骤。在一些实施方案中,另外的治疗包含免疫治疗。在一些实施方案中,另外的治疗包含本文所述的另外的治疗。在一些实施方案中,免疫治疗包含免疫检查点抑制剂治疗。在一些实施方案中,免疫治疗包含本文所述的免疫治疗。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂治疗包含PD-1抑制剂和/或CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂治疗包含本文所述的一种或更多种免疫检查点蛋白的一种或更多种抑制剂。

[0057] 在一些实施方案中,癌症包含CD20⁺癌症,其中CD20⁺癌症是这样的癌症,其包含CD20⁺细胞或者包含肿瘤细胞的群体中的至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、

9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90% CD20+癌细胞。在一些实施方案中,癌症包含黑素瘤。本公开内容的CAR多肽可具有区域、结构域、接头、间隔区、或其他的其他部分,其包含与本文所述的氨基酸序列的全部或一部分具有至少、至多或恰好50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的氨基酸序列或者由其组成。在某些实施方案中,CAR多肽包含与SEQ ID NO:1至144中的任一个具有、具有至少、具有至多或恰好50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的氨基酸序列或者由其组成。

[0058] 癌症可以是淋巴瘤或神经母细胞瘤。在其中CAR包含CD20 CAR的实施方案中,靶向的癌症可以是淋巴瘤。在其中CAR包含GD2 CAR的实施方案中,靶向的癌症可以是神经母细胞瘤。可用本公开内容的方法治疗的癌症还可包括以下的癌症:膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食管、胃肠、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。此外,癌症具体地可以是以下组织学类型,但不限于这些:恶性赘生物;癌;未分化癌;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;组合肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;恶性类癌肿瘤;支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸性粒细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡状腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;无包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌(endometrioid carcinoma);皮肤附属器癌;大汗腺腺癌(apocrine adenocarcinoma);皮脂腺癌;耵聍腺癌;黏液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;黏液性囊腺癌;黏液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特病(paget's disease);腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌w/鳞状化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质肿瘤;恶性泡膜细胞瘤;恶性粒层细胞瘤;恶性男性母细胞瘤;sertoli细胞瘤;恶性莱迪希细胞瘤(leydig cell tumor);恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤(glomangiosarcoma);恶性黑素瘤;无黑素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;巨大色素痣内恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;黏液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒管混合瘤(mullerian mixed tumor);肾胚细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;恶性间叶瘤;恶性布伦纳瘤(brenner tumor);恶性叶状肿瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎性癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺肿;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西肉瘤(kaposi's sarcoma);恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性成软骨细胞瘤;间叶性软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因肉瘤(ewing's sarcoma);恶性牙源性肿瘤;

成釉细胞牙肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性神经胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;成胶质细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经母细胞瘤;原始外胚叶肿瘤;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金病(Hodgkin's disease);霍奇金淋巴瘤;(Hodgkin's lymphoma);副肉芽肿;小淋巴细胞性恶性淋巴瘤;弥漫性大细胞恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样霉菌病;其他特定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓性白血病;嗜碱性粒细胞白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞白血病;髓样肉瘤;和毛细胞白血病。

[0059] 在某些实施方案中,本公开内容通篇描述的多肽是分离的,意味着其未在细胞环境中发现。在一些情况中,多肽是纯化的,这意味着如果没有完全从多肽分离,则大多数多肽具有不同的氨基酸序列和/或化学式。

[0060] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于治疗患有癌症的对象的方法,其包括向对象施用有效量的细胞群体或药物组合物,所述细胞群体或药物组合物包含嵌合多肽或编码嵌合多肽的核酸。

[0061] 可基于本文所述的任何方法使用一种或更多种序列或组合物。本申请中通篇讨论了另一些实施方案。关于本公开内容的一个方面讨论的任何实施方案同样可应用于本公开内容的另一些方面,反之亦然。例如,本文所述的方法中的任何步骤均可应用于任何其他方法。此外,本文所述的任何方法均可排除任何步骤或步骤的组合。实施例部分中的实施方案应理解为可应用于本文所述技术的所有方面的实施方案。

[0062] 本申请中通篇的术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的清晰且普通含义使用,以指示值包含用于确定该值所采用的装置或方法的误差的标准偏差。

[0063] 当与术语“包含/包括”结合使用时,没有数量词修饰的名词的使用可意指“一个/种”,但是其也符合“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义。

[0064] 如本文所用,术语“或/或者”和“和/或”用于描述组合或相互排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或“x或y或z”。特别地预期x、y或z可被特别地排除在一个实施方案之外。

[0065] 词语“包含”、“具有”、“包括”、“特征在于”或“含有”是包含性的或开放式的,并且不排除另外的、未记载的要素或方法步骤。

[0066] 所述组合物和方法根据其用途可“包含/包括”在本说明书通篇公开的任何成分或步骤、“基本上由其组成”或“由其组成”。短语“由……组成”不包括任何未指定的元素、步骤或成分。短语“基本上由……组成”将所述主题的范围限制为指定的物质或步骤以及不实质影响其基本的和新的特征的那些物质或步骤。预期在术语“包含/包括”的上下文中所述的实施方案也可在术语“由……组成”或“基本上由……组成”的上下文中实施。

[0067] 特别预期了关于本发明的一个实施方案所讨论的任何限制均可应用于本发明的任何另一些实施方案。此外,本发明的任何组合物均可用于本发明的任何方法,并且本发明的任何方法均可用于产生或利用本发明的任何组合物。在实施例中阐述的实施方案的一些

方面也是可在不同实施例中的其他地方或在本申请中的其他地方(例如在发明概述、实施方案的详细描述、权利要求书和附图说明中)讨论的一些实施方案的背景下实施的实施方案。

[0068] 通过以下详细描述,本发明的另一些目的、特征和优点将变得明显。然而,应当理解,详细描述和具体实施例尽管指示了本发明的一些具体实施方案,但是它们仅以示例的方式给出,因为根据该详细描述,本发明的精神和范围内的多种变化和修改对本领域技术人员将变得明显。

[0069] 附图简述

[0070] 以下附图形成了本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过结合本文给出的具体实施方案的详细描述来参考这些附图中的一幅或更多幅,可更好地理解本发明。

[0071] 图1A至B。(A) 用来源于多种抗体的scFv构建的CD20 CAR的示意图。所有的CAR都是包含CD28共刺激结构域的第二代受体。(B) CD20CAR构建中使用的scFv结构域的序列。

[0072] 图2A至B。利妥昔单抗(rituximab)来源的CD20 CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致(A) 激活和衰竭性标志物的上调以及(B) T细胞增殖(在不存在抗原刺激的情况下)。CD19 CAR和GD2 CAR被包括在内分别作为阴性和阳性对照,用于强直信号传导。

[0073] 图3。丙氨酸插入引起CAR分子结构转向的示意图。

[0074] 图4。丙氨酸插入校准了CAR强直信号传导强度。在不存在抗原刺激的情况下的(A) 如通过CellTrace Viobest染料稀释进行定量的T细胞增殖以及(B) 如通过ELISA进行定量的细胞因子产生显示出,在表达包含多种数量的丙氨酸残基(插入在跨膜结构域和胞质CD28结构域之间)的利妥昔单抗来源的CD20 CAR的T细胞中不同程度的抗原非依赖性激活。

[0075] 图5。利妥昔单抗来源的CD20 CAR包含两个插入在跨膜结构域和胞质CD28结构域之间的丙氨酸残基,导致优异的体内抗肿瘤功能。向NOD/scid/ $\gamma^{-/-}$ (NSG) 小鼠植入50万个表达萤火虫萤光素酶的Raji淋巴瘤细胞,并在肿瘤注射之后7天用135万个表达CD20 CAR或转导标志物(EGFRt)的T细胞进行处理。7天之后,对动物重新给药150万个T细胞。本研究中测试的所有CAR均包含利妥昔单抗来源的scFv、IgG4铰链-CH2-CH3胞外间隔区、CD28跨膜结构域和胞质结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域。在CD28跨膜结构域和CD28胞质结构域之间插入零至四个丙氨酸。通过生物发光成像监测肿瘤进展,并显示辐射信号作为自肿瘤注射以来的时间的函数。两个丙氨酸插入变体显示出优异的肿瘤控制和与亲本(无丙氨酸插入)构建体以及其他变体相比延长的中位存活。

[0076] 图6A至B。(A) 包含Leu16来源的、利妥昔单抗来源的或杂合的scFv结构域的CD20 CAR的示意图。构建了两种杂合体。只有RFR-LCDR杂合体具有功能(参见图7)。所有的CAR都是包含CD28共刺激结构域的第二代受体,如图3中所示。(B) 用于CD20 CAR构建的scFv结构域的序列。

[0077] 图7A至B。RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致(A) 激活和衰竭性标志物的上调以及(B) T细胞增殖(在不存在抗原刺激的情况下)。CD19 CAR和GD2 CAR被包括在内分别作为阴性和阳性对照,用于强直信号传导。

[0078] 图8。RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出在体外经重复抗原攻击后的优异的肿瘤细胞杀伤。每48小时用新鲜的Raji淋巴瘤细胞对表达不同CAR或转导标志物(EGFRt)的T细胞进

行攻击。在每次重新攻击之前,通过流式细胞术对活靶细胞计数进行定量。来自多个供体的结果表明,RFR-LCDR杂合CAR与任何一种其亲本构建体(Leu16和利妥昔单抗)相比具有优异的肿瘤细胞杀伤。

[0079] 图9A至C。RFR-LCDR杂合CD20 CAR在体内显示出优异的肿瘤清除。向NSG小鼠植入50万个表达萤火虫萤光素酶的Raji淋巴瘤细胞,并用图2所述的两剂的T细胞处理。在第一T细胞处理之后55天,用第二剂的肿瘤细胞再次攻击动物。(A)通过生物发光成像监测肿瘤进展。(B)存活曲线以Kaplan-Meier曲线表示。结果表明,杂合CAR在肿瘤清除和长期复发预防方面均优于亲本CD20 CAR和CD19 CAR二者。(C)通过流式细胞术测量初始T细胞注射之后23天外周血中表达CAR的人T细胞的频率。将两个丙氨酸残基添加至CAR中改善了基于利妥昔单抗的受体,证实了图5中所示的先前数据。与没有丙氨酸插入的杂合CAR相比,将杂合CAR与两个丙氨酸插入组合进一步加快了初始肿瘤清除的速率,并导致显著提高的T细胞持久性,表明可组合scFv改变和丙氨酸插入策略以产生CAR功能的协同改善。

[0080] 图10A至F。(A)第二代抗CD20 CAR组的示意图,其由来源于四种不同单克隆抗体的scFv与IgG4间隔区、CD28跨膜结构域和胞质结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域融合而构成。CAR通过自切割T2A肽与截短的EGFR(truncated EGFR,EGFRt,其用作转导标志物(顶部))来进一步融合。scFv所来源的四种抗体的K_D值和CDR结构家族名称(底部)。FR和CDR序列以及结构家族名称如前所述(Chothia and Lesk,1987;Chothia et al.,1989;Kabat and Wu,1971;Martin and Thornton,1996)进行确定。(B至C)将NSG小鼠静脉内(intravenously, i.v.)注射 0.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,6天之后用i.v.递送的 5×10^6 个CD20靶向的CAR-T细胞进行处理。(B)通过生物发光成像来监测肿瘤进展(n=每组6只小鼠)。辐射强度规模的最小值和最大值分别为 5×10^4 和 1×10^7 。(C)用于每个测试组的个体动物的平均辐射度(p/秒/cm²/sr)。(D)在无CD20抗原刺激的情况下,在去除Dynabead之后11天评价CAR⁺T细胞上的激活和衰竭性标志物表达。数据条指示三次技术重复的平均值 $\pm$ 1标准偏差(standard deviation,S.D.)。结果代表了使用来源于三种不同健康供体的T细胞的三个独立实验。除非另有说明,否则p值通过未配对、双尾、双样本Student t检验来确定;*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。(E)在不存在或存在靶细胞的情况下(在靶(on-target),CD19⁺/CD20⁺K562细胞;脱靶,亲本K562细胞),以2:1的效应物与靶标(effector-to-target,E:T)的比率用CellTrace Violet (CTV)染料对CAR⁺T细胞进行4天的T细胞增殖测定。示出的数据代表来自五种不同健康供体的五个独立实验。(F)在无CD20抗原刺激的情况下,在补充有10% dFBS和外源IL-2和IL-15的RPMI中培养24小时的CD20 CAR-T细胞的代谢率。数据条指示三次技术重复的平均值 $\pm$ 1S.D.。结果代表来自三种不同健康供体的三个独立实验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。

[0081] 图11A至E。信号传导结构域的扭转重定向调节了CAR-T细胞活性。(A)丙氨酸并入基于利妥昔单抗中的CAR的示意图。(B)在不存在或存在靶细胞的情况下,用CellTrace Violet (CTV)染料以2:1E:T比率进行4天的T细胞增殖测定。示出的数据代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(C)在无CD20抗原刺激的情况下,在去除Dynabead之后7天测量CAR-T细胞的TNF- α 产生。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。(D,E)将NSG小鼠静脉内注射 0.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞然后在6天(1.35×10^6 个细胞)和12天(1.5×10^6 个细胞)之后静脉内

注射两剂的CAR⁺T细胞;n=每组6只小鼠。(D)通过生物发光成像监测肿瘤进展(顶部)。示出了每组的个体动物的平均辐射度(p/秒/cm²/sr)(底部)。(E)Kaplan-Meier存活曲线。通过对数秩(Mantel-Cox)检验确定统计学显著性。*p<0.05,**p 0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。

[0082] 图12A至E.scFv序列杂合产生功能上优异的CAR变体。(A)CAR分子中的scFv序列杂合的示意图。将Leu16来源的scFv和利妥昔单抗来源的scFv的框架区(FR)和互补决定区(CDR)混合以产生两种新的CAR变体。(B)在重复抗原攻击之后,RFR-LCDR杂合CAR-T细胞显示出优异的抗肿瘤功能和T细胞增殖。将CAR-T细胞每两天用Raji细胞(CD19⁺/CD20⁺)以2:1的E:T比率进行攻击。通过流式细胞术对T细胞和靶细胞计数进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值±1S.D.。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(C)在无CD20抗原刺激的情况下,在去除Dynabead之后11天评价激活和衰竭性标志物的表达。数据条指示三次技术重复的平均值±1S.D.。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。(D)在不存在或存在靶细胞的情况下,使用CellTrace Violet(CTV)染料以2:1的E:T比率进行4天的CAR-T细胞增殖测定。(E)在不存在抗原刺激的情况下对培养中的CAR-T细胞进行代谢分析。将CAR-T细胞在补充有10%热灭活的透析胎牛血清(heat-inactivated,dialyzed fetal bovine serum,HI-dFBS)、IL-2和IL-15的RPMI中培养72小时。数据条指示三次技术重复的平均值±1S.D.。数据代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。

[0083] 图13A至G.scFv杂合与CAR蛋白中的扭转重定向的组合进一步增强了体内CAR-T细胞的功能。(A至D)将NSG小鼠静脉内注射表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞然后是两剂的CAR⁺T细胞和一次Raji肿瘤再攻击。(A)体内实验的示意图(n=每组6只小鼠)。(B)通过生物发光成像量化的个体动物中的肿瘤信号。(C)Kaplan-Meier存活曲线。针对成对比较进行对数秩(Mantel-Cox)检验。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。(D)在第一剂量的T细胞输注之后的第23天从小鼠收集的外周血中人CD45⁺EGFRt⁺细胞的频率。(E至G)将NSG小鼠静脉内注射表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞然后是单剂量的CAR⁺T细胞。在T细胞注射之后第25天和第45天,用Raji细胞再攻击小鼠两次。(E)体内实验的示意图(n=每组6只小鼠)。(F)通过生物发光成像量化的个体动物中的肿瘤信号。(G)从小鼠收集的外周血中人CD45⁺EGFRt⁺细胞随时间的频率。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,n.s.无统计学显著性。

[0084] 图14A至C.转录组学和表观遗传学分析揭示了T细胞表型中的CAR依赖性变异。(A,B)将NSG小鼠i.v.注射0.5×10⁶个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,6天之后用i.v.递送的2.85×10⁶个CAR⁺T细胞进行处理。T细胞注射9天之后从荷瘤小鼠收集肝、脾、心脏血液和骨髓(n=每组2只小鼠)。通过对huCD45⁺EGFRt⁺群体进行富集来获得CAR⁺T细胞,并随后通过RNA-seq和ATAC-seq进行分析。(A)基于RNA-seq的利妥昔单抗CAR-T细胞相对于Leu16(左)、RFR-LCDR(中)或RFR-LCDR.AA(右)CAR-T细胞的差异表达基因的火山图。所有差异表达基因都以灰色绘制。具有至少2倍上调或下调(log₂FC>1或log₂FC<-1)与FDR<0.05的基因以红点表示。对出现在所有三组成对比较中具有log₂FC>1和FDR<0.05或log₂FC<-1和FDR<0.05的基因名称进行标记。(B)Leu16、利妥昔单抗、RFR-LCDR、RFR-LCDR.AA CAR-T细胞中在ATP9A、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1基因座处的差异可访问区域的基因组浏览器文件。(C)用基于利

妥昔单抗的CAR-T细胞进行处理的动物显示出血清中的葡萄糖水平降低。在T细胞注射之后第58天,从图13E至G中所示的研究中的动物收集血清。通过LC-MS测量血清中的葡萄糖浓度。数据条指示生物学重复的平均值 ± 1 S.D. ($n=6$,对于两个杂合CAR-T细胞组; $n=4$,对于利妥昔单抗.AA CAR-T细胞处理组,这是由于在样本收集日期之前由肿瘤负荷引起的死亡)。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,n.s.无统计学显著性。

[0085] 图15A至D。RFR-LCDR.AA CAR-T细胞显示出稳健的T细胞活化连同记忆表型。(A)对如图14A中所述获得的RNA-seq数据进行基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)。与T细胞表型和功能相关的途径中的结果总结以BubbleGUM图谱格式示出(Spinelli et al.,2015)。(B)与T细胞亚型相关的途径的山图。(C)与T细胞活化和干扰素 γ 信号传导相关的途径的山图。(D)与细胞周期、DNA复制和细胞代谢相关的途径的山图。

[0086] 图16A至D。在CD20 CAR在体外表现出类似的特征的情况下的图。(A)使用T-Coffee(Notredame et al.,2000)的leu16、利妥昔单抗、GA101和奥法木单抗(ofatumumab) scFv序列的比对。(B)如通过CAR表面表达(顶部)和转导标志物表达(底部)(分别通过CAR的IgG4胞外间隔区(Fc)和EGFRt的抗体染色进行检测)量化的CAR-T细胞转导效率。在流式细胞术直方图下方记录了每种抗原染色的中位荧光强度(MFI)和%阳性。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(C)在用外源细胞因子IL-2和IL15离体培养期间的CD20 CAR-T细胞增殖。示出了第2天至第14天之间总活细胞计数的倍数变化。每个数据点代表一个供体;示出了每个构建体4个供体的数据。通过未配对、双尾、双样本Student t检验未检出任何供体之间的统计学差异。(D)重复抗原攻击之后CAR-T细胞的细胞毒性和增殖。将CD20 CAR-T细胞每两天用Raji肿瘤细胞以2:1的效应物比靶标(E:T)的比率进行攻击,并通过流式细胞术对活Raji和CAR-T细胞的数量进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值,误差棒指示 ± 1 标准偏差(S.D.)。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。

[0087] 图17A至E。Raji异种移植模型中的肿瘤进展和死后CD20 CAR-T细胞表征。(A)向NSG小鼠植入表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞并用CD20 CAR-T细胞进行处理,如图10B中所示。通过生物发光成像测量肿瘤负荷,并通过针对每只个体动物的肿瘤进展数据拟合指数回归曲线来量化T细胞注射之后第12天至人道终点之间的肿瘤生长速率。每组小鼠($n=6$)中针对肿瘤信号的平均倍增时间(doubling time, $T_{\text{倍增}}$)在每个图的上方示出。(B,C)在安乐死时从小鼠收集的骨髓、脑、肝和脾中的肿瘤细胞(B)和人CD45⁺EGFRt⁺细胞(B)的频率,如通过流式细胞术进行定量的。(D,E)在安乐死时从小鼠收集的骨髓、脑、肝和脾中的人CD45⁺EGFRt⁺细胞中PD-1⁺(D)和LAG-3⁺(E)细胞的频率,如通过流式细胞术进行定量。对图(B)至(E)中显示的所有数据通过未配对、双尾、双样本Student t检验未检出任何供体之间的统计学差异。

[0088] 图18。利妥昔单抗CAR-T细胞比其他CD20 CAR-T细胞更具有代谢活性。在补充有10%热灭活透析胎牛血清(HI-dFBS)、IL-2和IL-15的RPMI中培养24小时的CAR-T细胞对氨基酸和其他营养素的摄取。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,n.s.无统计学显著性。该图中的结果来自与图10F中相同的实验。每组的四个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、Leu16和利妥昔单抗的数据。

[0089] 图19。在不存在抗原接合的情况下,CD20 CAR均匀分布在T细胞表面上。将用CAR-

Halo 标签融合蛋白转导的 Jurkat 细胞用红色荧光染料四甲基若丹明 (tetramethylrhodamine, TMR) 进行染色, 并通过共聚焦显微术成像。在不存在抗原刺激的情况下, CAR 分子均匀分布在细胞表面上。

[0090] 图20A至D。具有扭转重定向的利妥昔单抗CAR-T细胞表现出类似的体外细胞毒性和抗原非依赖性激活标志物表达。(A) 基于利妥昔单抗的CAR构建体的示意图, 其在CD28跨膜结构域和胞质结构域之间具有零至四个丙氨酸插入。(B) 通过与每个CAR的N端进行融合的HA标签的抗体染色来量化CAR表面表达。数据代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(C) 重复抗原攻击之后CAR-T细胞的细胞毒性和增殖。将CD20CAR-T细胞每两天用Raji肿瘤细胞以2:1的E:T比率进行攻击, 并通过流式细胞术对活Raji和CAR-T细胞的数量进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值, 误差棒指示 ± 1 标准偏差(S.D.)。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(D) 在无CD20抗原刺激的情况下, 在去除Dynabead之后11天评价激活和衰竭性标志物的表达。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。除非另有说明, 否则p值通过未配对的双尾 Student t 检验来确定; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 无统计学显著性。

[0091] 图21A至E。尽管体外表现相同, 但具有扭转重定向的GD2 CAR-T细胞在体内表现出差异化的肿瘤控制。(A) GD2 CAR构建体的示意图, 其在CD28跨膜结构域和胞质结构域之间具有零至四个丙氨酸插入。(B) 将CAR表面表达(顶部)和转导效率(底部)通过Fc和EGFRt的抗体染色进行定量。(C) 重复抗原攻击之后CAR-T细胞的细胞毒性和增殖。将GD2 CAR-T细胞每两天用CHLA-255肿瘤细胞以2:1的E:T比率进行攻击, 并通过流式细胞术对活Raji和CAR-T细胞的数量进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值, 误差棒表示 ± 1 标准偏差(S.D.)。(D, E) 将NSG小鼠静脉内注射 3.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的CHLA-255细胞然后17天之后静脉内注射 2×10^6 个GD2 CAR-T细胞。(D) 通过生物发光成像监测肿瘤进展。(E) 将在安乐死时从小鼠收集的肝和脾中人CD45⁺EGFRt⁺细胞的频率通过流式细胞术进行定量。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 无统计学显著性。

[0092] 图22A至D。杂合CAR-T细胞的体外表征。(A) 将CAR表面表达(顶部)和转导效率(底部)通过Fc和EGFRt的抗体染色进行定量。结果代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。(B) 在不存在抗原刺激的情况下, CAR分子均匀分布在T细胞表面上。将用CAR-Halo标签融合蛋白转导的Jurkat细胞用TMR染色并通过共聚焦显微术成像。(C, D) 在存在(C) 和不存在(D) CD19⁺/CD20⁺K562靶细胞的情况下的IFN- γ 、TNF- α 、IL-2产生。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 无统计学显著性。对于(C)和(D), 每组的七个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、Leu16、利妥昔单抗、利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA的数据。

[0093] 图23。与利妥昔单抗CAR-T细胞相比, 杂合CAR-T细胞表现出降低的代谢活性。在补充有10%热灭活透析胎牛血清(HI-dFBS)、IL-2和IL-15的RPMI中培养72小时的CAR-T细胞对氨基酸和其他营养素的摄取。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。代表来自三个不同健康供体的三个独立实验。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. 无统计学显著性。该图中的结果来自与图12E中相同的实验。每组的七个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、Leu16、利妥昔单抗、利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA的数据。

[0094] 图24A至B。来自荷瘤小鼠的用于转录组和表观遗传谱分析的CAR-T细胞收获。将NSG小鼠静脉内注射 0.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞然后6天之后静脉内注射

2.85×10^6 个 CAR⁺T 细胞。在 T 细胞注射之后 9 天从荷瘤小鼠收集 CAR⁺T 细胞 (n = 每组 2 只小鼠)。仅从小鼠回收了少量的模拟转导 (仅 EGFRt) T 细胞, 这与在不存在抗原识别的情况下的 T 细胞扩增的缺乏一致。然而, 这种少量的细胞回收导致 RNA-seq 和 ATAC-seq 中的低读取计数, 妨碍了可靠的数据分析。作为结果, 这些样品被排除在图 14、14 和 25 中所示的分析之外。

(A) 体内实验示意图。(B) 如通过生物发光成像监测的肿瘤进展。

[0095] 图 25。RNA-seq 揭示了从荷瘤小鼠中回收的 CD20 CAR-T 细胞变体之间的巨大转录组差异。Leu16、利妥昔单抗、RFR-LCDR、RFR-LCDR.AA CAR-T 细胞的 ANOVA 比较中差异表达基因 (FDR < 0.05) 的热图。每列代表一只小鼠, 并且对每个处理组分析两个生物学重复。每行缩放至最大值 1 和最小值 0 以突出每个基因的相对表达。

[0096] 图 26。离体培养中的 CAR-T 细胞之间的 T 细胞亚群分布没有显著差异。在不存在抗原刺激的情况下, 通过 CD45RA 和 CD62L 染色来确定离体培养中的 CAR-T 细胞的亚型。CD45RA⁺CD62L⁺、CD45RA⁻CD62L⁺、CD45RA⁻CD62L⁻ 和 CD45RA⁺CD62L⁻ 分别指示初始细胞、中央记忆细胞、效应记忆细胞和效应细胞类型。

[0097] 图 27A 至 C。(A) CAR 表面表达 (顶部) 和转导标志物表达 (底部) 分别通过来自一个供体的 CAR 的 IgG4 胞外间隔区 (Fc) 和 EGFRt 的抗体染色来检测。记录每个样品的阳性百分比和中位荧光强度 (MFI)。(B) 示出了六种不同健康供体产生的 T 细胞的 %Fc⁺ 和 MFI 中的 CAR 表面染色数据。(C) 在用外源细胞因子 IL-2 和 IL15 离体培养期间的 CD20 CAR CD8⁺T 细胞扩增。示出了第 2 天至第 14 天之间总活细胞计数的倍数变化。每个数据点代表一个供体; 示出了每个构建体 4 个供体的数据。通过未配对、双尾、双样本 Student t 检验未检出任何供体之间的统计学差异。

[0098] 图 28A 至 C。(A) 对 Raji 和 K562 细胞系 CD20 表达水平的流式细胞术分析。(B) 以三种效应物比靶标 (E:T) 比率针对具有不同的 CD20 表达水平的靶细胞的 CD20 CAR-TN/M 细胞的 24 小时裂解测定。数据条指示三次技术重复的平均值 $\pm$ 1 标准偏差 (S.D.)。通过未配对、双尾、双样本 Student t 检验未观察到统计学显著差异。(C) 用 Raji 肿瘤细胞进行重复抗原攻击之后的 CAR CD8⁺T 细胞的细胞毒性和增殖。将 CD20 CAR-T 细胞每两天用 Raji 细胞以 2:1 的 E:T 比率进行攻击, 并通过流式细胞术对活 Raji 和 CAR-T 细胞的数量进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值, 误差棒指示 $\pm$ 1 S.D.。示出了来自三个不同健康供体的三个独立实验的结果。

[0099] 图 29A 至 D。抗原非依赖性 CAR 信号传导或利妥昔单抗来源的 CD20 CAR, 导致 (A, B) 激活和衰竭性标志物的上调和 (C, D) T 细胞增殖 (在不存在抗原刺激的情况下)。在 CD8⁺ (A, C) 和初始/记忆 T (naïve/memory T, TN/M) 细胞二者中均观察到基于利妥昔单抗的 CAR-T 细胞中的强直信号传导, CD8⁺ (A, C) 和初始/记忆 T (TN/M) 细胞被分选为 CD14⁻/CD25⁻/CD62L⁺ 表型。A 至 D 中的每组七个条以从左至右的顺序分别代表 EGFRt、CD19、GD2、Leu16、利妥昔单抗、GA101 和奥法木单抗的数据。

[0100] 图 30。利妥昔单抗来源的 CD20 CAR 的代谢通量。每组四个条以从左至右的顺序分别代表 EGFRt、CD19、Leu16 和利妥昔单抗的数据。

[0101] 图 31A 至 B。(A) 在不存在抗原刺激的情况下, 将表达 CAR 的 Jurkat 细胞用与 DyLight 405 缀合的抗 Fc 抗体进行染色, 并通过共聚焦显微镜成像。(B) 在不存在抗原刺激的情况下, 将用 CAR-Halo 标签融合蛋白转导的 Jurkat 细胞用红色荧光染料四甲基若丹明 (TMR) 染色,

并通过共聚焦显微镜成像。

[0102] 图32A至B。(A) 将NSG小鼠静脉内(i.v.)注射 0.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,6天之后用i.v.递送的 5×10^6 个CD8⁺CD20靶向CAR-T细胞进行处理。通过生物发光成像来监测肿瘤进展(n=每组6只小鼠)。辐射强度标度上的最小值和最大值分别为 5×10^4 和 1×10^7 。(B) 针对每个测试组的个体动物的平均辐射度(p/秒/cm²/sr)。黑色虚线表示T细胞注射之后12天,即在利妥昔单抗CAR-T细胞组开始迅速失去肿瘤控制的时间。每条迹线的终点指示每只动物的人道终点。

[0103] 图33A至C。(A) 基于利妥昔单抗的CAR的丙氨酸插入变体的示意图。(B) 通过来自一个供体的CAR的IgG4胞外间隔区(Fc)和EGFRt的抗体染色分别检测的CAR表面表达(顶部)和转导标志物表达(底部)。记录每个样品的阳性百分比和中位荧光强度(MFI)。(C) 针对从四种不同的T细胞制备运行中产生的T细胞的以%Fc+和MFI表示CAR表面染色数据。

[0104] 图34A至B。(A) 在去除Dynabead之后7天,测量在不存在抗原刺激的情况下由CAR-T细胞产生的肿瘤坏死因子(TNF)- α 。示出了大量CD8⁺T细胞的一个供体和T_{N/M}细胞的一个供体的结果。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。(B) 在不存在靶细胞或外源细胞因子的情况下培养4天之后,测定用CTV染料染色的CAR⁺CD8⁺和T_{N/M}细胞的增殖。示出了大量CD8⁺T细胞的一个供体和T_{N/M}细胞的一个供体的结果。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。

[0105] 图35A至B。(A) 以不同E:T比率针对具有不同的CD20表达水平的靶细胞的利妥昔单抗CAR-TN/M细胞的24小时裂解测定。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。通过未配对、双尾、双样本Student t检验未观察到统计学上的显著差异。(B) 重复抗原攻击之后的CAR-T细胞细胞毒性和增殖。将CD20 CAR-T细胞每两天用Raji肿瘤细胞以2:1的E:T比率进行攻击,并通过流式细胞术对活Raji和CAR-T细胞的数量进行定量。示出的数据是三次技术重复的平均值,误差棒指示 ± 1 S.D.。示出了使用来自四个不同健康供体的T细胞的四个独立实验的结果。

[0106] 图36A至C。(A) GD2 CAR构建体的示意图,其在CD28跨膜结构域和胞质结构域之间具有零到四个丙氨酸插入。(B) 将NSG小鼠静脉内注射 3.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的CHLA-255细胞然后在17天之后静脉内注射 2×10^6 个GD2 CAR-T细胞。通过生物发光成像监测肿瘤进展。(C) 将在安乐死时从小鼠收集的肝和脾中的人CD45+EGFRt+细胞的频率通过流式细胞术进行定量。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。每条迹线的终点指示每只动物的人道终点。

[0107] 图37A至B。(A) 通过Fc和EGFRt的抗体染色对CAR表面表达(顶部)和转导效率(底部)进行定量。(B) 示出了针对从十个不同健康供体产生的T细胞的以%Fc+和MFI表示的CAR表面染色数据。

[0108] 图38A至B。RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致(A)激活和衰竭性标志物的上调和(B)T细胞增殖(在不存在抗原刺激的情况下)。CD19 CAR和GD2 CAR被包括在内分别作为阴性和阳性对照,用于强直信号传导。每组七个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、GD2、Leu16、利妥昔单抗、RFR-LCDR和LFR-RCDR的数据。

[0109] 图39。通过生物层干涉法测量Leu16、利妥昔单抗和RFR-LCDR scFv的结合动力学参数。KD:平衡解离常数;ka:结合常数;kdis:解离常数;Avg:3次运行的平均值;S.D.:3次运

行的标准偏差。双尾Student t检验用于计算所示的p值。

[0110] 图40A至B。(A) RFR-LCDR.AA是CAR构建体,其包含RFR-LCDR scFv和插入在CD28跨膜结构域和胞质结构域之间的两个丙氨酸。该CAR在体外显示出与其他CD20 CAR类似的抗原检测阈值。(B) 包含杂合scFv序列和/或丙氨酸插入的CAR在细胞表面上保持无簇聚。将用CAR-Halo标签融合蛋白转导的Jurkat细胞用TMR红色荧光染料染色,并通过共聚焦显微术成像。在不存在抗原刺激的情况下,CAR分子均匀分布在细胞表面上。

[0111] 图41A至C。(A) 在去除Dynabead之后11天评价了在不存在CD20抗原刺激的情况下CAR-TN/M细胞的激活和衰竭性标志物表达。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。(B) 在不存在靶细胞或外源细胞因子的情况下培养4天之后,测定用CTV染料染色的CAR+TN/M细胞的增殖。直方图中示出的数据对应于条形图中的供体1。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。(C) 在不存在抗原刺激的情况下CAR+TN/M细胞的IFN- γ 、TNF- α 、IL-2产生。通过ELISA测量在不存在外源细胞因子的情况下培养48小时的细胞的上清液中的细胞因子浓度。数据条指示三次技术重复的平均值 ± 1 S.D.。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, n.s.无统计学显著性。每组七个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、Leu16、利妥昔单抗、利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA的数据。(B) 中的数据从上至下代表EGFRt、CD19、Leu16、利妥昔单抗、利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA。

[0112] 图42。CAR的强直信号传导。每组七个条以从左至右的顺序分别代表EGFRt、CD19、Leu16、利妥昔单抗、利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA的数据。

[0113] 图43A至H。强直信号传导CAR显示出不同的转录谱,指示(A) 提高的线粒体蛋白翻译、(B) 提高的抗原呈递、(C) 提高的MYC信号传导、(D) 提高的MTORC信号传导、(E) 提高的TNF- α 信号、(F) 发散的干扰素响应、(G) 与效应T细胞亚型(与记忆T细胞亚型相反)相关的基因的富集特征和(H) 提高的细胞周期活性。对于包含超出可用于显示的空间的基因的热图,以每个图的侧方顺序列出热图中示出的基因名称。

[0114] 图44A至D。RFR-LCDR杂合CD20 CAR在体内显示出优异的肿瘤清除。(A) 动物研究的示意图。向NSG小鼠植入50万个表达萤火虫萤光素酶的Raji淋巴瘤细胞,并用两剂的T细胞处理。在第一剂的T细胞处理之后55天,将动物用第二剂的肿瘤细胞再攻击。(B) 通过生物发光成像监测肿瘤进展。(C) 存活曲线以Kaplan-Meier曲线表示。结果表明,杂合CAR在肿瘤清除和长期复发预防方面优于亲本CD20 CAR以及CD19 CAR二者。(D) 通过流式细胞术测量初始T细胞注射之后23天外周血中表达CAR的人T细胞的频率。将两个丙氨酸残基添加至CAR中改善了基于利妥昔单抗的受体,证实了图5中所示的先前数据。与无丙氨酸插入的杂合CAR相比,将杂合CAR与两个丙氨酸插入进行组合进一步加快了初始肿瘤清除速率,并导致显著提高的T细胞持久性,表明可组合scFv改变和丙氨酸插入策略以产生CAR功能的协同改善。

[0115] 图45A至C。(A) 基于RNAseq的利妥昔单抗CAR-T细胞相对于Leu16(左)、RFR-LCDR(中)或RFR-LCDR.AA(右)CAR-T细胞的差异表达基因的火山图。所有差异表达基因都以灰色绘制。具有至少2倍上调或下调($\log_2 FC > 1$ 或 $\log_2 FC < -1$)与FDR < 0.05 的基因显示为红点。将出现在所有三组成对比较中具有 $\log_2 FC > 1$ 和FDR < 0.05 或 $\log_2 FC < -1$ 和FDR < 0.05 的基因名称进行标记。(B) 在Leu16、利妥昔单抗、RFR-LCDR、RFR-LCDR.AA CAR-T细胞中在ATP9A、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1基因座处的基于ATACseq的差异可访问区域的基因组浏览器文件。(C) 对

如图5A中所述获得的RNA-seq数据进行基因集富集分析(GSEA)。与T细胞表型和功能相关的途径中的结果总结以BubbleGUM图格式示出。

[0116] 举例说明性实施方案的描述

[0117] 嵌合抗原受体包含具有重链(VH)和轻链(VL)的单链可变片段(scFv),其各自包含互补决定区(CDR)侧翼的框架区(FR)。认为框架区是scFv结构的主要决定因素。已经提出,特定的FR序列,当作为CAR的scFv部分的一部分并入时,可引起强直信号传导,这可能是由于它们对诱导CAR簇聚的作用。先前的工作已表明,强直信号传导CAR(GD2)的FR序列与非强直信号传导CD19 CAR的CDR序列组合,并且所得的杂合CAR显示出强直信号。根据该结果,假设了在新的CAR分子的开发中并入强直信号传导CAR的FR序列通常是不期望的(Long et al. Nature Medicine, 2015. 21 (6): 581-590)。出乎意料的是,本发明人发现并入来自强直信号传导的CAR的FR产生了具有优异性质的CAR。因此,本公开内容的组合物和方法提供了重新设计的CAR(包括CD20 CAR),其具有提高的体内效力。

[0118] I. 定义

[0119] 本公开内容的肽涉及包含嵌合抗原受体或CAR的肽。CAR是工程化受体,其能够将任意特异性植入到免疫效应细胞上。在一些情况中,这些受体用于将单克隆抗体的特异性植入到T细胞上。受体被称为嵌合的,因为其由来自不同来源的部分构成。

[0120] 当涉及基因产物时,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文可互换使用。

[0121] “同源性”或“同一性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可通过比较每个序列中的位置来确定同一性,所述序列可出于比较目的而对齐。当比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置共有序列同一性。序列之间的同一性程度是序列共有的匹配或同源位置数目的函数。“无关”或“非同源”序列与本公开内容的序列之一共有小于60%的同一性,小于50%的同一性,小于40%的同一性,小于30%的同一性或小于25%的同一性。

[0122] 如本文所用,术语“氨基部分”、“N末端”、“氨基末端”等用于指多肽区域的顺序。此外,当某物在区域的N末端时,其不一定在整个多肽的末端(或端部),而仅在该区域或结构域的N末端。类似地,本文所用的术语“羧基部分”、“C末端”、“羧基末端”等用于指多肽区域的顺序,并且当某物在区域的C末端时,其不一定在整个多肽的末端(或端部),而是仅在该区域或结构域的C末端。

[0123] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,可在多核苷酸组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。核苷酸的序列可被非核苷酸组分中断。多核苷酸可在聚合之后进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。该术语也指双链和单链分子二者。除非另有说明或要求,否则本发明的作为多核苷酸的任何实施方案既涵盖双链形式,也涵盖已知或预测构成双链形式的两个互补单链形式中的每一个。

[0124] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是当在适当调节序列的控制下时在体外或体内被转录并任选地还翻译成基因产物(例如多肽)的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,核酸分子可以是单链(即有义链)或双链。编码区的边界由5' (氨基) 端的起始密码子和3' (羧基) 端的翻译终止密码子确定。基因可包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列和合成DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3'。

[0125] 术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体和抗体片段,其可以是人的、小鼠的、人源化的、嵌合的或来源于其他物种。“单克隆抗体”是从针对特定抗原位点的基本上均质的抗体群中获得的抗体。

[0126] “抗体或其功能片段”意指与特定抗原或表位特异性结合或者与其进行免疫反应的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆抗体和单克隆抗体二者。术语抗体包括免疫球蛋白的经遗传改造或以其他方式修饰的形式,例如胞内抗体(intrabody)、肽抗体(peptibody)、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和杂缀合抗体(heteroconjugate antibody)(例如双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)。术语功能性抗体片段包括抗体的抗原结合片段或区域,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rlgG和scFv片段。术语scFv是指单链Fv抗体,其中传统双链抗体的重链和轻链的可变结构域已连接形成一条链。

[0127] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指两种物质的可逆结合的平衡常数,并表示为解离常数(Kd)。结合亲和力可比抗体对不相关氨基酸序列的结合亲和力大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍、或者大至少1000倍或更多倍(或其中可推导出的任何范围)。如本文所用,术语“亲合力”是指两种或更多种物质的复合物在稀释后对解离的抗性。术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中关于抗体和/或抗原结合片段可互换使用。

[0128] 术语“结合”是指由于例如共价的、静电的、疏水的和离子的和/或氢键的相互作用,包括例如盐桥和水桥的相互作用,在两个分子之间的直接缔合。

[0129] “个体”、“对象”和“患者”可互换使用,并且可指人或非人。

[0130] 术语“降低/减少(lower)”、“降低的/减少的(reduced)”、“降低/减少(reduction)”、“减少/降低(decrease)”或“抑制”在本文中均一般用于意指统计学上显著量的减少。然而,为了避免疑问,“降低/减少”、“降低的/减少的”、“降低/减少”、“减少/降低”或“抑制”意指与参照水平相比至少10%的减少/降低,例如与参照水平相比至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或者多至并且包括100%(即,与参照样品相比不存在的水平)的减少/降低、或者10%至100%之间的任意减少/降低。

[0131] 术语“增加的/提高的(increased)”、“增加/提高(increase)”、“增强(enhance)”或“激活/活化(activate)”在本文中均一般用于意指统计学上显著量的增加;为了避免疑问,术语“增加的/提高的”、“增加/提高”、“增强”或“激活/活化”意指与参照水平相比至少10%的增加/提高,例如与参照水平相比至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或者多至并且包括

100%的增加/提高或者10%至100%之间的任意增加/提高,或者与参照水平相比,至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加/提高,或者2倍至10倍或更高的任意增加/提高。

[0132] II. 多肽

[0133] A. 信号肽

[0134] 本公开内容的多肽可包含信号肽。“信号肽”是指引导蛋白质在细胞内转运和定位(例如,至某个细胞器(如内质网)和/或细胞表面)的肽序列。在一些实施方案中,信号肽引导新生蛋白到内质网中。如果受体要被糖基化并锚定在细胞膜中,则这是必不可少的。通常,使用天然连接到最氨基末端组分的信号肽(例如,在具有轻链-接头-重链取向的scFv中,使用轻链的天然信号)。

[0135] 在一些实施方案中,信号肽在通过内质网(endoplasmic reticulum,ER)之后被切割,即,是可切割的信号肽。在一些实施方案中,限制位点位于信号肽的羧基端以促进切割。

[0136] B. 抗原结合结构域

[0137] 本公开内容的多肽可包含一个或更多个抗原结合结构域。“抗原结合结构域”描述了在适当条件下能够结合抗原的多肽区域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是基于一种或更多种抗体(例如,CD20抗体)的单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含重可变(VH)区和轻可变(VL)区,其中VH和VL区位于同一多肽上。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含VH和VL区之间的接头。接头可使抗原结合结构域能够形成用于抗原结合的所期望结构。

[0138] 本公开内容的多肽的抗原结合结构域的可变区可通过使VH和/或VL CDR 1、CDR 2和/或CDR 3区内的氨基酸残基突变来进行修饰,以改善抗体的一种或更多种结合特性(例如亲和力)。术语“CDR”指互补决定区,其基于分别由B细胞和T细胞产生的免疫球蛋白(抗体)和T细胞受体中的可变链的一部分,其中这些分子结合其特异性抗原。由于与免疫球蛋白和T细胞受体相关的大多数序列变异存在于CDR中,因此有时将这些区域称为高变区。突变可通过定点诱变或PCR介导的诱变引入,并且对抗体结合或其他目的功能特性的影响可在适当的体外或体内测定中进行评价。优选地,引入保守的修饰,并且通常改变CDR区域内的不超过1、2、3、4或5个残基。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失。

[0139] 可对抗体进行框架修饰以降低免疫原性,例如,通过将一个或更多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列。

[0140] 还预期了通过使抗原结合结构域与结合同一抗原(多价)或不同抗原(多特异性)的VH和VL区对多聚,抗原结合结构域可以是多特异性或多价的。

[0141] 抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的结合亲和力可为至少 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M。在一些实施方案中,抗原结合区例如可变区(重链和/或轻链可变区)或CDR的KD可为至少 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M(或其中可推导出的任何范围)。

[0142] 结合亲和力、KA或KD可通过本领域已知的方法来确定,例如通过基于表面等离子共振(surface plasmon resonance,SRP)的生物传感器,通过动力学排斥测定(kinetic exclusion assay,KinExA),通过基于偏振调制斜入射反射差(oblique-incidence reflectivity difference,OI-RD)用于微阵列检测的光学扫描仪,或通过ELISA。

[0143] 在一些实施方案中,与包含非人源化结合区(例如来自小鼠的结合区)的多肽相比,包含人源化结合区的多肽在宿主细胞中具有相等、更好或至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、103%、104%、104%、106%、106%、108%、109%、110%、115%或120%的结合亲和力和/或表达水平。

[0144] 在一些实施方案中,相对于小鼠框架,人框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可各自或共同具有至少、至多或恰好

[0145] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0146] 在一些实施方案中,相对于人框架,小鼠框架的框架区(例如FR1、FR2、FR3和/或FR4)可各自或共同具有至少、至多或恰好

[0147] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,或200个(或其中可推导出的任何范围)氨基酸替换、连续氨基酸添加或连续氨基酸缺失。

[0148] 替换可在重链或轻链可变区的FR1、FR2、FR3或FR4的第

[0149] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100位。

[0150] C. 胞外间隔区

[0151] 胞外间隔区可将抗原结合结构域连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,铰链具有足够的柔性以允许抗原结合结构域以不同方向取向以促进抗原结合。在一个实施方案

中,间隔区包含来自IgG的铰链区。在一些实施方案中,间隔区包含或还包含免疫球蛋白的CH2CH3区和CD3的一部分。在一些实施方案中,CH2CH3区可具有L235E/N297Q或L235D/N297Q修饰,或与CH2CH3区具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,间隔区来自IgG4。胞外间隔区可包含铰链区。

[0152] 如本文所用,术语“铰链”是指提供结构柔性和分隔侧翼多肽区域的柔性多肽连接区(本文也称为“铰链区”),并且可由天然或合成多肽组成。来源于免疫球蛋白(例如,IgG1)的“铰链”通常被定义为从人IgG1的Glu216延伸至Pro230(Burton(1985) *Molec. Immunol.*, 22:161—206)。通过将形成重链间二硫键(S—S)的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同位置,可将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对。铰链区可以是天然存在的或非天然存在的,包括但不限于如美国专利No.5,677,425(通过引用并入本文)中描述的改变的铰链区。铰链区可包含来源于与CH1结构域的抗体不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。术语“铰链”还可包含来源于CD8以及在提供柔性和分隔侧翼区域方面提供类似功能的其他受体。

[0153] 胞外间隔区的长度可为至少、至多或恰好

[0154] 4,5,6,7,8,9,10,12,15,16,17,18,19,20,20,25,30,35,40,45,50,75,100,110,119,120,130,140,150,160,170,180,190,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,260,270,280,290,300,325,350,或400个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,胞外间隔区由来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区组成或包含来自免疫球蛋白(例如IgG)的铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见例如Tan et al.(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:162;和Huck et al.(1986) *Nucl. Acids Res.*

[0155] 胞外间隔区的长度可影响CAR的信号传导活性和/或响应于抗原刺激的CAR信号传导的CAR-T细胞的扩增特性。在一些实施方案中,使用了较短的间隔区,例如少于50、45、40、30、35、30、25、20、15、14、13、12、11或10个氨基酸。在一些实施方案中,较长的间隔区,例如至少

[0156] 50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,260,270,280,或290个氨基酸的那些可具有提高的体内或体外扩增的优势。

[0157] 作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可包括以下氨基酸序列之一:表:示例性铰链区

[0158]

序列	SEQ ID NO:
DKTHT	42
CPPC	42
CPEPKSCDTPPPCPR	44
ELKTP LGDTTHT	45
KSCDKTHTCP	46
KCCVDCP	47

KYGPPCP	48
EPKSCDKTHTCPPCP	49
ELKTPLGDTTHTCPRCP	50
SPNMVPHAHHAQ	51
ESKYGPPCPPCP	52
EPKSCDKTYTCPPCP	53

[0159] 胞外间隔区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4、铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,胞外间隔区还可包含一个或多个氨基酸替换和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可被Tyr替换,使得铰链区包含序列EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO:53)。

[0160] 胞外间隔区可包含来源于人CD8的氨基酸序列;例如,铰链区可包含氨基酸序列:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:54),或其变体。

[0161] 胞外间隔区可包含或还包含CH2区。示例性CH2区是

APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

(SEQ ID NO:55)。胞外间隔区可包含或还包含CH3区。示例性CH3区是
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SEQ ID NO:56)。

[0162] 当胞外间隔区包含多个部分时,在多个部分之间的任何地方可存在0至50个氨基酸。例如,在铰链和CH2或CH3区之间或在CH2和CH3区之间(当两者都存在时),可存在至少、至多或恰好0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45或50个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,胞外间隔区基本上由铰链、CH2和/或CH3区组成,这意味着铰链、CH2和/或CH3区是存在的仅有的可鉴别区域,并且排除了所有其他结构域或区域,但是还可能不存在不是可鉴别区域的一部分的氨基酸。

[0163] D. 跨膜结构域

[0164] 本公开内容的多肽可包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是跨越膜的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域可能导致不同的受体稳定性。

[0165] 在一些实施方案中,跨膜结构域插入在胞外间隔区和胞质区之间。在一些实施方案中,跨膜结构域插入在胞外间隔区和一个或多个共刺激区之间。在一些实施方案中,接头位于跨膜结构域和一个或多个共刺激区之间。

[0166] 提供将多肽插入真核(例如哺乳动物)细胞的细胞膜中的任何跨膜结构域都可适合于使用。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD28、CD8、CD4、CD3- ζ 、CD134或CD7。

[0167] 可用于本公开内容的任何实施方案的示例性跨膜结构域包括下表中的那些:

[0168] 表:示例性跨膜结构域序列

[0169]

描述	序列	SEQ ID NO:
CD28-来源	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	57
CD8 β 来源	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	58
CD4 来源	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	59
CD3 ζ 来源	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	60
CD28 来源	WVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	61
CD134 (OX40) 来源	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	62
CD7 来源	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	63

[0170] E. 胞质区

[0171] 在抗原识别之后,本公开内容的受体可聚集并且信号通过胞质区传递到细胞。在一些实施方案中,本文所述的共刺激结构域是胞质区的一部分。在一些实施方案中,胞质区包含胞内信号传导结构域。胞内信号传导结构域可包含初级信号传导结构域和一个或更多个共刺激结构域。

[0172] 适用于本公开内容的多肽的胞质区和/或共刺激区包括任何所期望的信号传导结构域,其响应于通过抗原与抗原结合结构域结合的激活而提供不同且可检测的信号(例如,通过细胞一种或更多种细胞因子的产生提高;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导应答的调节等)。在一些实施方案中,胞质区包含至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个等)如本文中所述的ITAM基序。在一些实施方案中,胞质区包含DAP10/CD28型信号传导链。

[0173] 适用于本公开内容的多肽的胞质区包括包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的胞内信号传导多肽。ITAM基序是YX1X2(L/I),其中X1和X2独立地为任何氨基酸。在一些情况下,胞质区包含1、2、3、4或5个ITAM基序。在一些情况下,ITAM基序在胞内结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一和第二个实例彼此由6至8个氨基酸隔开,例如(YX1X2(L/I))(X3)_n(YX1X2(L/I)),其中n为6至8的整数,并且6至8个X3各自可以是任何氨基酸。

[0174] 合适的胞质区可以是来源于含ITAM基序多肽的含ITAM基序部分。例如,合适的胞质区可以是来自任何含ITAM基序蛋白质的含ITAM基序结构域。因此,合适的胞内结构域无需包含其所来源的整个蛋白质的整个序列。合适的含ITAM基序多肽的实例包括但不限于:DAP12、DAP10、FCER1G(Fc ϵ 受体I γ 链);CD3D(CD3 δ);CD3E(CD3 ϵ);CD3G(CD3 γ);CD3- ζ ;和CD79A(抗原受体复合物相关蛋白 α 链)。

[0175] 示例性胞质区是本领域已知的。下面所示的胞质区还提供了可并入本公开内容的CAR中的区域的实例:

[0176] 在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长DAP12氨基酸序列的含ITAM基序部分。在一些实施方案中,胞质区来源于FCER1G(也称为FCRG;Fc ϵ 受体I γ 链;Fc受体 γ -链;Fc- ϵ R1- γ ;FcR γ ;Fc ϵ RI γ ;高亲和力免疫球蛋白 ϵ 受体亚基 γ ;免疫球蛋白E受体,高亲和力 γ 链等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长FCER1G氨基酸序列的含ITAM基序部分。

[0177] 在一些实施方案中,胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3δ链(也称为CD3D;CD3-δ;T3D;CD3抗原,δ亚基;CD3δ;CD3δ;CD3d抗原,δ多肽(TiT3复合物);OKT3,δ链;T细胞受体T3δ链;T细胞表面糖蛋白CD3δ链等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD3δ氨基酸序列的含ITAM基序部分。在一些实施方案中,胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3ε链(也称为CD3e、CD3ε;T细胞表面抗原T3/Leu-4ε链、T细胞表面糖蛋白CD3ε链、AI504783、CD3、CD3-ε、T3e等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD3ε氨基酸序列的含ITAM基序部分。在一些实施方案中,胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3γ链(也称为CD3G、CD3γ、T细胞受体T3γ链、CD3-γ、T3G、γ多肽(TiT3复合物)等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD3γ氨基酸序列的含ITAM基序部分。在一些实施方案中,胞质区来源于T细胞表面糖蛋白CD3ζ链(也称为CD3Z、CD3ζ、T细胞受体T3ζ链、CD247、CD3-ζ、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD3ζ氨基酸序列的含ITAM基序部分。

[0178] 在一些实施方案中,胞质区来源于CD79A(也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白α链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关α);MB-1膜糖蛋白;ig-α;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。在一些实施方案中,合适的胞质区可包含全长CD79A氨基酸序列的含ITAM基序部分。

[0179] 具体的示例性胞质区在本领域中是已知的并且进一步在下表中示出。

[0180] 表:胞质区

序列	SEQ ID NO:
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLV LTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSD LNTQRPYYK	64
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLV LTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDL NTQRPYYK	65

[0182]

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFL GRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	66
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFL GRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	67
MIPAVLLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKA AITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	68
DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	69
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSD ITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGI IVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDA QYSHLGGNWARNK	70
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVFNVCNTSITWVEGTVGTLLSD ITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQVYQ PLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	71
DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	72
MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQ YPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDITGGLLLLVEYWSKN RKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQR RI	73
NPDYEPKRGQRDLYSGLNQR	74
MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAAEAKN ITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYR MCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLA VGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLP NDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	75
DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	76
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	77
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKQRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	78

[0183]

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	39
NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	79
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	80
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	81
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAH FQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGG IYVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCA VVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQ GTYQDVGSLNIGDVQLEKP	82
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAH FQCPHNSSNNANVTWVRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGT KNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNL DDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	83
ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	84
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS	85
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS	86

[0184] F. 共刺激区

[0185] 合适的共刺激区(例如包括在胞质区中的那些)的一些非限制性实例包括但不限于来自4-1BB(CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM的多肽。

[0186] 共刺激区可具有至少、至多或恰好20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200或300个氨基酸或其中可推导出的任何范围的长度。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白4-1BB(也称为TNFRSF9;CD137;CDw137;ILA;等)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白CD28(也称为Tp44)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白ICOS(也称为AILIM、CD278和CVID1)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白OX-40(也称为TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1L)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白BTLA(也称为BTLA1和CD272)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白CD27(也称为S 152、T14、TNFRSF7和Tp55)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白CD30(也称为TNFRSF8、D1S166E和Ki-1)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白GITR(也称为TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357和GITR-D)的胞内部分。在一些实施方案中,共刺激区来源于跨膜蛋白HVEM(也称为TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR和TR2)的胞内部分。

[0187] 具体示例性共刺激结构域由以下氨基酸序列表示:

[0188] 表:共刺激结构域

[0189]

序列	SEQ ID NO:
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	87
FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	88
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL	89
RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	90
CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYD NDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNH SVIGPNSRLARNVKEAP TEYASICVRS	91
HQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	92
RRACRKRIKQLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEER GLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKI EKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEP PLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	93
HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEER GERSAEEKGRLGDL WV	94
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPS FTGRSPNH	95
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	38

[0190] G. 检测肽

[0191] 在一些实施方案中,本文所述的多肽还可包含检测肽。合适的检测肽包括血细胞凝聚素 (hemagglutinin, HA; 例如, YPYDVPDYA (SEQ ID NO:96); FLAG (例如, DYKDDDDK (SEQ ID NO:97); c-myc (例如, EQKLISEEDL; SEQ ID NO:98) 等。其他合适的检测肽是本领域已知的。

[0192] H. 肽接头

[0193] 在一些实施方案中,本公开内容的多肽包括肽接头(有时称为接头)。可使用肽接头来隔开任何本文中所述的肽结构域/区。例如,接头可在信号肽与抗原结合结构域之间、抗原结合结构域的VH与VL之间、抗原结合结构域与肽间隔区之间、肽间隔区与跨膜结构域之间、侧接共刺激区或在共刺激区的N-或C-区上、和/或在跨膜结构域与胞内结构域之间。肽接头可具有多种氨基酸序列中的任一种。结构域和区可通过一般具有柔性性质的肽接头连接,但是不排除其他化学键联。接头可以是长度为约6至约40个氨基酸、或长度为约6至约25个氨基酸的肽。这些接头可通过使用合成的编码接头的寡核苷酸来偶联蛋白质而产生。

[0194] 可使用具有一定程度柔性的肽接头。肽接头实际上可具有任何氨基酸序列,应记住合适的肽接头将具有导致一般柔性肽的序列。使用小氨基酸(例如甘氨酸和丙氨酸)可用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员是常规的。

[0195] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的长度,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0196] 合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的不同长度,例如1个氨基酸(例如

Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0197] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGS)_n(SEQ ID NO:99)、(G4S)_n和(GGGS)_n(SEQ ID NO:100),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,n是至少、至多、或者恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser二者均是相对未结构化的,并且因此可充当组分之间的中性链(tether)。可使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基的限制少得多。示例性的间隔区可包含氨基酸序列,其包括但不限于

GGSG (SEQ ID NO:101), GSGGG (SEQ ID NO:102), GSGSG (SEQ ID NO:103), GSGGG (SEQ ID NO:104), GGGSG (SEQ ID NO:105), GSSSG (SEQ ID NO:106), 等。

[0198] 在另一些实施方案中,接头包含(EAAAK)_n(SEQ ID NO:107),其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,n是至少、至多、或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。

[0199] I. 另外的修饰和多肽增强

[0200] 另外,本公开内容的多肽可以是经化学修饰的。可改变多肽的糖基化,例如,通过修饰多肽序列内的一个或更多个糖基化位点以提高多肽对抗原的亲和力(美国专利No.5,714,350和6,350,861)。

[0201] 预期本公开内容的多肽的区域或片段可相对于SEQ ID NO:1至144中任一个具有、具有至少或具有至多

[0202] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200个或更多个氨基酸替换、连续氨基酸添加、或连续氨基酸缺失。或者,本公开内容的多肽的区域或片段可具有包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成的氨基酸序列:与SEQ ID NO:1至144中任一个具有、具有至少、或具有至多50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%(或其中可推导出的任何范围)同一性。此外,在一些实施方案中,区域或片段包含在SEQ ID NO:1至144中任一个中起始于第

[0203] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500位(其中第1位处于SEQ ID NO的N端)的具有

[0204] 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,

274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500个或更多个连续氨基酸的氨基酸区域。本公开内容的多肽可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个或更多个变体氨基酸,或者本公开内容的多肽可与SEQ ID NO:1至144中任一个的至少、或至多

[0205] 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,300,400,500,550,600,个或更多个、或其中可推导出的任何范围的连续氨基酸具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相似性、同一性或同源性。

[0206] 本公开内容的多肽可包含至少、至多、或恰好

[0207] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,

140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,或615 (或其中可推导出的任何范围) 个替换。

[0208] 替换可在SEQ ID NO:1至144中任一个的第

[0209] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,

254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,或650(或其中可推导出的任何范围)位氨基酸处。

[0210] 本文中所述的多肽的固定长度可为至少、至多或恰好

[0211] 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,300,400,500,550,1000(或其中可推导出的任何范围)个或更多个氨基酸。

[0212] 替换变体通常包含在蛋白质内的一个或更多个位点处一个氨基酸与另一个氨基酸的交换,并且可设计成在丧失或不丧失其他功能或特性的情况下调节多肽的一种或更多种性质。替换可以是保守的,也就是说,一个氨基酸被一个相似形状和电荷的氨基酸替代。保守替换是本领域公知的并且包括,例如,以下改变:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺到天冬酰胺。

胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;甲硫氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,替换可以是非保守的,使得多肽的功能或活性受到影响。非保守的改变通常包括将残基用化学上相异的残基替换,例如用极性或带电荷的氨基酸替换非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0213] 蛋白质可以是重组的或体外合成的。或者,非重组或重组蛋白质可从细菌分离。还预期包含这样变体的细菌可应用于组合物和方法中。因此,不需要分离蛋白质。

[0214] 如本文所用,术语“功能等同的密码子”是指编码相同氨基酸的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的六个密码子,并且也指编码生物学等同的氨基酸的密码子。

[0215] 还将理解的是,氨基酸和核酸序列可分别包含另外的残基,例如另外的N-或C-端氨基酸,或者5'或3'序列,并且仍然基本上如本文中所公开的一个序列所示,只要序列符合以上提出的标准即可,所述标准包括在涉及蛋白质表达的情况下,维持生物学蛋白质活性。末端序列的添加特别适用于这样的核酸序列,其可例如包括位于编码区的5'或3'部分侧翼的多个非编码序列。

[0216] 以下是基于改变蛋白质的氨基酸以产生等同的或甚至改善的第二代分子的讨论。例如,某些氨基酸可替换蛋白质结构中的其他氨基酸,而不明显损失相互作用结合能力。一些结构例如如酶催化结构域或相互作用组分可具有被替换以维持这样的功能的氨基酸。由于限定蛋白质的生物学功能活性的是该蛋白质的相互作用能力和性质,因此可在蛋白质序列及其基础DNA编码序列中进行某些氨基酸替换,并且尽管如此仍产生具有相似特性的蛋白质。因此,本发明人预期,可在基因的DNA序列中做出多种改变而不明显损失其生物学效用或活性。

[0217] 在另一些实施方案中,通过引入一个或更多个替换来实现多肽功能的改变。例如,某些氨基酸可替换蛋白质结构中的其他氨基酸,以改变相互作用组分的相互作用结合能力。例如如蛋白质相互作用结构域、核酸相互作用结构域和催化位点的结构可具有被替换以改变这样的功能的氨基酸。由于决定蛋白质的生物学功能活性的是该蛋白质的相互作用能力和性质,因此可在蛋白质序列及其基础DNA编码序列中进行某些氨基酸替换,并且尽管如此却产生具有不同特性的蛋白质。因此,本发明人预期,可在基因的DNA序列中做出多种改变使其生物学效用或活性发生显著改变。

[0218] 在进行这样的变化时,可考虑氨基酸的亲水指数(hydropathic index)。氨基酸亲水指数在赋予蛋白质以相互作用生物学功能中的重要性是本领域中通常理解的(Kyte and Doolittle,1982)。公认的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,其转而限定了蛋白质与其他分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0219] 本领域中还应理解的是,可基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利4,554,101(通过引用并入本文)声称:蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性控制)与蛋白质的生物学特性相关。应理解的是,氨基酸可替换具有相似亲水性值的另一氨基酸,并且仍产生生物学上等同和免疫上等同的蛋白质。

[0220] 如以上所概括的,氨基酸替换通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。将多个前述特征考虑在内的示例性替换是公知的,并且包

括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0221] 在一些具体的实施方案中,全部或部分本文中所述蛋白质也可根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成。多种自动合成仪可商购获得并且可根据已知的方案使用。参见,例如,Stewart and Young (1984); Tam等 (1983); Merrifield, (1986); 和Barany and Merrifield (1979),其各自通过引用并入本文。或者,可使用重组DNA技术,其中将编码肽或多肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到适当的宿主细胞中,并在适合表达的条件下培养。

[0222] 一个实施方案包括将基因转移至细胞(包括微生物)用于产生和/或呈递蛋白质的用途。可将目的蛋白的基因转移到适当的宿主细胞中,随后在适当的条件下培养细胞。可使用编码几乎任何多肽的核酸。本文中讨论了重组表达载体的产生以及其中包含的元件。或者,待产生的蛋白质可以是通常由用于蛋白质产生的细胞合成的内源性蛋白质。

[0223] III. 细胞

[0224] 某些实施方案涉及包含本公开内容的多肽或核酸的细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞或T细胞。“T细胞”包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括T辅助细胞、恒定自然杀伤T (iNKT) 细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞 (T-regulatory cell, Treg) γ - δ T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞和嗜中性粒细胞。T细胞可指CD4+或CD8+T细胞。

[0225] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC) No. CCL-2)、CHO细胞(例如ATCC No. CRL9618、CCL61、CRL9096)、人胚肾(human embryonic kidney, HEK) 293细胞(例如ATCC No. CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如ATCC No. CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如ATCC No. CCL10)、PC12细胞(ATCC No. CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No. CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC No. CCLI.3)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如,NKL、NK92和YTS)等。

[0226] 在一些情况下,细胞不是永生化细胞系,而是从个体获得的细胞(例如,原代细胞)。例如,在一些情况下,细胞是从个体获得的免疫细胞。作为一个实例,细胞是从个体获得的T淋巴细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的细胞毒性细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的干细胞(例如,外周血干细胞)或祖细胞。

[0227] IV. 用于修饰基因组DNA的方法

[0228] 在某些实施方案中,对基因组DNA进行修饰以包含另外的突变、插入或缺失,或者以整合本公开内容的某些分子构建体,使得该构建体从基因组DNA表达。在一些实施方案中,将编码本公开内容的多肽的核酸整合到细胞的基因组DNA中。在一些实施方案中,核酸通过病毒转导整合到细胞中,例如通过慢病毒或逆转录病毒转导进行的基因转移。在一些实施方案中,通过逆转录病毒载体、慢病毒载体或腺相关病毒载体将编码本公开内容的多肽(例如,CAR)的核酸整合到宿主细胞的基因组中来修饰基因组DNA。

[0229] 在一些实施方案中,整合是靶向整合。在一些实施方案中,靶向整合通过使用DNA消化剂/多核苷酸修饰酶例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶来实现。术语“DNA消化剂”是指能够切割核酸的核苷酸亚基之间的键(即磷酸二酯键)的试剂。一个特异性靶标

是TRAC (T细胞受体 α 恒定 (T cell receptor alpha constant)) 基因座。例如,首先,将用由与靶向TRAC (T细胞受体 α 恒定) 基因座的单指导RNA (single-guide RNA, sgRNA) 复合的Cas9蛋白组成的核糖核蛋白 (RNP) 复合物对细胞进行电穿孔。电穿孔之后十五分钟,将用携带编码CAR的HDR模板的AAV6处理细胞。在另一个实例中,双链或单链DNA包含HDR模板并通过电穿孔与RNP复合物一起被引入到细胞中。

[0230] 因此,一方面,本公开内容包括靶向整合。实现此的一种方式是通过使用外源核酸序列(即,着陆垫 (landing pad)),其包含至少一种多核苷酸修饰酶,例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶的至少一种识别序列。位点特异性重组酶是本领域公知的,并且通常可被称为转化酶、解离酶或整合酶。位点特异性重组酶的一些非限制性实例可包括 λ 整合酶、Cre重组酶、FLP重组酶、 γ - δ 解离酶、Tn3解离酶、 Φ C31整合酶、Bxb1整合酶和R4整合酶。位点特异性重组酶识别特异性识别序列(或识别位点)或其变体,所有这些是本领域公知的。例如,Cre重组酶识别LoxP位点,而FLP重组酶识别FRT位点。

[0231] 预期的靶向内切核酸酶包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、 π 核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、CRISPR/Cas样内切核酸酶、I-Tev1核酸酶或相关单体杂合体、或人工靶向DNA双链断裂诱导剂。示例性的靶向内切核酸酶在下面进一步描述。例如,通常来说,锌指核酸酶包含DNA结合结构域(即,锌指)和切割结构域(即,核酸酶),其二者均在下面描述。多核苷酸修饰酶的定义中还包括本领域技术人员已知的任何其他有用的融合蛋白,例如可包含DNA结合结构域和核酸酶。

[0232] 着陆垫序列是包含至少一个被特定的多核苷酸修饰酶(例如位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶)选择性地结合并修饰的识别序列的核苷酸序列。通常,着陆垫序列中的识别序列不以内源性存在于待修饰细胞的基因组中。例如,在待修饰的细胞是CHO细胞的情况下,着陆垫序列中的识别序列不存在于内源性CHO基因组中。可通过选择不以内源性存在于靶细胞的基因组内的对于高效核苷酸修饰酶的识别序列,来提高靶向整合的速率。选择不以内源性存在的识别序列还降低了潜在的脱靶整合。在另一些方面中,可期望使用在待修饰细胞中为天然的识别序列。例如,在着陆垫序列中使用多个识别序列的情况下,一个或更多个可以是外源性的,并且一个或更多个可以是天然的。

[0233] 本领域普通技术人员可容易地确定被位点特异性重组酶和/或靶向内切核酸酶结合和切割的序列。

[0234] 可使用的靶向内切核酸酶的另一个实例是包含至少一个核定位信号的RNA指导的内切核酸酶,其允许内切核酸酶进入真核细胞的细胞核中。RNA指导的内切核酸酶还包含至少一个核酸酶结构域和至少一个与指导RNA相互作用的结构域。通过指导RNA将RNA指导的内切核酸酶引导至特定的染色体序列,使得RNA指导的内切核酸酶切割特定的染色体序列。由于指导RNA提供了靶向切割的特异性,因此RNA指导的内切核酸酶的内切核酸酶是通用的,并且可与不同的指导RNA一起使用以切割不同的靶染色体序列。以下进一步详细讨论了示例性的RNA指导的内切核酸酶蛋白。例如,RNA指导的内切核酸酶可以是CRISPR/Cas蛋白或CRISPR/Cas样融合蛋白、来源于成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeat, CRISPR)/CRISPR相关(Cas)系统的RNA指导的内切核酸酶。

[0235] 靶向内切核酸酶也可以是兆核酸酶。兆核酸酶是特征在于大的识别位点(即,识别位点通常为约12个碱基对至约40个碱基对)的内切脱氧核糖核酸酶。作为该要求的结果,识别位点通常在任何给定的基因组中仅出现一次。在兆核酸酶中,称为“LAGLIDADG”的归巢内切核酸酶(homing endonuclease)家族已成为研究基因组和基因组工程的有价值的工具。兆核酸酶可通过使用本领域技术人员公知的技术修饰其识别序列来靶向特定的染色体序列。参见,例如,Epinat et al,2003,Nuc.Acid Res.,31(11):2952-62和Stoddard,2005,Quarterly Review of Biophysics,pp.1-47。

[0236] 可使用的靶向内切核酸酶的另一个实例是转录激活子样效应物(TALE)核酸酶。TALE是来自植物病原体黄单胞菌属(Xanthomonas)的转录因子,其可容易地被改造成结合新的DNA靶标。TALE或其截短形式可与内切核酸酶(例如FokI)的催化结构域连接,以产生被称为TALE核酸酶或TALEN的靶向内切核酸酶。参见,例如,Sanjana et al.,2012,Nature Protocols 7(1):171-192;Bogdanove AJ,Voytas D F.,2011,Science,333(6051):1843-6;Bradley P,Bogdanove AJ,Stoddard B L.,2013,Curr Opin Struct Biol.,23(1):93-9。

[0237] V. 方法

[0238] 本公开内容的一些方面涉及用于治疗癌症(例如黑素瘤)的方法。在另一些实施方案中,本文所述的治疗性受体(例如,CAR)可用于刺激免疫应答。免疫应答刺激可在体外、体内或离体进行。在一些实施方案中,本文所述的治疗性受体用于预防复发。所述方法通常涉及用包含编码本公开内容的多肽的核苷酸序列的表达载体或DNA、RNA(例如体外经转录的RNA)或腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)对哺乳动物细胞进行遗传修饰,或将多肽直接转移到细胞中。细胞可以是免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)、干细胞、祖细胞等。在一些实施方案中,细胞是本文所述的细胞。

[0239] 在一些实施方案中,遗传修饰是离体进行的。例如,从个体获得T淋巴细胞、干细胞或NK细胞(或本文中所述的细胞);以及从个体获得的细胞被遗传修饰以表达本公开内容的多肽。在一些情况下,经遗传修饰的细胞离体被激活。在另一些情况下,将经遗传修饰的细胞引入个体(例如,从其获得细胞的个体);并且经遗传修饰的细胞在体内被激活。

[0240] 在一些实施方案中,所述方法涉及施用本文所述的细胞或肽以用于治疗癌症或向患有癌症的人施用。在一些实施方案中,癌症是CD20+癌症。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。

[0241] VI. 另外的治疗

[0242] A. 免疫治疗

[0243] 在一些实施方案中,所述方法包括施用癌症免疫治疗。癌症免疫治疗(有时称为免疫肿瘤学(immuno-oncology),缩写IO)是利用免疫系统来治疗癌症。可将免疫治疗分类为主动治疗、被动治疗或混合治疗(主动治疗和被动治疗)。这些方法运用了以下事实:癌细胞通常在其表面具有可被免疫系统检测到的分子,称为肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA);它们通常是蛋白质或其他大分子(例如碳水化合物)。主动免疫治疗通过靶向TAA引导免疫系统攻击肿瘤细胞。被动免疫治疗增强现有的抗肿瘤应答,并包括使用单克隆抗体、淋巴细胞和细胞因子。下面描述可用于本公开内容方法中的免疫治疗。

[0244] 1. 检查点抑制剂和组合治疗

[0245] 本公开内容的一些实施方案可包括施用免疫检查点抑制剂(也称为检查点抑制剂治疗),下面对其进行进一步描述。检查点抑制剂治疗可以是仅靶向一种细胞检查点蛋白的单一治疗,或者可以是靶向至少两种细胞检查点蛋白的组合治疗。例如,检查点抑制剂单一治疗可包含以下之一:PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂,或者可包含CTLA-4、B7-1或B7-2抑制剂之一。检查点抑制剂组合治疗可包含以下之一:PD-1、PD-L1或PD-L2抑制剂,并且还可组合包含CTLA-4、B7-1或B7-2抑制剂之一。组合治疗中的抑制剂组合不需要在同一组合物中,而是可同时、基本同时或以包括定期施用两种抑制剂的给药方案来施用,其中周期可以是本文中所述的时间段。

[0246] a. PD-1、PD-L1和PD-L2抑制剂

[0247] PD-1可在其中T细胞遇到感染或肿瘤的肿瘤微环境中发挥作用。活化的T细胞上调PD-1并继续在外周组织中表达它。细胞因子(例如IFN- γ)诱导上皮细胞和肿瘤细胞上PD-L1的表达。PD-L2在巨噬细胞和树突细胞上表达。PD-1的主要作用是在免疫应答过程中限制外周中效应T细胞的活性并防止对组织的过度损害。本公开内容的抑制剂可阻断PD-1和/或PD-L1活性的一种或更多种功能。

[0248] “PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。“PD-L1”的替代名称包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。“PD-L2”的替代名称包括B7-DC、B7-1和CD273。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2是人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0249] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-1配体结合配偶体是PD-L1和/或PD-L2。在另一个实施方案中,PD-L1抑制剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-L1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PD-L2抑制剂是抑制PD-L2与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-L2结合配偶体是PD-1。抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段/区域、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利No. 8,735,553、8,354,509和8,008,449,其全部通过引用并入本文。用于本文中提供的方法和组合物中的其他PD-1抑制剂是本领域已知的,例如描述于美国专利申请No. US2014/0294898、US2014/022021和US2011/0008369中,其全部通过引用并入本文。

[0250] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自:纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和皮地利珠单抗(pidilizumab)。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是免疫黏附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的胞外部分或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中,PD-L1抑制剂包含AMP-224。纳武单抗(也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO®**)是描述于W02006/121168中的抗PD-1抗体。派姆单抗(也称为MK-3475、Merck 3475、兰洛利珠单抗(lambrolizumab)、**KEYTRUDA®**和SCH-900475)是描述于W02009/114335中的抗PD-1抗体。皮地利珠单抗(也称为CT-011、hBAT或hBAT-1)是描述于W02009/101611中的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是描述于W02010/027827和W02011/066342中的PD-L2-Fc融合可溶性受体。另外的PD-1抑制剂包括MEDI0680,也称为AMP-514和REGN2810。

[0251] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂,例如度伐单抗(Durvalumab),也称为MEDI4736;阿特珠单抗(atezolizumab),也称为MPDL3280A;阿维单抗

(avelumab),也称为MSB00010118C、MDX-1105、BMS-936559;或其组合。在某些方面中,免疫检查点抑制剂是PD-L2抑制剂,例如rHIgM12B7。

[0252] 在一些实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争PD-1、PD-L1或PD-L2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0253] b.CTLA-4、B7-1和B7-2抑制剂

[0254] 在本文中提供的方法中可靶向的另一免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列具有Genbank登录号L15006。CTLA-4见于T细胞表面,并且当与抗原呈递细胞表面上的B7-1 (CD80) 或B7-2 (CD86) 结合时充当“关闭”开关。CTLA-4是免疫球蛋白超家族的成员,其在辅助性T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA-4与T细胞共刺激蛋白CD28类似,并且两个分子均与抗原呈递细胞上的B7-1和B7-2结合。CTLA-4向T细胞传递抑制信号,而CD28传递刺激信号。胞内CTLA-4也见于调节性T细胞中并且对其功能可能是重要的。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4 (B7分子的抑制性受体) 的表达提高。本公开内容的抑制剂可阻断CTLA-4、B7-1和/或B7-2活性的一种或更多种功能。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-1的相互作用。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-2的相互作用。

[0255] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

[0256] 适用于本发明方法中的抗人CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)可使用本领域公知的方法来产生。或者,可使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于以下中的抗CTLA-4抗体可用于本文中公开的方法中:US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675,206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);原名替西木单抗(ticilimumab))、美国专利No.6,207,156;Hurwitz et al.,1998.。每个上述出版物的教导在此通过引用并入。也可使用与这些本领域公认的抗体中任一者竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请No.WO2001/014424、WO2000/037504和美国专利No.8,017,114中;所有均通过引用并入本文。

[0257] 在本公开内容的方法和组合物中可用作检查点抑制剂的另外的抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和**Yervoy®**) 或者其抗原结合片段和变体(参见,例如WO01/14424)。

[0258] 在一些实施方案中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及曲美木单抗或伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争PD-1、B7-1或B7-2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0259] 2. 共刺激分子的抑制

[0260] 在一些实施方案中,免疫治疗包含共刺激分子的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂包括B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD28、ICOS、OX40 (TNFRSF4)、4-1BB (CD137; TNFRSF9)、CD40L (CD40LG)、GITR (TNFRSF18) 及其组合。抑制剂包括抑制性抗体、多肽、化合物和核酸。

[0261] 3. 树突细胞治疗

[0262] 树突细胞治疗通过使树突细胞将肿瘤抗原呈递给淋巴细胞来引发抗肿瘤应答,这活化它们,引发它们杀伤呈递抗原的其他细胞。树突细胞是哺乳动物免疫系统中的抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC)。在癌症治疗中,它们有助于靶向癌症抗原。基于树突细胞的细胞癌治疗的一个实例是 sipuleucel-T。

[0263] 诱导树突细胞呈递肿瘤抗原的一种方法是通过用自体肿瘤裂解物或短肽 (对应于癌细胞上蛋白质抗原的小部分蛋白质) 进行疫苗接种。这些肽通常以与佐剂 (高免疫原性物质) 组合来提供,以提高免疫和抗肿瘤应答。其他佐剂包括吸引或活化树突细胞的蛋白质或其他化学物质,例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)。

[0264] 树突细胞也可通过使肿瘤细胞表达 GM-CSF 在体内被活化。这可通过对肿瘤细胞进行遗传改造以产生 GM-CSF 来实现,或通过用表达 GM-CSF 的溶瘤病毒感染肿瘤细胞来实现。

[0265] 另一策略是从患者的血液中去掉树突细胞并在身体外部活化它们。树突细胞在存在肿瘤抗原的情况下被活化,肿瘤抗原可以是单个肿瘤特异性肽/蛋白质或肿瘤细胞裂解物 (分解肿瘤细胞的溶液)。这些细胞 (与可选的佐剂) 被输注并引发免疫应答。

[0266] 树突细胞治疗包括使用与树突细胞表面上的受体结合的抗体。抗原可添加至抗体并可诱导树突细胞成熟并提供对肿瘤的免疫。

[0267] 4. 细胞因子治疗

[0268] 细胞因子是由在肿瘤内存在的许多类型的细胞产生的蛋白质。它们可调节免疫应答。肿瘤经常运用它们来使其生长并降低免疫应答。这些免疫调节作用使得它们被用作引发免疫应答的药物。两种常用的细胞因子是干扰素和白介素。

[0269] 干扰素由免疫系统产生。它们通常参与抗病毒反应,但对于癌症也有用途。它们分为三组:I型 (IFN α 和IFN β)、II型 (IFN γ) 和III型 (IFN λ)。

[0270] 白介素具有一系列免疫系统作用。IL-2是示例性的白介素细胞因子治疗。

[0271] 5. 过继性T细胞治疗

[0272] 过继性T细胞治疗是通过输注T细胞 (过继性细胞转移) 的被动免疫接种的一种形式。它们见于血液和组织中,并且通常当它们发现外来病原体时会活化。具体地,当T细胞的表面受体遇到在其表面抗原上显示出部分外来蛋白质的细胞时,它们就会活化。这些可以是感染的细胞,或是抗原呈递细胞 (APC)。它们见于正常组织中和肿瘤组织中,在那里它们被称为肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL)。它们在存在APC (例如呈递肿瘤抗原的树突细胞) 的情况下被活化。尽管这些细胞可攻击肿瘤,但肿瘤内的环境具有高度免疫抑制作用,这阻止免疫介导的肿瘤死亡。

[0273] 已经开发了产生和获得靶向肿瘤的T细胞的多种方式。对肿瘤抗原具有特异性的T细胞可从肿瘤样品 (TIL) 中除去,或从血液过滤。随后的活化和培养离体进行,并将所得物进行再输注。肿瘤靶向T细胞可通过基因治疗产生。肿瘤靶向T细胞可通过将T细胞暴露于肿

瘤抗原来扩增。

[0274] 在一些实施方案中,过继性细胞治疗中使用的治疗性细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR是融合蛋白,通常由胞外抗原结合结构域(其可以是scFv)、胞外间隔区、跨膜结构域、共刺激信号传导区(其数量根据特定的CAR设计而变化)和CD3- ζ 信号传导结构域/内结构域组成。

[0275] 在一些实施方案中,过继性细胞治疗中使用的治疗性细胞表达工程化T细胞受体(T-cell receptor, TCR),其是靶向肿瘤抗原的异源TCR分子。免疫细胞(包括T细胞和自然杀伤(NK)细胞)可通过本领域已知的多种方法(包括病毒转导、DNA核转染和RNA核转染)来工程化以表达CAR或TCR。CAR或TCR与抗原靶标的结合可使表达CAR或TCR的人T细胞活化,这可导致对荷有抗原的细胞的杀伤或一些其他的免疫应答。

[0276] 在一些实施方案中,细胞包含癌症特异性CAR或TCR。在CAR或TCR多肽的上下文中的术语“癌症特异性”是指对癌症特异性分子例如癌症特异性抗原具有抗原结合特异性的多肽。在一些实施方案中,癌症特异性CAR和另外的CAR位于不同的多肽上。

[0277] B. 溶瘤病毒

[0278] 在一些实施方案中,另外的治疗包含溶瘤病毒。溶瘤病毒是优先感染并杀伤癌细胞的病毒。当感染的癌细胞被溶瘤作用破坏时,它们释放出新的感染性病毒颗粒或病毒粒子来帮助破坏剩余的肿瘤。认为溶瘤病毒不仅造成肿瘤细胞的直接破坏,而且还刺激宿主的抗肿瘤免疫应答以进行长期的免疫治疗。

[0279] C. 多糖

[0280] 在一些实施方案中,另外的治疗包含多糖。见于蘑菇中的某些化合物(主要是多糖)可上调免疫系统并可具有抗癌特性。例如, β -葡聚糖(例如香菇多糖)在实验室研究中已显示出刺激巨噬细胞、NK细胞、T细胞和免疫系统细胞因子,并在临床试验中已经作为免疫佐剂进行了研究。

[0281] D. 新生抗原

[0282] 在一些实施方案中,另外的治疗包括新生抗原突变的靶向。许多肿瘤表达突变。这些突变潜在地产生新的可靶向抗原(新生抗原)以用于T细胞免疫治疗。如使用RNA测序数据所确定的,在具有高突变负荷的肿瘤中,癌症病变中CD8+T细胞的存在更高。与自然杀伤细胞和T细胞的细胞溶解活性相关的转录水平与许多人肿瘤中的突变负荷呈正相关。

[0283] E. 化学治疗

[0284] 在一些实施方案中,另外的治疗包括化学治疗。合适的化学治疗剂类别包括:(a)烷化剂,例如氮芥类(例如,二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺类(例如,六甲基三聚氰胺、噻替派(thiotepa))、烷基磺酸酯类(例如白消安(busulfan))、亚硝基脲类(例如,卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、链脲菌素(streptozocin))和三嗪类(例如,达卡巴嗪(dicarbazine));(b)抗代谢物,例如叶酸类似物(例如,甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、氮尿苷)以及嘌呤类似物和相关物质(例如,6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin));(c)天然产物,例如长春花生物碱(例如,长春花碱、长春新碱)、表鬼臼毒素(epipodophylotoxin)(例如,依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide))、抗生素(例如,放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星

(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)和米托蒽醌(mitoxanthrone))、酶(例如,L-天冬酰胺酶),和生物反应调节剂(例如,干扰素- α);以及(d)其他药剂,例如铂配位复合物(例如,顺铂、卡铂)、经取代脲(例如,羟基脲)、甲基胍(methylhydrazine)衍生物(例如,丙卡巴肼(procarbazine),和肾上腺皮质抑制剂(例如,泰素(taxol)和米托坦(mitotane))。在一些实施方案中,顺铂是特别合适的化学治疗剂。

[0285] 顺铂已经被广泛用于治疗癌症,例如转移性睾丸或卵巢癌、晚期膀胱癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌或其他肿瘤。顺铂不经口吸收并因此必须通过其他途径例如静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。顺铂可单独使用或与其他药剂组合使用,在某些实施方案中,预期在临床应用中使用的有效剂量包括:约15mg/m²至约20mg/m²持续每三周5天,总共三个疗程。在一些实施方案中,与包含与编码治疗性多肽的多核苷酸有效连接的Egr-1启动子的构建体联合递送至细胞和/或对象的顺铂的量少于单独使用顺铂时将递送的量。

[0286] 其他合适的化学治疗剂包括抗微管剂,例如紫杉醇(“泰素”)和盐酸多柔比星(“多柔比星”)。确定通过腺病毒载体递送的Egr-1启动子/TNF α 构建体与多柔比星的组合在克服对化学治疗和/或TNF- α 的抗性方面是有效的,这表明构建体与多柔比星的组合治疗克服了对多柔比星和TNF- α 二者的抗性。

[0287] 多柔比星吸收差,并且优选静脉内施用。在某些实施方案中,对于成人,合适的静脉内剂量包括:约60mg/m²至约75mg/m²,以约21天的间隔;或者约25mg/m²至约30mg/m²,以约3周至约4周的间隔,以连续2或3天中的每一者重复;或者约20mg/m²,每周一次。在年长患者中,当存在先前化学治疗或肿瘤性骨髓浸润(neoplastic marrow invasion)导致的先前骨髓抑制或当药物与其他骨髓生成抑制药物组合时,应使用最低剂量。

[0288] 氮芥类是可用于本公开内容方法中的另一合适的化学治疗剂。氮芥类可包括但不限于二氯甲基二乙胺(HN₂)、环磷酰胺和/或异环磷酰胺、美法仑(L-溶肉瘤素)和苯丁酸氮芥。环磷酰胺((**CYTOXAN®**))可从Mead Johnson获得,而**NEOSTAR®**可从Adria获得)是另一合适的化学治疗剂。对于成人,合适的经口剂量包括:例如约1mg/kg/天至约5mg/kg/天,静脉内剂量包括:例如,最初在约2天至约5天的时间内约40mg/kg至约50mg/kg的分剂量,或者约每7天至约10天约10mg/kg至约15mg/kg,或者每周两次约3mg/kg至约5mg/kg,或者约1.5mg/kg/天至约3mg/kg/天。由于不利的胃肠道作用,因此优选静脉内途径。药物有时也通过渗透或进入体腔内肌内施用。

[0289] 另外的合适的化学治疗剂包括嘧啶类似物,例如阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside))、5-氟尿嘧啶(氟尿嘧啶;5-FU)和氟尿苷(氟脱氧尿苷(fluorode-oxyuridine);FudR)。5-FU可约7.5至约1000mg/m²之间的任何剂量施用于对象。此外,5-FU给药方案可以是多种时间段,例如长至六周,或由本公开内容所属领域的普通技术人员确定。

[0290] 另一种合适的化学治疗剂吉西他滨二磷酸(**GEMZAR®**,Eli Lilly&Co.,“吉西他滨”)被推荐用于治疗晚期和转移性胰腺癌,并且因此也将可用于本公开内容以用于这些癌症。

[0291] 递送至患者的化学治疗剂的量可以是可变的。在一个合适的实施方案中,当化学治疗与构建体一起施用时,化学治疗剂可以有效地在宿主中引起癌症的停止或消退的量来施用。在另一些实施方案中,化学治疗剂可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量少2至

10,000倍之间的任何量来施用。例如,化学治疗剂可以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量少约20倍、少约500倍或甚至少约5000倍的量来施用。本公开内容的化学治疗剂可在体内与构建体组合测试用于期望的治疗活性,以及用于确定有效剂量。例如,这样的化合物在人中进行测试之前可在合适的动物模型系统中测试,包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等。如实施例所述,还可使用体外测试来确定合适的组合和剂量。

[0292] F. 放射治疗

[0293] 在一些实施方案中,另外的治疗或先前的治疗包括辐射,例如电离辐射。如本文所用,“电离辐射”意指包括通过核相互作用具有足够能量或可产生足够能量以产生电离(电子的获得或损失)的粒子或光子的辐射。一个示例性和优选的电离辐射是x辐射。用于将x辐射递送至靶组织或细胞的手段是本领域公知的。

[0294] 在一些实施方案中,电离辐射的量大于20Gy并且以一剂施用。在一些实施方案中,电离辐射的量为18Gy并且以三剂施用。在一些实施方案中,电离辐射的量至少、至多或恰好是2、4、6、8、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、18、19、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或40 Gy(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,电离辐射以至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10剂(或其中可推导出的任何范围)施用。当施用多于一剂时,剂量可相隔约1、4、8、12或24小时,或者1、2、3、4、5、6、7或8天,或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14或16周,或其中可推导出的任何范围。

[0295] 在一些实施方案中,IR的量可表示为IR的总剂量,其然后以分次剂量施用。例如,在一些实施方案中,总剂量是50Gy,以每次5Gy的10次分次剂量施用。在一些实施方案中,总剂量为50至90Gy,以每次2至3Gy的20至60次分次剂量施用。在一些实施方案中,IR的总剂量为至少、至多或约

[0296] 20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,125,130,135,140,或150(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,总剂量以至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25、30、35、40、45或50Gy(或其中可推导出的任何范围)的分次剂量施用。在一些实施方案中,施用至少、至多或恰好

[0297] 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100(或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。在一些实施方案中,每天施用至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12(或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。在一些实施方案中,每周施用至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30(或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。

[0298] G. 手术

[0299] 大约60%患有癌症的人将经历一些类型的手术,其包括预防性、诊断性或阶段性、

治疗性和姑息性手术。治疗性手术包括切除术,其中将所有或部分的癌组织物理地去除、切除和/或破坏,并且可与其他治疗,例如本发明实施方案的治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或替代治疗联合使用。肿瘤切除是指物理去除至少部分的肿瘤。除肿瘤切除术之外,通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制的手术(莫氏手术(Mohs' surgery))。

[0300] 在切除部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤之后,可在体内形成腔。治疗可通过灌注、直接注射或在该区域局部施加另外的抗癌治疗来完成。这样的治疗可例如每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周,或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复进行。这些治疗也可具有多种剂量。

[0301] H. 其他药剂

[0302] 考虑可将其他药剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的治疗效力。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂、提高过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂,或其他生物药剂。通过提高GAP连接数而提高胞间信号传导将提高对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在另一些实施方案中,细胞抑制剂或分化剂可与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的抗过度增殖效力。考虑了细胞黏附抑制剂以提高本发明实施方案的效力。细胞黏附抑制剂的一些实例是黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)抑制剂和洛伐他汀。还考虑了可将提高过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他药剂(例如抗体c225)与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗效力。

[0303] 预期癌症治疗可排除本文中所述的任何癌症治疗。此外,本公开内容的一些实施方案包括先前针对本文中所述的治疗进行过治疗、当前正在针对本文中所述的治疗进行治疗、或尚未针对本文中所述的治疗进行治疗的患者。在一些实施方案中,患者是已经确定对本文中所述的治疗具有抗性的患者。在一些实施方案中,患者是已经确定对本文中所述的治疗敏感的患者。

[0304] VII. 药物组合物

[0305] 本公开内容包括用于在有此需要的对象中治疗疾病和调节免疫应答的方法。本公开内容包括可为药物组合物形式的细胞,所述药物组合物可用于诱导或修饰免疫应答。

[0306] 根据本公开内容的组合物的施用将通常经由任何常见途径进行。这包括但不限于肠胃外、原位、皮内、皮下、经口、经皮、肌肉、腹膜内、腹膜内、眼内、通过植入、通过吸入、脑室内、鼻内或静脉内注射。在一些实施方案中,本公开内容的组合物(例如,包含表达治疗性受体的细胞的组合物)。

[0307] 通常,本公开内容的组合物和治疗以与剂量制剂相容的方式并且以将是治疗有效和免疫修饰的这样的量施用。待施用的数量取决于待治疗的对象。需要施用的活性成分的确切量取决于从业者的判断。

[0308] 施加的方式可广泛地变化。用于施用包含细胞组分的药物组合物的任何常规方法都是适用的。药物组合物的剂量将取决于施用途径,并且将根据对象的身材大小和健康而变化。

[0309] 在许多情况下,将期望具有至多约或至少约3、4、5、6、7、8、9、10或更多次的多次施用。施用可为2天至12周间隔,更通常为一至两周间隔。施用过程之后可进行对于同种异体

反应性免疫应答和T细胞活性的测定。

[0310] 短语“可药用”或“药理学上可接受的”是指当施用于动物或人时不产生不良反应、变应性反应或其他不良反应的分子实体和组合物。如本文所用，“可药用载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。这样的介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容，否则考虑其在免疫原性和治疗性组合物中的使用。本公开内容的药物组合物是可药用组合物。

[0311] 本公开内容的组合物可配制成为用于肠胃外施用，例如，配制成为用于经由静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。通常，这样的组合物可制备成作为液体溶液剂或混悬剂的可注射剂，并且制剂还可被乳化。

[0312] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体；包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂。其在制造和储存条件下也应该是稳定的，并且必须被保存以免受微生物（例如细菌和真菌）的污染作用。

[0313] 通过将活性成分（即，本公开内容的细胞）以需要的量与以上列举的多种其他成分（根据需要）一起并入适当溶剂中随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常来说，通过将多种经灭菌的活性成分并入无菌载剂中来制备分散体，所述无菌载剂包含基础分散介质和所需要的来自以上列举的那些的其他成分。

[0314] 基于预期目标确定组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适合用于对象中的物理离散单位，每个单位包含经计算产生与其施用（即适当的途径和方案）相关的本文中讨论的所期望响应的预定量的组合物。根据治疗次数和单位剂量二者，待施用的量取决于所期望的结果和/或保护。组合物的确切量还取决于从业者的判断，并且对于每个个体是特有的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标（症状的减轻与治愈），以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。在配制之后，溶液以与剂量制剂相容的方式并且以治疗或预防有效的量来施用。制剂易于以多种剂型施用，例如上述可注射溶液的类型。

[0315] 本公开内容的组合物和相关方法，特别是本公开内容的组合物的施用，也可与另外的治疗例如本文中所述的另外的治疗的施用组合使用，或者与本领域已知的其他传统治疗组合使用。

[0316] 本文中公开的治疗性组合物和治疗可在另一治疗或药剂之前、与之同时和/或之后进行，间隔为数分钟至数周。在将药剂分开施加于细胞、组织或生物体的实施方案中，通常将确保在每次递送的时间之间重要的时间段没有到期，使得治疗剂仍将能够对细胞、组织或生物体发挥有利的组合作用。例如，在这样的情况下，预期可使细胞、组织或生物体与两种、三种、四种或更多种药剂或治疗基本同时（即，在小于约一分钟内）接触。在另一些方面中，一种或更多种治疗剂或治疗可在施用另一治疗剂或治疗之前和/或之后在以下时间内施用或提供：1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48

小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周或更长时间,以及可从其中推导出的任何范围。

[0317] 治疗可包括多种“单位剂量”。单位剂量被定义为包含预定量的治疗性组合物。待施用的量以及特定途径和制剂在临床领域技术人员的技能决定范围内。单位剂量不需要作为单次注射施用,但可包括在设定时间段内连续输注。在一些实施方案中,单位剂量包括单一可施用剂量。

[0318] 根据治疗次数和单位剂量二者,待施用的量取决于所期望的治疗效果。有效剂量被理解是指达到特定效果所需的量。在某些实施方案中的实践中,预期在10mg/kg至200mg/kg范围内的剂量可影响这些药剂的保护能力。因此,预期剂量包括以下剂量:约0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、和200、300、400、500、1000 μ g/kg、mg/kg、 μ g/天、或mg/天、或其中可推导出的任何范围。此外,这样的剂量可在一天内、和/或在数天、数周或数月内多次施用。

[0319] 在一些实施方案中,无论通过一次施用或是更多次施用,施用于人的免疫检查点抑制剂(例如抗体和/或微生物调节剂)的治疗有效量或足够量将在约0.01至约50mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中,使用的治疗例如每天施用约0.01至约45mg/kg、约0.01至约40mg/kg、约0.01至约35mg/kg、约0.01至约30mg/kg、约0.01至约25mg/kg、约0.01至约20mg/kg、约0.01至约15mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约0.01至约5mg/kg、或约0.01至约1mg/kg。在一个实施方案中,本文中所述的治疗在21天周期的第1天以约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg或约1400mg的剂量施用于对象。剂量可作为单剂量或作为多剂量(例如,2或3次剂量)施用,例如输注。这种治疗的进展容易通过常规技术进行监测。

[0320] 在某些实施方案中,药物组合物的有效剂量是可提供约1 μ M至150 μ M的血液水平的剂量。在另一个实施方案中,有效剂量提供约4 μ M至100 μ M;或约1 μ M至100 μ M;或约1 μ M至50 μ M;或约1 μ M至40 μ M;或约1 μ M至30 μ M;或约1 μ M至20 μ M;或约1 μ M至10 μ M;或约10 μ M至150 μ M;或约10 μ M至100 μ M;或约10 μ M至50 μ M;或约25 μ M至150 μ M;或约25 μ M至100 μ M;或约25 μ M至50 μ M;或约50 μ M至150 μ M;或约50 μ M至100 μ M(或其中可推导出的任何范围)的血液水平。在另一些实施方案中,剂量可提供药剂的以下血液水平(其是由向对象施用的治疗剂产生的):约、至少约或至多约

[0321] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100 μ M或其中可推导出的任何范围。在某些实施方案中,施用于对象的治疗剂在体内被代谢为经代谢的治疗剂,在这种情况下,血液水平可指该治疗剂的量。或者,到了治疗剂不被对象代谢的程度,本文中讨论的血液水平可指未经代谢的治疗剂。

[0322] 治疗性组合物的确切量还取决于从业者的判断并且对每个个体是特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(症状的减轻与治愈),以

及对象可能正在经历的特定治疗性物质或其他治疗的效力、稳定性和毒性。

[0323] 本领域技术人员将理解并意识到,可将 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 mg/kg 体重的剂量单位转换并以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 mM (血液水平)的相当浓度单位(例如 $4\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$)来表示。还应理解,摄取依赖于物种和器官/组织。待进行的与摄取和浓度测量有关的适用的转换因素和生理假设是公知的,并且将允许本领域技术人员将一种浓度测量转换为另一种浓度测量,并且对本文中所述的剂量、效力和结果做出合理的比较和结论。

[0324] VIII. 治疗方法

[0325] 本公开内容的组合物可用于体内、体外或离体施用。组合物的施用途径可以是例如皮内、皮下、静脉内、局部、表面和腹膜内施用。

[0326] 在一些实施方案中,所公开的方法是针对用于治疗癌症的方法。癌症可以是实体瘤、转移性癌症或非转移性癌症。在某些实施方案中,癌症可起源于膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、泌尿系统、宫颈、食管、十二指肠、小肠、大肠、结肠、直肠、肛门、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。

[0327] 癌症具体地可以是以下组织学类型中的一种或更多种,但不限于这些:未分化癌、膀胱癌、血癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、泌尿系统癌、食管癌、胸腺瘤、十二指肠癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、牙龈癌、头癌、肾癌、软组织癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、颈癌、卵巢癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、舌癌、子宫癌、胸腺癌、皮肤鳞状细胞癌、非结直肠胃肠道癌、结直肠癌、黑素瘤、梅克尔细胞癌、肾细胞癌、宫颈癌、肝细胞癌、尿路上皮癌、非小细胞肺癌、头颈癌、子宫内膜癌、食管胃癌、小细胞肺间皮瘤、卵巢癌、食管胃癌、胶质母细胞瘤、肾上腺癌、葡萄膜癌、胰腺癌、生殖细胞癌、巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胆管癌;肝细胞癌;组合肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸性粒细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡状腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;无包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;黏液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;黏液性囊腺癌;黏液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特病;腺泡细胞癌;腺鳞癌;胸腺瘤;卵泡膜细胞瘤;男性母细胞瘤;Sertoli细胞癌;恶性黑素瘤;无黑素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;肉瘤;间叶瘤(例如,纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤;黏液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;苗勒管混合瘤;肾胚胎细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;无性细胞瘤;胚胎性癌;绒毛膜癌;中肾瘤;血管肉瘤;卡波西肉瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;间叶性软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因肉瘤;成釉细胞牙肉瘤;成釉细胞纤维肉瘤;脊索瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经母细胞瘤;原始神经外胚叶肿瘤;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;神经纤维肉瘤;副肉芽肿);或造血系统癌症(例如,多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓性白血病;嗜碱性粒细胞白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞白血病;髓样肉瘤;毛细胞白血病)。

[0328] VIII. 序列

[0329] 可用于本公开内容的方法和组合物中的示例性嵌合多肽和CAR分子的氨基酸序列在下表1中提供。

[0330]

描述	序列	SEQ ID NO:
Leu16 VL	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK	1
Leu16 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVGAGTTVTVSS	2
利妥昔单抗VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK	3
利妥昔单抗VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS	4
RFR-LCDR VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWFQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK	5
RFR-LCDR VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYWFFDVGAGTTVTVSS	6
LFR-RCDR VL	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK	7
LFR-RCDR VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS	8
Leu16 HCDR1	SYNMH	9
Leu16 HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10

[0331]

Leu16 HCDR3	SNYYGSSYWFFDV	11
Leu16 LCDR1	RASSSVNYMD	12
Leu16 LCDR2	ATSNLAS	13
Leu16 LCDR3	QQWSFNPPT	14
Leu16 HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	15
Leu16 HFR2	WVKQTPGQGLEWIG	16
Leu16 HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR	17
Leu16 HFR4	WGAGTTVTVSS	18
Leu16 LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC	19
Leu16 LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY	20
Leu16 LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	21
Leu16 LFR4	FGGGTKLEIK	22
利妥昔单抗 HCDR1	SYNMH	9
利妥昔单抗 HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
利妥昔单抗 HCDR3	STYYGGDWYFNV	23
利妥昔单抗 LCDR1	RASSSVSYIH	24
利妥昔单抗 LCDR2	ATSNLAS	13
利妥昔单抗 LCDR3	QQWTSNPPT	25
利妥昔单抗 HFR1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	26
利妥昔单抗 HFR2	WVKQTPGRGLEWIG	27

[0332]

利妥昔单抗 HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	28
利妥昔单抗 HFR4	WGAGTTVTVSS	18
利妥昔单抗 LFR1	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	29
利妥昔单抗 LFR2	WFQQKPGSSPKPWIY	30
利妥昔单抗 LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	31
利妥昔单抗 LFR4	FGGGTKLEIK	22
RFR-LCDR HCDR1	SYNMH	9
RFR-LCDR HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
RFR-LCDR HCDR3	SNYYGSSYWFFDV	11
RFR-LCDR LCDR1	RASSSVNYMD	12
RFR-LCDR LCDR2	ATSNLAS	13
RFR-LCDR LCDR3	QQWSFNPPT	14
RFR-LCDR HFR1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	26
RFR-LCDR HFR2	WVKQTPGRGLEWIG	27
RFR-LCDR HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	28
RFR-LCDR HFR4	WGAGTTVTVSS	18

[0333]

RFR-LCDR LFR1	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	29
RFR-LCDR LFR2	WFQQKPGSSPKPWIY	30
RFR-LCDR LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	31
RFR-LCDR LFR4	FGGGTKLEIK	22
LFR-RCDR HCDR1	SYNMH	9
LFR-RCDR HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	10
LFR-RCDR HCDR3	STYYGGDWYFNV	23
LFR-RCDR LCDR1	RASSSVSYIH	24
LFR-RCDR LCDR2	ATSNLAS	13
LFR-RCDR LCDR3	QQWTSNPPT	25
LFR-RCDR HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	15
LFR-RCDR HFR2	WVKQTPGQGLEWIG	16
LFR-RCDR HFR3	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR	17
LFR-RCDR HFR4	WGAGTTVTVSS	18
LFR-RCDR LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC	19
LFR-RCDR LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY	20

[0334]

LFR-RCDR LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	21
LFR-RCDR LFR4	FGGGTKLEIK	22
RFR-LCDR (pYC1917) - 鼠 κ 链 信号 序列- RFR-LCDR VL - scFv 接头 - RFR-LCDR VH - IgG4 铰链 /CH2/CH 3 (L235E, N297Q) - CD28 跨膜 - CD28 胞质 (gg) - GGG - CD3- ζ - 胞质 - T2A - EGFRt	METDTLLLWVLLLWVPGSTGQIVLSQSPAILSASPGEKVTM TCRASSSVNYMDWFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF SSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGK LEIKGSTSGGGSGGGSGGGSSQVQLQQPGAELVKPGASV KMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSNNYGGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSESKYGPCCPPCAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLGKMFVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPA FLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLINATNIHKFNCTSSISGDLHIL PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEIS DGDVHISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVD KCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVC HLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTNGPKIPSIATGMVGALLLL VVALGIGLFM*	33
LFR-RCDR (pYC1918); 鼠 κ 链 信号 序列- LFR-RCDR VL - scFv 接头 - LFR-RCDR VH - IgG4 铰链 /CH2/CH 3 (L235E, N297Q) - CD28 跨膜 - CD28	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTM TCRASSSVSYIHWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKL EIKGSTSGGGSGGGSGGGSSSEVQLQQSGAELVKPGASVK MSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDT SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSESKYGPCCPPCAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGKMFVVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS GGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD	34

[0335]

胞质 (gg) – GGG – CD3- ζ 胞质 - T2A – EGFRt	KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLE GGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCT SISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD LHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDG DVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKC NLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ CAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHL CHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVV ALGIGLFM*	
RFR-LCDR (RFR-LCDR VL – scFv 接头 – RFR- LCDR VH – IgG4 铰链 /CH2/CH 3 (L235E, N297Q) – CD28 跨膜 – CD28 胞质 (gg) – GGG – CD3- ζ - 胞质 - T2A – EGFRt)	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWFFQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYYCQQWFSNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGS SQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTT VTVSSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKMFVWL VVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPG PTRKHYPYAPPRDFAAYRSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGP RMLLLVTSLLLCELPHPAFL LIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINA TNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILK TVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSL AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPR DCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPEC LPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGE NNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM*	42
LFR-RCDR (LFR-RCDR VL – scFv 接头 – LFR- RCDR VH – IgG4 铰链 /CH2/CH 3 (L235E, N297Q) – CD28	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWYQKKPGSS PKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSS EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSADYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVT VVSSESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQ STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	43

[0336]

跨膜 - CD28 胞质 (gg) - GGG - CD3- ζ - 胞质 - T2A - EGFRt)	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFVVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSGGHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSGGGRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLA VVS LNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPPTNGPK IPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM*	
鼠 κ 链信号序列	METDTLLLWVLLWVPGSTG	35
scFv 接头	GSTSGGGSGGGSGGGGSS	32
IgG4 铰链 /CH2/CH3	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	36
CD28 跨膜	MFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	37
CD28 胞质 (gg)	RSKRSGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RS	38
CD3- ζ 胞质	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	39
T2A	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	40
EGFRt	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLA VVS LNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECL	41

[0337]

	PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPK IPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	
KM8138 (huKM666L) VH	QVQLQESGPGLVKPSQTL SITCTVSGFSLASYNHWVRQPP GKGLEWLGVIWAGGSTNYSALMSRLTISKDNSKNQVFLK MSSLTAADTAVYYCAK RSDDYSWFAYWGQGT LTVSS	108
KM8138 (huKM666L) VL	ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQK SGKAPK VWIYSTSNLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYC QQYSGYPITFGQGTKVEIK	109
KM8138 (huKM666L) HCDR1	SYNIH	110
KM8138 (huKM666L) HCDR2	VIWAGGSTNYSALMS	111
KM8138 (huKM666L) HCDR3	RSDDYSWFAY	112
KM8138 (huKM666L) LCDR1	RASSSVSSSYLH	113
KM8138 (huKM666L) LCDR2	STSNLAS	114
KM8138 (huKM666L) LCDR3	QQYSGYPIT	115
KM8138 (huKM666L) HFR1	QVQLQESGPGLVKPSQTL SITCTVSGFSLA	116
KM8138 (huKM666L) HFR2	WVRQPPGKGLEWLG	117
KM8138 (huKM666L) HFR3	RLTISKDNSKNQVFLKMSSLTAADTAVYYCAK	118

[0338]

KM8138 (huKM666L) HFR4	WGQGLTVTVSS	119
KM8138 (huKM666L) LFR1	ENQMTQSPSSLSASVGDRVMTTC	120
KM8138 (huKM666L) LFR2	WYQQKSGKAPKVWIY	121
KM8138 (huKM666L) LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	122
KM8138 (huKM666L) LFR4	FGQGTKVEIK	123
14g2a VH	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQN IGKSLEWIG AIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYM HLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSS	124
14g2a VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHW YLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRA	125
14g2a HCDR1	GYNMN	126
14g2a HCDR2	AIDPYYGGTSYNQKFKG	127
14g2a HCDR3	GMEY	128
14g2a LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH	129
14g2a LCDR2	KVSNRFS	130
14g2a LCDR3	SQSTHVPPLT	131
14g2a HFR1	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFT	132
14g2a HFR2	WVRQNIGKSLEWIG	133
14g2a HFR3	RATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVS	134
14g2a HFR4	WGQGTSVTVSS	135

[0339]

14g2a LFR1	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	136
14g2a LFR2	WYLQKPGQSPKLLIH	137
14g2a LFR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	138
14g2a LFR4	FGAGTKLELKRA	139
14g2a FR + KM8138 CDR VH	EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTSYNIHWVRQNI GKSLEWIGVIWAGGSTNYNSALMSRATLTVDKSSSTAYMH LKSLTSEDSAVYYCVSRSDDYSWFAYWGQGTSTVTVSS	140
14g2a FR + KM8138 CDR VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASSSVSSSYLHWYLPKP GQSPKLLIHSTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYFCQQYSGYPITFGAGTKLELKRA	141
KM8138 FR + 14g2a CDR VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLTITCTVSGFSLAGYNMNVWRQP PGKGLEWLGAIDPYYGGTSYNQKFKGRLTISKDNSKNQVF LKMSSLTAADTAVYYCAKGM EYWGQGT LVT VSS	143
KM8138 FR + 14g2a CDR VL	ENQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCRSSQSLVHRNGNTYLHW YQQKSGKAPKVWIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCSQSTHVPPLTFGQGTKVEIK	144

X. 实施例

[0340] 包括以下实施例以说明本公开内容的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,在以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本公开内容的实践中发挥良好作用的技术,并因此可被认为构成了用于本公开内容实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应理解,可在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,对所公开的具体实施方案作出许多变化而仍然获得相同或相似的结果。实施例不应以任何方式解释为限制。所有引用的参考文献(包括参考文献、已授权的专利、已公布的专利申请和本申请通篇引用的GenBank登录号)的内容通过引用明确并入本文。当通过引用并入本文的文件中的术语定义与本文使用的术语定义冲突时,以本文使用的定义为准。

[0341] 实施例1:扭转修饰的CAR

[0342] 一些CAR在不存在抗原刺激的情况下可进行信号传导的这一观察结果表明了这些受体可采用有益于信号转导的天然蛋白质构象的可能性。这种假设的一个推论是,改变CAR蛋白的构象可影响强直信号传导倾向,并潜在地还影响抗原依赖性CAR信号传导的强度。在此,本发明人报道了这样的发现,即CAR-T细胞的抗肿瘤活性可通过在CAR的跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间插入丙氨酸进行调节(图1)。每个丙氨酸的插入预期引起约109°的扭转。据推测,通过在CAR的跨膜结构域和胞质结构域之间插入丙氨酸,可显著提高包含CD28共刺激结构域的第二代CD20 CAR的体内抗肿瘤效力(图2;结果在图8中所示的后续研究中得到证实)。除CD20之外,还考虑将这种设计并入其他CAR中。在一些实施方案中,丙氨酸插入并入至可用于治疗神经母细胞瘤的GD2 CAR中。

[0343] 实施例2:具有提高的效力的杂合CAR。

[0344] 本发明人报道了与先前提出的假设(5)相反的发现:可通过将强直信号传导CAR的

FR序列与非强直信号传导CAR的CDR序列组合来构建功能优异的CAR。Leu16和利妥昔单抗二者均是靶向CD20的单克隆抗体。scFv由每种抗体的Vh和Vh构成(图3)。并入Leu16来源的scFv的CAR不进行强直信号传导,而并入利妥昔单抗来源的scFv的CAR的确进行强直信号传导(图4)。本发明人构建了“杂合”CD20 CAR,其scFv包含利妥昔单抗来源的scFv的FR序列,所述FR序列与Leu16来源的scFv的CDR序列偶联(图5)。这种被称为“RFR-LCDR”的杂合CAR也进行强直信号传导(图6)。然而,与表达亲本(即基于Leu16或基于利妥昔单抗的)CAR的T细胞相比,表达RFR-LCDR杂合CAR的T细胞在体外(图7)和体内(图8)两种情况下均显示出功能优异性。重要的是,RFR-LCDR杂合CAR在肿瘤异种移植模型中的表现优于CD19 CAR,实现了完全和持久的肿瘤清除和预防肿瘤复发,即使在初始T细胞处理之后55天接受第二剂肿瘤攻击时也是如此(图8)。

[0345] 实施例3:合理调节CAR强直信号传导产生了用于癌症的优异T细胞治疗

[0346] 嵌合抗原受体(CAR)是模块化蛋白质,其能够重新引导免疫细胞朝向广泛多种的疾病相关抗原。然而,迄今为止,涉及CAR的免疫治疗在B细胞恶性病之外实现的临床效力有限。在此,本发明人系统地探索了CAR蛋白序列和结构对CAR-T细胞功能的影响。本发明人报道了强直信号传导显著影响CAR-T细胞的代谢和抗肿瘤效力。具体而言,本发明人发现低但非零水平的强直信号传导可在抗原刺激后促进稳健的效应功能,同时避免CAR-T细胞过早的功能耗竭。此外,本发明人证明强直信号传导的强度可通过合理改变CAR的配体结合结构域和整体蛋白质构象来调节,从而在肿瘤异种移植模型中产生优于CD19 CAR的CD20 CAR变体。这些发现表明强直信号传导和基础T细胞活化为指导用于癌症治疗的下一代CAR的合理设计的信息参数。

[0347] 嵌合抗原受体(CAR)-T细胞的过继性转移已显示出对晚期B细胞恶性病的显著效力,并且针对广泛多种癌症类型的CAR-T细胞候选物已进入临床测试。然而,迄今为止,极少CAR-T细胞候选物显示出与CD19CAR-T细胞相当的抗肿瘤效力(Grigor et al.,2019;Guedan et al.,2018;Majzner and Mackall,2019;Yamamoto et al.,2019)。CAR构建的标准方法依赖于将胞外间隔区、跨膜结构域和胞质信号传导结构域的有限组与对目标抗原具有特异性的配体结合部分重新组合。尽管这种凭经验进行的过程可以可靠地产生具有肿瘤反应性的CAR分子,但所得的CAR-T细胞通常无法实现稳健的临床效力。例如,尽管CD20 CAR-T细胞在临床前模型中显示出有前景的活性,但临床试验结果表明,与CD19 CAR-T细胞处理相比,针对同一疾病类型的效力显著较低(Till et al.,2012;Zhang et al.,2016)。类似地,已经表明,并入了CD28共刺激结构域的第二代GD2 CAR相比于包含相同信号传导结构域的CD19 CAR表现出更差的体内抗肿瘤功能(Long et al.,2015)。无法针对目标抗原始终产生稳健的功能性CAR凸显了需要进一步理解CAR设计与CAR-T细胞功能之间的分子关系和机制关系。

[0348] 迄今为止,CAR工程化的工作已揭示了数个影响CAR-T细胞功能的设计参数(Chang and Chen,2017;Hong et al.,2020)。这些参数包括:在抗原刺激后促进T细胞活化的共刺激结构域(Omer et al.,2018;Wijewarnasuriya et al.,2020;Zhao et al.,2015)、为最佳T细胞/靶细胞缀合提供结构支持的胞外结构域(Hudecek et al.,2013;Srivastava and Riddell,2015)、CAR与靶向的抗原之间的结合亲和力(Drent et al.,2019;Liu et al.,2015)、以及CAR非依赖性参数例如靶细胞上的抗原表达水平(Majzner et al.,2020;

Watanabe et al., 2015)。然而,这些参数并不能完全解释CD19CAR与其他构建体例如CD20 CAR之间的差异,后者具有类似的高结合亲和力、包含相同的共刺激结构域并且结合在由CD19 CAR靶向的相同类型的肿瘤细胞上也高度表达的抗原。

[0349] 最近,数个研究强调了CAR强直信号传导——即在不存在抗原刺激的情况下的CAR信号传导——这一现象及其在触发过早的T细胞功能障碍中的潜在作用 (Frigault et al., 2015; Gomes-Silva et al., 2017; Long et al., 2015; Watanabe et al., 2016)。已经提出CD19 CAR-T细胞的稳健功能可归因于CD19 CAR缺乏强直信号传导 (Frigault et al., 2015; Long et al., 2015)。然而,对进行强直信号传导的T细胞的表型描述各不相同,并且关于哪些特定CAR组分可引起或阻止强直信号传导的假设有时是矛盾的 (Frigault et al., 2015; Gomes-Silva et al., 2017; Long et al., 2015)。此外,鉴于大多数关于强直信号传导的研究将CD19 CAR针对靶向其他抗原的CAR进行比较,尚不清楚观察到的功能差异是否严格归因于强直信号传导,以及消除强直信号传导是否将预期地导致CAR-T细胞的抗肿瘤效力的提高。

[0350] 在此,本发明人报道了CAR序列和体系结构对强直信号传导具有显著和可调节的影响,并且CAR-T细胞代谢和抗肿瘤功能可通过调节强直信号传导强度和相关的基础T细胞活化来改变。本发明人表明,低但非零水平的强直信号传导可通过增强快速抗肿瘤响应来提高CAR-T细胞功能,同时避免过早的T细胞耗竭,并且基础T细胞活化的水平可通过扭转接头的插入和不同配体结合结构域的序列杂合来调节。通过应用这些蛋白质工程策略,本发明人产生了在B细胞淋巴瘤小鼠模型中优于CD19 CAR的新的CD20 CAR,并且发现记忆表型富集和CAR驱动的代谢紊乱的最小化是与提高的CAR-T细胞功能相关的特性。这些结果表明,合理调节强直信号传导和基础T细胞活化是用于设计用于癌症的稳健CAR-T细胞治疗的可用且可广泛推广的方法。

[0351] A. 结果

[0352] 1. scFv序列改变强直信号传导和CAR-T细胞代谢

[0353] 迄今为止,关于强直信号传导的研究主要依赖于比较靶向不同抗原的CAR,因此由于多个参数(包括CAR序列、抗原同一性和表达水平以及CAR抗原结合相互作用的生物物理特性)的同时变化,对结果的解释变得复杂 (Frigault et al., 2015; Gomes-Silva et al., 2017; Long et al., 2015)。在此,本发明人首先检验了CAR的配体结合结构域的氨基酸序列可显著影响受体活性、非依赖性的靶抗原同一性或结合亲和力的假设。本发明人选择专注于CD20 CAR作为测试平台,因为CD20是经过临床验证的抗原,并且能够针对B细胞淋巴瘤治疗中的CD19 CAR进行直接的基准测试。用来源于具有类似KD值的四种不同单克隆抗体的单链可变片段(scFv) (Mossner et al., 2010; Reff et al., 1994; Uchiyama et al., 2010) 和通过abYsis预测的类似互补决定区(CDR) 结构 (Martin and Thornton, 1996; Swindells et al., 2017) 构建了CD20 CAR组。三种scFv (Leu16、利妥昔单抗和GA101) 结合CD20的主要胞外环上的重叠表位,而奥法木单抗结合CD20的小环和主要环二者 (Klein et al., 2013; Niederfellner et al., 2011; Rufener et al., 2016; Teeling et al., 2006) (图10A;图S16A)。所有四种CAR都具有相同的胞外间隔区、跨膜结构域和胞质信号传导结构域。该图能够将功能差异专门归因于scFv序列,同时消除混杂因素,例如结合亲和力和结合表位位置中的差异。为了更好地探索scFv序列和CAR强直信号传导之间的潜在关系,本发明人选择并

入CD28作为共刺激结构域,因为之前已经报道了含CD28的CAR比含4-1BB的CAR更易于进行强直信号传导(Frigault et al.,2015;Long et al.,2015)。

[0354] 所有四种CD20 CAR变体均在原代人T细胞表面上有效表达(图16B),并且表达每种CAR的T细胞在具有细胞因子支持的离体扩增期间以相当的速率生长(图16C)。响应于重复的抗原刺激,所有CAR-T细胞变体都表现出裂解靶细胞和增殖的能力(图16D)。然而,尽管表达四种CD20 CAR变体的T细胞在体外功能测定期间表现类似,但在Raji异种移植模型中显示出不同的体内肿瘤杀伤动力学(图10B)。特别地,与所有其他的受试CD20 CAR-T细胞相比,基于利妥昔单抗的CAR-T细胞在早期时间点发挥显著更强的肿瘤控制(图10B)。然而,在T细胞注射之后大约两周开始,用利妥昔单抗CAR-T细胞处理的动物开始表现出加速的肿瘤生长——比任何其他测试组都快(图10C;图17A)——这表明在利妥昔单抗CAR-T细胞中的功能耗竭快速发作。

[0355] 所有测试组中的动物在处死时都携带可检出的CAR-T细胞群体,特别是在肝、脾以及从脑恢复的肿瘤转移灶中(图17B、C)。然而,几乎所有T细胞都是PD-1+,并且许多T细胞显示出升高的LAG-3表达(图17D、E)。再加上未能根除肿瘤,这些结果表明尽管所有四组CAR-T细胞在体内具有持续性,但它们在研究结束时都出现了功能障碍。

[0356] 本发明人接下来试图阐明四种CD20 CAR-T细胞变体之间的哪些生物学差异可解释其体内肿瘤响应的不同的时间动力学,以及潜在的生物学是否可阐明改善的CAR设计能够具有持续的肿瘤控制。特别地,本发明人希望理解利妥昔单抗CAR为何导致最初稳健但最终短暂的抗肿瘤响应,以及本发明人是否可通过合理的CAR蛋白质工程来延长抗肿瘤效力。

[0357] 在不存在抗原刺激的情况下,表达利妥昔单抗CAR的T细胞显示出明显的活化标志物表达(图10D)和细胞增殖(图10E),其程度与表达基于14g2a的GD2 CAR(已知其进行强直信号传导)(Long et al.,2015)的T细胞类似或比其更强。这些观察结果表明利妥昔单抗CAR-T细胞的明显的基础活化可直接归因于CAR构建体,并导致假设利妥昔单抗CAR-T细胞可快速启动抗肿瘤响应的部分原因是这种朝向T-细胞活化的预先倾向。已经表明,稳健的T细胞效应功能的启动需要来自有氧糖酵解的支持(Chang et al.,2013)。因此,为了检验利妥昔单抗CAR-T细胞针对快速效应功能得以增强的这一假设,本发明人着手通过测量营养素摄取率和副产物分泌率来表征其基础代谢状态。在不存在抗原刺激的情况下,与模拟转导的T细胞和表达CD19 CAR或基于Leu16的CD20 CAR的T细胞相比,利妥昔单抗CAR-T细胞表现出显著更快的葡萄糖、谷氨酰胺和氨基酸摄取(图10F,图18)。此外,与其他CAR-T细胞相比,利妥昔单抗CAR-T细胞显示出乳酸和丙氨酸分泌提高2至7倍,以及谷氨酸分泌提高>3倍,分别表明了糖酵解通量和谷氨酰胺分解显著提高。由于葡萄糖和谷氨酰胺负责大部分ATP的产生,因此更快的糖酵解和谷氨酰胺分解意味着更多的能量消耗,这与活化的T细胞的行为一致(Chang et al.,2013)。

[0358] 综上所述,这些观察结果表明,在不存在抗原刺激的情况下,利妥昔单抗CAR-T细胞被基础地活化并在代谢上具备启动T细胞效应功能的能力。这种静息时的高代谢可解释利妥昔单抗CAR-T细胞在体内在早期时间点的快速抗肿瘤活性,但在不存在抗原刺激的情况下的慢性、低水平的T细胞活化也可促成利妥昔单抗CAR-T细胞与其他CAR-T细胞变体相比加速的肿瘤控制的损失,如在动物研究中观察到的。为了评价这种可能性及其对CAR设计的影响,本发明人接下来研究了调节基础活化的水平是否可产生能够具有快速且持续的抗

肿瘤响应的CAR-T细胞。

[0359] 2. 信号传导结构域的扭转重新定向调节了CAR-T细胞活性

[0360] 在细胞表面的受体二聚化可触发CAR信号传导 (Chang et al., 2018), 而早期的一项研究表明, 强直信号传导可以是由某些scFv序列引起的抗原非依赖性CAR簇聚的结果 (Long et al., 2015)。本发明人验证了图10A中示出的所有四种CD20 CAR变体在不存在抗原刺激的情况下均匀分布在T细胞表面上 (图19), 因此排除了宏观规模的CAR簇聚作为基于利妥昔单抗的CAR的强直信号传导的原因。然而, CD3 ζ 下游的信号传导级联涉及衔接蛋白和激酶, 它们与受体链的相互作用直接受到受体链的物理邻近度和构象的影响 (Hartman和Groves, 2011)。因此, 本发明人假设强直信号传导CAR可采用能够进行基础受体信号传导的构象, 并且改变CAR分子的构象可在不存在和存在抗原刺激的两种情况下能够调节CAR信号传导强度, 从而影响下游CAR-T细胞行为。

[0361] 为了系统地研究CAR构象变化的影响, 本发明人在基于利妥昔单抗的CAR中的CD28的跨膜结构域和胞质结构域之间插入了1至4个丙氨酸, 每个丙氨酸预计引起蛋白质结构中的约109°扭转 (通过形成 α 螺旋来引起) (Constantinescu et al., 2001; Liu et al., 2008; Scheller et al., 2018) (图11A; 图20A)。这种“扭转”过程旨在改变CAR的胞外配体结合结构域与其胞质信号传导结构域之间的排列, 从而潜在地影响受体在高密度区域中 (例如, 在抗原连接后的微簇内) 的堆积 (packing) 行为, 以及下游信号传导所涉及的锚定和磷酸化残基的可及性。

[0362] 所有丙氨酸插入变体以及原始利妥昔单抗CAR均在T细胞表面上良好表达 (图20B), 表现出类似的响应于重复抗原攻击而裂解靶细胞和增殖的能力 (图20C), 并在不存在抗原刺激的情况下表现出类似的激活和衰竭性标志物表达水平 (图20D)。然而, 与原始的基于利妥昔单抗的CAR相比, 丙氨酸插入导致了明显降低的抗原非依赖性T细胞增殖和TNF- α 产生 (图11B、C), 这表明扭转接头的插入显著降低了基础CAR-T细胞活性。CAR结构改变的影响在体内是明显的, 其中与原始的利妥昔单抗CAR相比, 表达包含一个、两个或四个丙氨酸的基于利妥昔单抗的CAR的T细胞显示出显著提高的对Raji异种移植物的控制 (图11D)。特别地, 与原始利妥昔单抗CAR相比, 两个丙氨酸的CAR使中位存活期提高了2.1倍 (55天vs. 26天; 图11E)。

[0363] 原则上, 基于丙氨酸的扭转接头的插入可在任何CAR蛋白上进行, 而与并入CAR中的特定配体结合结构域或信号传导结构域无关。为了探索这种CAR调节方法的普遍性, 本发明人评价了丙氨酸插入在基于14g2a的GD2 CAR中的影响。所有五种GD2 CAR变体 (在跨膜结构域和胞质结构域之间插入零至四个丙氨酸) 在T细胞表面上表达良好, 并且在体外在重复抗原攻击后表现出类似的抗肿瘤响应 (图21A至C)。与CD20 CAR组的结果 (图11D) 一致, 表达包含一个、两个或四个丙氨酸的GD2 CAR的T细胞优于插入零或三个丙氨酸的GD2 CAR (图21D)。此外, 在处死时回收的肝和脾的分析揭示了表达两个丙氨酸的CAR构建体的T细胞的显著更高水平, 强调了两个丙氨酸的插入在包含CD28跨膜结构域和胞质结构域的CAR中的效用 (图21E)。

[0364] 总之, 这些结果表明, 将丙氨酸插入到CAR分子中是调节CAR-T细胞活化和增强体内抗肿瘤效力的通用方法。然而, 尽管在丙氨酸插入的情况下观察到改善, 但CD20 CAR-T细胞仍然无法根除小鼠模型中的Raji异种移植物 (图11D、E)。因此, 本发明人着手探索可进一

步增强CAR-T细胞功能的另外的设计参数。

[0365] 3.scFv序列杂合产生优异的CAR变体

[0366] 鉴于所有CAR都具有相同的组分(除scFv之外),因此在四种CD20CAR的原始组中利妥昔单抗CAR的行为不同这一观察结果是引人注目的(图10A)。此外,与Leu16 scFv相比,利妥昔单抗scFv具有91%的序列同一性(图16A),但Leu16和利妥昔单抗CAR-T细胞在基础T细胞活化和体内肿瘤杀伤动力学二者方面具有显著不同的行为(图10B至E)。这些结果表明,scFv序列中的有限变化可对CAR信号传导活性产生显著影响。

[0367] 每个scFv包含轻链和重链,并且每条链可进一步细分为位于三个互补决定区(CDR)侧翼的四个框架区(FR)(图11A)。先前已经提出,某些scFv(如14g2a)的FR可以是强直信号传导和CAR-T细胞耗竭的原因,并且已表明将14g2a scFv的FR并入CD19 CAR中产生触发T细胞耗竭的杂合受体(Long et al., 2015)。因此,可能通过scFv改变损害了CAR,但仍不清楚是否可通过scFv序列杂合来改善CAR。目前为止,本发明人的结果表明,通过丙氨酸插入来降低CAR强直信号传导的强度可改善CAR-T细胞功能。本发明人接下来探索了通过序列杂合进行的scFv的改变是否可提供第二“杵”,通过该“杵”可合理地调节CAR信号传导活性。

[0368] 选择Leu16和利妥昔单抗作为杂合的起点,因为它们的序列类似但活性谱不同。本发明人构建了杂合CAR,其scFv包含利妥昔单抗的FR和Leu16的CDR(RFR-LCDR),或反之亦然(LFR-RCDR)(图12A)。在重复的抗原攻击后,RFR-LCDR杂合CAR触发了稳健的肿瘤细胞裂解和T细胞增殖,这提供了CD20 CAR的第一实例,其功能与体外测定中的CD19 CAR的功能相当(图12B)。在不存在抗原刺激的情况下,RFR-LCDR杂合CAR-T细胞显示出明显的活化标志物表达,表明了静息时T细胞活化的非零水平(图12C)。相比之下,LFR-RCDR杂合体尽管在T细胞表面上有效表达,但完全没有功能(图12B;图22A),因此其被排除在进一步的表征之外。此后,术语“杂合CAR”是指RFR-LCDR变体。

[0369] 在随后的研究中包括了在跨膜结构域和胞质CD28信号传导结构域之间具有两个丙氨酸插入的经修饰的杂合CAR(RFR-LCDR.AA),以确定序列杂合和丙氨酸插入是否协同作用以进一步改善CAR-T细胞功能。两种杂合CAR均显示出与具有和不具有丙氨酸的基于利妥昔单抗的CAR类似的表面分布(图22B),并且所有CAR-T细胞均响应于抗原刺激而产生了Th1细胞因子(图22C),这证实了肿瘤反应性。然而,与基于利妥昔单抗的CAR-T细胞相比,在不存在抗原刺激的情况下,杂合CAR-T细胞没有显示出抗原非依赖性T细胞增殖的迹象(图12D),并且scFv序列杂合显著降低了TNF- α 产生并提高了IL-2产生(图22D)。此外,对CAR-T细胞培养上清液的代谢分析揭示了在不存在抗原刺激的情况下,scFv杂合显著降低了葡萄糖和谷氨酰胺摄取以及谷氨酸、丙氨酸和乳酸分泌(图12E;图23)。因此,静息时杂合CAR-T细胞的代谢率处于中间水平,介于表达两种亲本构建体之一(即利妥昔单抗或Leu16 CAR)的T细胞的水平之间。总之,这些结果表明scFv杂合可显著降低强直信号传导的强度,而不完全消除基础T细胞活化。

[0370] 本发明人接下来进行了杂合CAR针对其亲本构建体中的每一个和CD19 CAR在体内的头对头比较(图13A)。结果表明RFR-LCDR CAR-T细胞有效地排斥原始肿瘤以及肿瘤再攻击二者(图13B、C)。事实上,这标志着本发明人知晓CD20 CAR在根除B细胞淋巴瘤异种移植方面优于CD19 CAR的第一实例。

[0371] 与先前结果一致,丙氨酸插入显著改善了利妥昔单抗CAR(图13B、C)。由于RFR-

LCDR和RFR-LCDR.AA CAR-T细胞二者针对肿瘤和再攻击均提供了近乎完美的保护,因此本发明人无法评估在杂合CAR背景中的丙氨酸插入是否在肿瘤杀伤中提供了进一步的益处。然而,RO血液分析表明,与RFR-LCDR CAR-T细胞相比,RFR-LCDR.AA CAR-T细胞具有优异的体内存活和扩增(图13D)。这些结果在第二体内研究中得到进一步验证,在该第二体内研究中,将动物用单(而不是分开)剂量的CAR-T细胞处理,并以逐渐升高的肿瘤剂量水平用肿瘤细胞再攻击两次(图13E、F)。利妥昔单抗.AA、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA CAR-T细胞在每次肿瘤再攻击之后均持续存在并反弹,其中RFR-LCDR.AA CAR-T细胞在第一次肿瘤再攻击之前和之后两种情况下在外周血液中显示出最高的CAR-T细胞水平(图13G)。通过本研究,两种杂合CAR变体都为动物提供了完全的保护。

[0372] 综上所述,这些结果表明,可通过改变CAR的scFv序列来改善其功能,并且调节——而不是完全消除——基础T细胞活化可导致具有显著改善的抗肿瘤功能的CAR设计。

[0373] 4. 记忆表型富集和CAR驱动的代谢紊乱的最小化增强了CAR-T细胞功能

[0374] 为了更好地理解支持体内观察到的功能差异的生物学,本发明人对在T细胞注射之后9天从荷瘤动物回收的利妥昔单抗、Leu16、RFR-LCDR和RFR-LCDR.AA CAR-T细胞进行了RNA-seq和ATAC-seq分析(图249)。结果显示,利妥昔单抗CAR-T细胞的转录组学和表观遗传谱与其他的相比存在明显差异,其中RFR-LCDR.AA CAR与利妥昔单抗CAR的差异最大(图14A、B;图25)。与其他CAR变体中的每一种相比,利妥昔单抗CAR-T细胞显示出ATP9A的表达显著提高,所述ATP9A编码正向调节GLUT1循环的磷脂翻转酶(Tanaka et al.,2016)(图14B、C)。从内体到质膜的GLUT1循环对于细胞摄取葡萄糖以支持糖酵解至关重要,并且已表明不同的GLUT1表达水平与人T细胞中不同的效应功能相关(Cretenet et al.,2016;Macintyre et al.,2014)。这些结果与如下的先前观察结果相呼应,即利妥昔单抗和利妥昔单抗AA CAR-T细胞在静息时表现出升高的葡萄糖摄取(图12E),并促使分析已经从体内研究中收集的血清样品中的葡萄糖水平(在图13E至G中示出)。结果显示了用利妥昔单抗AA CAR-T细胞处理的小鼠的血清中的显著更低的葡萄糖水平(图14D),进一步支持了基于利妥昔单抗的CAR-T细胞的糖酵解活性显著高于杂合CAR-T细胞这一观点。

[0375] 除了提高的糖酵解外,从小鼠中回收的利妥昔单抗CAR-T细胞与其他三种CAR-T细胞类型中的每一种相比均显示出显著更低的CD62L表达(由SELL基因编码)和更高的抑制性受体KIR2DL1、KIR2DL3和KIR3DL1转录水平(Bjorkstrom et al.,2012)(图14B)。通过ATAC-seq进一步确定了抑制性KIR的上调(图14C)。总之,利妥昔单抗CAR-T细胞表现出与趋向于功能耗竭的效应T细胞一致的表型。

[0376] 相比之下,杂合CAR-T细胞,特别是RFR-LCDR.AA CAR-T细胞,在基于基因集富集分析(GSEA)的记忆表型中显著富集(图15A、B)。GSEA还揭示,与利妥昔单抗和Leu16 CAR-T细胞相比,从小鼠中回收的两种杂合CAR-T细胞群体都表现出显著更强的T细胞活化、细胞毒性、受体信号传导和干扰素 γ 特征(图15A、C)。特别是对于RFR-LCDR.AA CAR-T细胞,这种强烈的T细胞活化特征与低细胞周期和DNA复制活性共存、与记忆表型一致以及与利妥昔单抗CAR-T细胞形成鲜明对比(图15A、D)。值得注意的是,在注射到荷瘤小鼠中之前,RFR-LCDR.AA CAR-T细胞中记忆亚型的富集并不明显(图2611),表明在遇到抗原刺激时和/或在体内环境下发生了变化。

[0377] 总之,这些数据表明利妥昔单抗CAR-T细胞在静息时和在体内抗原暴露时两种情

况下都表现出升高的糖酵解。相比之下,RFR-LCDR.AA,通过scFv序列杂合与丙氨酸插入协同组合而获得的新CAR,促进了记忆T细胞的形成,这些细胞可发挥稳健的效应功能,同时在体内维持相对低的代谢活性水平以及长期持久性。

[0378] B. 讨论

[0379] 在本研究中,本发明人探索了合理的CAR序列和结构修饰对CAR-T细胞行为的影响,并观察到即使是适度的改变——小到插入两个丙氨酸残基——也可引发所得CAR-T细胞的抗肿瘤效力的显著变化。本发明人发现强直信号传导——以及相关的基础T细胞活化——是量化和调节CAR行为的有用量度。这些结果表明,强直信号传导的作用是以梯度运行的,并且存在一个令人满意的点,其中低水平的强直信号传导可增强针对抗原刺激的快速T细胞响应,同时实现持续的抗肿瘤活性。例如包含丙氨酸的扭转接头的插入以及来自不同scFv的FR和CDR序列的杂合的方法能够产生沿强直信号传导强度谱下降(fall along)的CAR变体,并且这些变体中的一些甚至可优于体内肿瘤控制中的金标准CD19 CAR。

[0380] 丙氨酸插入是用于调节CAR强直信号传导以及抗原刺激的CAR-T细胞功能的通用的方法。在本研究中,本发明人发现在CD28的跨膜结构域和胞质结构域之间插入两个丙氨酸改善了CD20 CAR和GD2 CAR二者的体内功能。鉴于丙氨酸插入的预期效果是改变或“扭转”CAR构象,并且起始的蛋白质构象可能取决于CAR中并入的特定组分,因此丙氨酸的最佳数量可随CAR中使用的特定的跨膜结构域和胞质结构域而变化。对下游信号转导途径的详细生物化学分析可进一步阐明支持本研究中功能改善的分子机制,并告知丙氨酸插入策略是否可适应于具有多种跨膜结构域和胞质结构域的CAR。

[0381] 除了丙氨酸插入之外,scFv杂合被证明是产生改善的CAR变体的有效方法。在本研究中表征的RFR-LCDR杂合体的情况下,用来自强直信号传导CAR(利妥昔单抗)的FR和来自非强直信号传导CAR(Leu16)的CDR构建的CAR产生了具有中等强直信号传导强度和与任一亲本相比均优异得多的抗肿瘤效力的嵌合体。该结果凸显了scFv序列对CAR-T细胞功能的影响的不可预测性。对蛋白质结构和位点特异性突变的深入分析可允许精确识别真正关键的残基,并为未来的scFv设计提供完全合理的方法。

[0382] 一种发现与强直信号传导密切相关——并且可通过上面讨论的蛋白质工程方法进行调节的表型——是静息时升高的代谢活性,特别是糖酵解和谷氨酰胺分解。大量文献已表明,提高的糖酵解活性是效应T细胞的特征,并且增强的糖酵解对稳健的T细胞效应功能至关重要(Bantug et al.,2018)。利妥昔单抗CAR-T细胞在静息时和在抗原刺激时两种情况下都表现出强烈的糖酵解的这一事实与强直信号传导和基础T细胞活化可增强T细胞的快速效应功能的这一假设一致。同时,持续的有氧糖酵解活性也与获得衰老表型(senescent phenotype)以及缺乏长期持久性和记忆形成的潜力有关(Kishton et al.,2017),这与基于利妥昔单抗的CAR-T细胞无法实现肿瘤异种移植物的持续控制相一致。这与表现出相对较低的糖酵解通量但具有稳健且持续的抗肿瘤活性的杂合CAR-T细胞形成鲜明对比。具有内在高代谢率的CAR-T细胞面临的主要挑战是与肿瘤细胞的代谢竞争,这可进一步限制CAR-T细胞维持其功能的能力(Chang et al.,2015)。瓦尔堡效应(Warburg effect),其特征在于高的葡萄糖摄取率和乳酸分泌率(尽管存在氧),是肿瘤细胞的标志(Liberti和Locasale,2016)。在肿瘤微环境中,CAR-T细胞和肿瘤细胞必须竞争相同的有限供应的营养素,并有助于通过乳酸分泌进行的肿瘤微环境的相同潜在毒性酸化(Fischer

etal., 2007)。与具有较低代谢负荷的其他CAR-T细胞变体相比,这种竞争可对基于利妥昔单抗的CAR-T细胞的抗肿瘤效力具有不成比例的强烈影响。

[0383] 鉴于高代谢率是支持稳健的效应T细胞功能所必需的,而记忆表型有利于长期的肿瘤控制,一个有趣的问题是,将靶向同一抗原的不同CAR-T细胞组合——例如,通过同时或顺序地共施用利妥昔单抗CAR-T细胞与RFR-LCDR.AA CAR-T细胞——相比于单独施用任一细胞群体是否将实现更大的治疗效力。与施用单一产品相比,使用多种细胞产品可产生显著成本和技术复杂性。然而,可以证明这样的组合在到目前为止对CAR-T细胞处理具有抵抗响应的情况下是可用的。

[0384] CAR分子的结构模块化支持开发用于广泛多种病症的CAR-T细胞治疗,但合理设计在体内产生可预测的稳健功能的CAR的能力仍然难以实现。本研究中探索的蛋白质工程策略和CAR-T细胞表征方法提供了系统性方法以调节CAR信号传导以及定量评价CAR-T细胞表型和代谢,从而支持下一代CAR-T细胞的工程化以用于目前缺乏有效选项的难治性疾病。

[0385] C. 材料和方法

[0386] 1. 抗CD20 scFv和CAR的构建

[0387] 编码GA101和利妥昔单抗的scFv序列的质粒由Dr. Anna M. Wu (Zettlitz et al., 2017) (UCLA和希望之城 (City of Hope)) 慷慨惠赠。编码奥法木单抗scFv的DNA序列通过Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA) 进行密码子优化和合成。编码来源于leu16单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 的scFv的质粒由Dr. Michael C. Jensen (西雅图儿童研究所 (Seattle Children's Research Institute)) (Jensen et al., 1998) 慷慨惠赠。使用abYsis从14g2a mAb (PDB代码4TUJ) 中鉴定出抗GD2scFv的 V_L 和 V_H 序列 (Swindells et al., 2017)。抗CD20 CAR通过组装以下来构建: scFv (以 V_L 至 V_H 取向)、包含L235E N297Q突变的胞外IgG4铰链-CH2-CH3间隔区 (Hudecek et al., 2015)、CD28跨膜结构域和胞质结构域、CD3 ζ 胞质结构域和T2A“自切割”序列随后是具有MSCV骨架的截短的表皮生长因子受体 (truncated epidermal growth factor receptor, EGFRt)。EGFRt用作转导和分选标志物。上述抗CD20 CAR构建体用作模板以生成用于CAR簇聚的显微术成像的CAR-Halo标签融合蛋白。

[0388] 细胞系生成和维持

[0389] HEK293T和Raji细胞获自ATCC。K562细胞由Dr. Michael C. Jensen (西雅图儿童研究所) 惠赠。如前所述 (Zah et al., 2016) 生成CD19⁺CD20⁺K562细胞。表达萤光素酶的CHLA-255细胞系 (CHLA-255-Luc) 由Dr. Shahab Asgharzadeh (洛杉矶儿童医院 (Children's Hospital of Los Angeles)) 惠赠。通过逆转录病毒转导CHLA-255-Luc以表达EGFP来产生CHLA-255-Luc-EGFP细胞, 并通过在UCLA流式细胞术核心设施 (UCLA Flow Cytometry Core Facility) 的FACSAria (II) (BD Bioscience) 上进行荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 来富集EGFP⁺细胞。将HEK 293T细胞在补充有10%热灭活FBS (heat-inactivated FBS, HI-FBS; ThermoFisher) 的DMEM (HyClone) 中培养。将CHLA-255-Luc-EGFP细胞在具有10% HI-FBS的IMDM (thermoFisher) 中培养。将原代人T细胞、Raji和K562细胞在具有10% HI-FBS的RPMI-1640 (Lonza) 中培养。对于代谢组学研究中使用的CAR-T细胞, 将T细胞在包含2g/L 1,2-¹³C-葡萄糖与10%热灭活的经透析FBS (HI-dFBS) 的RPMI-1640中培养。

[0390] 2. 逆转录病毒的产生和人原代CAR-T细胞的产生

[0391] 使用线性聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI, 25kDa; Polysciences), 通过用编码抗CD20 CAR或对照构建体的质粒以及pRD114/pHIT60病毒包装质粒 (由Dr. Steven Feldman惠赠) 瞬时共转染HEK 293T细胞来产生逆转录病毒上清液。48和72小时之后收集上清液, 并在通过0.45 μ m膜过滤器去除细胞碎片之后合并所述上清液。健康的供体血液获自UCLA血液和血小板中心 (UCLA Blood and Platelet Center)。使用RosetteSep人CD8⁺T细胞富集混合物 (StemCell Technologies) 遵循制造商的方案来分离CD8⁺T细胞。根据Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 密度梯度分离外周血单个核细胞 (PBMC)。使用磁活化细胞分选 (magnetic-activated cell sorting, MACS; Miltenyi) 从PBMC中富集CD14⁻/CD25⁻/CD62L⁺初始/记忆T细胞 (T_{N/M})。在第0天 (分离日) 将T细胞用CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher) 以3:1细胞比珠的比例进行刺激, 并在第2天和第3天用逆转录病毒上清液进行转导。在第7天去除Dynabeads。将T细胞在补充有10% HI-FBS的RPMI-1640中培养, 并且每2天供应重组人IL-2 (ThermoFisher) 和IL-15 (Miltenyi) 至最终浓度分别为50U/mL和1ng/mL。对于用于RNA-seq、ATAC-seq和代谢组学研究的CAR-T细胞, 通过磁性细胞分选来针对CAR⁺表达富集T细胞, 该磁性细胞分选通过用生物素化的西妥昔单抗 (cetuximab) (Eli Lilly; 内部生物素化) 对EGFR^t进行的染色然后是抗生物素微珠 (Miltenyi) 来进行。对于RNA-seq和ATAC-seq, 用死细胞去除试剂盒 (Miltenyi) 去除死细胞, 之后富集EGFR^t群体。

[0392] 3. 细胞因子产生量化

[0393] 在第13天或第14天, 将5万个CAR⁺T细胞与25,000个表达EGFP的亲本K562 (CD19⁻CD20⁻) 或CD19⁺CD20⁺K562靶细胞以2:1效应物比靶标 (E:T) 的比率在96孔U型底的板中孵育。为了在考虑转导效率差异的同时控制细胞密度, 根据需要来添加未经转导的T细胞以达到每孔相同数量的总T细胞。共孵育48小时之后, 将细胞以300 $\times$ g离心2分钟。收获上清液并通过ELISA (BioLegend) 对细胞因子水平进行定量。

[0394] 4. 增殖测定 [305] 用1.25 μ M CellTrace Violet (ThermoFisher) 对T细胞进行染色, 并以2:1E:T比率在具有亲本K562或CD19⁺CD20⁺K562细胞的96孔U型底的板中的每个孔中接种40,000个CAR⁺T细胞。根据需要来添加未经转导的T细胞至孔中以对不同的转导效率进行归一化, 并确保每孔T细胞的总数量始终一致。根据需要对培养物进行传代, 并在共孵育4天之后, 在MACSQuant VYB流式细胞仪上分析CTV稀释。

[0395] 5. 具有重复抗原攻击的细胞毒性测定

[0396] 将CAR⁺T细胞以4 $\times$ 10⁵个细胞/孔接种在24孔板中, 并以2:1E:T比率与靶细胞共孵育。根据需要来添加未经转导的T细胞至孔中以对不同的转导效率进行归一化, 并确保每孔T细胞的总数量始终一致。每2天通过MACSQuant VYB流式细胞仪对细胞计数进行定量, 之后添加新鲜靶细胞 (2 $\times$ 10⁵个细胞/孔)。

[0397] 6. 用于流式细胞术分析的抗体染色

[0398] 用生物素化的西妥昔单抗 (Eli Lilly; 内部生物素化) 然后是PE缀合的链霉亲和素 (Jackson ImmunoResearch#016-110-084) 来测量EGFR^t表达。使用Flag标签 (DYKDDDDK标签, APC, 克隆L5, BioLegend#637308)、HA (FITC, 克隆GG8-1F3.3.1, Miltenyi#130-120-722) 或者用抗Fc (Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch#709-546-098) 通过表面表位染色来对CAR表达进行定量。在第18天 (即添加Dynabead之后18天和去除Dynabead之后11天)

通过针对CD137 (PE/Cy7, 克隆4B4-1, BioLegend#309818) 和CTLA-4 (PE/Cy7, 克隆BNI3, BioLegend#369614) 的抗体染色来评价CAR-T细胞的抗原非依赖性活化标志物表达。针对CD45RA (VioGreen, 克隆T6D11, Miltenyi#130-113-361)、CD62L (APC, 克隆DREG-56, ThermoFisher#17-0629-42)、PD-1 (APC, 克隆EH12.2H7, BioLegend#329908) 和LAG-3 (APC, 克隆3DS223H, ThermoFisher#17-2239-42) 的抗体被用于评价T细胞亚型和耗竭状态。体内T细胞和肿瘤细胞的持久性通过眶后血液样品的抗体染色来监测。将样品用红细胞裂解溶液($10\times$, Miltenyi) 遵循制造商的方案进行处理。将剩余的细胞内容物用抗人CD45 (PacBlue 或PECy7, 克隆HI30, BioLegend#304029或#304016) 和生物素化的西妥昔单抗然后是PE缀合的链霉亲和素进行染色。在MACSQuant VYB流式细胞仪 (Miltenyi) 上分析所有样品, 并使用FlowJo软件 (TreeStar) 分析所得数据。

[0399] 7. 共聚焦显微术

[0400] 将用CAR-Halo标签融合蛋白转导的Jurkat细胞以每孔10,000个细胞接种在48孔平底玻璃板 (MatTek) 的一个孔中的50 μ L RPMI-1640+10%HI-FBS中。用具有AiryScan和63 $\times$ 1.4NA油物镜的Zeiss LSM 880激光扫描共聚焦显微镜获得扫描共聚焦成像。

[0401] 8. 体内研究

[0402] 6至8周龄的NOD/SCID/IL-2R γ^{null} (NSG) 小鼠获自UCLA放射与肿瘤学系 (UCLA Department of Radiation and Oncology)。该方案得到了UCLA机构的动物护理和使用委员会 (UCLA Institutional Animal Care and Used Committee) 的批准。为了评价CD19和CD20 CAR-T细胞, 向每只小鼠通过尾静脉注射施用 0.5×10^5 个表达EGFP⁺萤火虫萤光素酶 (firefly luciferase, ffLuc) 的Raji细胞。六至九天之后, 在确认肿瘤植入之后, 将 1.5×10^6 至 5×10^6 个CAR⁺T细胞或仅表达EGFRt⁺的细胞 (阴性对照) 通过尾静脉注射至荷瘤小鼠。如正文和图中所述, 在研究的亚组中, 以 0.5×10^6 个肿瘤细胞施用第二剂并且以 2×10^6 个肿瘤细胞施用第三剂。在GD2 CAR-T细胞的研究中, 向每只小鼠通过尾静脉注射施用 3.5×10^6 个CHLA-255-Luc-EGFP细胞。在确认CHLA-255肿瘤植入后 (肿瘤注射之后17天), 通过尾静脉将 2×10^6 个CAR⁺T细胞注射至荷瘤小鼠。肿瘤剂量、T细胞剂量、肿瘤再攻击的细节在正文和图中示出。用IVIS Illumina III LT成像系统 (PerkinElmer) 监测肿瘤进展/消退。在T细胞注射之后3天和此后每10天通过眶后取血收获血液样品。以人道终点对小鼠实施安乐死。安乐死之后收集骨髓、脾和肝。将组织进行研磨并使其通过100- μ m过滤器, 然后进行红细胞裂解, 之后进行流式细胞术分析。对于ATAC-seq和RNA-seq实验, 向NSG小鼠植入 0.5×10^6 个Raji细胞, 6天之后用 2.85×10^6 个CAR-T细胞进行处理。T细胞注射之后九天, 从动物组织 (肝、脾、心脏血液和骨髓) 中回收CAR-T细胞, 并通过磁活化细胞分选 (MACS) 针对huCD45⁺和EGFRt⁺亚群进行富集, 之后进行ATAC-seq/RNA-seq文库构建。

[0403] 9. ATAC-seq文库构建和数据分析

[0404] ATAC-seq文库如前所述 (Buenrostro et al., 2013; Corces et al., 2017) 进行构建。简言之, 将来自MACS分选的30,000至50,000个活T细胞/小鼠用PBS洗涤一次, 并在50 μ L重悬缓冲液 (Resuspension Buffer, RSB) (10mM Tris-HCL, pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂) 中用0.1% IGEPAL CA-630、0.1%吐温-20和0.01%毛地黄皂苷裂解。将样品用1mL包含0.1%吐温-20的RSB缓冲液洗涤, 并在4 $^{\circ}$ C下以500 $\times$ g离心10分钟。将经沉淀的细胞核重悬在25 μ L Tn5转座混合物 (12.5 μ L 2 $\times$ Tagment DNA缓冲液、1.25 μ L Tn5转座酶和11.25 μ L 无菌

水;Illumina)中,并在处于37℃和500RPM下的摇动培养箱中储存一小时。用DNA Clean&Concentrator试剂盒(Zymo Research)纯化转座反应物。如前所述(Buenrostro et al., 2013),使用NEB Q5 MasterMix和定制引物对DNA片段进行PCR扩增。将文库通过AmPure珠(Beckman Coulter)进行尺寸选择,并通过TapeStation进行定量。将文库在UCLA广泛干细胞研究中心(UCLA Broad Stem Cell Research Center)的高通量测序核心的Illumina NovaSeq S1平台上以50bp的配对末端读取进行测序。将来自ATAC-seq的Fastq文件通过FastQC(Linux,v0.11.8)进行质量检查。将读取通过cutadapt(Linux,v1.18)处理以去除具有低质量(low quality)(质量评分<33)的读取并修剪适配物(adapter)。使用Bowtie2(Linux,v2.2.9)将经修剪的读取与mm10参考基因组对齐以消除来自小鼠细胞的污染读取。将非鼠的读取随后通过Bowtie2映射至hg38基因组,并通过samtools(Linux,v1.9)将sam文件转换为bam文件。使用MACS2(Linux,v2.1.2)在经对齐的读取上将峰针对每个复制进行独立调用,并随后通过bedtools(v2.26.0)合并。将与每个峰对齐的读取通过subread(Linux,v1.6.3)中的featureCounts函数进行计数。为了使染色质可访问位点可视化,将从MACS2调用的峰在IGV(v2.8.0)中可视化。峰的倍数富集(通过MACS2计算)在转录起始位点(transcription start site,TSS)的-1kb至1kb范围内指示了启动子区域的可访问性。

[0405] 10. 批量RNA-seq和基因集富集分析(GSEA)

[0406] 使用Qiagen RNeasy Plus Mini试剂盒从200,000至700,000个经MACS分选出的CAR-T细胞中提取总RNA。使用NEBNext Poly(A)mRNA磁分离模块(New England BioLabs)来分离mRNA。使用NEBNext Ultra II定向RNA文库制备试剂盒(New England BioLabs)遵循制造商的方案生成RNA-seq文库。将来自RNA-seq的Fastq文件通过FastQC(Linux,v0.11.8)进行质量检查。将读取通过cutadapt(Linux,v1.18)处理以去除具有低质量(质量评分<33)的读取并修剪适配物。使用Tophat2(Linux,v2.1.0)将经修剪的读取与mm10参考基因组对齐以去除来自小鼠细胞的受污染的读取。将非鼠的读取通过Tophat2映射至hg38基因组。将与每个基因对齐的读取通过subread包(Linux,v1.6.3)中的featureCounts函数进行计数,其中ensembl 38基因集作为参考。在至少一个样品中没有映射至少8个读取的基因被认为低于可靠的检测限并被淘汰。将读取计数通过M值的修剪平均值法(在R v3.6.3上运行的edgeR中的TMM归一化法)进行归一化,以产生RPKM(reads per millions per kilobases,每千碱基每百万读取)值,并使用edgeR包计算差异表达。使用GSEA软件(v4.1.0,Broad Institute)和BubbleGUM(v1.3.19)(Spinelli et al.,2015)进行基因本体论分析。将差异表达的基因的表达值输入至程序中,并使用从当前MSigDB基因集中选择的2493个T细胞相关基因集的精选列表。用于差异表达基因的热图使用R(版本3.6.3)中的pheatmap和ggplot2包来生成。使用R

[0407] (版本3.6.3)中的ggplot2生成火山图。

[0408] 11. 代谢物提取和分析

[0409] 将细胞最初在补充有10% HI-FBS的RPMI-1640中培养。在代谢物提取之前24至72小时,将培养基更换为包含10% FBS或经透析FBS(dFBS)与2g/L的1,2-¹³C-葡萄糖的RPMI。每24小时从每个细胞系收集细胞培养基以评价营养素摄取和消耗。将四体积的100% HPLC级甲醇添加至一体积的培养基,并以17,000×g和在4℃下离心5分钟以沉淀细胞碎片。收获澄清的上清液并通过液相色谱随后是质谱(LC-MS)进行分析。为了提供对营养素摄取和消

耗的准确估计,每24小时进行部分培养基更换以避免营养素耗尽。在切换至经标记葡萄糖培养基二十四或72小时之后,如前所述进行胞内代谢物提取(Bennett et al.,2008;Park et al.,2019)。简言之,将细胞转移至尼龙膜过滤器(0.45 μ m;Millipore)上并抽真空以去除培养基。将每个过滤器快速浸泡在6孔板的一个孔中的400 μ L冷提取溶剂(HPLC级乙腈:甲醇:水,40:40:20,v/v)中。将板在-20 $^{\circ}$ C下孵育20分钟。随后将细胞提取物转移至1.7mL微量离心管中,并在4 $^{\circ}$ C下以17,000 $\times$ g离心5分钟。将上清液冻干并在HPLC级水中重构,相对于总细胞计数进行归一化(每100万个细胞50 μ L)。在UCLA的分子仪器中心(Molecular Instrumentation Center,MIC)将经甲醇处理的培养基样品和胞内代谢物提取物二者通过与高分辨轨道阱质谱仪(Q-Exact plus Orbitrap;Thermo Fisher Scientific)结合的反相离子配对液相色谱(Vanquish UPLC;Thermo Fisher Scientific)进行分析。通过将质荷(mass-to-charge,m/z)比和保留时间与先前验证的标准品进行比较来鉴定代谢物。在负离子模式和正离子模式两种情况下检测样品。将负离子模式分为两个亚组—nlo和nhi—以获得m/z比分别为60至200和200至2000的数据。使用代谢组学分析和可视化引擎(Metabolomic Analysis and Visualization Engine,MAVEN)(Clasquin et al.,2012)处理LC-MS数据。针对天然存在的 ^{13} C丰度对标记分数进行校正。通过将来自LC-MS测量的离子计数相对于具有已知浓度的对照进行归一化来在24和72小时对培养基中的代谢物的浓度进行定量。通过从新鲜培养基中减去样品浓度并相对于活细胞计数进行归一化来计算摄取和分泌率(正值表示分泌,并且负值表示摄取)。进行摩尔平衡以解释来自细胞培养物的培养基变化。计算解释了每24小时10%至20%的培养基蒸发。

[0410] 12. 统计分析

[0411] 使用GraphPad Prism V8进行统计学检验,包括双尾、非配对、双样本Student's t检验和对数秩Mantel-Cox检验。用edgeR中的glmQLFTest函数对RNA-seq中的差异基因分析进行单因素ANOVA检验。

[0412] 实施例4:CAR工程化

[0413] 本实施例提供了补充上述实施例的数据。在一些情况下,数据可与上述实例中的数据重复,只是以不同的方式呈现。图1中示出的是用来源于多种抗体的scFv构建的CD20 CAR的示意图。所有CAR都是第二代受体,其包含CD28共刺激结构域(图1A)和用于CD20 CAR构建的scFv结构域的序列。

[0414] 基于Leu16、利妥昔单抗、GA101和奥法木单抗的CAR均在原代人T细胞表面有效表达,它们在离体培养期间对T细胞扩增的影响没有显著差异。(图27A至C)。基于Leu16、利妥昔单抗、GA101和奥法木单抗的CAR显示出类似的抗原检测阈值(图28A至C)。利妥昔单抗来源的CD20CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致在不存在抗原刺激的情况下的(图29A、B)激活和衰竭性标志物的上调以及(图29C、D)T细胞增殖。图29A、C示出了基于利妥昔单抗的CAR-T细胞中的强直信号传导,这在CD8 $^{+}$ 和初始/记忆T(TN/M)细胞二者中均观察到,其中CD8 $^{+}$ 和初始/记忆T(TN/M)细胞是针对CD14 $^{-}$ /CD25 $^{-}$ /CD62L $^{+}$ 表型分选出的。利妥昔单抗来源的CD20 CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致代谢通量的上调,如通过提高的葡萄糖和谷氨酰胺摄取以及提高的乳酸、丙氨酸和谷氨酸分泌所证明的。CD19 CAR和GD2 CAR分别作为阴性和阳性对照被包括在内以用于强直信号传导(图30)。共聚焦显微术显示出基于Leu16、利妥昔单抗、GA101和奥法木单抗的CAR的均匀表面表达,表明利妥昔单抗CAR-T细

胞的强直信号传导不是由CAR簇聚引起的(图31)。基于利妥昔单抗的CAR-T细胞在早期时间点显示出比基于Leu16、GA101和奥法木单抗的CAR更好的肿瘤控制,但在2周之后迅速失去抗肿瘤效力(图32)。基于利妥昔单抗的CAR的丙氨酸插入变体(图17)在原代人T细胞的表面上表达良好(图33)。丙氨酸插入导致基于利妥昔单抗的CAR-T细胞中的强直信号传导减少(图34)。丙氨酸插入不改变基于利妥昔单抗的CAR-T细胞的体外抗肿瘤活性(图35)。

[0415] 利妥昔单抗来源的CD20 CAR包含在跨膜结构域和胞质CD28结构域之间插入的两个丙氨酸残基,导致了优异的体内抗肿瘤功能。将50万个表达萤火虫萤光素酶的Raji淋巴瘤细胞植入NOD/scid/ $\gamma^-/-$ (NSG) 小鼠,并在肿瘤注射之后7天用135万个表达CD20 CAR或转导标记物(EGFRt)的T细胞对小鼠进行处理。7天之后向动物重新给药150万个T细胞。本研究中测试的所有CAR均包含利妥昔单抗来源的scFv、IgG4铰链-CH2-CH3胞外间隔区、CD28跨膜结构域和胞质结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域。在CD28跨膜结构域和CD28胞质结构域之间插入了零至四个丙氨酸。通过生物发光成像监测肿瘤进展,并显示了作为自肿瘤注射以来的时间的函数的辐射信号。每一条辐射度迹线的终点指示每只动物的人道终点。与亲本(无丙氨酸插入)构建体以及其他变体相比,两个丙氨酸的插入变体显示出优异的肿瘤控制和延长的中位存活。该数据在图5中示出。丙氨酸插入是改善CAR-T细胞功能的通用方法(图36)。

[0416] 具有杂合scFv的CD20 CAR(图6)在原代人T细胞表面上有效表达(图37)。RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出抗原非依赖性CAR信号传导,导致在不存在抗原刺激的情况下的激活和衰竭性标志物的上调(图38A)以及T细胞增殖(图38B)。CD19 CAR和GD2 CAR分别作为阴性和阳性对照被包括在内,以用于图38中的强直信号传导。在体外在重复抗原攻击后,RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出优异的肿瘤细胞杀伤。每48小时用新鲜的Raji淋巴瘤细胞对表达不同CAR或转导标记物(EGFRt)的T细胞进行攻击。在每次重新攻击之前,通过流式细胞术对活靶细胞计数进行定量。来自多个供体的结果表明,RFR-LCDR杂合CAR与其亲本构建体(Leu16和利妥昔单抗)中的任一者相比具有优异的肿瘤细胞杀伤(图8)。通过生物层干涉术测量Leu16、利妥昔单抗和RFR-LCDR scFv的结合动力学参数(图39)。

[0417] 可组合丙氨酸插入和scFv杂合以生成新的CAR构建体(图40)。在有和没有丙氨酸插入的情况下,包含RFR-LCDR杂合scFv的CAR导致低但非零水平的强直信号传导(图41)。如通过葡萄糖和谷氨酰胺摄取以及乳酸、丙氨酸和谷氨酸分泌所证明的,在有和没有丙氨酸插入的情况下,包含RFR-LCDR杂合scFv的CAR均导致低但非零水平的强直信号传导(图42)。强直信号传导CAR显示出不同的转录谱,其表明了提高的线粒体蛋白质翻译(图43A)、提高的抗原呈递(图43B)、提高的MYC信号传导(图43C)、提高的MTORC信号传导(图43D)、提高的TNF- α 信号传导(图43E)、不同的干扰素响应(图43F)、与效应(与记忆相反)T细胞亚型相关的基因的富集特征(图43G)和提高的细胞周期活性(图43H)。对于包含超出可显示空间的基因的热图,热图中示出的基因的名称在每个图的侧方顺序列出。RFR-LCDR杂合CD20 CAR显示出优异的体内肿瘤清除(图44)。转录组学和表观遗传学分析揭示了T细胞表型中的CAR依赖性变化(图45)。将NSG小鼠i.v.注射 0.5×10^6 个表达萤火虫萤光素酶的Raji细胞,6天之后用i.v.递送的 2.85×10^6 个CAR⁺T细胞进行处理。T细胞注射之后9天,从荷瘤小鼠收集肝、脾、心脏血液和骨髓(n=2只小鼠/组)。通过针对huCD45⁺EGFRt⁺群体进行富集来获得CAR⁺T细胞,并随后通过RNAseq和ATACseq进行分析(图45)。

[0418] ***

[0419] 根据本公开内容,本文中公开和要求保护的所有方法均可在不进行过度实验的情况下做出和执行。虽然已经根据一些优选实施方案描述了本公开内容的组合物和方法,但是对于本领域技术人员来说将明显的是,在不脱离本公开内容的概念、精神和范围的情况下,可对本文所述方法以及本文所述方法的步骤或步骤顺序施加变化。更具体地,将明显的是,在化学和生理学两方面均相关的某些试剂可替代本文中所述的试剂同时将实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员明显的所有这样的类似替代和修改被视为在所附权利要求书限定的本公开内容的精神、范围和概念内。

[0420] 在本申请中列举的参考文献就其提供了补充本文中阐述的那些的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0421] 在整个说明书中引用的以下参考文献和出版物,就其提供了补充本文中阐述的那些的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0422] 参考文献

[0423] Till B.G.et al.Blood,2008;112 (6) :2261-2271.

[0424] Wang et al.Clinical Immunology,2014;155:160-175.

[0425] Constantiescu et al.Molecular Cell,2001.7:377-385.

[0426] Bantug,G.R.,Galluzzi,L.,Kroemer,G.,and Hess,C. (2018) .The spectrum of T cell metabolism in health and disease.Nat Rev Immunol18,19-34.

[0427] Bennett,B.D.,Yuan,J.,Kimball,E.H.,and Rabinowitz,J.D. (2008) .Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach.Nat Protoc 3,1299-1311.

[0428] Bjorkstrom,N.K.,Beziat,V.,Cichocki,F.,Liu,L.L.,Levine,J.,Larsson,S.,Koup,R.A.,Anderson,S.K.,Ljunggren,H.G.,and Malmberg,K.J. (2012) .CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells.Blood 120,3455-3465.

[0429] Buenrostro,J.D.,Giresi,P.G.,Zaba,L.C.,Chang,H.Y.,and Greenleaf,W.J. (2013) .Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin,DNA-binding proteins and nucleosome position.Nat Methods 10,1213-1218.

[0430] Chang,C.H.,Curtis,J.D.,Maggi,L.B.,Jr.,Faubert,B.,Villarino,A.V.,O'Sullivan,D.,Huang,S.C.,van der Windt,G.J.,Blagih,J.,Qiu,J.,et al. (2013) .Posttranscriptional control ofT cell effector function by aerobic glycolysis.Cell 153,1239-1251.

[0431] Chang,C.H.,Qiu,J.,O'Sullivan,D.,Buck,M.D.,Noguchi,T.,Curtis,J.D.,Chen,Q.,Gindin,M.,Gubin,M.M.,van der Windt,G.J.,et al. (2015) .Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression.Cell 162,1229-1241.

[0432] Chang,Z.L.,and Chen,Y.Y. (2017) .CARs:Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond.Trends Mol Med 23,430-450.

- [0433] Chang,Z.L.,Lorenzini,M.H.,Chen,X.,Tran,U.,Bangayan,N.J.,and Chen,Y.Y. (2018).Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors.Nat Chem Biol14,317-324.
- [0434] Chothia,C.,and Lesk,A.M.(1987).Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins.J Mol Biol 196,901-917.
- [0435] Chothia,C.,Lesk,A.M.,Tramontano,A.,Levitt,M.,Smith-Gill,S.J.,Air,G.,Sheriff,S.,Padlan,E.A.,Davies,D.,Tulip,W.R.,et al.(1989).Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.Nature 342,877-883.
- [0436] Clasquin,M.F.,Melamud,E.,and Rabinowitz,J.D.(2012).LC-MS data processing with MAVEN:a metabolomic analysis and visualization engine.Curr Protoc Bioinformatics Chapter 14,Unit1411.
- [0437] Constantinescu,S.N.,Keren,T.,Socolovsky,M.,Nam,H.,Henis,Y.I.,and Lodish,H.F.(2001).Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain.Proc Natl Acad Sci U S A 98,4379-4384.
- [0438] Corces,M.R.,Trevino,A.E.,Hamilton,E.G.,Greenside,P.G.,Sinnott-Armstrong,N.A.,Vesuna,S.,Satpathy,A.T.,Rubin,A.J.,Montine,K.S.,Wu,B.,et al.(2017).An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues.Nat Methods 14,959-962.
- [0439] Cretenet,G.,Clerc,I.,Matias,M.,Loisel,S.,Craveiro,M.,Oburoglu,L.,Kinet,S.,Mongellaz,C.,Dardalhon,V.,and Taylor,N.(2016).Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions.Sci Rep 6,24129.
- [0440] Drent,E.,Poels,R.,Ruiter,R.,van de Donk,N.,Zweegman,S.,Yuan,H.,de Bruijn,J.,Sadelain,M.,Lokhorst,H.M.,Groen,R.W.J.,et al.(2019).Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells.Clin Cancer Res 25,4014-4025.
- [0441] Fischer,K.,Hoffmann,P.,Voelkl,S.,Meidenbauer,N.,Ammer,J.,Edinger,M.,Gottfried,E.,Schwarz,S.,Rothe,G.,Hoves,S.,et al.(2007).Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells.Blood 109,3812-3819.
- [0442] Frigault,M.J.,Lee,J.,Basil,M.C.,Carpenito,C.,Motohashi,S.,Scholler,J.,Kawalekar,O.U.,Guedan,S.,McGettigan,S.E.,Posey,A.D.,Jr.,et al.(2015).Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells.Cancer Immunol Res3,356-367.
- [0443] Gomes-Silva,D.,Mukherjee,M.,Srinivasan,M.,Krenciute,G,Dakhova,O.,Zheng,Y.,Cabral,J.M.S.,Rooney,C.M.,Orange,J.S.,Brenner,M.K.,et al.(2017).Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent.Cell Rep 21,17-26.
- [0444] Grigor,E.J.M.,Fergusson,D.,Kekre,N.,Montroy,J.,Atkins,H.,Seftel,M.D.,

Daugaard,M.,Presseau,J.,Thavorn,K.,Hutton,B.,et al.(2019).Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell(CAR-T)Therapy in Cancer:A Systematic Review and Meta-Analysis.Transfus Med Rev 33,98-110.

[0445] Guedan,S.,Ruella,M.,and June,C.H.(2018).Emerging Cellular Therapies for Cancer.Annu Rev Immunol 37,145-171.

[0446] Hartman,N.C.,and Groves,J.T.(2011).Signaling clusters in the cell membrane.Curr Opin Cell Biol 23,370-376.

[0447] Hong,M.,Clubb,J.D.,and Chen,Y.Y.(2020).Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy.Cancer Cell.

[0448] Hudecek,M.,Lupo-Stanghellini,M.T.,Kosasih,P.L.,Sommermeyer,D.,Jensen,M.C.,Rader,C.,and Riddell,S.R.(2013).Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells.Clin Cancer Res 19,3153-3164.

[0449] Hudecek,M.,Sommermeyer,D.,Kosasih,P.L.,Silva-Benedict,A.,Liu,L.,Rader,C.,Jensen,M.C.,and Riddell,S.R.(2015).The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity.Cancer Immunol Res 3,125-135.

[0450] Jensen,M.,Tan,G.,Forman,S.,Wu,A.M.,and Raubitschek,A.(1998).CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells:implications for cellular immunotherapy of CD20+malignancy.Biol Blood Marrow Transplant 4,75-83.

[0451] Kabat,E.A.,and Wu,T.T.(1971).Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains.Ann N Y Acad Sci 190,382-393.

[0452] Kishton,R.J.,Sukumar,M.,and Restifo,N.P.(2017).Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy.Cell Metab 26,94-109.

[0453] Klein,C.,Lammens,A.,Schafer,W.,Georges,G.,Schwaiger,M.,Mossner,E.,Hopfner,K.P.,Umana,P.,and Niederfellner,G.(2013).Response to:monoclonal antibodies targeting CD20.MAbs 5,337-338.

[0454] Liberti,M.V.,and Locasale,J.W.(2016).The Warburg Effect:How Does it Benefit Cancer Cells?Trends Biochem Sci 41,211-218.

[0455] Liu,W.,Kawahara,M.,Ueda,H.,and Nagamune,T.(2008).Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency.Biotechnol Bioeng 101,975-984.

[0456] Liu,X.,Jiang,S.,Fang,C.,Yang,S.,Olalere,D.,Pequignot,E.C.,Cogdill,A.P.,Li,N.,Ramones,M.,Granda,B.,et al.(2015).Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice.Cancer Res75,3596-3607.

[0457] Long,A.H.,Haso,W.M.,Shern,J.F.,Wanhainen,K.M.,Murgai,M.,Ingaramo,M.,

Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., et al. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 21, 581-590.

[0458] Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P., et al. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* 20, 61-72.

[0459] Majzner, R.G., and Mackall, C.L. (2019). Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med* 25, 1341-1355.

[0460] Majzner, R.G., Rietberg, S.P., Sotillo, E., Dong, R., Vachharajani, V.T., Labanieh, L., Myklebust, J.H., Kadapakkam, M., Weber, E.W., Tousley, A.M., et al. (2020). Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov* 10, 702-723.

[0461] Martin, A.C., and Thornton, J.M. (1996). Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J Mol Biol* 263, 800-815.

[0462] Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115, 4393-4402.

[0463] Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Sloodstra, J.W., et al. (2011). Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118, 358-367.

[0464] Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-217.

[0465] Omer, B., Castillo, P.A., Tashiro, H., Shum, T., Huynh, M.T.A., Cardenas, M., Tanaka, M., Lewis, A., Sauer, T., Parihar, R., et al. (2018). Chimeric Antigen Receptor Signaling Domains Differentially Regulate Proliferation and Native T Cell Receptor Function in Virus-Specific T Cells. *Front Med (Lausanne)* 5, 343.

[0466] Park, J.O., Tanner, L.B., Wei, M.H., Khana, D.B., Jacobson, T.B., Zhang, Z., Rubin, S.A., Li, S.H., Higgins, M.B., Stevenson, D.M., et al. (2019). Near-equilibrium glycolysis supports metabolic homeostasis and energy yield. *Nat Chem Biol* 15, 1001-1008.

[0467] Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by

a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83,435-445.

[0468] Rufener, G.A., Press, O.W., Olsen, P., Lee, S.Y., Jensen, M.C., Gopal, A.K., Pender, B., Budde, L.E., Rossow, J.K., Green, D.J., et al. (2016). Preserved Activity of CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells in the Presence of Rituximab. *Cancer Immunol Res* 4,509-519.

[0469] Scheller, L., Strittmatter, T., Fuchs, D., Bojar, D., and Fussenegger, M. (2018). Generalized extracellular molecule sensor platform for programming cellular behavior. *Nat Chem Biol* 14,723-729.

[0470] Spinelli, L., Carpentier, S., Montanana Sanchis, F., Dalod, M., and Vu Manh, T.P. (2015). BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics* 16,814.

[0471] Srivastava, S., and Riddell, S.R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol* 36,494-502.

[0472] Swindells, M.B., Porter, C.T., Couch, M., Hurst, J., Abhinandan, K.R., Nielsen, J.H., Macindoe, G., Hetherington, J., and Martin, A.C. (2017). abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure-Management, Analysis, and Prediction. *J Mol Biol* 429,356-364.

[0473] Tanaka, Y., Ono, N., Shima, T., Tanaka, G., Katoh, Y., Nakayama, K., Takatsu, H., and Shin, H.W. (2016). The phospholipid flippase ATP9A is required for the recycling pathway from the endosomes to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 27, 3883-3893.

[0474] Teeling, J.L., Mackus, W.J., Wiegman, L.J., van den Brakel, J.H., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 177,362-371.

[0475] Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A.K., Maloney, D.G., Lindgren, C.G., Lin, Y., Pagel, J.M., Budde, L.E., et al. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* 119,3940-3950.

[0476] Uchiyama, S., Suzuki, Y., Otake, K., Yokoyama, M., Ohta, M., Aikawa, S., Komatsu, M., Sawada, T., Kagami, Y., Morishima, Y., et al. (2010). Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. *Cancer Sci* 101,201-209.

[0477] Watanabe, K., Terakura, S., Martens, A.C., van Meerten, T., Uchiyama, S., Imai, M., Sakemura, R., Goto, T., Hanajiri, R., Imahashi, N., et al. (2015). Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 zeta chimeric antigen receptor-modified effector CD8+T cells. *J Immunol* 194,911-920.

[0478] Watanabe, N., Bajgain, P., Sukumaran, S., Ansari, S., Heslop, H.E., Rooney,

C.M., Brenner, M.K., Leen, A.M., and Vera, J.F. (2016). Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncoimmunology* 5, e1253656.

[0479] Wijewarnasuriya, D., Bebernitz, C., Lopez, A.V., Rafiq, S., and Brentjens, R.J. (2020). Excessive Costimulation Leads to Dysfunction of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Immunol Res* 8, 732-742.

[0480] Yamamoto, T.N., Kishton, R.J., and Restifo, N.P. (2019). Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors. *Nat Med* 25, 1488-1499.

[0481] Zah, E., Lin, M.Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M.C., and Chen, Y.Y. (2016). T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res* 4, 498-508.

[0482] Zettlitz, K.A., Tavaré, R., Knowles, S.M., Steward, K.K., Timmerman, J.M., and Wu, A.M. (2017). ImmunoPET of Malignant and Normal B Cells with (89)Zr- and (124)I-Labeled Obinutuzumab Antibody Fragments Reveals Differential CD20 Internalization In Vivo. *Clin Cancer Res* 23, 7242-7252.

[0483] Zhang, W.Y., Wang, Y., Guo, Y.L., Dai, H.R., Yang, Q.M., Zhang, Y.J., Zhang, Y., Chen, M.X., Wang, C.M., Feng, K.C., et al. (2016). Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report. *Signal Transduct Target Ther* 1, 16002.

[0484] Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S.J.C., Perna, F., Kloss, C.C., Gunset, G., Plotkin, J., and Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* 28, 415-428.

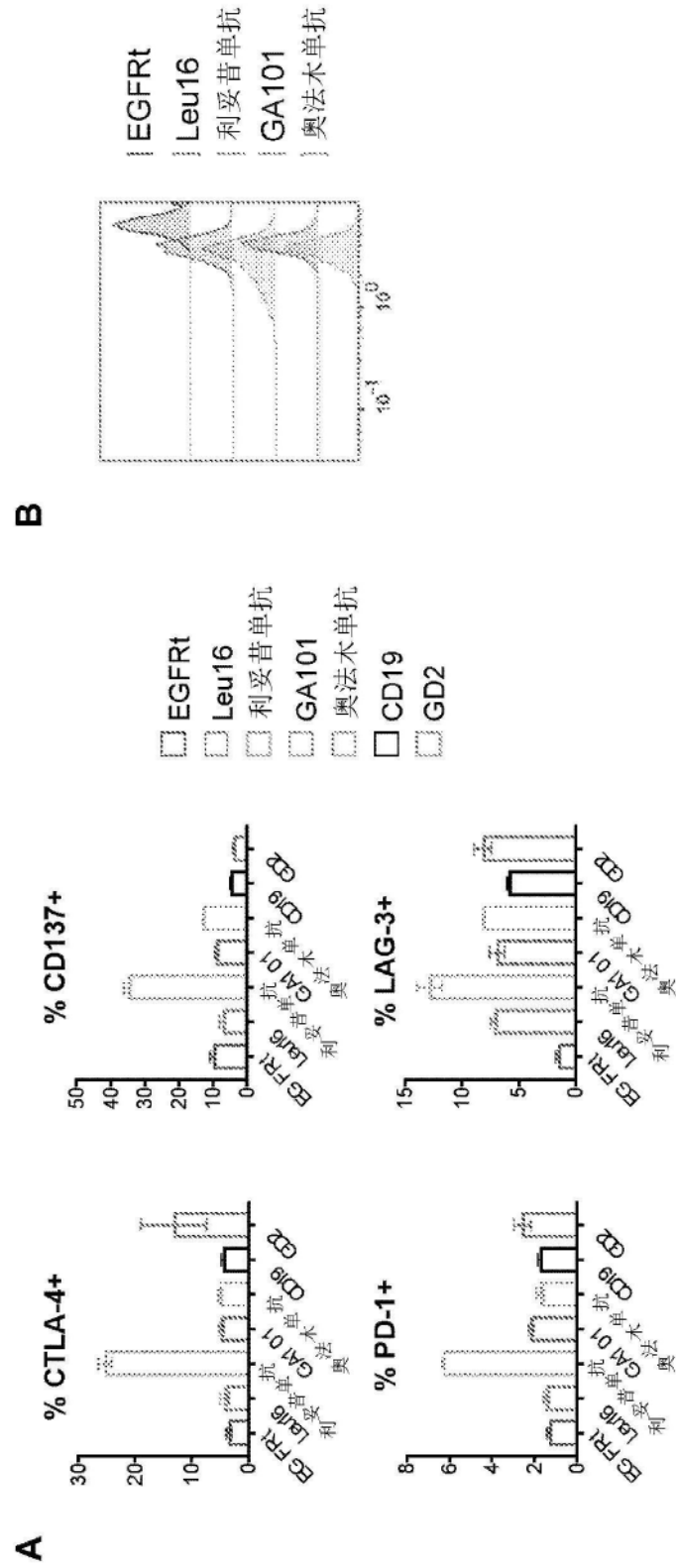


图2A-B

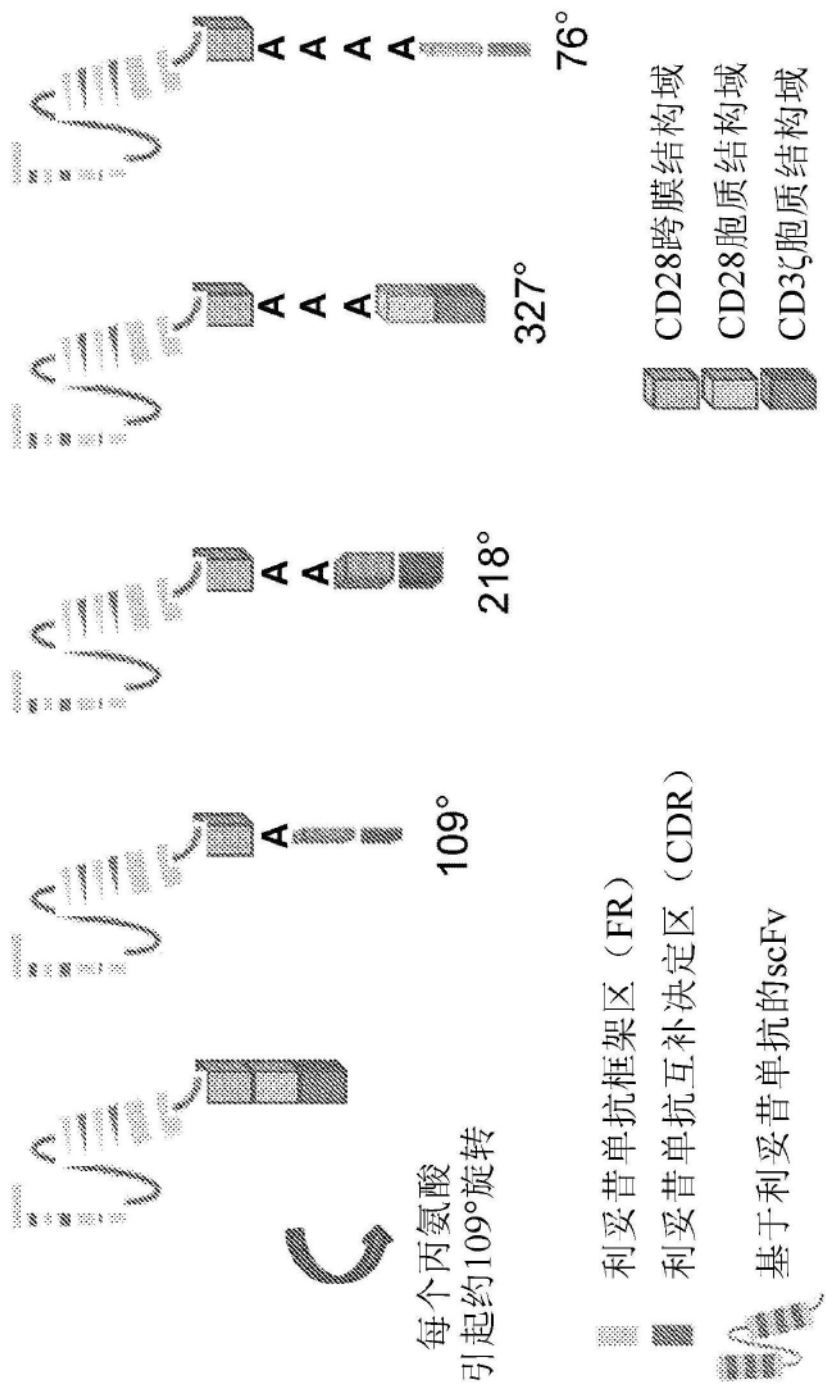


图3

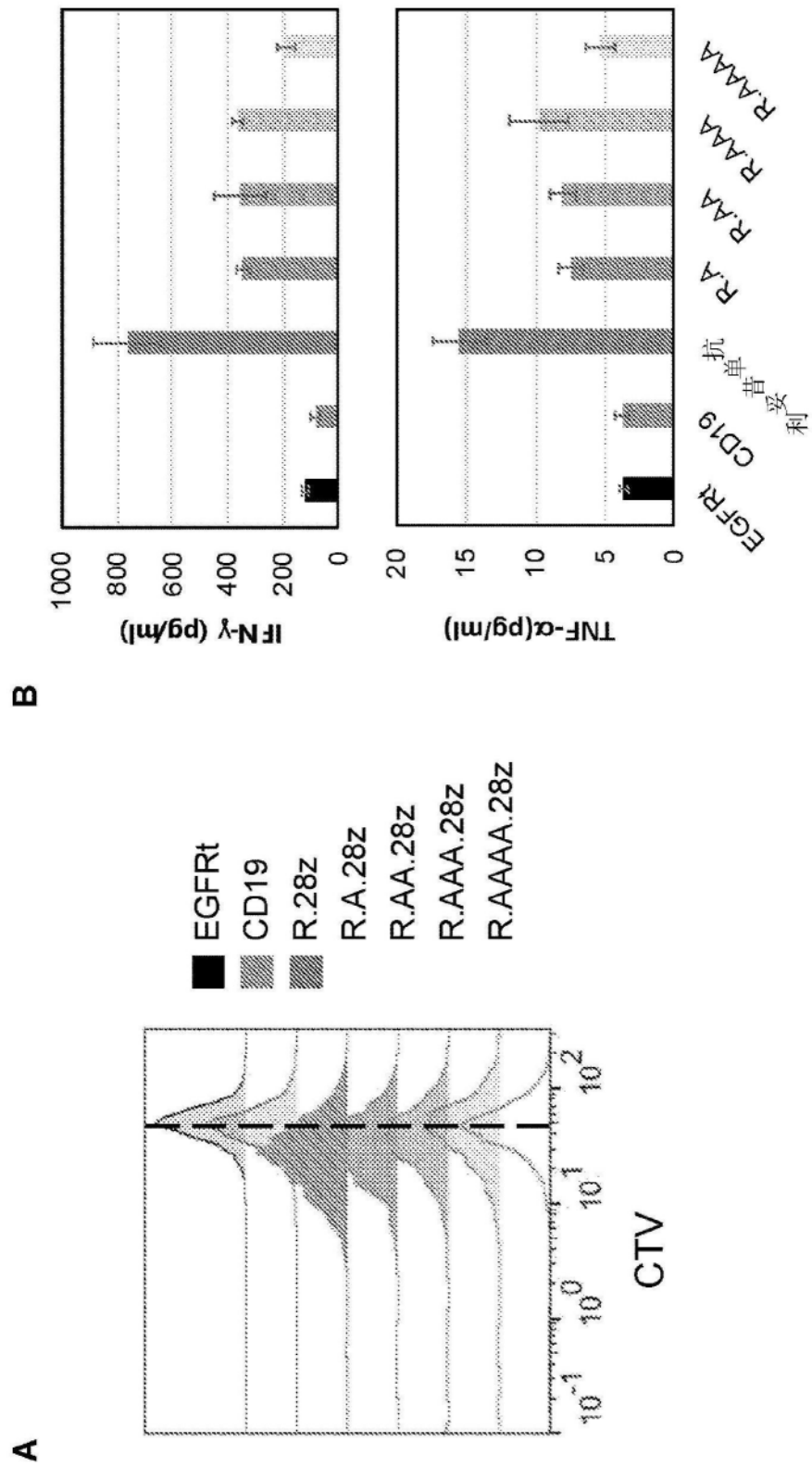


图4A-B

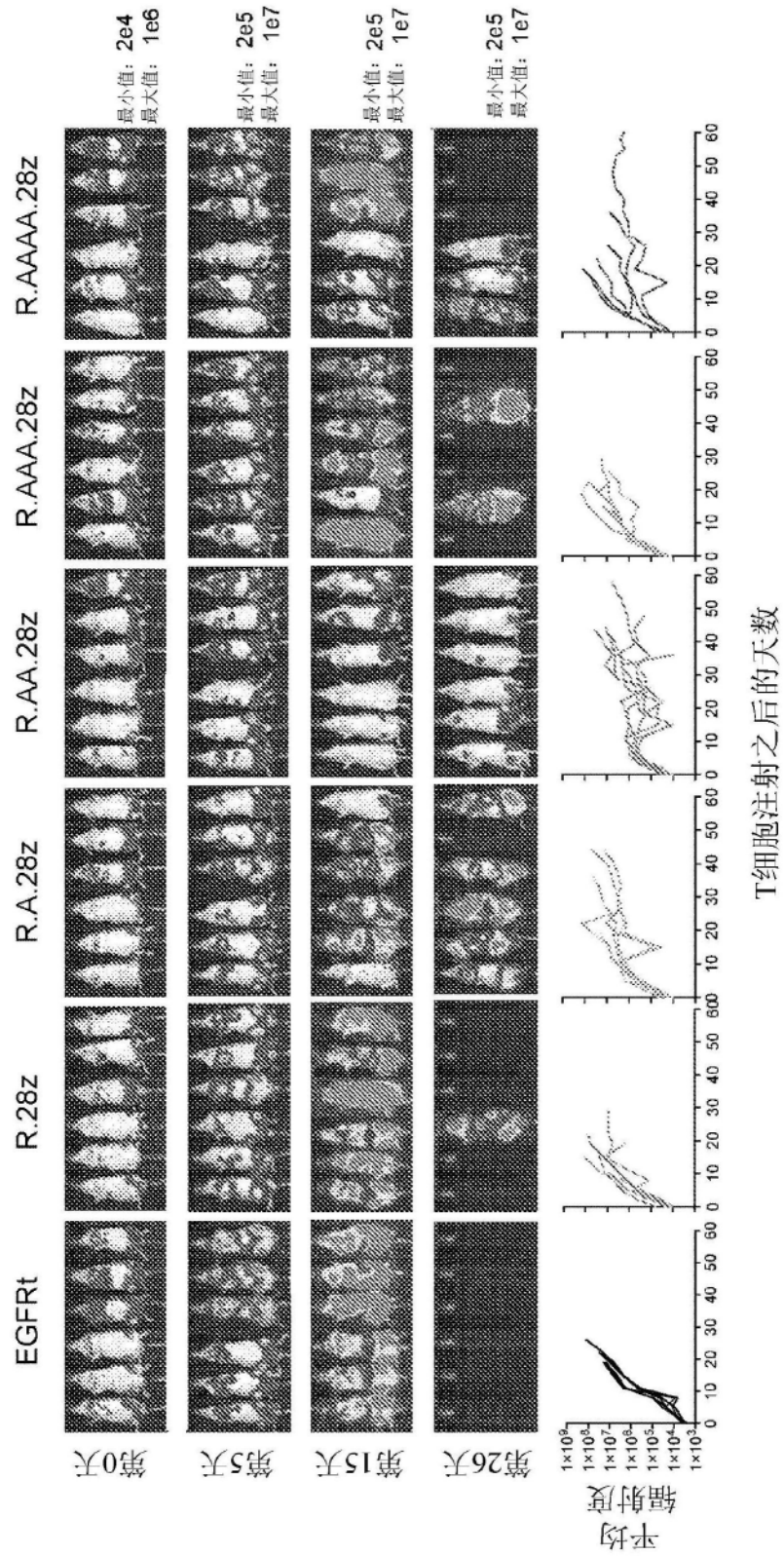


图5

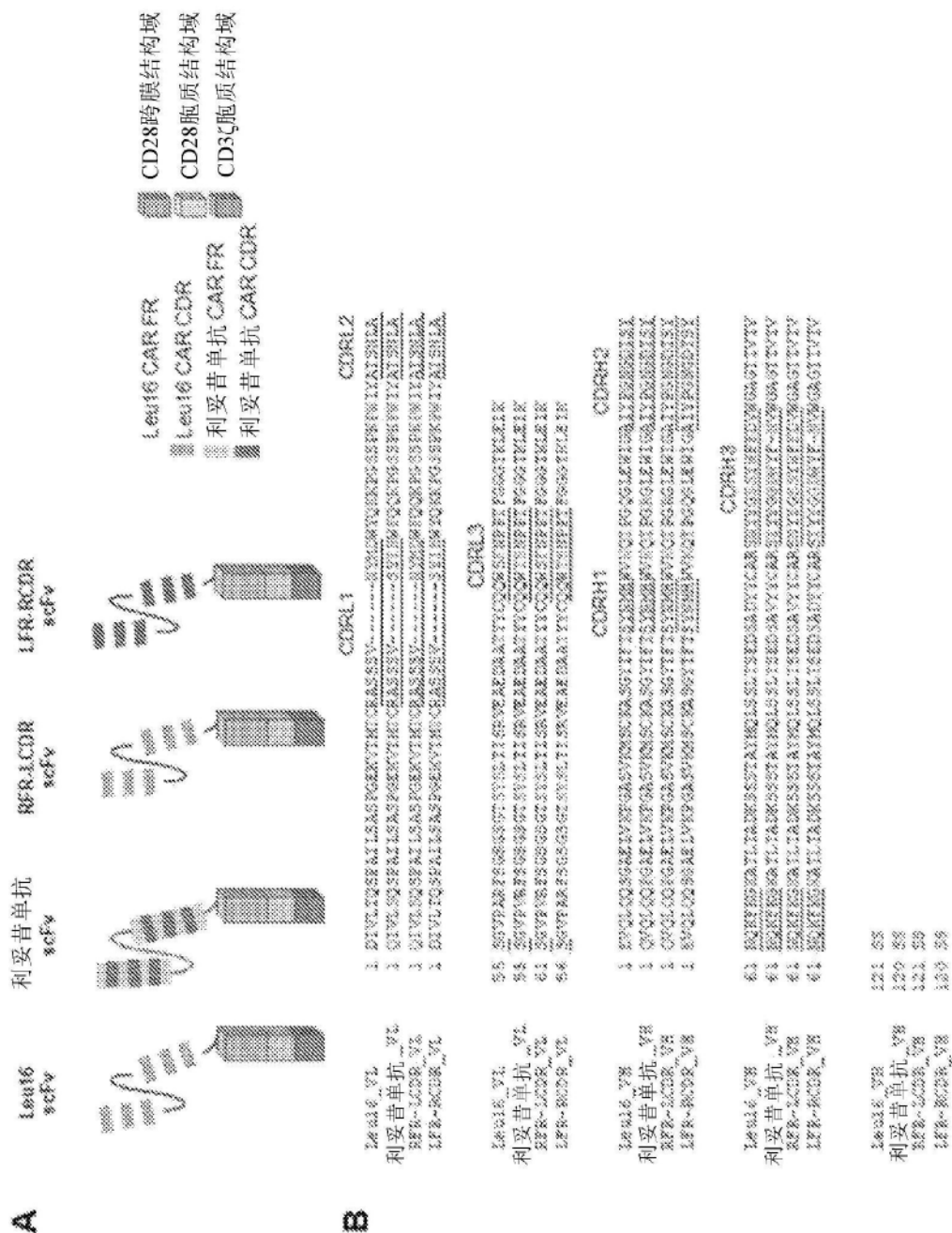


图6A-B

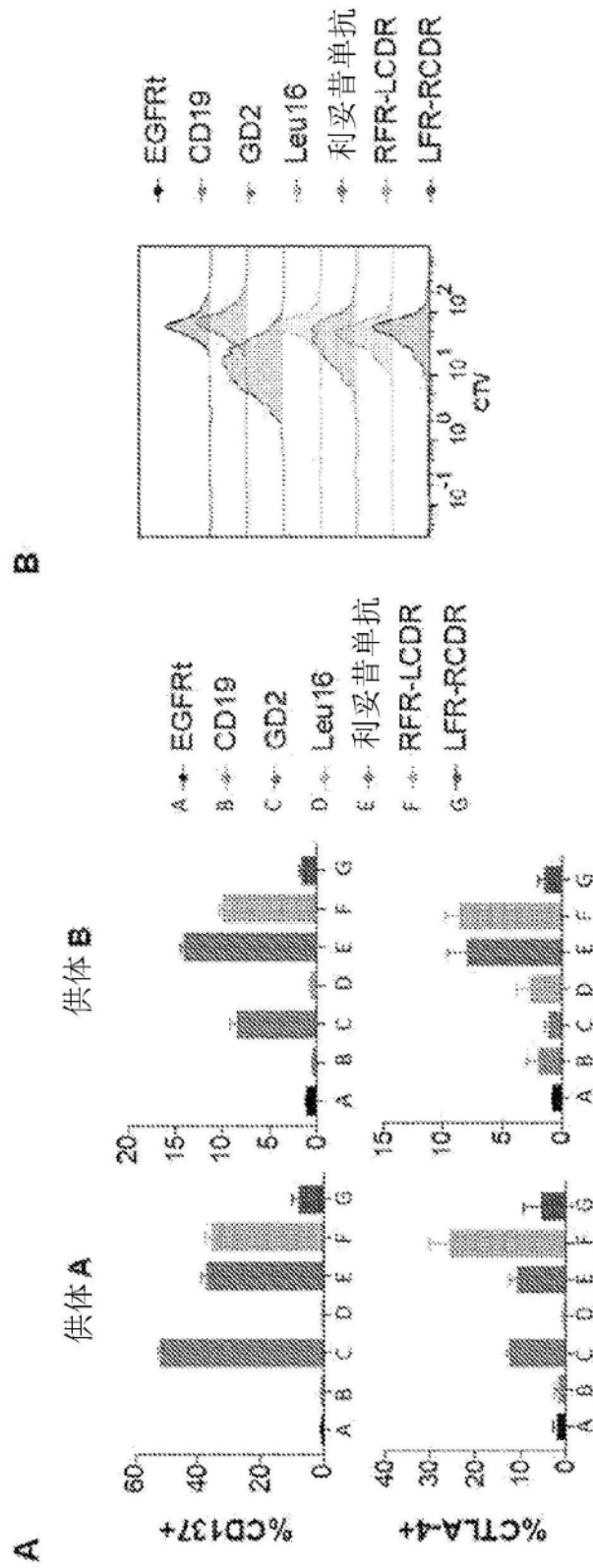


图7A-B

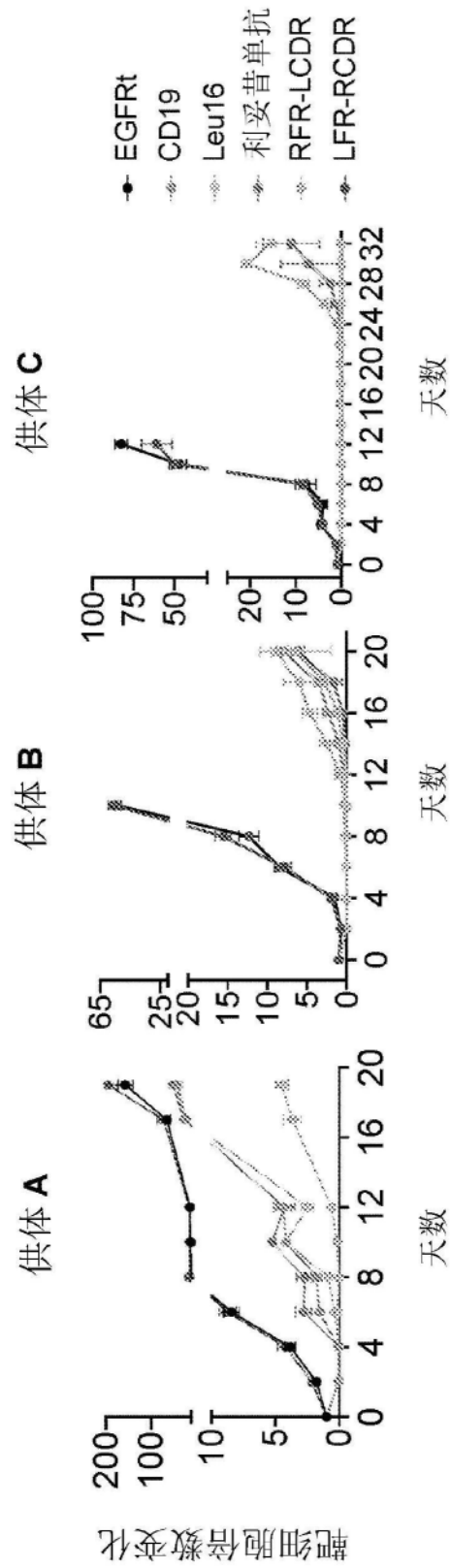


图8

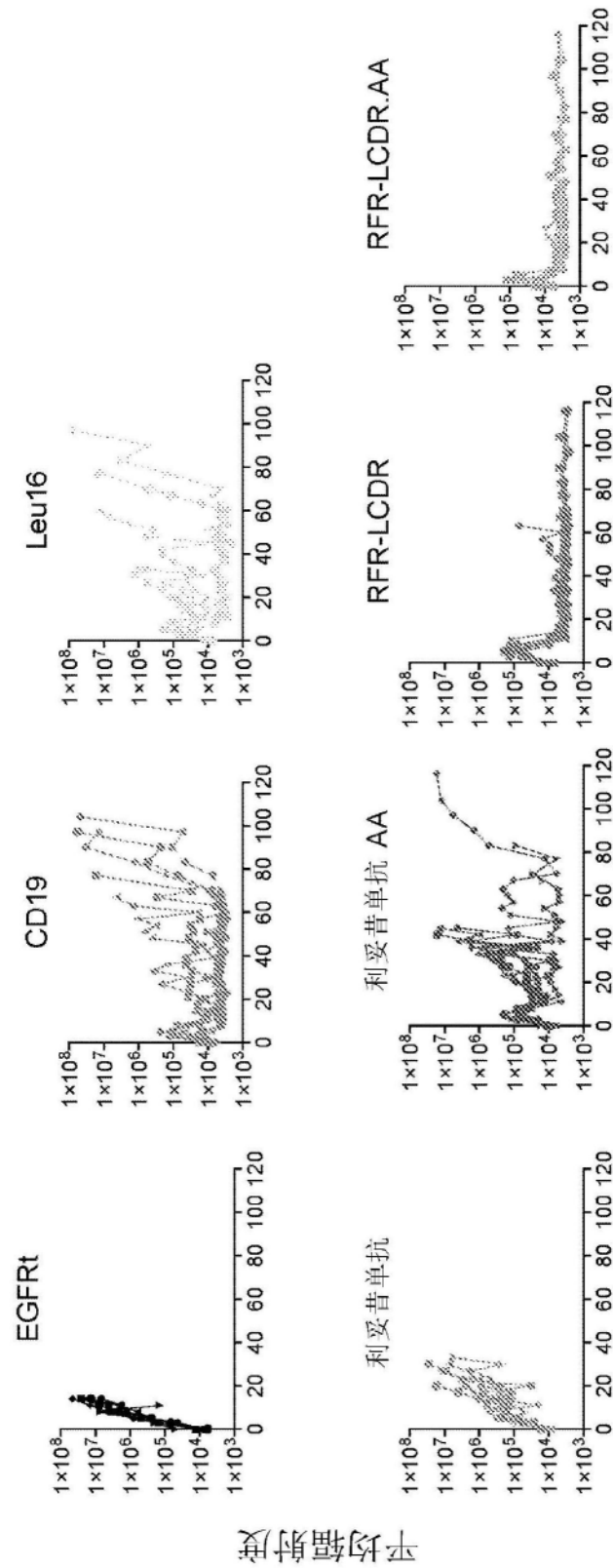


图9A

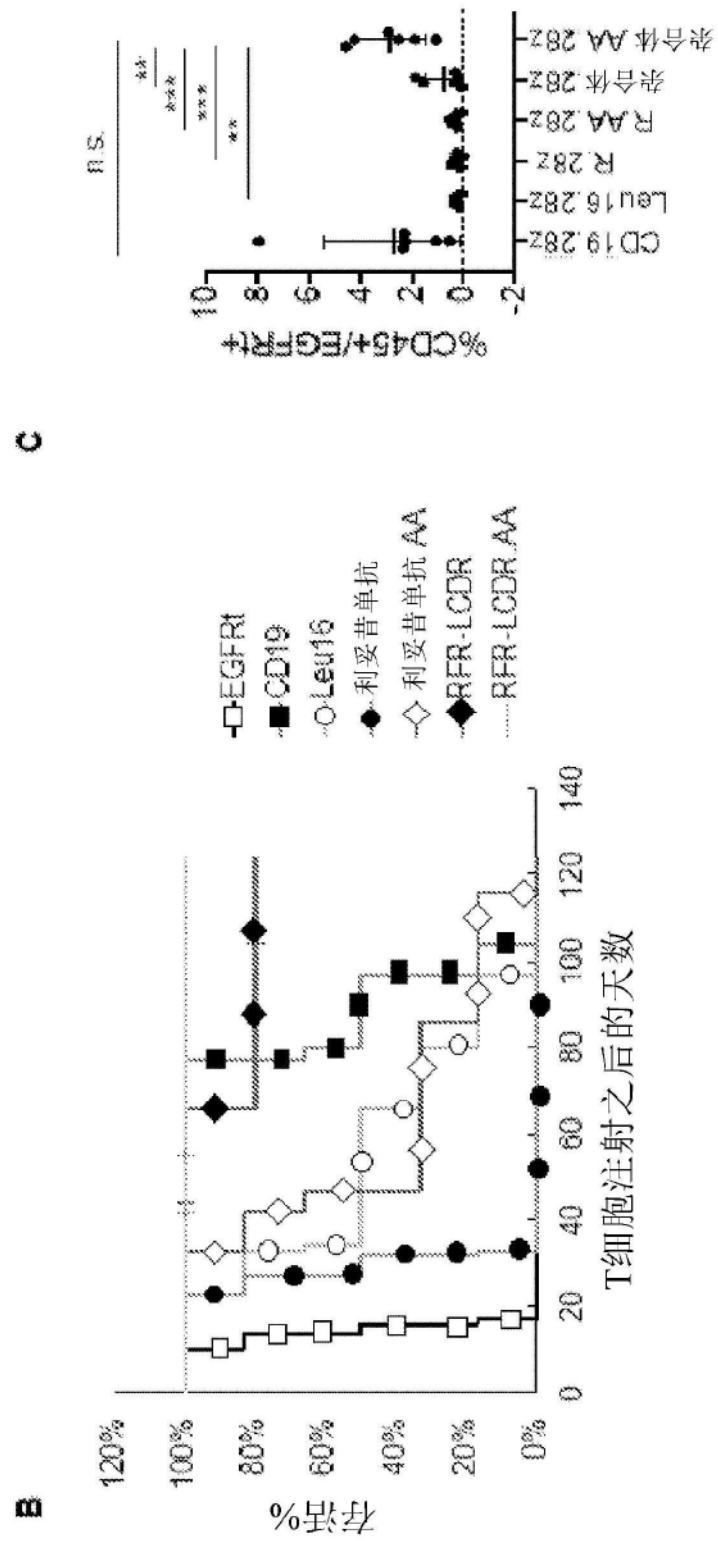


图9B-C

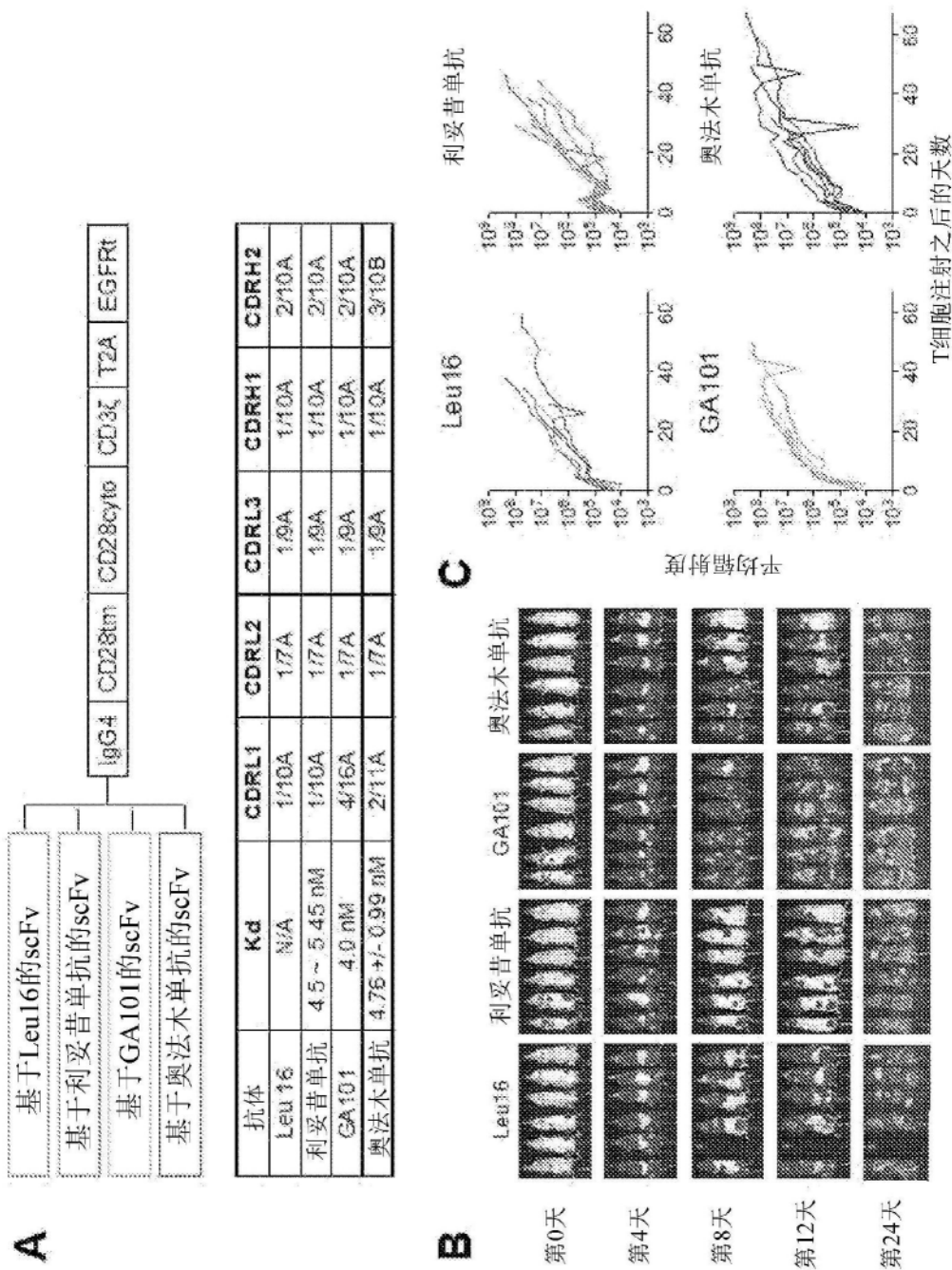


图10A-C

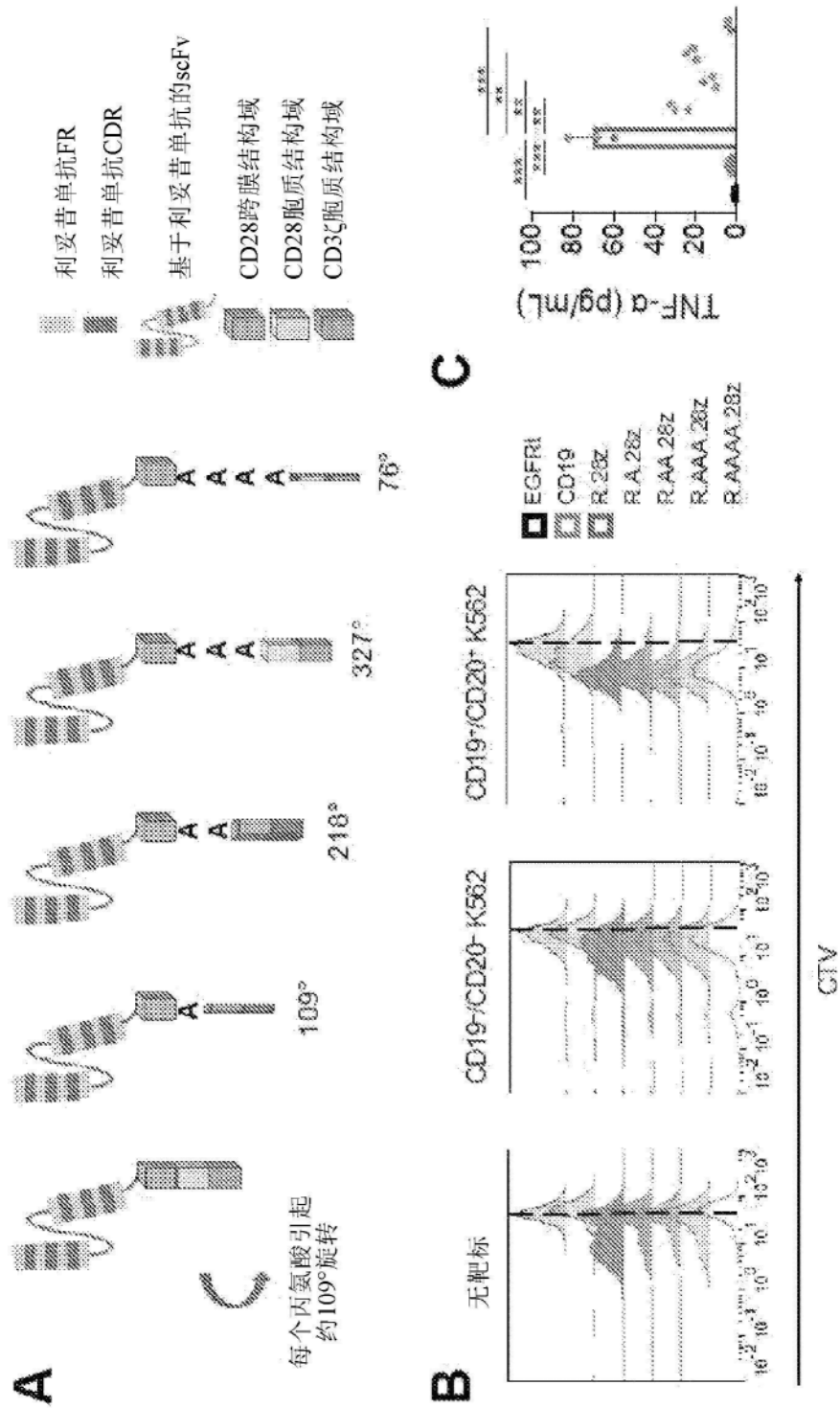


图11A-C

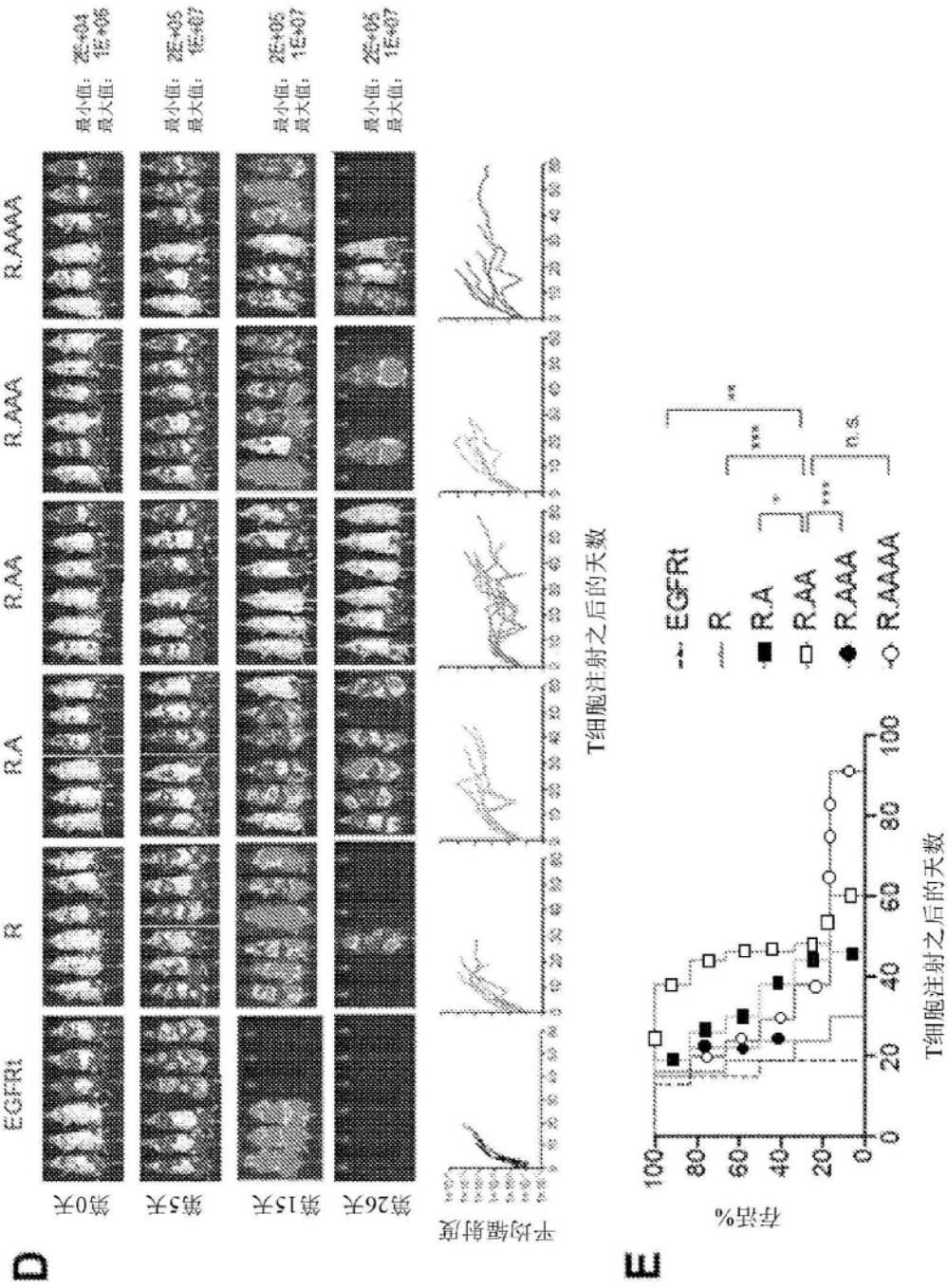


图11D-E

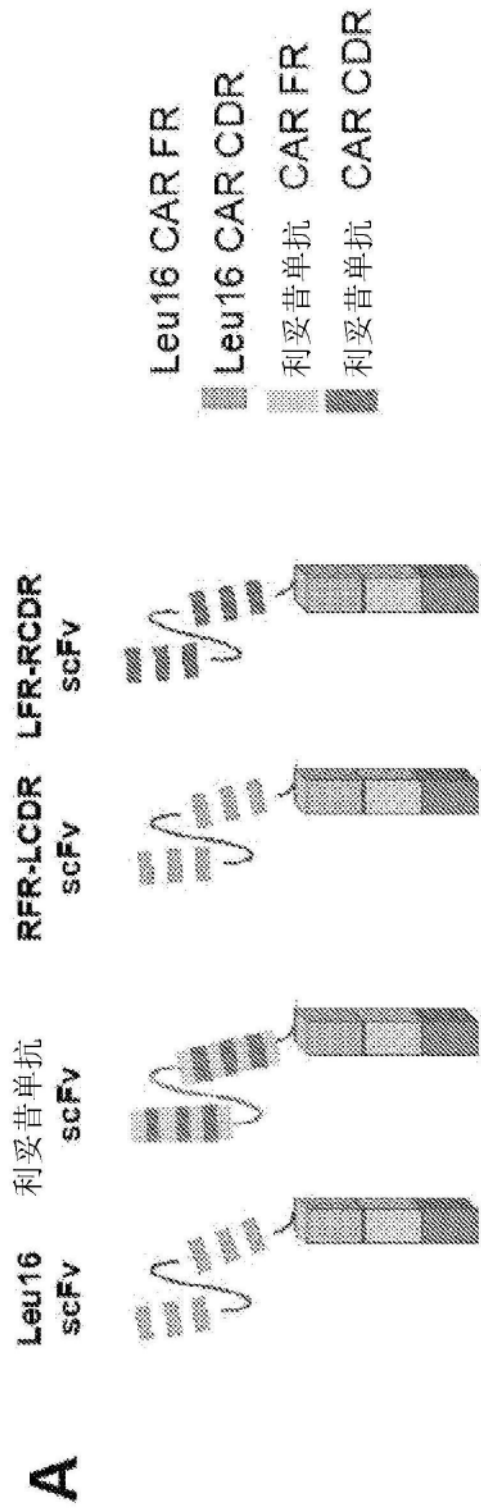


图12A

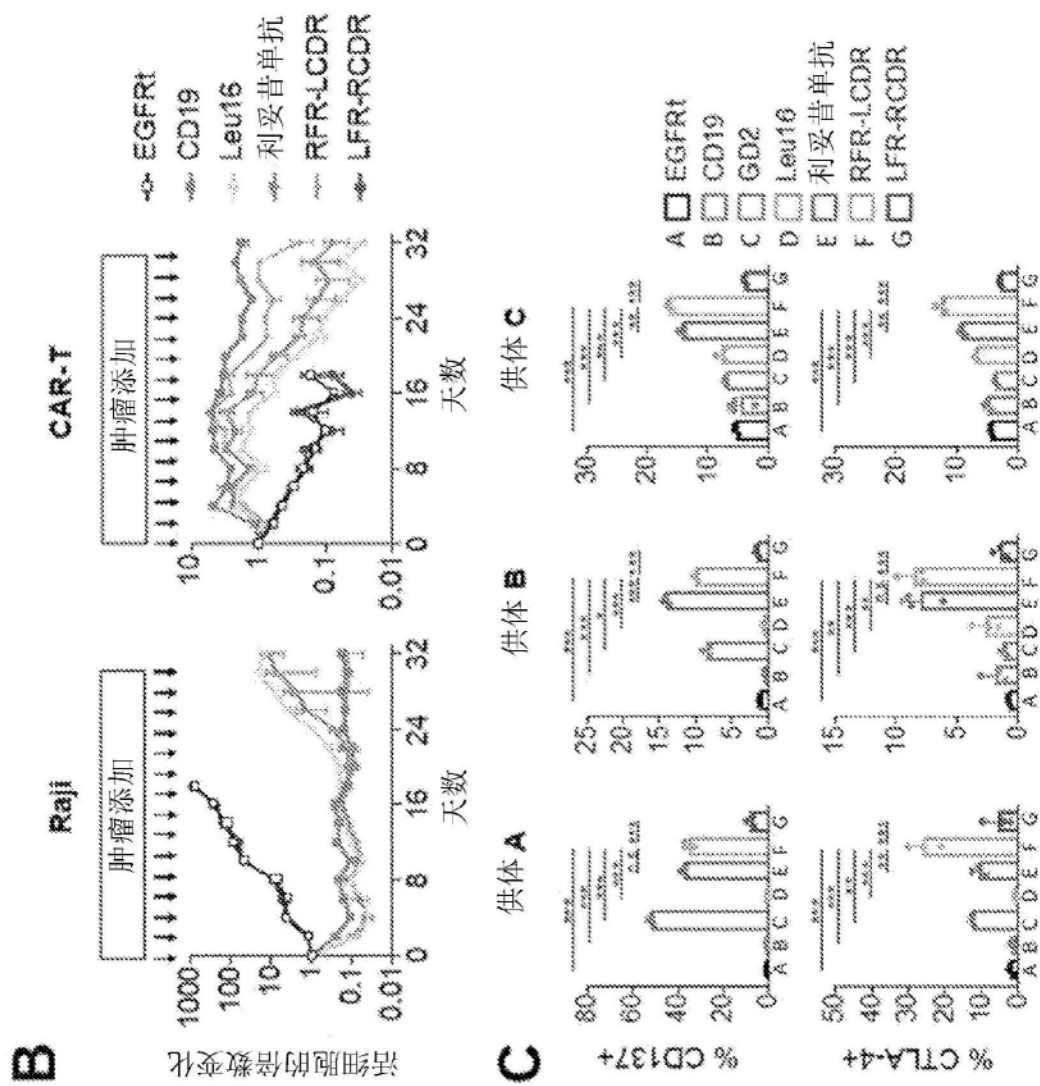


图12B-C

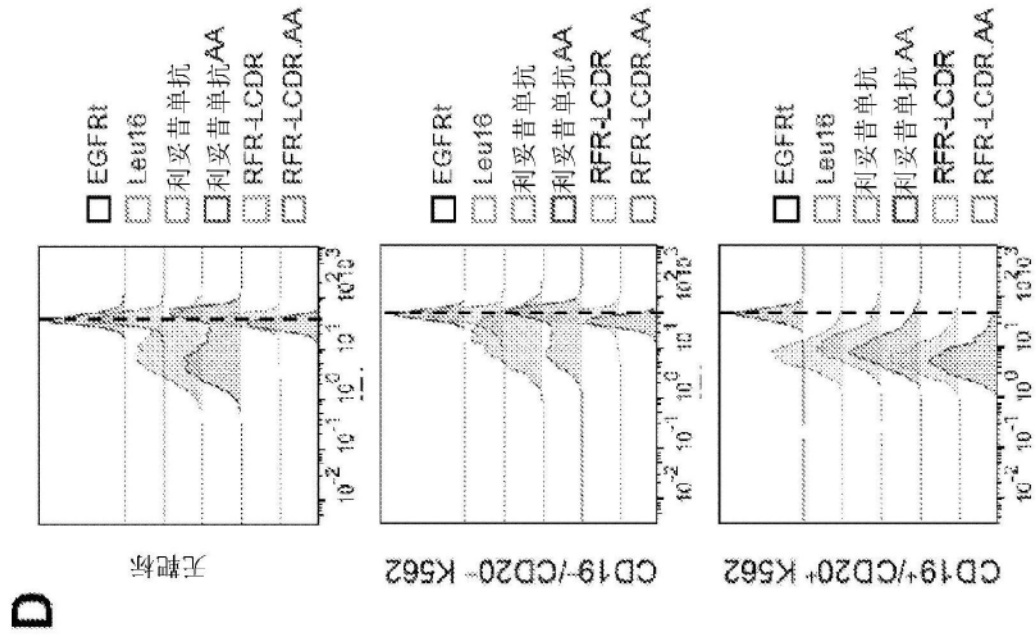


图12D

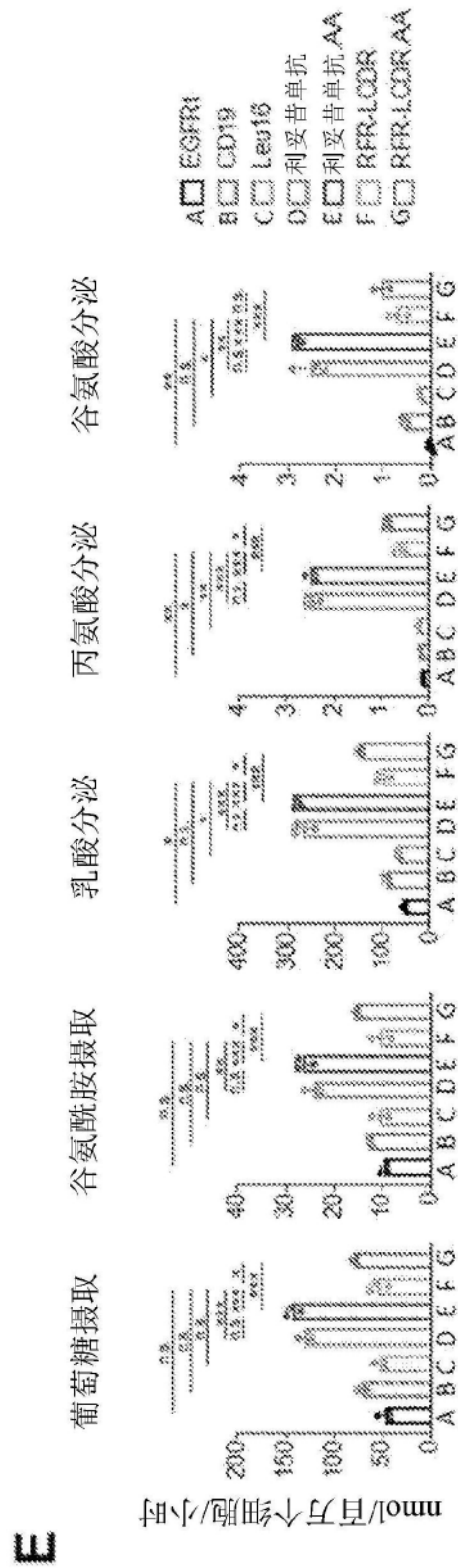


图12E

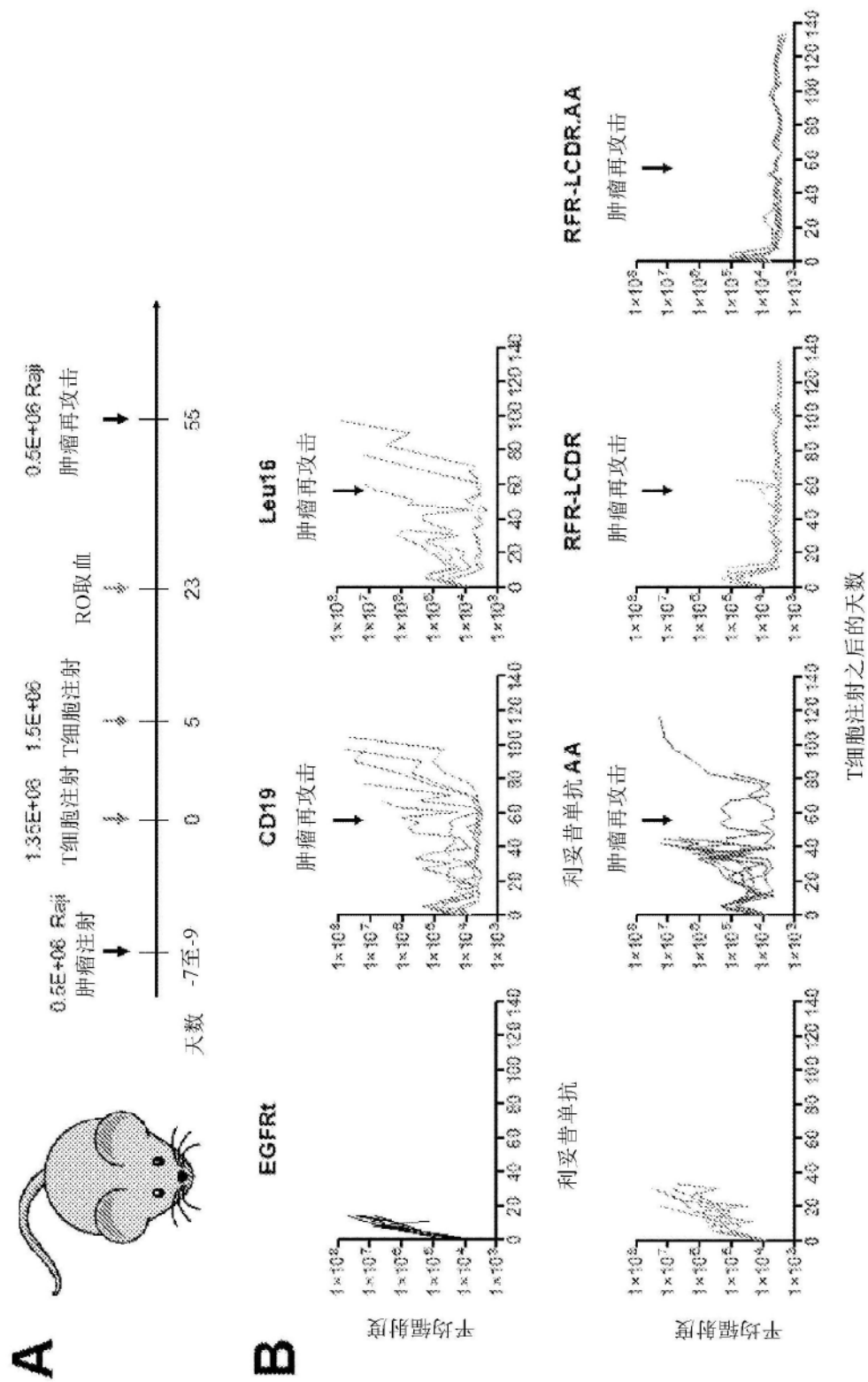


图13A-B

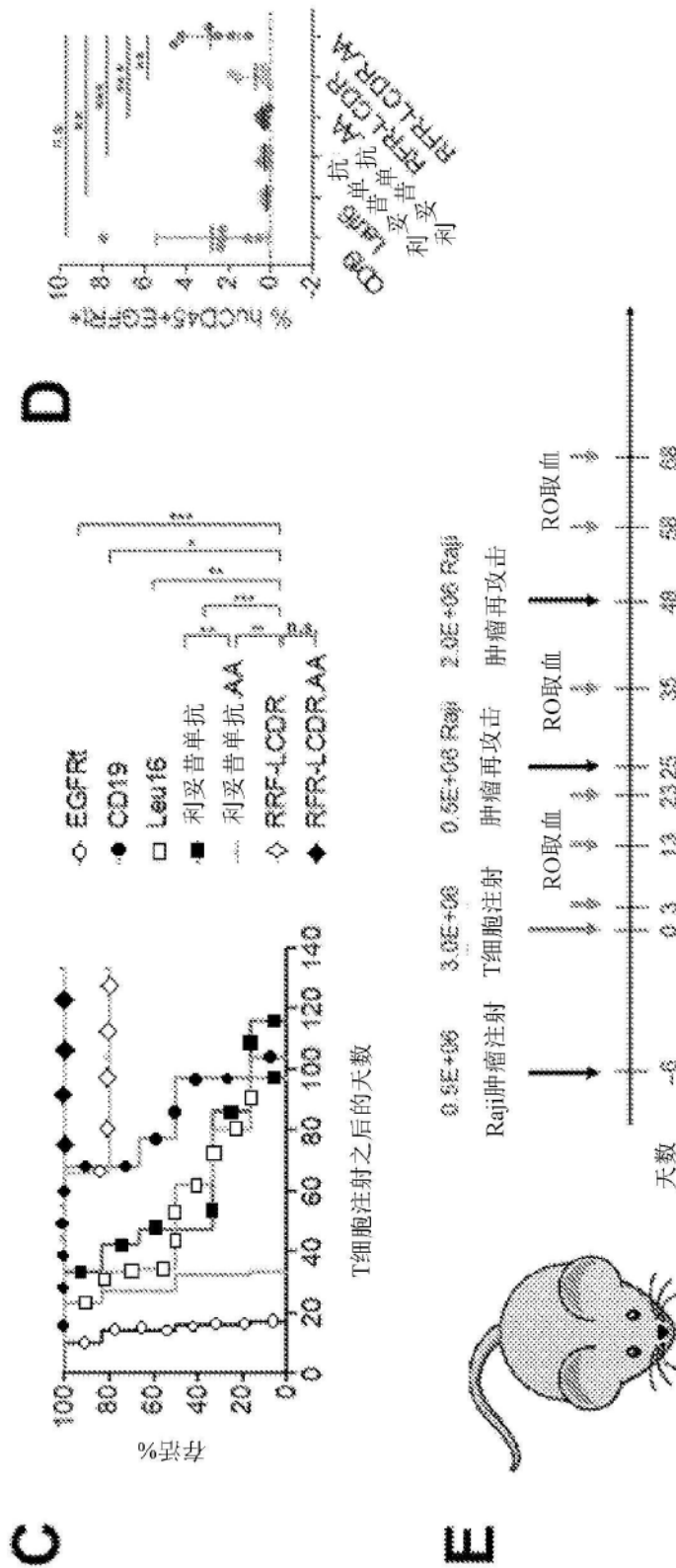


图13C-E

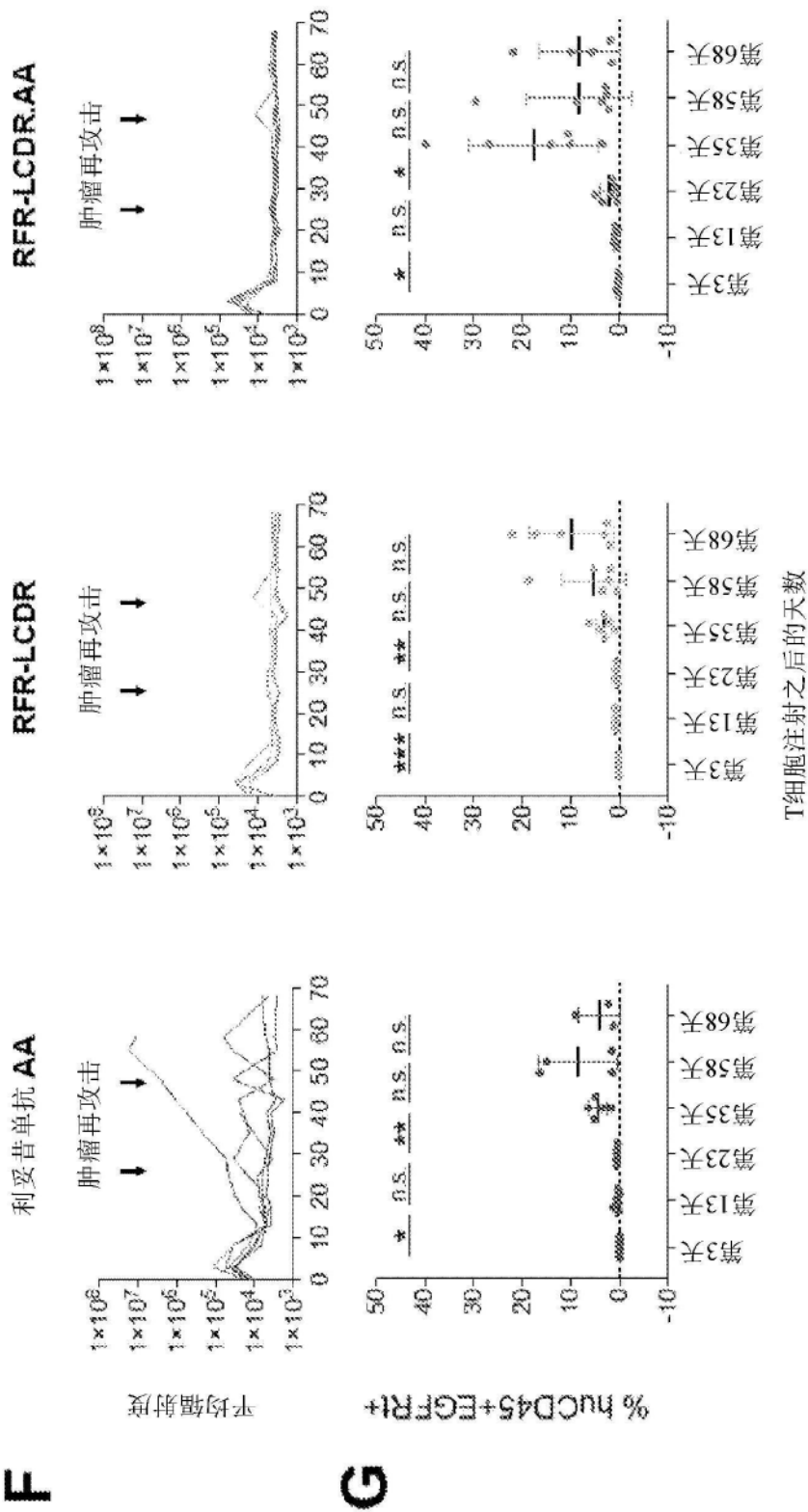


图13F-G

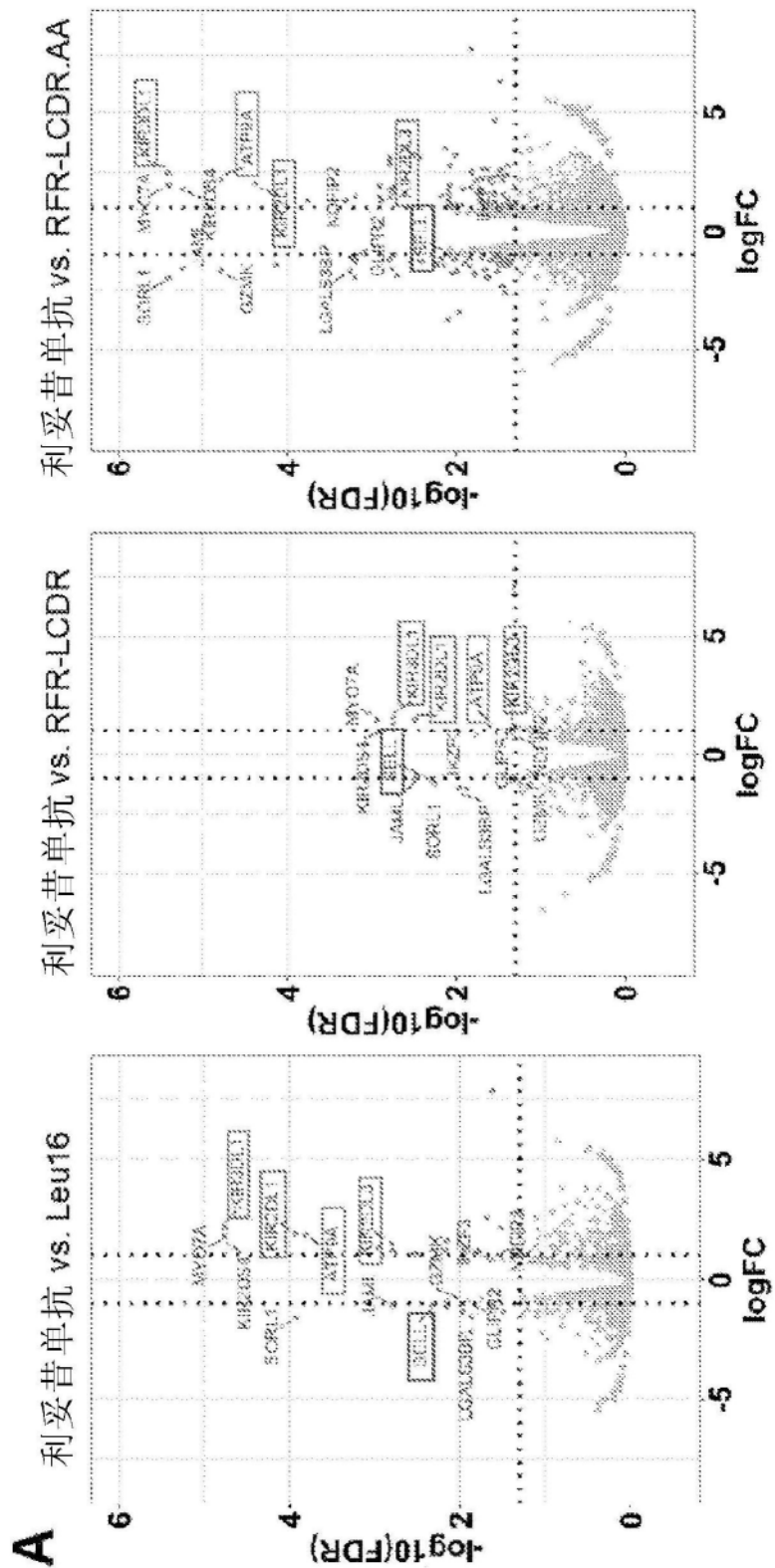


图14A

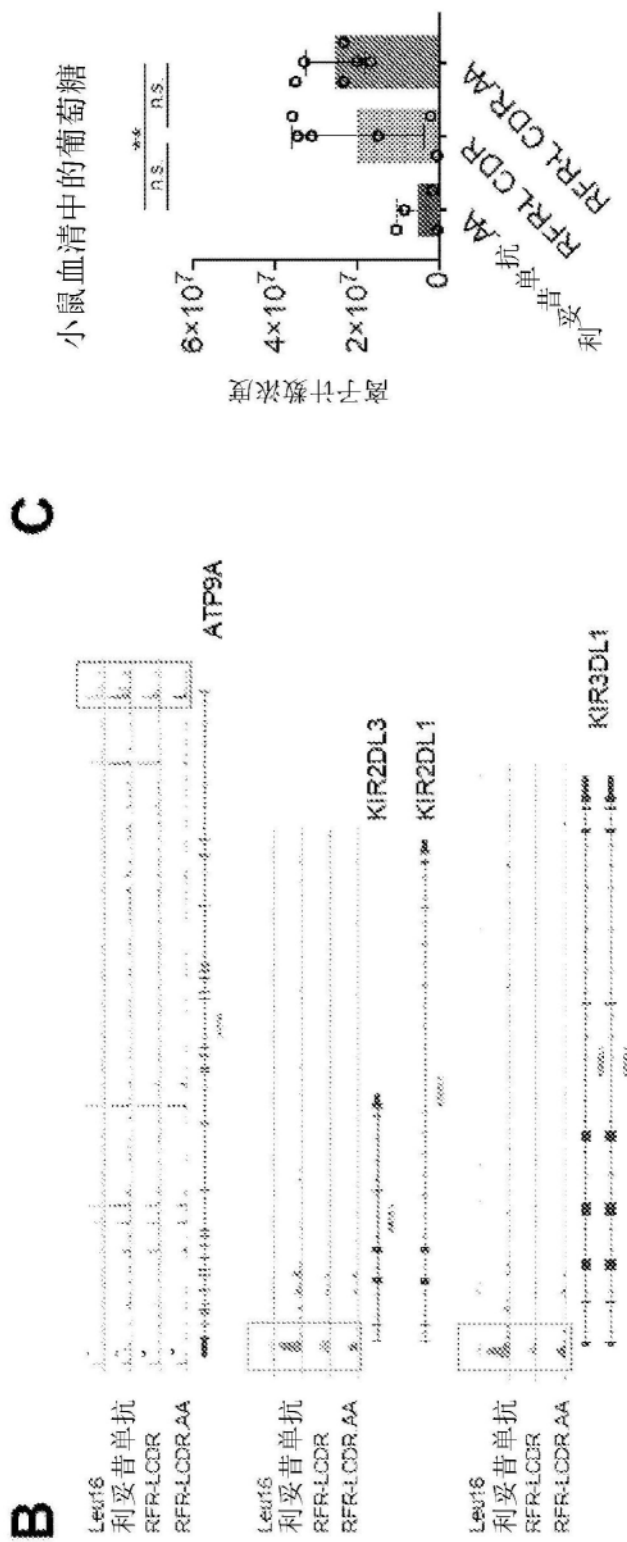


图14B-C

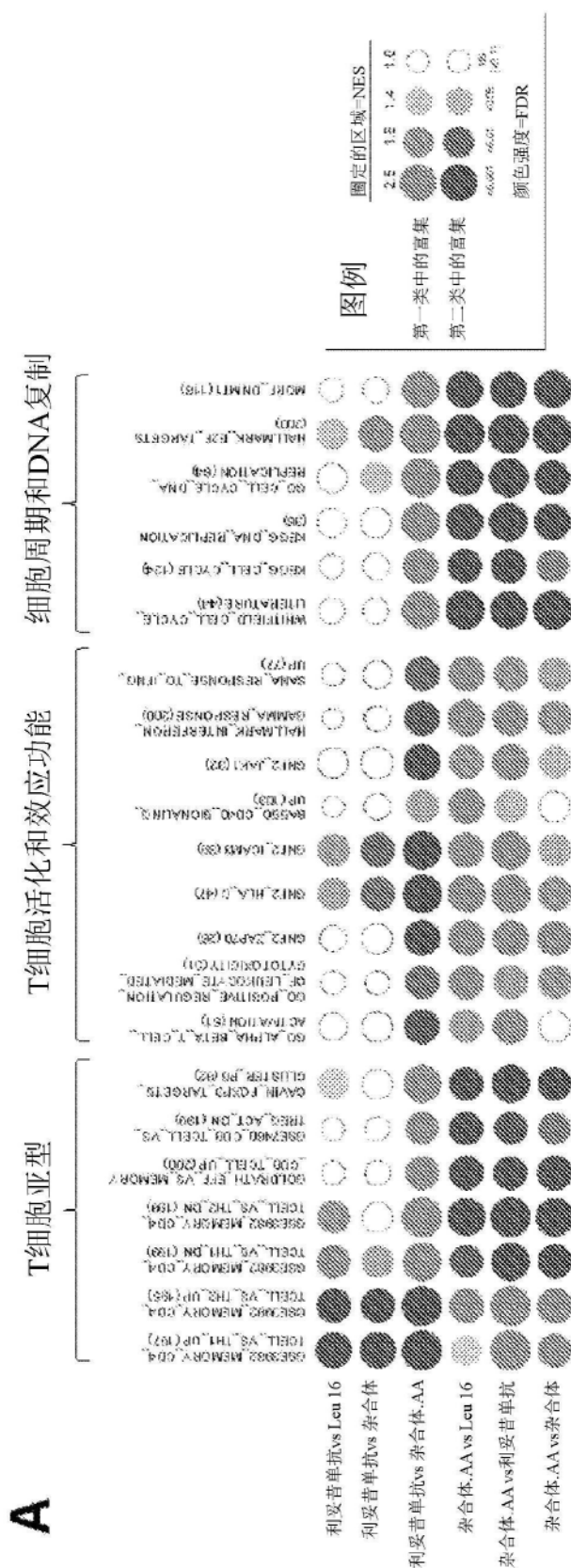
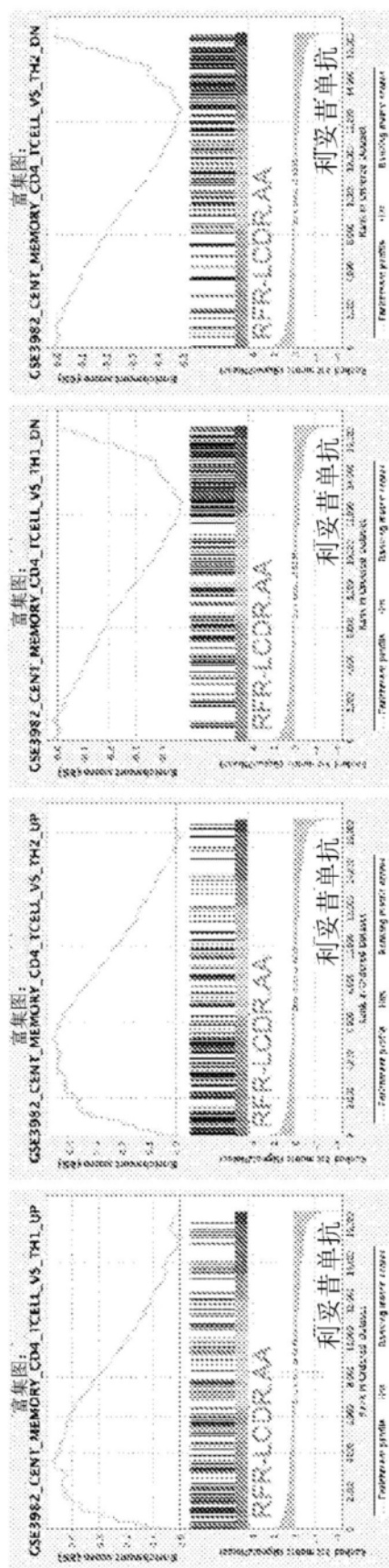


图15A

B



C

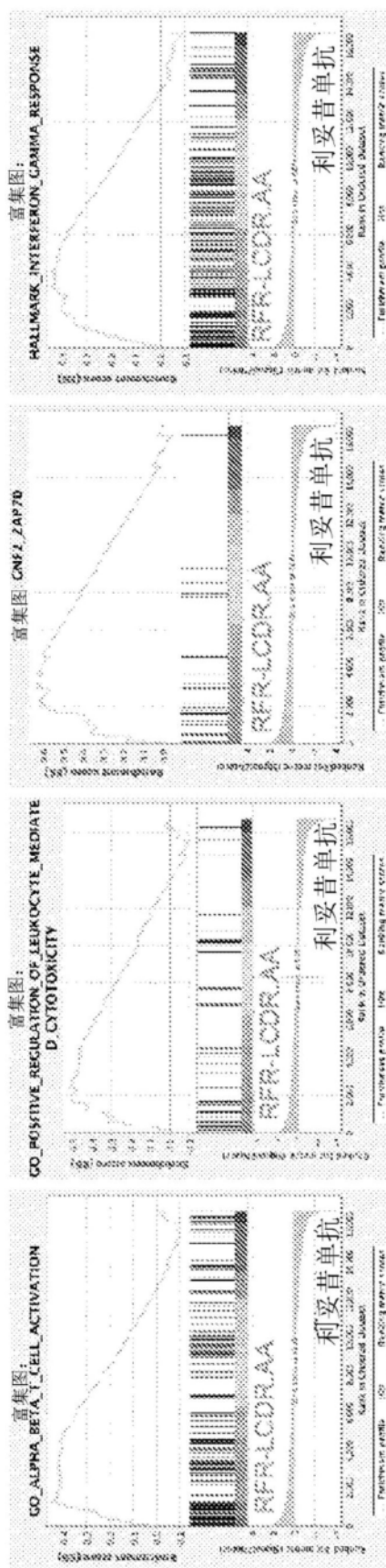


图15B-C

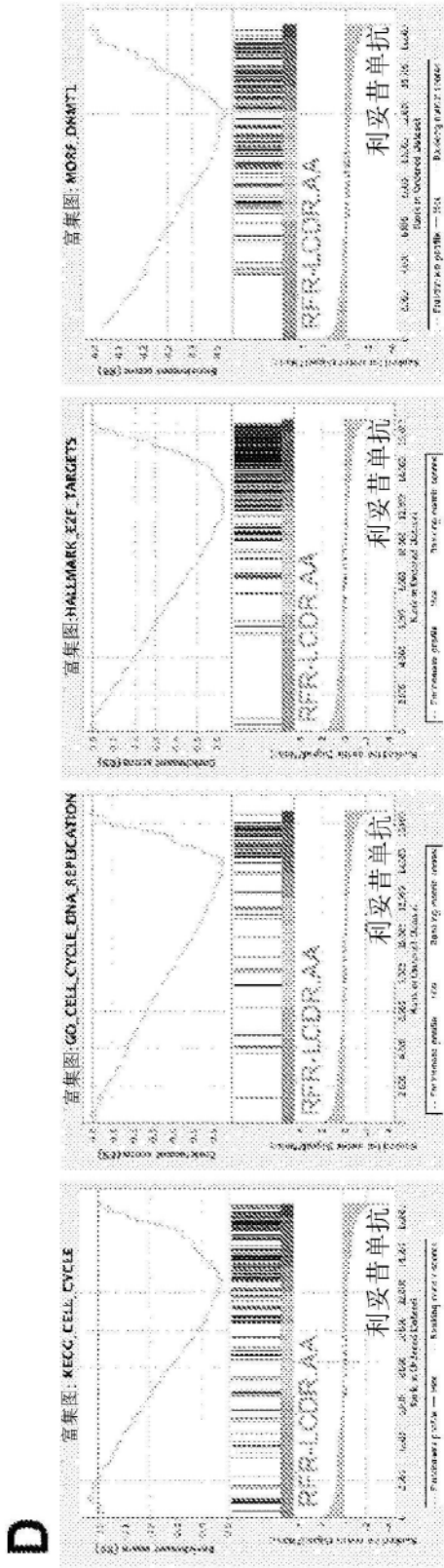


图15D

A

	CDRL1	CDRL2
Leu16_VL	1 DIVLTQSPAILSPGEEKVTMCRASSSV-----HYMNYCKPGSSPKHWIYATSNLA	
利妥昔单抗_VL	1 QIVLSQSPAILSPGEEKVTMCRASSSV-----SYHNQCKPGSSPKHWIYATSNLA	
GA101_VL	1 DIVMTQSPAILSPGEEKVTMCRASSSV-----SYHNQCKPGSSPKHWIYATSNLA	
奥法木单抗_VL	1 KIVLTQSPAILSPGEEKVTMCRASSSV-----SYHNQCKPGSSPKHWIYATSNLA	
Leu16_VL	55 SGVPAREFGSGSGT SYGLTISRVEAEDAA TYVQQWSNPTFGGKLEIK	
利妥昔单抗_VL	55 EGVPRFSGSGSGT SYGLTISRVEAEDAA TYVQQWSNPTFGGKLEIK	
GA101_VL	61 SGVPAREFGSGSGT SYGLTISRVEAEDAA TYVQQWSNPTFGGKLEIK	
奥法木单抗_VL	56 TGIPAREFGSGSGT SYGLTISRVEAEDAA TYVQQWSNPTFGGKLEIK	
Leu16_VH	1 EVQLQSGAEIVPKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHV KQTPGQGLEWIGAIYFGNGDSY	CDRH2
利妥昔单抗_VH	1 QVQLQSGAEIVPKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHV KQTPGQGLEWIGAIYFGNGDSY	
GA101_VH	1 QVQLVQSGAEIVPKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHV KQTPGQGLEWIGAIYFGNGDSY	
奥法木单抗_VH	1 EVQLVSGGKLVDPGSKSLKSCASGYTFTSYNMHV KQTPGQGLEWIGAIYFGNGDSY	
Leu16_VH	61 NCKFKGKATLTADKSSSTAINQLSSLTSEDAVYICARSTYGGHVF--HWGAGTIVV	CDRH3
利妥昔单抗_VH	61 NCKFKGKATLTADKSSSTAINQLSSLTSEDAVYICARSTYGGHVF--HWGAGTIVV	
GA101_VH	61 NCKFKGKATLTADKSTSTAINQLSSLTSEDAVYICARSTYGGHVF--HWGAGTIVV	
奥法木单抗_VH	61 NCKFKGKATLTADKSTSTAINQLSSLTSEDAVYICARSTYGGHVF--HWGAGTIVV	
Leu16_VH	121 SS	
利妥昔单抗_VH	120 SS	
GA101_VH	---	
奥法木单抗_VH	121 SS	

图16A

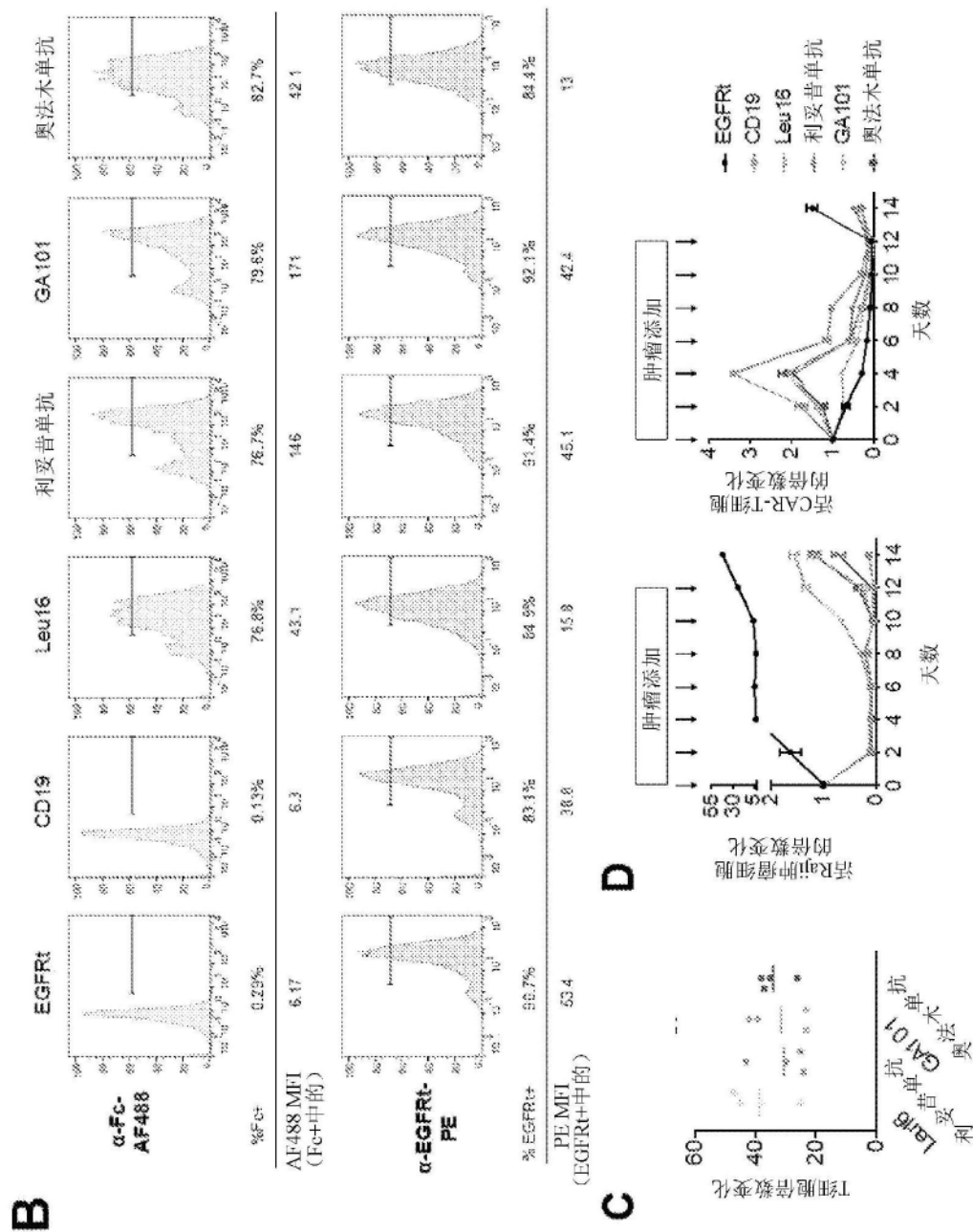


图16B-D

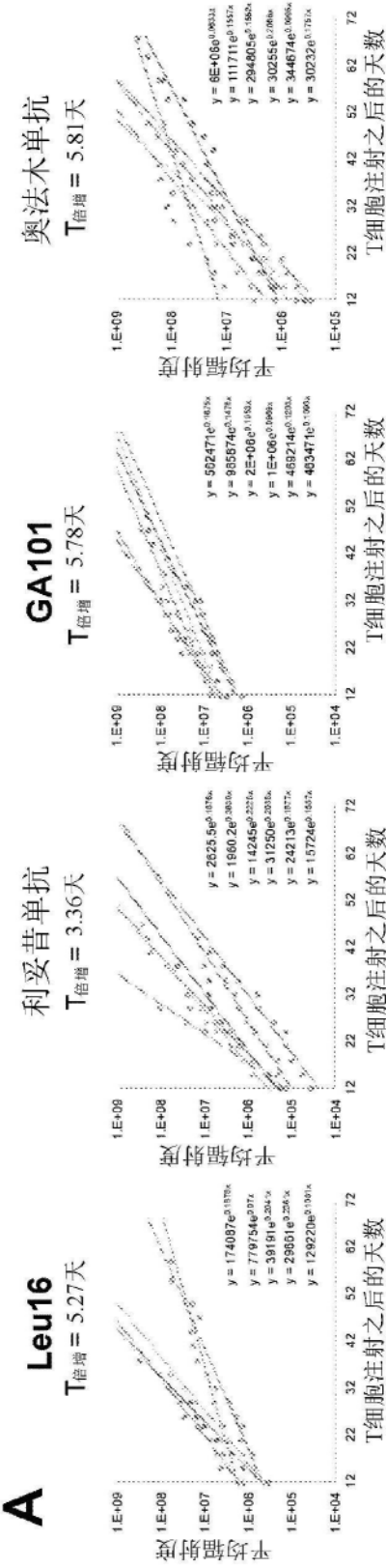


图17A

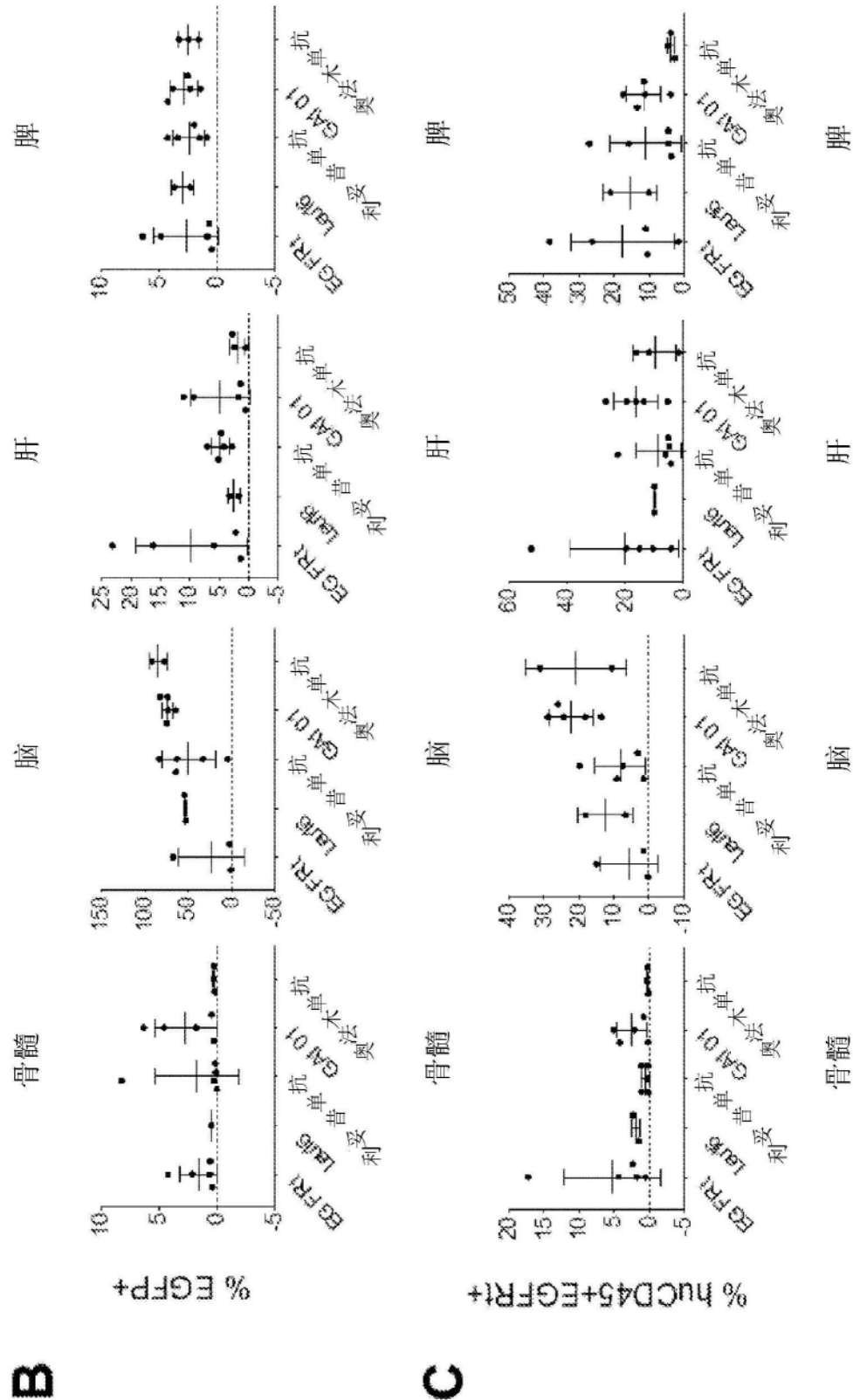


图17B-C

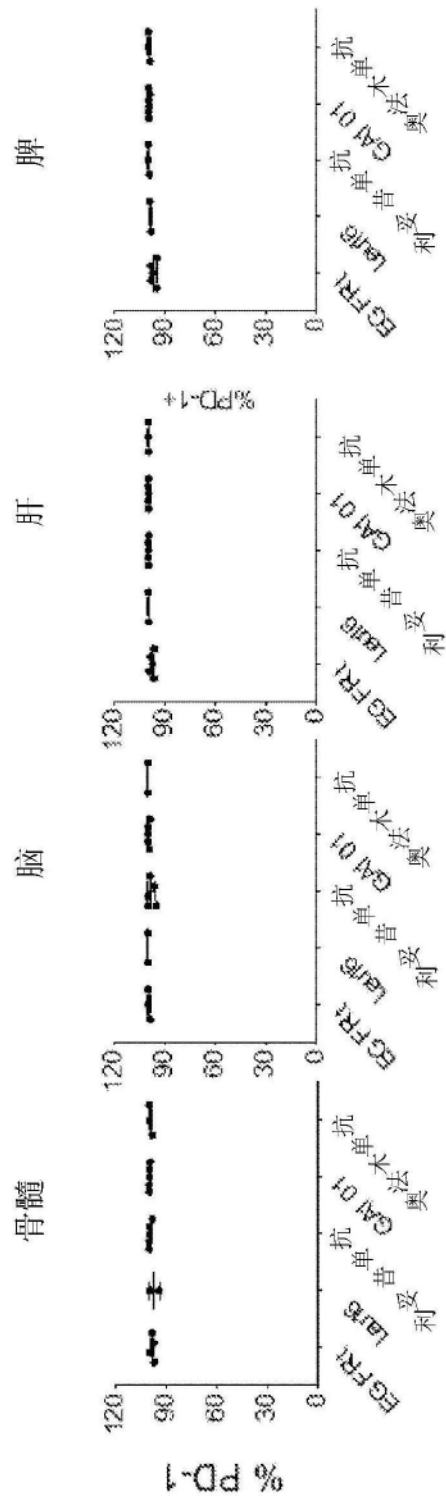
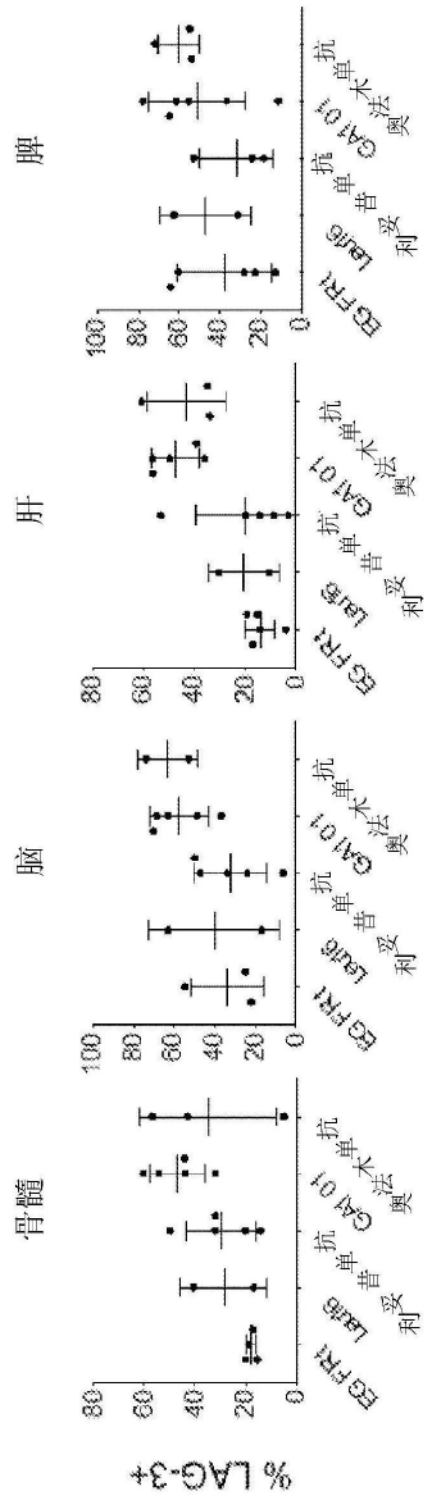
D**E**

图17D-E

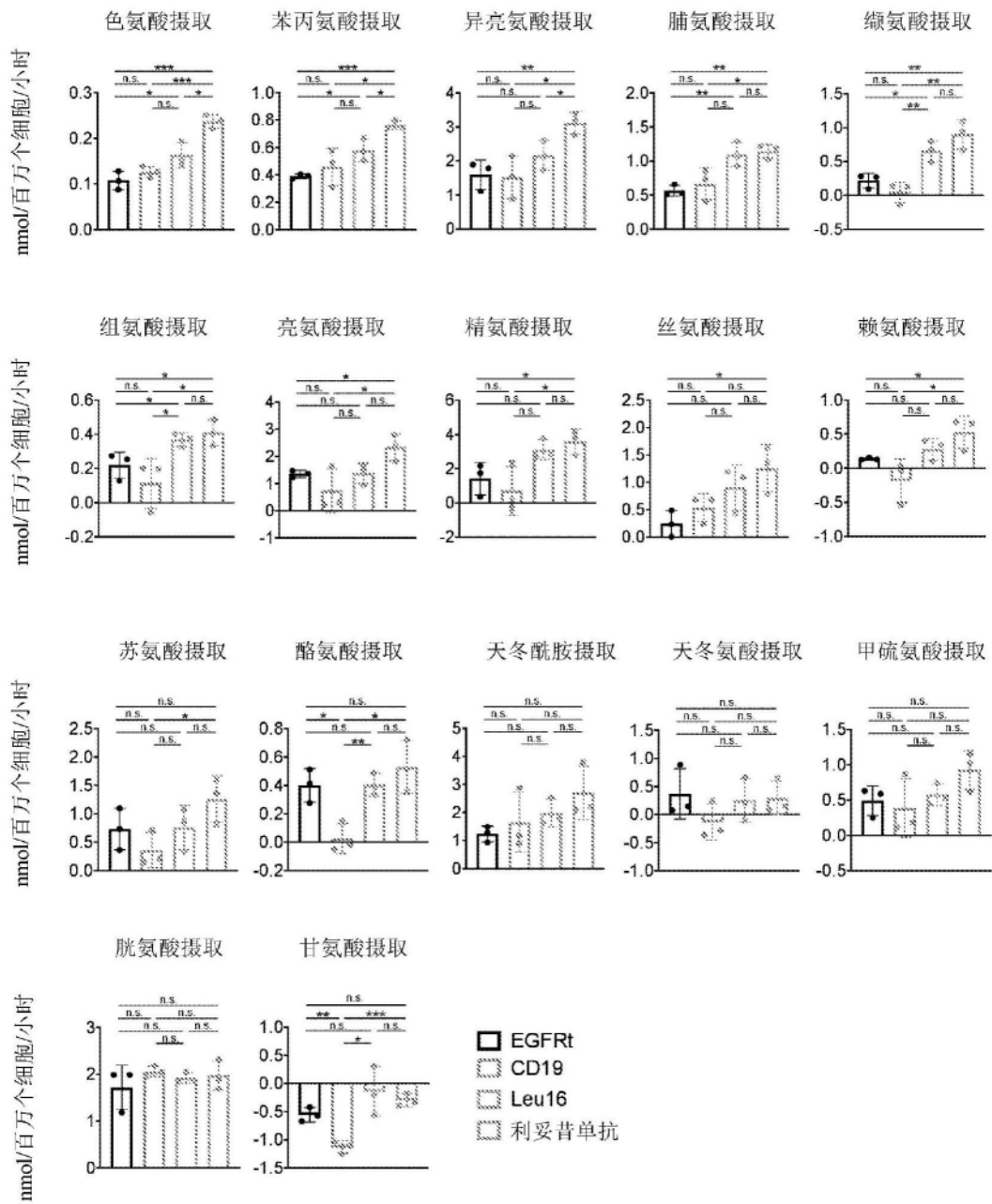


图18

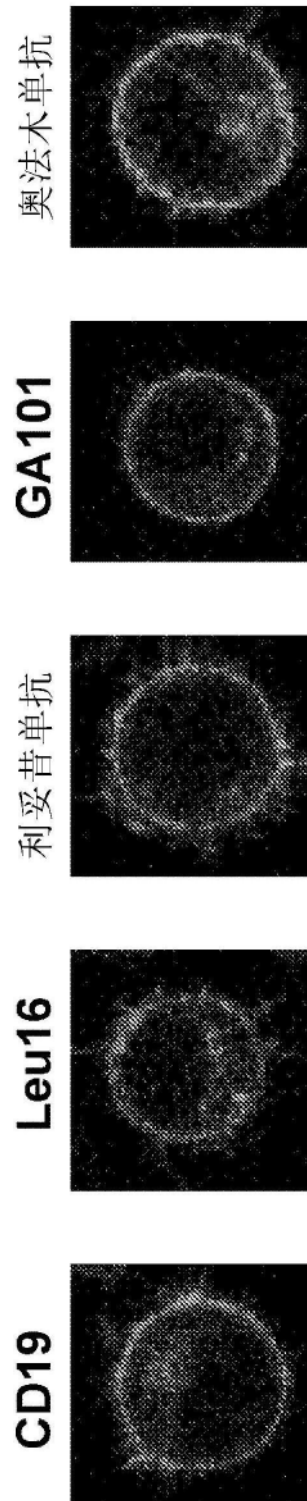


图19

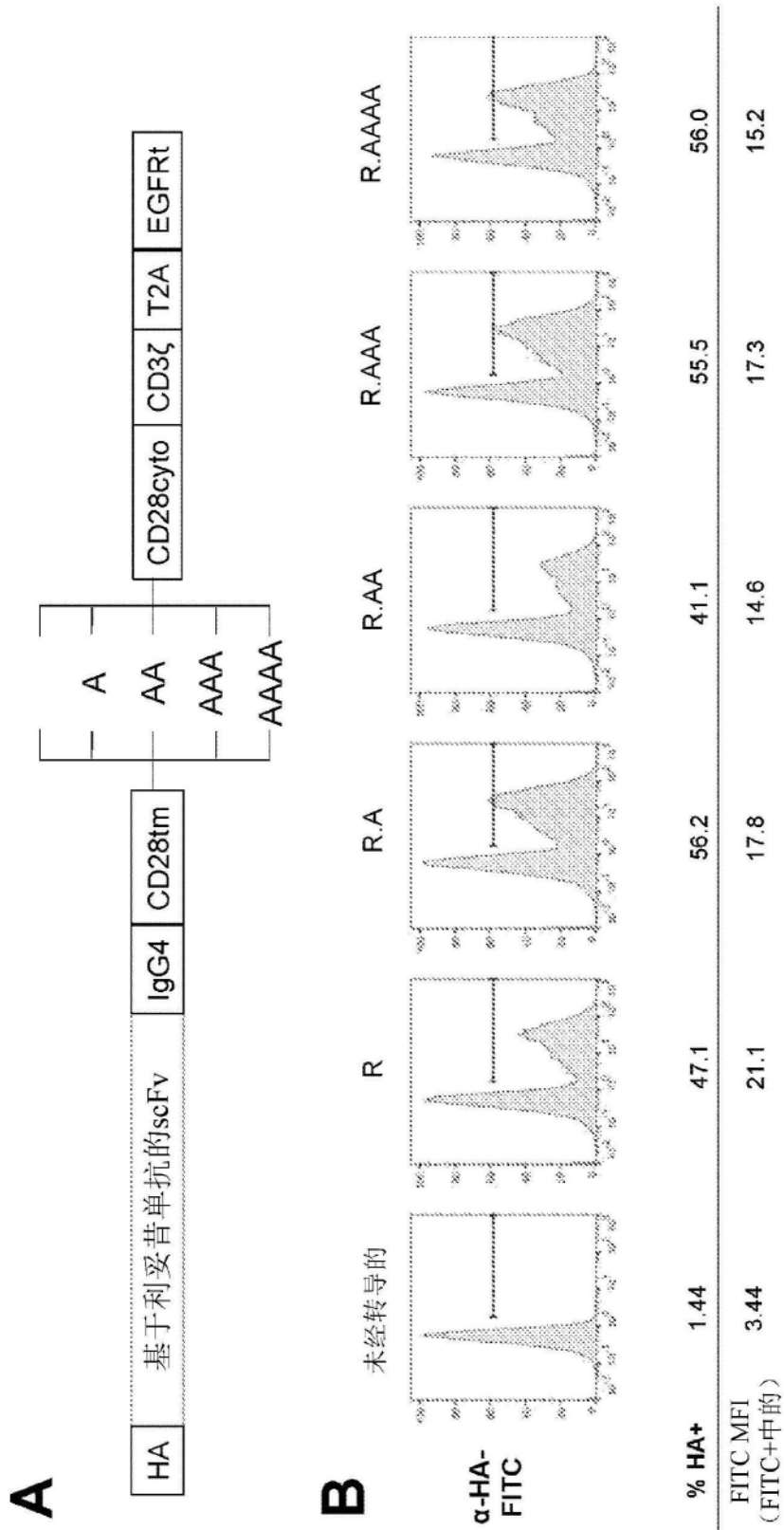


图20A-B

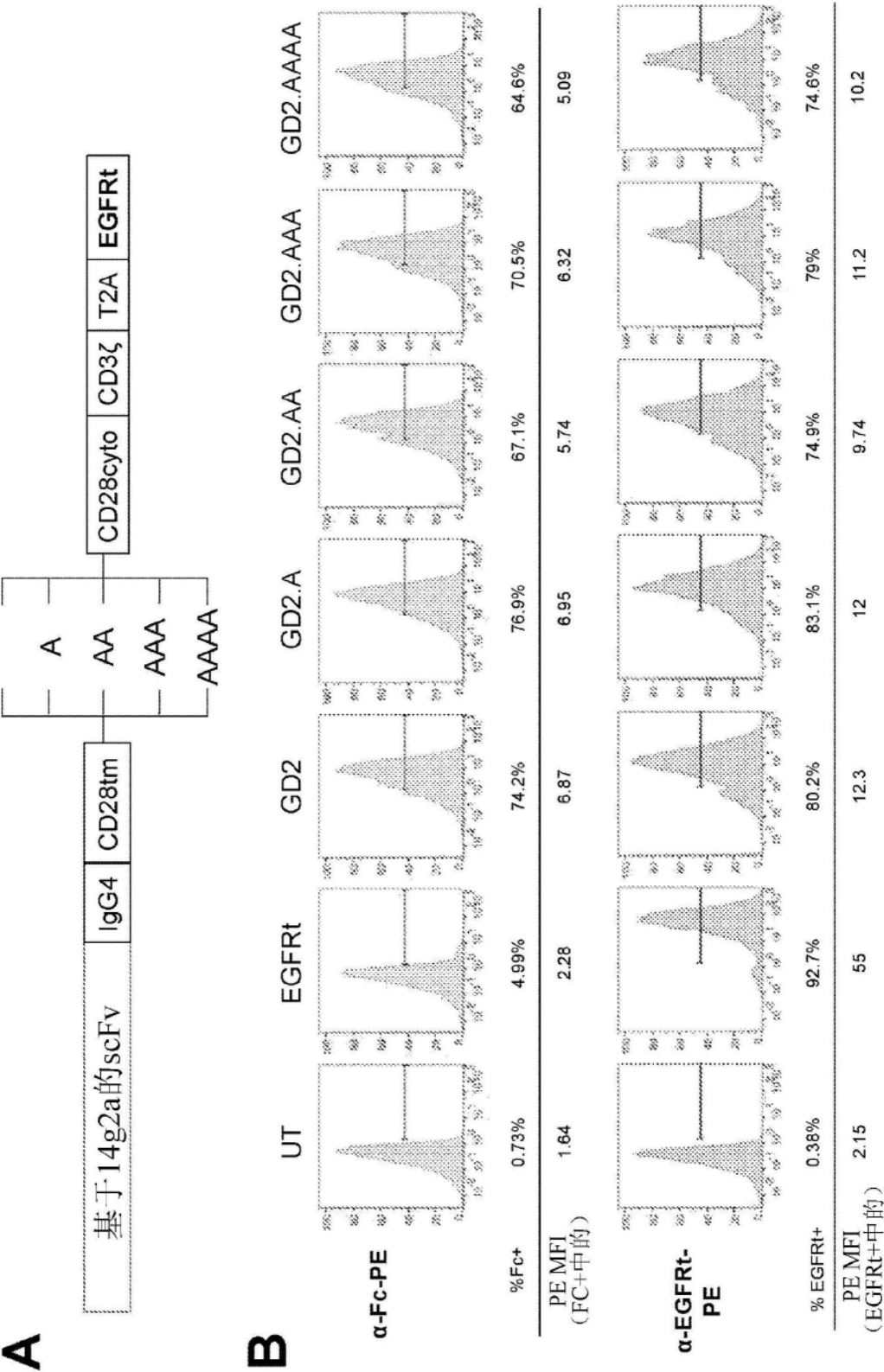


图21A-B

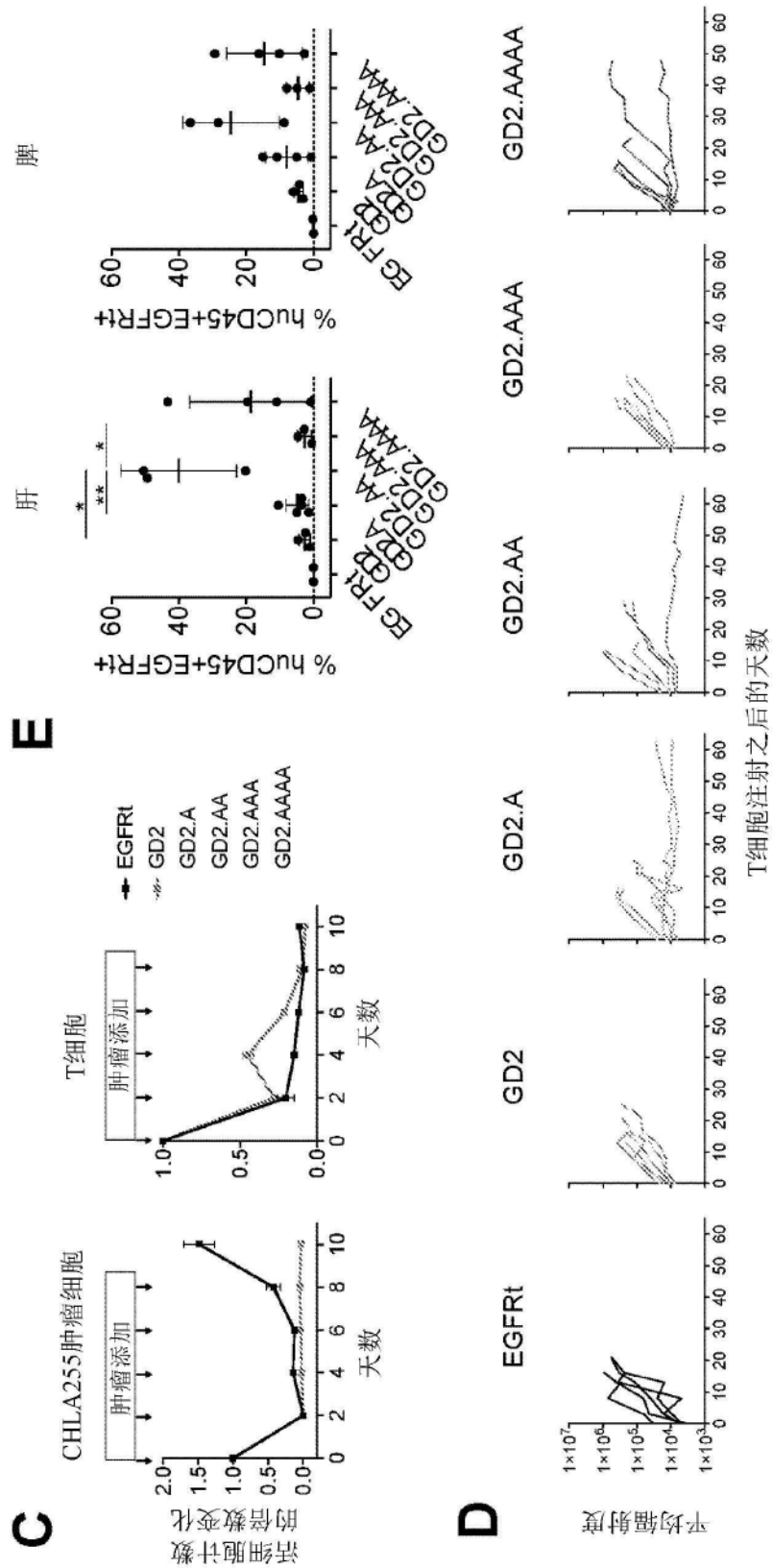


图21C-E

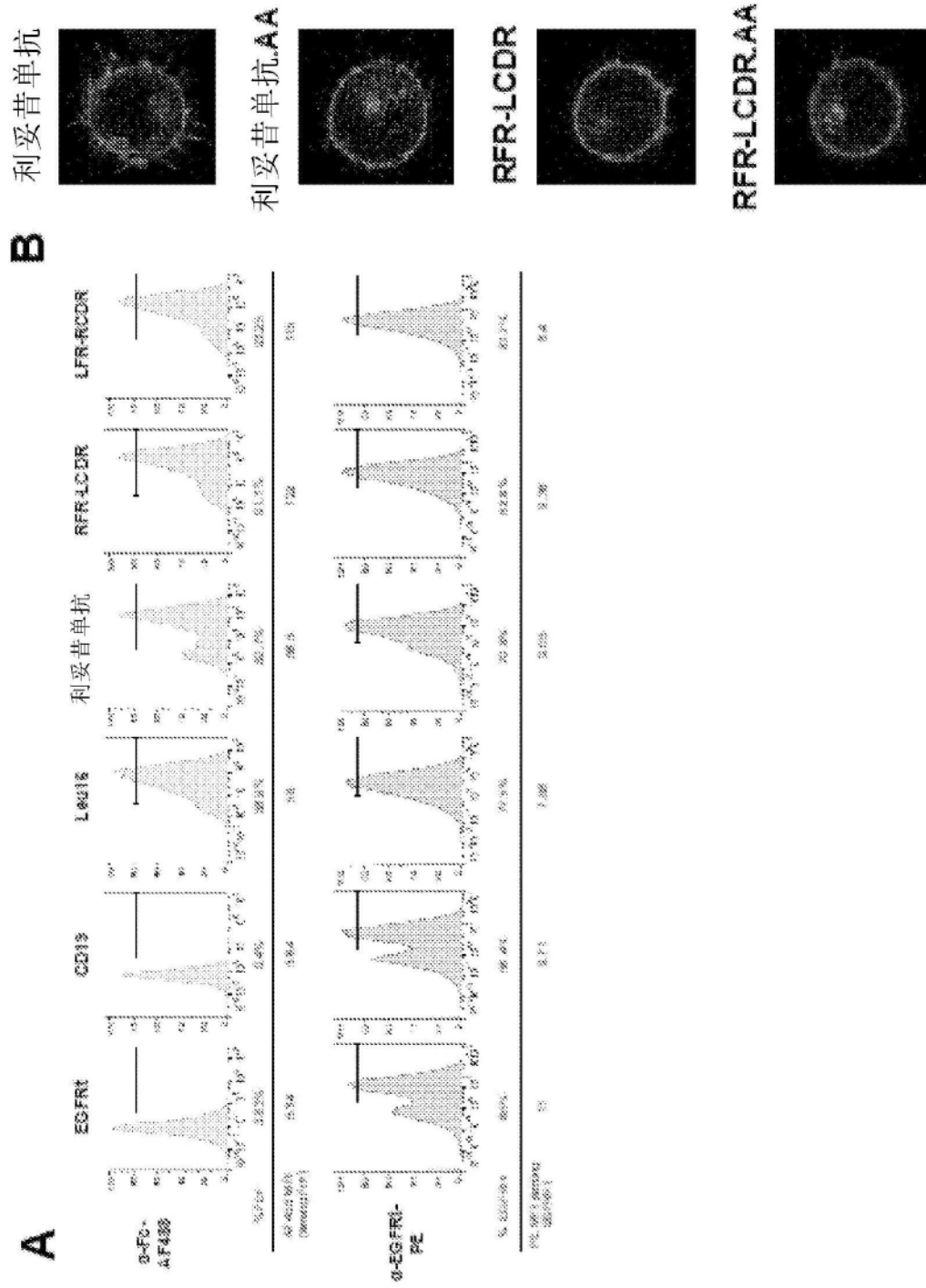


图22A-B

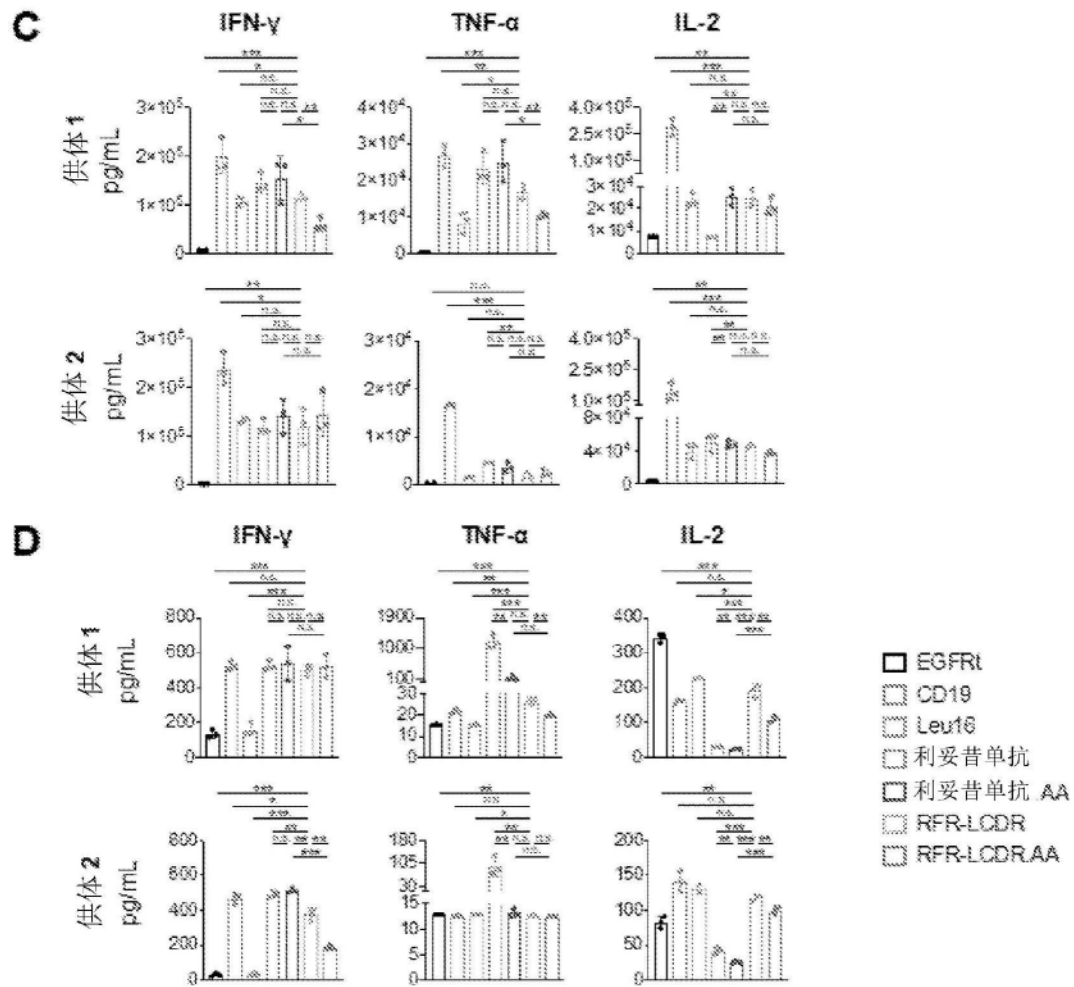


图22C-D

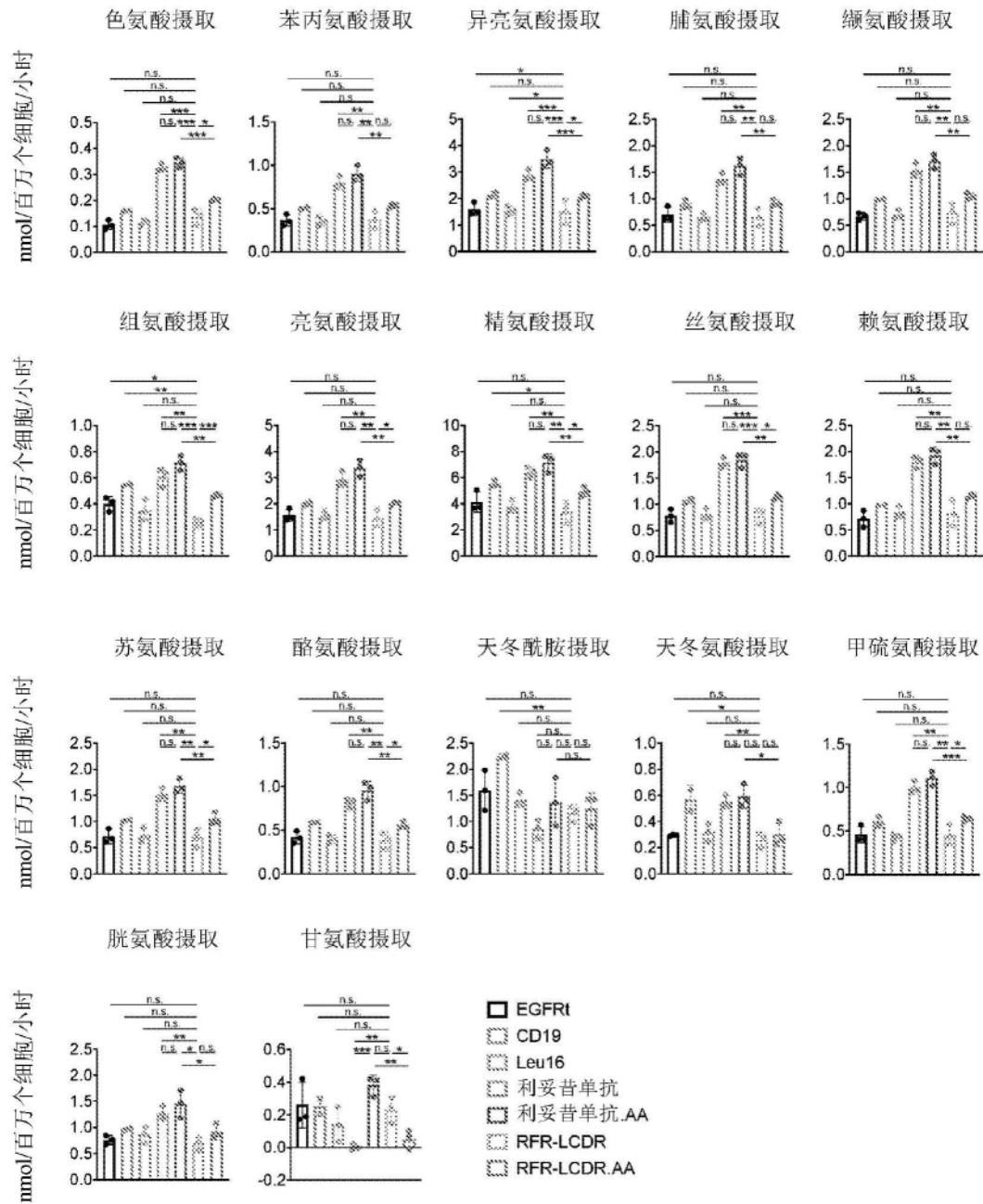


图23

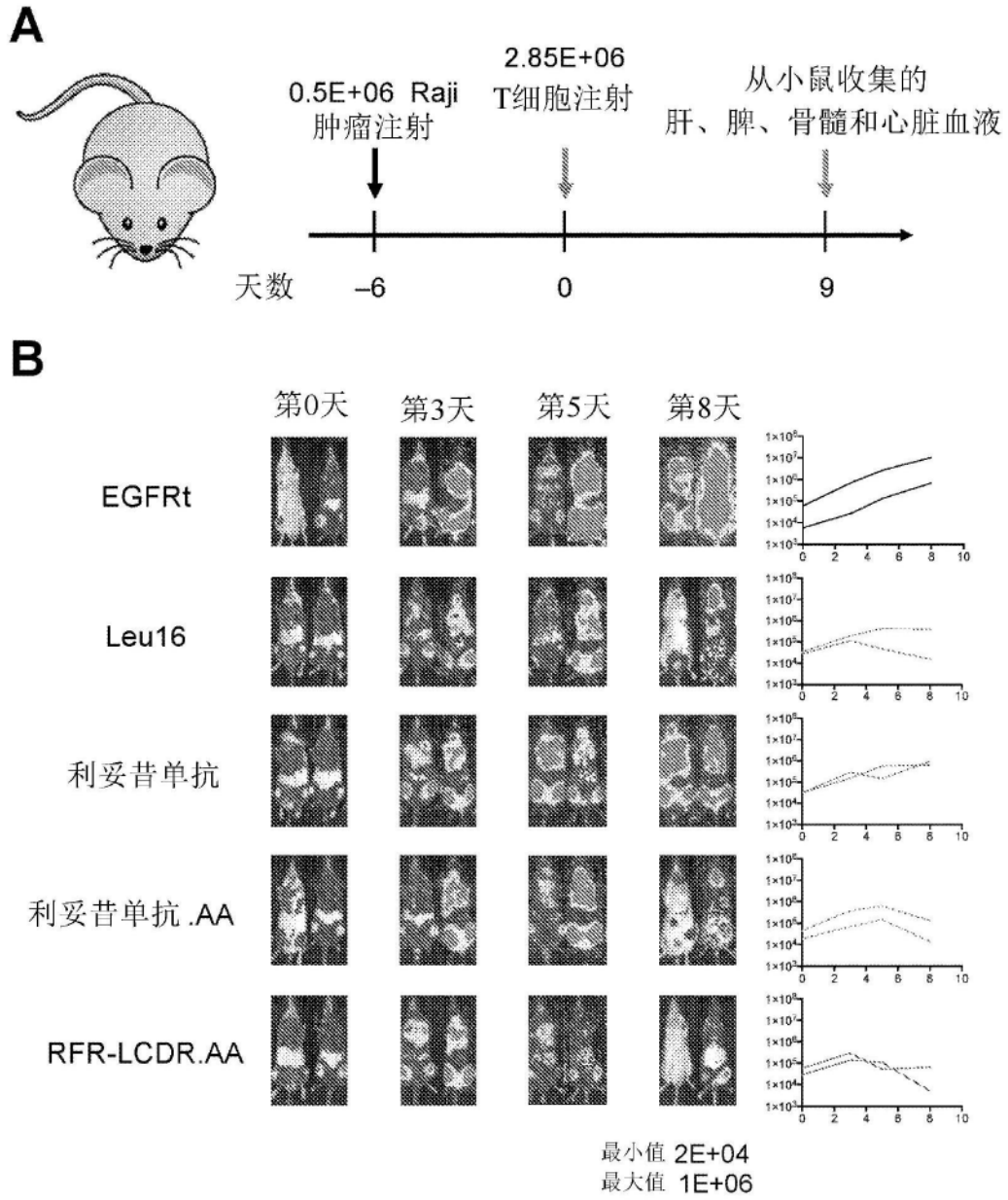


图24A-B

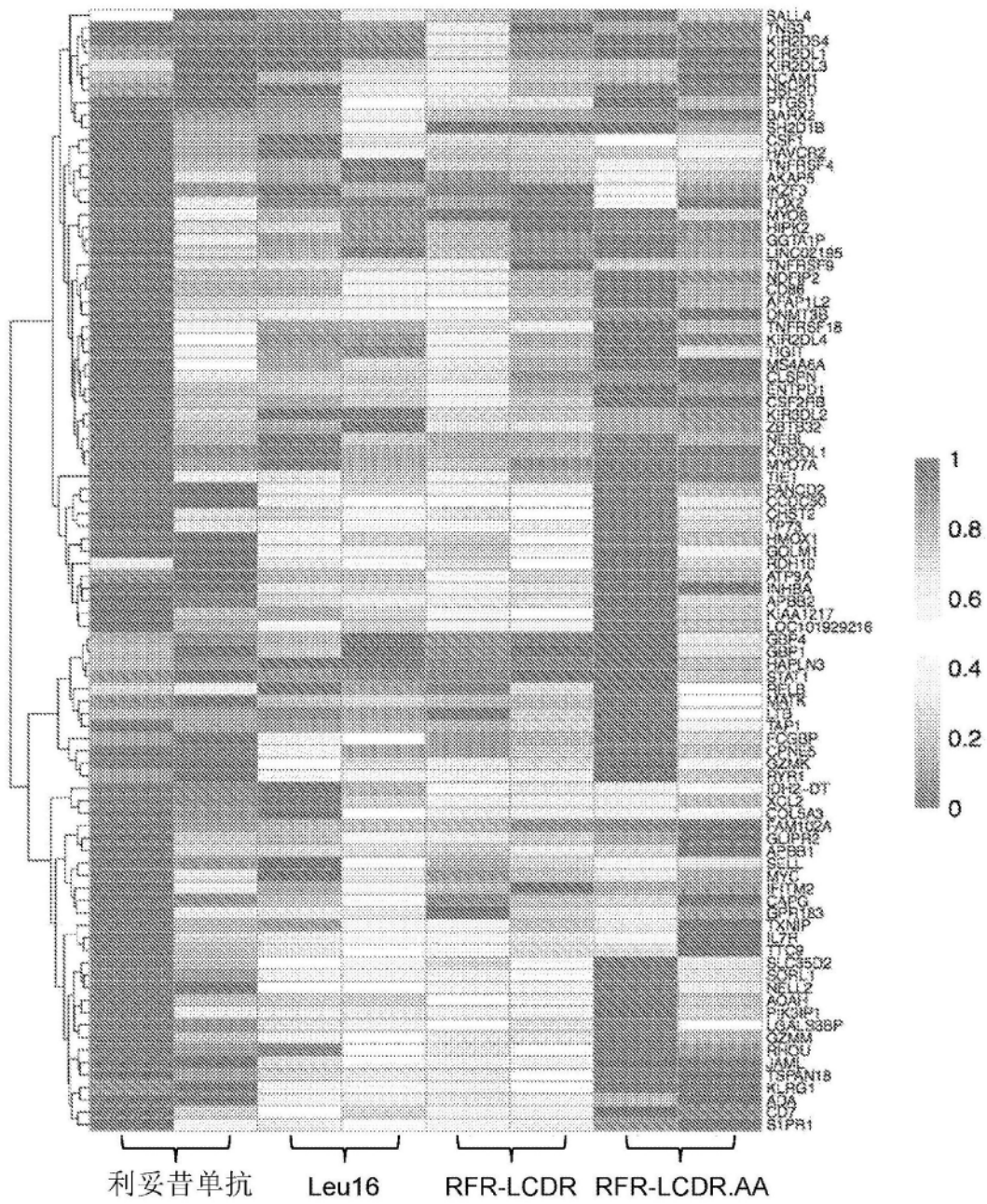


图25

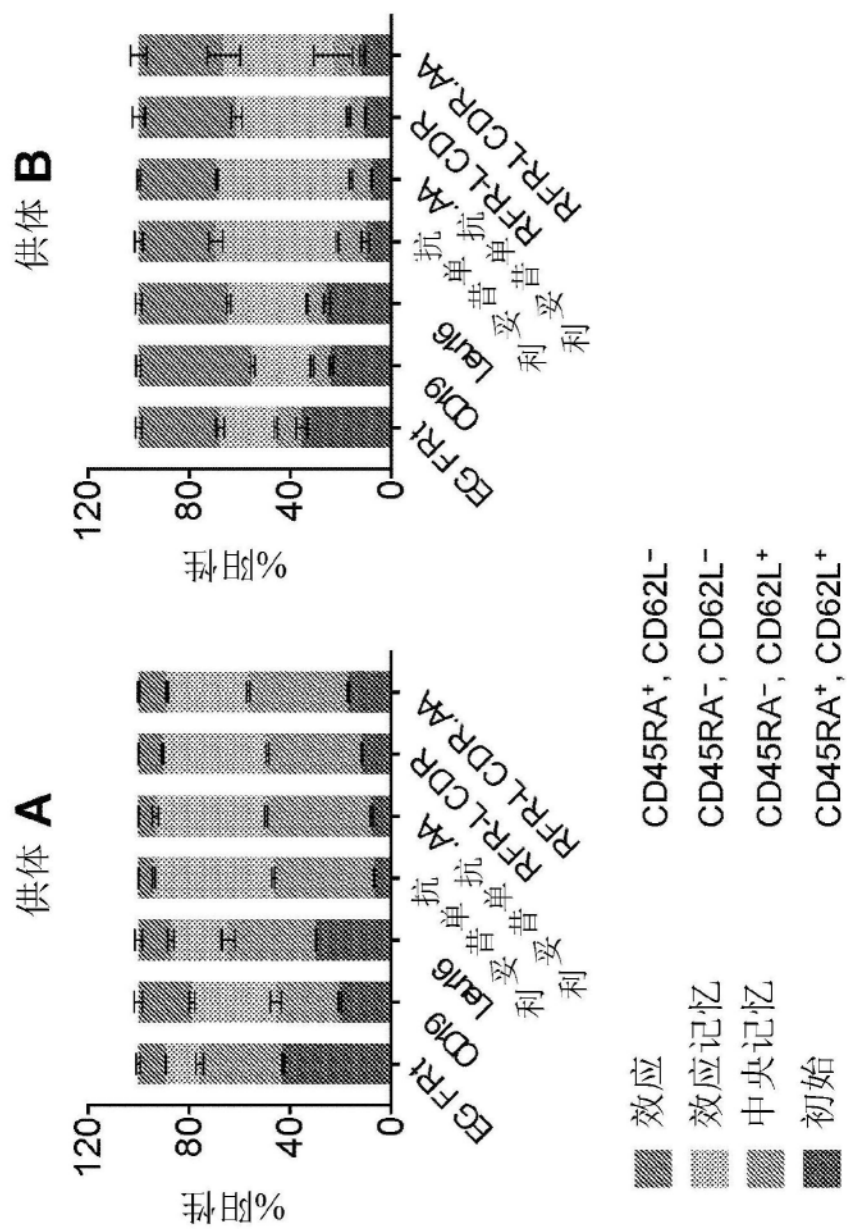


图26

A

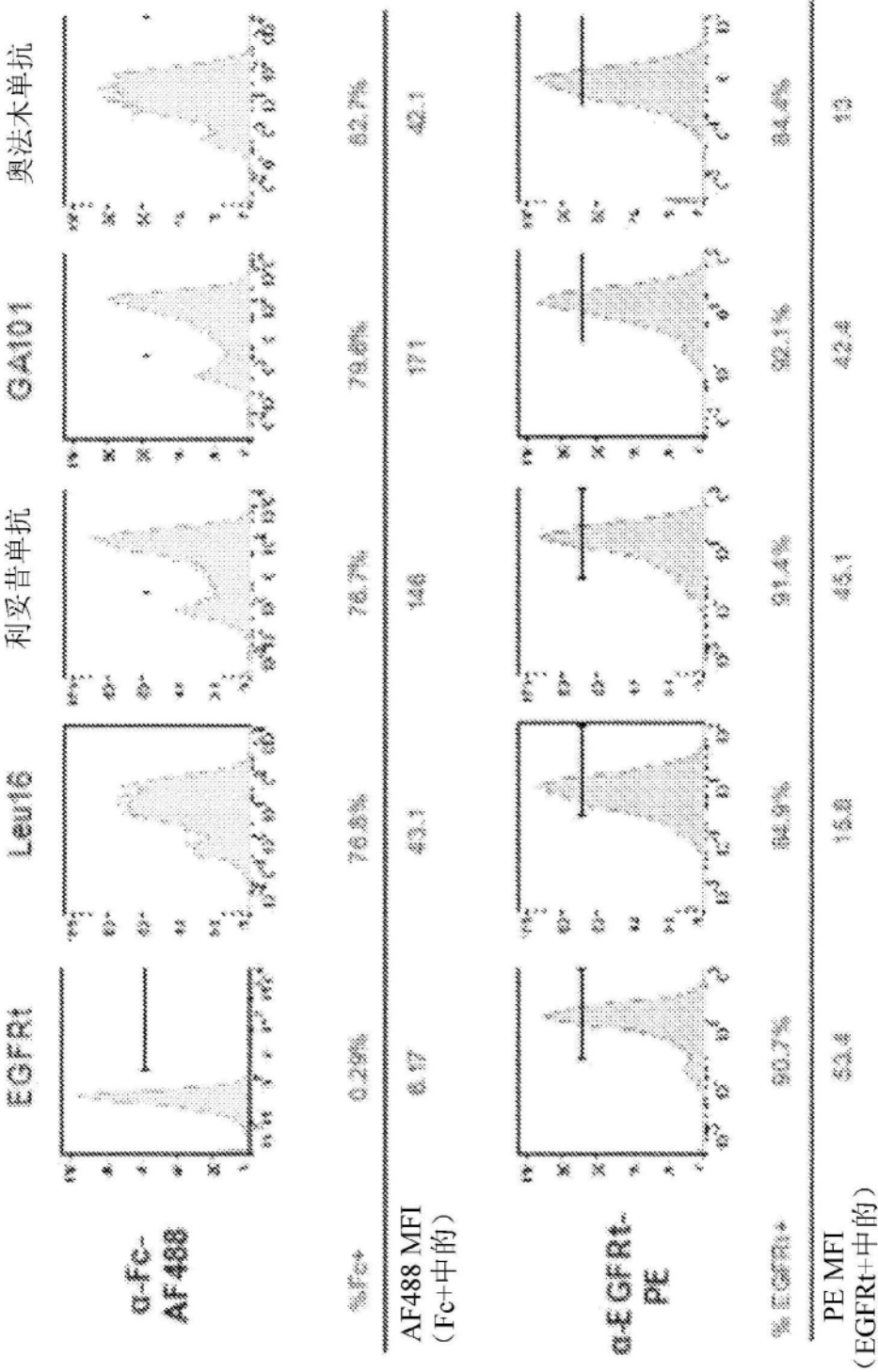


图27A

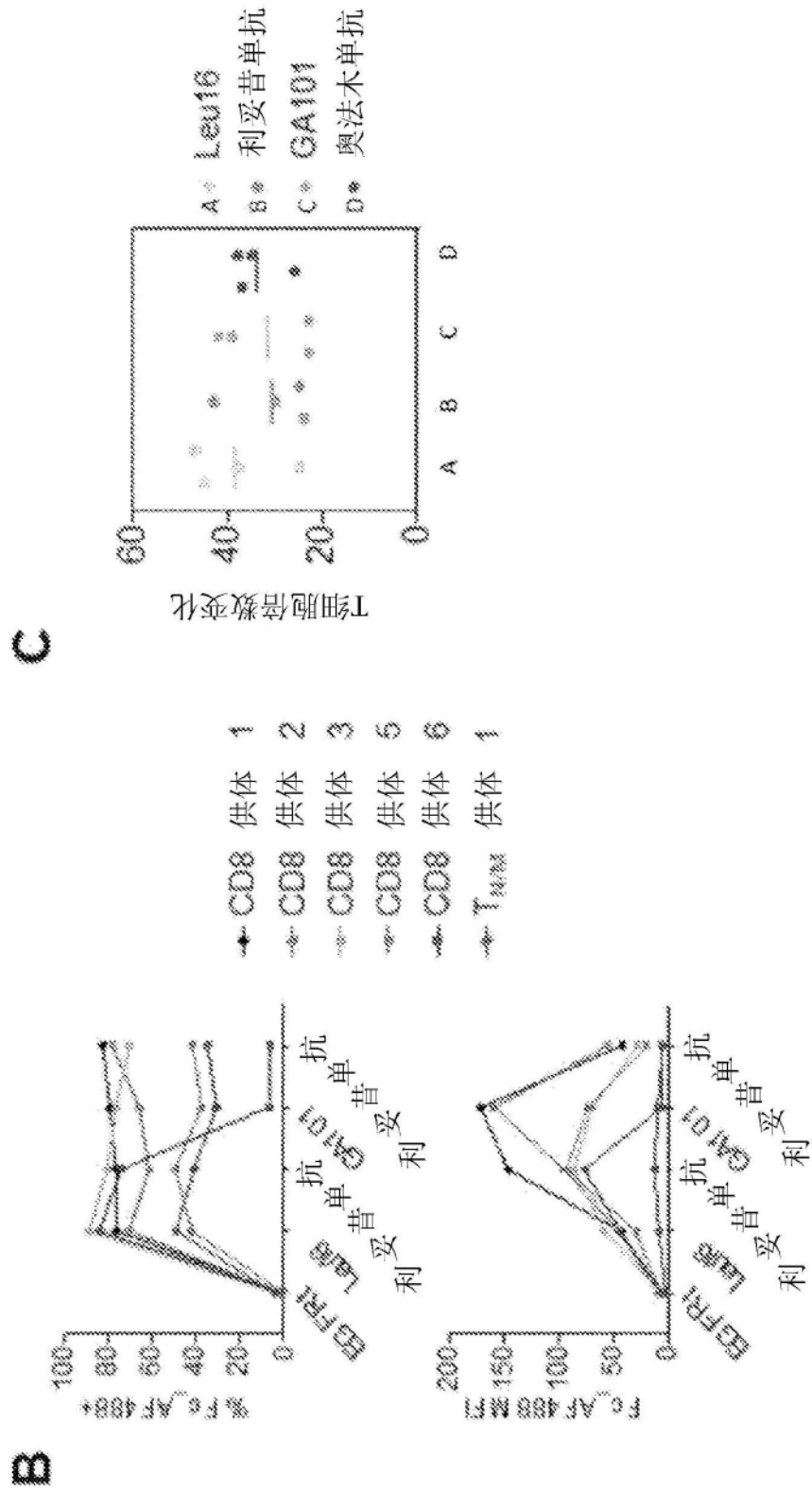


图27B-C

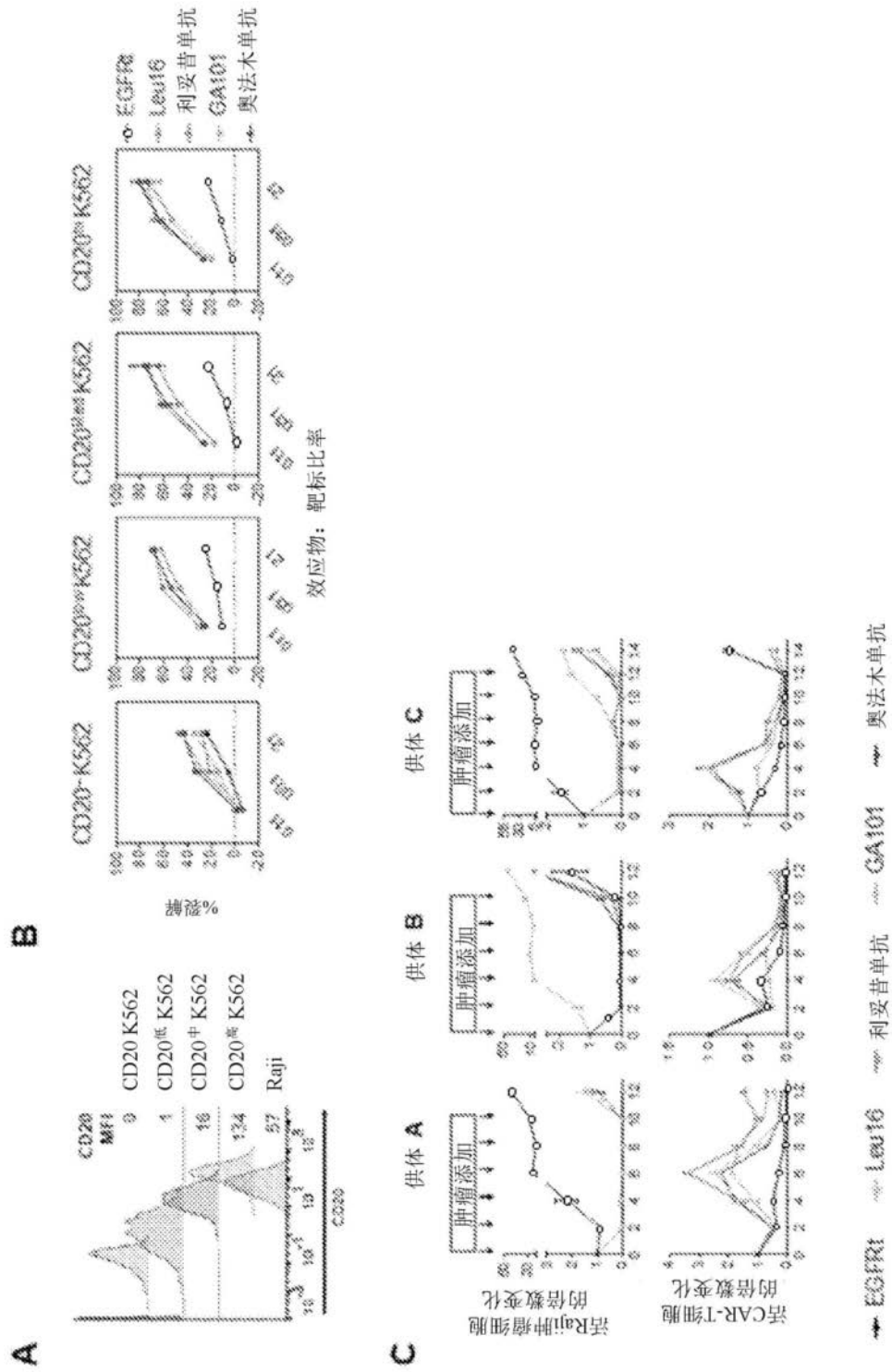


图28A-C

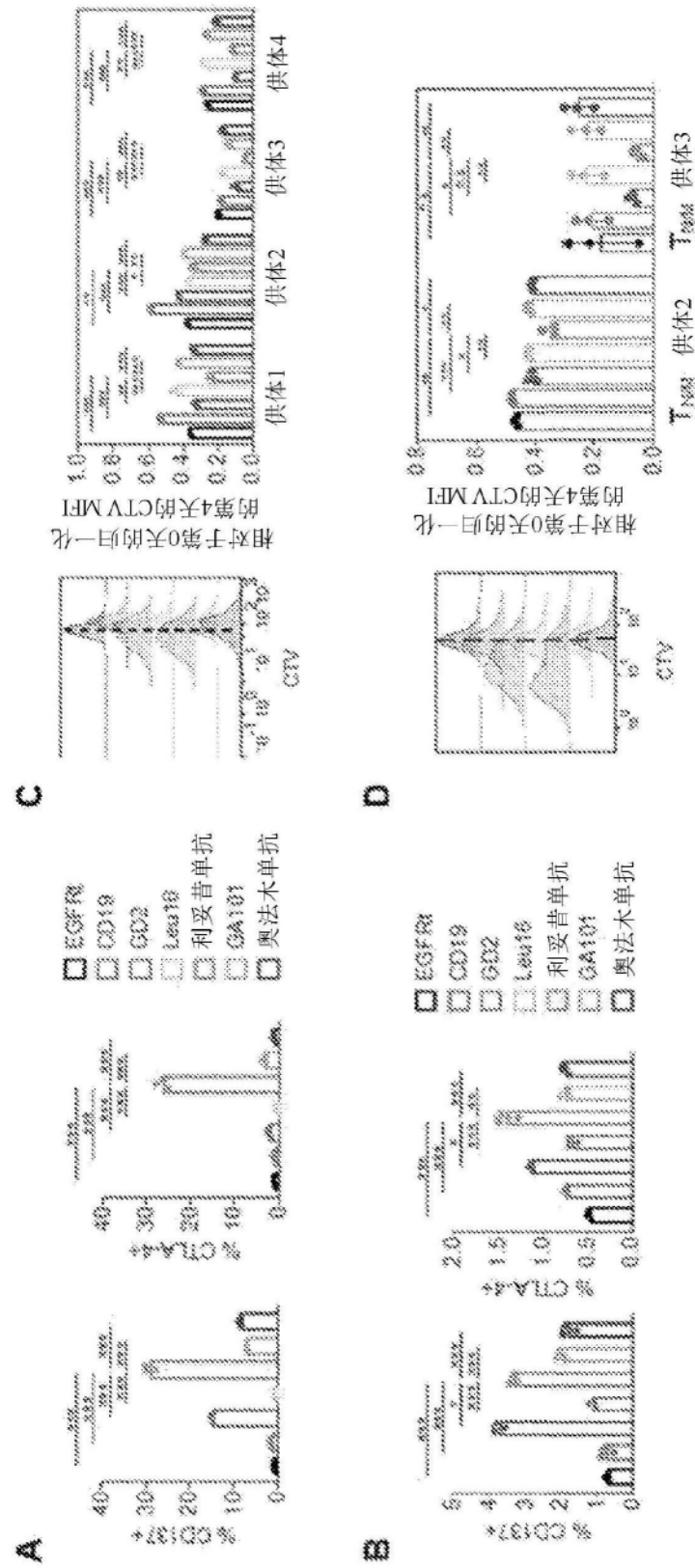


图29A-D

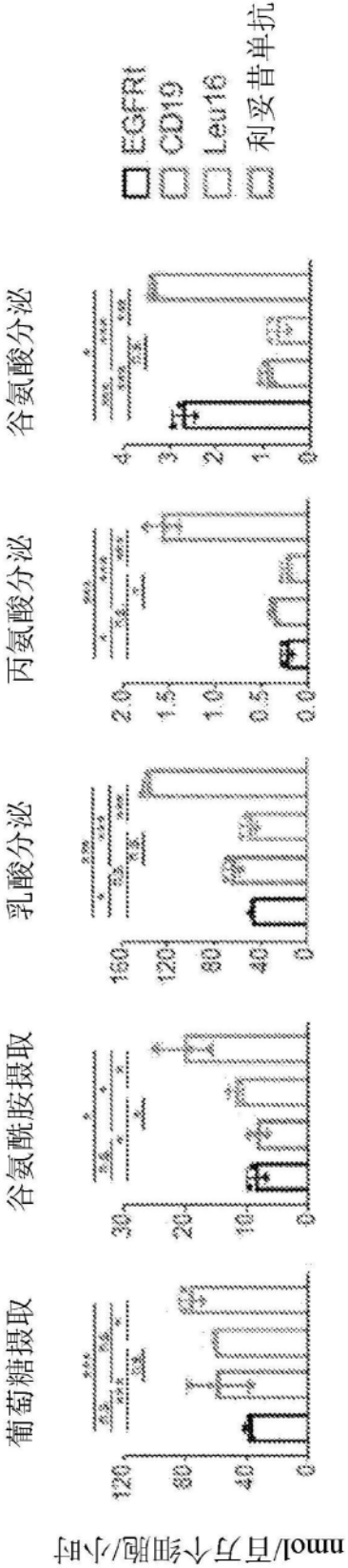


图30

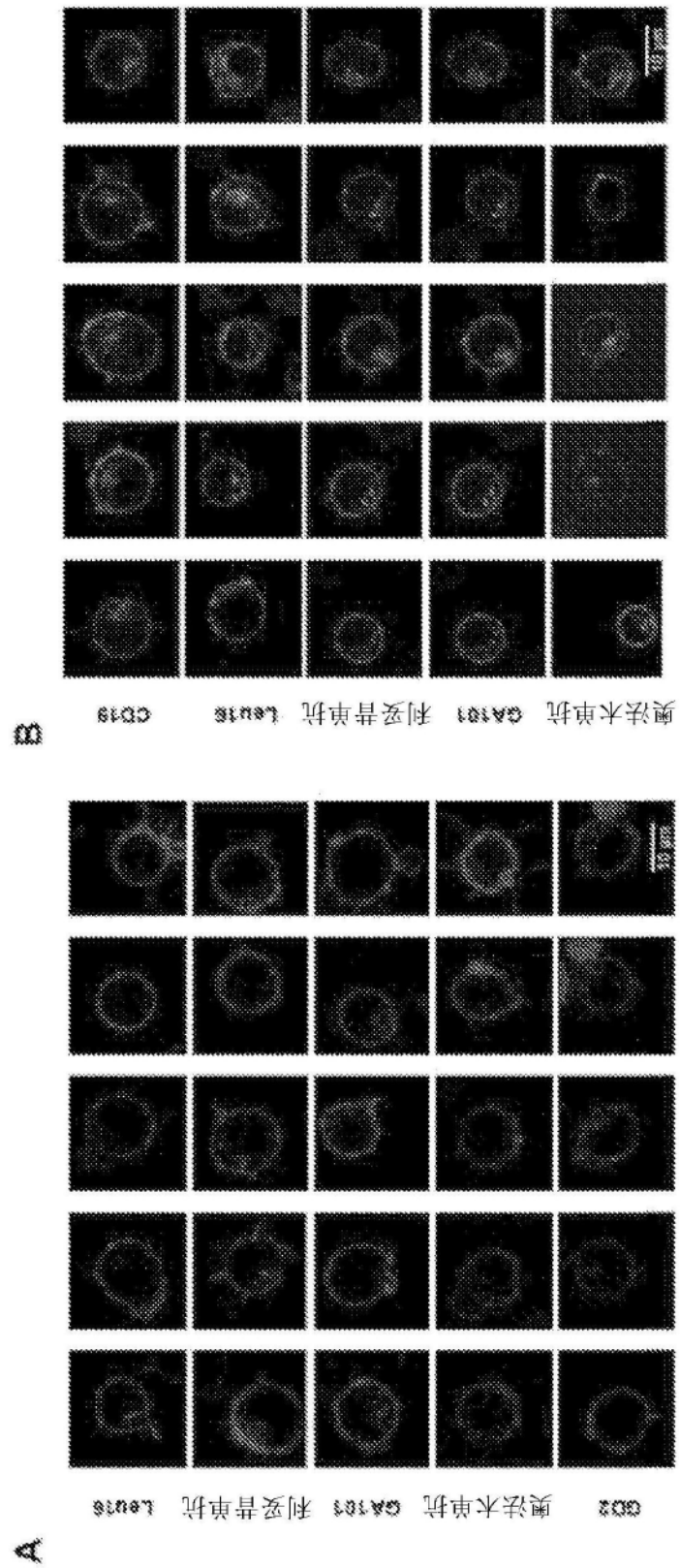


图31A-B

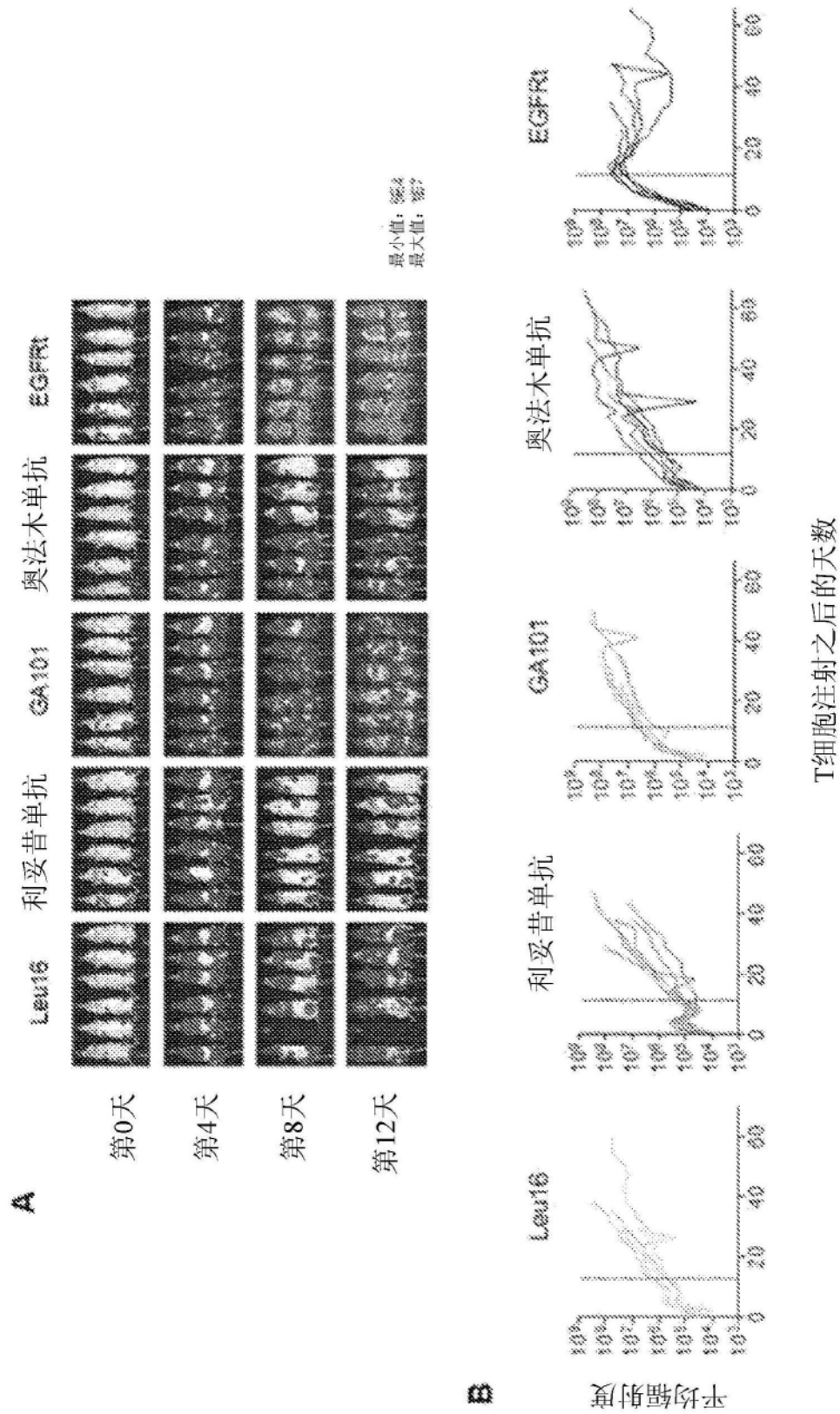


图32A-B

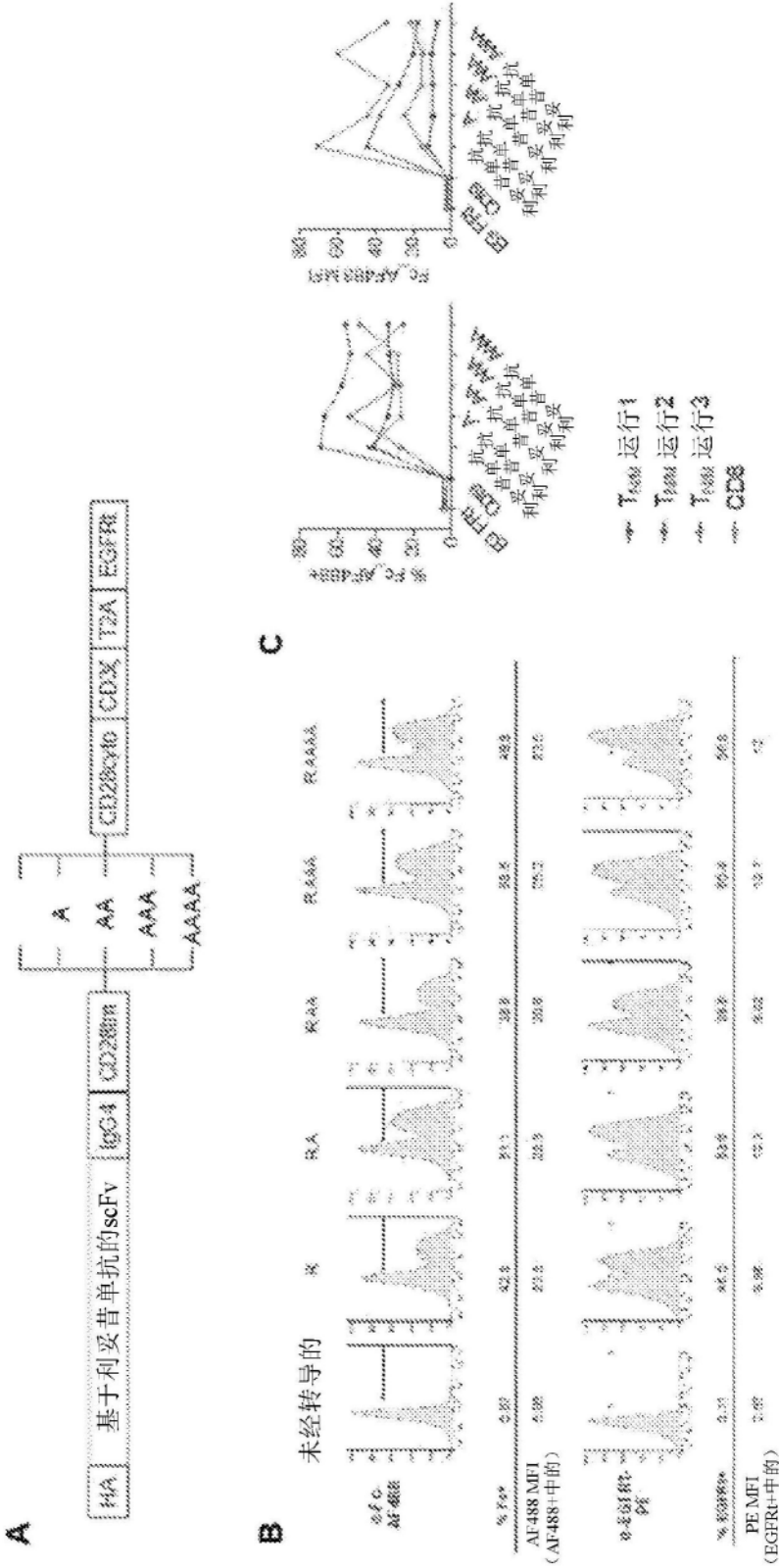


图33A-C

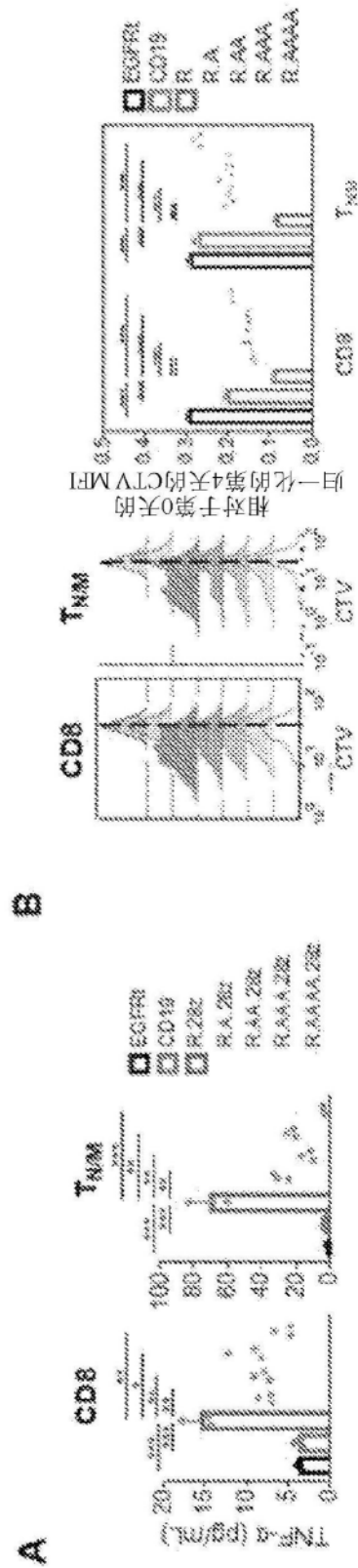


图34A-B

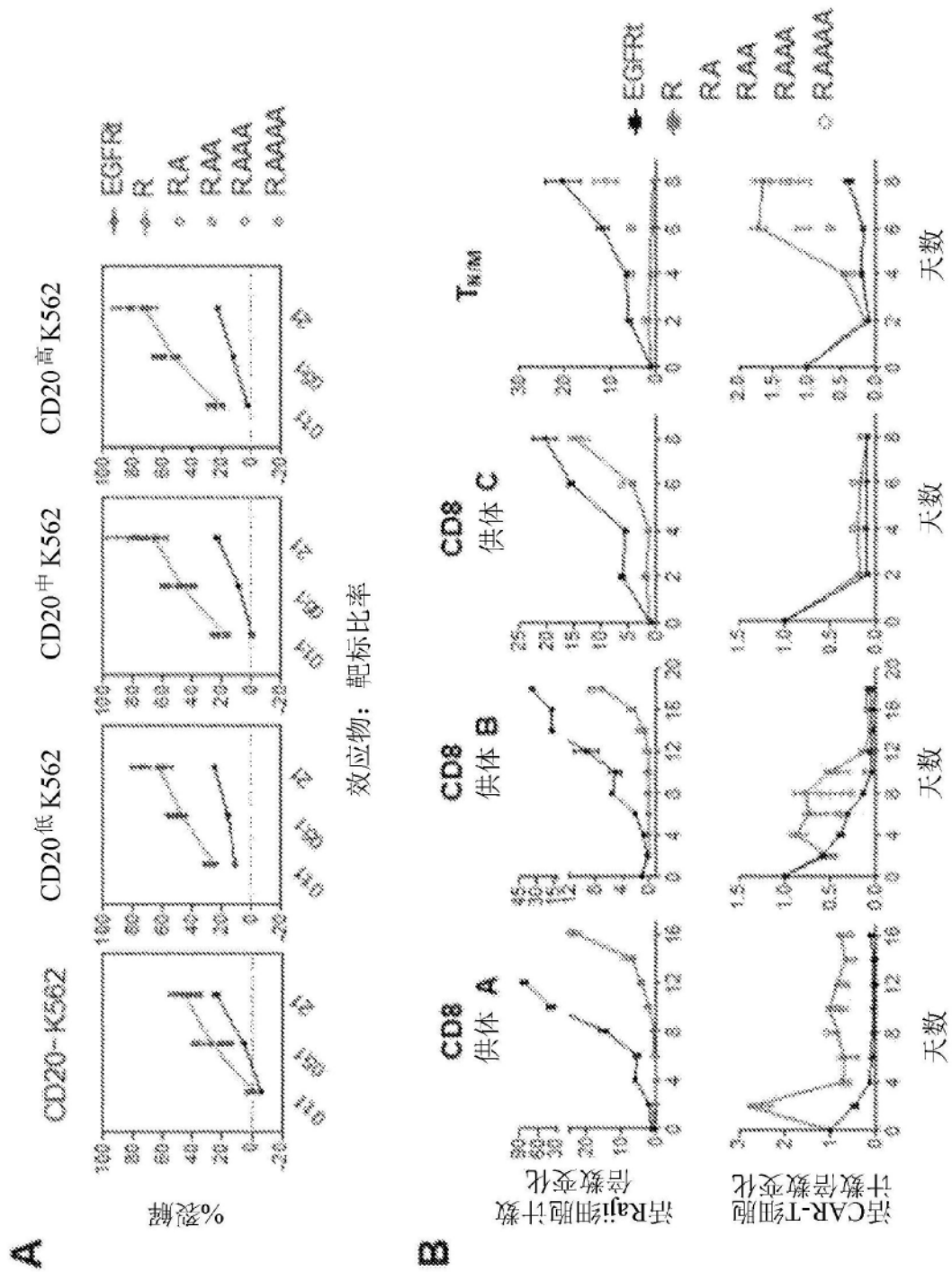


图35A-B

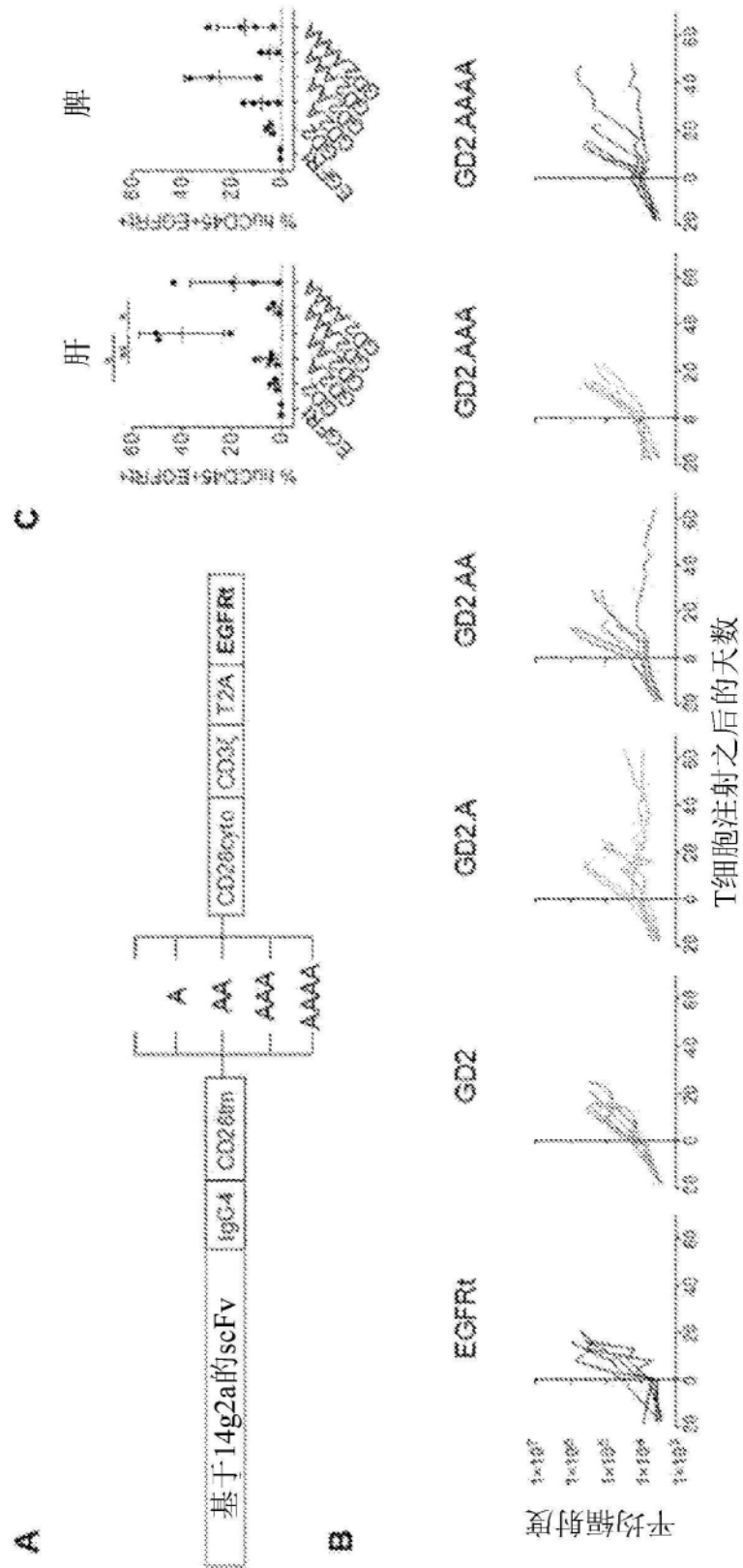


图36A-C

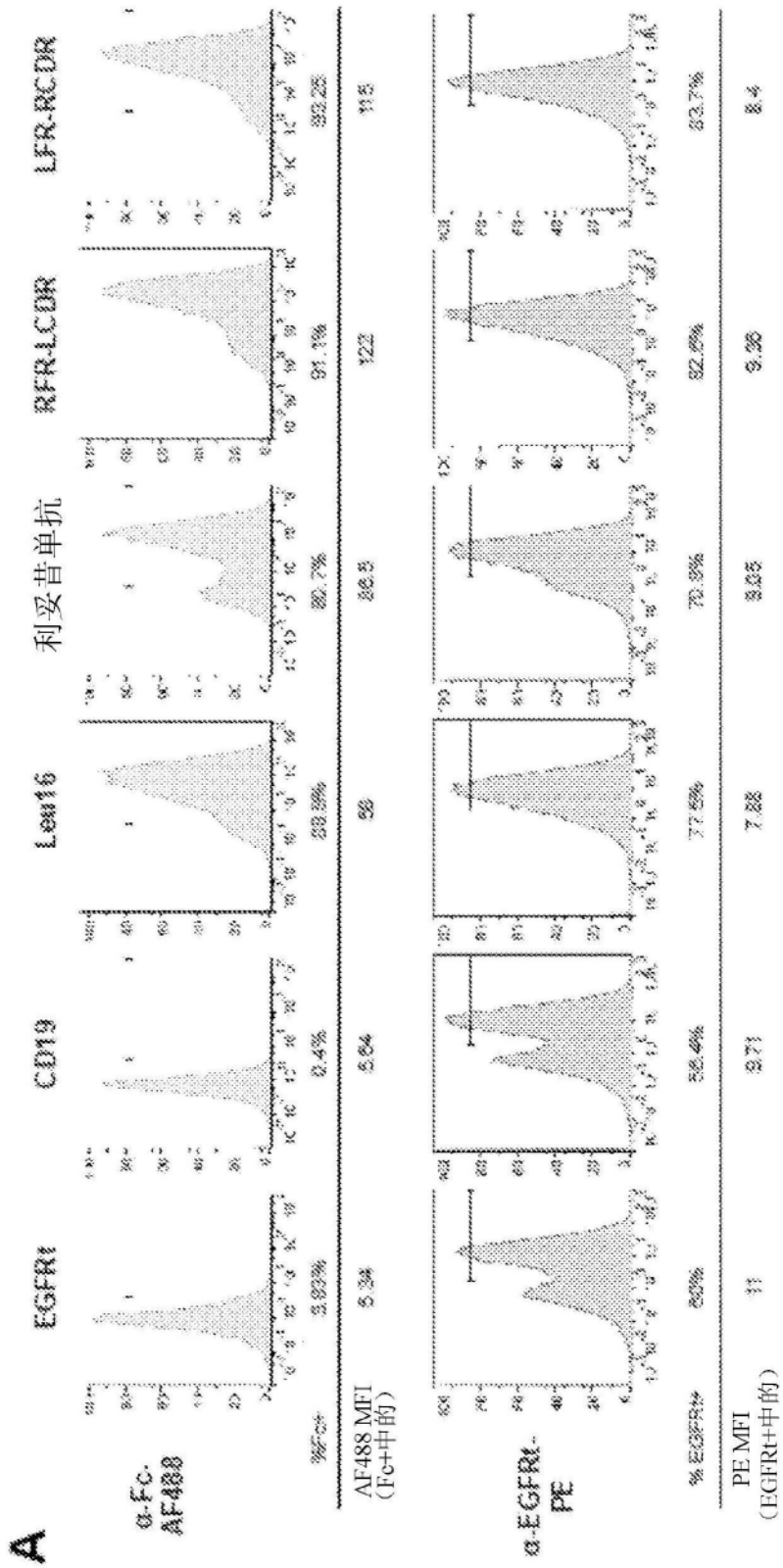


图37A

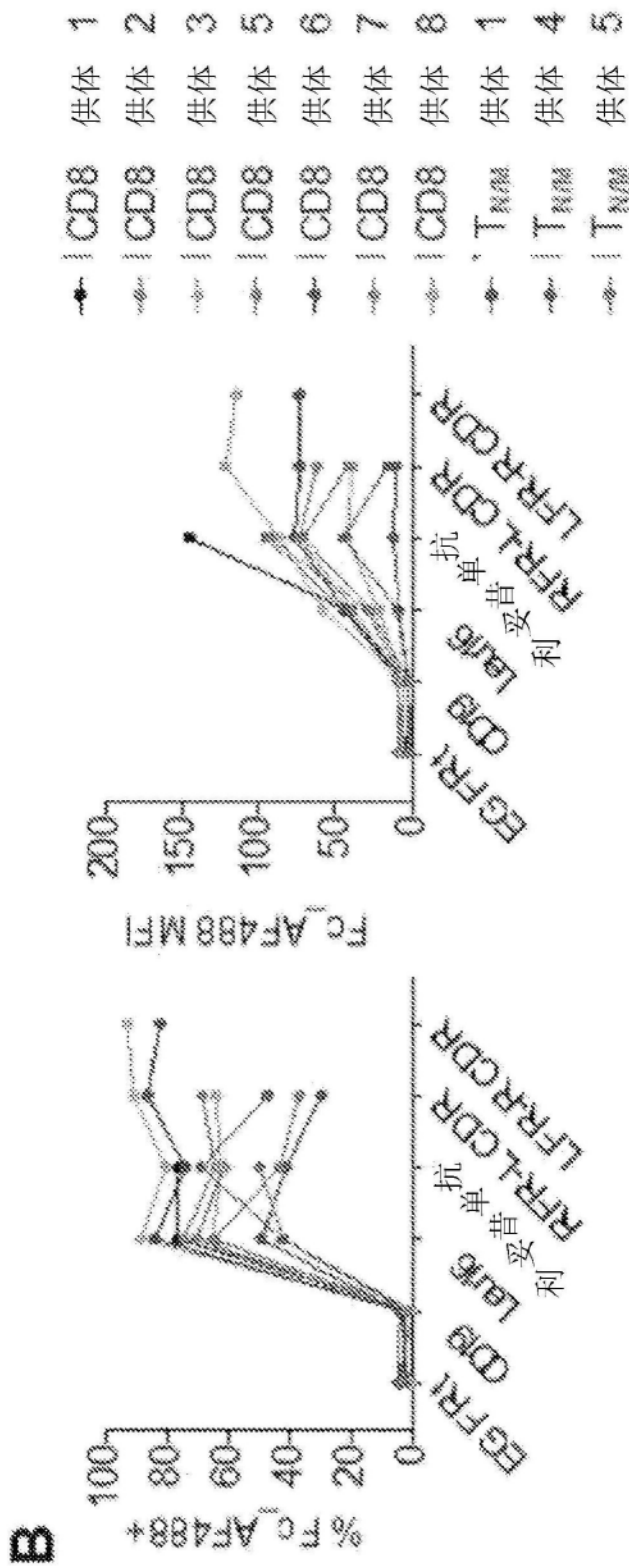


图37B

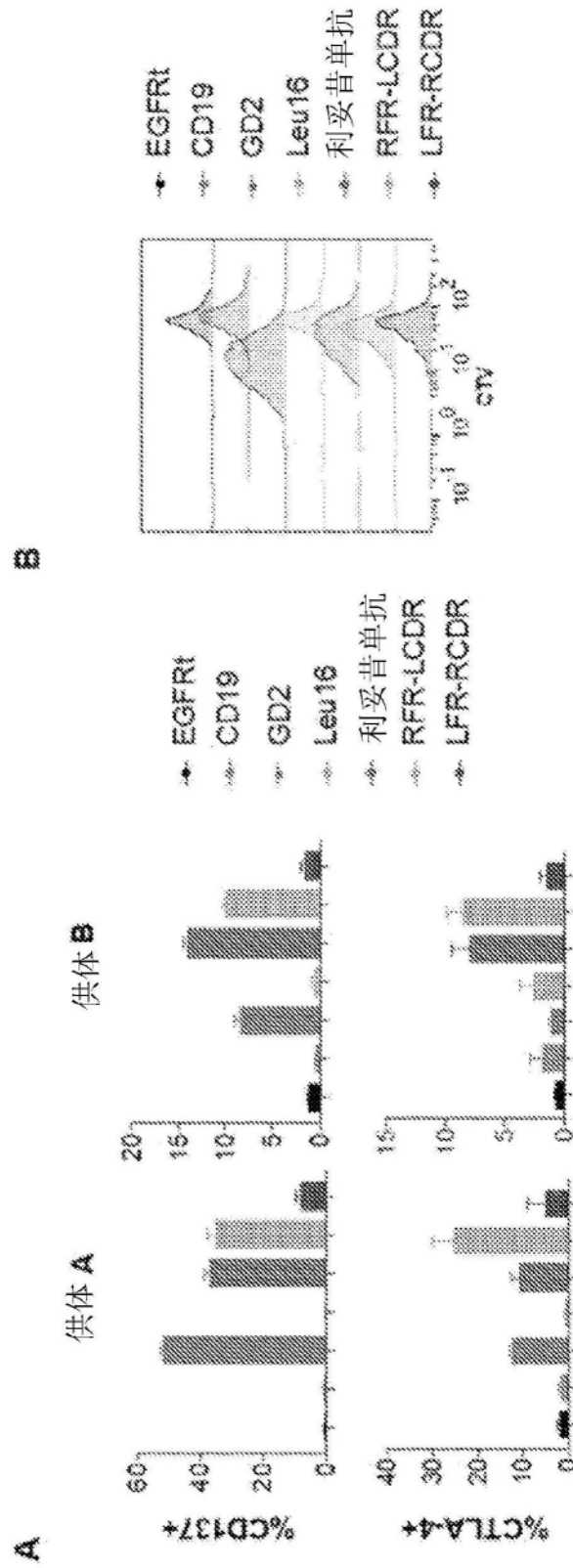


图38A-B

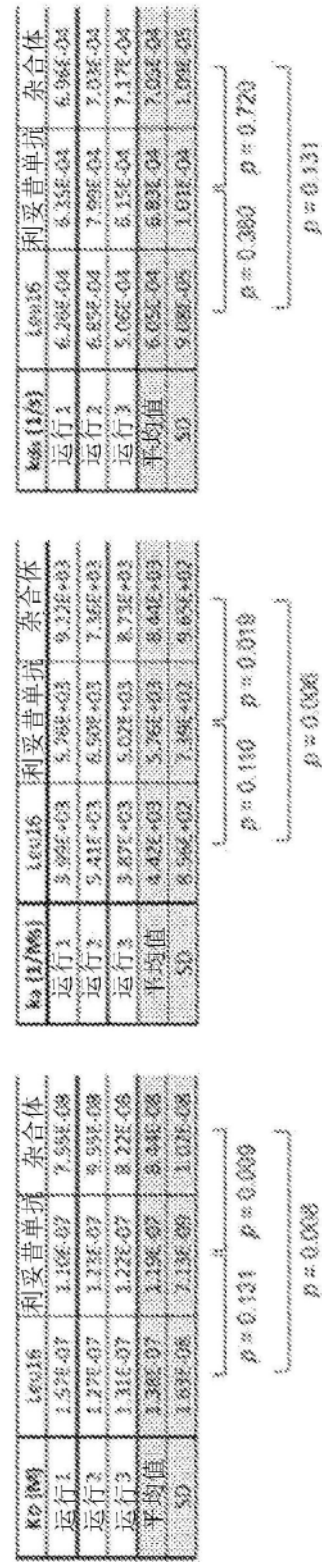


图39

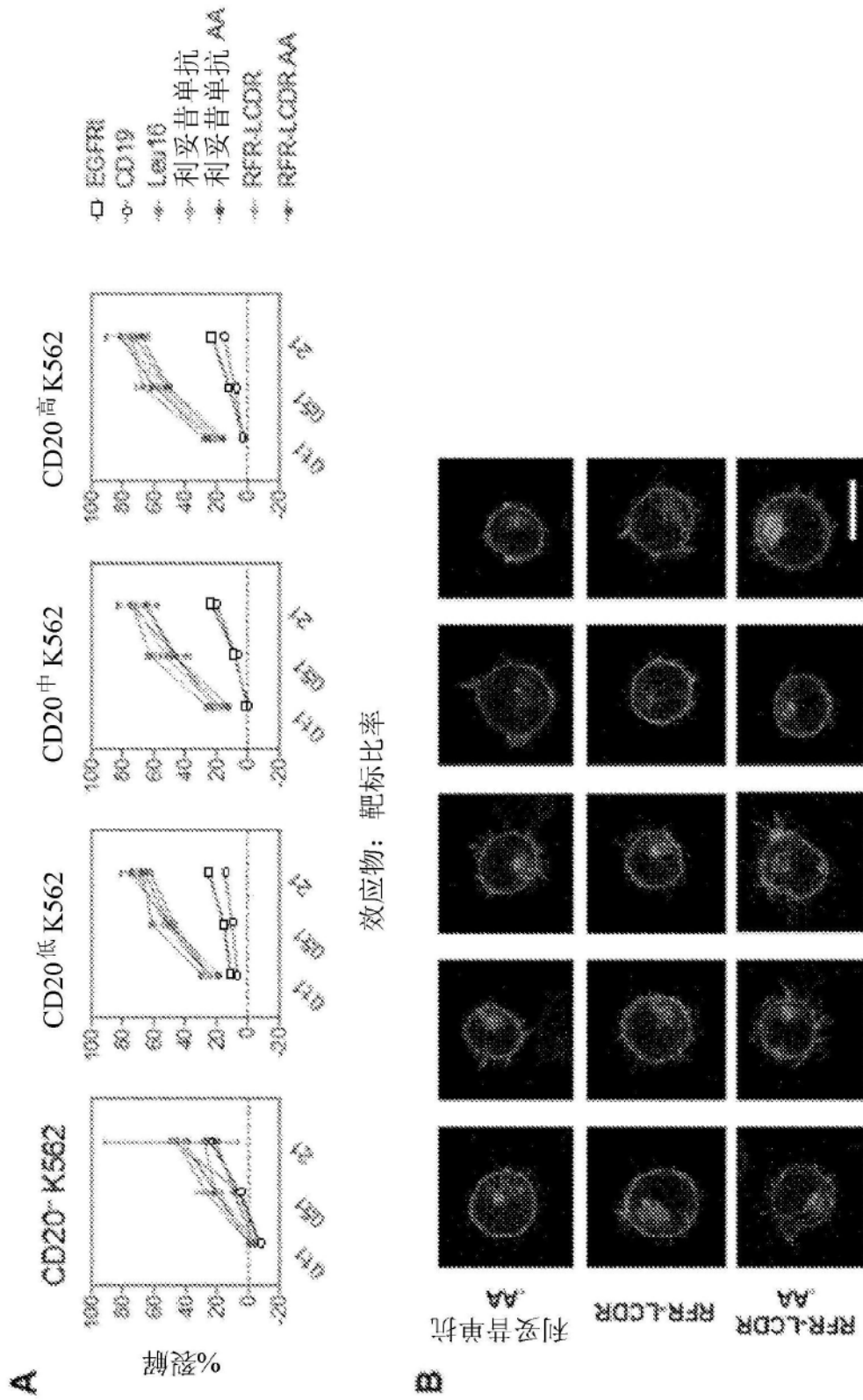


图40A-B

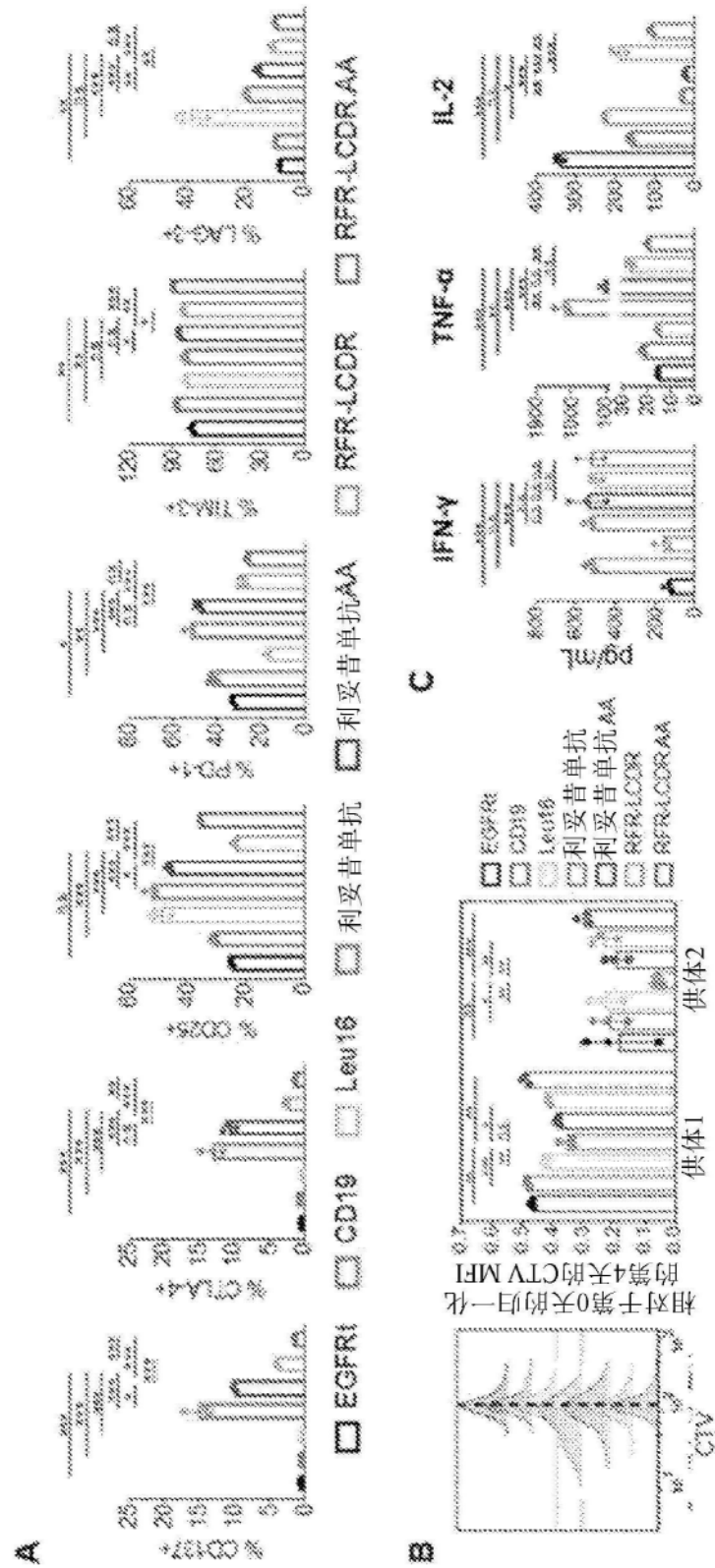


图41A-C

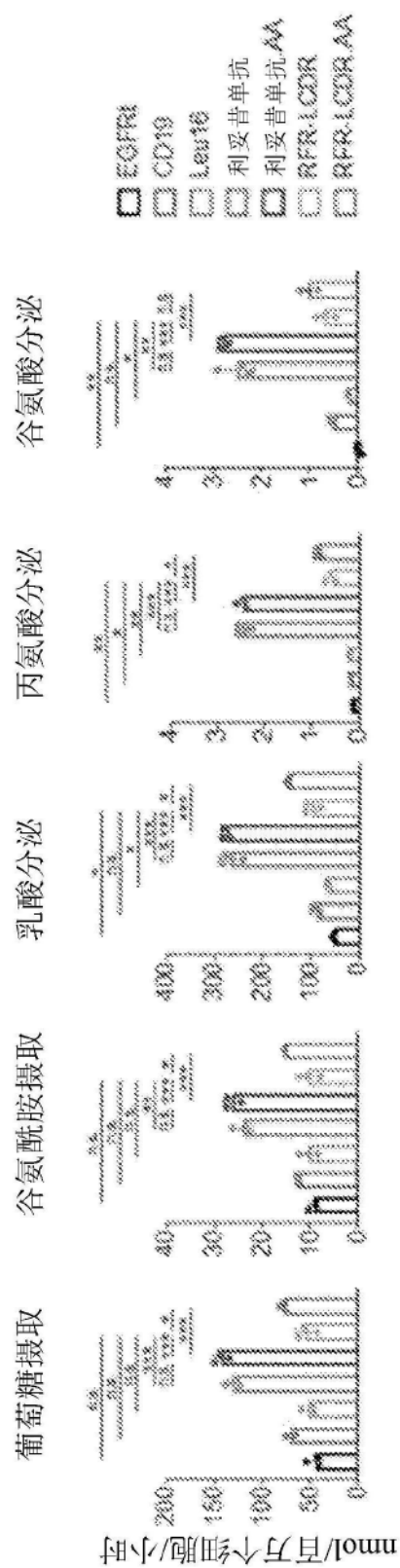


图42

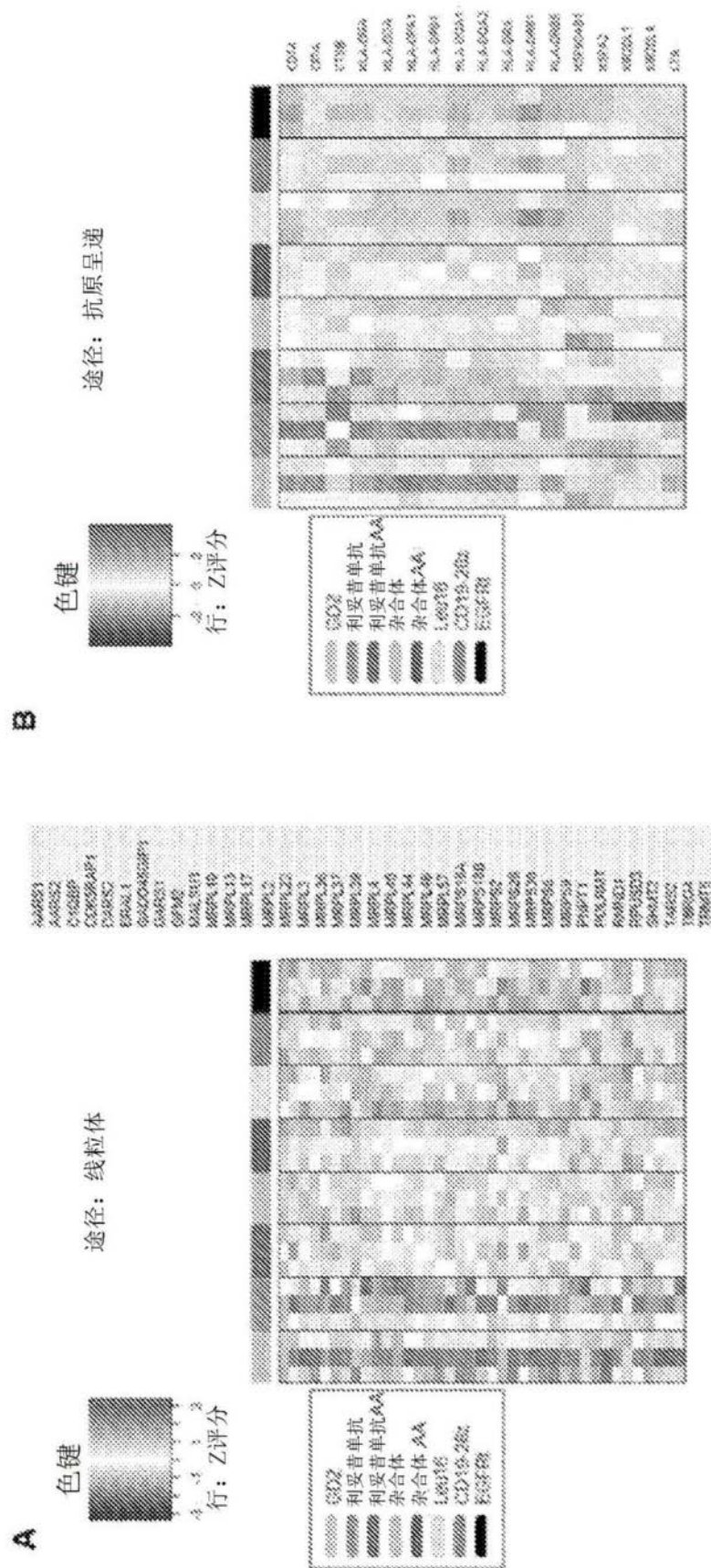


图43A-B

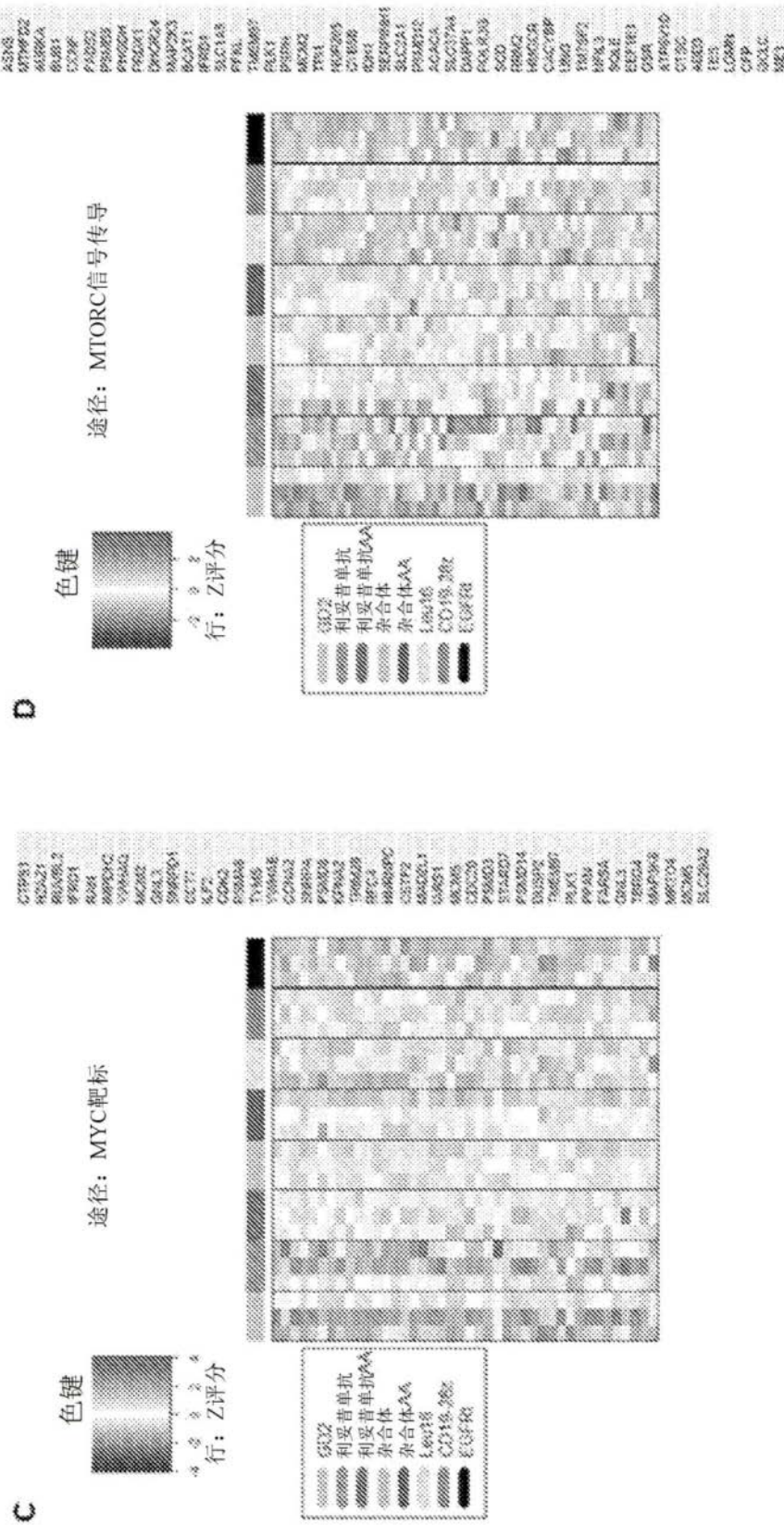


图43C-D

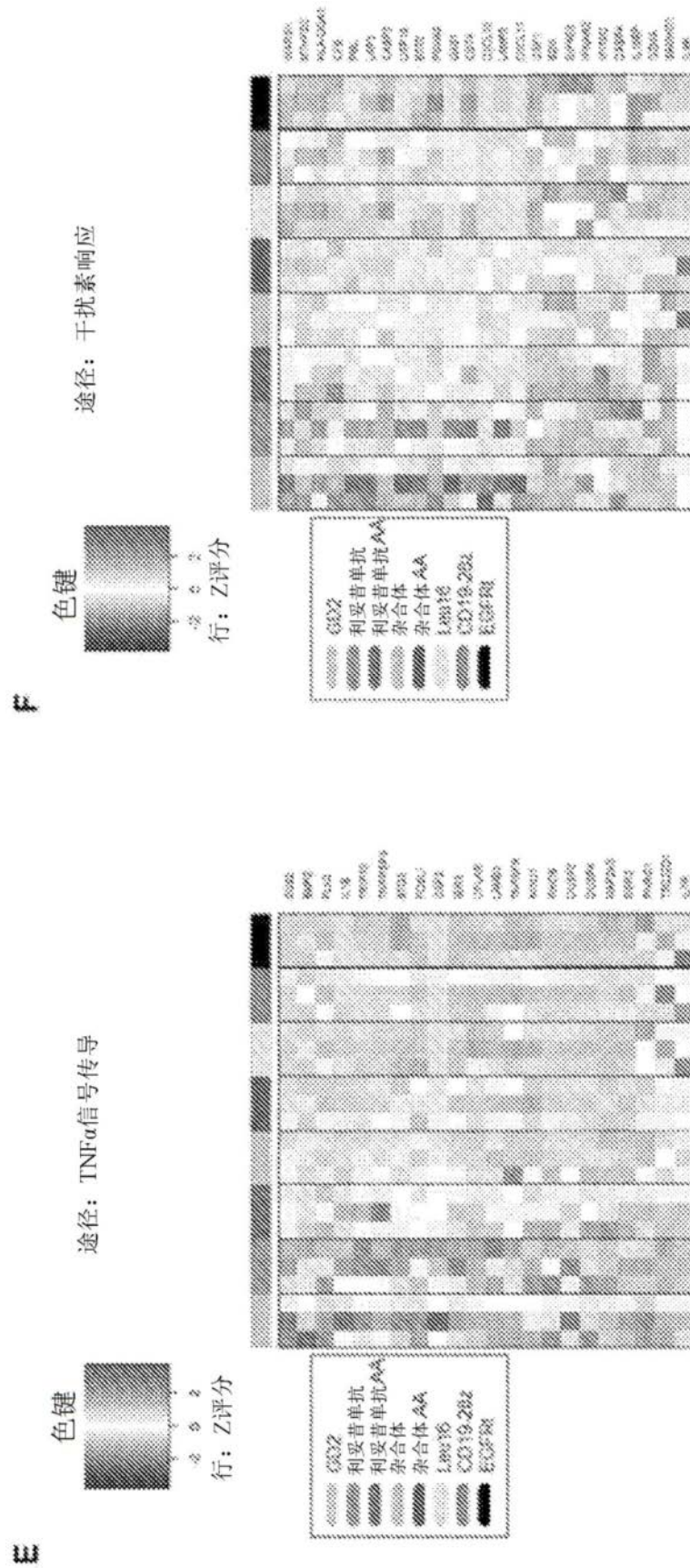


图43E-F

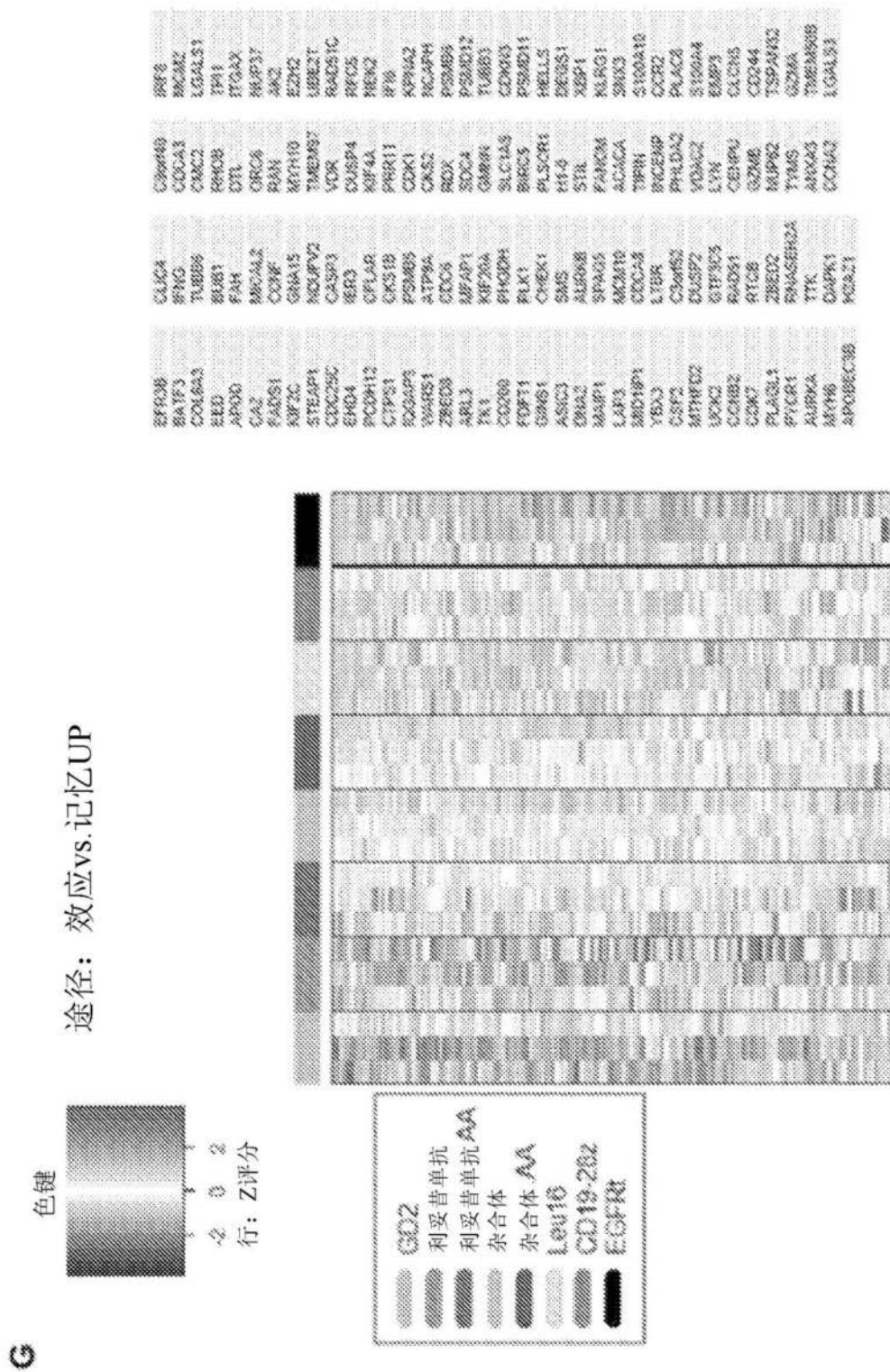


图43G

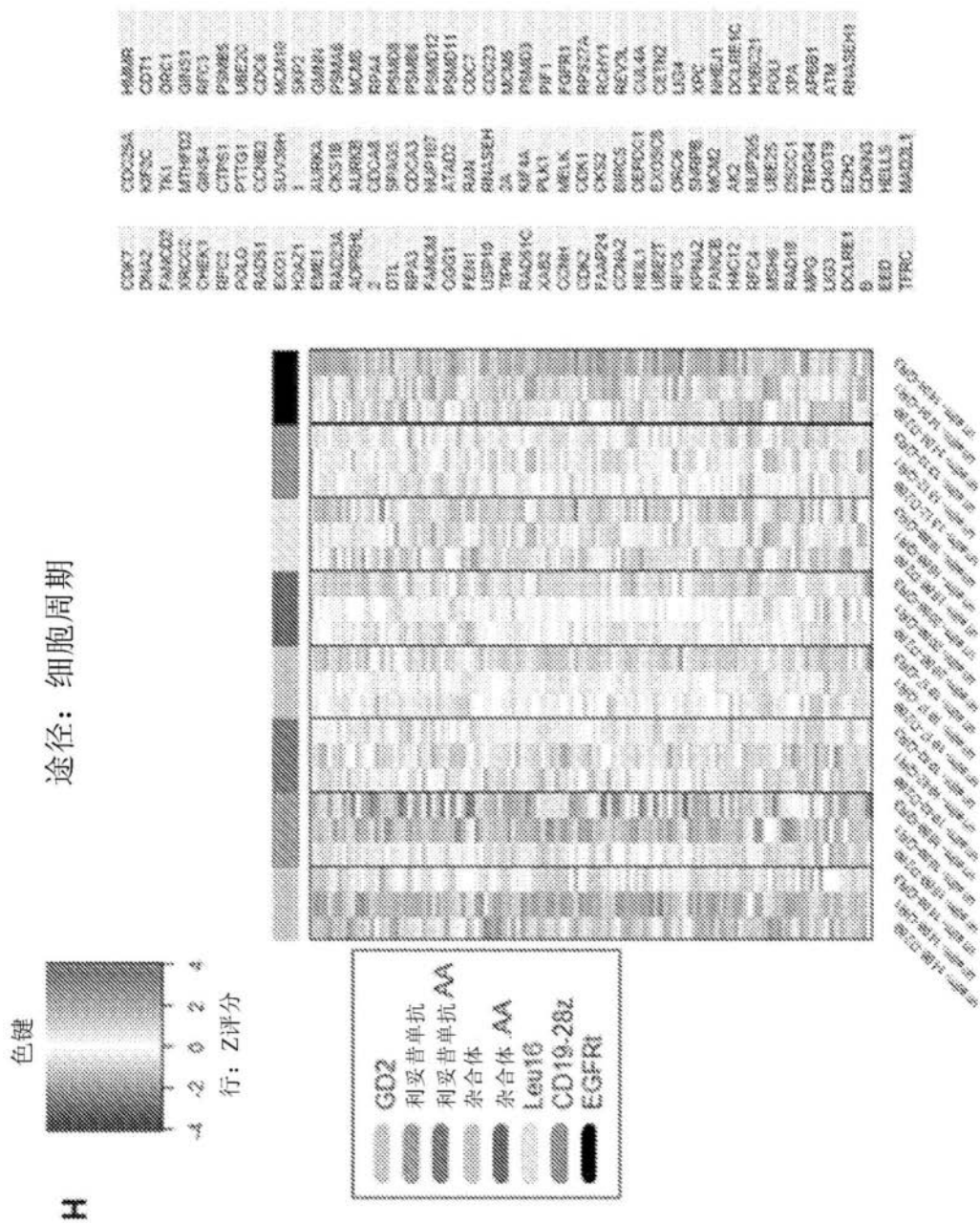


图43H

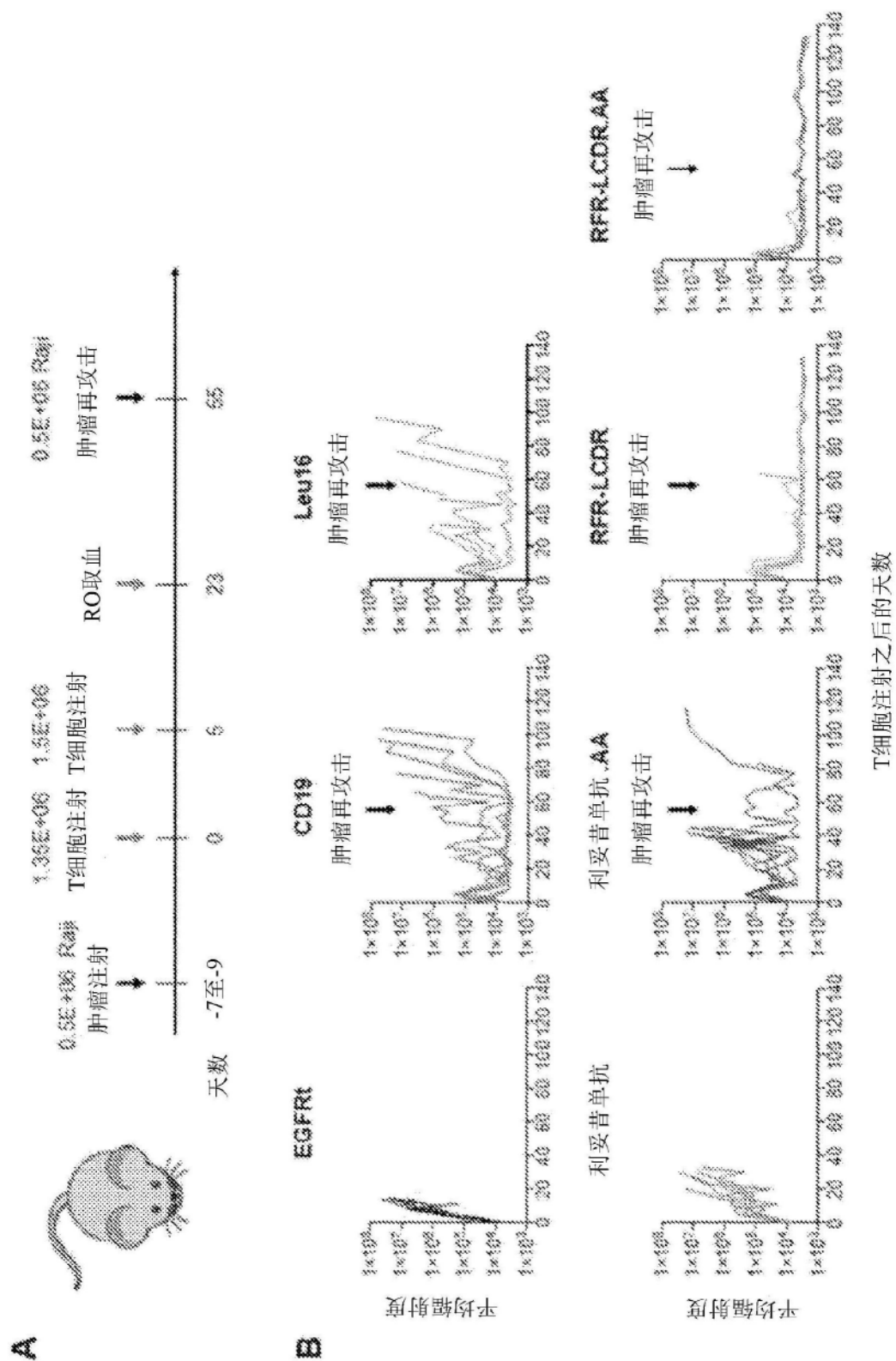


图44A-B

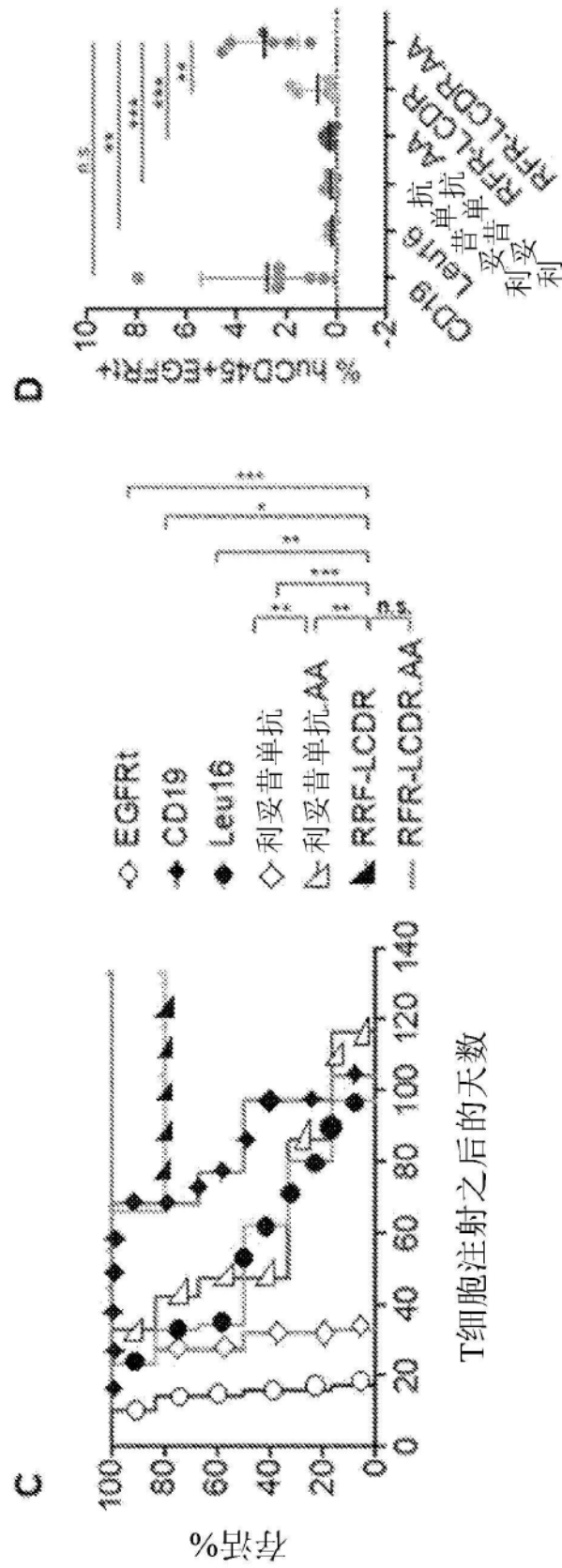


图44C-D

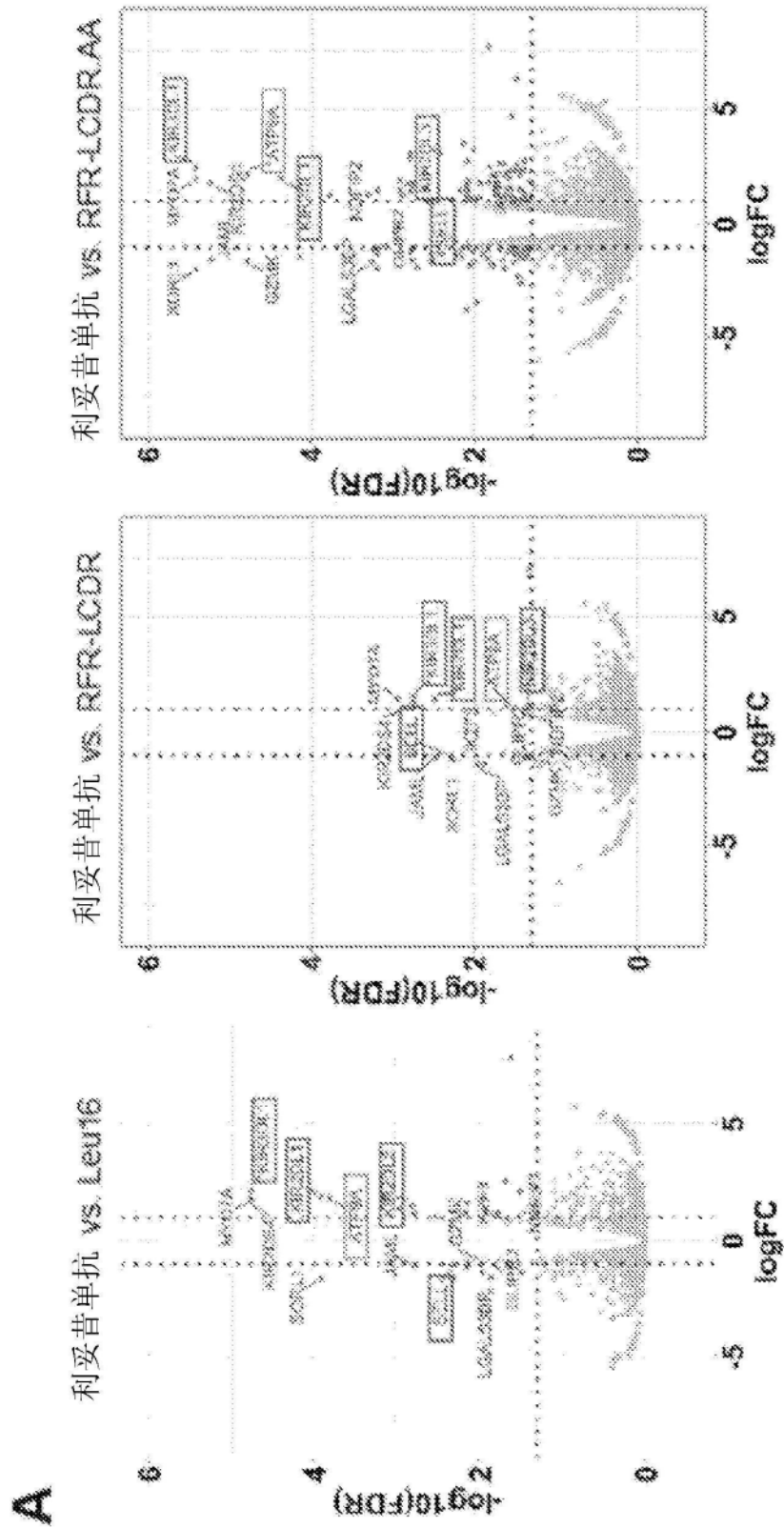


图45A

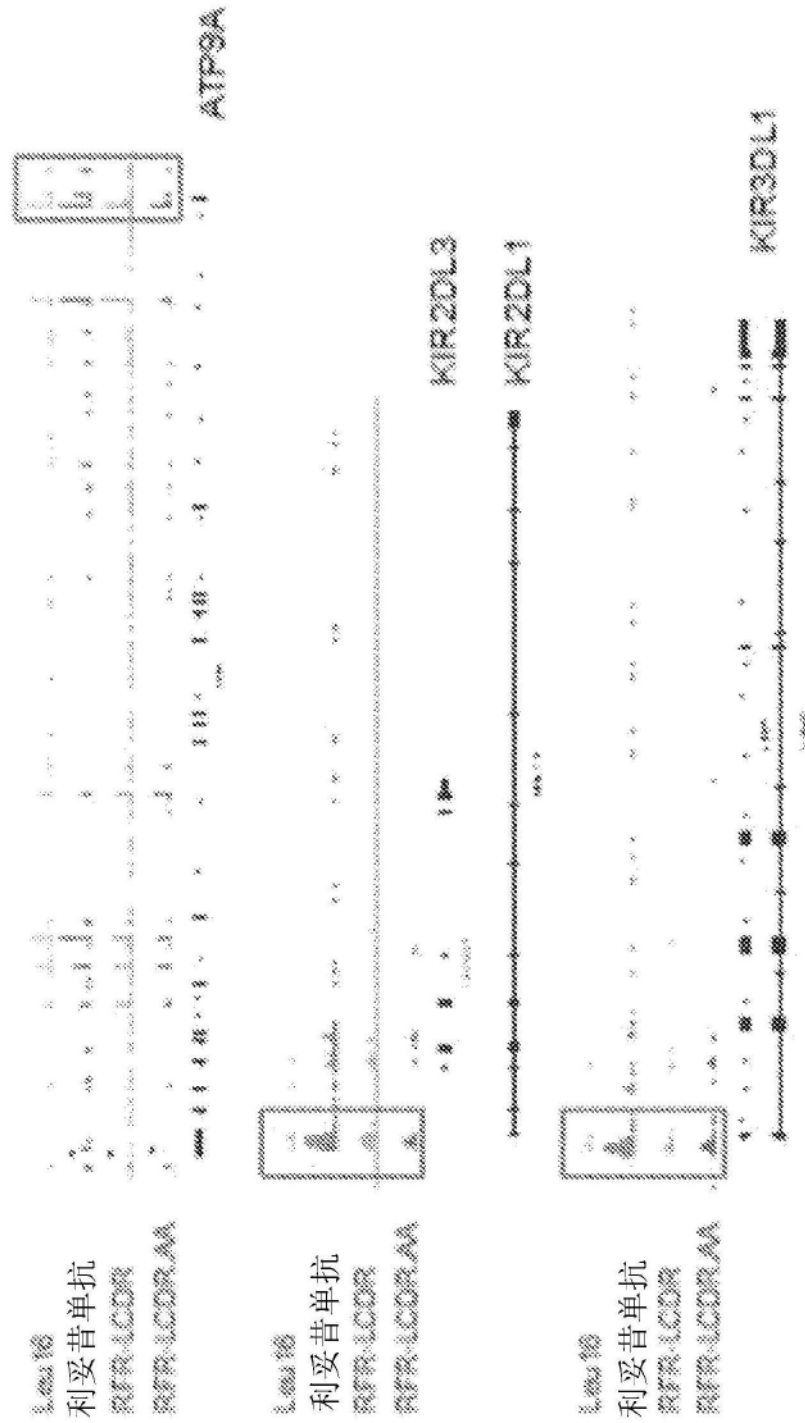
B

图45B

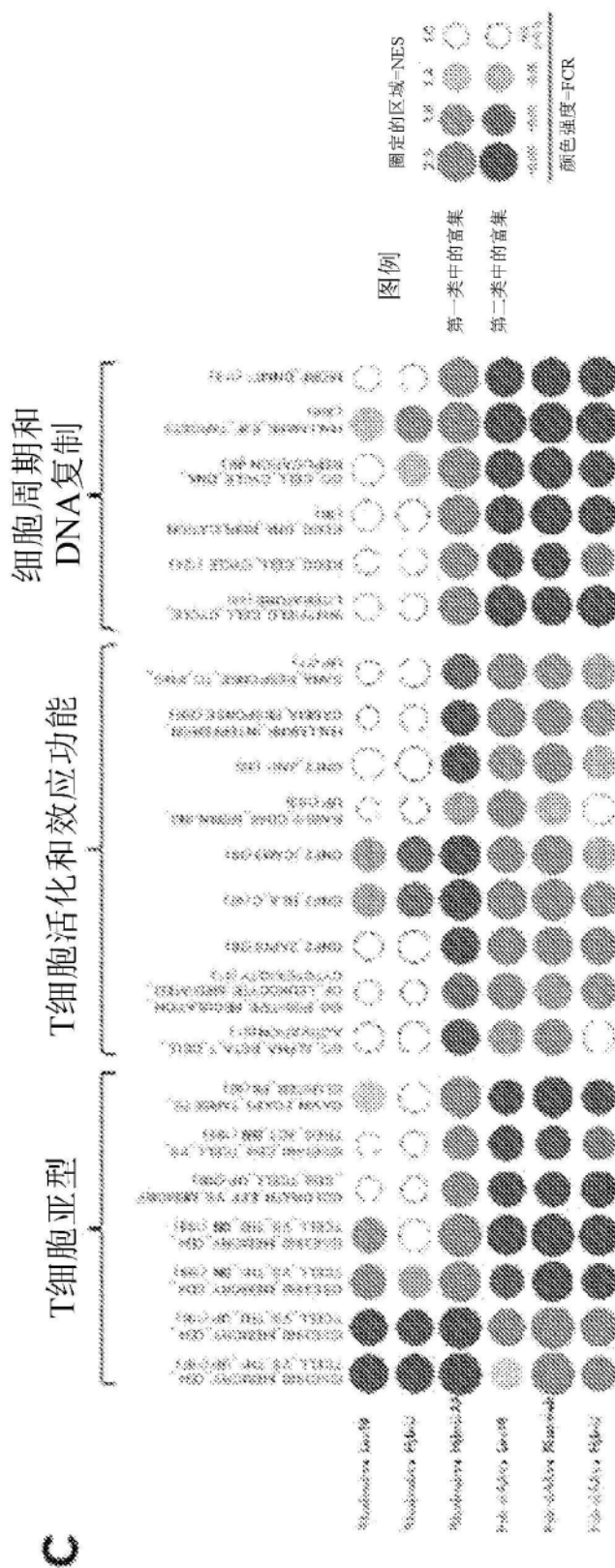


图45C