



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573989 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 01

(21) 申请号 201580045056.1
(22) 申请日 2015.08.28
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106573989 A
(43) 申请公布日 2017.04.19
(30) 优先权数据
 1415347.2 2014.08.29 GB
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.02.21
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/GB2015/052494 2015.08.28
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/030691 EN 2016.03.03
(73) 专利权人 奥托路斯有限公司
 地址 英国伦敦
(72) 发明人 M. 普勒 S. 科多巴 K. 孔
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 代理人 邹宗亮 张文辉

(51) Int.Cl.
 C07K 19/00 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01)
 C12N 5/0783 (2010.01)
 A61K 35/17 (2015.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 W0 2014127261 A1,2014.08.21
 Sylvia R.Luckner等.How an Agonist
 Peptide Mimics the Antibiotic
 Tetracycline to Induce Tet-Repressor.
 《J.Mol.Biol.》.2007,第368卷(第3期),780-
 790.
 Alex W.White等.Protein-protein
 interactions as targets for small-
 molecule therapeutics in cancer.《expert
 reviews in molecular medicine》.2008,第10
 卷1-14.
 审查员 李翠莹

权利要求书2页 说明书20页
序列表18页 附图15页

(54) 发明名称
 信号传导系统

(57) 摘要
 本发明提供嵌合抗原受体(CAR) 信号传导系
 统,其包含:(i) 受体组分,其包含抗原结合结构
 域,跨膜结构域和第一结合结构域;和(ii) 细胞
 内信号传导组分,其包含信号传导结构域和特异
 性结合所述受体组分的第一结合结构域的第二
 结合结构域;其中,所述第一和第二结合结构域
 的结合被试剂的存在破坏,使得在所述试剂不存
 在的情况下,所述受体组分和所述信号传导组分
 异二聚化,且所述抗原结合结构域对抗原的结合
 导致通过所述信号传导结构域的信号传导,而在
 所述试剂的存在下,所述受体组分和所述信号传
 导组分不异二聚化,而所述抗原结合结构域对抗
 原的结合不导致通过所述信号传导结构域的信

CN 106573989 B

1. 嵌合抗原受体 (CAR) 系统, 其包含:

(i) 受体组分, 其包含抗原结合结构域, 跨膜结构域和第一结合结构域; 和

(ii) 细胞内信号传导组分, 其包含信号传导结构域和特异性结合所述受体组分的第一结合结构域的第二结合结构域;

其中所述第一结合结构域和第二结合结构域之间的结合被试剂的存在破坏, 使得在所述试剂不存在的情况下, 所述受体组分和所述信号传导组分异二聚化, 且所述抗原结合结构域对抗原的结合导致通过所述信号传导结构域的信号传导, 而在所述试剂的存在下, 所述受体组分和所述信号传导组分不异二聚化, 且所述抗原结合结构域对抗原的结合不导致通过所述信号传导结构域的信号传导,

其中所述第一结合结构域包含Tet阻抑蛋白 (TetR), 且所述第二结合结构域包含转录诱导肽 (Tip), 或其中所述第一结合结构域包含Tip, 且所述第二结合结构域包含TetR;

和所述试剂是四环素、多西环素或米诺环素。

2. 根据权利要求1的CAR系统, 其中所述受体组分在所述跨膜结构域和所述第一结合结构域之间包含接头。

3. 根据权利要求2的CAR系统, 其中所述接头包含SEQ ID NO:3所示的序列, 或由SEQ ID NO:3所示的序列组成。

4. 根据前述权利要求中任一项的CAR系统, 其中所述受体组分包含两个第一结合结构域, 其为TetR结构域。

5. 根据权利要求4的CAR系统, 其中所述两个TetR结构域通过接头分开。

6. 根据权利要求4或5的CAR系统, 其中每个TetR结构域对所述试剂具有不同的亲和力。

7. 根据前述权利要求中任一项的CAR系统, 其中存在多个受体组分, 每个识别不同的抗原。

8. 根据权利要求7的CAR系统, 其中所述多个受体组分的结合结构域在结合所述信号传导组分的结合结构域上不同, 使得每个抗原传播不同的信号传导强度。

9. 根据权利要求7或8的CAR系统, 其中所述多个受体组分的结合结构域在结合所述试剂上不同, 使得在所述试剂存在下每个抗原传播不同的信号强度。

10. 根据权利要求1至8中任一项的CAR系统, 其中所述信号传导组分的信号传导结构域包含选自CD3 zeta胞内域 (endodomain), CD28胞内域, 41BB胞内域和OX40胞内域的单个胞内域。

11. 根据前述权利要求中任一项的CAR系统, 其中所述信号传导组分的信号传导结构域包含CD3 zeta胞内域, CD28胞内域, 41BB胞内域和OX40胞内域的至少一个。

12. 根据前述权利要求中任一项的CAR系统, 其包含多个信号传导组分, 每个信号传导组分包含信号传导结构域和结合结构域, 其中所述结合结构域各自识别所述受体组分的相同的结合结构域, 但所述信号传导结构域包含不同的胞内域。

13. 根据权利要求12的CAR系统, 其中所述多个信号传导组分包含多个结合结构域, 每个结合结构域以不同的亲和力独立地识别所述受体组分的结合结构域。

14. 编码根据权利要求1至13中任一项的CAR系统的核酸序列, 其中依靠自切割肽共表达所述受体组分和所述信号传导组分, 所述自切割肽在翻译后在所述受体组分和所述信号传导组分之间切割。

15. 载体,其包含根据权利要求14的核酸序列。
16. 逆转录病毒载体或慢病毒载体或转座子,其包含根据权利要求15的载体。
17. T细胞或NK细胞,其表达根据权利要求1至13中任一项的CAR系统。
18. 根据权利要求17的T细胞或NK细胞,其包含根据权利要求14的核酸序列或根据权利要求15或16的载体。
19. 药物组合物,其包含多个根据权利要求17或18的T细胞或NK细胞。
20. 根据权利要求19的药物组合物,其用于治疗 and/或预防疾病的用途。
21. 根据权利要求20使用的药物组合物,其中所述疾病是癌症。
22. 根据权利要求19的药物组合物在制备用于在受试者中治疗和/或预防癌症、感染或病原性免疫应答的药物中的用途。
23. 根据权利要求22的用途,其中所述制备包括以下步骤:
 - (i) 分离含有T细胞或NK细胞的样品;
 - (ii) 用根据权利要求14的核酸序列或根据权利要求15或16的载体转导或转染所述T细胞或NK细胞;和其中所述治疗包括以下步骤:
 - (iii) 将来自(ii)的所述T细胞或NK细胞施用至受试者。
24. 根据权利要求22或23的用途,其涉及在所述受试者中监测毒性活性,并包括向所述受试者施用用于根据权利要求1至13中任一项的CAR系统的试剂,以减少不利的毒性效果。
25. 根据权利要求23或24的用途,其涉及在所述受试者中监测疾病进展和/或监测毒性活性,并包括向所述受试者施用用于根据权利要求1至13中任一项的CAR系统的试剂,以提供可接受水平的疾病进展和/或毒性活性。
26. 根据权利要求22至25中任一项所述的用途,其中所述疾病是癌症。
27. 试剂盒,其包含根据权利要求14的核酸序列或根据权利要求15或16的载体。
28. 制备根据权利要求17或18的T细胞或NK细胞的方法,其包括将根据权利要求14的核酸序列或根据权利要求15或16的载体导入T细胞或NK细胞的步骤。
29. 根据权利要求28的方法,其中所述T细胞或NK细胞来自从受试者分离的样品。
30. 用于抑制根据权利要求1至13中任一项的CAR系统的试剂在制备用于在受试者中抑制所述CAR系统的药物中的用途,所述受试者包含根据权利要求17或18的T细胞或NK细胞。

信号传导系统

发明领域

[0001] 本发明涉及嵌合抗原受体信号传导系统。

[0002] 发明背景

[0003] 传统上,通过选择性扩增对靶抗原天然地特异性的外周血T细胞生成抗原特异性T细胞。然而,选择和扩增大量对于大多数癌症抗原特异性的T细胞是困难的且很多时候是不可能的。使用整合载体的基因疗法提供了该问题的解决方案,因为嵌合抗原受体(CAR)的转基因表达允许生成大量对于任何表面抗原特异性的T细胞,其通过对外周血T细胞的混合群体(bulk population)离体病毒载体转导实现。

[0004] 嵌合抗原受体是将单克隆抗体(mAb)的特异性移植至T细胞的效应功能的蛋白。它们通常的形式是I型跨膜域蛋白的,其中抗原识别的氨基末端,间隔区,跨膜域全部连接至传输T细胞存活和活化信号的复合胞内域(compound endodomain)(见图1A)。

[0005] 这些分子的最常见的形式是源自识别靶抗原的单克隆抗体的单链可变片段(scFv)经由间隔区和跨膜域融合至信号传导胞内域。此类分子响应scFv对其靶标的识别而导致T细胞的活化。当T细胞表达此类CAR时,它们识别并杀死表达靶抗原的靶细胞。已经开发了几种针对肿瘤相关抗原的CAR,且使用表达此类CAR的T细胞的过继转移方法目前在临床研究中用于各种肿瘤的治疗。

[0006] 从CAR研究已经报道了一些毒性,且存在另外的理论上的毒性。此类毒性包括由CAR T细胞的持续的强烈活化导致的免疫毒性,其导致巨噬细胞活化综合征(MAS)和“中靶脱肿瘤(On-target off-tumour)”毒性,即对正常组织上的靶抗原的识别。

[0007] 推测MAS是由持续的抗原驱动的T细胞活化和增殖导致的,其继而释放大量的炎症细胞因子,导致巨噬细胞的过度活化和免疫活化的前馈循环。血清IL-6中的大波峰(spike)是特征性的,并且该综合征可导致需要ICU收治的严重全身性疾病。

[0008] 已经报道了使用其它CAR的中靶脱肿瘤毒性,例如用针对肾细胞癌抗原CAIX的CAR治疗的一组患者形成了意想不到的和治疗限制性的胆毒性。已经报道了CAR研究的两例死亡(fatality):一名患者死于呼吸窘迫综合征,其在输注大剂量的第三代抗ERBB2CAR T细胞后立刻发生;不同的研究中的另一名患者在用第二代抗CD19CAR治疗CLL后的可能的细胞因子风暴后死亡。

[0009] 即使有详细的动物研究或非人类灵长类动物的工作,这些毒性也很难预测。至关重要的是,与小分子和生物制剂不同,CAR T细胞不具有半衰期,并且不能停止给药并等待试剂(agent)分解/被排泄。CAR T细胞是自主的,并且可以移植和增殖。因此,毒性可以是进行性的和暴发性的。

[0010] 自杀基因是遗传表达的元件,其可以有条件地破坏表达它们的细胞。实例包括单纯疱疹病毒胸苷激酶,其使细胞对更昔洛韦(Ganciclovir)易感;诱导型Caspase 9,其使得细胞对小分子同二聚体和CD20易感,和RQR8,其使得细胞对利妥昔单抗(Rituximab)易感。

[0011] 这种技术为CAR T细胞治疗增加了一定量的安全性,但是存在局限性。首先,它是一种二元方法(binary approach),其中在添加自杀剂时所有CAR T细胞被破坏。此外,药物

治疗剂通常具有治疗窗口。对于自杀基因,不能微调(tune)产物的效力,使得可以实现具有可耐受的毒性的功效。其次,不清楚自杀基因是否将有助于上述一些免疫毒性:例如,到已经触发了巨噬细胞活化综合征的时间,它可能完全不再需要CAR T细胞永存,并且自杀基因将不再有帮助。更急性的细胞因子释放综合征可能发生太快以至于自杀基因无法工作。

[0012] 因此,需要用于控制与上述缺点和问题无关的CAR T细胞的替代方法。

[0013] 附图简述

[0014] 图1-a)示出了经典CAR的示意图。(b)至(d):CAR胞内域的不同代和排列:(b)初始设计仅通过Fc ϵ R1- γ 或CD3 ζ 胞内域传递ITAM信号,而后来的设计在相同的复合胞内域中传递另外的(c)一个或(d)两个共刺激信号。

[0015] 图2-TetR和TiP的结构。(a)附着在任意蛋白质的氨基末端的TiP的序列;(b)与TetR相互作用的TiP的晶体衍生结构(来自PDB 2NS8和Luckner等人(J.Mol.Biol.368,780-790(2007))。可以看到TiP在TetR同二聚体内深入接合(engaged),与四环素缔合的许多残基缔合。

[0016] 图3-(a)膜跨越受体组分(membrane spanning receptor component)包含细胞外抗原结合结构域,跨膜结构域和连接至TetR的细胞内接头。单独的分子即信号传导组分包含通过将TiP与一个或几个T细胞信号传导结构域融合产生的细胞内蛋白质。在不存在四环素或四环素类似物的情况下,受体和信号传导组分相互作用,并且在关联(cognate)抗原存在下系统发出信号。(b)在四环素或四环素类似物存在下,TiP从TetR置换出来,并且即使在关联抗原存在下受体也不能传递信号。

[0017] 图4-衍生自CD4的细胞内接头结构域。

[0018] 图5-具有eGFP的测试构建体以证明系统的功能。(a)表达为单个转录物的双顺反子构建体,所述单个转录物在2A位点自切割以产生:与eGFP融合的TiP;和具有TetR作为其胞内域的CAR。(b)在不存在四环素的情况下表达该构建体的SupT1细胞的荧光显微照片。在细胞膜上可以清楚地看到eGFP荧光;(c)相同细胞但现在在四环素存在下的荧光显微照片。这里,eGFP是细胞质的,显示四环素已经置换了TiP。

[0019] 图6-初始TetCAR构建体和对照(a)表达为单个转录物的双顺反子构建体,所述单个转录物在2A位点自切割以产生:信号传导组分,其包含通过柔性接头与CD3-Zeta的胞内域融合的TiP;和受体组分,其包含识别scFv的CD33,源自IgG1的Fc结构域的间隔区,CD4衍生的跨膜和胞内结构域(intracellular domain);和TetR。(b)还构建了对照,其除了信号传导组分中不存在TiP外是相同的。(c)显示了基础TetCAR的带注释的氨基酸序列。

[0020] 图7-初始TetR构建体与对照相比的功能。(a) TetCAR在BW5T细胞中表达。这些T细胞用野生型SupT1细胞或工程化改造以表达CD33的SupT1细胞在不存在四环素或在递增浓度的四环素存在下攻击。在存在或不存在四环素的情况下用野生型SupT1细胞攻击的T细胞不活化;在四环素不存在下用表达CD33的SupT1细胞攻击的T细胞活化,但是在四环素存在下活化被快速抑制,其中在100nM四环素存在下完全抑制活化。(b)将缺乏TiP结构域的对照TetCAR转入BW5。再一次,在不存在或存在增加浓度的四环素的情况下,用野生型SupT1细胞或工程化改造以表达CD33的SupT1细胞攻击这些T细胞。信号传导组分中缺乏TiP元件导致在任何条件下没有信号传导。

[0021] 图8-双重tetR结构域tetCAR。tetR表达为具有附接在一起的两个TetR的单链。如

果使用对四环素(从而对TiP)具有不同亲和力的tetR结构域,则四环素介导的TiP置换的动力学可以调节信号传导的水平。

[0022] 图9-利用含有单个胞内域多个转导信号组分的tetCAR信号传导系统。与复合信号传导结构域相反,单个CAR与许多不同的信号传导组分一起表达,所有这些信号传导组分包含在其氨基末端的TiP,但是不同的个体信号传导结构域。这些随机与受体组分相互作用。不同的信号传导结构域和它们的第二信使之间空间相互作用的缺乏改善它们的功能。

[0023] 图10-使用包含单个胞内域和不同TiP结构域多个信号传导组分的tetCAR信号传导系统。每个信号传导组分包括个体信号传导结构域。每个信号传导组分还包括TiP,然而每个TiP对TetR结构域具有不同的亲和力。因此,CAR和信号传导结构域之间的相互作用的化学计量可以变化。在所示的实例中,信号传导系统被构建为使得OX40>CD3Zeta>CD28。

[0024] 图11-利用多个受体组分和多个信号传导组分的tetCAR信号传导系统,每个信号传导组分含有单个胞内域。

[0025] 图12-原代细胞中的TetCAR信号传导(a)测试的不同构建体:(i)经典CAR;(ii)tetCAR;(iii)对照tetCAR,其中TiP已缺失。(b)对CD19染色的非转导的细胞和SupT1.CD19细胞;(c)用抗-Fc染色的非转导的T细胞和使用不同CAR构建体转导的T细胞。

[0026] 图13-在不同浓度的四环素中用SupT1细胞,SupT1.CD19细胞攻击的非转导的T细胞和用不同CAR构建体((i)经典的第一代CAR,(ii)tetCAR和(iii)对照tetCAR)转导的T细胞的干扰素- γ 释放。

[0027] 图14-对靶细胞的杀死。使用铬释放测定来证明在不存在四环素的情况下对靶细胞(SupT1.CD19)的杀死。说明:(i)-常规CAR;(ii)-tetCAR;(iii)-对照tetCAR(在胞内域上没有TiP)。

[0028] 发明简述

[0029] 本发明人已经发现,可以分离CAR的抗原识别和信号传导组分以产生系统,其中尽管抗原与CAR系统的抗原识别组分持续结合仍可以快速抑制/终止信号传导。该信号传导的抑制在试剂,如小分子的存在下发生,所述试剂抑制否则将在CAR的细胞外抗原结合组分(本文称为受体组分)和细胞内信号传导组分之间发生的共定位和相互作用。

[0030] 因此,在第一方面,本发明提供了嵌合抗原受体(CAR)系统,其包含:

[0031] (i)受体组分,其包含抗原结合结构域,跨膜结构域和第一结合结构域;和

[0032] (ii)细胞内信号传导组分,其包含信号传导结构域和特异性结合受体组分的第一结合结构域的第二结合结构域;

[0033] 其中,所述第一和第二结合结构域的结合被试剂的存在破坏,使得在所述试剂不存在时,受体组分和信号传导组分异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合导致通过信号传导结构域的信号传导,而在试剂存在下,受体组分和信号传导组分不异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合不导致通过信号传导结构域的信号传导。

[0034] 受体组分可以包含在跨膜结构域和第一结合结构域之间的接头。

[0035] 接头可以包含SEQ ID NO:3所示的序列或由SEQ ID NO:3所示的序列组成。

[0036] 第一结合结构域可包含Tet阻抑蛋白(TetR)或其变体,而第二结合结构域可包含TetR诱导肽(TiP,如Klotzsche等人;The Journal of biological chemistry;2005;280(26);24591-9所述)(TiP);或相反亦然。在这种情况下,该试剂可以是四环素,多西环素

(doxycycline) 或米诺环素 (minocycline) 或其类似物。

[0037] 受体组分可以包含两个第一结合结构域, 其是TetR结构域。所述两个TetR结构域可以通过接头分开。每个TetR结构域可以对该试剂具有不同的亲和力。

[0038] 本发明第一方面的CAR系统可以包含多个受体组分, 每个识别不同的抗原。

[0039] 多个受体组分的第一结合结构域可以在与信号传导组分的第二结合结构域的结合上不同, 使得每个抗原传播不同的信号传导强度。

[0040] 多种受体组分的第一结合结构域可以在与试剂的结合上不同, 使得每种抗原在试剂存在下传播不同的信号传导强度。

[0041] 信号传导组分的信号传导结构域可以包含选自CD3zeta胞内域, CD28胞内域, 41BB胞内域和OX40胞内域的单个胞内域。

[0042] 信号传导组分的信号传导结构域可以包含CD3zeta胞内域, CD28胞内域, 41BB胞内域和OX40胞内域中的至少一种。

[0043] 本发明第一方面的CAR系统可以包括多个信号传导组分, 每个包括信号传导结构域和第二结合结构域, 其中第二结合结构域各自识别受体组分的相同的第一结合结构域, 但信号传导结构域包含不同的胞内域。

[0044] 多个信号传导组分可以包括多个第二结合结构域, 其中每个以不同的亲和力独立地识别受体组分的第一结合结构域。

[0045] 在第二方面, 本发明提供了适用于本发明第一方面的CAR系统的受体组分, 其包含抗原结合结构域, 跨膜结构域和第一结合结构域。

[0046] 在第三方面, 本发明提供了适用于本发明第一方面的CAR系统的信号传导组分, 其包含信号传导结构域和第二结合结构域。

[0047] 在第四方面, 本发明提供了编码根据本发明第二方面的受体组分的核酸序列。

[0048] 在第五方面, 本发明提供了编码根据本发明第三方面的信号传导组分的核酸序列。

[0049] 在第六方面, 本发明提供编码本发明第一方面的CAR系统的核酸序列, 其中所述受体组分和信号传导组分依靠自剪切肽共表达, 所述自剪切肽在翻译后在受体组分和信号传导组分之间剪切。

[0050] 在第七方面, 本发明提供了包含根据本发明的第四至第六方面的核酸序列的载体。

[0051] 在第八方面, 本发明提供了包含根据本发明第七方面的载体的逆转录病毒载体或慢病毒载体或转座子。

[0052] 在第九方面, 本发明提供了表达根据本发明第二方面的受体组分和根据本发明第三方面的信号传导组分的T细胞或NK细胞。

[0053] 所述T细胞或NK细胞可以包含根据本发明的第四至第六方面的核酸或根据本发明的第七或第八方面的载体。

[0054] 在第十方面, 本发明提供了包含根据本发明第九方面的多种T细胞或NK细胞的药物组合物。

[0055] 在第十一方面, 本发明提供根据本发明第十方面的药物组合物, 其用于治疗 and/或预防疾病。

[0056] 在第十二方面,本发明涉及用于治疗 and/or 预防疾病的方法,其包括向受试者施用根据本发明的第十方面的药物组合物的步骤。

[0057] 根据本发明的第十二方面的方法可以包括以下步骤:

[0058] (i) 分离含有T细胞或NK的样品;

[0059] (ii) 用根据本发明的第四至第六方面中任一项的核酸序列或根据本发明的第七或第八方面的载体转导或转染T细胞或NK细胞;并且

[0060] (iii) 将来自(ii)的T细胞或NK细胞施用至受试者。

[0061] 该方法可以涉及向受试者施用T细胞/NK细胞,所述T细胞/NK细胞先前已经从受试者分离并且用根据本发明的第四至第六方面中任一项的核酸序列或者根据本发明的第七或第八方面的载体转导/转染。

[0062] 根据本发明第十二方面的方法可以包括监测受试者中的毒性活性,并且包括将用于本发明第一方面的CAR系统中的试剂施用至受试者以减少不利毒性作用的步骤。

[0063] 该方法可以涉及监测受试者中的疾病进展和/or 监测毒性活性,并且包括将用于本发明第一方面的CAR系统中的试剂施用至受试者以提供可接受水平的疾病进展和/or 毒性活性的步骤。

[0064] 在使用根据本发明的第十方面的药物组合物或根据本发明的第十二方面的方法中,所述疾病可以是癌症。

[0065] 在第十三方面,本发明涉及根据本发明第十方面的药物组合物在制备用于治疗 and/or 预防疾病的药物中的用途。

[0066] 在第十四方面,本发明提供试剂盒,其包含根据本发明的第四至第六方面的核酸或根据本发明的第七或第八方面的载体。

[0067] 在第十五方面,本发明涉及用于制备根据本发明第九方面的T细胞或NK细胞的方法,其包括将根据本发明第四至第六方面的核酸序列或根据本发明第七或第八方面的载体导入T细胞或NK细胞。

[0068] T细胞或NK细胞可来自从受试者分离的样品。

[0069] 在第十六方面,本发明涉及在受试者中抑制根据本发明第一方面的CAR系统的方法,所述受试者包含根据本发明的第九方面的T细胞或NK细胞,该方法包括向受试者施用试剂的步骤。

[0070] 因此,本发明提供了CAR系统,其中可以在试剂,如小分子的存在下抑制信号传导,所述试剂阻止受体组分和信号传导组分的共定位。这允许CAR信号传导和从而CAR细胞的效力以可控的方式可逆地终止,以避免与未减退的CAR信号传导相关的潜在毒性作用。此外,本系统还允许在药理学上控制CAR细胞的效力并微调至实现期望的治疗效果和避免不想要的毒性之间的可接受的平衡。

[0071] 发明详述

[0072] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0073] 经典的CAR,其在图1中示意性显示,是将细胞外抗原识别结构域(结合剂)连接到细胞内信号传导结构域(胞内域)的嵌合I型跨膜蛋白。结合剂通常是衍生自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv),但其可基于包含抗体样抗原结合位点的其它形式。间隔区域可以是必要的,以将结合剂从膜分离并允许其具有合适的定向。使用的常见间隔区结构域

是IgG1的Fc。取决于抗原,更紧凑的间隔区可以满足,例如来自CD8 α 的茎,甚至仅单独的IgG1铰链。跨膜结构域将蛋白质锚定在细胞膜中并将间隔区连接到胞内域。

[0074] 早期CAR设计具有源自Fc ϵ R1或CD3 ζ 的 γ 链的胞内部分的胞内域。因此,这些第一代受体传递免疫信号1,其足以触发T细胞对关联靶细胞的杀伤,但不能完全激活T细胞增殖和存活。为了克服这种限制,已经构建了复合胞内域:将T细胞共刺激分子的细胞内部分与CD3 ζ 的细胞内部分融合产生第二代受体,其可以在抗原识别后同时传递活化和共刺激信号。最常用的共刺激结构域是CD28的共刺激结构域。这提供最有力的共刺激信号-即免疫信号2,其引发T细胞增殖。还描述了一些受体,其包括TNF受体家族胞内域,如传播存活信号的密切相关的OX40和41BB。现在已经描述了甚至更有力的第三代CAR,其具有能够传递激活,增殖和存活信号的胞内域。

[0075] 可以使用例如逆转录病毒载体将编码CAR的核酸转移到T细胞。以这种方式,可以产生大量的抗原特异性T细胞用于过继性细胞转移。当CAR结合靶抗原时,这导致激活信号传输到表达其的T细胞。因此,CAR指导T细胞对表达靶定抗原的细胞的特异性和细胞毒性。

[0076] 在第一方面,本发明涉及CAR系统,其中抗原识别/抗原结合结构域和跨膜结构域提供在第一分子(本文称为“受体组分”)上,所述第一分子定位于细胞膜。细胞内信号传导结构域提供在第二细胞内分子(本文称为“信号传导组分”)上。

[0077] 重要的是,受体组分包含第一结合结构域,并且信号传导组分包含第二结合结构域,其特异性结合受体组分的第一结合结构域。因此,第一结合结构域与第二结合结构域的结合引起受体组分和信号传导组分的异二聚化和共定位。当抗原结合受体组分的抗原结合结构域时,存在通过信号传导组分的信号传导。

[0078] 除了相互结合结构域之外,第一或第二结合结构域还能够结合另外的试剂。所述另外的试剂可以是例如小分子。试剂与第一或第二结合结构域之间的结合具有比第一结合结构域和第二结合结构域之间的结合更高的亲和力。因此,当试剂存在时,它优先结合第一或第二结合结构域并抑制/破坏受体组分和信号传导组分之间的异二聚化。当在另外的试剂存在下抗原结合受体组分的抗原结合结构域时,没有通过信号传导组分的信号传导。

[0079] 具体地,在试剂存在下,受体组分和信号传导组分以随机分散的方式定位,并且通过受体组分的抗原结合结构域结合抗原不会导致通过信号传导组分的信号传导。

[0080] 本文中,受体和信号传导组分的“共定位”或“异二聚化”类似于通过受体组分的第一结合结构域和信号传导组分的第二结合结构域的结合将信号传导组分连接(ligation)/募集到受体组分。

[0081] 在试剂存在下,受体组分的抗原结合可以称为导致通过信号传导组分“非产生性(non-productive)”信号传导。此类信号传导不导致细胞活化,例如T细胞活化。在不存在试剂的情况下受体组分的抗原结合可以称为产生通过信号传导组分的“产生性”信号传导。该信号传导导致T细胞活化,触发例如靶细胞杀伤和T细胞活化。

[0082] 在不存在试剂的情况下,受体组分的抗原结合可导致通过信号传导组分的信号传导,其比当试剂存在下抗原被受体组分结合时发生的信号传导高2,5,10,50,100,1,000或10,000倍。

[0083] 可以通过本领域已知的各种方法来确定通过信号传导组分的信号传导。此类方法包括测定信号转导,例如测定特定蛋白酪氨酸激酶(PTK)的水平,磷脂酰肌醇4,5-二磷酸

(PIP2)的分解,蛋白激酶C(PKC)的激活和细胞内钙离子浓度的升高。还可以利用功能性读出,例如T细胞的克隆扩增,细胞表面上的活化标记物的上调,分化为效应细胞和诱导细胞毒性或细胞因子分泌。作为说明,在本实施例中,本发明人确定了在不同浓度的试剂的存在下当抗原与受体组分结合时,由表达根据本发明的CAR系统的受体组分和信号传导组分的T细胞产生的白细胞介素-2(IL-2)的水平。

[0084] 第一结合结构域,第二结合结构域和试剂

[0085] 本CAR系统的第一结合结构域,第二结合结构域和试剂可以是能够在不存在试剂的情况下使受体组分和信号传导组分选择性共定位和二聚化的分子/肽/结构域的任何组合。

[0086] 因此,第一结合结构域和第二结合结构域能够特异性结合。

[0087] 本发明的信号传导系统不受特定二聚化系统的排列的限制。受体组分可以包含给定二聚化系统的第一结合结构域或第二结合结构域,只要信号传导组分包含相应的互补结合结构域,其使得受体组分和信号传导组分能够在不存在试剂的情况下共定位。

[0088] 第一结合结构域和第二结合结构域可以是肽结构域和肽结合结构域;或相反亦然。肽结构域和肽结合结构域可以是能够特异性结合的肽/结构域的任何组合。

[0089] 试剂是分子,例如小分子,其能够以比第一结合结构域和第二结合结构域之间的结合更高的亲和力特异性结合第一结合结构域或第二结合结构域。

[0090] 例如,结合系统可以基于肽:肽结合结构域系统。第一或第二结合结构域可以包含肽结合结构域,并且另一个结合结构域可以包含以比肽低的亲和力结合肽结合结构域的肽模拟物。使用肽作为试剂通过竞争性结合破坏肽模拟物与肽结合结构域的结合。肽模拟物可以具有与“野生型”肽类似的氨基酸序列,但具有一个或多个氨基酸改变以降低对肽结合结构域的结合亲和力。

[0091] 例如,所述试剂可以以比第一结合结构域和第二结合结构域之间的亲和力高至少10,20,50,100,1000或10000倍的亲和力结合第一结合结构域或第二结合结构域。

[0092] 试剂可以是任何药学上可接受的分子,其以比第一结合结构域和第二结合结构域之间的亲和力更高的亲和力优先结合第一结合结构域或第二结合结构域。

[0093] 试剂能够被递送至靶细胞的细胞质并且可用于细胞内结合。

[0094] 试剂可以能够穿过血脑屏障。

[0095] 用于控制肽的共定位的小分子系统是本领域已知的,例如Tet阻抑物(TetR),TetR相互作用蛋白(TiP),四环素系统(Klotzscheet等人;J.Biol.Chem.280,24591-24599(2005);Luckner等人;J.Mol.Biol.368,780-790(2007))。

[0096] Tet阻抑物(TetR)系统

[0097] Tet操纵子是已经适用于哺乳动物细胞中的公知的生物操纵子。TetR结合四环素作为同二聚体并经历构象变化,其然后调节TetR分子的DNA结合。Klotzsche等人(如上)描述了噬菌体展示衍生的肽,其活化TetR。该蛋白(TetR相互作用蛋白/TiP)在TetR中具有结合位点,其与四环素结合位点重叠但不相同(Luckner等人;如上)。因此,TiP和四环素竞争结合TetR。

[0098] 在本CAR系统中,受体组分的第一结合结构域可以是TetR或TiP,只要信号传导组分的第二结合结构域是相应的互补结合配偶体。例如,如果受体组分的第一结合结构域是

TetR,则信号传导组分的第二结合结构域是TiP。如果受体组分的第一结合结构域是TiP,则信号传导组分的第二结合结构域是TetR。

[0099] 例如,第一结合结构域或第二结合结构域可以包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的序列:

[0100] SEQ ID NO:1-TetR

[0101] MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLD RHHTHFCP
LEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGH

[0102] SEQ ID NO:2-TiP

[0103] MWTWNAYAFAAPSGGGS

[0104] TetR必须同二聚化以发挥功能。因此,当受体组分上的第一结合结构域是TetR时,受体组分可以包含跨膜结构域和第一结合结构域(TetR)之间的接头。接头使TetR与来自相邻受体组分的TetR能够同二聚化,并以正确的方向定向。

[0105] 接头可以是如SEQ ID NO:3所示的序列。

[0106] SEQ ID NO:3-修饰的CD4胞内域

[0107] ALIVLGGVAGLLLLFIGLGIFFCVRCRHRRRQAERMAQIKRVVSEKKTAQAPHRFQKTCSPI

[0108] 或者,接头可包含具有与SEQ ID NO:3所示序列相似的长度和/或结构域间隔特性的备选接头序列。

[0109] 接头可以与SEQ ID NO:3具有至少80%,85%,90%,95%,98%或99%的序列同一性,只要其提供了使TetR能够与来自相邻受体成分的TetR同二聚化并在正确的方向定向的功能。

[0110] TetR/TiP系统的一个潜在缺点是TetR是异种(xenogenic)和免疫原性的。因此,TetR序列可以是免疫原性较小但保留特异性结合TiP的能力的变体。

[0111] 当第一和第二结合结构域是TetR或TiP或其变体时,试剂可以是四环素,多西环素,米诺环素或其类似物。

[0112] 类似物是指保留特异性结合TetR的能力的四环素,多西环素或米诺环素的变体。

[0113] 可用于本CAR系统中的结合结构域和试剂的其它组合是本领域已知的。例如,CAR系统可以使用基于链霉亲合素/生物素的结合系统。

[0114] 链霉亲合素结合表位

[0115] 第一或第二结合结构域可以包含一个或多个链霉亲合素结合表位。其它结合结构域可以包含生物素模拟物。

[0116] 链霉亲合素是来自细菌Streptomyces avidinii的52.8kDa蛋白。链霉亲合素同四聚体对生物素(维生素B7或维生素H)具有非常高的亲和力,其中解离常数(Kd)为 $\sim 10^{-15}$ M。生物素模拟物比野生型生物素具有更低的对链霉亲合素的亲和力,使得生物素本身可以用作破坏或防止链霉亲合素结构域和生物素模拟物结构域之间的异二聚化的试剂。生物素模拟物可以例如以1nM至100uM的Kd结合链霉亲合素。

[0117] “生物素模拟物”结构域可以例如包含特异性结合链霉亲合素的短肽序列(例如6至20,6至18,8至18或8至15个氨基酸)。

[0118] 生物素模拟物可以包含如表1所示的序列。

[0119] 表1.生物素模拟肽

[0120]	名称	序列	亲和力
	长 nanotag	DVEAWLDERVPLVET (SEQ ID NO: 4)	3.6nM
[0121]	短 nanotag	DVEAWLGAR (SEQ ID NO: 5)	17nM
	Streptag	WRHPQFGG (SEQ ID NO: 6)	72 uM
	streptagII	WSHPQFEK (SEQ ID NO: 7)	
	SBP-tag	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARL EHHPQGQREP (SEQ ID NO: 8)	2.5 nM
	ccstreptag flankedccstreptag	CHPQGPPC (SEQ ID NO: 9) AECHPQGPPCIEGRK (SEQ ID NO: 10)	230 nM

[0122] 生物素模拟物可以选自以下组:StreptagII, Flankedccstreptag和ccstreptag。

[0123] 链霉亲合素结构域可以包含具有如SEQ ID No.11所示序列的链霉亲合素或保留了结合生物素的能力的其片段或变体。

[0124] 全长链霉亲合素具有159个氨基酸。加工159个残基全长蛋白的N和C末端以产生更短的“核心”链霉亲合素,通常由残基13-139组成;除去N和C末端对于高生物素结合亲和力是必需的。

[0125] “核心”链霉亲合素(残基13-139)的序列显示为SEQ ID No.11

[0126] SEQ ID No.11

[0127] EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNN
YRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS

[0128] 链霉亲合素作为同四聚体存在于自然界中。链霉亲合素单体的二级结构由八个反向平行的 β -链组成,其折叠以产生反向平行的 β 桶三级结构。生物素结合位点位于每个 β -桶的一端。四个相同的链霉亲合素单体(即四个相同的 β -桶)缔合以产生链霉亲合素的四聚体四级结构。每个桶中的生物素结合位点由来自桶内部的残基,以及来自相邻亚基的保守Trp120组成。以这种方式,每个亚基有助于相邻亚基上的结合位点,因此四聚体也可以被认为是功能性二聚体的二聚体。

[0129] 本发明的CAR系统的链霉亲合素结构域可以基本上由链霉亲合素单体,二聚体或四聚体组成。

[0130] 链霉亲合素单体,二聚体或四聚体的序列可以包含如SEQ ID No.11所示的序列的全部或部分,或其保留结合生物素的能力的变体。

[0131] 变体链霉亲合素序列可以与SEQ ID No.11或其功能性部分具有至少70,80,90,95或99%的同源性。变体链霉亲合素可包含参与生物素结合的一个或多个以下氨基酸:残基Asn23,Tyr43,Ser27,Ser45,Asn49,Ser88,Thr90和Asp128。变体链霉亲合素可以例如包含所有8个这些残基。当变体链霉亲合素作为二聚体或四聚体存在于结合结构域中时,其还可以包含参与通过相邻亚基的生物素结合的Trp120。

[0132] 已经开发出用于药物目的的破坏蛋白质-蛋白质相互作用的小分子试剂(由Vassilev等人;Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions ISBN:

978-3-642-17082-9综述)。如所述的CAR系统可以使用此类小分子。相互作用被破坏的蛋白质或肽(或这些蛋白质的相关片段)可以用作第一和/或第二结合结构域,且小分子可以用作抑制CAR活化的试剂。此类系统可以通过改变小分子和蛋白质来改变,使得系统功能如所描述的那样发挥功能,但是小分子没有不需要的药理活性(例如以类似于由Rivera等人,(Nature Med;1996;2;1028-1032)描述的方式)。

[0133] 在表2中给出其相互作用使用诸如小分子的试剂可破坏的蛋白质/肽的列表。这些可破坏的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)可以用于本发明的CAR系统中。关于这些PPI的进一步信息可从White等人2008(Expert Rev.Mol.Med.10:e8)获得。

[0134] 表2

[0135]	相互作用蛋白 1	相互作用蛋白 2	PPI 的抑制物
	p53	MDM2	Nutlin
	抗凋亡 Bcl2 成员	凋亡 Bcl2 成员	GX015 和 ABT-737
	Cacpase-3, -7 或-9	X 连锁的凋亡蛋白抑制物 (XIAP)	DIABLO 和 DIABLO 模拟物
	RAS	RAF	呋喃-茛衍生物
	FR2-7	DVL 的 PD2 结构域	FJ9
	T 细胞因子(TCF)	环 AMP 反应元件结合蛋白(CBP)	ICG-001

[0136] 与上述试剂竞争性结合相同的第一结合结构域,因此可用于在不存在试剂的情况下共定位本信号传导系统的受体组分和信号传导组分的第二结合结构域,可以使用本领域熟知的技术和方法鉴定。例如,可以通过单结构域VHH文库的展示来鉴定此类第二结合结构域。

[0137] 本信号传导系统的第一结合结构域和/或第二结合结构域可以包含能够特异性结合互相的结合结构域并因此促进受体组分和信号传导组分的共定位的变体。

[0138] 变体序列可以与野生型序列具有至少80%,85%,90%,95%,98%或99%的序列同一性,条件是所述序列提供有效的二聚化系统。也就是说,条件是所述序列在不存在试剂的情况下促进受体和信号传导组分的足够的共定位,用于在抗原结合结构域与抗原结合时发生产生性信号。

[0139] 本发明还涉及抑制本发明第一方面的CAR系统的方法,该方法包括施用试剂的步骤。如上所述,试剂的施用导致受体组分和信号传导组分之间的共定位的破坏,使得即使在抗原与抗原结合结构域结合时,通过信号传导组分的信号传导也被抑制。

[0140] 第一和第二结合结构域可以促进通过CAR系统的信号传导,所述CAR系统与存在的试剂的浓度成比例。因此,当试剂以比第一和第二结合结构域之间的结合亲和力更高的亲和力结合第一结合结构域或第二结合结构域时,受体和信号传导组分的共定位可能在低浓度的试剂存在下不完全消除。例如,低浓度的试剂可以响应抗原降低信号传导的总体水平,

而不完全抑制它。试剂的特定浓度将根据所需的信号传导水平和特定的结合结构域和试剂而不同。可以使用本领域已知的方法测定信号传导水平和与试剂浓度的相关性,如上所述。

[0141] 受体组分

[0142] 本发明提供了包含抗原结合结构域,任选的间隔区结构域,跨膜结构域和第一结合结构域的受体组分。当在细胞中表达时,受体组分定位于细胞膜。这里,分子的抗原结合结构域在膜的细胞外侧定向,且第一结合结构域定位于膜的细胞内侧。

[0143] 因此,受体成分提供本发明的CAR系统的抗原结合功能。

[0144] 抗原结合域

[0145] 抗原结合结构域是识别抗原的经典CAR的部分。在本发明的信号传导系统中,抗原结合位于受体组分内。

[0146] 许多抗原结合结构域是本领域已知的,包括基于抗体,抗体模拟物和T细胞受体的抗原结合位点的那些。例如,抗原结合结构域可以包括:源自单克隆抗体的单链可变片段(scFv);靶抗原的天然配体;对靶标具有足够亲和力的肽;单结构域结合剂,例如camelid;单一作为Darpin的人工结合剂;或衍生自T细胞受体的单链。

[0147] 各种肿瘤相关抗原(TAA)是已知的,如下表1中所示。本发明中使用的抗原结合结构域可以是能够结合其中所示的TAA的结构域。

[0148] 表1

[0149]	癌症类型	TAA
	弥散性大B细胞淋巴瘤	CD19,CD20
	乳腺癌	ErbB2,MUC1
	AML	CD13,CD33
	神经母细胞瘤	GD2,NCAM,ALK,GD2
	B-CLL	CD19,CD52,CD160
	结直肠癌	叶酸结合蛋白,CA-125
	慢性淋巴细胞性白血病	CD5,CD19
	胶质瘤	EGFR,波形蛋白
	多发性骨髓瘤	BCMA,CD138
	肾细胞癌	碳酸酐酶IX,G250
	前列腺癌	PSMA
	肠癌	A33

[0150] 跨膜结构域

[0151] 跨膜结构域是跨越膜的经典CAR的序列。在本发明的信号传导系统中,跨膜结构域位于受体组分中。其可以包含疏水 α 螺旋。跨膜结构域可以衍生自CD28,其提供良好的受体稳定性。

[0152] 信号肽

[0153] 本发明的CAR系统的受体组分可以包含信号肽,使得当受体组分在细胞,如T细胞中表达时,新生蛋白质被导向内质网,并且随后导向细胞表面,在那里它被表示。

[0154] 信号肽的核心可以包含具有形成单个 α -螺旋的趋势的疏水性氨基酸的长段(stretch)。信号肽可以以短的带正电荷的氨基酸段起始,这有助于在移位期间实施多肽的

正确拓扑学。在信号肽的末端,通常存在被信号肽酶识别和切割的氨基酸段。信号肽酶可在移位完成期间或之后切割以产生游离信号肽和成熟蛋白。游离信号肽然后被特定蛋白酶消化。

[0155] 信号肽可以在分子的氨基末端。

[0156] 信号肽可以包含如SEQ ID NO:12,13或14所示的序列或其具有5,4,3,2或1个氨基酸突变(插入,取代或添加)的变体,只要信号肽仍然发挥功能以引起CAR的细胞表面表达。

[0157] SEQ ID NO:12:MGTSLLCWMALCLLGADHADG

[0158] SEQ ID NO:12的信号肽是紧凑且高效的。预测在末端甘氨酸之后产生约95%的切割,提供通过信号肽酶的有效除去。

[0159] SEQ ID NO:13:MSLPVTALLLPLALLLHAARP

[0160] SEQ ID NO:13的信号肽源自IgG1。

[0161] SEQ ID NO:14:MAVPTQVLGLLLLWLTDARC

[0162] SEQ ID NO:14的信号肽源自CD8。

[0163] 间隔区结构域

[0164] 本文所述的CAR系统可包含间隔区序列以将抗原结合结构域与受体组分中的跨膜结构域连接。柔性间隔区允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进结合。

[0165] 间隔区序列可以例如包含IgG1Fc区,IgG1铰链或人CD8茎部或小鼠CD8茎部。或者,间隔物可包含具有与IgG1Fc区,IgG1铰链或CD8茎部类似的长度和/或结构域间隔特性的替代性接头序列。可以改变人IgG1间隔区以除去Fc结合基序。

[0166] 这些间隔区的氨基酸序列的实例如下给出:

[0167] SEQ ID NO:15(人IgG1的铰链-CH2CH3)

[0168] AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

[0169] SEQ ID NO:16(人CD8茎部):

[0170] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

[0171] SEQ ID NO:17(人IgG1铰链):

[0172] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

[0173] SEQ ID NO:18(CD2胞外域(ectodomain))

[0174] KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKKKIAQFRKEKETFKEDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD

[0175] SEQ ID NO:19(CD34胞外域)

[0176] SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSQYQETTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNARTEIS SKLQLMKKHQSDLKKGILDFTEQDVASHQSYSQKT

[0177] 包含多个第一结合结构域的受体组分

[0178] 受体组分可以包含多个第一结合结构域,因此能够募集多于一个信号传导组分。

[0179] 多个第一结合结构域可以存在于受体组分的单个细胞内结构域中。

[0180] 受体组分可以包含适当数目的跨膜结构域,使得每个第一结合结构域定向在细胞膜的细胞内侧。例如,受体组分可以包含3,5,7,9,11或更多个跨膜结构域。以这种方式,单个受体组分可以募集多个信号传导组分,放大响应于抗原的信号传导。

[0181] 第一结合结构域可各自是对信号传导组分的第二结合结构域具有不同亲和力的变体。

[0182] 多个受体组分

[0183] 在本发明的另一个实施方案中,CAR系统可以包含两个或更多个受体组分,其各自识别不同的抗原但包含相同的细胞内第一结合结构域。此类CAR系统将能够识别多种抗原(图11)。这可能有助于例如避免肿瘤逃逸。在本发明的另一个相关方面,受体组分的第一结合结构域在残基方面不同,所述残基规定了它们对信号传导组分的第二结合结构域的亲和力。以这种方式,可以微调CAR系统,使得响应一种抗原的信号传导大于或小于对另一种抗原的响应(图11)。这可以是有益的,例如当同时靶向两种肿瘤抗原但一种以比另一种更高的密度表达时。可以向下微调对该抗原的响应以避免由过度刺激引起的毒性。

[0184] 适于改变第一或第二结合结构域的氨基酸残基使得两个结构域之间的结合亲和力改变的方法是本领域已知的,并且包括使用靶向和随机诱变二者的氨基酸取代,添加和除去。用于测定第一结合结构域和第二结合结构域之间的结合亲和力的方法也是本领域熟知的,包括蛋白-蛋白相互作用,亲和电泳,表面等离子共振,生物层干涉测量,双重极化干涉测量,静态光散射和动态光散射。

[0185] 信号传导组分

[0186] 本发明还提供了包含信号传导结构域和第二结合结构域的信号传导组分。信号传导组分是可溶性分子,因此当其在细胞例如T细胞中表达时,其定位于细胞质。

[0187] 通过信号传导组分的信号传导结构域不发生信号传导,除非它与由本发明提供的受体组分共定位。此类共定位仅在不存在试剂的情况下发生,如上文所述。

[0188] 细胞内信号传导结构域

[0189] 细胞内信号传导结构域是经典CAR的信号传输部分。在本发明的信号传导系统中,细胞内信号传导结构域(信号传导结构域)位于信号传导组分中。在不存在试剂的情况下,使膜结合的受体组分和细胞内信号传导组分接近。在抗原识别之后,受体簇,天然CD45和CD148从突触中被排除,且信号被传输到细胞。

[0190] 因此,信号传导组分的信号传导结构域类似于经典CAR分子的胞内域。

[0191] 最常用的信号传导结构域组分是CD3-zeta胞内域的,所述CD3-zeta胞内域含有3个ITAM。这在结合抗原后将活化信号传递至T细胞。CD3-zeta可能不提供完全有能力的活化信号,并且可能需要另外的共刺激信号传导。例如,嵌合CD28和OX40可以与CD3-zeta一起使用来传输增殖/存活信号,或所有三个可以一起使用(在图1B中示出)。

[0192] 本文所描述的信号传导组分包括信号传导结构域,其可包括单独的CD3-Zeta胞内域,CD3-Zeta胞内域与CD28或OX40的胞内域,或CD28胞内域和OX40和CD3-Zeta胞内域(图3A)。

[0193] 根据本发明的CAR系统的信号传导组分可以包括如SEQ ID NO:20,21或22所示的

序列或具有至少80%的序列同一性的其变体。

[0194] SEQ ID NO:20-CD3Z胞内域

[0195] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0196] SEQ ID NO:21-CD28和CD3Zeta胞内域

[0197] SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0198] SEQ ID NO:22-CD28,OX40和CD3Zeta胞内域

[0199] SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0200] 变体序列可以与SEQ ID NO:20,21或22具有至少80%,85%,90%,95%,98%或99%的序列同一性,只要该序列提供有效的细胞内信号传导结构域。

[0201] 多个信号传导组分

[0202] 根据本发明第一方面的信号传导系统可包含多个信号传导组分,每个信号传导组分包含信号传导结构域和第二结合结构域,其中每个第二结合结构域由受体组分的相同的第一结合结构域结合,但信号传导结构域包含不同的胞内域(图9)。以这种方式,可以同时激活多个不同的胞内域。这相对于复合信号传导结构域是有利的,因为每个信号传导结构域保持不受其它信号传导结构域的阻碍。

[0203] 如果每个信号传导组分包含在残基方面不同的第二结合结构域,则包含不同信号传导结构域的信号传导组分以不同的动力学连接到第一结合结构域,所述残基改变它们对受体组分的第一结合结构域的亲和力(图10)。这允许响应于受体组分的抗原结合对信号传导的更大控制,因为不同的信号传导组分以不同的动力学(kinetics)/动力学(dynamics)被募集到受体组分。这是有利的,因为与由复合胞内域传输的固定的等比例的信号不同,最佳的T细胞活化信号可能需要不同比例的不同免疫信号。

[0204] 核酸

[0205] 本发明还提供编码第二方面的受体组分的核酸和编码第三方面的信号传导组分的核酸。

[0206] 如本文所用,术语“多核苷酸”,“核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0207] 本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。此外,应当理解本领域技术人员可以使用常规技术进行不影响本文所述的多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要表达多肽的任何特定宿主生物体的密码子选择。

[0208] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是在其内包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。对寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主链,在分子的3'和/或5'末端添加吡啶或聚赖氨酸链。为了如本文所述的用途的目的,应理解可以通过本领域可用的任何方法修饰多核苷酸。可以进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0209] 与核苷酸序列相关的术语“变体”，“同源物”或“衍生物”包括自序列或对序列的一个(或多个)核酸的任何取代,变异,修饰,置换,缺失或添加。

[0210] 本发明的核酸可以是编码受体组分和信号传导组分两者的核酸。

[0211] 核酸可以产生包含通过切割位点连接的受体组分和信号传导组分的多肽。切割位点可以是自切割的,使得当多肽产生时,其立即切割成受体组分和信号传导组分,而不需要任何外部切割活性。

[0212] 已知各种自切割位点,包括口蹄疫病毒(FMDV) 2a自切割肽,其具有所示的序列:

[0213] SEQ ID NO:23

[0214] RAEGRGSLLTCGDVEENPGP。

[0215] 或者

[0216] SEQ ID NO:24

[0217] QCTNYALLKLAGDVESNPGP

[0218] 核酸可以产生包含SEQ ID NO:25所示序列的多肽。

[0219] SEQ ID NO:25

[0220] MWTWNAYAFAPSGGGSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMAVPTQVLGLLLLWLTARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYFNLVWYQQKPGKAPKLLIYDTRNLADGVPSTRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHYKNYPLTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNRYGMHWIRQAPGKGLEWVSSISLNGGSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQDAYTGGYFDYWGQGLTVTVSSMDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPM.SGGGGSMRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLDHRHHTFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLFGLELIICGLEKQLKCESGS

[0221] 其中.指示可以包括抗原结合结构域序列的位置。可以包括任何抗原结合结构域,例如本文所述的scFv。

[0222] 共表达序列可以是内部核糖体进入序列(IRES)。共表达序列可以是内部启动子。

[0223] 本发明还提供了试剂盒,其包含编码第二方面的受体组分的核酸和/或编码第三方面的信号传导组分的核酸。

[0224] 载体

[0225] 本发明还提供载体或载体试剂盒,其包含编码本发明第二方面的受体组分和/或第三方面的信号传导组分的一个或多个核酸序列。此类载体可以用于将核酸序列导入宿主细胞,使得其表达根据本发明的第一方面的CAR系统的受体组分和信号传导组分。

[0226] 载体可以是例如质粒或病毒载体,例如逆转录病毒载体或慢病毒载体,或基于转座子的载体或合成的mRNA。

[0227] 载体可以能够转染或转导T细胞或NK细胞。

[0228] 细胞溶解性免疫细胞

[0229] 本发明还涉及包含根据本发明的第一方面的CAR系统的免疫细胞。

[0230] 细胞溶解性免疫细胞可以包含本发明的核酸或载体。

[0231] 细胞溶解性免疫细胞可以包含本发明的受体组分和信号传导组分。

[0232] 细胞溶解性免疫细胞可以包含本发明的至少一种信号传导组分。例如,细胞溶解性免疫细胞可以包含一种,两种,三种,四种,五种,多至多种本发明的信号传导组分。

[0233] 细胞溶解性免疫细胞可以包含本发明的至少一种受体组分。例如,细胞溶解性免疫细胞可以包含一种,两种,三种,四种,五种,多至多种本发明的受体成分。

[0234] 细胞溶解性免疫细胞可以是T细胞或T淋巴细胞,其是在细胞介导的免疫中起核心作用的淋巴细胞类型。通过在细胞表面上存在T细胞受体(TCR),它们可以与其它淋巴细胞,如B细胞和天然杀伤细胞(NK细胞)区分开。存在各种类型的T细胞,如下所概述。

[0235] 辅助T辅助细胞(TH细胞)在免疫过程中辅助其它白细胞,包括B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化。TH细胞在其表面上表达CD4。当TH细胞通过抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC II类分子给它们呈递肽抗原时,TH细胞被激活。这些细胞可以分化为几种亚型之一,包括TH1,TH2,TH3,TH17,Th9或TFH,其分泌不同的细胞因子以促进不同类型的免疫应答。

[0236] 细胞溶解性T细胞(TC细胞或CTL)破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且还牵涉移植排斥。CTL在其表面表达CD8。这些细胞通过结合存在于所有有核细胞表面上的MHC I类相关的抗原来识别它们的靶标。通过由调节性T细胞分泌的IL-10,腺苷和其它分子,CD8+细胞可以失活为无能状态,其防止自身免疫性疾病,如实验性自身免疫性脑脊髓炎。

[0237] 记忆T细胞是抗原特异性T细胞的亚群,其在感染已经消退后长期存留。它们在重新暴露于其关联抗原时迅速扩增为大量效应T细胞,从而为免疫系统提供针对过去感染的“记忆”。记忆T细胞包括三种亚型:中心记忆T细胞(TCM细胞)和两种类型的效应记忆T细胞(TEM细胞和TEMRA细胞)。记忆细胞可以是CD4+或CD8+。记忆T细胞通常表达细胞表面蛋白CD45RO。

[0238] 调节性T细胞(Treg细胞),以前称为抑制性T细胞,对于免疫耐受性的维持至关重要。它们的主要作用是为了免疫反应结束而关闭T细胞介导的免疫,并抑制逃脱胸腺中的负选择过程的自身反应性T细胞。

[0239] 已经描述了两种主要类型的CD4+Treg细胞-天然存在的Treg细胞和适应性Treg细胞。

[0240] 天然存在的Treg细胞(也称为CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞)在胸腺中出现并且已经与发育中的T细胞和已经用TSLP活化的髓样(CD11c+)和浆细胞样(CD123+)树突细胞两者之间的相互作用相关联。天然存在的Treg细胞可以通过称为FoxP3的细胞内分子的存在与其它T细胞区分开。FOXP3基因的突变可以阻止调节性T细胞发育,引起致命的自身免疫性疾病IPEX。

[0241] 适应性Treg细胞(也称为Tr1细胞或Th3细胞)可以在正常免疫应答期间起源。

[0242] 自然杀伤细胞(或NK细胞)是形成固有免疫系统的一部分的细胞溶解性类型。NK细胞以不依赖于MHC的方式提供对来自病毒感染细胞的固有信号的快速应答。

[0243] NK细胞(属于先天淋巴样细胞群)定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),并且构成从产生B淋巴细胞和T淋巴细胞的共同淋巴样祖先分化的第三种细胞。已知NK细胞在骨髓,淋巴结,

脾,扁桃体和胸腺中分化和成熟,随后它们在那里进入循环。

[0244] 本发明的CAR细胞可以是上述任何细胞类型。

[0245] 表达根据本发明的第一方面的CAR系统分子的T细胞或NK细胞可以从患者自身的外周血(第一方),或在来自供体外周血的造血干细胞移植物的背景(第二方)中或来自不相关供体的外周血(第三方)离体产生。

[0246] 或者,表达根据本发明的第一方面的CAR系统的分子的T或NK细胞可以源自可诱导祖细胞或胚胎祖细胞离体分化为T细胞。或者,可以使用保持了其溶解功能并可以起治疗剂作用的永生化T细胞系。

[0247] 在所有这些实施方案中,通过包括用病毒载体转导,用DNA或RNA转染的许多方法之一,通过引入编码受体组分和信号传导组分的DNA或RNA产生CAR细胞。

[0248] 本发明的CAR细胞可以是来自受试者的离体T或NK细胞。T或NK细胞可来自外周血单核细胞(PBMC)样品。T或NK细胞可以在用编码提供根据本发明第一方面的CAR系统的分子的核酸转导之前活化和/或扩增,例如通过用抗CD3单克隆抗体处理。

[0249] 可以通过以下步骤制备本发明的T或NK细胞:

[0250] (i) 从受试者或上文列出的其它来源分离含T或NK细胞的样品;和

[0251] (ii) 用编码根据本发明的第二和第三方面的CAR系统的受体组分和/或信号传导组分的一种或多种核酸序列转导或转染T细胞或NK细胞。

[0252] 然后通过纯化,例如,基于抗原结合多肽的抗原结合结构域的表达来选择T或NK细胞。

[0253] 本发明还提供了包含T或NK细胞的试剂盒,其包含根据本发明的第一方面的CAR系统。

[0254] 药物组合物

[0255] 本发明还涉及含有表达本发明第一方面的CAR系统的组分的多种细胞溶解性免疫细胞的药物组合物。药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂。药物组合物可任选地包含一种或多种其它药物活性多肽和/或化合物。此类制剂可以是例如适于静脉内输注的形式。

[0256] 治疗方法

[0257] 本发明提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,其包括向受试者施用本发明的细胞溶解性免疫细胞(例如在如上所述的药物组合物中)的步骤。

[0258] 用于治疗疾病的方法涉及本发明的细胞溶解性免疫细胞的治疗用途。本文中,可以将细胞施用至患有存在的疾病或状况的受试者,以减轻,减少或改善与疾病相关的至少一种症状和/或减缓,减少或阻断疾病的进展。

[0259] 用于预防疾病的方法涉及本发明的细胞溶解性免疫细胞的预防用途。本文中,此类细胞可以施用给尚未感染疾病和/或没有显示疾病的任何症状的受试者,以预防或减弱疾病的原因,或者减少或预防与疾病相关的至少一种症状的形成。受试者可能具有对疾病的素因或被认为有形成疾病的风险。

[0260] 该方法可以包括以下步骤:

[0261] (i) 分离含有T或NK细胞的样品;

[0262] (ii) 用本发明提供的核酸序列或载体转导或转染此类细胞;

[0263] (iii)将来自(ii)的细胞施用至受试者。

[0264] 含有T或NK细胞的样品可以从受试者或其它来源分离,例如如上文所述。T或NK细胞可以从受试者自身的外周血(第一方)或在来自供体外周血的造血干细胞移植的背景(第二方)中或来自不相关的供体的外周血(第三方)分离。

[0265] 本发明提供的用于治疗疾病的方法可以涉及监测疾病的进展和任何毒性活性,以及施用适用于根据本发明第一方面的CAR系统中的试剂,以抑制CAR信号传导和从而减少或减轻任何不利的毒性作用。

[0266] 本发明提供的用于治疗疾病的方法可以涉及监测疾病的进展并监测任何毒性活性并调节施用于受试者的试剂的剂量以提供可接受水平的疾病进展和毒性活性。

[0267] 监测疾病的进展意味着随时间评估与疾病相关的症状,以确定它们是否正在减少/改善或增加/恶化。

[0268] 毒性活性指在将本发明的CAR细胞施用至受试者之后由其引起的不良作用。毒性活性可包括例如免疫毒性,肝毒性和呼吸窘迫综合征。

[0269] 通过本发明的第一方面的信号传导系统的信号传导水平,以及因此表达信号传导系统的CAR细胞的活化水平,可以通过改变存在的试剂的量或试剂存在的时间量来调节。在本方法中,可以通过减少施用于受试者的试剂的剂量或降低其施用频率来增强CAR细胞活化的水平。相反,可以通过增加试剂的剂量或对受试者的施用频率来降低CAR细胞活化的水平。

[0270] 较高水平的CAR细胞活化可能与减少的疾病进展但增加的毒性活性相关,而较低水平的CAR细胞活化可能与增加的疾病进展但减少的毒性活性相关。

[0271] 本发明还提供了用于治疗和/或预防受试者中疾病的方法,该受试者包括本发明的细胞,该方法包括将适用于根据第一方面的CAR系统的试剂施用于受试者的步骤。因此,该方法包括对已经包含本发明的CAR细胞的受试者施用合适的试剂。

[0272] 因此,可以改变施用于受试者的试剂的剂量或施用的频率,以提供疾病进展和毒性活性两者的可接受水平。确定为“可接受”的疾病进展和毒性活动的具体水平将根据具体情况而变化,并应在此基础上进行评估。本发明提供了改变CAR细胞的活化水平以实现此适当水平的方法。

[0273] 可以以药物组合物的形式施用试剂。药物组合物可另外包含药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂。药物组合物可任选地包含一种或多种其它药物活性多肽和/或化合物。此类制剂可以例如是适于静脉内输注的形式。

[0274] 本发明提供了本发明的CAR细胞,其用于治疗和/或预防疾病。

[0275] 本发明还涉及本发明的CAR细胞在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途。

[0276] 本发明还提供了适用于抑制根据本发明第一方面的CAR系统的试剂,其用于治疗和/或预防疾病。

[0277] 本发明还提供了用于在CAR细胞中抑制根据本发明的第一方面的CAR系统的试剂。

[0278] 本发明还提供了适用于抑制根据本发明第一方面的CAR系统的试剂在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途。

[0279] 通过本发明的方法治疗和/或预防的疾病可以是感染,例如病毒感染。

[0280] 本发明的方法还可以用于控制病原性免疫应答,例如在自身免疫疾病,变态反应

和移植物抗宿主排斥中。

[0281] 该方法可用于治疗癌性疾病,例如膀胱癌,乳腺癌,结肠癌,子宫内膜癌,肾癌(肾细胞),白血病,肺癌,黑素瘤,非霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤,胰腺癌,前列腺癌和甲状腺癌。

[0282] 本发明的CAR细胞可以能够杀死靶细胞,例如癌细胞。靶细胞可以通过TAA的表达,例如上文表1中提供的TAA的表达可识别的。

[0283] 本发明的CAR细胞和药物组合物可用于治疗和/或预防上述疾病。

[0284] 本发明的CAR细胞和药物组合物可以用于上述任何方法。

[0285] 现在将通过实施例进一步描述本发明,这些实施例用于帮助本领域普通技术人员实施本发明,而不以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0286] 实施例1-TetCAR信号传导系统的功能性

[0287] 将双顺反子构建体表达为单个转录物,其在2A位点自切割以产生与eGFP融合的TiP和具有TetR作为其胞内域的CAR(图5a)。

[0288] 在不存在四环素的情况下表达该构建体的SupT1细胞的荧光显微术证实可以在细胞膜处清楚地看到eGFP荧光(图5b);而在四环素存在下,eGFP是细胞质的(图5c)。这些数据表明,四环素从TetR CAR置换了TiP。

[0289] 实施例2-通过TetCAR系统的信号传导

[0290] 将双顺反子构建体在BW5T细胞中表达为单个转录物,其在2A位点自切割产生信号传导组分,其包含通过柔性接头与CD3-Zeta的胞内域融合的TiP;和受体组分,其包含识别CD33的scFv,源自IgG1的Fc结构域的间隔区,CD4衍生的跨膜和胞内域;和TetR(图6a)。还表达了对照,其除了信号传导组分中不存在TiP以外是相同的(图6b)。

[0291] 在不存在四环素的情况下或在存在增加浓度的四环素下用野生型SupT1细胞或工程化改造以表达CD33的SupT1细胞攻击BV5T细胞。在存在或不存在四环素的情况下用野生型SupT1细胞攻击的T细胞不活化;在缺乏四环素的情况下用表达CD33的SupT1细胞攻击的T细胞活化,但是在四环素存在下活化被快速抑制,其中在100nM四环素存在下完全抑制活化(图7a)。

[0292] 将缺少TiP结构域的对照TetCAR也转导入BW5中。再次,在不存在或存在增加浓度的四环素的情况下,用野生型SupT1细胞或工程改造为表达CD33的SupT1细胞攻击这些T细胞。信号传导成分中缺乏TiP元件导致在任何条件下没有信号传导(图7b)。

[0293] 实施例3-在原代T细胞中的TetCAR系统的信号传导

[0294] 将SupT1细胞(其为CD19阴性)工程化为CD19阳性,给出尽可能相似的靶标阴性和阳性细胞系。用三种CAR构建体转导来自3个供体的原代人T细胞:(i)“经典”第一代抗CD19CAR;(ii)第一代抗CD19tetCAR;(iii)对照抗CD19tetCAR,其中从胞内域缺少TiP。在不同浓度的四环素存在下,用SupT1细胞或SupT1.CD19细胞以1:1攻击非转导的T细胞和用不同CAR构建体转导的T细胞。攻击后48小时取样上清液。来自背景(单独的T细胞)和最大值(用PMA/离子霉素(ionomycin)刺激的T细胞)的上清液也是样品。通过ELISA在上清液中测量干扰素- γ (图13)。“经典”CAR T细胞被SupT1.CD19活化,与四环素无关。TetCAR T细胞被SupT1.CD19细胞活化,但活化被四环素抑制。对照TetCAR和NT T细胞对SupT1.CD19细胞没

有反应。

[0295] 实施例4-对靶细胞的杀伤

[0296] 在实施例3中描述的干扰素- γ 释放研究之后,使用铬释放测定证明了对靶细胞的杀伤。使用 ^{51}Cr 加载SupT1和SupT1.CCD19细胞,并在四环素存在或不存在下与对照和Tet-CAR T细胞孵育4小时。通过计数上清液中的 ^{51}Cr 来测定靶细胞的裂解。结果显示在图14中。显示Tet-CAR T细胞仅在不存在四环素的情况下裂解SupT1.CD19靶细胞。

[0297] 在上述说明书中提及的所有出版物通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的条件下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。虽然已经结合具体的优选实施例描述了本发明,但是应当理解,所要求保护的本发明不应该不适当地限于这些具体实施方案。实际上,对于分子生物学,细胞免疫学或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修饰旨在在所附权利要求书的范围内。

[0001]	序列表
[0002]	<110> UCL商务股份有限公司
[0003]	<120> 信号传导系统
[0004]	<130> P105610PCT
[0005]	<150> GB1415347.2
[0006]	<151> 2014-08-29
[0007]	<160> 29
[0008]	<170> PatentIn version 3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 139
[0011]	<212> PRT
[0012]	<213> 人工序列
[0013]	<220>
[0014]	<223> TetR结合结构域
[0015]	<400> 1
[0016]	Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu
[0017]	1 5 10 15
[0018]	Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln
[0019]	20 25 30
[0020]	Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys
[0021]	35 40 45
[0022]	Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His
[0023]	50 55 60
[0024]	Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg
[0025]	65 70 75 80
[0026]	Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly
[0027]	85 90 95
[0028]	Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr
[0029]	100 105 110
[0030]	Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu
[0031]	115 120 125
[0032]	Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His
[0033]	130 135
[0034]	<210> 2
[0035]	<211> 17
[0036]	<212> PRT
[0037]	<213> 人工序列
[0038]	<220>

[0039]	<223> TiP结合结构域
[0040]	<400> 2
[0041]	Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly
[0042]	1 5 10 15
[0043]	Ser
[0044]	<210> 3
[0045]	<211> 61
[0046]	<212> PRT
[0047]	<213> 人工序列
[0048]	<220>
[0049]	<223> 经修饰的CD4胞内结构域接头
[0050]	<400> 3
[0051]	Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly
[0052]	1 5 10 15
[0053]	Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala
[0054]	20 25 30
[0055]	Glu Arg Met Ala Gln Ile Lys Arg Val Val Ser Glu Lys Lys Thr Ala
[0056]	35 40 45
[0057]	Gln Ala Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
[0058]	50 55 60
[0059]	<210> 4
[0060]	<211> 15
[0061]	<212> PRT
[0062]	<213> 人工序列
[0063]	<220>
[0064]	<223> 生物素模拟肽, 长nanotag
[0065]	<400> 4
[0066]	Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
[0067]	1 5 10 15
[0068]	<210> 5
[0069]	<211> 9
[0070]	<212> PRT
[0071]	<213> 人工序列
[0072]	<220>
[0073]	<223> 生物素模拟肽, 短nanotag
[0074]	<400> 5
[0075]	Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
[0076]	1 5
[0077]	<210> 6

[0078]	<211> 8
[0079]	<212> PRT
[0080]	<213> 人工序列
[0081]	<220>
[0082]	<223> 生物素模拟肽, streptag
[0083]	<400> 6
[0084]	Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
[0085]	1 5
[0086]	<210> 7
[0087]	<211> 8
[0088]	<212> PRT
[0089]	<213> 人工序列
[0090]	<220>
[0091]	<223> 生物素模拟肽, streptagII
[0092]	<400> 7
[0093]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0094]	1 5
[0095]	<210> 8
[0096]	<211> 38
[0097]	<212> PRT
[0098]	<213> 人工序列
[0099]	<220>
[0100]	<223> 生物素模拟肽, SBP-tag
[0101]	<400> 8
[0102]	Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
[0103]	1 5 10 15
[0104]	Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
[0105]	20 25 30
[0106]	Gln Gly Gln Arg Glu Pro
[0107]	35
[0108]	<210> 9
[0109]	<211> 8
[0110]	<212> PRT
[0111]	<213> 人工序列
[0112]	<220>
[0113]	<223> 生物素模拟肽, ccstreptag
[0114]	<400> 9
[0115]	Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys
[0116]	1 5

[0117]	<210>	10
[0118]	<211>	15
[0119]	<212>	PRT
[0120]	<213>	人工序列
[0121]	<220>	
[0122]	<223>	生物素模拟肽，flankedccstreptag
[0123]	<400>	10
[0124]		Ala Glu Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys Ile Glu Gly Arg Lys
[0125]		1 5 10 15
[0126]	<210>	11
[0127]	<211>	126
[0128]	<212>	PRT
[0129]	<213>	人工序列
[0130]	<220>	
[0131]	<223>	核心链霉亲和素序列
[0132]	<400>	11
[0133]		Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
[0134]		1 5 10 15
[0135]		Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser
[0136]		20 25 30
[0137]		Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
[0138]		35 40 45
[0139]		Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
[0140]		50 55 60
[0141]		Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
[0142]		65 70 75 80
[0143]		Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
[0144]		85 90 95
[0145]		Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
[0146]		100 105 110
[0147]		Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
[0148]		115 120 125
[0149]	<210>	12
[0150]	<211>	21
[0151]	<212>	PRT
[0152]	<213>	人工序列
[0153]	<220>	
[0154]	<223>	信号肽
[0155]	<400>	12

[0156]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0157]	1 5 10 15
[0158]	Asp His Ala Asp Gly
[0159]	20
[0160]	<210> 13
[0161]	<211> 21
[0162]	<212> PRT
[0163]	<213> 人工序列
[0164]	<220>
[0165]	<223> 信号肽
[0166]	<400> 13
[0167]	Met Ser Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0168]	1 5 10 15
[0169]	His Ala Ala Arg Pro
[0170]	20
[0171]	<210> 14
[0172]	<211> 20
[0173]	<212> PRT
[0174]	<213> 人工序列
[0175]	<220>
[0176]	<223> 信号肽
[0177]	<400> 14
[0178]	Met Ala Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
[0179]	1 5 10 15
[0180]	Asp Ala Arg Cys
[0181]	20
[0182]	<210> 15
[0183]	<211> 234
[0184]	<212> PRT
[0185]	<213> 人工序列
[0186]	<220>
[0187]	<223> 间隔区序列,人IgG1的铰链-CH2CH3
[0188]	<400> 15
[0189]	Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0190]	1 5 10 15
[0191]	Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[0192]	20 25 30
[0193]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[0194]	35 40 45

[0195]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[0196]	50 55 60
[0197]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[0198]	65 70 75 80
[0199]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[0200]	85 90 95
[0201]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[0202]	100 105 110
[0203]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
[0204]	115 120 125
[0205]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[0206]	130 135 140
[0207]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[0208]	145 150 155 160
[0209]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[0210]	165 170 175
[0211]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[0212]	180 185 190
[0213]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[0214]	195 200 205
[0215]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[0216]	210 215 220
[0217]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
[0218]	225 230
[0219]	<210> 16
[0220]	<211> 46
[0221]	<212> PRT
[0222]	<213> 人工序列
[0223]	<220>
[0224]	<223> 间隔区序列, 人CD8茎部
[0225]	<400> 16
[0226]	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
[0227]	1 5 10 15
[0228]	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
[0229]	20 25 30
[0230]	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
[0231]	35 40 45
[0232]	<210> 17
[0233]	<211> 20

[0234]	<212>	PRT
[0235]	<213>	人工序列
[0236]	<220>	
[0237]	<223>	间隔区序列,人IgG1铰链
[0238]	<400>	17
[0239]	Ala	Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0240]	1	5 10 15
[0241]	Lys	Asp Pro Lys
[0242]		20
[0243]	<210>	18
[0244]	<211>	185
[0245]	<212>	PRT
[0246]	<213>	人工序列
[0247]	<220>	
[0248]	<223>	间隔区序列, CD2胞外结构域
[0249]	<400>	18
[0250]	Lys	Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
[0251]	1	5 10 15
[0252]	Ile	Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
[0253]		20 25 30
[0254]	Ile	Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
[0255]		35 40 45
[0256]	Lys	Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
[0257]		50 55 60
[0258]	Asn	Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
[0259]	65	70 75 80
[0260]	Tyr	Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
[0261]		85 90 95
[0262]	Ile	Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
[0263]		100 105 110
[0264]	Trp	Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
[0265]		115 120 125
[0266]	Asp	Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
[0267]		130 135 140
[0268]	Gln	Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
[0269]	145	150 155 160
[0270]	Lys	Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
[0271]		165 170 175
[0272]	Val	Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp

[0273]	180	185
[0274]	<210> 19	
[0275]	<211> 259	
[0276]	<212> PRT	
[0277]	<213> 人工序列	
[0278]	<220>	
[0279]	<223> 间隔区序列, CD34胞外结构域	
[0280]	<400> 19	
[0281]	Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly	
[0282]	1 5 10 15	
[0283]	Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr	
[0284]	20 25 30	
[0285]	Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly	
[0286]	35 40 45	
[0287]	Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser	
[0288]	50 55 60	
[0289]	Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln	
[0290]	65 70 75 80	
[0291]	Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val	
[0292]	85 90 95	
[0293]	Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val	
[0294]	100 105 110	
[0295]	Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys	
[0296]	115 120 125	
[0297]	Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile	
[0298]	130 135 140	
[0299]	Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu	
[0300]	145 150 155 160	
[0301]	Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly	
[0302]	165 170 175	
[0303]	Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp	
[0304]	180 185 190	
[0305]	Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg	
[0306]	195 200 205	
[0307]	Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser	
[0308]	210 215 220	
[0309]	Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly	
[0310]	225 230 235 240	
[0311]	Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser	

[0312]		245	250	255
[0313]	Gln Lys Thr			
[0314]	<210> 20			
[0315]	<211> 112			
[0316]	<212> PRT			
[0317]	<213> 人工序列			
[0318]	<220>			
[0319]	<223> 信号传导组分, CD3 Z胞内结构域			
[0320]	<400> 20			
[0321]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly			
[0322]	1	5	10	15
[0323]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
[0324]		20	25	30
[0325]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
[0326]		35	40	45
[0327]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
[0328]		50	55	60
[0329]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			
[0330]	65	70	75	80
[0331]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
[0332]		85	90	95
[0333]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0334]		100	105	110
[0335]	<210> 21			
[0336]	<211> 152			
[0337]	<212> PRT			
[0338]	<213> 人工序列			
[0339]	<220>			
[0340]	<223> 信号传导组分, CD28和CD3 Zeta胞内结构域			
[0341]	<400> 21			
[0342]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro			
[0343]	1	5	10	15
[0344]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
[0345]		20	25	30
[0346]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala			
[0347]		35	40	45
[0348]	Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu			
[0349]		50	55	60
[0350]	Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly			

[0351]	65	70	75	80
[0352]	Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu			
[0353]	85	90	95	
[0354]	Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser			
[0355]	100	105	110	
[0356]	Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly			
[0357]	115	120	125	
[0358]	Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu			
[0359]	130	135	140	
[0360]	His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0361]	145	150		
[0362]	<210> 22			
[0363]	<211> 188			
[0364]	<212> PRT			
[0365]	<213> 人工序列			
[0366]	<220>			
[0367]	<223> 信号传导组分, CD28, OX40和CD3 Zeta胞内结构域			
[0368]	<400> 22			
[0369]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro			
[0370]	1	5	10	15
[0371]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
[0372]	20	25	30	
[0373]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp			
[0374]	35	40	45	
[0375]	Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu			
[0376]	50	55	60	
[0377]	Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe			
[0378]	65	70	75	80
[0379]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu			
[0380]	85	90	95	
[0381]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp			
[0382]	100	105	110	
[0383]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys			
[0384]	115	120	125	
[0385]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala			
[0386]	130	135	140	
[0387]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys			
[0388]	145	150	155	160
[0389]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr			

[0390]	165	170	175
[0391]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0392]	180	185	
[0393]	<210> 23		
[0394]	<211> 20		
[0395]	<212> PRT		
[0396]	<213> 人工序列		
[0397]	<220>		
[0398]	<223> 自切割位点,2a自切割肽		
[0399]	<400> 23		
[0400]	Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu		
[0401]	1	5	10 15
[0402]	Asn Pro Gly Pro		
[0403]	20		
[0404]	<210> 24		
[0405]	<211> 20		
[0406]	<212> PRT		
[0407]	<213> 人工序列		
[0408]	<220>		
[0409]	<223> 自切割位点,2a自切割肽		
[0410]	<400> 24		
[0411]	Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser		
[0412]	1	5	10 15
[0413]	Asn Pro Gly Pro		
[0414]	20		
[0415]	<210> 25		
[0416]	<211> 652		
[0417]	<212> PRT		
[0418]	<213> 人工序列		
[0419]	<220>		
[0420]	<223> 嵌合抗原受体 (CAR) 序列		
[0421]	<400> 25		
[0422]	Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly		
[0423]	1	5	10 15
[0424]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
[0425]	20	25	30
[0426]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
[0427]	35	40	45
[0428]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		

[0429]	50	55	60
[0430]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
[0431]	65	70	75
[0432]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His		
[0433]	85	90	95
[0434]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
[0435]	100	105	110
[0436]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly		
[0437]	115	120	125
[0438]	Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala		
[0439]	130	135	140
[0440]	Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala		
[0441]	145	150	155
[0442]	Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
[0443]	165	170	175
[0444]	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr		
[0445]	180	185	190
[0446]	Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0447]	195	200	205
[0448]	Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe		
[0449]	210	215	220
[0450]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
[0451]	225	230	235
[0452]	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr		
[0453]	245	250	255
[0454]	Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly		
[0455]	260	265	270
[0456]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0457]	275	280	285
[0458]	Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
[0459]	290	295	300
[0460]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
[0461]	305	310	315
[0462]	Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0463]	325	330	335
[0464]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr		
[0465]	340	345	350
[0466]	Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
[0467]	355	360	365

[0468]	Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
[0469]	370 375 380
[0470]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe
[0471]	385 390 395 400
[0472]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro
[0473]	405 410 415
[0474]	Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0475]	420 425 430
[0476]	Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[0477]	435 440 445
[0478]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[0479]	450 455 460
[0480]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[0481]	465 470 475 480
[0482]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[0483]	485 490 495
[0484]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[0485]	500 505 510
[0486]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[0487]	515 520 525
[0488]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
[0489]	530 535 540
[0490]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[0491]	545 550 555 560
[0492]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[0493]	565 570 575
[0494]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[0495]	580 585 590
[0496]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[0497]	595 600 605
[0498]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[0499]	610 615 620
[0500]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[0501]	625 630 635 640
[0502]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Met
[0503]	645 650
[0504]	<210> 26
[0505]	<211> 213
[0506]	<212> PRT

[0507]	<213>	人工序列
[0508]	<220>	
[0509]	<223>	嵌合抗原受体 (CAR) 序列
[0510]	<400>	26
[0511]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile	
[0512]	1	5 10 15
[0513]	Asn Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr	
[0514]	20	25 30
[0515]	Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr	
[0516]	35	40 45
[0517]	Trp His Val Lys Asn Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu	
[0518]	50	55 60
[0519]	Met Leu Asp Arg His His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser	
[0520]	65	70 75 80
[0521]	Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu	
[0522]	85	90 95
[0523]	Leu Ser His Arg Asp Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr	
[0524]	100	105 110
[0525]	Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln	
[0526]	115	120 125
[0527]	Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly	
[0528]	130	135 140
[0529]	His Phe Thr Leu Gly Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala	
[0530]	145	150 155 160
[0531]	Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu	
[0532]	165	170 175
[0533]	Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe	
[0534]	180	185 190
[0535]	Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys	
[0536]	195	200 205
[0537]	Cys Glu Ser Gly Ser	
[0538]	210	
[0539]	<210>	27
[0540]	<211>	16
[0541]	<212>	PRT
[0542]	<213>	人工序列
[0543]	<220>	
[0544]	<223>	Tip的序列
[0545]	<400>	27

[0546]	Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ser
[0547]	1 5 10 15
[0548]	<210> 28
[0549]	<211> 87
[0550]	<212> PRT
[0551]	<213> 人类
[0552]	<400> 28
[0553]	Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu
[0554]	1 5 10 15
[0555]	Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly
[0556]	20 25 30
[0557]	Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys
[0558]	35 40 45
[0559]	Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln Ile
[0560]	50 55 60
[0561]	Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg Phe
[0562]	65 70 75 80
[0563]	Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
[0564]	85
[0565]	<210> 29
[0566]	<211> 926
[0567]	<212> PRT
[0568]	<213> 人工序列
[0569]	<220>
[0570]	<223> 基础TetCAR序列
[0571]	<400> 29
[0572]	Met Trp Thr Trp Asn Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Pro Ser Gly Gly Gly
[0573]	1 5 10 15
[0574]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
[0575]	20 25 30
[0576]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
[0577]	35 40 45
[0578]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
[0579]	50 55 60
[0580]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
[0581]	65 70 75 80
[0582]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
[0583]	85 90 95
[0584]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

[0585]	100	105	110
[0586]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Glu Gly Arg Gly		
[0587]	115	120	125
[0588]	Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala		
[0589]	130	135	140
[0590]	Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala		
[0591]	145	150	155
[0592]	Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
[0593]	165	170	175
[0594]	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr		
[0595]	180	185	190
[0596]	Phe Asn Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0597]	195	200	205
[0598]	Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe		
[0599]	210	215	220
[0600]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
[0601]	225	230	235
[0602]	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Asn Tyr		
[0603]	245	250	255
[0604]	Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly		
[0605]	260	265	270
[0606]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0607]	275	280	285
[0608]	Gly Gly Ser Arg Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
[0609]	290	295	300
[0610]	Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
[0611]	305	310	315
[0612]	Thr Leu Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0613]	325	330	335
[0614]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Leu Asn Gly Gly Ser Thr Tyr		
[0615]	340	345	350
[0616]	Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
[0617]	355	360	365
[0618]	Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0619]	370	375	380
[0620]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Asp Ala Tyr Thr Gly Gly Tyr Phe		
[0621]	385	390	395
[0622]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Met Asp Pro		
[0623]	405	410	415

[0624]	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
[0625]				420					425					430		
[0626]	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
[0627]				435					440					445		
[0628]	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
[0629]				450					455					460		
[0630]	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
[0631]	465							470				475				480
[0632]	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
[0633]						485					490					495
[0634]	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
[0635]						500					505					510
[0636]	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
[0637]						515					520				525	
[0638]	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
[0639]						530					535				540	
[0640]	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
[0641]	545							550				555				560
[0642]	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
[0643]						565						570				575
[0644]	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
[0645]						580						585				590
[0646]	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
[0647]						595					600				605	
[0648]	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
[0649]						610						615				620
[0650]	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
[0651]	625							630				635				640
[0652]	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Met	Ala	Leu	Ile	Val
[0653]						645						650				655
[0654]	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	Phe
[0655]						660						665				670
[0656]	Phe	Cys	Val	Arg	Cys	Arg	His	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Arg	Met	Ala
[0657]						675							680			685
[0658]	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Lys	Thr	Ala	Gln	Ala	Pro	His
[0659]						690							695			700
[0660]	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Cys	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met
[0661]	705							710					715			720
[0662]	Ser	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Lys	Val	Ile	Asn	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu

[0663]		725		730		735
[0664]	Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln Lys					
[0665]		740		745		750
[0666]	Leu Gly Val Gly Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys Arg					
[0667]		755		760		765
[0668]	Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His Thr					
[0669]		770		775		780
[0670]	His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn					
[0671]		785		790		795
[0672]	Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly Ala					
[0673]		805		810		815
[0674]	Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu					
[0675]		820		825		830
[0676]	Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn					
[0677]		835		840		845
[0678]	Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val					
[0679]		850		855		860
[0680]	Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro					
[0681]		865		870		875
[0682]	Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe					
[0683]		885		890		895
[0684]	Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile					
[0685]		900		905		910
[0686]	Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser					
[0687]		915		920		925

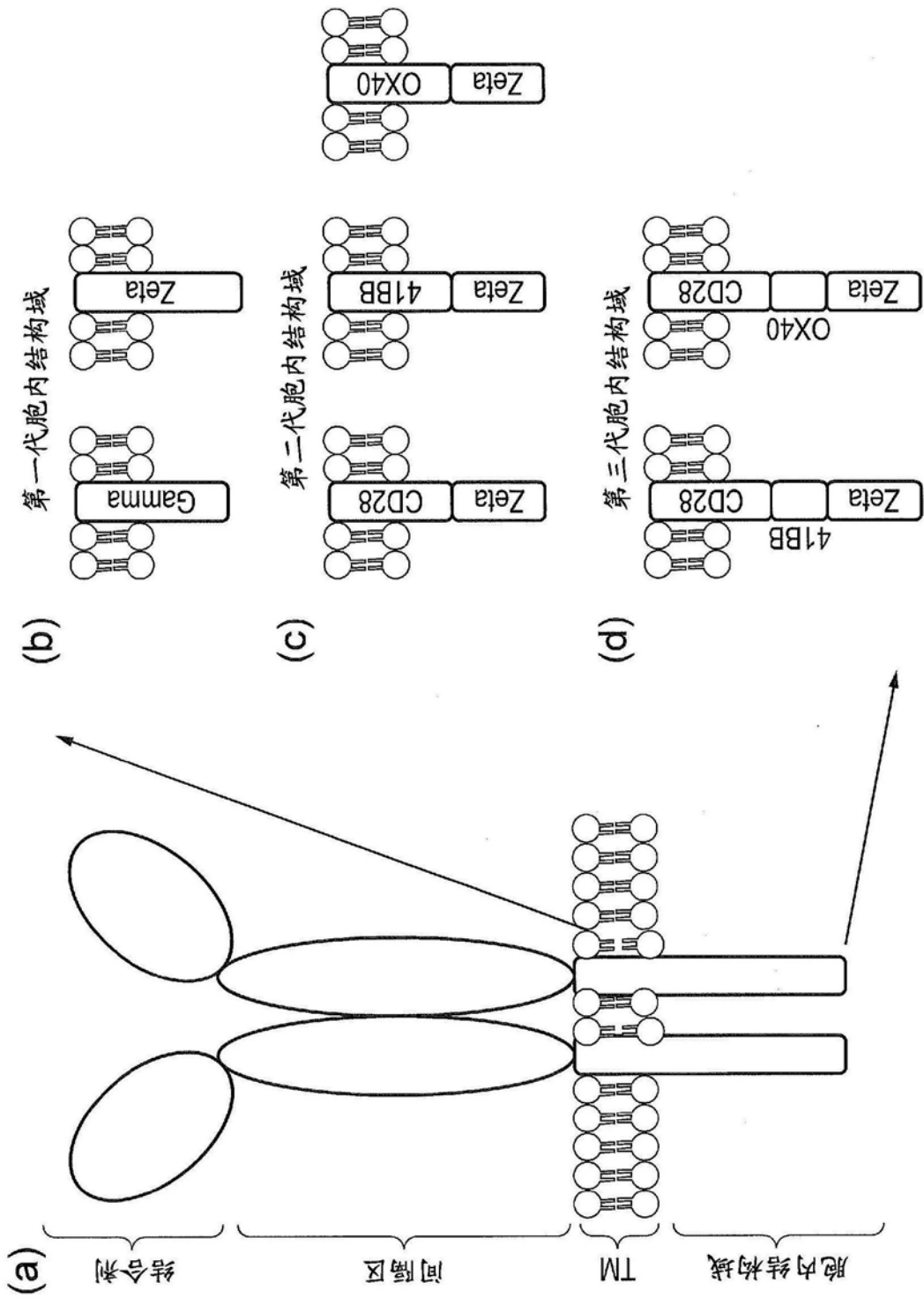


图1

(a) WTWNAYAFAAPS-GGGS-蛋白质

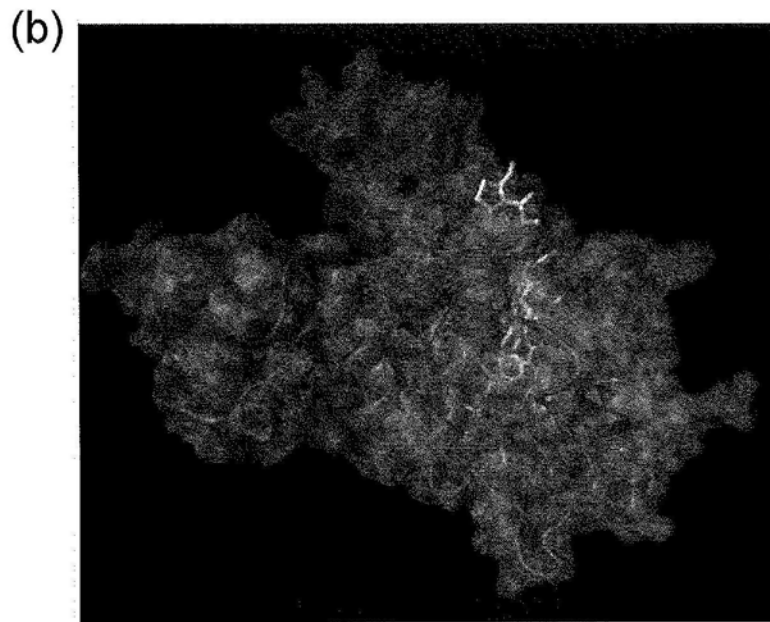


图2

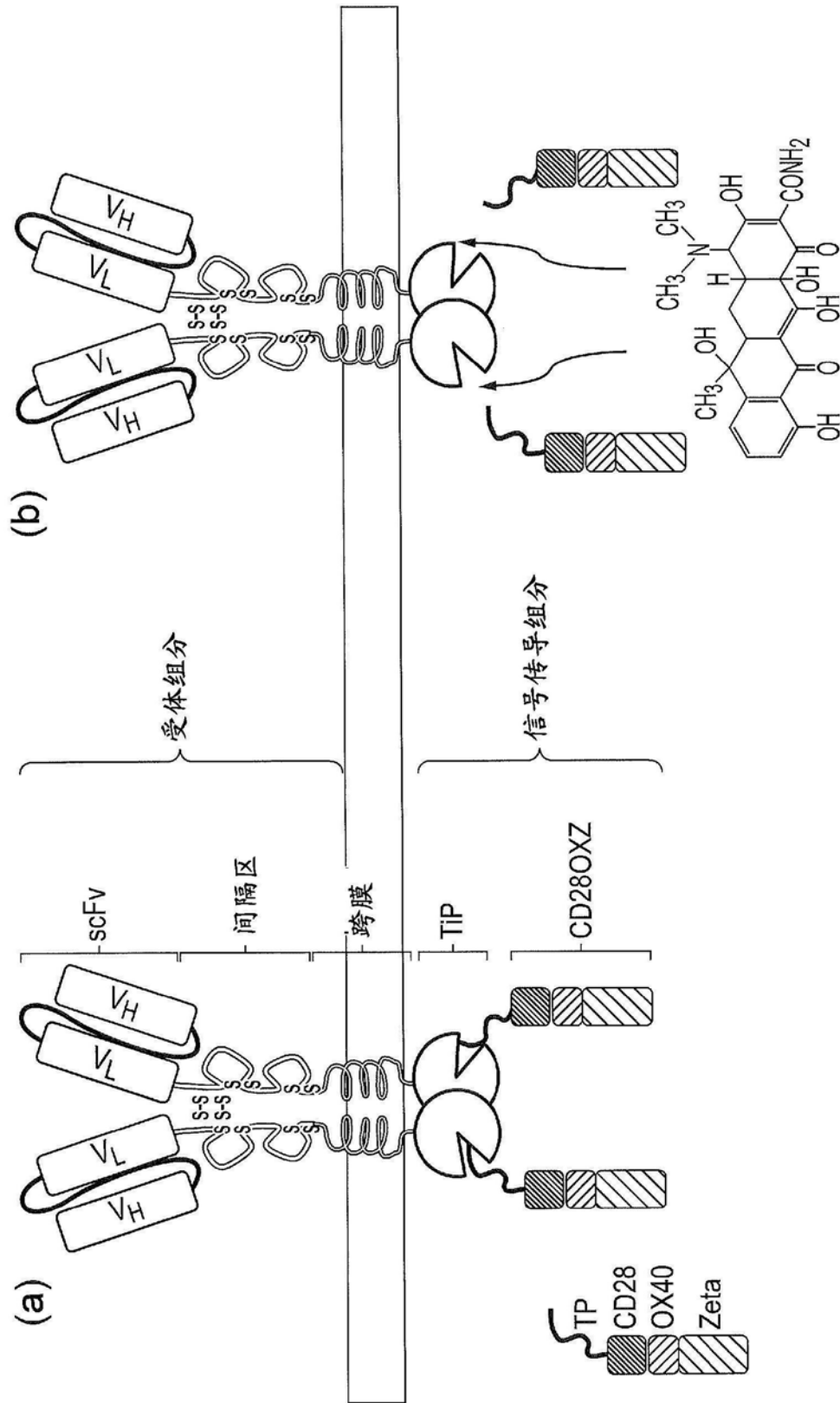


图3

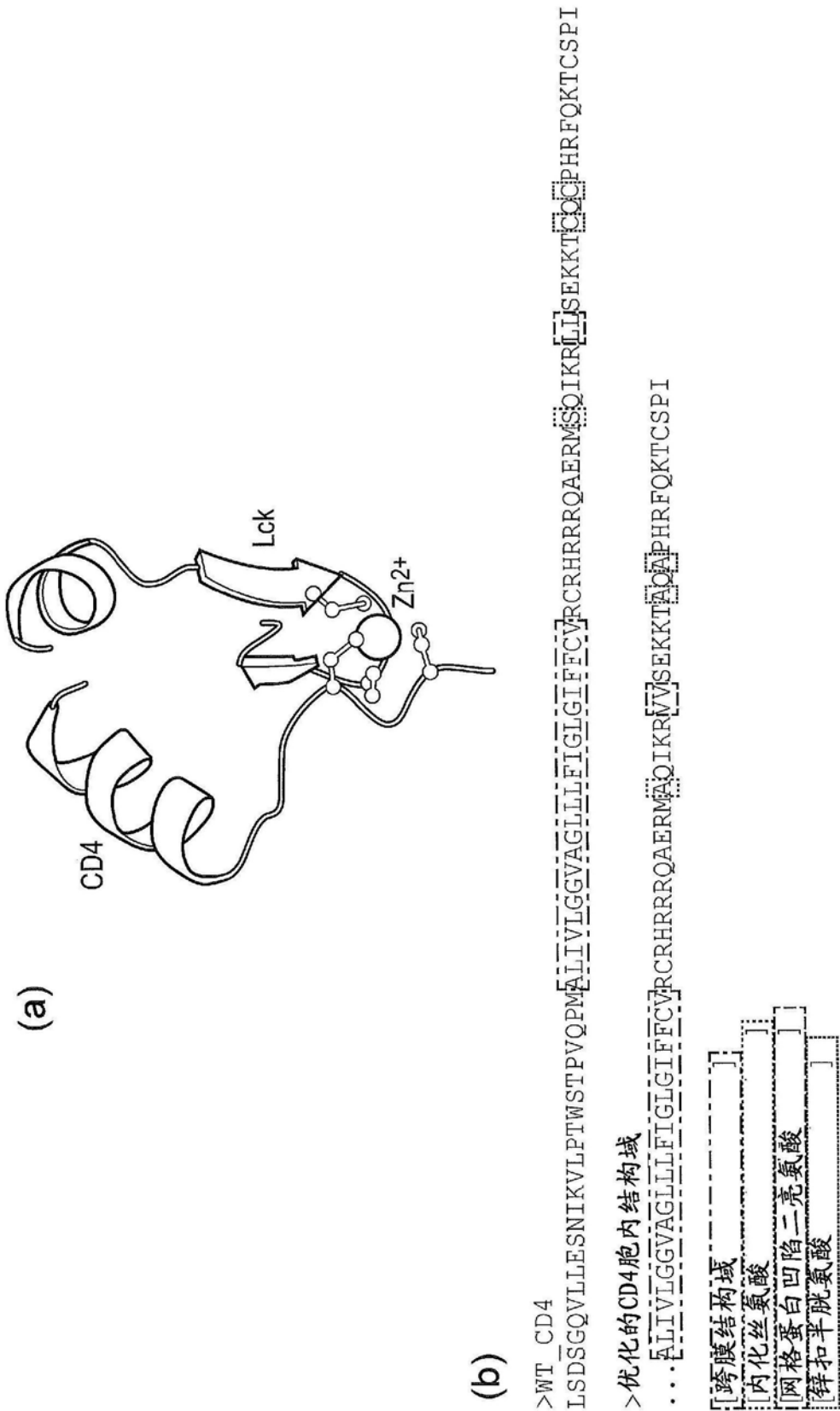


图4

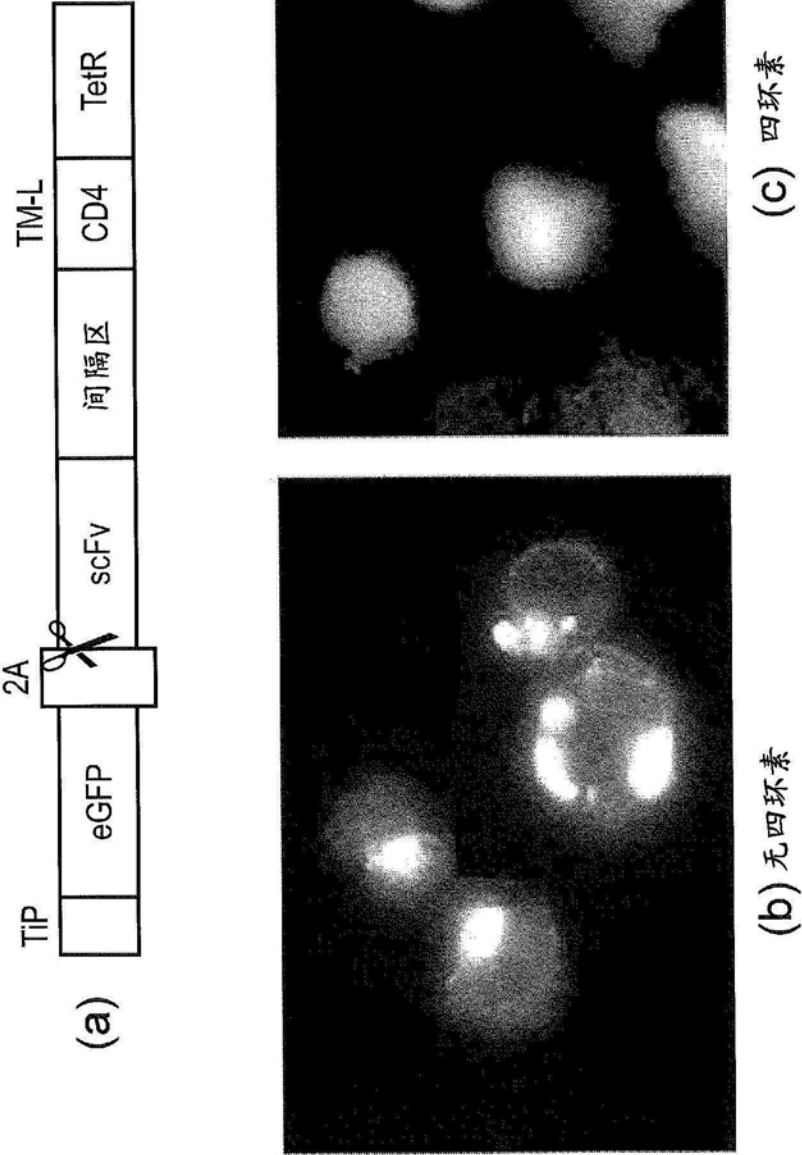


图5

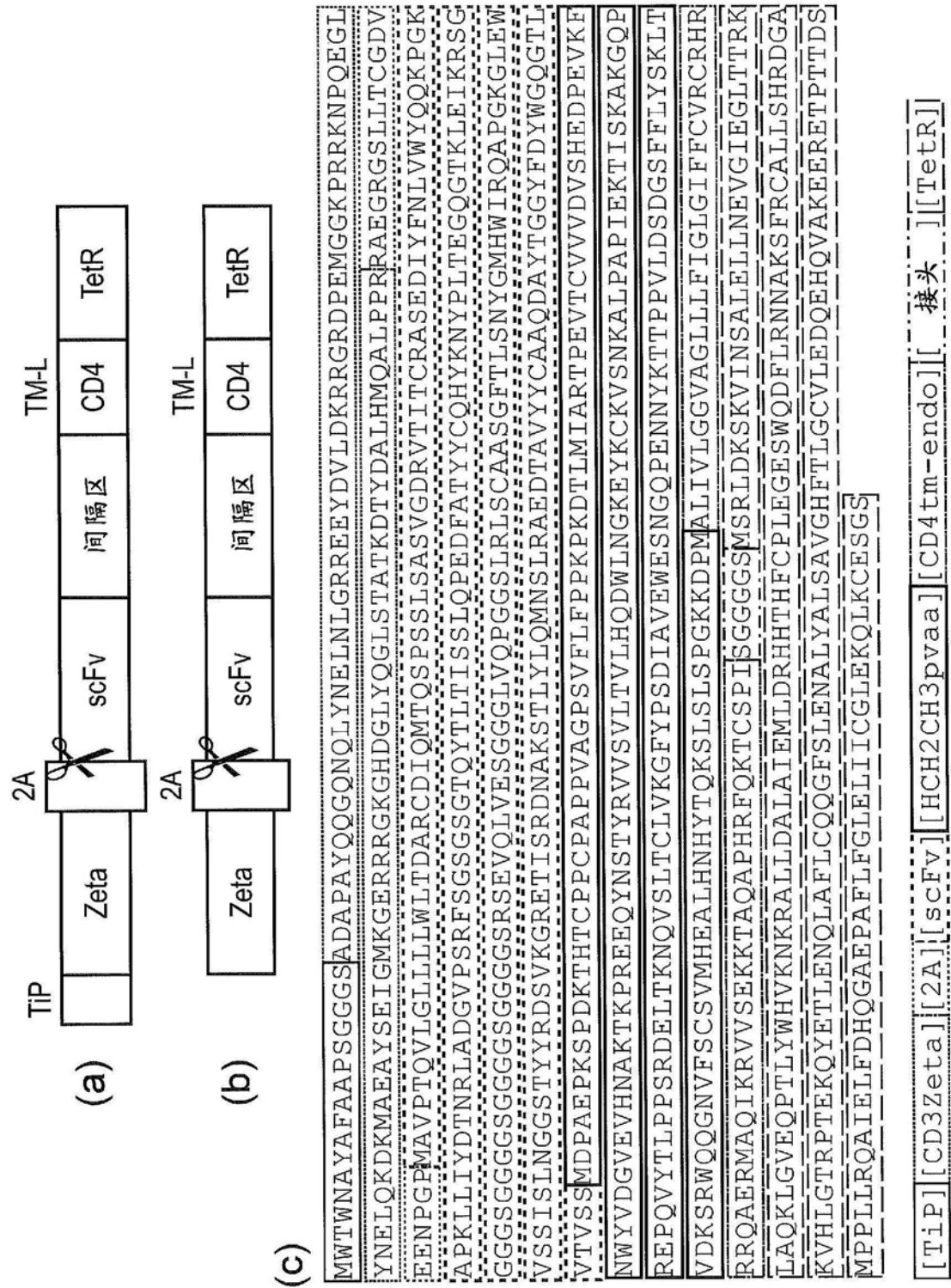


图6

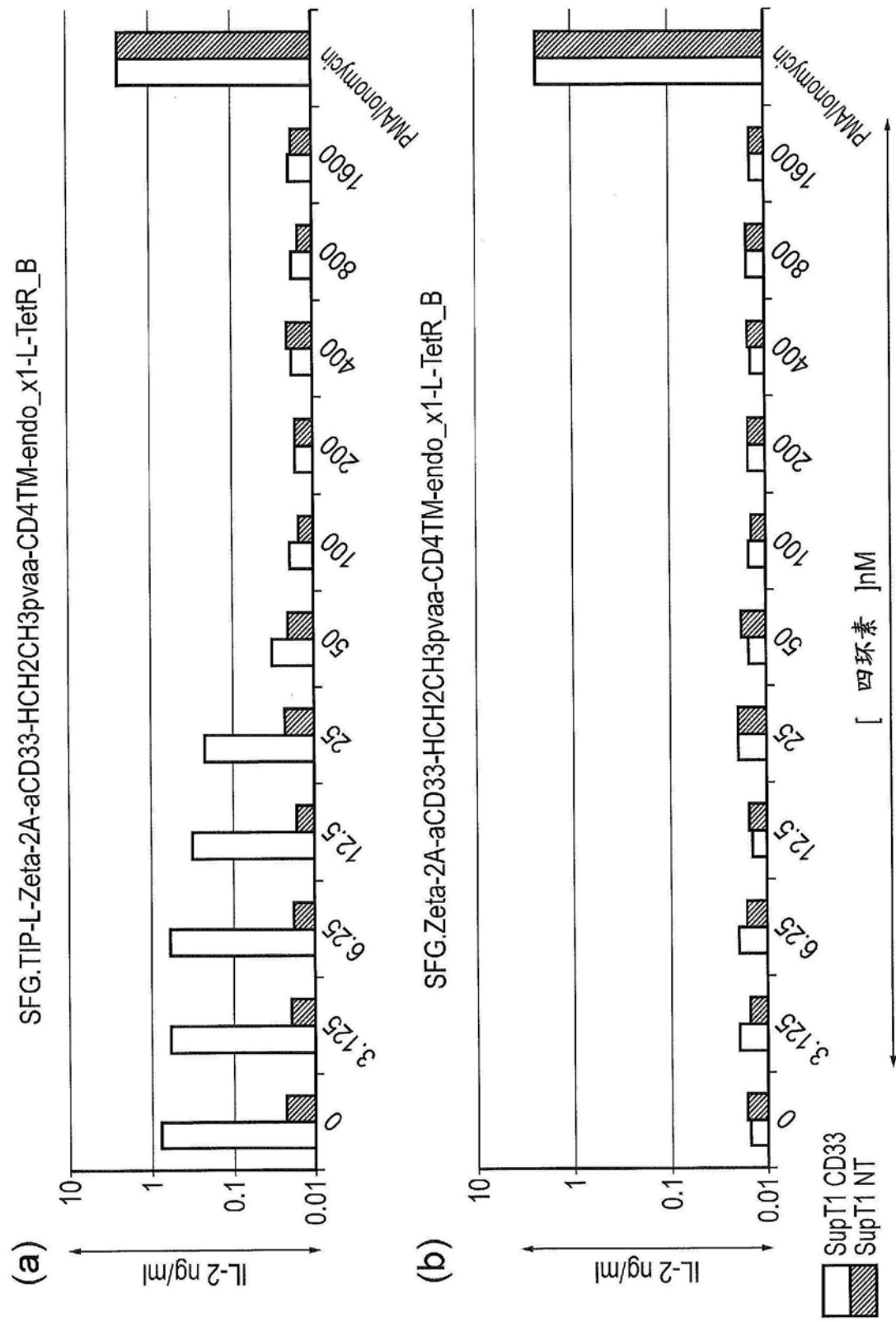


图7

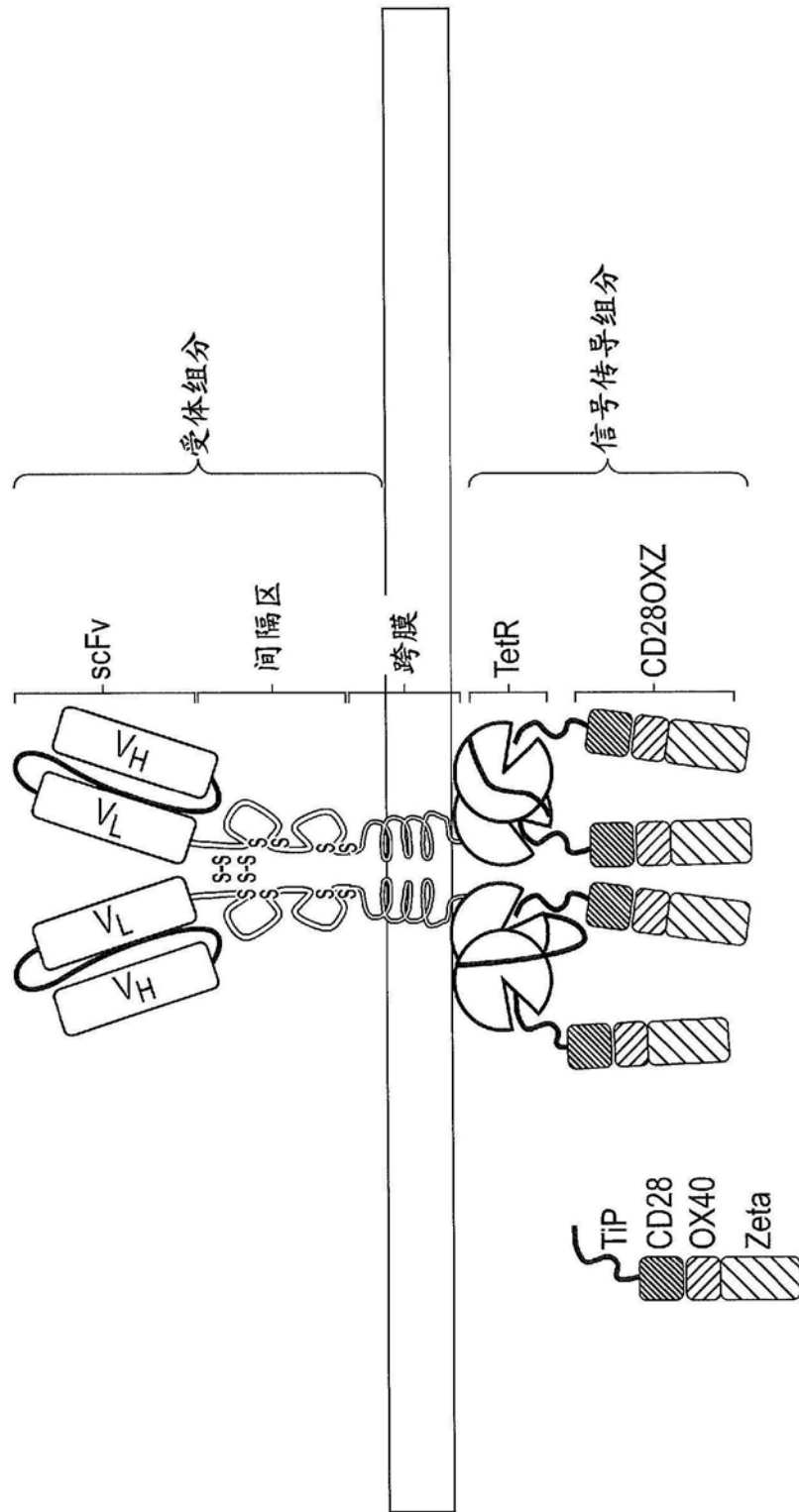


图8

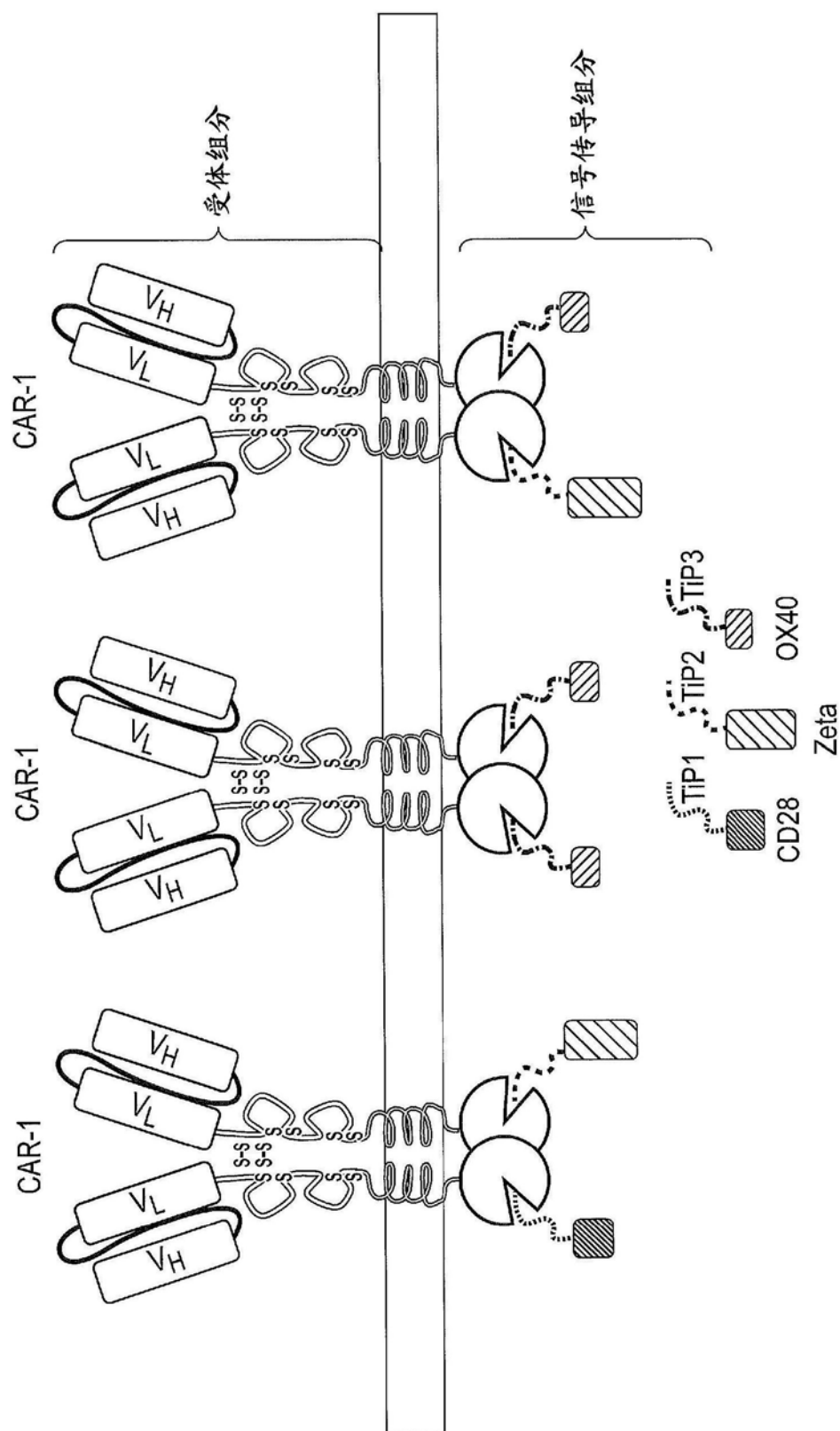


图10

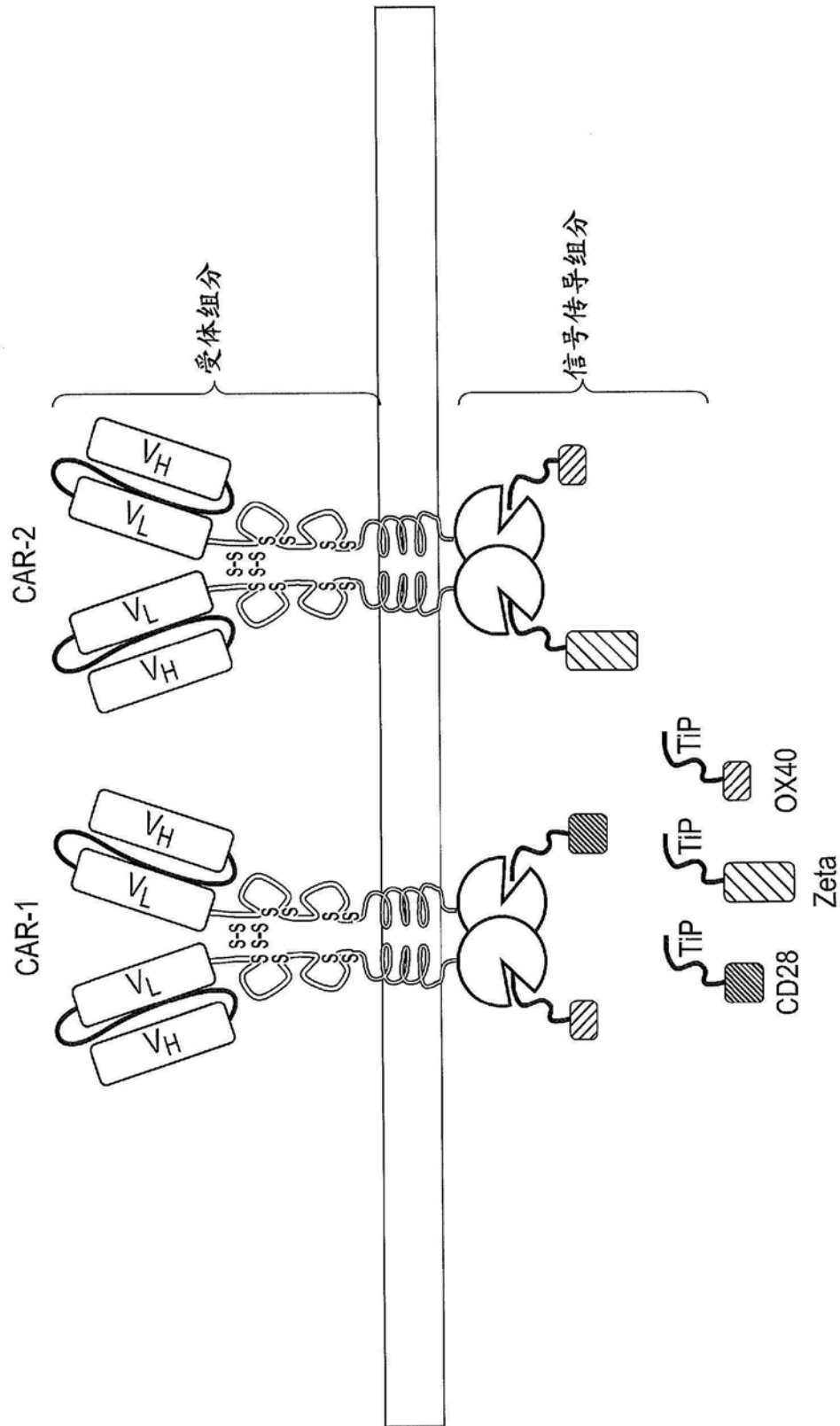


图11

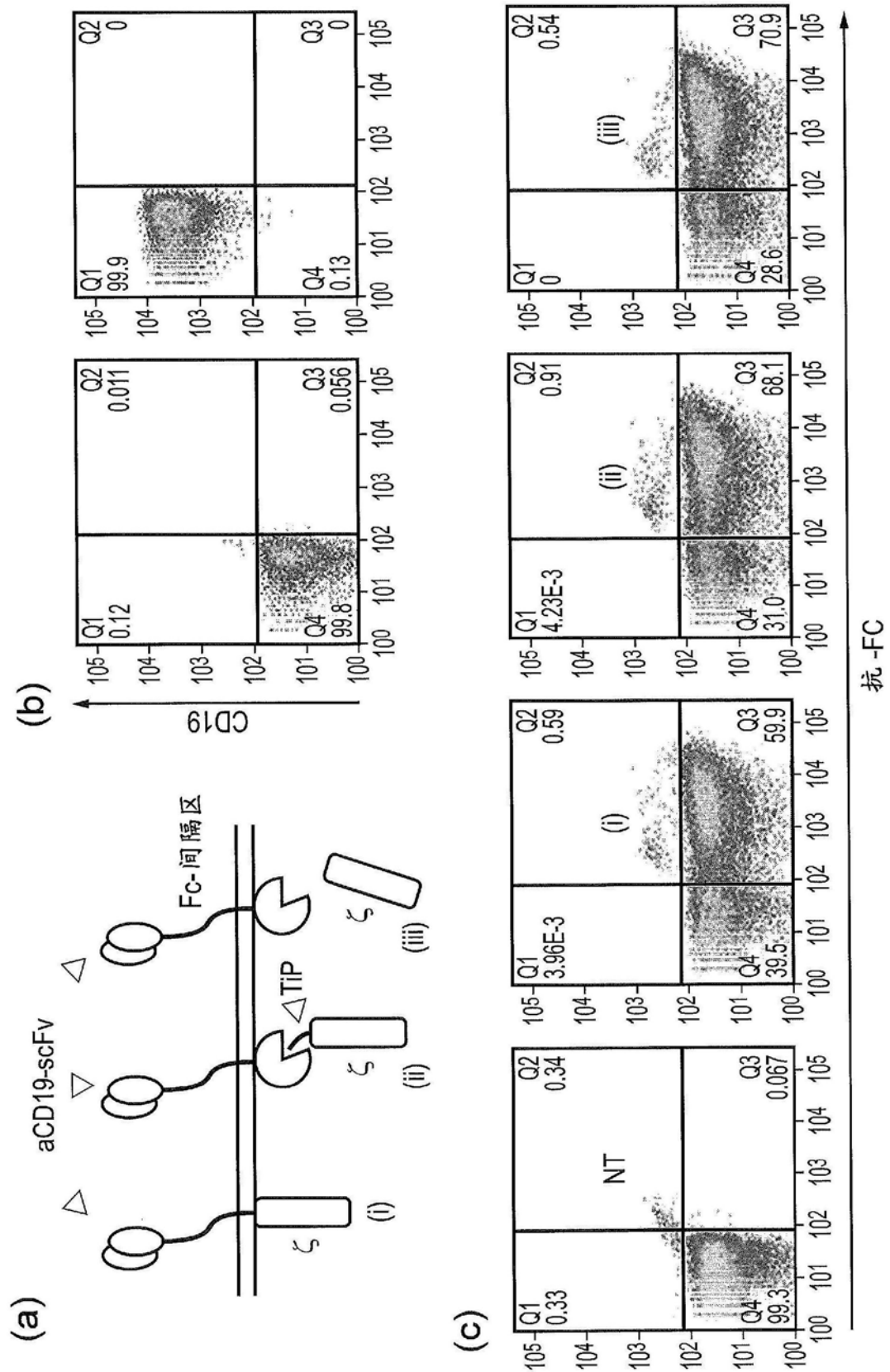


图12

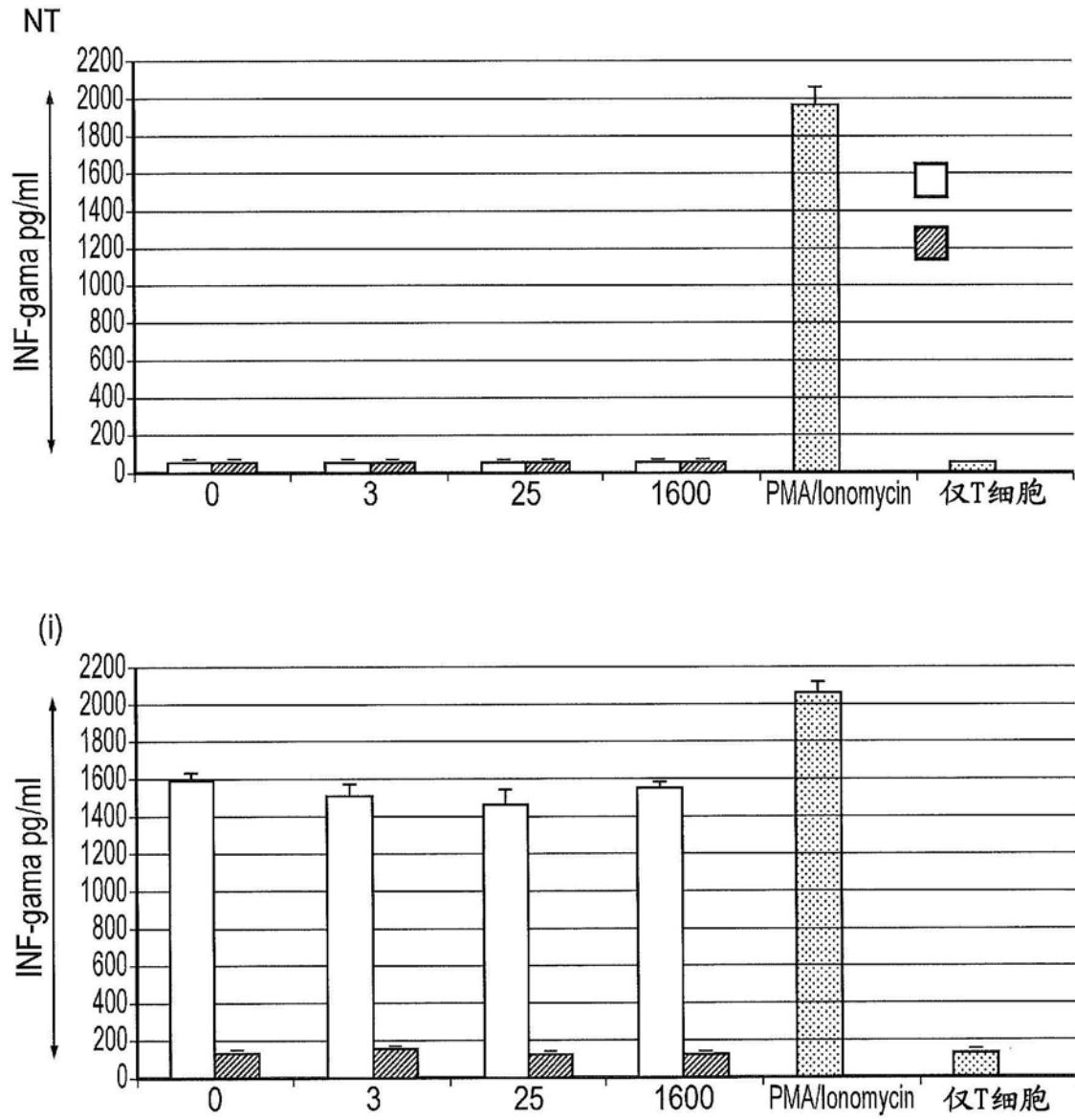


图13

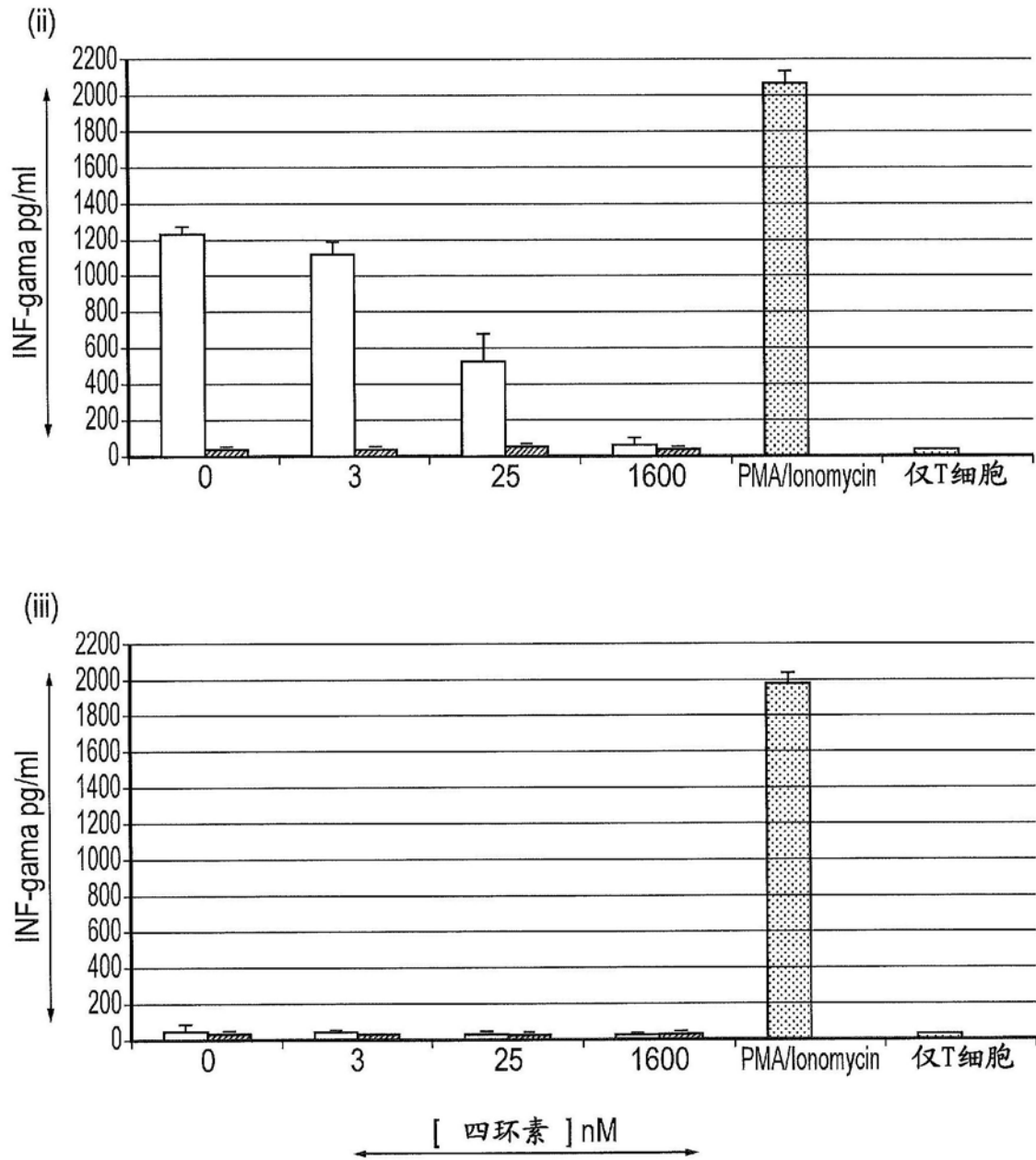


图13(续)

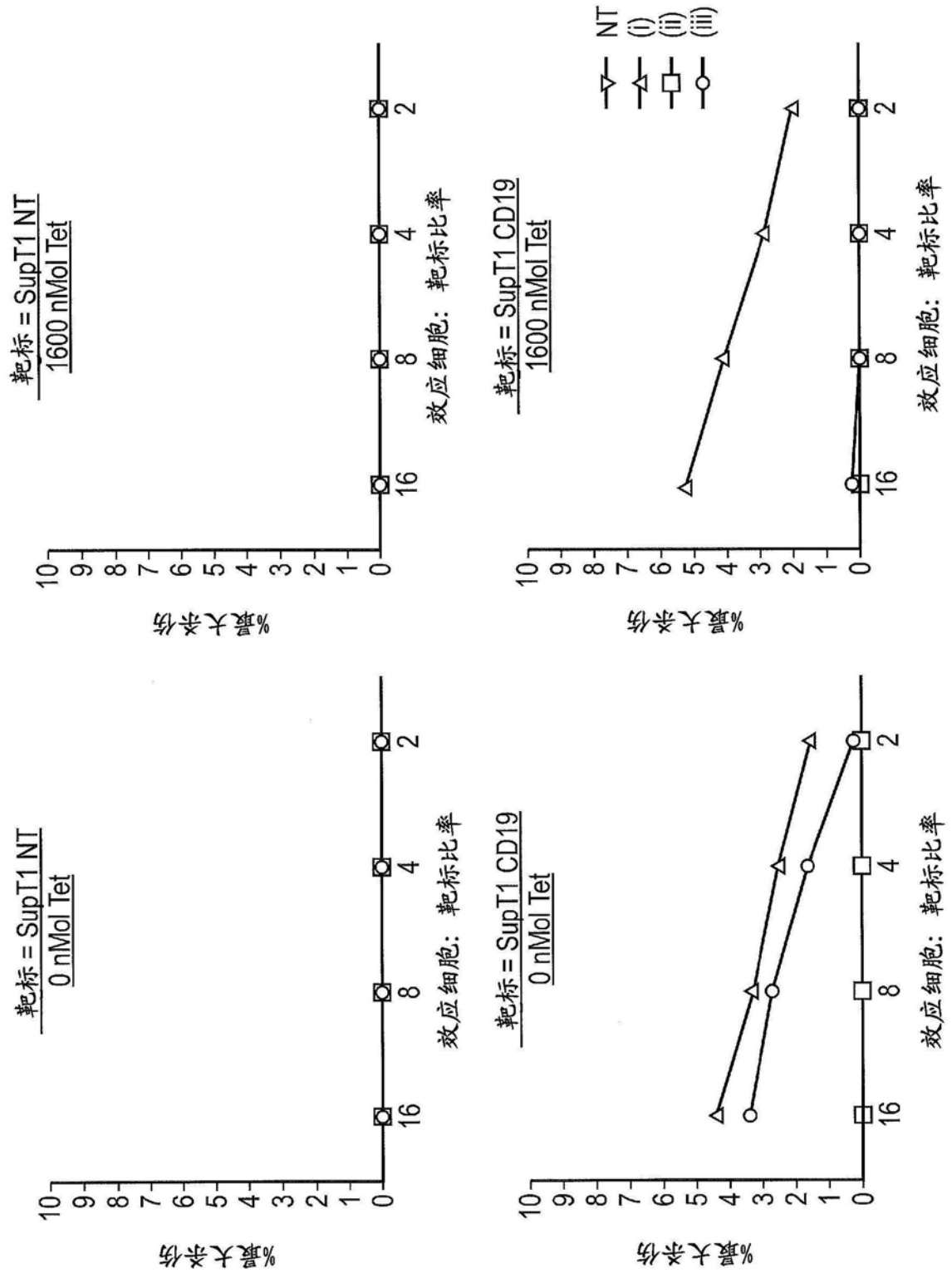


图14