



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118206655 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 18

(21) 申请号 202410061631.8
(22) 申请日 2018.07.25
(30) 优先权数据
62/536,934 2017.07.25 US
(62) 分案原申请数据
201880058794.3 2018.07.25
(71) 申请人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国得克萨斯
(72) 发明人 S·O·安格 E·刘 P·施帕
K·雷兹瓦尼
(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 刘晓东

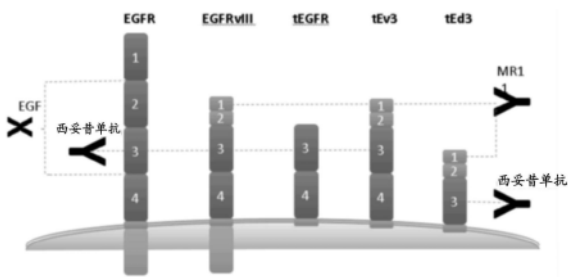
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书43页
序列表（电子公布） 附图59页

(54) 发明名称
增强的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要
本文提供了一种CD5特异性的抗原特异性单链可变片段(scFv),包含所述scFv的嵌合抗原受体(CARs),表达所述CAR的免疫细胞及其在免疫疾病治疗中的使用方法。



1. 一种分离的抗原特异性单链可变片段(scFv),其包含轻链可变区(VL)和重链可变区域(VH),其中所述scFv是CD5特异性的,并且其中所述scFv包含互补决定区(CDR),所述互补决定区具有SEQ ID NO:30中所示scFv序列的CDR的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:30中所示scFv序列的CDR具有不多于3个氨基酸修饰的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的scFv,其中所述scFv包含SEQ ID NO:30中所示scFv序列的CDR。

3. 根据权利要求1或2所述的scFv,其中所述V_L和V_H分别包含由SEQ ID NO:46编码的V_L和V_H的氨基酸序列,或与它们具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的scFv,其中所述V_L和V_H分别包含由SEQ ID NO:46编码的V_L和V_H的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项的scFv,其中所述scFv包含由SEQ ID NO:46编码的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的scFv,其中所述V_L和V_H分别包含具有与SEQ ID NO:46编码的V_L和V_H的框架区具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的框架区。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的scFv,其中所述V_L和V_H分别包含具有与SEQ ID NO:46编码的V_L和V_H的框架区具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的框架区。

8. 根据权利要求1或2的scFv,其中所述V_L包含与SEQ ID NO:31具有至少85%序列同一性的氨基酸序列,并且所述V_H包含与SEQ ID NO:32具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1、2和8中任一项所述的scFv,其中所述V_L包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,并且所述V_H包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1、2、8和9中任一项所述的scFv,其中所述CD5特异性scFv包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1、2和8-10中任一项所述的scFv,其中所述V_L和V_H包含具有与SEQ ID NO:30的氨基酸序列中的框架区具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的框架区。

12. 根据权利要求1、2和8-11中任一项所述的scFv,其中所述V_L和V_H包含具有与SEQ ID NO:30的氨基酸序列中的框架区具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的框架区。

13. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求1-12任一项所述的scFv。

14. 根据权利要求13所述的CAR,其中所述CAR包含选自CD3 ξ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc ϵ RI γ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP10、DAP12、CD70、CD40及其组合的至少一个信号传导结构域。

15. 根据权利要求14所述的CAR,其中所述至少一个信号传导结构域包括DAP10或DAP12。

16. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1-12中任一项所述的scFv或根据权利要求13-15中任一项所述的CAR。

17. 一种表达载体,其包含根据权利要求16所述的多核苷酸。

18. 根据权利要求17所述的表达载体,其中所述表达载体表达根据权利要求1-14中任一项所述的scFv。

19. 根据权利要求18所述的表达载体,其中所述表达载体表达权利要求13-15中任一项

的CAR并表达IL-15。

20. 根据权利要求17-19中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

21. 一种宿主细胞,其被工程化以表达根据权利要求16所述的多核苷酸或者根据权利要求17-20中任一项所述的表达载体。

22. 根据权利要求21所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是免疫细胞。

23. 根据权利要求22所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、不变NK细胞、NKT细胞或干细胞。

24. 根据权利要求22或23所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞是从脐带血中分离的。

25. 一种细胞群,其包含根据权利要求21-24中任一项所述的宿主细胞。

26. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-12中任一项所述的scFv、根据权利要求13-15中任一项所述的CAR、根据权利要求16所述的多核苷酸、根据权利要求17-20中任一项所述的表达载体、根据权利要求21-24中任一项所述的宿主细胞或根据权利要求25所述的细胞群。

27. 根据权利要求1-12中任一项所述的scFv、根据权利要求13-15中任一项所述的CAR、根据权利要求16所述的多核苷酸、根据权利要求17-20中任一项所述的表达载体、根据权利要求21-24中任一项所述的宿主细胞或根据权利要求25所述的细胞群在制备用于治疗受试者中免疫相关疾病的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述免疫相关病症是癌症、自身免疫性病症、移植植物抗宿主病、同种异体移植排斥或炎性病症。

29. 一种分离的抗原特异性单链可变片段(scFv),其包含轻链可变区(VL)和重链可变区域(VH),其中所述scFv选自下组中:

(a) CD19特异性的scFv,并且其中VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

(b) CD123-特异性的scFv,并且其中VL包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(c) 间皮素特异性的scFv,并且其中VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;和

(d) ROR1特异性的scFv,并且其中VL包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

30. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含根据权利要求29所述的scFv。

增强的嵌合抗原受体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2018年7月25日、发明名称为“增强的嵌合抗原受体及其用途”的中国发明专利申请No.201880058794.3的分案申请。

[0002] 本申请要求2017年7月25日提交的美国临时申请序列号62/536,934的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

[0003] 引入序列表

[0004] 于2018年7月23日创建的名为“UTFCP1331W0.txt”的文件中包含的大小为289KB (在MicrosoftWindows中测量的)的序列列表在此通过电子提交方式提交,并通过引用并入本文。

[0005] 背景

[0006] 1. 领域

[0007] 本发明总体上涉及免疫学和分子生物学领域。更特别地,本发明涉及增强的嵌合抗原受体(CAR),例如用于免疫细胞。

[0008] 2. 相关技术描述

[0009] 尽管可供用于诊断出癌症的患者的诊断和治疗选择方面有了技术进步,但预后通常仍然很差,许多患者无法治愈。免疫疗法有望为诊断出各种肿瘤的患者提供有效而靶向的治疗,并有可能根除恶性肿瘤细胞而不损害正常组织。从理论上讲,免疫系统的T细胞能够识别肿瘤细胞特异性的蛋白质模式,并通过多种效应子机制介导它们的破坏。施用表达嵌合抗原受体(CARs)的免疫细胞,例如过继T细胞疗法或NK细胞疗法,是一种试图利用和扩大患者自身免疫细胞的消灭肿瘤的能力,然后将这些效应子以有效消除残留的肿瘤、但又不损害健康的组织的状态返回患者的尝试。通常,CAR包含特异性针对肿瘤相关抗原(TAA)的抗体的单链可变区片段(scFv),所述片段通过铰链和跨膜区与T细胞信号传导分子的胞质域偶联。然而,免疫细胞疗法的临床使用中的许多缺点损害了该方法在癌症治疗中的充分利用。因此,仍然需要有益于免疫细胞疗法的改进的CAR。

[0010] 概述

[0011] 在某些实施方案中,本公开提供了增强的嵌合抗原受体及其用于治疗疾病和病症、包括癌症和自身免疫病症的方法。在一个实施方案中,提供了被称为Ev3(或tEv3)的截短的EGFRvIII,其不包含胞内域或功能性EGF结合结构域。在特定方面,Ev3包含EGFR的截短的结构域1(L1),截短的结构域2(CR1),结构域3(L2)和结构域4(CR2)(如图2B所示)。在一些方面,Ev3可以位于CAR的铰链区中,并且可以用于CAR表达细胞的CAR检测和/或消融。在一些实施方案中,CAR包括人源化scFv和Ev3铰链。在另一个实施方案中,提供了用于CAR的人源化抗原结合结构域,例如人源化单链可变片段(scFv)。进一步的实施方式提供了通过向受试者施用表达所述实施方式的CAR的免疫细胞,例如T细胞或NK细胞,来治疗免疫相关疾病的方法。

[0012] 在另一个实施方案中,提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其在所述CAR的铰链中包含Ev3,其中所述Ev3铰链连接细胞外结构域和至少一个细胞内免疫信号传导结构域。在一些方面,Ev3铰链包含EGFRvIII的跨膜结构域和非功能性胞外域(ectodomain)。在特定方

面,Ev3铰链不包含EGFRvIII胞内域(endodomain)。在一些方面,EGFRvIII的非功能性胞外域基本上不具有与表皮生长因子(EGF)的结合能力。

[0013] 在一些方面,Ev3铰链包含与SEQ ID NO:2具有至少80%、例如至少81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的序列同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述Ev3铰链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0014] Ev3可包含如下SEQ ID NO:2或与其具有至少80% (例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性: LEEKK-GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK-VCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLE IIRGR TKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK ATGQ-VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRG PDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPS (包含部分结构域1-部分结构域2-结构域3-结构域4)。在某些方面,Ev3可具有一个、两个、三个或更多个修饰。

[0015] 在一些方面,Ev3铰链由与SEQ ID NO:1具有至少80%、例如至少81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%的序列同一性的核苷酸序列编码。在某些方面,Ev3铰链由SEQ ID NO:1的核苷酸序列编码。

[0016] 在某些方面,CAR的细胞外结构域包含选自F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv和scFv的抗原结合结构域。在一些方面,所述抗原结合结构域包含scFv。在特定方面,所述scFv进一步定义为人源化scFv。在一些方面,所述人源化scFv是根据所述实施方案的scFv。

[0017] 在一些方面,所述CAR的抗原结合区结合一种或多种肿瘤相关抗原。在某些方面,所述一种或多种肿瘤相关抗原选自CD19、CD319(CS1)、ROR1、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD5、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、 κ 链、 λ 链、CSPG4、ERBB2、WT-1、TRAIL/DR4、VEGFR2、CD33、CLL-1和CD99。在特定的方面,所述一种或多种肿瘤相关抗原是CD19、CD319、CD123、CD5、ROR1、间皮素、CD33、CLL-1和/或CD99。在一些方面,所述scFv不包含EGFR结合结构域。

[0018] 在某些方面,所述至少一个信号传导结构域包含CD3 ξ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc ϵ RI γ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70、CD40或其组合。在特定方面,所述至少一个信号传导结构域包括DAP12。在一些方面,所述CAR包含IL-15。在一个特定方面,所述CAR包含CD3 ζ 、CD28、DAP12和IL-15。

[0019] 在一些方面,所述CAR进一步包含自杀基因。在特定方面,所述自杀基因是诱导型胱天蛋白酶9。

[0020] 在一个实施方案中,提供了分离的抗原特异性人源化单链可变片段(scFv),其包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),其中所述scFv为:

[0021] (a) CD19特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

[0022] (b) CD123-特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,而VH包含SEQ

ID NO:14的氨基酸序列;

[0023] (c) 间皮素特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;

[0024] (d) ROR1特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;

[0025] (e) CD5特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

[0026] (f) CLL-1特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

[0027] (g) CD99特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列,或者

[0028] (h) 与(a)-(g)中任一项的构架区具有90%序列同一性的序列。

[0029] 在一些方面,所述scFv序列与SEQ ID NO:6、12、18、24或30的构架区具有91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性,并且与所述序列的CDR有100%序列同一性。在某些方面,所述序列的CDR可以具有一个、两个或三个修饰。

[0030] 在一些方面,所述scFv是CD19特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一个特定方面,所述CD19特异性scFv包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在某些方面,所述scFv是CD123特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在特定方面,所述CD123特异性scFv包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些方面,所述scFv是间皮素特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在特定方面,所述间皮素特异性scFv包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些方面,所述scFv是ROR1特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在特定方面,所述ROR1特异性scFv包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些方面,scFv是CD5特异性的,并且其中VL包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,而VH包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在某些方面,所述CD5特异性scFv包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0031] 在一些方面,所述scFv包含与SEQ ID NO:6、12、18、24或30的氨基酸序列的构架区具有至少95%,例如至少96、97、98或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0032] 本文还提供了编码上述实施方案的分离的scFv的分离的多核苷酸。在一些方面,该多核苷酸包含SEQ ID NO:3、9、15、21或27。在其他方面,该多核苷酸包含与SEQ ID NO:3、9、15、21或27具有至少90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性的序列。

[0033] 本文还提供了包含所述实施方案的分离的核苷酸的表达载体。在一些方面,所述载体被进一步定义为病毒载体。

[0034] 本文进一步提供了分离的核酸,其包含编码根据本发明的各实施方案中任一项的CAR的核苷酸序列。

[0035] 本文还提供了经加工以表达CAR的宿主细胞,所述CAR包含本实施方案的人源化scFv和/或在所述CAR的铰链区中的截短的EGFRvIII (Ev3)。在一些方面,所述CAR是根据本实施方案中的任何一个。在一些方面,编码所述CAR的DNA被整合到细胞的基因组中。

[0036] 在一些方面,所述宿主细胞被进一步定义为CAR免疫细胞。在特定方面,所述免疫

细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、不变NK细胞(invariant NK cell)、NKT细胞或干细胞。在特定方面,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些方面,所述干细胞是间充质干细胞(MSC)或诱导的多能干(iPS)细胞。在某些方面,所述免疫细胞源自iPS细胞。在一些方面,所述T细胞是CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或 γ - δ T细胞。在某些方面,所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。在某些方面,所述免疫细胞是同种异体的或自体的。在一些方面,所述免疫细胞是从外周血、脐带血或骨髓分离的。在某些方面,所述免疫细胞是从脐带血中分离出来的。在特定方面,脐带血是从2个或更多个个体脐带血单元汇集的。

[0037] 本文还提供了包含根据本发明任一实施方案的免疫细胞群的药物组合物。本文还提供了包含根据本发明任一实施方案的免疫细胞群的药物组合物用于治疗免疫相关病症。

[0038] 在另一个实施方案中,提供了一种在受试者中治疗免疫相关病症的方法,其包括施用有效量的本发明任一实施方案的CAR免疫细胞,例如包含人源化的scFv和/或Ev3铰链。

[0039] 在以上实施方案的一些方面,所述免疫相关疾病是癌症、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病、同种异体移植排斥或炎性病状。在某些方面,所述与免疫有关的疾病是炎性疾病,并且所述免疫细胞基本上不表达糖皮质激素受体。在特定方面,所述免疫相关疾病是癌症。在某些方面,所述免疫细胞是自体的或同种异体的。在某些方面,所述癌症是实体癌或血液系统恶性肿瘤。

[0040] 在其他方面,该方法进一步包括施用至少第二治疗剂。在一些方面,所述至少第二治疗剂包括化学疗法、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。在某些方面,所述免疫细胞和/或至少所述第二治疗剂通过静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌肉内、内窥镜、病变内、经皮、皮下、局部、或通过直接注射或灌注来施用。

[0041] 在一些方面,该方法进一步包括施用抗EGFR抗体。在一些方面,所述抗EGFR抗体是单克隆抗体。在某些方面,所述抗EGFR抗体是西妥昔单抗(cetuximab)或帕尼单抗(panitumumab)。在一些方面,所述抗EGFR抗体通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)选择性消融Ev3-CAR免疫细胞。在某些方面,所述抗EGFR抗体与可检测标签和/或细胞毒性剂融合。在一些方面,该方法进一步包括使可检测标签成像,从而检测所述Ev3-CAR免疫细胞。在某些方面,所述抗EGFR抗体与细胞毒剂融合。在一些方面,所述细胞毒性剂诱导Ev3-CAR免疫细胞中自杀基因的活化。在一些方面,所述细胞毒性剂导致Ev3-CAR免疫细胞的消融。

[0042] 通过下面的详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解,这些详细说明和具体实施例虽然指示了本发明的优选实施方案,但它们仅是通过示例的方式给出,因为根据下述的详细描述,在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0043] 附图的简要说明

[0044] 以下附图构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。通过参考这些附图中的一个或多个附图,结合在此提供的具体实施方式的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0045] 图1A-1B: 当前CAR和Ev3-CAR设计之间的比较。(A) Ev3茎用作整合结构,转导来自抗原结合例如scFv等的信号,以及“关闭”开关,从而可被临床上可供利用的抗体(例如西妥昔单抗)识别以消融CAR阳性免疫细胞。(B) 作为对CAR的增强,例如T细胞的使用,DAP12可用

作Ev3-DAP12 CAR中的信号增强剂,以提高NK细胞中CAR功能的效力。

[0046] 图2A-2C: (A) 显示Ev3与包含胞内域和EGF结合结构域的EGFR相比的示意图。(B) 描绘EGFR变体和片段的示意图。(C) 仅包含细胞外结构域的Ev3序列。

[0047] 图3A-3F: 抗原CD19 (A), hCD19 (B), CD123 (C), hCD123 (D) 和CD99 (E) 的逆转录病毒载体的图。(F) 使用针对CD19的人源化scFv (可以将其替换为其他scFv) 构建CAR 2.0的图谱。

[0048] 图4A-4B: (A) Ev3抗体识别CAR19.Ev3.CD28.CD3 ζ , CAR19.Ev3.DAP12.CD3 ζ 或人源化CAR19.Ev3.CD3 ζ 转导的NK细胞。(B) 在铬释放试验中评估CAR.19转导的NK细胞对CD19+ Raji 肿瘤靶标的杀伤活性, 结果表明CAR19.Ev3.CD28.DAP12 NK细胞与转导的CAR19.IgG1.CD28.CD3z转导的NK细胞在多种效应子: 靶标比率下对于杀死CD19+Raji细胞一样有效。

[0049] 图5A-5B: (A) 描绘CAR的人源化的示意图。(B) 单克隆抗体序列分析。

[0050] 图6: 描绘抗体的同种型、同种异型和独特型的示意图。对抗体的结构决定簇进行拍照, 以定义分离出的、用于分析和随后CDR/构架移植的元件。如所指出的, 人免疫球蛋白的5种主要同种型被进一步亚分类 (IgG1、2、3、4, IgA1、2)。

[0051] 图7A-7C: (A) hCD19scFv和mCD19scFv的氨基酸序列, 包括VL和VH。CDR区域带有下划线。(B) hCD19 scFv和mCD19 scFv的BLAST分析, 以通过序列同一性或同源性验证它们各自的物种起源。(C) 比较mCD19 scFv与人源化CD19 scFv的分析总结。

[0052] 图8A-8D: (A) 描绘3D结构建模的示意图。(B-D) 人类CD19可变轻链的3D结构建模。使用SWISS-MODEL*, 一个全自动的蛋白质结构同源性建模器, 生成了人源化VL和VH结构域的3维模型 (以抗CD19作为具体示例显示)。从结构抗体数据库SAbDab提取结构文件, 作为同源性建模的模板, 并使用在SWISS-MODEL中自动访问的PDB结构文件。

[0053] 图9A-9C: 人CD19可变重链的3D结构建模。对于具体实例hCD19VL结构域, (A) 在SWISS-MODEL中生成一个列表, 以寻求最佳匹配 (结构同源) 结构, 列出了其得分 (GMQE) 和匹配方法 (BLAST或HHblits)。(B-C) 然后将最佳得分结构 (2fgw) 与hCD19VL结构域 (“靶”) 比对, 如下图所示。

[0054] 图10A-10G: (A) 描绘人构架移植的示意图, 显示了从小鼠抗体鉴定和分离CDR区 (左上), 分辨人构架区 (右图), 和人构架/鼠CDR移植 (左下)。如上所述, 从序列分析中收集CDR和构架区。(B) 使用T20评分系统 (Gao等, 2013) 对单克隆抗体进行基线人源化评分, 以列举特定Ig结构域的“人性” (humanness)。作为对照, 从目前在市场上用于评分和比较的抗体中提取VL和VH结构域。针对VL和VH结构域列出了所示抗体的人性得分 (最右边的列)。(C) 批准用于商业市场的早期治疗性抗体是鼠或嵌合抗体 (可变小鼠区域+人类恒定区), 而后来批准的往往是人源化或人类抗体。人性得分 (humanness scores) 倾向于聚集相同类型的抗体 (鼠, 嵌合, 人源化或人类), 并且人性得分高与人类含量相关。(D) 通过FDA抗体年度批准的可变重链的人源化评分。人性得分倾向于聚集相同类型的抗体 (鼠的、嵌合的、人源化的或人的), 并且人性得分高与人类含量相关。由于VH域较大, 因此其人性得分往往较低 (与VL相比)。(E) 指定抗体的人源化评分。抗治疗性抗体反应的频率显示为%, 括号内给出了所评估患者组的大小。通常, 抗体越是人的或人源化的, 在临床使用中报道的免疫原性就越小。(F) hCD19-CAR (SEQ ID NO:1) 和mCD19-CAR (SEQ ID NO:3) 的可变轻链的人源化评分。(G)

hCD19-CAR (SEQ ID NO:2) 和 mCD19-CAR (SEQ ID NO:4) 的可变重链的人源化评分。

[0055] 图11A-11E: (A) CD19-CAR和hCD19-CAR构建体的示意图。(B) CAR的转导效率。(C) 不同的CAR构建体对K562细胞的细胞毒性。(D) 不同的CAR构建体对Raji细胞的细胞毒性。(E) 在指示的效应子:靶标比率下具有对照CD3 ζ /IgG1 CAR或人源化CD3 ζ /IgG1CAR的细胞对K562或Raji细胞的细胞毒性测定。

[0056] 图12A-12I: (A) CD319-CAR NK转导。(B) NK细胞的生长曲线。(C) 细胞系中的CD319表达。(D-F) CD319-CAR NK细胞毒性测定。(G) 用CD319-CAR NK细胞针对指示的细胞类型(包括K562、MM.1S和OPM2)的细胞毒性测定。(H-I) CD319-CAR NK细胞具有效应子表型。

[0057] 示意性实施方式的描述

[0058] 基于嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞免疫疗法已在癌症治疗中显示出显著疗效,尤其是在白血病和淋巴瘤的治疗中。尽管如此,当前可用的CAR可能包含各种设计缺陷。使用CAR对免疫细胞进行重编程以进行靶向癌症免疫治疗的最新临床结果已显示出有效的抗肿瘤细胞毒性。由于大多数CAR单链可变片段 (scFv) 模块是鼠抗体的衍生物,因此人类抗小鼠免疫反应性会损害由此衍生的CAR的功效。

[0059] 因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了一种平台技术来工程化针对抗原的人源化CAR (hCAR)。所述抗原可以包括CD19 (hCD19CAR)、CD123 (hCD123CAR)、间皮素 (hMesoCAR)、ROR1 (hROR1CAR)、CD5 (hCD5CAR)、CLL-1 (hCLL-1CAR) 和/或CD99 (hCD99CAR) 以及可被靶向用于治疗疾病(例如癌症或自身免疫性疾病)的其他抗原。因此,在某些实施方案中,本公开进一步提供了人源化CAR及其在癌症治疗中的使用方法。

[0060] 在一些实施方案中,本公开提供了用于CAR,特别是CAR的scFv的人源化的平台。该过程遵循实施例1中所述的5模块化组件。这些组件可以包括序列分析、3D结构建模,人工构架移植,人源化评分和功能分析。接下来,集中对IgG进行人源化过程,利用同种异型(即,同种同种型的变体)中广泛的序列变异来微调用于人构架的选择(图2)。

[0061] 第一步,可以从诸如GenBank等来源的本地数据库中整理人类重链和轻链的抗体序列。可以使用IgBLAST (BLAST的一种版本) 对可变域进行比对,以描绘同种异型并根据同源性对序列进行分选。然后可以鉴定CDR区并将构架序列分类(图1A)。然后可以执行3D结构建模,例如使用蛋白质结构同源性建模器(例如SWISS-MODEL)。

[0062] 在一些实施方案中,免疫细胞经工程改造以表达具有本文提供的人源化scFv的CAR。免疫细胞可以是NK细胞和/或T细胞,例如衍生自外周血,脐带血或骨髓来源的浸润淋巴细胞。具有源自本人源化平台的scFv的免疫细胞可以减轻人抗小鼠抗体 (HAMA) 产生以及基因修饰的免疫细胞治疗产品的相关免疫介导排斥的可能性。

[0063] 因此,进一步的实施方案提供了通过施用表达具有人源化scFv的CAR的免疫细胞来治疗疾病或病症的方法。这些方法可用于降低免疫排斥反应以及输注的细胞治疗产品的持久性。可以治疗的示例性受试者包括患有CD19⁺CLL, ALL和NHL的癌症患者;CD123阳性恶性肿瘤,包括AML、CML、MDS和BPDCN;间皮素阳性癌症,包括子宫颈癌、子宫内膜癌和头颈癌;ROR1阳性恶性肿瘤,包括CLL(例如,未经事先CAR治疗或CD19-CAR治疗后复发CD19阴性疾病的那些),乳腺癌,卵巢癌和胰腺癌;CD5阳性恶性肿瘤,包括ALL和NHL以及胸腺癌。

[0064] 在进一步的实施方案中,本公开提供了包含截短的EGFRvIII的CAR,其中所述受体不包含胞质胞内域或功能性EGF结合域,在本文中称为Ev3。EGFRvIII是一种EGFR变体,仅在

肿瘤细胞(如多形性胶质母细胞瘤和肺癌)中发现,而在正常的EGFR表达细胞(如上皮细胞)中没有发现。EGFRvIII具有体细胞突变,导致外显子2-7缺失(801个碱基对的读框内缺失,与野生型相比缺失267个氨基酸)。EGFRvIII的缺失还覆盖了结构域1和2的大部分,导致截短的结构域1和截短的结构域2。此外,由于外显子1和外显子8融合,产生了一个额外的甘氨酸残基(氨基酸6-273被甘氨酸残基取代),导致EGFRvIII具有一个特定的表位(即LEEKKGNYVVT),形成肿瘤特异性抗原,例如对于多形胶质母细胞瘤。

[0065] 本文提供的截短的EGFRvIII,称为Ev3(或tEv3),不包含胞内域或功能性EGF结合域。具体而言,Ev3胞外域可用作除跨膜和胞内信号传导域外的CAR茎,用于a)信号转导,b)分配CAR阳性的细胞标志物和c)通过抗体结合(例如与西妥昔单抗)消融细胞的抗原性标志物。在特定方面,Ev3包含EGFR的截短结构域1(L1),截短结构域2(CR1),结构域3(L2)和结构域4(CR2)(如图2B所示)。Ev3的示例性序列在图2C中描绘。本Ev3可包含与图2C中的序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。西妥昔单抗结合位点(在结构域3中)在Ev3和野生型EGFR细胞外结构域中均被保留。除了西妥昔单抗(和/或帕尼单抗)结合位点外,Ev3表位还具有对于其他抗体(例如MR1,mAb 806和DH8.3)的额外的结合位点。

[0066] 本文提供的CAR可以使用Ev3作为整体信号转导铰链,该铰链可以加倍作为抗原安全开关,将scFv(即抗原识别域)与信号传导域(即CD28和CD3 ζ)共价连接。Ev3还允许在体外和体内检测CAR免疫细胞。此外,Ev3铰链可确保保留遗传荷载(CAR)。

[0067] 本文提供的Ev3铰链的另一方面是其被诸如MR1的抗体靶向的能力,所述抗体对EGFRvIII具有特异性并且不会与存在于其他组织和细胞例如上皮细胞中的EGFR的结构域III和IV交叉反应。西妥昔单抗和帕尼单抗是临床上可获得的抗体,并且已获得FDA批准,从而消除了对具有不同抗原特异性(例如CD19、CD123、CD5、ROR1、CD33、CD99和间皮素)的每种CAR的独特型抗体获得监管批准的需求。靶向Ev3-CAR的能力可用于检测CAR阳性细胞和/或受控的细胞消融。如果发生不良事件,例如细胞因子释放综合征,神经毒性和/或靶标上或肿瘤外活性,则可能需要进行细胞消融。由于Ev3在免疫细胞(例如T或NK细胞)中通常不表达,因此Ev3的强制表达将特异性标记基因修饰的免疫细胞。最后,Ev3不包含信号传导胞内域(因为细胞质结构域被去除了)或EGF结合域,包含Ev3的CAR将不响应或与EGF信号传导通路(细胞内或细胞外)发生串扰(例如AR、ARF4、CAV1、CAV3、CBL、CBLB、CBLG、CD44、CDC25A、CRK、CTNNB1、DCN、EGF、GRB14、Grb2、JAK2、MUC1、NCK1、NCK2、PKC α 、PLCG1、PLSCR1、PTPN1、PTPN11、PTPN6、PTPRK、SH2D3A、SH3KBP1、SHC1、SOS、OS、STAT3、STAT3、STAT5A、UBC、WAS)。因此,在特定方面,预期这些基因产物均不干扰Ev3-CARS的Ev3铰链。在某些方面,Ev3可具有一个、两个、三个或更多个修饰。

[0068] 在其他方面,通过在Ev3-DAP12-CARs中掺入NK细胞激活中的重要元素DNAX-活化蛋白12(DAP12)信号传导模块,可以进一步增强Ev3-CAR的功能、功效和细胞持久性。

[0069] 进一步的实施方案提供了将本文提供的CAR引入免疫细胞例如T细胞和NK细胞的方法。可以将CAR-T或CAR-NK细胞施用给受试者,例如用于治疗癌症。特别地,可以通过CAR-T或CAR-NK细胞治疗的癌症包括白血病和淋巴瘤,例如慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0070] I. 定义

[0071] 如本文所用,就指定组分而言,“基本上不含”在本文中是指没有将指定组分故意

地配制到组合物中和/或其仅以污染物或痕量存在。因此,由组合物的任何意外污染导致的指定组分的总量远低于0.05%,优选低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到指定成分的量的组合物。

[0072] 如本说明书中所使用的,“一个/种”可以表示一个/种或多个/种。如在本文的权利要求中使用的,当与表述“包括/包含”结合使用时,表述“一”或“一个/种”可以表示一伙多于一个/种。

[0073] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互斥的,否则权利要求中的术语“或”的使用是指“和/或”,尽管本公开内容支持仅提及替代方案和“和/或”的定义。如本文所用,“另一”可以表示至少第二或更多。术语“大约”,“基本上”和“约”通常是指规定值正负5%。

[0074] 当与细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸有关使用时,术语“外源”是指已经通过人工或天然途径引入细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸;或者针对细胞时,该术语是指被分离并随后通过人工或天然手段引入其他细胞或生物体的细胞。外源核酸可以来自不同的生物体或细胞,或者可以是在该生物体或细胞中天然存在的核酸的一个或多个其他拷贝。外源细胞可能来自其他生物,也可能来自同一生物。作为非限制性实例,外源核酸是处于与天然细胞中的染色体位置不同的染色体位置处,或侧翼具有不同于自然界中发现的核酸序列的核酸。

[0075] “表达构建体”或“表达盒”是指能够指导转录的核酸分子。表达构建体至少包括指导一种或多种所需细胞类型、组织或器官中的基因表达的一个或多个转录控制元件(例如启动子、增强子或其功能等效的结构)。也可以包括其他元件,例如转录终止信号。

[0076] “载体”或“构建体”(有时称为基因递送系统或基因转移“载体”)是指包含要在体外或体内递送至宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。

[0077] “质粒”是载体的一种常见类型,其是与染色体DNA分开的染色体外DNA分子,能够独立于染色体DNA而复制。在某些情况下,它是环形和双链的。

[0078] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指活的哺乳动物生物体,例如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因物种。在某些实施方案中,患者或受试者是灵长类动物。人类患者的非限制性实例是成人、少年、婴儿和胎儿。

[0079] “免疫疾病”、“免疫相关疾病”或“免疫介导的疾病”是指其中免疫应答在疾病的发生或进展中起关键作用的疾病。免疫介导的疾病包括自身免疫疾病、同种异体移植排斥、移植物抗宿主疾病以及炎性和过敏性疾病。

[0080] “免疫应答”是免疫系统的细胞例如B细胞或T细胞或者先天免疫细胞对刺激的应答。在一个实施方案中,该应答对特定抗原是特异性的(“抗原特异性应答”)。

[0081] 术语“肿瘤相关抗原”、“肿瘤抗原”和“癌细胞抗原”在本文可互换使用。在每种情况下,所述术语是指癌细胞特异性或优先表达的蛋白质、糖蛋白或碳水化合物。

[0082] “表位”是由氨基酸序列的特异性决定的抗体识别的抗原上的位点。如果按照竞争性结合测定法中测量的,两种抗体彼此竞争性抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则可以说这两种抗体结合同一表位。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体结合的大多数氨基酸突变也减少或消除了另一种抗体的结合,则这两种抗体具有相同的表位。如果两种抗体各自部分抑制另一种抗体与抗原的结合,和/或如果某些减少或消除一种抗体结合的一些氨基酸突变也减少或消除另一种抗体的结合,则称这两种抗体具有重叠的表位。

[0083] 对疾病或病症的“治疗”或处理是指执行一个方案,其可以包括向患者施用一种或多种药物,以减轻疾病的体征或症状。理想的治疗效果包括降低疾病进展速度,改善或减轻疾病状态和复发或改善预后。缓解可以在疾病或病症出现的迹象或症状出现之前,也可以在迹象或症状出现之后出现。因此,“治疗”或“处理”可包括“预防”疾病或不良病症。另外,“治疗”或“处理”不需要完全缓解体征或症状,不需要治愈,并且特别包括仅对患者有轻微影响的方案。

[0084] 在说明书和/或权利要求书中使用的术语“有效”是指足以实现期望的、预期的或目标的结果。“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”在用化合物治疗患者或受试者的上下文中使用时是指当向受试者或患者给药以治疗或预防药物时所述化合物的量是足以实现对这种疾病的治疗或预防的量。

[0085] “治疗”或“处理”包括 (1) 在经历或表现出该疾病的病理或症状的受试者或患者中抑制疾病(例如,阻止病理和/或症状的进一步发展), (2) 在正在经历或显示疾病的病理或症状的受试者或患者中改善所述疾病(例如,逆转病理和/或症状), 和/或 (3) 在正在经历或显示疾病的病理或症状的受试者或患者中实现所述疾病或其症状的任何可测量的减少。

[0086] “预防”包括: (1) 在可能处于疾病风险中和/或易患该疾病但尚未经历或未表现出该疾病的任何或所有病理或症状的受试者或患者中抑制所述疾病的发作, 和/或 (2) 在可能处于疾病风险中和/或易患该疾病但尚未经历或未表现出该疾病的任何或所有病理或症状的受试者或患者中减慢所述疾病的病理或症状的发作。

[0087] 如本文所用,术语“构架区”(framework region)是指抗体的可变区中充当CDR的支架的区域。因此,构架区可包含可变轻链和可变重链的非CDR序列。可变区的CDR可以通过本领域已知的方法来确定,例如通过使用如Sela-Culang等,2013中所述的Kabat编号系统;该文献通过引用整体并入本文。Kabat (CITE) 描述的系统不仅提供适用于抗体任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供定义三个CDR的精确残基边界。

[0088] 如本文中通常使用的,“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合与人和动物的组织、器官和/或体液接触使用,同时没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,且具有合理的受益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0089] “药学上可接受的盐”是指本文所公开的化合物的盐,其是如上所定义的药学上可接受的并且具有所需的药理活性。这样的盐包括与无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成的酸加成盐;或与有机酸例如1,2乙烷二磺酸、2-羟基乙烷磺酸、2-萘磺酸、3-苯基丙酸、4,4’亚甲基双(3-羟基-2-烯-1羧酸)、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、乙酸、脂族单和二羧酸、脂族硫酸、芳族硫酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环戊烷丙酸、乙磺酸、富马酸、葡萄糖庚酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、庚酸、己酸、羟萘甲酸、乳酸、月桂基硫酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘康酸、邻(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、草酸、对氯苯磺酸、苯基取代的链烷酸、丙酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、叔丁基乙酸、三甲基乙酸等形成的酸加成盐。药学上可接受的盐还包括碱加成盐,当存在的酸性质子能够与无机或有机碱反应时,可以形成碱加成盐。可接受的无机碱包括氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、氢氧化铝和氢氧化钙。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡萄糖胺等。应该认识到,构成本发明的任何盐的一部分的具体阴离子或阳离子不是关键的,只要该盐整体上在药理学上是可接受的即可。药学上可

接受的盐的另外实例及其制备和使用方法在Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P.H.Stahl&C.G.Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002) 中提供。

[0090] “药学上可接受的载体”, “药物载体”或简称为“载体”是与活性成分药物一起配制的药学上可接受的物质, 该活性成分药物涉及运载、递送和/或运输化学试剂。药物载体可以用于改善药物的递送和有效性, 包括例如控释技术以调节药物生物利用度, 降低药物代谢和/或降低药物毒性。一些药物载体可能会提高药物向特定靶位点递送的有效性。载体的实例包括: 脂质体、微球 (例如由聚 (乳酸-共-乙醇酸) 制成)、白蛋白微球、合成聚合物、纳米纤维、蛋白质-DNA复合物、蛋白质缀合物、红细胞、病毒体和树状聚合物。

[0091] 如本文所用, 术语“嵌合抗原受体 (CARs)”可以指例如人工T细胞受体, 嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体, 并且包括将人工特异性移植到特定免疫效应细胞上的工程化受体。可以使用CAR来将单克隆抗体的特异性赋予T细胞, 从而允许产生大量特异性T细胞, 例如用于过继细胞疗法。在特定的实施方案中, CARs将细胞的特异性导向例如肿瘤相关抗原。在一些实施方案中, CAR包含细胞内激活结构域、跨膜结构域和含有肿瘤相关抗原结合区的细胞外结构域。在特定方面, CAR包含源自单克隆抗体的单链可变片段 (scFv) 与CD3-zeta、跨膜结构域和胞内域融合的融合物。其他CAR设计的特异性可以源自受体 (例如, 肽) 的配体或源自模式识别受体, 例如Dectins。在某些情况下, 可以修饰抗原识别域的间隔以减少激活诱导的细胞死亡。在某些情况下, CAR包含用于其他共刺激信号传导的结构域, 例如CD3 ζ 、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10和/或OX40。在某些情况下, 分子可以与CAR共表达, 包括共刺激分子、用于成像的报告基因 (例如用于正电子发射断层扫描)、在添加前药后有条件消融T细胞的基因产物、归巢受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子和细胞因子受体。

[0092] 术语“抗原呈递细胞 (APC)”是指能够以免疫系统的特定效应细胞可识别的肽-MHC复合物形式呈递一种或多种抗原, 从而诱导针对其呈递的抗原的有效细胞免疫应答的一类细胞。APC可以是完整的整个细胞, 例如巨噬细胞、B细胞、内皮细胞、活化的T细胞和树突状细胞; 或其他天然或合成的分子, 例如与 β 2-微球蛋白复合的纯化的I类MHC分子。尽管许多类型的细胞可能能够在其细胞表面上呈递抗原以进行T细胞识别, 但只有树突状细胞才具有以有效量呈递抗原以激活幼稚T细胞以产生细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 反应的能力。

[0093] 术语“培养”是指细胞在合适的培养基中的体外维持、分化和/或扩增。“富集的”是指以比其在生物体中存在的组织内出现的占总细胞百分比更高的占总细胞百分比包含细胞的组合物。

[0094] “抗癌”剂能够例如通过促进癌细胞的杀伤、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低转移的发病率或量、减少肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少向肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应、预防或抑制癌症的进展或者延长患有癌症的受试者的寿命而负面影响受试者内的癌细胞/肿瘤。

[0095] 如本文所用, 术语“自杀基因”被定义为可用于选择性地靶向杀死细胞的基因。

[0096] 多核苷酸或多核苷酸区域 (或者多肽或多肽区域) 与另一序列具有某一百分比 (例如80%、85%、90%或95%) 的“序列同一性”或“同源性”是指, 在比对时, 所比较的两个序列内该百分比的碱基 (或氨基酸) 是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定这种比对和同源性或序列同一性百分比, 例如CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY

(F.M.Ausubel等编,1987)增刊30,第7.7.18节表7.7.1中描述的那些程序。优选地,使用默认参数进行比对。优选的比对程序是BLAST,使用默认参数。特别是,首选程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;filter=none;股=两者;截止=60;期望=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。

[0097] 如本文所用,术语“截短的”是指蛋白质或蛋白质结构域的片段,其比全长蛋白质或蛋白质结构域更短。截短可以是去除全长序列的1个或更多个氨基酸,例如5、10、15、20、25、30或更多个氨基酸。

[0098] II. 免疫细胞

[0099] 本公开的某些实施方案涉及表达CAR的免疫细胞,例如以Ev3作为CAR的铰链和/或将人源化的scFv作为cAR的抗原结合结构域。免疫细胞可以是T细胞(例如调节性T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或 γ - δ T细胞)、NK细胞、不变NK细胞、NKT细胞、干细胞(例如间充质干细胞(MSC))或诱导的多能干(iPSC)细胞)。在一些实施方案中,所述细胞是单核细胞或粒细胞,例如髓样细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。本文还提供了产生和加工免疫细胞的方法,以及使用和施用该细胞用于过继细胞治疗的方法,在这种情况下,细胞可以是自体的或同种异体的。因此,免疫细胞可以用作免疫疗法,例如靶向癌细胞。

[0100] 免疫细胞可以分离自受试者,特别是人类受试者。免疫细胞可获自感兴趣的受试者,例如怀疑患有特定疾病或病症的受试者,怀疑易患特定疾病或病症的受试者,或正在接受针对特定疾病或病症的治疗的受试者。免疫细胞可以从它们在受试者体内存在的任何位置收集,包括但不限于血液、脐带血、脾脏、胸腺、淋巴结和骨髓。分离的免疫细胞可以直接使用,或者可以保存一段时间,例如通过冷冻。

[0101] 免疫细胞可以从其所处的任何组织中富集/纯化,包括但不限于血液(包括通过血库或脐带血库收集的血液)、脾脏、骨髓、在手术过程中取出和/或暴露的组织和通过活检程序获得的组织。可以从活体和非活体受试者中分离用于免疫细胞富集、分离和/或纯化的组织/器官,其中所述非活体受试者是器官供体。在特定的实施方案中,免疫细胞是从血液例如外周血或脐带血分离的。在一些方面,从脐带血分离的免疫细胞具有增强的免疫调节能力,例如由CD4或CD8阳性T细胞抑制测量的。在特定方面,为了增强的免疫调节能力,从汇集的血液,特别是汇集的脐带血中分离免疫细胞。汇集的血液可以来自2个或更多个来源,例如3、4、5、6、7、8、9、10或更多个来源(例如供体受试者)。

[0102] 免疫细胞群体可以从需要治疗或患有与免疫细胞活性降低有关的疾病的受试者中获得。因此,所述细胞对于需要治疗的受试者将是自体的。或者,可以从供体,优选组织相容性匹配的供体获得免疫细胞群。可以从外周血、脐带血、骨髓、脾脏或免疫细胞在所述受试者或供体中存在的任何其他器官/组织中收获免疫细胞群。免疫细胞可以从受试者和/或供体汇集库中分离,例如从汇集的脐带血中分离。

[0103] 当从不同于受试者的供体获得免疫细胞群体时,该供体优选是同种异体的,条件是所获得的细胞是与受试者相容的,因为它们可以被引入受试者中。同种异体供体细胞可能是人白细胞抗原(HLA)相容性的,也可能不是相容性的。

[0104] A. T细胞

[0105] 在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在最近的二十年中,已经描述了用于功能性抗肿瘤效应细胞的衍生、活化和扩增的几种基本方法。这些包括:自体细胞,例如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL);使用自体DC,淋巴细胞,人工抗原呈递细胞(APC)或涂有T细胞配体和活化抗体的珠子或通过捕获靶细胞膜分离的细胞离体激活的T细胞;天然表达抗宿主肿瘤T细胞受体(TCR)的同种异体细胞;经过基因重编程或“重定向”以表达展示抗体样肿瘤识别能力的肿瘤反应性TCR或嵌合TCR分子(被称为“T体”(T bodies))的非肿瘤特异性的自体或同种异体细胞。这些方法已经产生了许多可用于本文描述的方法中的T细胞制备和免疫方案。

[0106] 在一些实施方案中,T细胞衍生自血液、骨髓、淋巴、脐带或淋巴器官。在某些方面,所述细胞是人细胞。所述细胞通常是原代细胞,例如直接从受试者中分离和/或从受试者中分离并冷冻的细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集,例如整个T细胞群体,CD4⁺细胞,CD8⁺细胞及其亚群,例如由功能、激活状态、成熟度、分化潜能、扩增、再循环、定位和/或持久能力,抗原特异性,抗原受体的类型,在特定器官或区室中的存在,标志物或细胞因子的分泌概况和/或分化程度所确定的那些。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。在一些方面,例如对于现有技术,细胞是多能的和/或多能的,例如干细胞,例如诱导的多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,该方法包括如本文所述从受试者分离细胞,制备、加工、培养和/或工程化它们,以及在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者。

[0107] T细胞(例如CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)的亚型和亚群是幼稚T(TN)细胞,效应T细胞(T_{EFF}),记忆T细胞及其亚型,例如干细胞记忆T(TSC_M)、中枢记忆T(TC_M)、效应记忆T(T_{EM})或终末分化的效应记忆T细胞,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),未成熟T细胞,成熟T细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,黏膜相关的不变T(MAIT)细胞,天然和适应性调节性T(Treg)细胞,辅助性T细胞,例如TH1细胞,TH2细胞,TH3细胞,TH17细胞,TH9细胞,TH22细胞,滤泡性辅助性T细胞, α/β T细胞和 δ/γ T细胞。

[0108] 在一些实施方案中,一个或多个T细胞群被富集或耗尽了对特定标志物例如表面标志物呈阳性或对特定标志物呈阴性的细胞。在某些情况下,此类标志物是在某些T细胞群体(例如非记忆细胞)上不存在或以相对较低的水平表达,但在某些其他T细胞群体(例如,记忆细胞)上以相对较高水平存在或表达的那些标志物。

[0109] 在一些实施方案中,通过负选择在非T细胞例如B细胞、单核细胞或其他白细胞例如CD14上表达的标志物,将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。可以通过对在一种或多种天然、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高的程度表达的标志物的正或负选择,可以将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类为亚群。

[0110] 在一些实施方案中,例如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的正或负选择,对CD8⁺T细胞进一步富集或耗尽幼稚,中枢记忆,效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,对中央记忆T(T_{CM})细胞的富集以提高效力,例如改善给药后的长期存活,扩增和/或植入,在某些方面,在这些亚群中特别稳健。

[0111] 在一些实施方案中,T细胞是自体T细胞。在该方法中,从患者获得肿瘤样品并获得单细胞悬液。可以以任何合适的方式,例如机械地(使用例如温和的MACSTM Dissociator, MiltenyiBiotec, Auburn, CA,使肿瘤分解)或酶促地(例如,胶原酶或DNase)获得单细胞悬

液。在白介素2 (IL-2) 中培养肿瘤酶促消化物的单细胞悬液。

[0112] 培养的T细胞可以合并并快速扩增。快速扩增使抗原特异性T细胞的数量在约10至14天增加了至少约50倍(例如50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多)。更优选地,快速扩增提供在约10至约14天的一段时间内至少约200倍的增加(例如200、300、400、500、600、700、800、900或更大)。

[0113] 可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种来完成扩增。例如,可以在存在饲养淋巴细胞和白介素2 (IL-2) 或白介素15 (IL-15) (优选IL-2) 的情况下,使用非特异性T细胞受体刺激迅速扩增T细胞。非特异性T细胞受体刺激可以包括约30ng/ml的OKT3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-**McNeil®**, Raritan, N.J. 获得)。或者,可通过用癌症的一种或多种抗原(包括其抗原性部分,例如表位或细胞)在T细胞生长因子(例如300IU/ml IL-2或IL-15)存在下在体外刺激外周血单核细胞(PBMC)来快速扩增T细胞,所述抗原抗原(包括其抗原性部分,例如表位或细胞)可以任选地从载体表达而来,例如人白细胞抗原A2 (HLA-A2) 结合肽。通过用脉冲到表达HLA-A2的抗原呈递细胞上的相同癌症抗原重新刺激,体外诱导的T细胞被迅速扩增。备选地,例如,可以用辐照的自体淋巴细胞或辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和例如IL-2重新刺激T细胞。

[0114] 可以修饰自体T细胞以表达促进自体T细胞的生长和活化的T细胞生长因子。合适的T细胞生长因子包括例如白介素 (IL) -2, IL-7, IL-15和IL-12。合适的修饰方法是本领域已知的。参见例如Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 和Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994。在特定方面,修饰的自体T细胞以高水平表达T细胞生长因子。T细胞生长因子编码序列,例如IL-12的编码序列,和启动子一样容易在本领域中获得,启动子与T细胞生长因子编码序列的可操作连接促进了高水平表达。

[0115] B. NK细胞

[0116] 在一些实施方案中,所述免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。NK细胞是淋巴细胞的亚群,其对多种肿瘤细胞,病毒感染的细胞以及骨髓和胸腺中的某些正常细胞具有自发的细胞毒性。NK细胞在骨髓,淋巴结,脾脏,扁桃体和胸腺中分化并成熟。NK细胞可以通过人类中特定的表面标记(例如CD16, CD56和CD8)检测。NK细胞不表达T细胞抗原受体,泛T标记CD3或表面免疫球蛋白B细胞受体。

[0117] 在某些实施方案中,NK细胞通过本领域熟知的方法衍生自人外周血单核细胞(PBMC),未刺激的白细胞分离产物(PBSC),人胚胎干细胞(hESC),诱导的多能干细胞(iPSC),骨髓或脐带血。特别地,脐带CB用于衍生NK细胞。在某些方面,通过先前描述的NK细胞的体外扩增方法分离和扩增NK细胞(Spanholtz等, 2011; Shah等, 2013)。在这种方法中,通过ficoll密度梯度离心分离出CB单核细胞,并在生物反应器中与IL-2和人工抗原呈递细胞(aAPC)一起培养。7天后,将细胞培养物中的所有表达CD3的细胞清除掉,并再培养7天。再次对细胞耗尽CD3,并对其特征进行鉴定以确定CD56⁺/CD3⁻细胞或NK细胞的百分比。在其他方法中,脐带CB用于通过分离CD34⁺细胞并通过在含有SCF, IL-7, IL-15和IL-2的培养基中培养而分化为CD56⁺/CD3⁻细胞来衍生NK细胞。

[0118] C. 干细胞

[0119] 在一些实施方案中,本公开的免疫细胞可以是干细胞,例如诱导的多能干细胞(PSC),间充质干细胞(MSC)或造血干细胞(HSC)。

[0120] 本文使用的多能干细胞可以是诱导的多能干(iPS)细胞,通常缩写为iPS细胞或iPSC。除生殖细胞外,其它任何细胞都可用作iPSC的起点。例如,细胞类型可以是角质形成细胞,成纤维细胞,造血细胞,间充质细胞,肝细胞或胃细胞。对细胞分化的程度或收集细胞的动物的年龄没有限制。在本文公开的方法中,甚至未分化的祖细胞(包括体干细胞)和最终分化的成熟细胞也可以用作体细胞的来源。

[0121] 可以使用本领域技术人员已知的方法将体细胞重编程以产生iPS细胞。通常,核重编程因子用于从体细胞产生多能干细胞。在一些实施方案中,利用了Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28中的至少三个或至少四个。在其他实施方案中,利用Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4,或者Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28。

[0122] 衍生后,可以在足以维持多能性的培养基中培养iPSC。在某些实施方案中,可以使用不确定成分的条件;例如,多能细胞可以在成纤维细胞饲养细胞或已经暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基上培养,以使干细胞保持未分化状态。在一些实施方案中,将细胞在经放射线或抗生素处理以终止细胞分裂的小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养细胞共存的条件下进行培养。或者,可以使用成分确定的、不依赖饲养细胞的培养系统,例如TESR™培养基或E8™/Essential 8™培养基,将多能细胞培养并维持在基本上未分化的状态。

[0123] III. 增强的嵌合抗原受体

[0124] A. 截短的EGFRvIII (Ev3)

[0125] 在某些实施方案中,本公开提供了增强的CAR,其通过将抗原结合区共价连接至细胞内信号传导域而包含Ev3作为CAR的铰链或茎区域。抗原结合区可包含衍生自源于抗体例如小鼠抗人抗体的抗抗原结合结构域的单链可变片段(scFv)。scFv可以靶向任何潜在的抗原。scFv可以被人源化,例如在scFv的构架区域中。在特定方面,维持了对检测抗体或消融抗体的可及性(例如,经由ADCC)。

[0126] Ev3可包含以下SEQ ID NO:2或与其具有至少80%(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%)序列同一性: LEEKK-GNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRK-VCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLE IIRGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQ-VCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRG PDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAVGMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPS (包括部分结构域1-部分结构域2-结构域3-结构域4)。在某些方面,Ev3可具有一个、两个、三个或更多个修饰。

[0127] 在一个实施方案中,提供了一种CD19Ev3-CAR,其从N末端至C末端包含源自小鼠抗人CD19单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3ζ胞内域。在另一个实施方案中,CD19Ev3-CAR包含人源化CD19(hCD19),被称为hCD19Ev3-CAR。CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3ζ胞内域之间,例如CD19Ev3DAP12-CAR或hCD19Ev3DAP12-CAR。

[0128] 在一个实施方案中,提供了一种CD123Ev3-CAR,其从N末端至C末端包含衍生自小

鼠抗人CD123单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3 ζ 胞内域。在另一个实施方案中,CD123Ev3-CAR包含人源化CD123(hCD123),被称为hCD123Ev3-CAR。所述CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3 ζ 胞内域之间,例如CD123Ev3DAP12-CAR或hCD123Ev3DAP12-CAR。

[0129] 在一个实施方案中,提供了一种MesoEv3-CAR,其从N末端至C末端包含衍生自小鼠抗人皮素单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3 ζ 胞内域。在另一个实施方案中,MesoEv3-CAR包含人源化Meso(hMeso),被称为hMesoEv3-CAR。所述CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3 ζ 胞内域之间,例如MesoEv3DAP12-CAR或hMesoEv3DAP12-CAR。

[0130] 在一个实施方案中,提供了一种ROR1-Ev3-CAR,其从N端至C端包含源自小鼠抗人ROR1单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3 ζ 胞内域。在另一个实施方案中,ROR1-Ev3-CAR包含人源化ROR1(hROR1),被称为hROR1Ev3-CAR。所述CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3 ζ 胞内域之间,例如ROR1-Ev3DAP12-CAR或hROR1-Ev3DAP12-CAR。

[0131] 在一个实施方案中,提供了一种CD5Ev3-CAR,其从N端至C端包含源自小鼠抗人CD5单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3 ζ 胞内域。在另一个实施方案中,CD5Ev3-CAR包含人源化CD5(hCD5),被称为hCD5Ev3-CAR。所述CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3 ζ 胞内域之间,例如CD5Ev3DAP12-CAR或hCD5Ev3DAP12-CAR。

[0132] 在一个实施方案中,提供了一种CD99Ev3-CAR,其从N端至C端包含衍生自小鼠抗人CD99单克隆抗体的scFv,包括跨膜结构域的Ev3铰链,CD28胞内域和CD3 ζ 胞内域。在另一个实施方案中,CD5Ev3-CAR包含人源化CD99(hCD99),被称为hCD99Ev3-CAR。所述CAR可以进一步包含DAP12胞内域,例如在Ev3跨膜结构域和CD3 ζ 胞内域之间,例如CD99Ev3DAP12-CAR或hCD99Ev3DAP12-CAR。

[0133] EGFRvIII是EGFR基因外显子2-7突变的结果,该突变使突变受体无法结合任何已知的配体,因为该受体没有完整的配体结合域。本公开的截短的EGFRvIII,即Ev3,进一步包含EGFRvIII的胞内域或胞内域的缺失。因此,Ev3不包含功能性EGF结合域或EGFRvIII的细胞内信号传导结构域。

[0134] Ev3铰链可包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在特定的实施方案中,Ev3铰链与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的序列同一性。Ev3铰链区可包含SEQ ID NO:2的片段或可在受体片段的N-末端或C-末端包含另外的氨基酸。Ev3的示例性示意图如图2所示。

[0135] 在CAR的铰链区中包含截短的EGFRvIII使得可以保留遗传货物的负载。Ev3还可以用作安全开关和/或用于体外或体内CAR的检测。完整的Ev4铰链可被抗体(例如临床上可供利用的单克隆抗体(例如西妥昔单抗))识别,以进行检测或细胞消融。另外,Ev3不包含配体结合结构域;因此,没有内源性功能或与其他途径的串扰。Ev3在CAR信号转导中也起作用,并且是肿瘤特异性的,可以使CAR疗法的副作用最小化。

[0136] B. 抗原

[0137] 本文提供的CAR可以具有可用于治疗疾病或病症的任何抗原特异性。本文提供的

CAR可以包含一种以上的抗原,例如两种抗原。示例性抗原包括但不限于CD19、CD123、间皮素、CD5、CD47、CLL-1、CD33、CD99、CLL-1、U5snRNP200、CD200、CS1、BAFF-R、ROR-1、CD99、间皮素、或BCMA。

[0138] 本文提供的人源化平台可用于对任何给定抗原开发人源化CAR。具有人源化CAR的示例性抗原包括但不限于CD19、CD123、间皮素、CD5、CD47、CLL-1、CD33、CD99、U5snRNP200、CD200、CS1、BAFF-R、ROR-1或BCMA。

[0139] 在一个实施方案中,编码的轻链可变区包含人PH0879种系序列的一个、两个、三个或所有四个构架区。hCD19的编码的重链可变区可以包含人ACD43442种系序列的一个、两个、三个或所有四个构架区。

[0140] 在一个实施方案中,编码的抗原结合结构域是scFv,其包含SEQ ID NO:6、12、18、24、30、58或61的氨基酸序列的轻链和重链。在一个实施方案中,所述抗原结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,其包含具有本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如取代)但不超过10、20或30个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7、13、19、25、31、59或63的氨基酸序列具有90-99%同一性的序列;和/或重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:8、14、20、26、32、60或64的重链可变区的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如取代)但不超过10、20或30个修饰(例如取代)的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:6、12、18、24、30、58或61的氨基酸序列具有90-99%同一性的序列。

[0141] 在一些实施方案中,本文提供了CD19的人源化scFv。所述人源化CD19(hCD19)的scFv可以具有SEQ ID NO:7(DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKR)的可变轻链序列,以及SEQ ID NO:8(EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKGLEWIGWVIGSETTYINSALKSKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS)的可变重链序列。在其他方面,所述hCD19 scFv可包含与SEQ ID NO:7具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:8具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hCD19 scFv可包含与SEQ ID NO:6具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hCD19scFv可以由与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hCD19 scFv的VL可以由与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hCD19 scFv的VH可由与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多核苷酸编码。hCD19 scFv的VH可由与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多核苷酸编码。

[0142] 在一些实施方案中,本文提供了CD123的人源化scFv。所述人源化CD123(hCD123)的scFv可以具有SEQ ID NO:13的可变轻链序列以及SEQ ID NO:14的可变重链序列。在其他方面,所述hCD123 scFv可包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:14具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hCD123 scFv可包含与SEQ ID NO:12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hCD123 scFv可以由与

SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hCD123 scFv的VL可以由与SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hCD123 scFv的VH可由与SEQ ID NO:11具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0143] 在一些实施方案中,本文提供了间皮素的人源化scFv。人源化间皮素(hMeso) scFv可具有SEQ ID NO:19的可变轻链序列和SEQ ID NO:20的可变重链序列。在其他方面,hMeso scFv可包含与SEQ ID NO:19具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:20具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。hMeso scFv可包含与SEQ ID NO:18具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。hMeso scFv可以由与SEQ ID NO:15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hMeso scFv的VL可以由与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hMeso scFv的VH可以由与SEQ ID NO:17具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0144] 在一些实施方案中,本文提供了ROR1的人源化scFv。所述人源化ROR1(hROR1)的scFv可以具有SEQ ID NO:25的可变轻链序列以及SEQ ID NO:26的可变重链序列。在其他方面,所述hROR1 scFv可包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:26具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hROR1 scFv可包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hROR1 scFv可以由与SEQ ID NO:21具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hROR1 scFv的VL可以由与SEQ ID NO:22具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hROR1 scFv的VH可由与SEQ ID NO:23具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0145] 在一些实施方案中,本文提供了CD5的人源化scFv。所述人源化CD5(hCD5)的scFv可以具有SEQ ID NO:31的可变轻链序列以及SEQ ID NO:32的可变重链序列。在其他方面,所述hCD5 scFv可包含与SEQ ID NO:31具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:32具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hCD5 scFv可包含与SEQ ID NO:30具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hCD5 scFv可以由与SEQ ID NO:27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。hCD5 scFv的VL可以由与SEQ ID NO:28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸

编码。hCD5 scFv的VH可由与SEQ ID NO:29具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0146] 在一些实施方案中,本文提供了CD99的人源化scFv。所述人源化CD99(hCD99)的scFv可以具有SEQ ID NO:63的可变轻链序列以及SEQ ID NO:64的可变重链序列。在其他方面,所述hCD99 scFv可包含与SEQ ID NO:63具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:64具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hCD99 scFv可包含与SEQ ID NO:61具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hCD99 scFv可以由与SEQ ID NO:61具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0147] 在一些实施方案中,本文提供了CD99的人源化scFv。所述人源化CD99(hCD99)的scFv可以具有SEQ ID NO:59的可变轻链序列以及SEQ ID NO:60的可变重链序列。在其他方面,所述hCD99 scFv可包含与SEQ ID NO:59具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VL和/或与SEQ ID NO:60具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的VH。所述hCD99scFv可包含与SEQ ID NO:58具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。所述hCD99 scFv可以由与SEQ ID NO:57具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0148] 在基因工程化抗原受体靶向的抗原中,包括有在通过过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下表达的抗原。所述疾病和病症中包括增生性、赘生性和恶性疾病和病症,包括癌症和肿瘤,包括血液癌症、免疫系统癌症例如淋巴瘤,白血病和/或骨髓瘤,例如B、T和髓性白血病,淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,与正常或非靶向的细胞或组织,与自身免疫或同种免疫疾病相关的抗原或病原体特异性抗原相比,所述抗原在所述疾病或病症的细胞例如肿瘤或病原性细胞上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,所述抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0149] 任何合适的抗原均可用于本方法。示例性的抗原包括、但不限于来自感染原的抗原性分子,自/自身抗原,与肿瘤/癌症相关的抗原和肿瘤新抗原。在特定方面,所述抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4和CEA。

[0150] 肿瘤相关抗原可源自前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、间皮瘤、卵巢癌或黑素瘤。示例性的肿瘤相关抗原或肿瘤细胞衍生的抗原包括MAGE 1、3和MAGE 4; PRAME; BAGE; RAGE, Lage(也称为NY ESO 1); SAGE; 和HAGE或GAGE。肿瘤抗原的这些非限制性实例在多种肿瘤类型例如黑素瘤,肺癌,肉瘤和膀胱癌中表达。前列腺癌肿瘤相关抗原包括例如前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen,PSMA),前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,PSA),前列腺酸性磷酸盐,NKX3.1和前列腺六跨膜上皮抗原(ix-transmembrane epithelial antigen of the prostate,STEAP)。

[0151] 其他肿瘤相关抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto和Criptin。另外,肿瘤抗原

可以是自身肽激素,例如全长促性腺激素释放激素,一种短的10个氨基酸长的肽,其可用于治疗许多癌症。

[0152] 肿瘤抗原包括源于癌症的肿瘤抗原,其特征在于肿瘤相关抗原表达,例如HER-2/neu表达。感兴趣的肿瘤相关抗原包括谱系特异性肿瘤抗原,例如黑素细胞-黑素瘤谱系抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白。示例性的肿瘤相关抗原包括但不限于源自或包含下述中的任何一种或多种:p53,Ras,c-Myc,胞质丝氨酸/苏氨酸激酶(例如,A-Raf,B-Raf和C-Raf,细胞周期蛋白依赖性激酶),MAGE-A1,MAGE-A2,MAGE-A3,MAGE-A4,MAGE-A6,MAGE-A10,MAGE-A12,MART-1,BAGE,DAM-6,-10,GAGE-1,-2,-8,GAGE-3,-4,-5,-6,-7B,NA88-A,MART-1,MC1R,Gp100,PSA,PSM,酪氨酸酶,TRP-1,TRP-2,ART-4,CAMEL,CEA,Cyp-B,hTERT,hTRT,iCE,MUC1,MUC2,磷酸肌醇3激酶(PI3Ks),TRK受体,PRAME,P15,RU1,RU2,SART-1,SART-3,Wilms肿瘤抗原(WT1),AFP,-catenin/m,胱天蛋白酶-8/m,CEA,CDK-4/m,ELF2M,GnT-V,G250,HSP70-2M,HST-2,KIAA0205,MUM-1,MUM-2,MUM-3,肌球蛋白/m,RAGE,SART-2,TRP-2/INT2,707-AP,膜联蛋白II,CDC27/m,TPI/m, bcr-abl,BCR-ABL,干扰素调节因子4(IRF4),ETV6/AML,LDLR/FUT,Pml/RAR,肿瘤相关钙信号转导蛋白1(TACSTD1),TACSTD2,受体酪氨酸激酶(例如表皮生长F受体(EGFR)(尤其是EGFRvIII),血小板衍生生长因子受体(PDGFR),血管内皮生长因子受体(VEGFR),胞质酪氨酸激酶(例如src家族,syk-ZAP70家族),整联蛋白连接激酶(ILK),转录的信号转导蛋白和激活剂STAT3、STAT5和STAT6,缺氧诱导因子(例如HIF-1和HIF-2),核因子- κ B(NF- κ B),Notch受体(例如Notch1-4),c-Met,雷帕霉素的哺乳动物靶(mammalian targets of rapamycin,mTOR),WNT,细胞外信号调节的激酶(ERK)及其调节亚基,PMSA,PR-3,MDM2,间皮素,肾细胞癌5T4,SM22-alpha,碳酸酐酶I(CAI)和IX(CAIX)(也称为G250),STEAD,TEL/AML1,GD2,蛋白酶3,hTERT,肉瘤易位断点,EphA2,ML-IAP,EpCAM,ERG(TMPRSS2-ETS融合基因),NA17,PAX3,ALK,雄激素受体,细胞周期蛋白B1,多唾液酸,MYCN,RhoC,GD3,岩藻糖基GM1,间皮素(mesothelium),PSCA,sLe,PLAC1,GM3,BORIS,Tn,GLobO,H, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, 精子蛋白17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumain, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos相关抗原1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1和独特型。

[0153] 抗原可能包括衍生自肿瘤细胞中突变的基因或与正常细胞相比在肿瘤细胞中以不同水平转录的基因的表位区或表位肽,例如端粒酶,survivin,间皮素,突变的ras,bcr/abl重排,Her2/neu,突变或野生型p53,细胞色素P450 1B1和异常表达的内含子序列,例如N-乙酰葡萄糖氨基转移酶-V;免疫球蛋白基因的克隆重排,在骨髓瘤和B细胞淋巴瘤中产生独特的独特型;肿瘤抗原,包括来源于癌病毒过程的表位区或表位肽,例如人乳头瘤病毒蛋白E6和E7;爱泼斯坦病毒蛋白LMP2;具有肿瘤选择性表达的非突变癌胚蛋白,例如癌胚抗原和甲胎蛋白。

[0154] 在其他实施方案中,抗原是从病原微生物或机会病原性微生物(在本文中也称为传染病微生物)获得或衍生的,例如病毒、真菌、寄生虫和细菌。在某些实施方案中,源自此类微生物的抗原包括全长蛋白。

[0155] 预期其抗原可用于本文所述方法的示例性病原性生物包括人类免疫缺陷病毒(HIV),单纯疱疹病毒(HSV),呼吸道合胞病毒(RSV),巨细胞病毒(CMV),EB病毒(EBV),流感

A、B和C,水疱性口炎病毒(VSV),水疱性口炎病毒(VSV),多瘤病毒(例如BK病毒和JC病毒),腺病毒,葡萄球菌种类(包括耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌,MRSA),和链球菌种类(包括肺炎链球菌)。如本领域技术人员将理解的,可以在出版物和公共数据库如**GENBANK®**, Swiss-**Prot®**和**TrEMBL®**中鉴定出如本文所述用作抗原的源自这些和其他病原微生物的蛋白质和编码所述蛋白质的核苷酸序列。

[0156] 源自人类免疫缺陷病毒(HIV)的抗原包括任何HIV病毒体结构蛋白(例如gp120, gp41, p17, p24),蛋白酶,逆转录酶或由tat、rev、nef、vif、vpr和vpu编码的HIV蛋白。

[0157] 源自单纯疱疹病毒的抗原(例如HSV 1和HSV2)包括、但不限于从HSV晚期基因表达的蛋白质。晚期组基因主要编码形成病毒粒子的蛋白质。此类蛋白质包括来自(UL)的形成病毒衣壳的五种蛋白质:UL6、UL18、UL35、UL38和主要衣壳蛋白UL19、UL45和UL27,它们每一种都可用作本文所述的抗原。预期用作本文抗原的其他示例性HSV蛋白包括ICP27(H1, H2), 糖蛋白B(gB)和糖蛋白D(gD)蛋白。HSV基因组包含至少74个基因,每个基因编码一种可能被用作抗原的蛋白质。

[0158] 巨细胞病毒(CMV)衍生的抗原包括CMV结构蛋白,在病毒复制的立即早期和早期阶段表达的病毒抗原,糖蛋白I和III,衣壳蛋白,外壳蛋白,下部基质蛋白pp65(ppUL83), p52(ppUL44), IE1和IE2(UL123和UL122), 来自UL128-UL150(Rykman等人,2006)的基因簇的蛋白质产物,包膜糖蛋白B(gB), gH, gN和pp150。如本领域技术人员将理解的,可以在诸如**GenBank®**、Swiss-**Prot®**和**TrEMBL®**之类的公共数据库中鉴定用作本文所述抗原的CMV蛋白。

[0159] 预期在某些实施方案中使用的源自EB病毒(EBV)的抗原包括EBV裂解蛋白gp350和gp110,在潜伏期感染期间产生的EBV蛋白,包括EB核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA前导蛋白(EBNA-LP)和潜伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A和LMP-2B。

[0160] 预期在本文中使用的源自呼吸道合胞病毒(RSV)的抗原包括RSV基因组编码的11种蛋白质中的任何一种或其抗原片段:NS1、NS2、N(核衣壳蛋白)、M(基质蛋白)SH、G和F(病毒外壳蛋白)、M2(第二基质蛋白)、M2-1(延伸因子)、M2-2(转录调控)、RNA聚合酶和磷蛋白P。

[0161] 预期使用的来自水疱性口炎病毒(VSV)的抗原包括VSV基因组编码的五种主要蛋白质中的任何一种及其抗原性片段:大蛋白质(L)、糖蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)和基质蛋白(M)。

[0162] 预期在某些实施方案中使用的源自流感病毒的抗原包括血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、核蛋白(NP)、基质蛋白M1和M2、NS1、NS2(NEP)、PA、PB1、PB1-F2和PB2。

[0163] 示例性病毒抗原还包括、但不限于腺病毒多肽、 α 病毒多肽、杯状病毒多肽(例如杯状病毒衣壳抗原)、冠状病毒多肽、瘟热病毒多肽、埃博拉病毒多肽、肠病毒多肽、黄病毒多肽、肝炎病毒(AE))多肽(乙型肝炎核心或表面抗原、丙型肝炎病毒E1或E2糖蛋白、核心或非结构蛋白)、疱疹病毒多肽(包括单纯疱疹病毒或水痘带状疱疹病毒糖蛋白)、传染性腹膜炎病毒多肽、白血病毒多肽、马尔堡病毒多肽、正粘病毒多肽、乳头瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血凝素和神经氨酸酶多肽)、副粘病毒多肽、细小病毒多肽、瘟病毒多肽、小核糖核酸病毒多肽(例如脊髓灰质炎病毒衣壳多肽)、痘病毒多肽(例如牛痘病毒多肽)、狂犬病

病毒多肽(例如狂犬病病毒糖蛋白G)、呼肠孤病毒多肽、逆转录病毒多肽和轮状病毒多肽。

[0164] 在某些实施方案中,抗原可以是细菌抗原。在某些实施方案中,感兴趣的细菌抗原可以是分泌的多肽。在其他某些实施方案中,细菌抗原包括其一部分或多个部分暴露于细菌的细胞外表面的抗原。

[0165] 预期使用的源自葡萄球菌物种(包括甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌,MRSA)的抗原包括毒力调节剂,例如Agr系统,Sar和Sae,Arl系统,Sar同源物(Rot,MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ和TcaR),Srr系统和TRAP。可以充当抗原的其他葡萄球菌蛋白包括Clp蛋白、HtrA、MsrR、乌头酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA和CfvB(参见例如Staphylococcus:Molecular Genetics,2008Caister Academic Press,Ed.Jodi Lindsay)。已经对两种金黄色葡萄球菌(N315和Mu50)的基因组进行了测序,并已公开提供,例如在PATRIC(PATRIC:The VBIPathoSystems Resource Integration Center,Snyder et al.,2007)。如技术人员将理解的,还可以在其他公共数据库如**GenBank®**、**Swiss-Prot®**和**TrEMBL®**中鉴定用作抗原的葡萄球菌蛋白。

[0166] 预期用于本文所述的某些实施方案中使用的源自肺炎链球菌的抗原包括肺炎球菌溶素、PspA、胆碱结合蛋白A(CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht和菌毛蛋白(RrgA;RrgB;RrgC)。肺炎链球菌的抗原蛋白也是本领域已知的,并且在一些实施方案中可用作抗原。已经对肺炎链球菌的强毒株的完整基因组序列进行了测序,如本领域技术人员将理解的那样,用于本文的肺炎链球菌蛋白也可以在其他公共数据库如**GenBank®**、**Swiss-Prot®**和**TrEMBL®**中进行鉴定。根据本公开内容,特别感兴趣用作抗原的蛋白质包括毒力因子和预计在肺炎球菌表面暴露的蛋白质。

[0167] 可以用作抗原的细菌抗原的示例包括但不限于放线菌(Actinomyces)多肽、芽孢杆菌(Bacillus)多肽、拟杆菌(Bacteroides)多肽、博德特氏菌(Bordetella)多肽、巴尔多氏球菌(Bartonella)多肽、疏螺旋体(Borrelia)多肽(例如、布氏梭菌(B.burgdorferi)OspA)、布鲁氏菌(Brucella)多肽、弯曲杆菌(Campylobacter)多肽、噬二氧化碳胞菌(Capnocytophaga)多肽、衣原体(Chlamydia)多肽、棒状杆菌(Corynebacterium)多肽、柯克斯体(Coxiella)多肽、嗜皮菌(Dermatophilus)多肽、肠球菌(Enterococcus)多肽、埃利希氏菌(Ehrlichia)多肽、埃希氏菌(Escherichia)多肽、弗朗西斯氏菌(Francisella)多肽、梭杆菌(Fusobacterium)多肽、血巴尔通体(Haemobartonella)多肽、嗜血杆菌(Haemophilus)多肽(例如乙型流感嗜血杆菌(H.influenzae)外膜蛋白)、螺杆菌(Helicobacter)多肽、克雷伯菌(Klebsiella)多肽、L-型细菌多肽、钩端螺旋体(Leptospira)多肽、李斯特菌(Listeria)多肽、分枝杆菌(Mycobacteria)多肽、支原体(Mycoplasma)多肽、奈瑟氏球菌(Neisseria)多肽、新立克次氏体(Neorickettsia)多肽、诺卡氏菌(Nocardia)多肽、巴氏杆菌(Pasteurella)多肽、消化球菌(Peptococcus)多肽、消化链球菌(Peptostreptococcus)多肽、肺炎球菌(Pneumococcus)多肽(即肺炎链球菌(S.pneumoniae)多肽)(参见本说明书)、变形菌(Proteus)多肽、假单胞菌(Pseudomonas)多肽、立克次氏体(Rickettsia)多肽、罗卡利马体(Rochalimaea)多肽、沙门氏菌(Salmonella)多肽、志贺氏菌(Shigella)多肽、葡萄球菌(Staphylococcus)多肽、A型链球菌(streptococcus)多肽(例如化脓性链球菌(S.pyogenes)M蛋白)、B型链球菌

(streptococcus) (例如无乳链球菌 (*S. agalactiae*)) 多肽、密螺旋体 (*Treponema*) 多肽和耶尔森氏菌 (*Yersinia*) 多肽 (例如鼠疫耶尔森氏菌 (*Y. pestis*) F1和V抗原)。

[0168] 真菌抗原的示例包括但不限于:犁头霉菌 (*Absidia*) 多肽、支顶孢菌 (*Acremonium*) 多肽、链格孢菌 (*Alternaria*) 多肽、曲霉菌 (*Aspergillus*) 多肽、蛙粪霉菌 (*Basidiobolus*) 多肽、离蠕孢菌 (*Bipolaris*) 多肽、芽生菌 (*Blastomyces*) 多肽、念珠菌 (*Candida*) 多肽、孢子菌 (*Coccidioides*) 多肽、耳霉菌 (*Conidiobolus*) 多肽、隐球菌 (*Cryptococcus*) 多肽、弯孢菌 (*Curvalaria*) 多肽、表皮癣菌 (*Epidermophyton*) 多肽、嗜热菌 (*Exophiala*) 多肽、地霉菌 (*Geotrichum*) 多肽、组织胞浆菌 (*Histoplasma*) 多肽、马杜拉分支菌 (*Madurella*) 多肽、马拉色菌 (*Malassezia*) 多肽、小孢霉菌 (*Microsporum*) 多肽、丛梗孢菌 (*Moniliella*) 多肽、被孢霉菌 (*Mortierella*) 多肽、毛霉菌 (*Mucor*) 多肽、拟青霉菌 (*Paecilomyces*) 多肽、青霉菌 (*Penicillium*) 多肽、单孢瓶霉菌 (*Phialemonium*) 多肽、拟盘孢菌 (*Phialophora*) 多肽、原囊藻 (*Prototheca*) 多肽、假埃希氏菌 (*Pseudallescheria*) 多肽、假微结节菌 (*Pseudomicrodochium*) 多肽、腐霉菌 (*Pythium*) 多肽、鼻孢子菌 (*Rhinosporidium*) 多肽、根霉菌 (*Rhizopus*) 多肽、齿梗孢菌 (*Scolecobasidium*) 多肽、孢子丝菌 (*Sporothrix*) 多肽、匍柄霉菌 (*Stemphylium*) 多肽、毛癣菌 (*Trichophyton*) 多肽、丝孢酵母菌 (*Trichosporon*) 多肽和斑替木丝霉菌 (*Xylohypha*) 多肽。

[0169] 原生动物寄生虫抗原的示例包括但不限于巴贝西虫 (*Babesia*) 多肽, 肠袋虫 (*Balantidium*) 多肽、贝诺孢子虫 (*Besnoitia*) 多肽、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 多肽、艾美球虫 (*Eimeria*) 多肽、脑胞内原虫 (*Encephalitozoon*) 多肽、内阿米巴虫 (*Entamoeba*) 多肽、贾第虫 (*Giardia*) 多肽、哈蒙虫 (*Hammondia*) 多肽、肝簇虫 (*Hepatozoon*) 多肽、等孢球虫 (*Isospora*) 多肽、利什曼虫 (*Leishmania*) 多肽、微孢子虫 (*Microsporidia*) 多肽、新孢子虫 (*Neospora*) 多肽、龙船草 (*Nosema*) 多肽、毛滴科五鞭虫 (*Pentatrichomonas*) 多肽、疟原虫多肽。蠕虫寄生虫抗原的示例包括但不限于:棘唇线虫 (*Acanthocheilonema*) 多肽、猫圆线虫 (*Aelurostrongylus*) 多肽、钩虫 (*Ancylostoma*) 多肽、管圆线虫 (*Angiostrongylus*) 多肽、蛔虫 (*Ascaris*) 多肽、布鲁线虫 (*Brugia*) 多肽、仰口线虫 (*Bunostomum*) 多肽、毛细线虫 (*Capillaria*) 多肽、夏柏特线虫 (*Chabertia*) 多肽、古柏线虫 (*Cooperia*) 多肽、齿线虫 (*Crenosoma*) 多肽、网尾线虫 (*Dictyocaulus*) 多肽、膨结线虫 (*Dioctophyme*) 多肽、双瓣线虫 (*Dipetalonema*) 多肽、裂头绦虫 (*Diphyllobothrium*) 多肽、复孔绦虫 (*Diplydium*) 多肽、恶丝虫 (*Dirofilaria*) 多肽、龙线虫 (*Dracunculus*) 多肽、住肠线虫 (*Enterobius*) 多肽、肺线虫 (*Filaroides*) 多肽、血矛线虫 (*Haemonchus*) 多肽、兔唇蛔 (*Lagochilascaris*) 多肽、罗阿丝虫 (*Loa*) 多肽、曼森线虫 (*Mansonella*) 多肽、缪勒线虫 (*Muellerius*) 多肽、侏体吸虫 (*Nanophyetus*) 多肽、板口线虫 (*Necator*) 多肽、细颈线虫 (*Nematodirus*) 多肽、结节线虫 (*Oesophagostomum*) 多肽、盘尾丝虫 (*Onchocerca*) 多肽、后睾吸虫 (*Opisthorchis*) 多肽、奥斯特线虫 (*Ostertagia*) 多肽、副丝虫 (*Parafilaria*) 多肽、并殖吸虫 (*Paragonimus*) 多肽、副蛔虫 (*Parascaris*) 多肽、泡翼线虫 (*Physaloptera*) 多肽、原圆线虫 (*Protostrongylus*) 多肽、狗尾草 (*Setaria*) 多肽、螺旋体 (*Spirocerca*) 多肽、迭宫绦虫 (*Spirometra*) 多肽、冠丝虫 (*Stephanofilaria*) 多肽、粪线虫 (*Strongyloides*) 多肽、圆线虫 (*Strongylus*) 多肽、吸吮线虫 (*Thelazia*) 多肽、弓蛔虫 (*Toxascaris*) 多肽、弓首蛔虫 (*Toxocara*) 多肽、旋毛虫 (*Trichinella*) 多肽、毛样线虫 (*Trichostrongylus*) 多肽、毛首线虫 (*Trichuris*) 多肽、钩线

虫 (Uncinaria) 多肽和吴策线虫 (Wuchereria) 多肽。(例如、卵形疟原虫 (*P. falciparum*) 环子孢子 (PfCSP)、子孢子表面蛋白2 (PfSSP2)、肝脏状态抗原1的羧基末端 (PfLSA1 c-末端) 和输出蛋白1 (PfExp-1)、肺囊原虫 (*Pneumocystis*) 多肽、肉孢子虫 (*Sarcocystis*) 多肽、血吸虫 (*Schistosoma*) 多肽、泰勒虫 (*Theileria*) 多肽、弓形虫 (*Toxoplasma*) 多肽和锥虫 (*Trypanosoma*) 多肽。

[0170] 外寄生虫抗原的示例包括但不限于来自下述的多肽 (包括抗原以及过敏原): 跳蚤 (fleas); 蜱 (ticks), 包括硬蜱 (hard ticks) 和软蜱 (soft ticks); 蝇 (flies), 如蠓 (midges)、蚊 (mosquitoes)、沙蝇 (sand flies)、黑蝇 (black flies)、马蝇 (horse flies)、角蝇 (horn flies)、鹿蝇 (deer flies)、采采蝇 (tsetse flies)、螫蝇 (stable flies)、引起蝇蛆病的蝇和咬人蠓虫 (biting gnats); 蚂蚁; 蜘蛛, 虱子; 螨虫; 和蝽类 (true bugs), 比如臭虫 (bed bugs) 和锥蝽 (kissing bugs)。

[0171] C. 嵌合抗原受体

[0172] 在一些实施方案中, CAR含有特异性结合抗原的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中, 所述抗原是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中, CAR是TCR样CAR, 并且所述抗原是加工的肽抗原, 例如细胞内蛋白的肽抗原, 其像TCR一样, 在主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的情形下在细胞表面上被识别。

[0173] 在一些实施方案中, 所述嵌合抗原受体包含: a) 细胞内信号传导结构域, b) 铰链和跨膜结构域, 例如Ev3铰链, 和c) 包含抗原结合区的细胞外结构域。

[0174] 在一些实施方案中, 工程化的抗原受体包括嵌合抗原受体 (CAR), 包括活化或刺激性CAR, 共刺激性CAR (参见W02014/055668) 和/或抑制性CAR (iCAR, 参见Fedorov等人, 2013)。CAR通常包括连接至一个或多个细胞内信号传导组分 (在一些方面经由接头) 和/或跨膜结构域的细胞外抗原 (或配体) 结合结构域。这样的分子通常模拟或近似通过天然抗原受体的信号, 通过这种受体与共刺激受体结合的信号和/或仅通过共刺激受体的信号。

[0175] 本公开的某些实施方案涉及核酸的用途, 包括编码抗原特异性CAR多肽的核酸, 包括已被人源化以降低免疫原性的CAR (hCAR), 其包含细胞内信号传导结构域, 跨膜域和包含一个或多个信号传导基序的细胞外结构域。在某些实施方案中, CAR可以识别包含一种或多种抗原之间的共享空间的表位。在某些实施方案中, 结合区可包含单克隆抗体的互补决定区, 单克隆抗体的可变区和/或其抗原结合片段。在另一个实施方案中, 该特异性源自结合受体的肽 (例如, 细胞因子)。

[0176] 预期人类CAR核酸可以是用于增强人类患者的细胞免疫疗法的人类基因。在一个具体的实施方案中, 本发明包括全长CAR cDNA或编码区。抗原结合区或结构域可以包含衍生自特定人单克隆抗体的单链可变片段 (scFv) 的VH和VL链的片段, 例如在美国专利7,109,304中描述的那些, 该文献通过引用结合到本文中。该片段也可以是人抗原特异性抗体的任何数量的不同抗原结合结构域。在一个更具体的实施方案中, 该片段是由针对人密码子使用而优化以在人细胞中表达的序列编码的抗原特异性scFv。

[0177] 该排布可以是多聚体, 例如双抗体或多聚体。多聚体最有可能通过将轻链和重链的可变部分交叉配对成双抗体而形成。构建体的铰链部分可以具有多种选择, 包括从完全缺失到维持第一个半胱氨酸、到脯氨酸而不是丝氨酸取代、直至被截短至第一半胱氨酸。Fc部分可以被删除。任何稳定和/或二聚化的蛋白质都可以达到这个目的。可以仅使用一个Fc

结构域,例如人免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。还可以使用经过修饰以改善二聚化的人免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3区。也可以只使用免疫球蛋白的铰链部分。也可以使用CD8α的一部分。

[0178] 在一些实施方案中,CAR核酸包含编码其他共刺激受体的序列,例如跨膜结构域和修饰的CD28细胞内信号传导结构域。其他共刺激受体包括但不限于CD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)中的一种或多种。除了CD3引发的主要信号外,插入入CAR中的人共刺激受体提供的其他信号对于NK细胞的完全活化也很重要,并且可以帮助改善体内持久性和过继免疫疗法的治疗成功。CAR可以表达一种或多种细胞因子,例如IL-15。包含一种或多种细胞因子可促进体内持久性。在一些方面,CAR包含抗原结合结构域,例如人源化的scFv、CD3ζ、DAP12和IL-15,任选地与Ev3铰链组合。

[0179] 在一些实施方案中,CAR被构建成对特定抗原(或标志物或配体)具有特异性,例如在将被过继治疗靶向的特定细胞类型中表达的抗原,例如癌症标志物和/或预期诱导减毒反应的抗原,例如在正常或非疾病细胞类型上表达的抗原。因此,CAR通常在其细胞外部分中包含一个或多个抗原结合分子,例如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域,和/或抗体分子。在一些实施方案中,CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,例如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0180] 在嵌合抗原受体的某些实施方案中,受体的抗原特异性部分(其可以称为包含抗原结合区的细胞外结构域)包含肿瘤相关抗原或病原体特异性抗原结合结构域。抗原包括被模式识别受体识别的碳水化合物抗原,例如Dectin-1。肿瘤相关抗原可以是任何种类的,只要它在肿瘤细胞的细胞表面上表达即可。肿瘤相关抗原的示例性实施方案包括CD19、CD319(CS1)、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras等。在某些实施方案中,当存在少量肿瘤相关抗原时,CAR可以与细胞因子共表达以改善持久性。例如,可以将CAR与IL-15共表达。

[0181] 编码嵌合受体的开放阅读框的序列可以从基因组DNA来源、cDNA来源获得,或可以合成(例如,经由PCR),或其组合。取决于基因组DNA的大小和内含子的数目,可能期望使用cDNA或其组合,因为发现内含子使mRNA稳定。同样,使用内源或外源非编码区来稳定mRNA可能是进一步有利的。

[0182] 预期可将嵌合构建体以裸DNA或在合适载体中的形式引入免疫细胞。使用裸露的DNA通过电穿孔稳定转染细胞的方法是本领域已知的。裸DNA通常是指以对于表达的正确方向包含在质粒表达载体中的编码嵌合受体的DNA。

[0183] 或者,可以使用病毒载体(例如逆转录病毒载体,腺病毒载体,腺相关病毒载体或慢病毒载体)将嵌合构建体引入免疫细胞。根据本公开的方法使用的合适的载体在免疫细胞中是非复制性的。已知许多基于病毒的载体,其中维持在细胞中的病毒的拷贝数低到足以维持细胞的生存力,例如基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0184] 在一些方面,所述抗原特异性结合或识别组分与一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述CAR包括与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用天然与CAR中的结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情况下,跨

膜结构域被选择或通过氨基酸取代被修饰以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0185] 在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自天然或合成来源。如果来源是天然的,则该结构域在某些方面源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区域包括源自下述(即包含下述的至少跨膜区)的那些跨膜区域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D和DAP分子。或者,在一些实施方案中,所述跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成的跨膜结构域主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,在合成跨膜结构域的每个末端将发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体。

[0186] 在某些实施方案中,本文公开的遗传修饰免疫细胞例如NK细胞的平台技术包括(i)使用电穿孔装置(例如,核转染子)的非病毒基因转移,(ii)通过胞内域传导信号的CARs(例如CD28/CD3- ζ ,CD137/CD3- ζ 或其他组合),(iii)具有可变长度的胞外域将抗原识别域连接到细胞表面的CAR,在某些情况下还包括(iv)源自K562的人工抗原呈递细胞(aAPC),从而能够稳健地和数量上扩增CAR+免疫细胞(Singh等,2008;Singh等,2011)。

[0187] 在一些实施方案中,CAR可以在细胞中逆转录病毒转导。逆转录病毒载体可以是pSFG4载体。逆转录病毒转移载体pSFG4包含基于pUC19质粒的骨架(在HindIII和EcoRI限制性内切酶位点之间的大片段[2.63kb]),其携带莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)的病毒成分,包括5'LTR,psi包装序列和3'LTR。LTR是逆转录病毒前病毒任一侧发现的长末端重复序列,在转移载体的情况下,其将感兴趣的遗传货物囊括起来(在我们的情况下,主要是CAR和相关的遗传成分)。psi包装序列是核衣壳包装的目标位点,也被顺式插入5'LTR和CAR编码序列之间。因此,pSFG4转移载体的基本结构可概述如下:pUC19序列-5'LTR-psi包装序列-目的遗传货物-3'LTR-pUC19序列。

[0188] D. 抗原呈递细胞

[0189] 抗原呈递细胞,包括巨噬细胞,B淋巴细胞和树突状细胞,其特征不在于它们表达特定的MHC分子。APC将抗原内在化,并与MHC分子一起在其外细胞膜上重新表达该抗原的一部分。主要组织相容性复合体(MHC)是具有多个基因座的大型遗传复合体。MHC基因座编码两大类MHC膜分子,称为I类和II类MHC。T辅助淋巴细胞通常识别与II类MHC分子相关的抗原,而T细胞毒性淋巴细胞识别与I类MHC分子相关的抗原。在人类中,MHC被称为HLA复合物,在小鼠中被称为H-2复合物。

[0190] aAPC系统可包含至少一种外源性辅助分子。可以采用任何合适数量和组合的辅助分子。辅助分子可以选自辅助分子,例如共刺激分子和粘附分子。示例性共刺激分子包括CD86,CD64(Fc γ RI),41BB配体和IL-21。粘附分子可以包括碳水化合物结合糖蛋白(例如选择素),跨膜结合糖蛋白(例如整合素),钙依赖性蛋白(例如钙黏着蛋白)和单程跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白,例如促进细胞-细胞或细胞-基质接触的细胞间粘附分子(ICAM)。示例性的粘附分子包括LFA-3和ICAM,例如ICAM-1。用于选择、克隆、制备和表达示例性辅助分子(包括共刺激分子和粘附分子)的技术、方法和试剂。

[0191] IV. 使用方法

[0192] 在一些实施方案中,本公开提供了用于免疫疗法的方法,其包括施用有效量的表达本公开的CAR(例如,具有Ev3铰链和/或人源化scFv的CAR)的免疫细胞。在一个实施方案

中,通过转移引起免疫应答的免疫细胞群来治疗医学疾病或病症。在本公开的某些实施方案中,通过转移引发免疫应答的免疫细胞群来治疗癌症或感染。本文提供了用于治疗或延缓个体中癌症发展的方法,包括向该个体施用有效量的抗原特异性细胞疗法。本方法可用于治疗免疫疾病,实体癌,血液学癌症和病毒感染。

[0193] 在特定的实施方案中,提供了通过给予免疫细胞如NK细胞和/或T细胞来治疗癌症患者的方法,所述免疫细胞表达本文提供的CAR,所述CAR具有对所述癌症表达的抗原具有特异性的抗原结合结构域。例如,患有慢性淋巴细胞性白血病 (CLL), B细胞急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 或非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的受试者可以用CD19-Ev3-CAR免疫细胞治疗,以消融CD19阳性细胞例如癌症干细胞。在其他方面,受试者可患有急性髓细胞性白血病 (AML), 慢性髓细胞性白血病 (CML), 骨髓增生异常综合症 (MDS) 或浆细胞样树突细胞白血病 (PDCL), 并用CD123-Ev3-CAR免疫细胞治疗。在其他方面,所述受试者可以患有T细胞白血病和淋巴瘤,并用CD5-Ev3-CAR免疫细胞治疗。患有CLL、乳腺癌、胰腺癌或肺癌的受试者可以用ROR1-Ev3-CAR免疫细胞治疗。患有宫颈癌、子宫内膜癌或卵巢癌的患者可以用Meso-Ev3-CAR免疫细胞治疗。

[0194] 患有多发性骨髓瘤 (MM) 或其他表达CD319的癌症的受试者可用CD319-CAR免疫细胞治疗。在一些方面,通过消融CD319阳性细胞例如癌症干细胞来治疗淀粉样变性病患者。在某些方面,用CD319-CAR免疫细胞治疗患有意义不明的单克隆丙种球蛋白病 (monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS) 或冒烟型骨髓瘤 (smoldering myeloma) 的患者。患有自身免疫性疾病 (例如类风湿性关节炎, SLE或自身免疫性溶血性贫血) 的CD319阳性细胞的受试者可以通过本实施方案的免疫细胞治疗。在特定方面,通过施用表达Ev3-CAR的免疫细胞与CD319 scFv、CD3 ζ 、DAP12和IL-15一起来治疗表达CD319的癌症。

[0195] 在一些实施方案中,可通过抗EGFR抗体消融和/或检测包含本文提供的Ev3 CAR的细胞。示例性的抗EGFR抗体包括但不限于西妥昔单抗 (Erbix) 和帕尼单抗 (Vectibix) 以及生物类似物。这两种抗体均已被FDA批准用于治疗结直肠癌。在一些实施方案中,表达Ev3-CAR的细胞的检测包括给予具有可检测标签的抗EGFR抗体。在其他方面,表达Ev3-CAR的细胞的消融包括施用诱导ADCC的抗EGFR抗体。在一些方面,所述抗EGFR抗体可以与前药或细胞毒性剂例如毒素融合。

[0196] 本发明治疗方法有用的肿瘤包括任何恶性细胞类型,例如在实体瘤或血液肿瘤中发现的那些。示例性的实体瘤可包括但不限于选自下述的器官中的肿瘤:胰腺、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑色素瘤、前列腺和乳腺。血液肿瘤的例子包括骨髓瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、母细胞瘤、骨髓瘤等。可以使用本文提供的方法治疗的癌症的其他例子包括但不限于肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、胃癌或胃癌 (包括胃肠道癌和胃肠道间质癌)、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、各种类型的头颈癌和黑色素瘤。

[0197] 所述癌症具体来说可属于以下组织学类型,不过其不限于这些:恶性赘生物;癌瘤;未分化癌瘤;巨细胞和梭形细胞癌瘤;小细胞癌瘤;乳头状癌瘤;鳞状细胞癌瘤;淋巴上皮癌瘤;基底细胞癌瘤;毛母质癌瘤;移行细胞癌瘤;乳头状移行细胞癌瘤;腺癌瘤;恶性胃泌素瘤;胆管癌瘤;肝细胞癌瘤;肝细胞和胆管细胞混合癌瘤;小梁腺癌瘤;腺样囊性癌瘤;

腺瘤性息肉内腺癌瘤;家族性结肠息肉腺癌瘤;实体癌瘤;恶性类癌肿瘤;细支气管肺泡状腺癌瘤;乳头状腺癌瘤;嫌色细胞癌瘤;嗜酸细胞癌瘤;嗜酸性细胞腺癌瘤;嗜碱细胞癌瘤;透明细胞腺癌瘤;颗粒细胞癌瘤;滤泡状腺癌瘤;乳头状和滤泡状腺癌瘤;非包围性硬化性癌瘤;肾上腺皮质细胞癌瘤;内膜样癌瘤;皮肤附属器癌瘤;大汗腺腺癌瘤;皮脂腺腺癌瘤;耵聍腺腺癌瘤;粘液表皮样癌瘤;囊腺癌瘤;乳头状囊腺癌瘤;乳头状重度囊腺癌瘤;粘液性囊腺癌瘤;粘液性腺癌瘤;印戒细胞癌瘤;浸润性导管癌瘤;髓样癌瘤;小叶癌瘤;炎性癌瘤;乳腺佩吉特氏病(paget's disease);腺泡细胞癌瘤;腺鳞癌瘤;腺癌瘤w/鳞状化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性卵泡膜细胞瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性成睾丸细胞瘤;塞托利细胞(sertoli cell)癌瘤;恶性莱迪希细胞(leydig cell)瘤;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;恶性黑素瘤;无色素性恶性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;雀斑样痣恶性黑素瘤;肢端雀斑样痣黑素瘤;结节性黑素瘤;巨大色素痣中的恶性黑素瘤;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;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒氏混合瘤(mullerian mixed tumor);成肾细胞瘤;成肝细胞瘤;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;胚胎癌瘤;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺肿;绒毛膜癌瘤;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮细胞瘤;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;间质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤(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;成星形细胞瘤;成胶质细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层肿瘤;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;成视网膜细胞瘤;嗅觉神经源性肿瘤;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;霍奇金氏病(hodgkin's disease);霍奇金氏;副肉芽肿;小淋巴细胞恶性淋巴瘤;大细胞弥漫性恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样肉芽肿;其他指定的非霍奇金氏淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低度/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中度/滤泡性NHL;中度弥漫型NHL;重度成免疫细胞性NHL;重度成淋巴细胞性NHL;重度小无裂细胞NHL;巨大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia);恶性组织细胞病;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增殖性小肠病;白血病;淋巴性白血病;浆细胞性白血病;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;成巨核细胞白血病;髓样肉瘤;毛细胞白血病;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞白血病(ALL);急性髓样白血病(AML);以及慢性成髓细胞白血病。

[0198] 具体的实施方案涉及治疗白血病的方法。白血病是血液或骨髓的癌症,其特征在在于血细胞,通常是白细胞(白细胞)的异常增殖(通过繁殖产生)。它是被称为血液肿瘤的广泛疾病的一部分。白血病是一个涵盖广泛疾病的广义术语。白血病在临床和病理上分为急性和慢性形式。

[0199] 在本公开的某些实施方案中,免疫细胞被递送至需要其的个体,例如患有癌症或感染的个体。然后,这些细胞增强个体的免疫系统,以攻击相应的癌症或致病细胞。在某些

情况下,向个体提供一剂或多剂免疫细胞。在为个体提供两剂或更多剂的免疫细胞的情况下,给药之间的持续时间应足以使其在个体中增殖,并且在特定的实施方案中,各剂之间的持续时间为1、2、3、4、5、6、7或更多天。

[0200] 本公开的某些实施方案提供了用于治疗或预防免疫介导的疾病的方法。在一个实施方案中,所述受试者患有自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的非限制性实例包括:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生氏病、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵泡炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、Behcet病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎(celiac spate-dermatitis)、慢性疲劳免疫功能障碍综合症(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、原发性混合型球蛋白血症、纤维肌痛、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓(lichen planus)、狼疮性红斑、多尼尔氏病(Meniere's disease)、混合性结缔组织病、多发性硬化、I型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、肾病综合征(例如轻微变化疾病、局灶性肾小球硬化或膜性肾病)、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺综合征、多肌痛风湿、多发性肌炎、皮炎性肌病、原发性无丙种球蛋白血症,原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷诺现象、雷特综合症、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵硬综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、葡萄膜炎、脉管炎(例如结节性多动脉炎、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎或疱疹样皮炎性血管炎)、白癜风和韦格纳肉芽肿病。因此,可以使用本文公开的方法治疗的自身免疫疾病的一些实例包括但不限于多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、克罗恩氏病;溃疡性结肠炎、重症肌无力、肾小球肾炎、强直性脊柱炎、血管炎或牛皮癣。受试者还可以患有过敏性疾病,例如哮喘。

[0201] 在另一个实施方案中,受试者是移植的器官或干细胞的接受者,并且免疫细胞用于预防和/或治疗排斥。在特定的实施方案中,受试者患有移植物抗宿主疾病或有发展移植物抗宿主疾病的风险。GVHD是使用或包含来自相关或不相关供体的干细胞的任何移植的可能并发症。GVHD有两种,急性的和慢性的。急性GVHD出现在移植后的前三个月内。急性GVHD的迹象包括手和脚上出现红色的皮疹,该皮疹可能扩散并变得更严重,有皮肤剥落或起泡。急性GVHD也会影响胃和肠,在这种情况下会出现痉挛,恶心和腹泻。皮肤和眼睛发黄(黄疸)表明急性GVHD影响了肝脏。慢性GVHD根据其严重程度进行分级:1级/阶段比较轻微;4级/阶段很严重。慢性GVHD在移植后三个月或之后发展。慢性GVHD的症状与急性GVHD的症状相似,但此外,慢性GVHD也可能会影响眼睛的粘液腺,口腔的唾液腺以及润滑胃壁和肠道的腺体。可以利用本文公开的任何免疫细胞群体。移植器官的实例包括实体器官移植物,例如肾脏、肝脏、皮肤、胰腺、肺和/或心脏,或细胞移植物,例如胰岛、肝细胞、成肌细胞、骨髓或造血或其他干细胞。移植物可以是复合移植物,例如面部组织。免疫细胞可以在移植之前、移植同时或移植后施用。在一些实施方案中,免疫细胞在移植前施用,例如在移植前至少1小时、至少12小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周或至少1个月。在一个具体的非限制性实例中,治疗有效量的免疫细胞的施用是在移植前3-5天进行。

[0202] 在一些实施方案中,可以在免疫细胞治疗之前向受试者施用非清髓性淋巴清扫化疗(nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy)。非清髓性淋巴清扫化疗可以是任何合适的此类疗法,可以通过任何合适的途径进行给药。非清髓性淋巴清扫化疗可包括例如给予环磷酰胺和氟达拉滨,特别是如果癌症是可转移的黑色素瘤。施用环磷酰胺和氟达拉滨的示例性途径是静脉内。同样,可以施用任何合适剂量的环磷酰胺和氟达拉滨。在特定方面,施用约60mg/kg的环磷酰胺约两天,此后施用约25mg/m²的氟达拉滨五天。

[0203] 在某些实施方案中,将促进免疫细胞生长和活化的生长因子与免疫细胞同时或随后给予免疫细胞。免疫细胞生长因子可以是促进免疫细胞生长和活化的任何合适的生长因子。合适的免疫细胞生长因子的例子包括白介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12,它们可以单独使用或以多种组合使用,例如IL-2和IL-7,IL-2和IL-15,IL-7和IL-15,IL-2、IL-7和IL-15,IL-12和IL-7,IL-12和IL-15或IL-12和IL2。

[0204] 治疗有效量的免疫细胞可以通过多种途径施用,包括肠胃外施用、例如静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内或关节内注射或输注。

[0205] 用于过继细胞疗法的免疫细胞的治疗有效量是在被治疗的受试者中实现所需效果的量。例如,这可以是抑制进展,引起自身免疫或同种免疫疾病消退或能够缓解由自身免疫疾病引起的症状(例如疼痛和炎症)所必需的免疫细胞数量。它可能是缓解与炎症相关的症状(例如疼痛,水肿和体温升高)所必需的量。它也可以是减少或防止移植器官排斥所必需的量。

[0206] 可以按照与疾病相一致的治疗方案来施用免疫细胞群,例如在一到几天内单次或几次剂量以改善疾病状态,或在延长的时间内以周期性剂量给药以抑制疾病进展并防止疾病复发。制剂中使用的精确剂量还取决于给药途径和疾病或病症的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。免疫细胞的治疗有效量将取决于所治疗的受试者,患病的严重程度和类型以及给药方式。在一些实施方案中,可用于治疗人类受试者的剂量为至少 3.8×10^4 、至少 3.8×10^5 、至少 3.8×10^6 、至少 3.8×10^7 、至少 3.8×10^8 、至少 3.8×10^9 或至少 3.8×10^{10} 个免疫细胞/m²。在某些实施方案中,用于治疗人类受试者的剂量范围为约 3.8×10^9 至约 3.8×10^{10} 个免疫细胞/m²。在另外的实施方案中,免疫细胞的治疗有效量可以从每千克体重约 5×10^6 个细胞到每千克体重约 7.5×10^8 个细胞,例如每千克体重约 2×10^7 个细胞至约 5×10^8 个细胞,或每千克体重约 5×10^7 个细胞到约 2×10^8 个细胞。免疫细胞的确切数量容易由本领域技术人员根据受试者的年龄、体重、性别和生理状况来确定。有效剂量可以从体外或动物模型测试系统得出的剂量反应曲线中推断出来。

[0207] 可以将免疫细胞与一种或多种其他治疗剂联合施用以治疗免疫介导的疾病。组合疗法可包括但不限于一种或多种抗微生物剂(例如抗生素,抗病毒剂和抗真菌剂),抗肿瘤剂(例如氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、紫杉醇、氟达拉滨、依托泊苷、阿霉素或长春新碱),免疫消耗剂(例如氟达拉滨、依托泊苷、阿霉素或长春新碱),免疫抑制剂(例如硫唑嘌呤或糖皮质激素,例如地塞米松或泼尼松),抗炎剂(例如糖皮质激素如氢化可的松、地塞米松或泼尼松、或非甾体抗炎药例如乙酰水杨酸,布洛芬或萘普生钠),细胞因子(例如白介素10或转化生长因子-β),激素(用于例如雌激素)或疫苗。另外,免疫抑制剂或tolerogenic agents包括但不限于钙调神经磷酸酶抑制剂(例如环孢菌素和他克莫司);mTOR抑制剂(例如雷帕霉素);霉酚酸酯(mycophenolate mofetil),抗体(例如识别CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG

或B细胞);化疗剂(例如甲氨蝶呤,曲奥舒凡(Treosulfan),白消安);辐照,或趋化因子,白介素或其抑制剂(例如BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAK激酶抑制剂)。根据期望的效果,可以在施用免疫细胞之前、期间或之后施用此类另外的药剂。细胞和试剂的这种施用可以通过相同的途径或通过不同的途径,并且可以在相同的位置或在不同的位置。

[0208] B. 药物组合物

[0209] 本文还提供了包含免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)和药学上可接受的载体的药物组合物和制剂。

[0210] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(例如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第22版,2012)混合来制备,可以是冻干制剂或水溶液的形式。药学上可接受的载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,其包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如Zn蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。

[0211] C. 组合法

[0212] 在某些实施方案中,本实施方案的组合物和方法涉及免疫细胞群与至少一种其他疗法的组合。所述其他疗法可以是放射疗法,手术(例如,肿块切除术(lumpectomy)和乳房切除术(mastectomy)),化学疗法,基因疗法,DNA疗法,病毒疗法,RNA疗法,免疫疗法,骨髓移植,纳米疗法,单克隆抗体疗法或前述的组合。所述其他疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0213] 在一些实施方案中,所述其他疗法是小分子酶促抑制剂或抗转移剂的施用。在一些实施方案中,所述其他疗法是施用副作用限制剂(例如,旨在减轻治疗副作用的发生和/或严重性的试剂,例如抗恶心剂等)。在一些实施方案中,所述其他疗法是放射疗法。在一些实施方案中,所述其他疗法是手术。在一些实施例中,所述其他疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,所述其他疗法是伽马辐射。在一些实施方案中,所述其他疗法是靶向PI3K/AKT/mTOR途径,HSP90抑制剂,微管蛋白抑制剂,细胞凋亡抑制剂和/或化学预防剂的疗法。所述其他疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0214] 相对于另外的癌症疗法,例如免疫检查点疗法,可以在之前,期间,之后或以各种组合施用免疫细胞疗法。施用间隔可以从同时至数分钟至数天至数周。在其中免疫细胞疗法与另外的治疗剂分开地提供给患者的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间没有显着的时间段到期,使得两种化合物仍然能够对患者发挥有利的联合作用。在这样的情况下,可以预期的是,可以在彼此大约12至24或72小时内,更具体地在彼此大约6至12小时内为患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在某些情况下,可能希望将治疗时间显着延长,相应施用之间的间隔从几天(2、3、4、5、6或7天)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0215] 可以采用各种组合。对于下面的示例,CAR免疫细胞疗法为“A”,抗癌疗法为“B”:

[0216] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B
A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/
B/A

[0217] 考虑到药剂的毒性(如果有的话),遵循用于施用此类化合物的一般方案将本实施方案的任何化合物或疗法施用于患者。因此,在一些实施方案中,存在监测归因于联合疗法的毒性的步骤。

[0218] 1. 化学疗法

[0219] 根据本实施方案,可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症的治疗中所施用的化合物或组合物。这些药剂或药物通过它们在细胞内的活性方式进行分类,例如,它们是否影响细胞周期以及在什么阶段影响细胞周期。或者,可以基于其直接交联DNA,嵌入DNA或通过影响核酸合成而诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征药剂。

[0220] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸酯类,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimine)和甲基蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯类(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱类(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatins);卡利抑素(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻素类(cryptophycin)(特别是隐藻素1和隐藻素8);海兔毒素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);葡枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类(nitrogen mustard),例如氯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine hydrochloride)、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲类(nitrosurea),例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,例如烯二炔类(enediynes)抗生素(例如,加利车霉素(calicheamicin),尤其是加利车霉素 γ 1和加利车霉素 ω 1;达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐类(bisphosphonate),例如氯膦酸盐(clodronate);埃斯波霉素(esperamicin);以及新抑癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、氨茴霉素(authramycin)、氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素、放线菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素

(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯代-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星(esorubicin)、依达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培来霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,例如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸(denopterin)、蝶罗呤(pteropterin)和三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、多西氟尿啶(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine);雄激素类,例如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,例如米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基酮戊酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);氨苯吡啶(amsacrine);阿莫斯汀(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elformithine);醋酸羟吡唑(elliptinium acetate);埃博霉素类(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoid),例如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);苯来美特(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢菌素类(trichothecene)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurinA)、杆孢菌素A(roridinA)和蛇形菌素(anguidine));聚氨酯;长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加西托星(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺;紫杉烷类(taxoid),例如紫杉醇(paclitaxel)和多西他塞(docetaxel);吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位络合物,例如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱(vinblastine);铂类;依托泊苷(VP-16);异磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺安托(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊拜膦酸盐(ibandronate);伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇,例如视黄酸;卡培他滨;卡铂、丙卡巴肼、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨、诺维本、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂,以及以上任一种的可药用盐、酸或衍生物。

[0221] 2. 放射疗法

[0222] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括众所周知的 γ 射线,X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的直接递送。也可以考虑其他形式的DNA破坏因子,例如微波,质子束辐照和UV辐照。所有这些因素非常可能对DNA、DNA前体、DNA复制和修复以及染色体装配和维持产生广泛损害。X射线的剂量范围从长时间(3-4周)内的日剂量50至200伦琴到单次剂量2000至6000伦琴。放射性同位素的剂量范围变化很大,并且取决于同位素的半衰期,所发射辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的吸收。

[0223] 3. 免疫疗法

[0224] 本领域技术人员将理解,可以将额外的免疫疗法与所述实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依靠使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(**RITUXAN®**)就是这样的例子。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可以充当治疗的效应子,或者可以募集其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化学疗法、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并用作靶向剂。或者,效应子可以是携带表面分子的淋巴细胞,该表面分子直接或间接与肿瘤细胞靶相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0225] 抗体-药物偶联物(ADC)包含与杀细胞药物共价连接的单克隆抗体(MAb),可用于联合疗法。这种方法将单克隆抗体针对其抗原靶标的高特异性与高效的细胞毒性药物相结合,从而产生了“武装”单克隆抗体,可将有效载荷(药物)递送至具有丰富抗原水平的肿瘤细胞。药物的靶向递送还将其在正常组织中的接触降至最低,从而降低了毒性并提高了治疗指数。示例性的ADC药物包括**ADCETRIS®**(brentuximab vedotin)和**KADCYLA®**(曲妥珠单抗emtansine或T-DM1)。

[0226] 在免疫疗法的一个方面,肿瘤细胞必须带有适合于靶向的某种标志物,即其在大多数其他细胞上不存在。存在许多肿瘤标志物,并且在本实施方案的背景下,这些肿瘤标志物中的任何一种都可能适于靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的另一个方面是将抗癌作用与免疫刺激作用结合起来。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN,趋化因子例如MIP-1、MCP-1、IL-8,以及生长因子例如FLT3配体。

[0227] 免疫疗法的实例包括免疫佐剂,例如牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳香族化合物;细胞因子治疗,例如干扰素和IL-1、GM-CSF和TNF;基因治疗,例如TNF、IL-1、IL-2和p53;单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185。预期一种或多种抗癌疗法可以与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0228] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点或者调高信号(例如共刺激分子)或调低信号。可能被免疫检查点封锁靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR),B7-H3(也称为CD276),B和T淋巴细胞减毒剂(B and T lymphocyte attenuator,BTLA),细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4,CTLA-4,也称为CD152),吲哚胺2,3-二加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,

IDO), 杀伤细胞免疫球蛋白(killer-cell immunoglobulin, KIR), 淋巴细胞激活基因3(lymphocyte activation gene-3, LAG3), 程序性死亡1(PD-1), T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3, TIM-3)以及T细胞活化的V区Ig抑制剂(V-domain Ig suppressor of T cell activation, VISTA)。特别地, 免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0229] 免疫检查点抑制剂可以是药物, 例如小分子, 配体或受体的重组形式, 或者特别是抗体, 例如人抗体。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂, 特别是可以使用抗体的嵌合、人源化或人形式。如技术人员将知道的, 替代和/或等效名称可以用于本公开中提及的某些抗体。在本公开的上下文中, 这样的替代和/或等效名称是可互换的。例如, 已知lambrolizumab也以替代和等效名称MK-3475和派姆单抗(pembrolizumab)而为人所知。

[0230] 在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合伙伴结合的分子。在一个具体方面, PD-1配体结合伙伴是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中, PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合伙伴结合的分子。在一个特定方面, PDL1结合伙伴是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中, PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合伙伴结合的分子。在一个特定方面, PDL2结合伙伴是PD-1。所述拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0231] 在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂是抗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), 派姆单抗和CT-011。在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如, 包含与恒定区(例如, 免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素。在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂是AMP-224。Nivolumab, 也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO®**, 是一种抗PD-1抗体, 其可以使用。派姆单抗, 也称为MK-3475、Merck 3475、lambrolizumab、**KEYTRUDA®**和SCH-900475, 是示例性的抗PD-1抗体。CT-011, 也称为hBAT或hBAT-1, 也是一种抗PD-1抗体。AMP-224, 也称为B7-DCIg, 是PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0232] 在本文提供的方法中可以靶向的另一个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序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4位于T细胞表面上, 当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时, 充当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员, 该家族在辅助T细胞的表面表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似, 两种分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4向T细胞传递抑制信号, 而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中, 可能对它们的功能很重要。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4的表达增加, 这是B7分子的一种抑制性受体。

[0233] 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、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0234] 适用于本发明方法的抗人CTLA-4抗体(或衍生自其的VH和/或VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。或者, 可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。示例性的抗CTLA-4抗体是依匹莫单抗(也称为10D1, MDX-010, MDX-101和**Yervoy®**)或其抗原结合片

段和变体。在其他实施方案中,该抗体包含依匹莫单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,该抗体包含依匹木单抗的VH区的CDR1,CDR2和CDR3结构域,以及依匹木单抗的VL区的CDR1,CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,所述抗体竞争与CTLA-4上和上述抗体相同的表位结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与伊匹木单抗具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

[0235] 4. 手术

[0236] 大约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,包括预防、诊断或分期、根治性和姑息手术。根治性手术包括切除,其中全部或部分癌组织被物理取出、切除和/或破坏,并且可以与其他疗法结合使用,例如本实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指物理取出肿瘤的至少部分。除肿瘤切除术外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制手术(莫氏手术)。

[0237] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,体内可能会形成空腔。可以通过对该区域进行灌注、直接注射或局部应用其他抗癌治疗来完成治疗。可以例如每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4、5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗也可以采用不同的剂量。

[0238] 5. 其他药剂

[0239] 预期可以将其他药剂与本实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的疗效。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,细胞生长抑制和分化药剂,细胞粘附抑制剂,增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂敏感性的药剂或其他生物药剂。通过增加GAP连接数来增加细胞间信号传导,将增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞抑制剂或分化剂可以与本实施方案的某些方面结合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附抑制剂可改善本发明实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的例子是粘着斑激酶(focal adhesion kinase,FAKs)抑制剂和洛伐他汀。进一步考虑可以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)与本实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

[0240] V. 制品或试剂盒

[0241] 本文还提供了包含免疫细胞的制品或试剂盒。所述制品或试剂盒可进一步包括包装插页,该包装插页包含用于使用所述免疫细胞治疗或延迟个体中癌症的进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明书。本文所述的任何抗原特异性免疫细胞可包括在制品或试剂盒中。合适的容器包括例如瓶,小瓶,袋子和注射器。容器可以由多种材料形成,例如玻璃,塑料(例如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(例如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施方案中,容器保持制剂,并且在容器上或与容器相关的标签可以指示使用指南。制品或试剂盒还可以包括从商业和用户角度出发期望的其他材料,包括其他缓冲液,稀释剂,过滤器,针头,注射器和带有使用说明的包装插页。在一些实施方案中,制品还包括一种或多种其他试剂(例如,化学治疗剂和抗肿瘤剂)。用于所述一种或多种试剂的合适容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。

VI. 实施例

[0242] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,以下

实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实施中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成其实施的优选方式。然而,根据本公开,本领域技术人员应当理解,可以在所公开的特定实施例中进行许多改变,仍可获得类似或相似的结果,而不脱离本发明的精神和范围。

[0243] 实施例1-截短的EGFRvIII (Ev3) CAR的开发

[0244] 设计了Ev3-CAR,其中Ev3茎用作整合结构,通过scFv和“off”开关来转导来自抗原结合的信号,这意味着它可以被临床上可接近的抗体(例如西妥昔单抗)识别而消融CAR阳性免疫细胞(图1A)。Ev3-CAR可以进一步包括DAP12信号传导域,并被称为Ev3-DAP12-CAR。图2显示了Ev3与包含胞内域(endodomain)和EGF结合域的EGFR相比较的示意图。

[0245] 如图3A-3D所示产生编码具有各种抗原结合结构域的Ev3-CAR或Ev3-DAP12-CAR的逆转录病毒载体。所述抗原结合结构域既是源自小鼠抗人抗体的scFv,也是人源化的scFv。载体包含CD28和CD3 ζ 信号传导域,以及任选地DAP12。所述载体还包含自杀基因,可诱导的胱天蛋白酶9。

[0246] 将包括CAR19.Ev3.CD28.CD3 ζ 、CAR19.Ev3.DAP12.CD3 ζ 或人源化CAR19.Ev3.CD3 ζ 的CD19特异性CAR导入NK细胞(图4A)。测试了CAR-NK细胞杀死CD19+Raji或K562细胞的功效(图4B)。观察到CAR19-Ev3-CD28-DAP12-CAR NK细胞具有最高的细胞毒性。因此,将CAR铰链区中Ev3的使用与DAP12胞内域结合应用产生了对靶细胞具有高度细胞毒性的CAR。

[0247] 实施例2-人源化CAR的开发

[0248] 开发了平台以产生人源化scFv用于生产人源化CAR。由于结构限制,一些残基对抗原结合的贡献更大,因此使用3-D建模来识别潜在的关键相互作用以生成人源化CAR。可以重复以下详细介绍的逐步过程,以改进先前的循环。

[0249] 本文提供的CAR人源化工作流程包括5个基本工艺模块,如下文详述并在图5A中描绘。

[0250] 模块I包含单克隆抗体(mAb)序列分析。利用BLAST程序在免疫球蛋白(IG)序列中搜索与起始查询的最佳匹配,例如鼠mAb序列(图5B)。BLAST可以串联(一对一)或并行(分批)分析核苷酸和氨基酸序列,还可以同时搜索包括计划的序列数据库在内的种系基因数据库,从而最大程度地获得最佳匹配可变区(V基因)的机会。对于参考序列,使用种系可变区(V),多样性(D)和连接(J)基因数据库描述IG V结构域构架区(FR1-4s)和互补决定区(CDRs)。对于每种抗体,分析轻链和重链的可变区,二者均由多个基因编码,包括V、D和J基因,这项研究的重点主要在于比较V基因以比较限定区域范围内的变异,找到每个FR和CDR区域的边界,并与数据库中的其他IG序列进行比较。

[0251] 由于基因组序列内的个体变化(即,估计为每1,000bp DNA序列具有1个单核苷酸多态性),种系IG序列包含成千上万的同种异型(即,基因的等位基因或版本)(图6)。生成了人类同种异型数据库,并将其用于CAR人源化。

[0252] 例如,使用特定的人同种异型通过CDR移植衍生人源化结构域,以从小鼠抗体(克隆FMC63)转化抗人CD19结合结构域VL和VH序列(图7A)。CDR区在图7A中用下划线标出。

[0253] 通过图7B所示的BLAST(Altschul等,1997)分析确认了构架序列的来源。另外,序列同源性和同一性易于定量并且总结在图7C中。作为比较,将从头产生的序列与先前可获得的序列进行比较,并且在氨基酸和核苷酸水平上检测明显且容易区分的差异。

[0254] 模块II包含3D结构建模。为了鉴定用于抗原结合的关键残基,构建了3D结构以评估构建体。SWISS-MODEL是一种蛋白质结构同源性建模器,用于制作人源化单克隆抗体的3维模型。从结构抗体数据库SAbDab提取结构文件,作为同源性建模的模板。作为表征VL和VH结构域的CDR区的3D构象的示例,使用SWISS-MODEL (Arnold等,2006;Benkert等,2011)算法采用以下一级氨基酸序列进行同源性建模:

[0255] hCD19 V_L (SEQ ID NO:9):DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDVATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKR

[0256] hCD19 V_H (SEQ ID NO:8):EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKGLWIGVIWGSETTYNSALKSKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS

[0257] 使用BLAST (Altschul等,1997)和HHblits (Remmert等,2012)搜索SWISS-MODEL模板库 (SMTL版本2017-06-28,PDB版本2017-06-23)以寻找与靶序列hCD19 V_L和hCD19 V_H匹配的进化相关结构。

[0258] 总体上发现了hCD19 V_L的13,535个模板,其中2fgw.1.A显示了最佳拟合 (图8A),并用于进一步分析。用BLAST搜索针对SMTL中包含的一级氨基酸序列的靶序列 (hCD19 VL)。总共找到761个模板。已使用Remmert等人概述的过程建立了初始HHblits模式,然后针对NR20进行了1次HHblits迭代。然后针对SMTL的所有模式搜索由此获得的模式。总共找到12,946个模板。

[0259] 总共找到了14631个hCD19 V_H模板,其中4uv7.1.B显示出最佳拟合 (图8A),并用于进一步分析。用BLAST搜索针对SMTL中包含的一级氨基酸序列的靶序列 (hCD19 VL)。总共找到755个模板。已使用Remmert等人概述的过程建立了初始HHblits模式,然后针对NR20进行了1次HHblits迭代。然后针对SMTL的所有模式搜索由此获得的模式。总共找到13,964个模板。

[0260] 模板选择:对于每个识别的模板,已经根据靶-模板比对方式的特征预测了模板的质量。然后选择质量最高的模板进行模型构建。

[0261] 模型构建:使用ProMod3基于靶-模板比对来构建模型。将靶和模板之间保守的坐标从模板复制到模型。使用片段文库对插入和缺失进行重塑。然后重建侧链。最后,通过用力场对所得模型的几何形状进行了正则化。如果使用ProMod3进行的环建模失败,则使用PROMOD-II构建替代模型 (Geux等,1997)。

[0262] 模型质量估计:已使用QMEAN评分功能 (Benkert等,2011)评估了整体和每个残基模型的质量。为了提高性能,专门针对SWISS-MODEL训练了各个QMEAN术语的权重。

[0263] hCD19 V_L和hCD19 V_H的3维模型表明CDR残基暴露在水相中,并能够与其抗原结合特性一致地形成对位表面。

[0264] 模块III包括人工构架移植。作为合成CAR构建过程的一部分,平台技术中包含了强大而可靠的CDR移植技术。使用定制分析算法 (传统Kabat/IMGT和新颖方法的组合),从抗原可变域鉴定出抗原结合序列 (CDR)并将其剪接成选择性的人类构架序列 (基于同源性和关键残基的位置精心策划的定制数据库)创建全长人源化scFv组,以实现稳定表达。

[0265] 完全人源化的scFv是将mAb的抗原结合域整合到CAR中以进行临床应用的必不可少的步骤,同时降低了人类抗小鼠反应性的可能性,从而确保了CAR修饰的治疗细胞的持久性和活力。从头开始创建了至少5种高质量的全长人源化CAR来进行表达表征,功能验证和

临床前测试,从而证明本CAR人源化平台的功效。

[0266] 模块IV包含人源化评分。评分指标用于量化和客观评估合成构建体,作为CAR人源化过程的一部分。如图10B所示,将T201评分算法应用于一系列可商购并获得FDA批准的单克隆抗体(mAb),以测试其实用性。如所预期的,VL和VH(图10C)序列随着人源化程度的提高而得分更高。有趣的是,与配对的VH序列相比,VL序列的T20评分趋势更高。

[0267] 作为一项相关分析,评估了有关FDA批准的抗体治疗剂的信息,并从公共领域的处方信息中观察在患者中报告的免疫原性水平。如在图10E中总结的,较高水平的人源化倾向于与患者中报告的免疫毒性降低的情形相关。

[0268] 作为人源化评分的例子,在mCD19CAR与hCD19CAR的人源化过程之前和之后评估VL和VH序列的T20得分(图10F-G)。确实,对两种加工片段(人源化的VL和VH)均观察到较高的T20得分。由于工作流程可以重复,因此可以使用CAR人源化过程来生产具有较低免疫原性、更好的持久性和强大功能的CAR。

[0269] 本发明涉及以下实施方案:

[0270] 1.一种嵌合抗原受体(CAR),其在所述CAR的铰链中包含截短的EGFRvIII(Ev3),其中所述Ev3铰链连接细胞外结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。

[0271] 2.根据实施方案1所述的CAR,其中所述Ev3铰链包含EGFRvIII的非功能性胞外域和跨膜结构域。

[0272] 3.根据实施方案1所述的CAR,其中所述Ev3铰链不包含EGFRvIII胞内域。

[0273] 4.根据实施方案2所述的CAR,其中EGFRvIII的非功能性胞外域基本上不与表皮生长因子(EGF)结合。

[0274] 5.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链包含EGFR的截短的结构域1、截短的结构域2、结构域3和结构域4。

[0275] 6.根据实施方案5所述的CAR,其中EGFR的结构域3和结构域4未被截短。

[0276] 7.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链包含与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0277] 8.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链包含与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0278] 9.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0279] 10.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链由与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的核苷酸序列编码。

[0280] 11.实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链由与SEQ ID NO:1具有至少95%序列同一性的核苷酸序列编码。

[0281] 12.根据实施方案1-4中任一项所述的CAR,其中所述Ev3铰链由SEQ ID NO:1的核苷酸序列编码。

[0282] 13.根据实施方案1所述的CAR,其中所述CAR的细胞外结构域包含选自F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv和scFv的抗原结合结构域。

[0283] 14.根据实施方案13所述的CAR,其中所述抗原结合结构域包含scFv。

[0284] 15.根据实施方案14所述的CAR,其中所述scFv进一步限定为人源化scFv。

[0285] 16. 根据实施方案13-15中任一项所述的CAR,其中所述CAR的抗原结合区结合一种或多种肿瘤相关抗原。

[0286] 17. 根据实施方案16所述的CAR,其中所述一种或多种肿瘤相关抗原选自CD19、CD319(CS1)、ROR1、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD5、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、 κ 链、 λ 链、CSPG4、ERBB2、WT-1、TRAIL/DR4、VEGFR2、CD33、CD47、CLL-1、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、BCMA和CD99。

[0287] 18. 根据实施方案16所述的CAR,其中所述一种或多种肿瘤相关抗原是CD19、CD319、CD123、CD5、ROR1、CD33、CD99、CLL-1和/或间皮素。

[0288] 19. 根据实施方案13至15中任一项所述的CAR,其中所述scFv不包含EGFR结合结构域。

[0289] 20. 根据实施方案1所述的CAR,其中所述至少一个信号传导结构域包含CD3 ξ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc ϵ RI γ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70、CD40或其组合。

[0290] 21. 根据实施方案1所述的CAR,其中所述至少一个信号传导结构域包含DAP12。

[0291] 22. 根据实施方案1所述的CAR,其中所述CAR包含IL-15。

[0292] 23. 根据实施方案1所述的CAR,其中所述CAR包含CD3 ζ 、CD28、DAP12和IL-15。

[0293] 24. 根据实施方案1所述的CAR,其中所述CAR进一步包含自杀基因。

[0294] 25. 根据实施方案24所述的CAR,其中所述自杀基因是诱导型胱天蛋白酶9。

[0295] 26. 一种分离的抗原特异性人源化单链可变片段(scFv),其包含轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H),其中所述scFv是:

[0296] (a) CD19特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

[0297] (b) CD123特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

[0298] (c) 间皮素特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;

[0299] (d) ROR1特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;

[0300] (e) CD5特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;

[0301] (f) CLL-1特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列;

[0302] (g) CD99特异性的,并且其中 V_L 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列,而 V_H 包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列;或者

[0303] (h) 与(a)-(g)中任一项的构架区具有90%序列同一性的序列。

[0304] 27. 根据实施方案26所述的人源化scFv,其中所述scFv是CD19特异性的,并且其中所述 V_L 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述 V_H 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0305] 28. 根据实施方案27所述的人源化scFv, 其中所述CD19特异性scFv包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0306] 29. 根据实施方案26所述的人源化scFv, 其中所述scFv是CD123特异性的, 并且其中所述V_L包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列, 所述V_H包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0307] 30. 根据实施方案29所述的人源化scFv, 其中所述CD123特异性scFv包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0308] 31. 根据实施方案26所述的人源化scFv, 其中所述scFv是间皮素特异性的, 并且其中所述V_L包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列, 所述V_H包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0309] 32. 根据实施方案31所述的人源化scFv, 其中所述间皮素特异性scFv包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0310] 33. 根据实施方案26所述的人源化scFv, 其中所述scFv是ROR1特异性的, 并且其中所述V_L包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列, 所述V_H包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0311] 34. 根据实施方案33所述的人源化scFv, 其中所述ROR1特异性scFv包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0312] 35. 根据实施方案26所述的人源化scFv, 其中所述scFv是CD5特异性的, 并且其中所述V_L包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 所述V_H包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0313] 36. 根据实施方案35所述的人源化scFv, 其中所述CD5特异性scFv包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0314] 37. 根据实施方案26所述的人源化scFv, 其中所述scFv是CD99特异性的, 并且其中所述V_L包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列, 所述V_H包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0315] 38. 根据实施方案35所述的人源化scFv, 其中所述CD99特异性scFv包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列。

[0316] 39. 根据实施方案26-38中任一项所述的人源化scFv, 其中所述scFv包含与SEQ ID NO:6、12、18、24或30所示氨基酸序列中的构架区具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0317] 40. 根据实施方案26-38中任一项所述的人源化scFv, 其中所述scFv包含与SEQ ID NO:6、12、18、24或30所示氨基酸序列中的构架区具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

[0318] 41. 一种分离的多核苷酸, 其编码根据实施方案26-38中任一项所述的分离的人源化scFv。

[0319] 42. 根据实施方案41所述的分离的多核苷酸, 其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:3、9、15、21或27。

[0320] 43. 一种表达载体, 其包含根据实施方案41所述的分离的多核苷酸。

[0321] 44. 根据实施方案43所述的载体, 其中所述载体进一步限定为病毒载体。

[0322] 45. 根据实施方案15所述的CAR, 其中所述人源化scFv是根据实施方案26-38中任一项所述的scFv。

[0323] 46. 一种分离的核酸, 其包含编码根据实施方案1-25和45中任一项的CAR的核苷酸序列。

[0324] 47. 经工程改造以表达CAR的宿主细胞, 所述CAR在其铰链区包含实施方案26-38中任一项所述的人源化scFv和/或截短的EGFRvIII (Ev3)。

[0325] 48. 根据实施方案47所述的细胞, 其中所述CAR是根据实施方案1-25中任一项所述

的。

[0326] 49. 根据实施方案47所述的细胞,其中所述宿主细胞被进一步定义为CAR免疫细胞。

[0327] 50. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、不变NK细胞、NKT细胞或干细胞。

[0328] 51. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

[0329] 52. 根据实施方案50所述的细胞,其中所述干细胞是间充质干细胞(MSC)或诱导的多能干(iPS)细胞。

[0330] 53. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞衍生自iPS细胞。

[0331] 54. 根据实施方案50所述的细胞,其中所述T细胞是CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或 γ - δ T细胞。

[0332] 55. 根据实施方案50所述的细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0333] 56. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是同种异体的。

[0334] 57. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是自体的。

[0335] 58. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是从外周血、脐带血或骨髓分离的。

[0336] 59. 根据实施方案49所述的细胞,其中所述免疫细胞是从脐带血分离的。

[0337] 60. 根据实施方案59所述的细胞,其中所述脐带血是从2个或更多个个体脐带血单元汇集的。

[0338] 61. 根据实施方案47所述的细胞,其中编码所述CAR的DNA被整合到所述细胞的基因组中。

[0339] 62. 一种药物组合物,其包含根据根据实施方案47-61中任一项所述的细胞的群体。

[0340] 63. 包含根据实施方案47-61中任一项所述的细胞的群体的组合物用于治疗免疫相关疾病的用途。

[0341] 64. 一种在受试者中治疗免疫相关病症的方法,包括对所述受试者施用有效量的根据实施方案47-61中任一项所述的细胞。

[0342] 65. 根据实施方案64所述的方法,其中所述免疫相关疾病是癌症、自身免疫病、移植物抗宿主病、同种异体移植排斥或炎性病症。

[0343] 66. 根据实施方案64所述的方法,其中所述免疫相关疾病是炎性病症,并且所述免疫细胞基本上不表达糖皮质激素受体。

[0344] 67. 根据实施方案64所述的方法,其中所述免疫细胞是自体的。

[0345] 68. 根据实施方案64所述的方法,其中所述免疫细胞是同种异体的。

[0346] 69. 根据实施方案64所述的方法,其中所述免疫相关病症是癌症。

[0347] 70. 根据实施方案69所述的方法,其中所述癌症是实体癌或血液系统恶性肿瘤。

[0348] 71. 根据实施方案64所述的方法,其中还包括施用至少第二治疗剂。

[0349] 72. 根据实施方案71所述的方法,其中所述至少第二治疗剂包括化学疗法、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。

[0350] 73. 根据实施方案71所述的方法,其中所述免疫细胞和/或所述至少第二治疗剂通

过静脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌肉内、内窥镜、病变内、经皮、皮下、区域性地或者通过直接注射或灌注来施用。

[0351] 74.根据实施方案64所述的方法,其进一步包括施用抗EGFR抗体。

[0352] 75.根据实施方案74所述的方法,其中所述抗EGFR抗体是单克隆抗体。

[0353] 76.根据实施方案75所述的方法,其中所述抗EGFR抗体是西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0354] 77.根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述抗EGFR抗体通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)选择性地消融Ev3-CAR免疫细胞。

[0355] 78.根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述抗EGFR抗体与可检测标签和/或细胞毒性剂融合。

[0356] 79.根据实施方案78所述的方法,其进一步包括使所述可检测标签成像,从而检测所述Ev3-CAR免疫细胞。

[0357] 80.根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述抗EGFR抗体与细胞毒性剂融合。

[0358] 81.根据实施方案79所述的方法,其中所述细胞毒性剂在所述Ev3-CAR免疫细胞中诱导自杀基因的活化。

[0359] 82.根据实施方案78所述的方法,其中所述细胞毒性剂导致所述Ev3-CAR免疫细胞的消融。

[0360] 根据本公开,可以在不进行过度实验的情况下进行和执行本文公开和要求保护的所有方法。尽管已经根据优选的实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以对所述方法以及所描述的方法的步骤或步骤顺序进行变化,而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地,显而易见的是,化学和生理相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时将获得相同或相似的结果。对本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改都被认为在所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0361] 参考文献

[0362] 以下参考文献在本文中通过引用被明确地并入本文中,在一定程度上提供了本文所示操作性或其他细节的补充。

[0363] Altschul,S.F.,et al.,Nucleic Acids Res,25,3389-3402,1997.

[0364] Arnold,K.,et al.,Bioinformatics,22,195-201,2006.

[0365] Benkert,P.,et al.,Bioinformatics,27,343-350,2011.

[0366] Fedorov et al.,Sci.Transl.Medicine,5(215),2013.

[0367] Gao SH,et al.,BMC Biotechnology.13:55,2013.

[0368] Guex,N.et al.,Electrophoresis,18,2714-2723,1997.

[0369] Marco Biasini et al.,Nucleic Acids Research,42(W1):W252-W258,2014.

[0370] Remmert,M.,et al.,Nat Methods,9,173-175,2012.

[0371] Sela-Culanget al.,Frontiers in Immunology,4:302,2013.

[0372] Shah et al.,PLoS One,8:e776781,2013.

[0373] Singh et al.,Cancer Research,68:2961-2971,2008.

[0374] Singh et al.,Cancer Research,71:3516-3527,2011.

[0375] 美国专利7,109,304

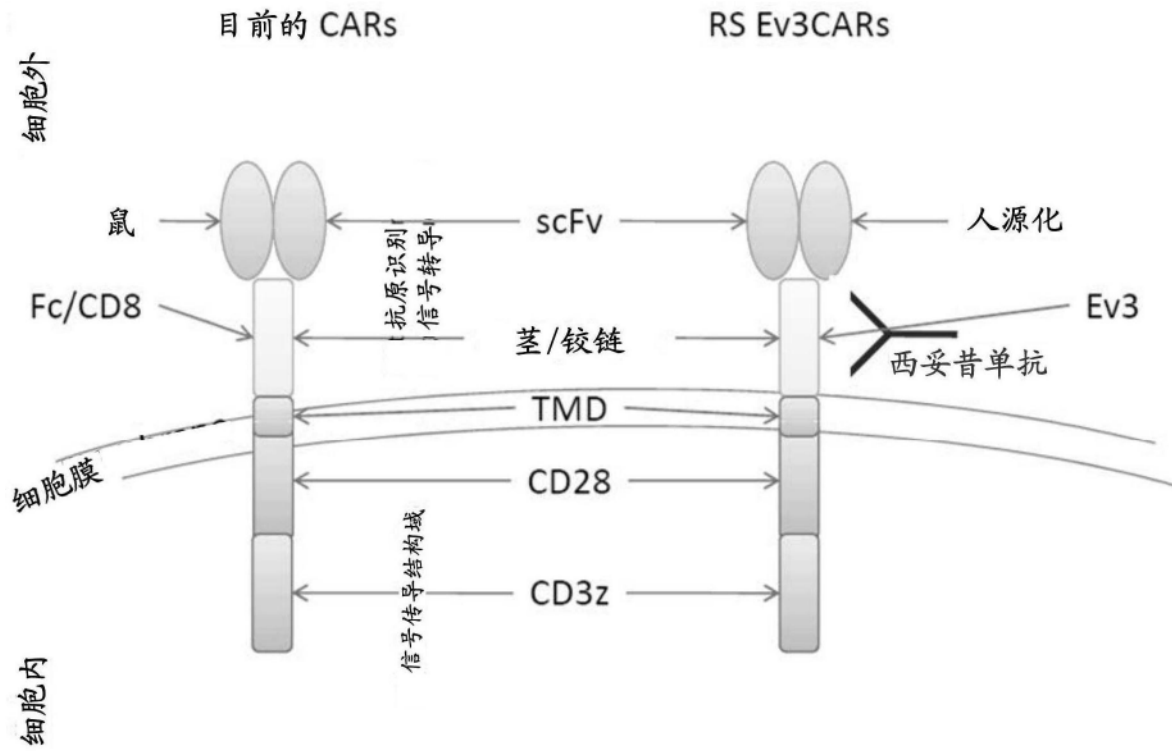


图1A

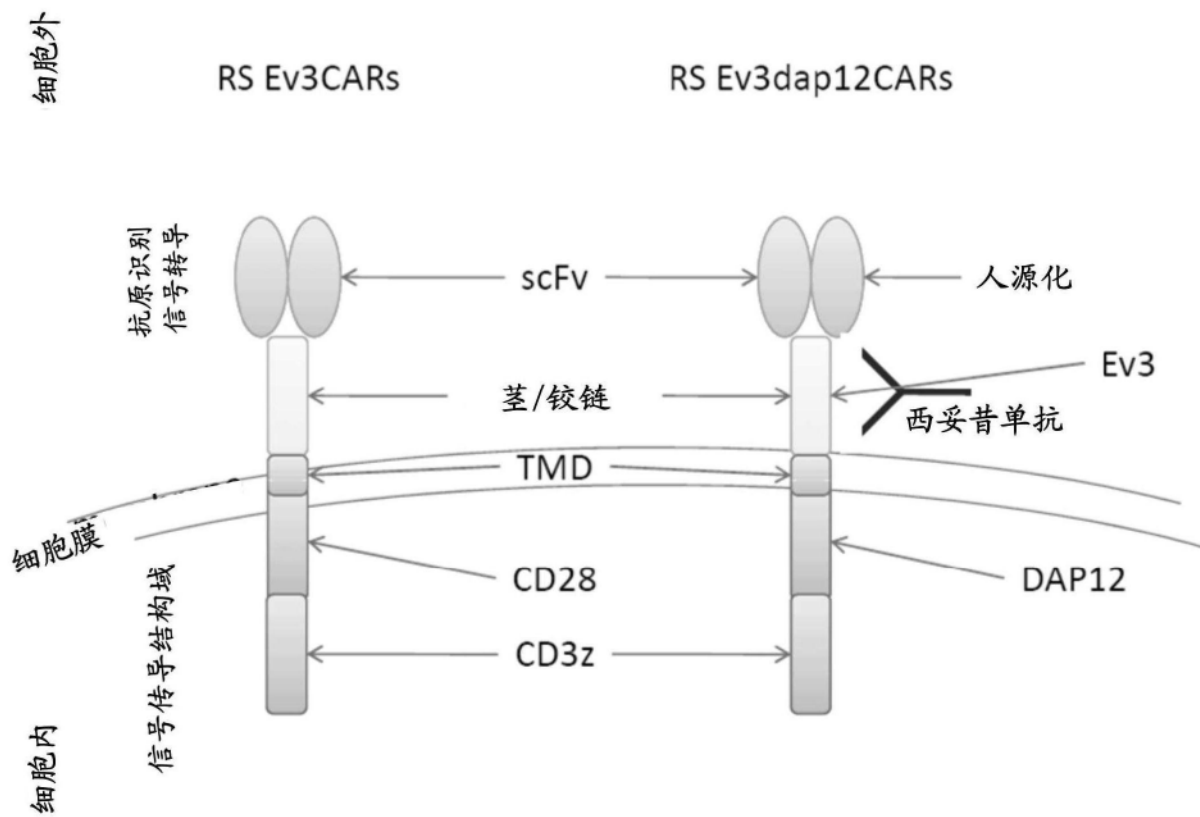


图1B

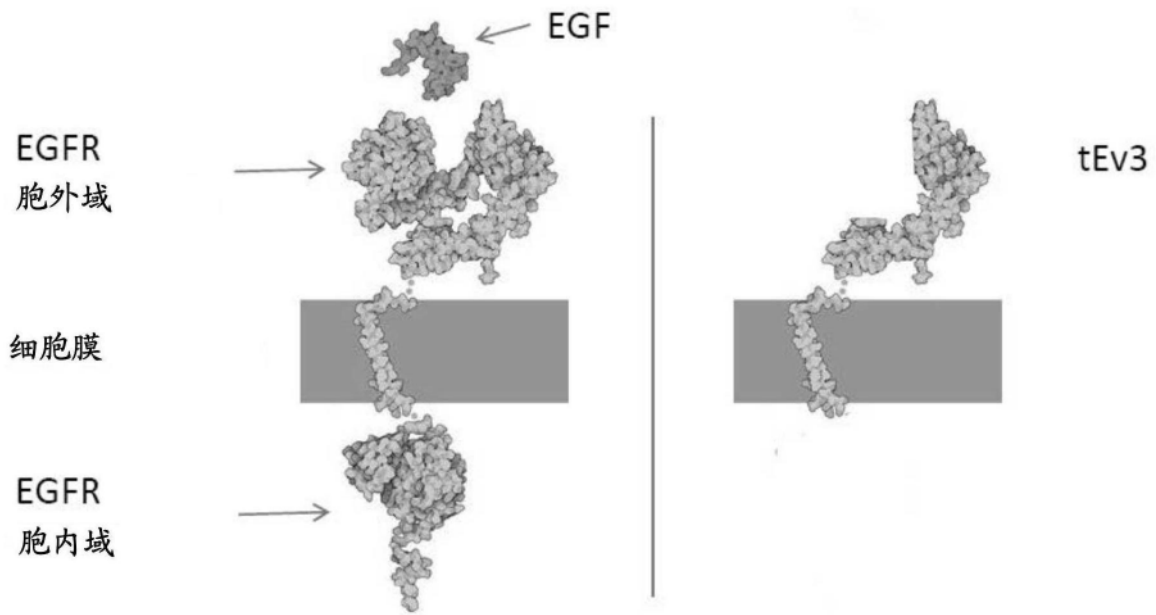


图2A

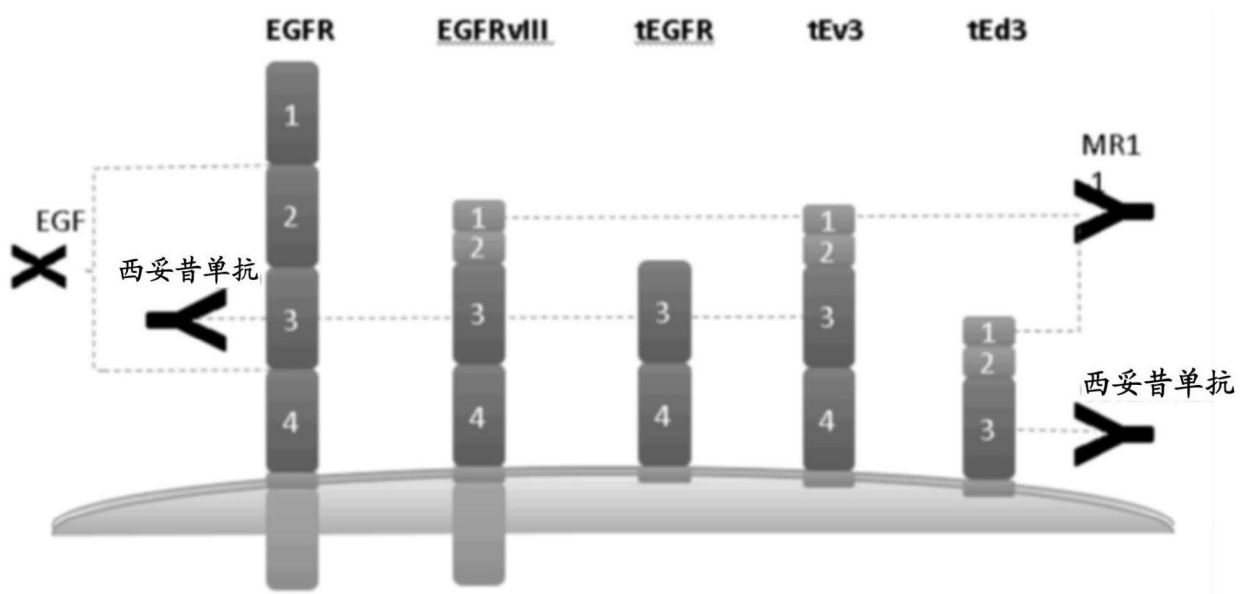


图2B

关键特征	位置 (s)	描述	长度 (aa)
信号肽	1 - 24		24
拓扑结构域	25 - 645	细胞外	621
跨膜	646 - 668	螺旋	23
拓扑结构域	669 - 1210	胞质	542

细胞外结构域

10	20	30	40	50
MRPSGTAGAA	LLALLAALCP	ASRALEEKKG	-----	-----
Domain>		11111	1111111111	1111111111
60	70	80	90	100
-----	-----	-----	-----	-----
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
110	120	130	140	150
-----	-----	-----	-----	-----
1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
160	170	180	190	200
-----	-----	-----	-----	-----
1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222
210	220	230	240	250
-----	-----	-----	-----	-----
2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
260	270	280	290	300
-----	-----	-----	-----	-----NYV
2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
310	320	330	340	350
VTDHGSCVRA	CGADSYEMEE	DGVRKCKKCE	GPCRKVCNGI	GIGEFKDSLS
2222222222	2222222222	2222222222	2222233333	3333333333
360	370	380	390	400
INATNIKHFK	NCTSIISGDLH	ILPVAFRGDS	FTHTPPLDPQ	ELDILKTVKE
3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333
410	420	430	440	450
ITGFLLIQAW	PENRTDLHAF	ENLEIIRGRT	KQHGQFSLAV	VSLNITSLGL
3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333
460	470	480	490	500
RSLKEISDGD	VIISGNKNLC	YANTINWKKL	FGTSGQKTKI	ISNRGENSCK
3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333

图2C

关键特征	位置 (s)	描述	长度 (aa)
信号肽	1 - 24		24
拓扑结构域	25 - 645	细胞外	621
跨膜	646 - 668	螺旋	23
拓扑结构域	669 - 1210	胞质	542

细胞外结构域

510	520	530	540	550
ATGQVCHALC	SPEGCWGPEP	RDCVSCRNV	RGRECVDKCN	LLEGEPREFV
3333444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444
560	570	580	590	600
ENSECIQCHP	ECLPQAMNIT	CTGRGPDNCI	QCAHYIDGPH	CVKTCPAGVM
4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444
610	620	630	640	650
GENNTLVWKY	ADAGHVCHLC	HPNCTYGCTG	PGLEGCP TNG	PKIPSIATGM
4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	44444

图2C续

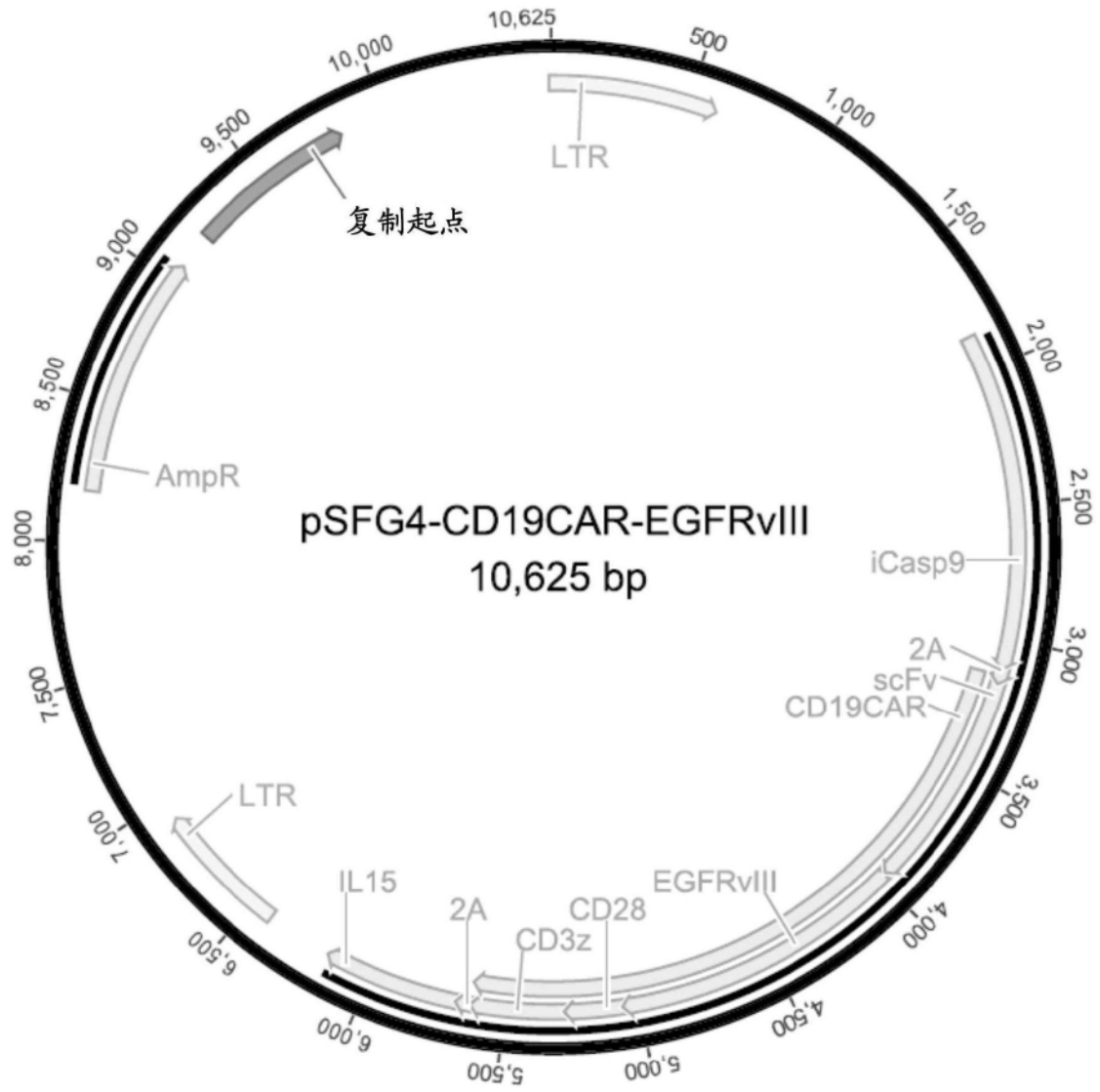


图3A

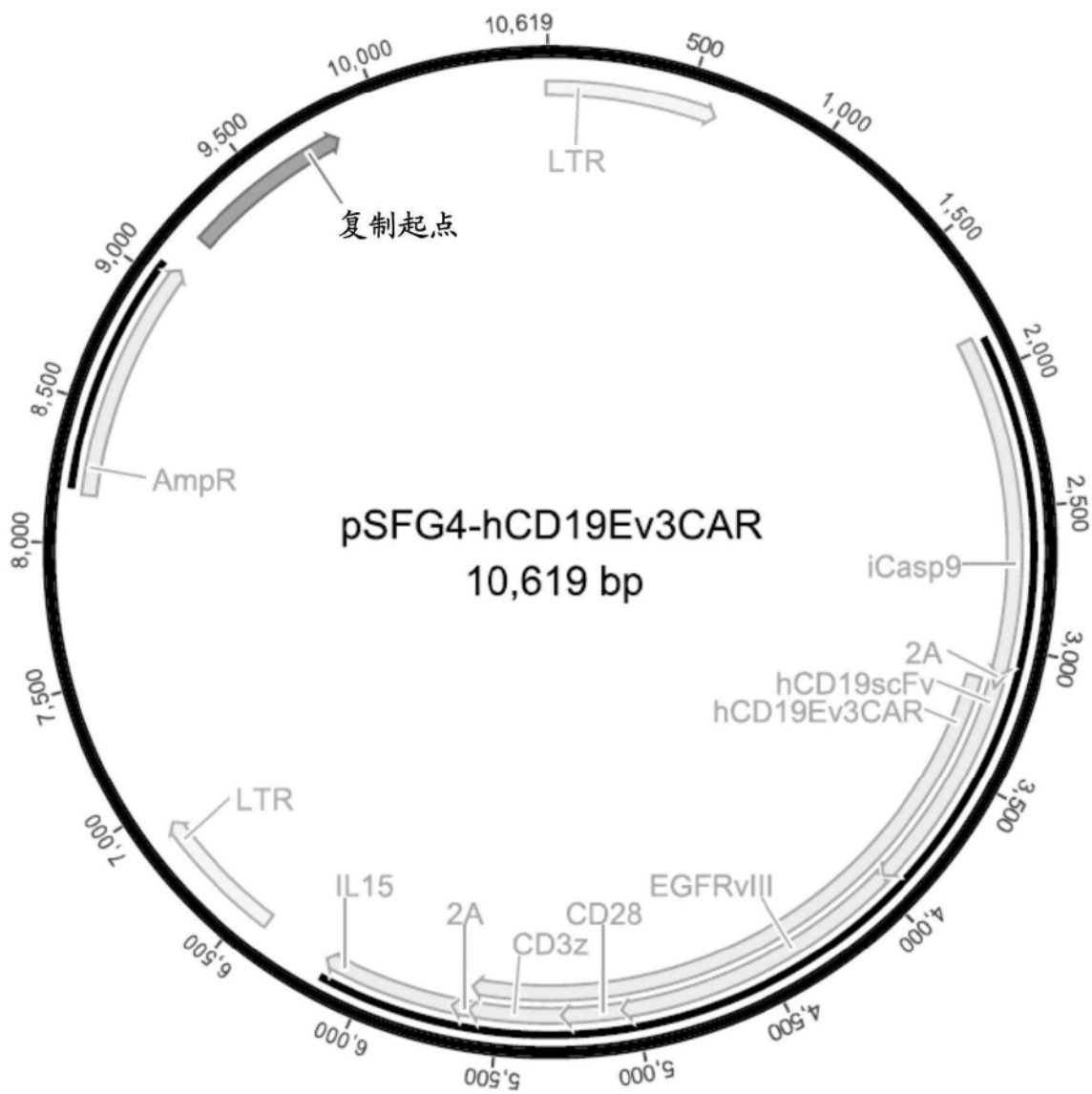


图3B

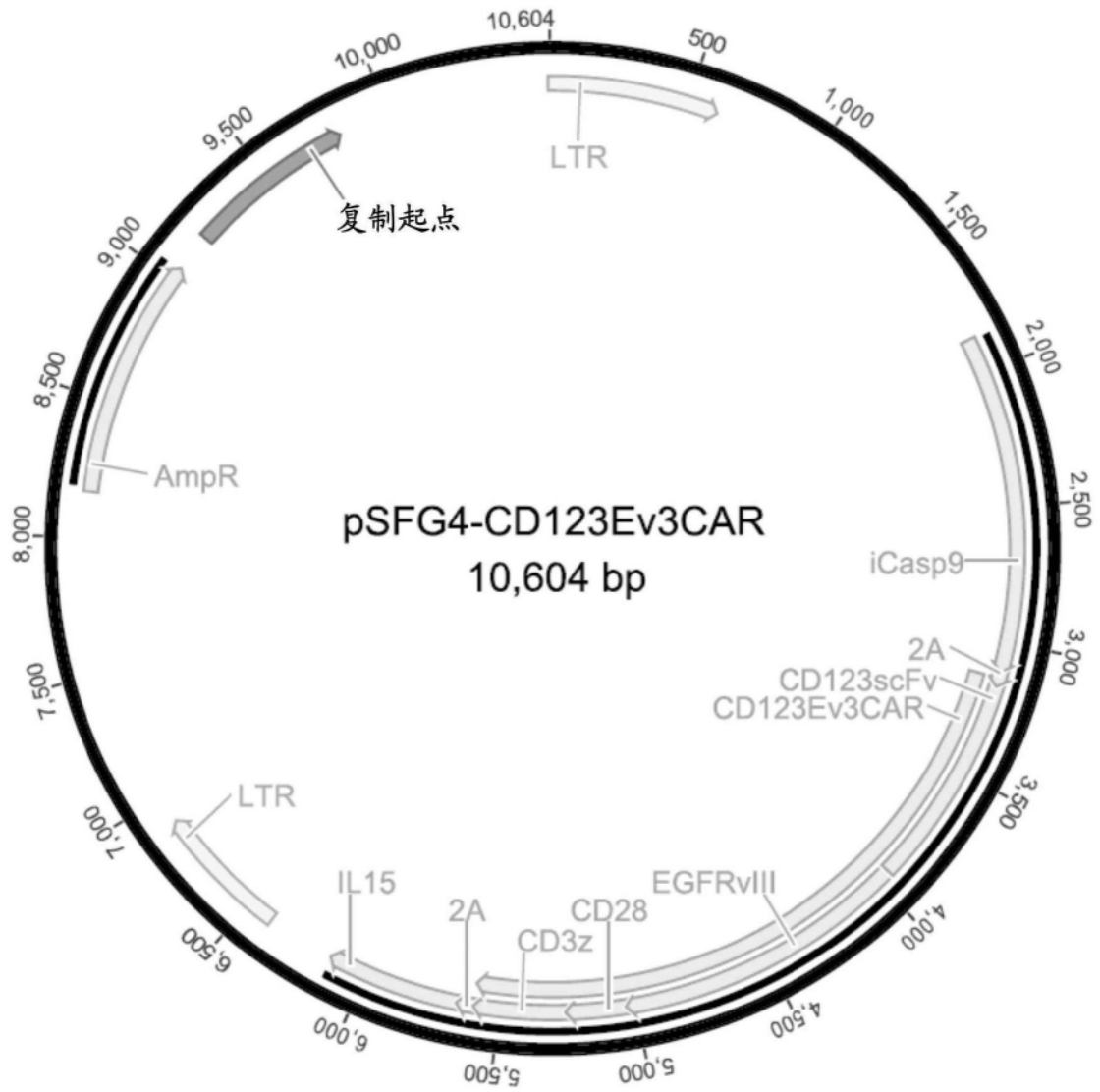


图3C

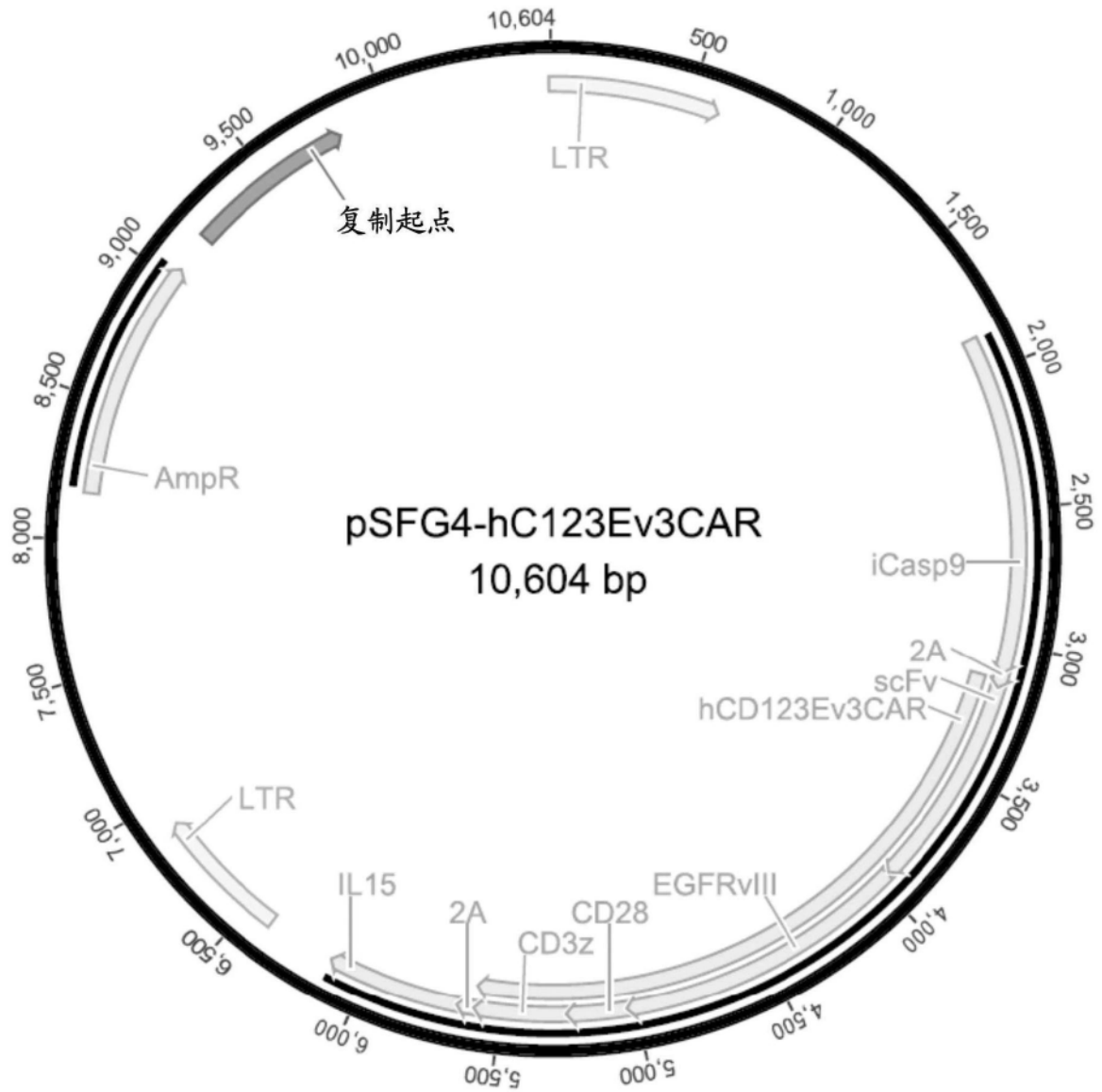


图3D



图3E



图3F

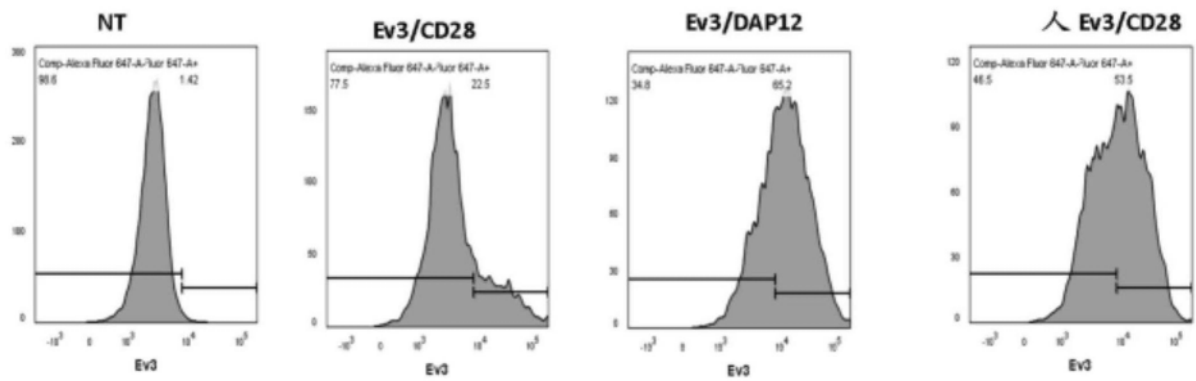


图4A

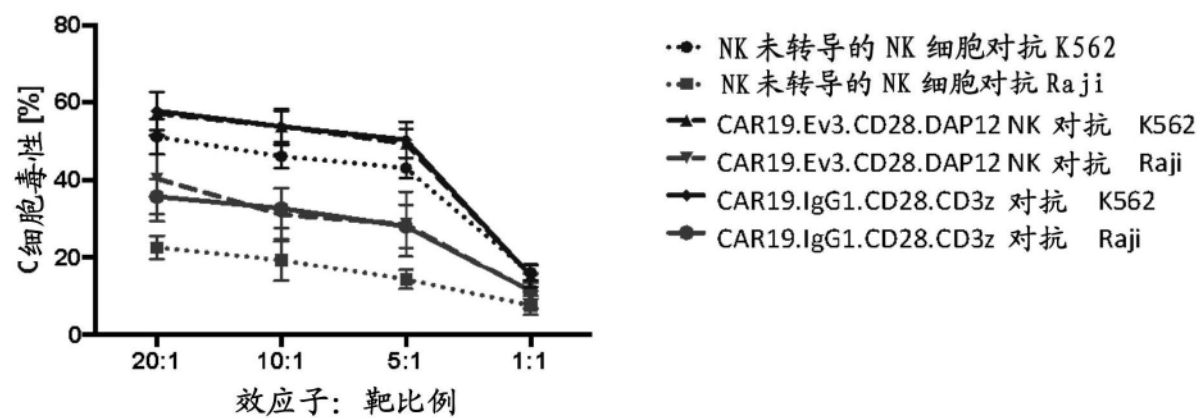


图4B

RS CAR 人源化流程图

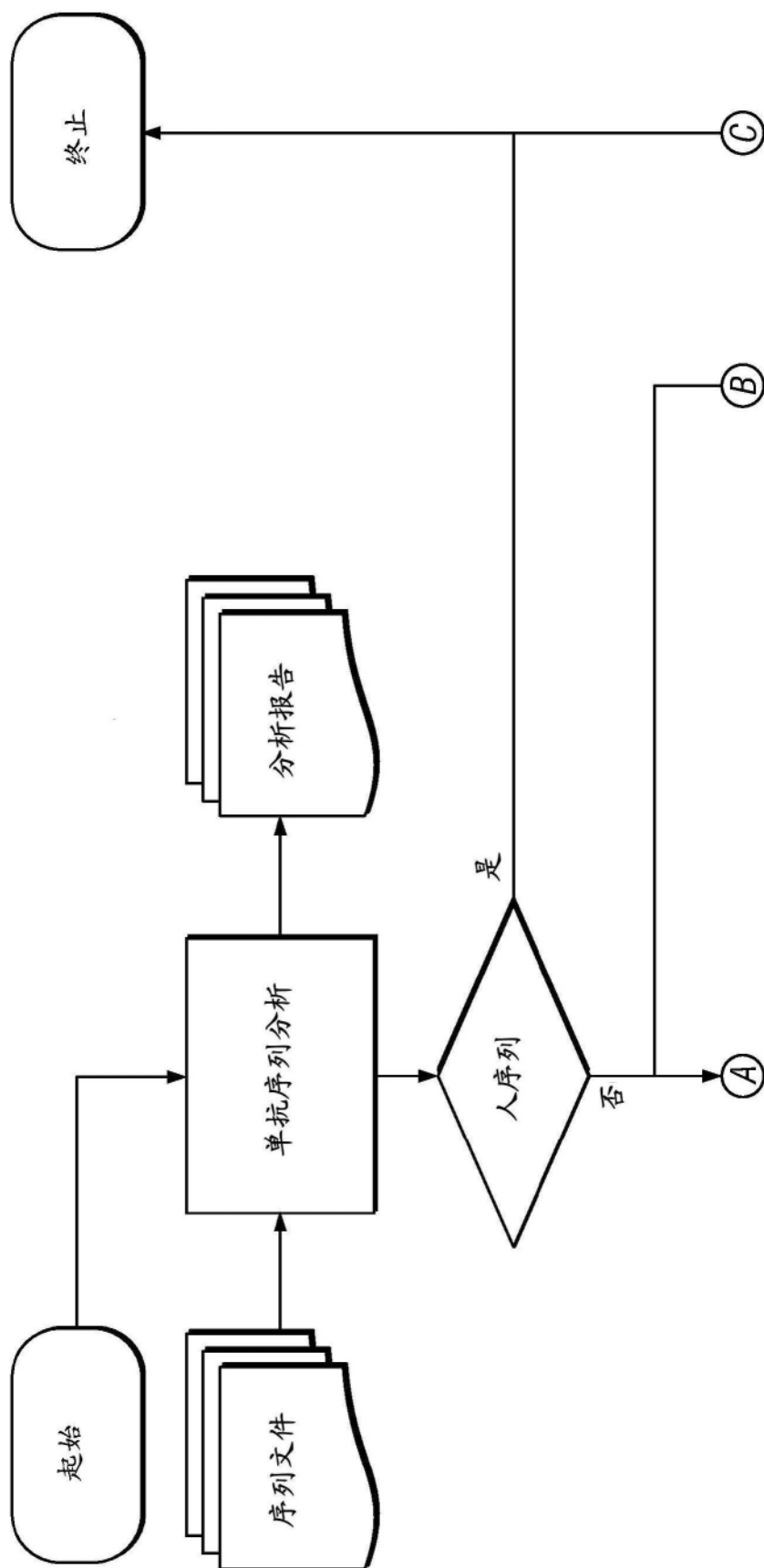


图5A

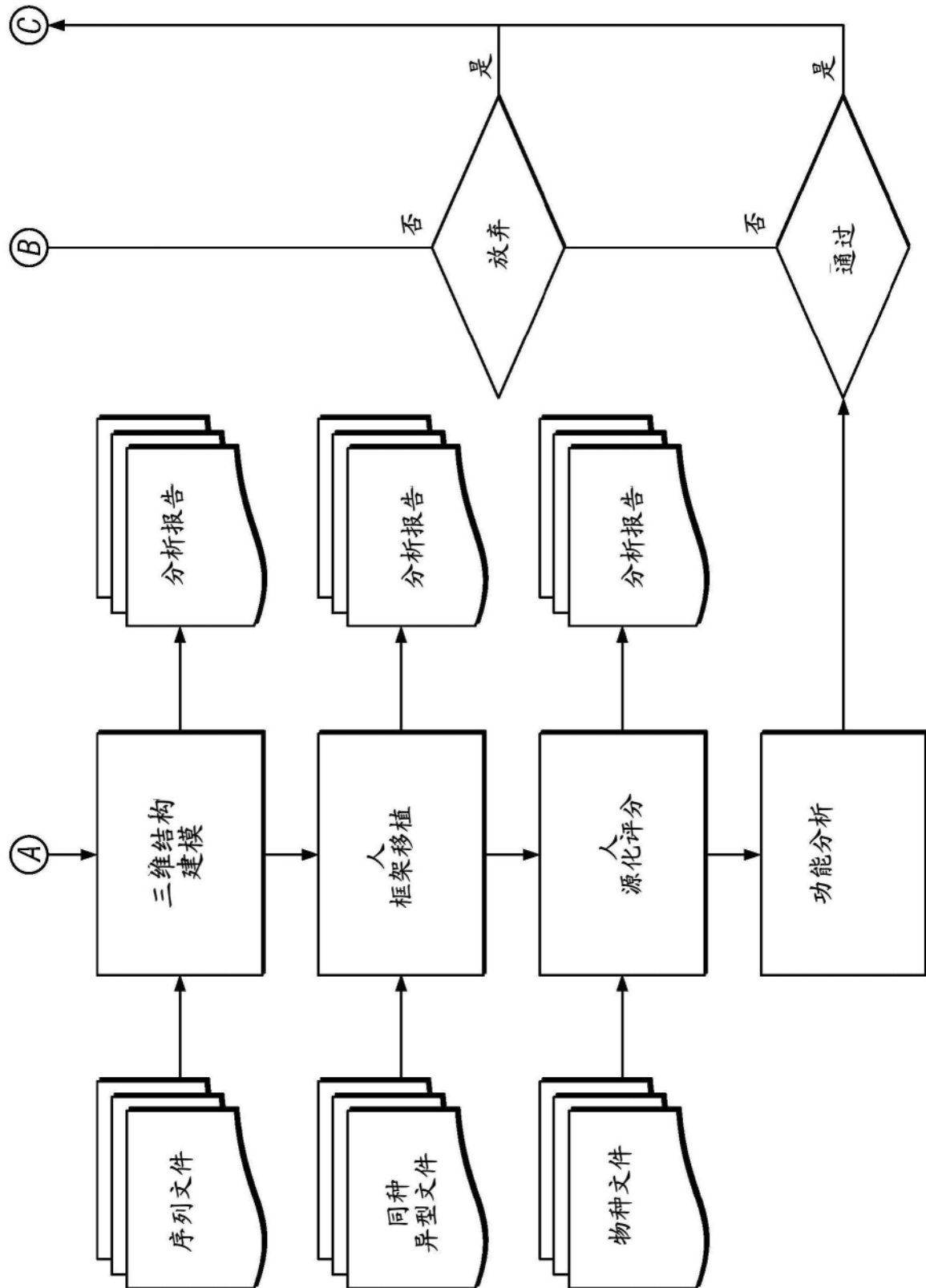


图5A续

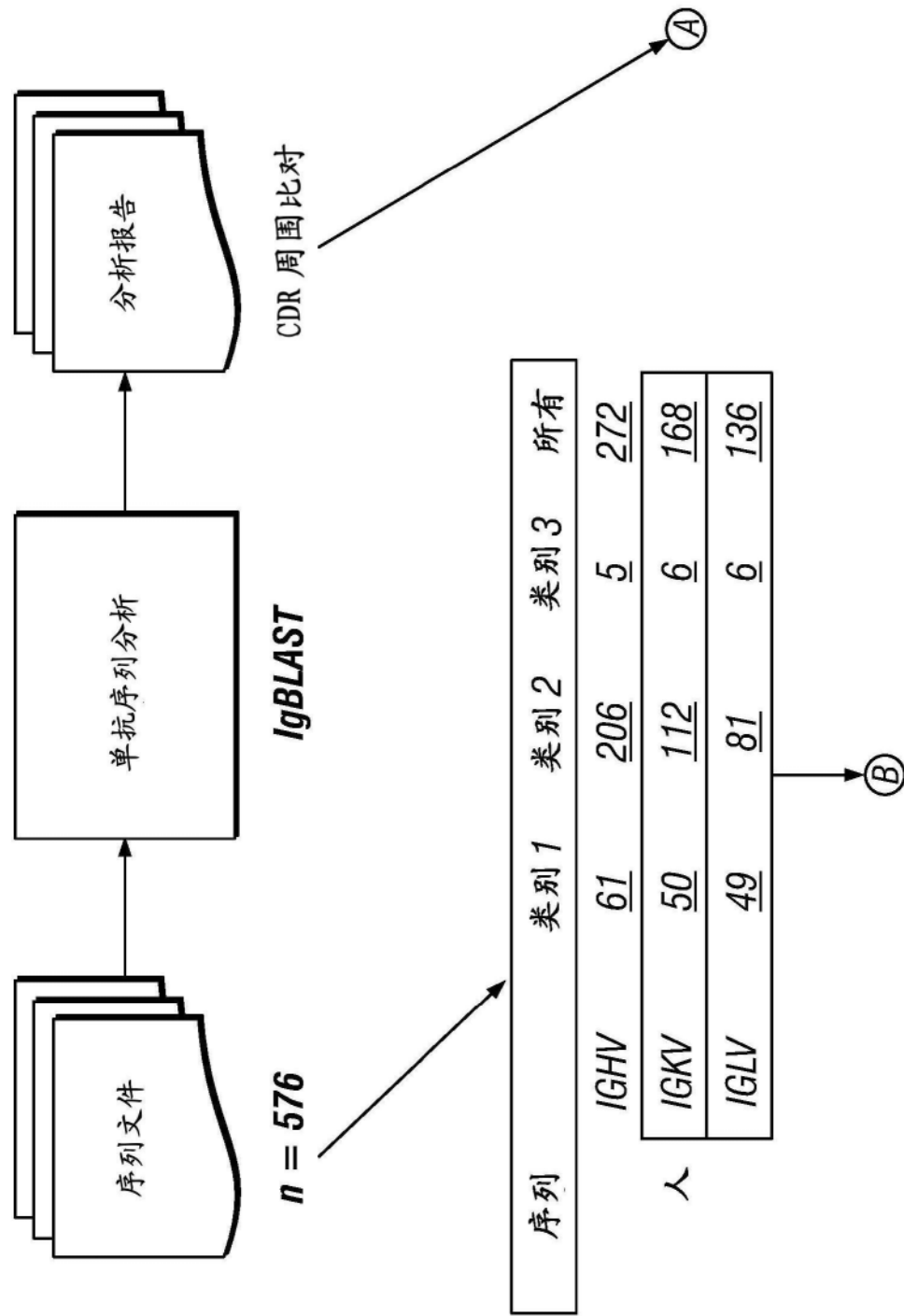


图5B

V	Y14934	1	96.0%	(264/275)	<-----FR1-IMGT-----G	G G G L V K P G G S L R L S C GGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG G G G L V K P G G S L R L S C
	IGHV3-21*01	22				
	IGHV3-21*02	22				
	IGHV3-21*04	22				
	Y14934	1				
	Y14942	1				
	Y14935	1				
	JX432690	22				
	JX432693	22				
	JX432692	22				
V	JX432702	22	96.0%	(264/275)	-----FR2-IMGT-----><-----H	R Q A P G K G L E W V S S I T CCCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTCTCATCCATTAC R Q A P G K G L E W V S S I S
	JX432730	22				
	JX432735	22				
	JX432740	22				
	Y14934	91				
	IGHV3-21*01	112				
	IGHV3-21*02	112				
	IGHV3-21*04	112				
	Y14934	91				
	Y14942	91				
V	Y14935	91	96.0%	(264/275)	-----FR2-IMGT-----><-----H	R Q A P G K G L E W V S S I T CCCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTCTCATCCATTAC R Q A P G K G L E W V S S I S
	JX432690	112				
	JX432693	112				
	JX432692	112				
	JX432702	112				
	JX432730	112				
	JX432735	112				
	JX432740	112				
	Y14934	91				
	IGHV3-21*01	112				

图5B续1

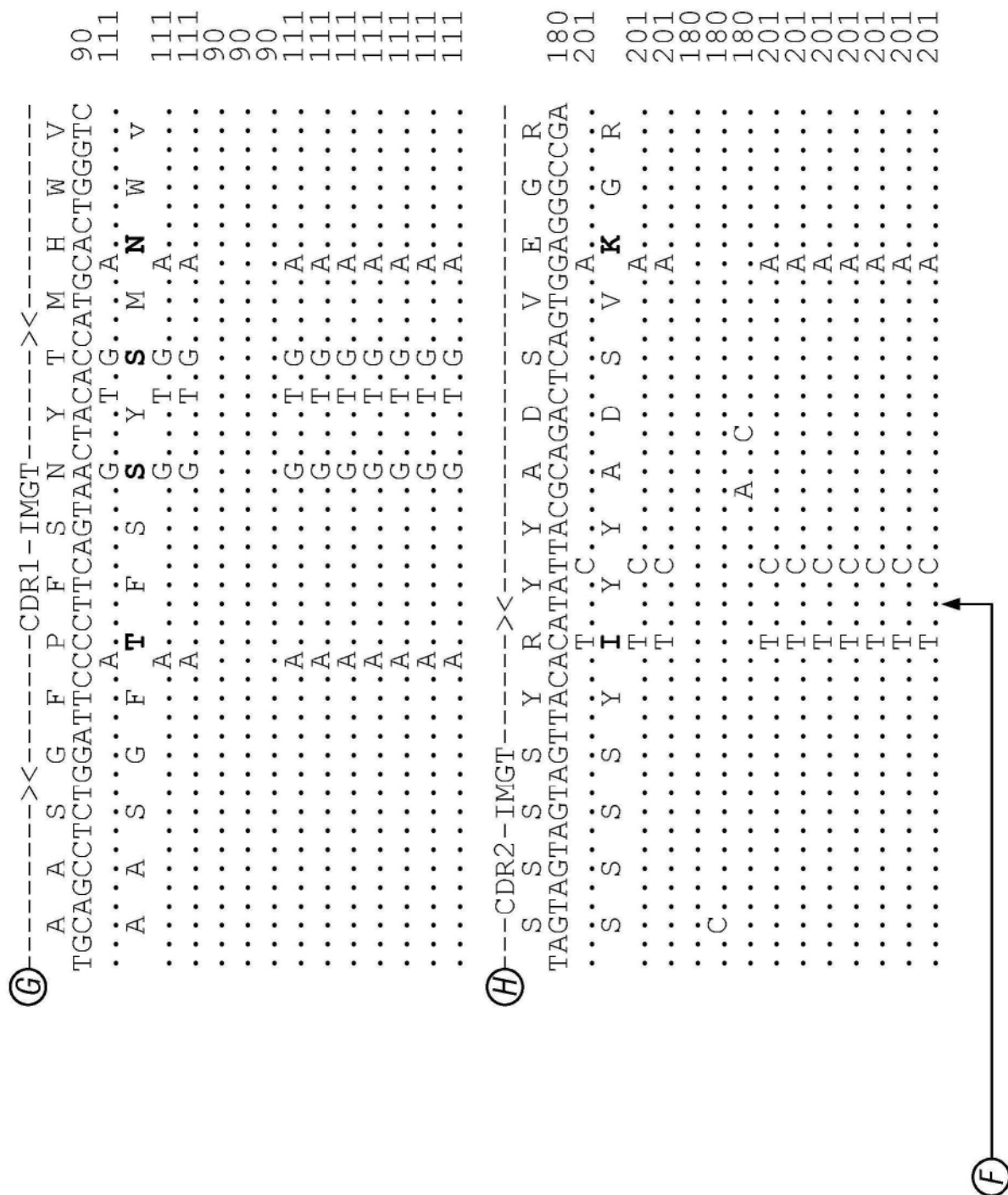


图5B续2

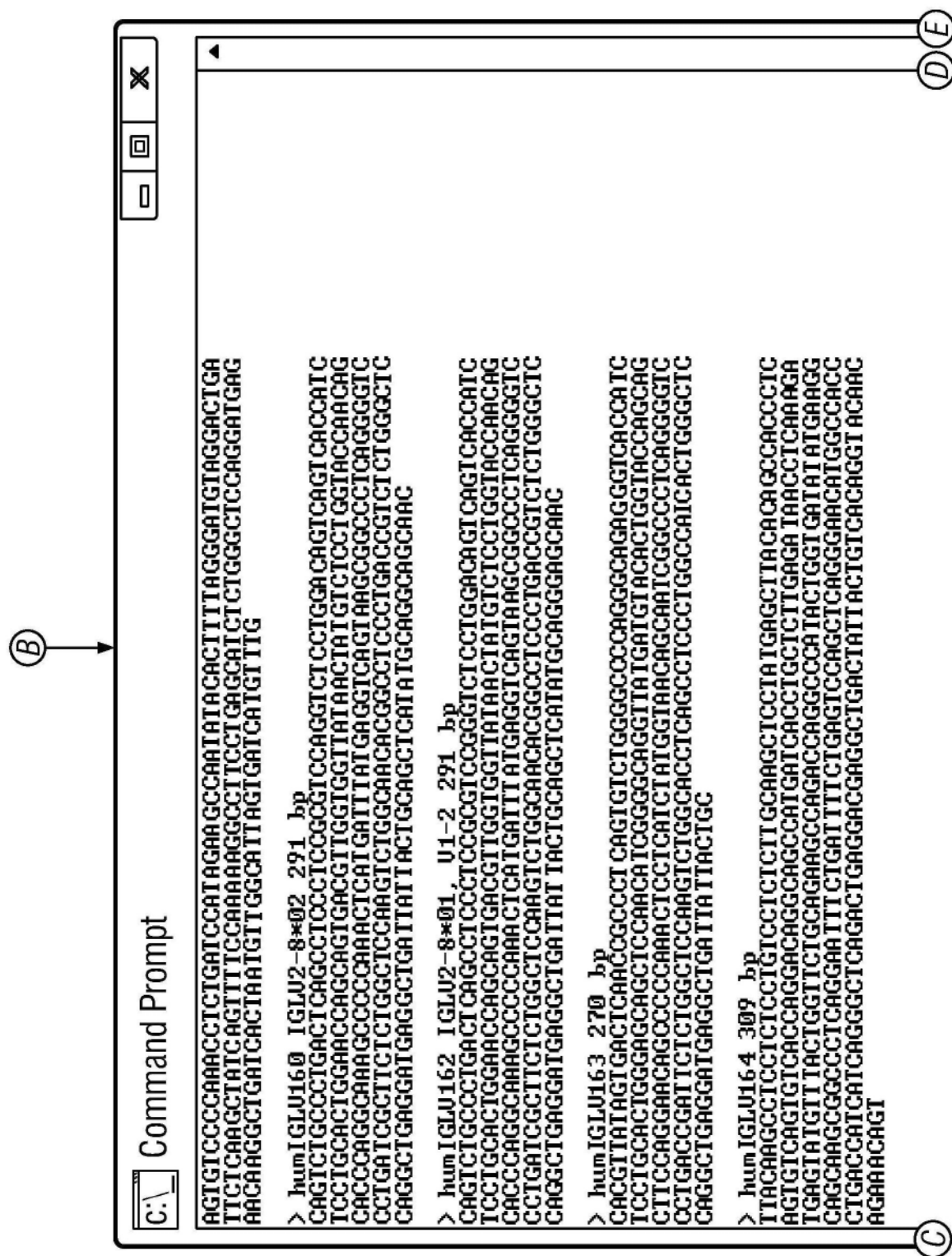


图5B续3

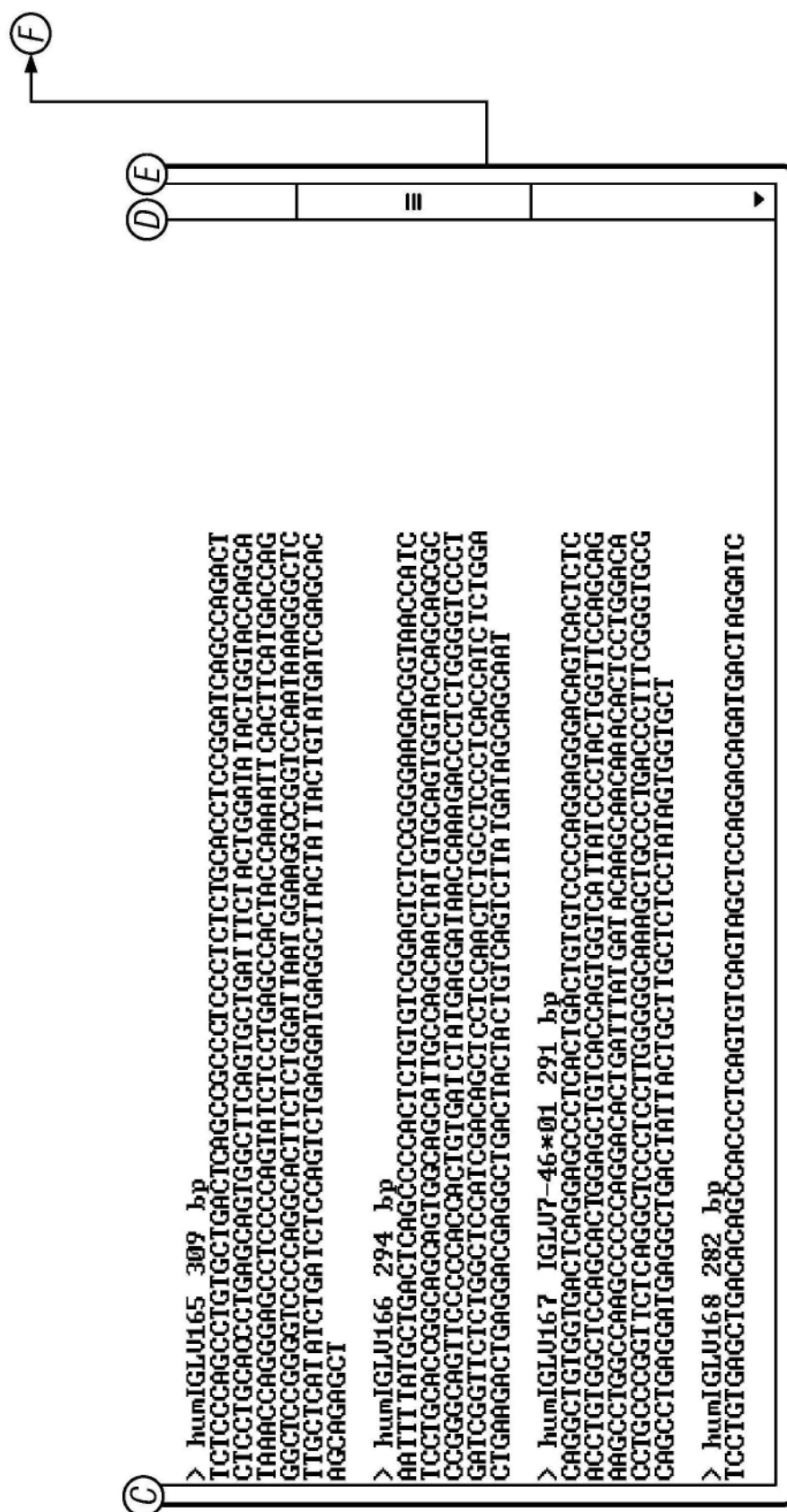


图5B续4

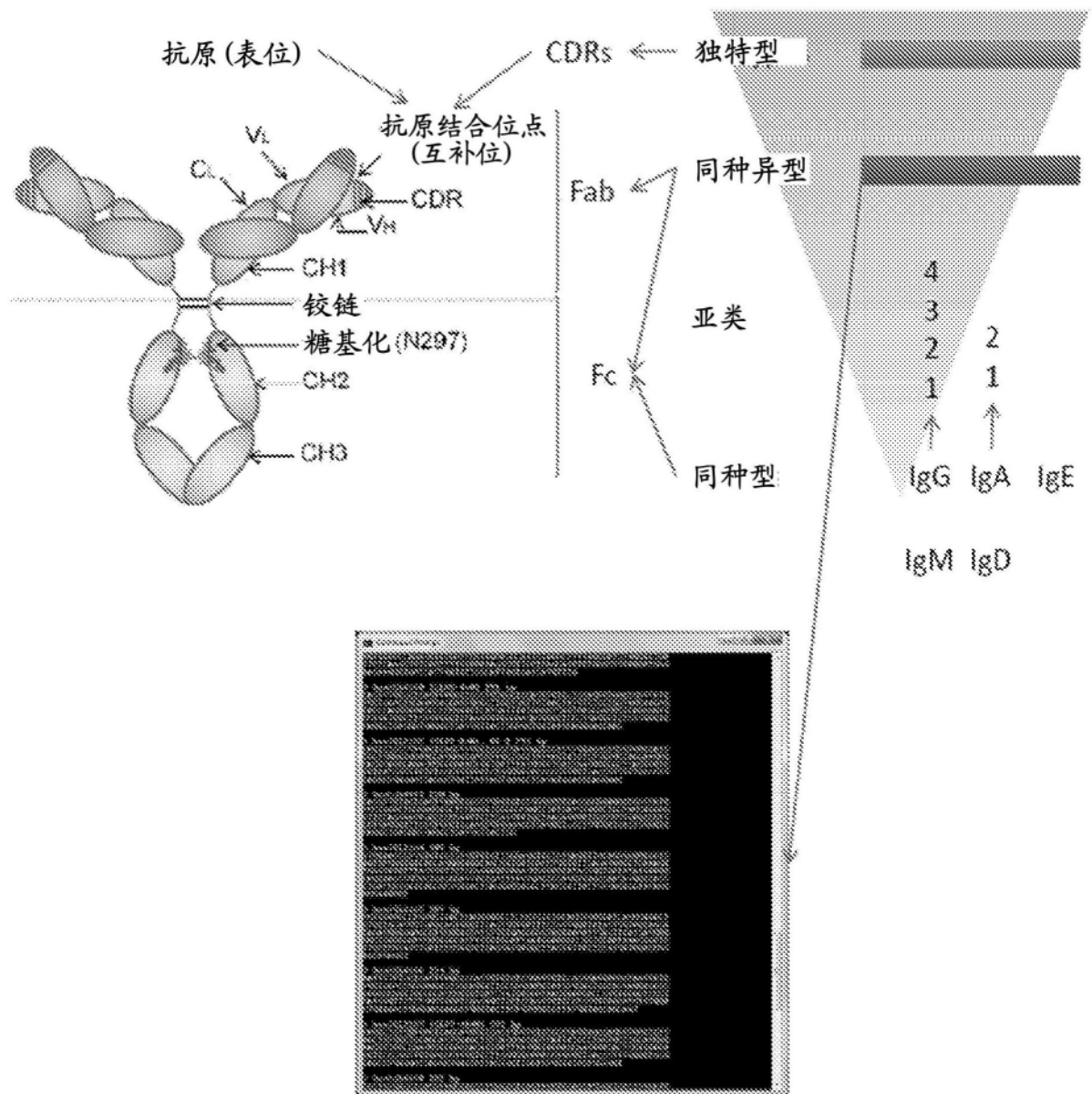


图6

hCD19 scFv					
V _L	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRASQDIS	KYLNWYQQK	GKVPKLLIYH
	<u>TSRLHSGVPD</u>	<u>RFSGSGSGTD</u>	<u>FTLTISSLQP</u>	<u>EDVATYYCQQ</u>	<u>GNTLPYTFGQ</u>
	GTKVEIKR				
V _H	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGVSLP	DYGVSQWRQA	PGKGLEWIGV
	<u>IWGSETTYYN</u>	<u>SALKSKFIIS</u>	<u>RDNAKNSLYL</u>	<u>QMNSLRAEDT</u>	<u>AVYYCARHYY</u>
	<u>YGGSYAMDYW</u>	<u>GQGTLVTVSS</u>			
mCD19 scFv					
V _L	DIQMTQTTSS	LSASLGDRV	ISCRASQDIS	KYLNWYQQK	DGTVKLLIYH
	<u>TSRLHSGVPS</u>	<u>RFSGSGSGTD</u>	<u>YSLTISNLEQ</u>	<u>EDIATYFCQQ</u>	<u>GNTLPYTFGG</u>
	GTKLELKR				
V _H	EVQLQQSGPG	LVAPSQSLSV	TCTVSGVSLP	DYGVSQWRQA	PRKGLEWLG
	<u>IWGSETTYYN</u>	<u>SALKSRITII</u>	<u>KDNSKSQVFL</u>	<u>KMNSLOTDDT</u>	<u>AIYYCAKHYY</u>
	<u>YGGSYAMDYW</u>	<u>GQGTIVTVSS</u>			

图7A

hCD19 scFv	mCD19 scFv
• DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC V_L • Ig κ 链 V 区 (MAR) - 人 (片段) [PH0879]	• DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC • 免疫球 蛋白轻链, [鼠] [AAC52468]
• EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS V_H • 免疫球蛋白 重链可变区, 部分 [人] [ACD43442]	• EVQLQQSGPG LVAPSQSLSV TCTVS • 免疫球 蛋白重链 可变区, 部分[鼠] [AAS45200]

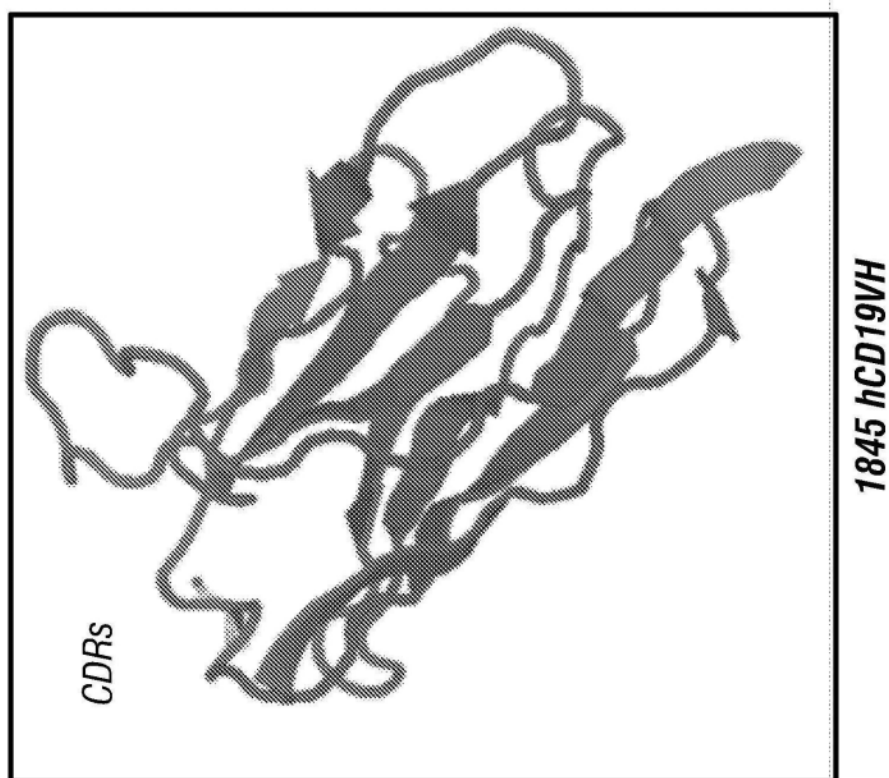
图7B

scFv 氨基酸	scFv 核苷酸
• V_L 同一性—80% • V_L 同源性—91% • V_L 比对评分—480	• V_L 同一性—70% • V_L 同源性—70% • V_L 比对评分—773
• V_H 同一性—75% • V_H 同源性—88% • V_H 比对评分—502	• V_H 同一性—68% • V_H 同源性—68% • V_H 比对评分—741

图7C



图8A



构架

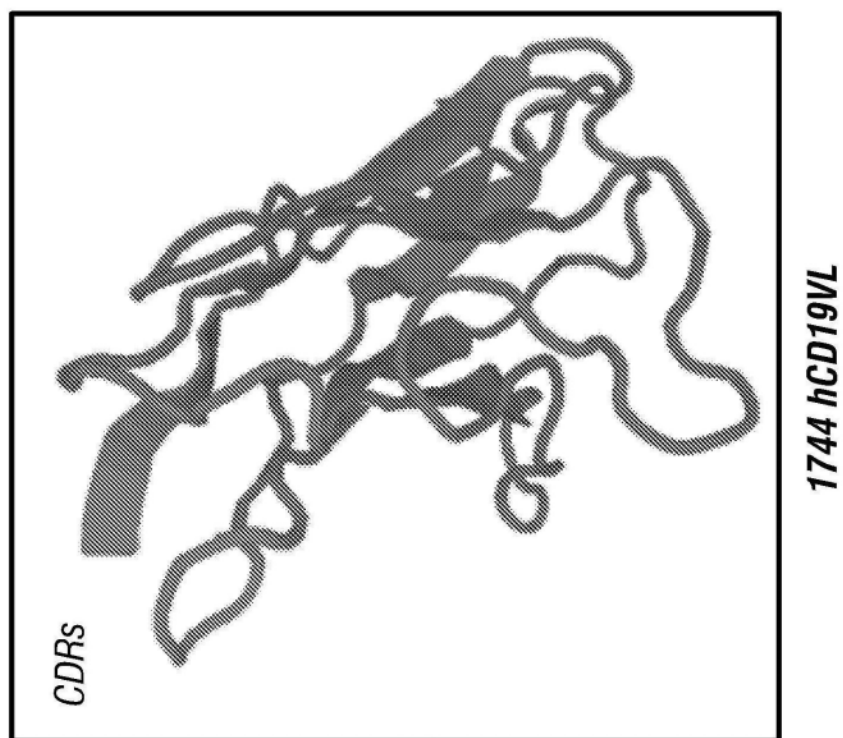


图8A续

Templates		Sequence Similarity		Alignment of Selected Templates		More ▼	
◆ Name	◆ Title	◆ Coverage	◆ Identity	◆ Method	◆ Oligo State	◆ Ligands	
☒ 2fgw.1.A	H52 FAB (LIGHT CHAIN)		91.67	X-ray, 3.0Å	hetero-oligomer	None	▼
☐ 4edw.1.A	tanezumab Fab light chain		88.89	X-ray, 2.5Å	hetero-oligomer	None	▼
☐ 2fgw.1.A	H52 FAB (LIGHT CHAIN)		91.59	X-ray, 3.0Å	hetero-oligomer	None	▼
☐ 1fgv.1.A	H52 FV (LIGHT CHAIN)		89.81	X-ray, 1.9Å	hetero-oligomer	None	▼
☐ 1bj1.1.A	FAB FRAGMENT		88.89	X-ray, 2.4Å	hetero-oligomer	None	▼
☐ 1cz8.1.C	LIGHT CHAIN OF NEUTRALIZING ANTIBODY		87.96	X-ray, 2.4Å	hetero-oligomer	None	▼

图8B

Templates		Sequence Similarity		Alignment of Selected Templates		More ▾	
◆ Name	◆ Title	◆ Coverage	◆ Identity	◆ Method	◆ Oligo State	◆ Ligands	
☐ 1cz8.1.E	LIGHT CHAIN OF NEUTRALIZING ANTIBODY		87.96	X-ray, 2.4Å	hetero- oligomer	None	>
☐ 3ncj.1.A	Fab15 Mut8 light chain		89.81	X-ray, 1.6Å	hetero- oligomer	4 x ZN ^α	>
☐ 4edw.1.A	tanezumab Fab light chain		88.79	X-ray, 2.5Å	hetero- oligomer	None	>
☐ 1bj1.1.A	FAB FRAGMENT		88.79	X-ray, 2.4Å	hetero- oligomer	None	>
☐ 3na9.1.A	Fab15 light chain		88.89	X-ray, 1.7Å	hetero- oligomer	7 x ZN ^α	>

图8B续

Found Templates									
ID	Name	Seq ID	Seq Sim	Cov	Resolu	Method	GMQE	Found By	
16ab2a54676539ba5354b5ae4631978d23d69f0f	2fgw.1.A	91.667	0.582	1.000	3.000	X-ray	0.982	BLAST	
919b2cfd6b66ff490e541d188d3364a35035627	4edw.1.A	88.889	0.575	1.000	2.480	X-ray	0.977	BLAST	
a3ebccc75776de851fdee4abc3415195d94fb9a6	2fgw.1.A	91.589	0.582	0.991	3.000	X-ray	0.959	HHblits	
d1fac46a2f9bc24ddb5264a18f3f086df89d329	1fgv.1.A	89.815	0.573	1.000	1.900	X-ray	0.916	HHblits	
f537a248f491064f4d38449441e7a0a25b3f53e6	1bj1.1.A	88.889	0.572	1.000	2.400	X-ray	0.977	BLAST	
5185b6260c466fca1a7d8f93b28ed57ead694d44	1cz8.1.C	87.963	0.570	1.000	2.400	X-ray	0.980	BLAST	
a5214da2aef2b06f4e6382b31e8d11ebfcd037a9	1cz8.1.E	87.963	0.570	1.000	2.400	X-ray	0.980	BLAST	
0f0883c8a9c05c2c3db1cac3d80d327d57955a78	3ncj.1.A	89.815	0.569	1.000	1.600	X-ray	0.983	BLAST	
01aa021a39308f06db24b49a645ef740f4fa9c21	4edw.1.A	88.785	0.575	0.991	2.480	X-ray	0.946	HHblits	
16a6f6fff3b541f1daa39194e5ff3b18d77ad45a	1bj1.1.A	88.785	0.572	0.991	2.400	X-ray	0.945	HHblits	
66e2a7e52fa5012ef38fd0257c3fdd1772bb6264	3na9.1.A	88.889	0.564	1.000	1.700	X-ray	0.980	BLAST	
4eb750c9fe5c850a3e92ec8f95ecd79687ed0f39	3ulu.1.B	88.889	0.564	1.000	3.520	X-ray	0.980	BLAST	
12893efb7685cfa2a3929c298d073d36c92959ec	3ulv.1.B	88.889	0.564	1.000	3.522	X-ray	0.980	BLAST	
0dc02afbccd59befd067834464c34edf96359a35	5veb.1.B	87.963	0.563	1.000	2.340	X-ray	0.977	BLAST	
86e7e4d61ab12f05442ec2520a2c16c2a569283a	1cz8.1.C	87.850	0.570	0.991	2.400	X-ray	0.940	HHblits	
c953ed986edb59ef472c6de925517b117e44ccb4	1cz8.1.E	87.850	0.570	0.991	2.400	X-ray	0.940	HHblits	
a7703d4bad28b91e373050c1b9a681acd731a88f	2kqm.1.A	85.185	0.562	1.000	NA	NMR	0.885	HHblits	
ef9d37498230eb34b8e343f965966f1195c7a767	2kqm.1.B	85.185	0.562	1.000	NA	NMR	0.885	HHblits	

图8C

Found Templates									
ID	Name	Seq ID	Seq Sim	Cov	Resolu	Method	GMQE	Found By	
c06fb1666ca2220ea35ab93c1fc958d95033cab3	3ncj.1.A	89.720	0.569	0.991	1.600	X-ray	0.954	HHblits	
ad6c18aab86bdfe36a61ba2e4366029652321f06	5d1q.1.A	84.259	0.560	1.000	3.220	X-ray	0.974	BLAST	
134492e948694cb1fd1211586e652742aae21ac5	5it2.1.B	87.037	0.560	1.000	1.700	X-ray	0.973	BLAST	
3a667df8cf03b012f5f40604711fc4990ad8f0d1	5i19.1.A	87.037	0.559	1.000	2.800	X-ray	0.972	BLAST	
b72cc746b30590cbe92a4d1cafe85ebdc2588d1a	5115.1.A	87.037	0.559	1.000	2.600	X-ray	0.972	BLAST	
905c68765b1a29e6ae10da4d0e4fd6a6c610e8c9	4kmt.1.A	86.111	0.559	1.000	2.100	X-ray	0.963	BLAST	
54db60cc74641525f8bf9372557b269eb4862486	2wub.1.C	85.185	0.559	1.000	2.900	X-ray	0.967	BLAST	
399430263bb502e648291e2673e014e0f984593e	3k2u.1.D	85.185	0.559	1.000	2.350	X-ray	0.967	BLAST	
e3dc77fd87c865c0184b1f85d002bef842f032c1	2wuc.1.D	85.185	0.559	1.000	2.700	X-ray	0.971	BLAST	
12f2db1e2160c9dc5d754a12c238bacc9f9d8a9c	4n1e.1.A	86.111	0.558	1.000	2.230	X-ray	0.768	HHblits	
b5d1dcc7c5ee7904c2cd2869e2de56872b07135b	4n1e.1.B	86.111	0.558	1.000	2.230	X-ray	0.887	HHblits	

图8C续1

Templates	Sequence Similarity	Alignment of Selected Templates	More ▼
* Target	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLLHSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTI		75
2fgw.1.A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNVLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI		75
Target	SSLQPEDVATYYCOQGNLTPYTFGQGTKVEIKR		108
2fgw.1.A	SSLQPEDFATYYCOQGNLTPPTFGQGTKVEIKR		108

图8C续2

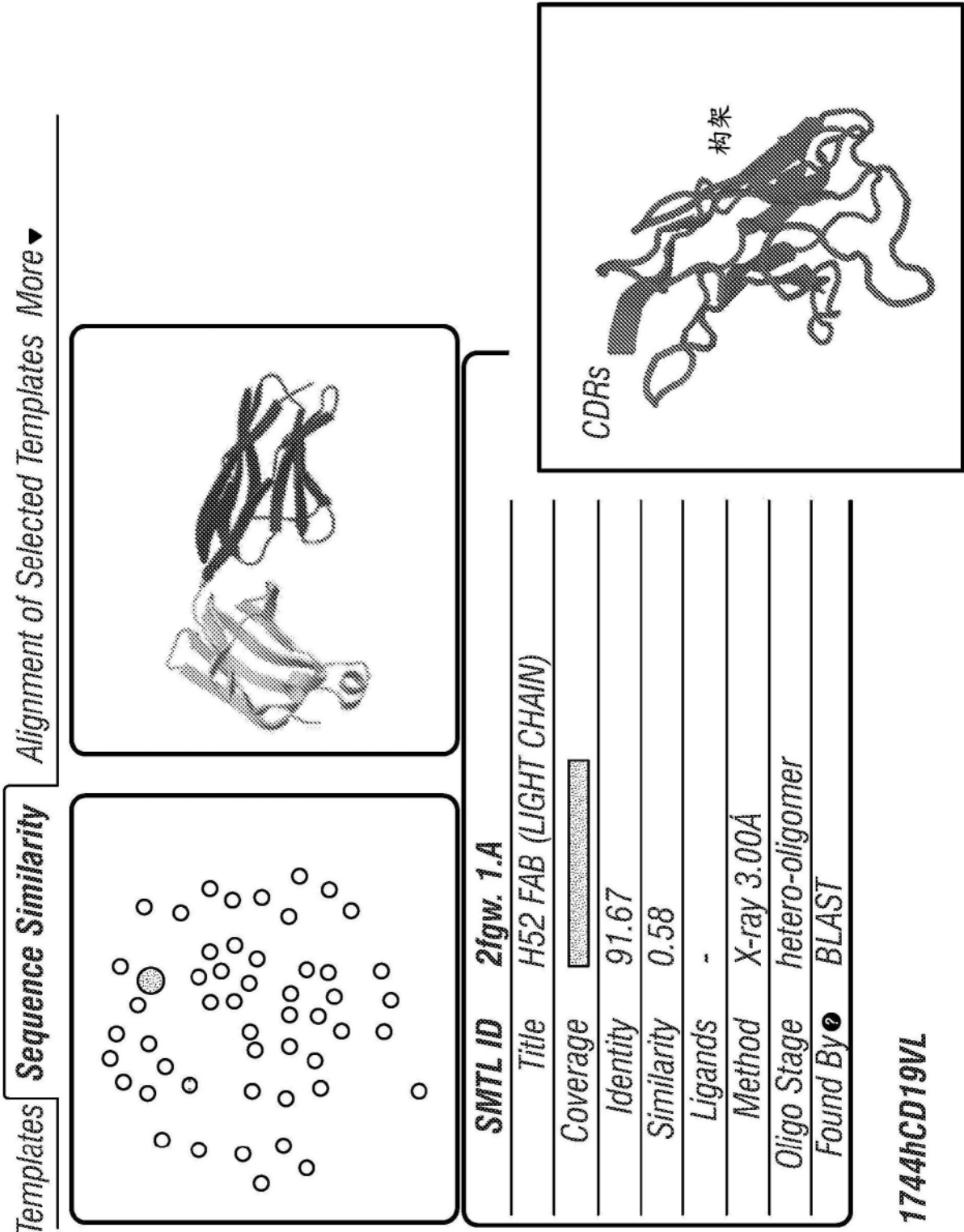


图8D

Sequence Similarity Alignment of Selected Templates More ▾						
Templates	◆ Name ◆	Title	◆ Coverage ◆	◆ Identity ◆	◆ Method ◆	◆ Oligo State ◆ Ligands
☒	4uv7.1.B	GC1118A		73.33	X-ray, 2.1Å	hetero-oligomer 2 x NAG-AG ^o , 1 x NAG ^o
☐	4hs8.1.B	antibody hu5B3.v2 Fab heavy chain		74.17	X-ray, 2.6Å	hetero-oligomer None
☐	4jfz.1.B	Fab heavy chain		75.63	X-ray, 1.8Å	hetero-oligomer 1 x PPI ^o
☐	3g6j.1.D	Fab heavy chain		74.17	X-ray, 3.1Å	hetero-oligomer 1 x CA ^o
☐	4jfx.1.B	Fab heavy chain		73.95	X-ray, 2.0Å	hetero-oligomer None
☐	4jfx.2.B	Fab heavy chain		73.95	X-ray, 2.0Å	hetero-oligomer None
☐	4lmq.2.A	immunoglobulin G1 heavy chain		76.67	X-ray, 2.8Å	hetero-oligomer None

图9A

Templates

Sequence Similarity Alignment of Selected Templates More ▼

◆ Name	◆ Title	◆ Coverage	◆ Identity	◆ Method	◆ Oligo State	Ligands
❑ 4lmq.1.B	immunoglobulin G1 heavy chain		76.67	X-ray, 2.8Å	hetero-oligomer	None
❑ 5fu0.1.B	FAB HEAVY CHAIN		72.50	X-ray, 3.6Å	hetero-oligomer	None
❑ 5fuz.1.A	645 FAB, HEAVY CHAIN		72.50	X-ray, 2.7Å	hetero-oligomer	None
❑ 1dfb.1.B	IGG1-KAPPA 3D6 FAB (HEAVY CHAIN)		72.50	X-ray, 2.7Å	hetero-oligomer	None
❑ 1w72.2.C	HYB3 HEAVY CHAIN		77.78	X-ray, 2.1Å	hetero-oligomer	1 x GLU-ALA-ASP-PRO-THR-GLY-HIS-SER-TYR ^α
❑ 1w72.1.C	HYB3 HEAVY CHAIN		77.78	X-ray, 2.1Å	hetero-oligomer	1 x GLU-ALA-ASP-PRO-THR-GLY-HIS-SER-TYR ^α

图9A续

Found Templates									
ID	Name	Seq ID	Seq Sim	Cov	Resolu	Method	GMQE	Found By	
21101ec705dbd41451b58ac59ff02528b91e18a5	4uv7.1.B	73.333	0.531	1.000	2.100	X-ray	0.909	BLAST	
45f63856aaf6a6b3a9d9224af51a2accfcfd5071	4hs8.1.B	74.167	0.529	1.000	2.680	X-ray	0.885	BLAST	
03329e74435aaac544f4ced9f398115e07fb07dd	4jfb.1.B	75.630	0.532	0.992	1.750	X-ray	0.872	BLAST	
20291db69c52a49b9c20c96a0392a6a973f761ae	3g6j.1.D	74.167	0.525	1.000	3.100	X-ray	0.874	BLAST	
49d4e2b0048335bbae43c66a8fdebb34da268942	4jfx.1.B	73.950	0.531	0.992	1.950	X-ray	0.879	BLAST	
39120a1abdd0a1dd42f57e5ecd995bc82ba6d558	4jfx.2.B	73.950	0.531	0.992	1.950	X-ray	0.879	BLAST	
2f2ffb3012446a5178eb0b1fee9684239911cc1d	41mq.1.B	76.667	0.524	1.000	2.773	X-ray	0.891	BLAST	
a82368c848fce9786bb3af117a9aec8021b45035	41mq.2.A	76.667	0.524	1.000	2.773	X-ray	0.891	BLAST	
a52d1879dbdbf56cfde405605006d19bd440fea6	5fuo.1.B	72.500	0.523	1.000	3.600	X-ray	0.897	BLAST	
51ffa985d658ff36864e1cf539ae51aace391822	5fuz.1.A	72.500	0.523	1.000	2.680	X-ray	0.897	BLAST	
c5270bf7ad127585242f4b52059eb7bb5b509043	1dfb.1.B	72.500	0.523	1.000	2.700	X-ray	0.847	BLAST	
7cd2148779876e3b0b1c3bdd5c8760a87d02531b	1w72.1.C	77.778	0.542	0.975	2.150	X-ray	0.908	BLAST	
d3b90dcd3d71865671f955692083780a98ad90eb	1w72.2.C	77.778	0.542	0.975	2.150	X-ray	0.908	BLAST	
795834131fff385ac5c440b259404b135d8694eb	4k7p.1.B	73.333	0.534	1.000	2.950	X-ray	0.881	BLAST	
003efdc39ec26490624d65c11be86921d3cc3588	4qci.1.B	75.424	0.534	0.983	3.353	X-ray	0.865	BLAST	
7264514b518e4f6bd8dbc20bf912fa084848b480	4iof.1.C	75.424	0.533	0.983	3.353	X-ray	0.822	BLAST	
d7635c25c1371e76fcad17f0cdc67241274fb164	4iof.1.E	75.424	0.533	0.983	3.353	X-ray	0.822	BLAST	

图9B

Found Templates								

ID	Name	Seq ID	Seq Sim	Cov	Resolu	Method	GMQE	Found By

22691bb26c13370f94f3da002dec68503a3462aa	4m1c.1.B	75.424	0.533	0.983	3.501	X-ray	0.749	BLAST
2747a43a7e9de83ea8cc0bd04416d8c331610bee	4m1c.2.B	75.424	0.533	0.983	3.501	X-ray	0.800	BLAST
0be5beb780d160c80515d210b80f90b9a2c052da	4q5z.1.B	75.424	0.533	0.983	3.930	X-ray	0.822	BLAST
90b9a1b402478f8e3b4b007236e66d84370596c9	4jg0.1.B	74.790	0.527	0.992	1.810	X-ray	0.874	BLAST
a5c366d43831e3404129b8857853950f1aceb065	4jg1.1.B	74.790	0.527	0.992	1.550	X-ray	0.861	BLAST
b49139b7fabf8a6db51dc7b0f9bf6228c056c886	4nnp.1.B	73.950	0.526	0.992	2.690	X-ray	0.839	BLAST
6782e472f605d22e20993c88d570d5e8656e66e3	5csz.1.A	73.333	0.519	1.000	1.800	X-ray	0.807	BLAST
09293b931a2f88034b3873bdc68c3d9b715b91a6	3grw.1.C	72.500	0.525	1.000	2.100	X-ray	0.883	BLAST
f4c72d463469b16e04f2b47a07d3d8b316258223	41vh.2.A	70.588	0.525	0.992	2.800	X-ray	0.831	BLAST
2d45fe1b130233f0d36f5254b5c073d3060232a8	41vh.2.C	70.588	0.525	0.992	2.800	X-ray	0.831	BLAST
fcdc5dad1e5a70b6bec51de5a4979439982ad332	41vh.3.A	70.588	0.525	0.992	2.800	X-ray	0.831	BLAST
8e18bbe85cf288b0bc1c962e9546d816ceb75db	41vh.3.C	70.588	0.525	0.992	2.800	X-ray	0.831	BLAST
a95f3b534e5f99f4314fd1655e4e2b0a20f968f2	3kdm.1.B	79.310	0.545	0.967	1.500	X-ray	0.897	BLAST
552b7cbaa5ef6940b829ceb87498f5ca49ff9343	3kdm.2.B	79.310	0.545	0.967	1.500	X-ray	0.897	BLAST

图9B续1

Templates	Sequence Similarity	Alignment of Selected Templates	More ▼
Target 84	EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGVSLEPDYGVSWVRQAPGKGLFI	GVINGSETTTYNSALKSKFIISRDNAKNSLYLQMN	84
4UV7.1.B	EVOLVESGGGVVOPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWIRQAPGKGL	SYYPDSVIRGRFTISRDNSSRKITLYLQMN	85
Target 120	LRAEDTAVYYCARHYYGGSYAMDYWGQGTLLTVSS		120
4UV7.1.B	LRAEDTAVYYCARHGSFGYITLYAMDYWGQGTITVTVSS		122

1845 hCD19VH

图9B续2

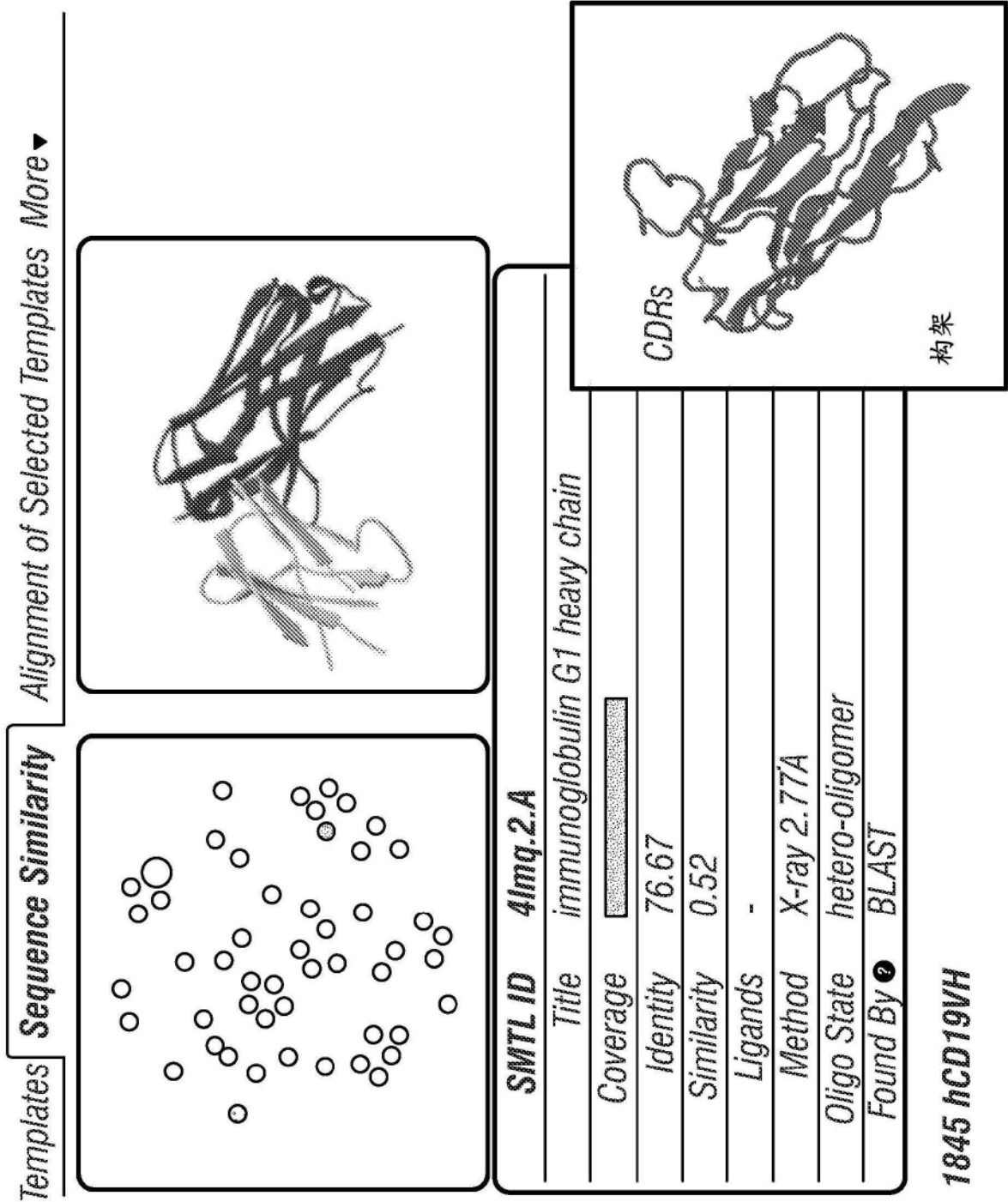


图9C

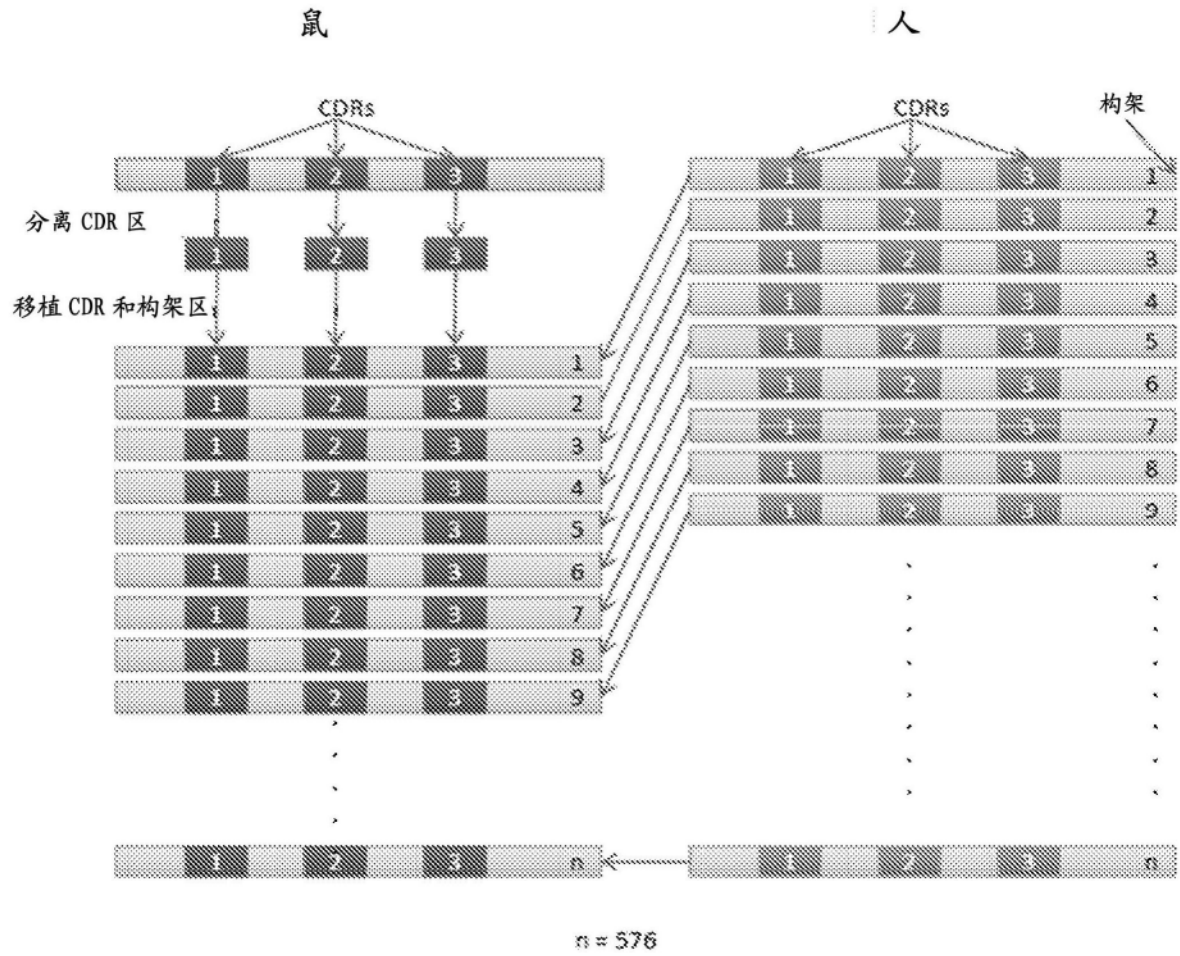


图10A

类型	非专有名称	FDA	商标	V_H	V_L
鼠的	muromonabCD3	1992	ORTHOCLONE OKT3 [®]	69.87	61.15
鼠的	ibritumomab tiuxetan	2002	ZEVALIN [®]	66.07	64.58
嵌合的	abciximab	1993	REOPRO [®]	64.62	66.97
嵌合的	rituximab	1997	MABTHERA [®] /RITUXAN [®]	68.26	66.51
嵌合的	basiliximab	1998	SIMULECT [®]	65.26	66.54
嵌合的	cetuximab	2004	ERBITUX [®]	57.98	65.82
嵌合的	siltuximab	2014	SYLVANT [®]	74.83	68.67
人源化的	palivizumab	1998	SYNAGIS [®]	80.76	
人源化的	trastuzumab	1998	HERCEPTIN [®]	86.26	93.04
人源化的	alemtuzumab	2001	CAMPATH [®]	72.31	85.45
人源化的	omalizumab	2003	XOLAIR [®]	76.36	87.32
人源化的	bevacizumab	2004	AVASATIN [®]	73.66	89.18
人源化的	ranibizumab	2006	LUCENTIS [®]	72.56	88.54
人源化的	certolizumab pegol	2008	CIMZIA [®]	78.64	89.09
人源化的	pertuzumab	2012	PURJETA [®]	76.47	90.05
人源化的	pembrolizumab	2014	KEYTRUDA [®]	75.71	82.28

图10B

类型	非专有名称	FDA	商标	V_H	V_L
人源化的	vedolizumab	2014	ENTYVIO™	79.88	84.91
人源化的	elotuzumab	2015	EMPLICIT™	78.95	85.05
人源化的	idarucizumab	2015	PRAXBIND®	77.34	85.96
人的	adalimumab	2002	HUMIRA®	87.85	91.32
人的	canakinumab	2009	ILARIS®	90.51	30.72
人的	ofatumumab	2009	ARZERRA®	92.54	96.73
人的	denosumab	2010	XGEVA®/PROLIA®	90.98	94.41
人的	ipilimumab	2011	YERVOY®	90.47	96.62
人的	nivolumab	2014	OPDIVO®	90.18	96.64
人的	ramucirumab	2014	CYRAMZA®	90.78	82.14
人的	necitumumab	2015	PORTRAZZA™	90.79	92.59
人的	secukinumab	2015	COSENTYX®	84.09	97.25

图10B续

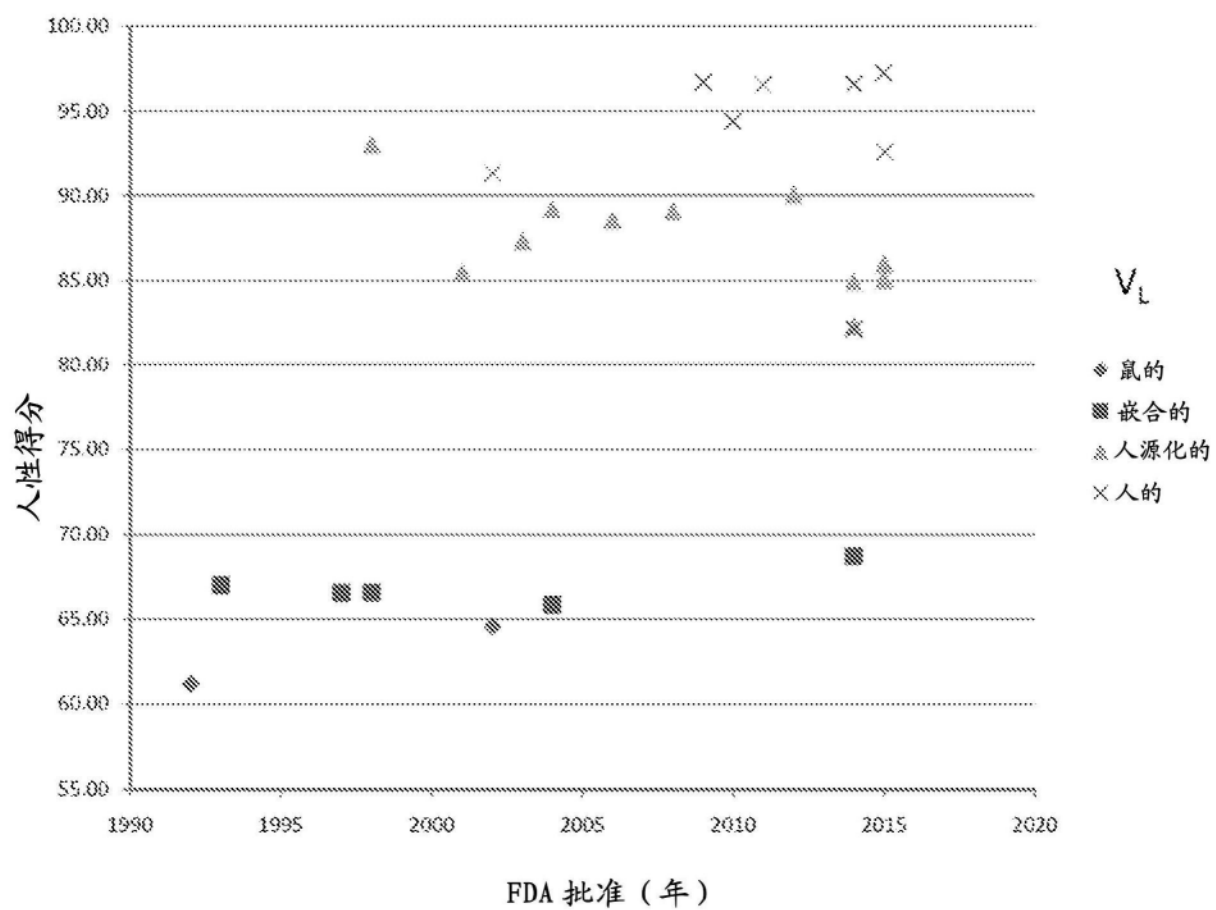


图10C

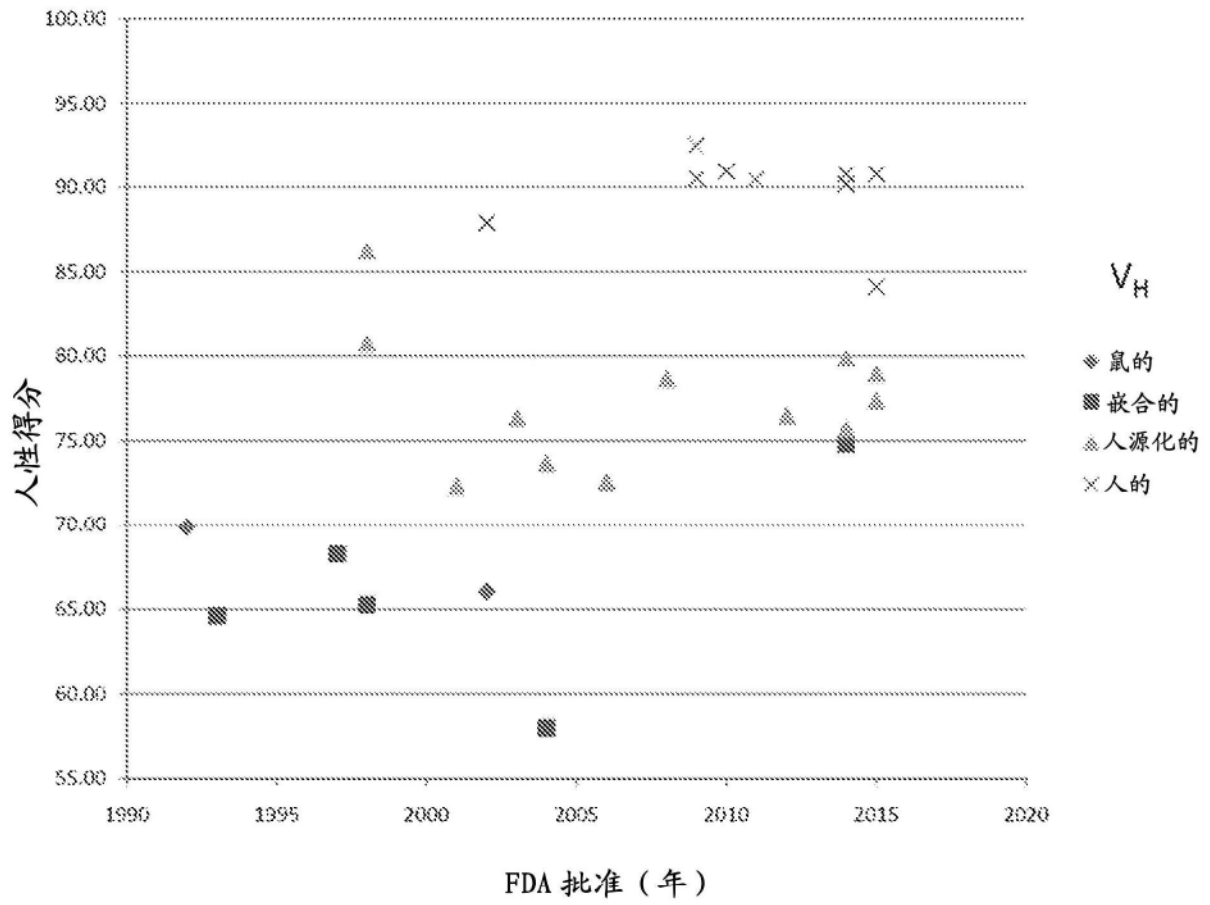


图10D

人源化得分

抗体名称	公司	类型	报道的免疫原性
Muromanab (OKT3)	Ortho Biotech	鼠的	25% (24)
Arcitumomab (CEA-scan)	Immunomedics	鼠的	<1% (3/400)
Fanolesomab (Neutrospec)	Palatin Tech.	鼠的	0-16.6% (30-54)
Imciromab (Myoscint)	Centocor (Johnson & Johnson)	鼠的	<1% (914)
Capromab (Prostascint)	Cytogen	鼠的	8%-19% (27-239)
Nofetumomab (Verluma)	Boehringer Ingelheim	鼠的	6% (53)
Ibritumomab (Zevalin)	Idec Pharma (Biogen Idec)	鼠的	1.3% (446)
Tositumomab (Bexxar)	GSK	鼠的	11% (230)
Rituximab (Rituxan)	Genentech(Roche)/Biogen/Idec	嵌合的	11% (2578)
Basiliximab (Simulect)	Novartis	嵌合的	1-2% (138-339)
Infliximab (Remicade)	Centocor (Johnson & Johnson)	嵌合的	10-15%
Cetuximab (Erbix)	Imclone (Eli Lilly)	嵌合的	5% (1001)
Daclizumab (Zenapax)	Hoffman LaRoche	人源化的	14-34%
Trastuzumab (Herceptin)	Genentech (Roche)	人源化的	<1%
Palivizumab (Synagis)	MedImmune (Astra Zeneca)	人源化的	0.7%-2% (1002-639)
Gemtuzumab (Mylotarg)	Wyeth Pharma (Pfizer)	人源化的	0% (277)
Alemtuzumab (Campath)	Ilex Pharma (Genzyme)	人源化的	1.9-8.3% (133-211)
Omalizumab (Xolair)	Genentech (Roche)	人源化的	<0.1% (1723)
Efalizumab (Raptiva)	Genentech (Roche)	人源化的	6.3% (1063)
Bevacizumab (Avastin)	Genentech (Roche)	人源化的	0% (~500)
Ranibizumab (Lucentis)	Genentech (Roche)	人源化的	1-6%
Eculizumab (Soliris)	Alexion Pharma	人源化的	2% (196)
Natalizumab (Tysabri)	Biogen Idec	人源化的	9% (627)
Cetolizumab pegol (Cimzia)	UCB	人源化的	8% (1509)
Tocilizumab (Actemra)	Genentech (Roche)	人源化的	2% (2876)
Canakinumab (Ilaris)	Novartis	人的	0% (64)
Adalimumab (Humira)	Abbott	人的	2.6%-26%
Panitumumab (Vectibix)	Amgen	人的	4.6% (613)
Golimumab (Simponi)	Centocor (Johnson & Johnson)	人的	4% (1425)
Ofatumumab (Arzerra)	GSK	人的	0% (79)
Ustekinumab (Stelara)	Centocor (Johnson & Johnson)	人的	3-5% (743-1198)
Denosumab (Prolia)	Amgen	人的	<1% (8113)
Abciximab (Reopro)	Centocor (Johnson & Johnson)	嵌合的 Fab	6%-44% (36)

图10E

mCD19CAR

序列可变区:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLELKR

链: VL

区: 构架 + CDR

T20 得分 : 74.07

hCD19CAR (RS)

序列可变区:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIYHTSRLHSGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKR

链: VL

区: 构架 + CDR CDR

T20 得分 : 87.13

图10F

mCD19CAR

序列可变区:

EVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY
YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
TTVTVSS

链: VL

区: 构架 + CDR CDR

T20 得分 : 64.67

hCD19CAR (RS)

序列可变区:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLPDYGVSWVRQAPGKLEWIGVIWGSETT
YNSALKSKFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYGGSYAMDYWGQ
GTLVTVSS

链: VL

区: 构架 + CDR CDR

T20 得分 : 74.46

图10G



图11A

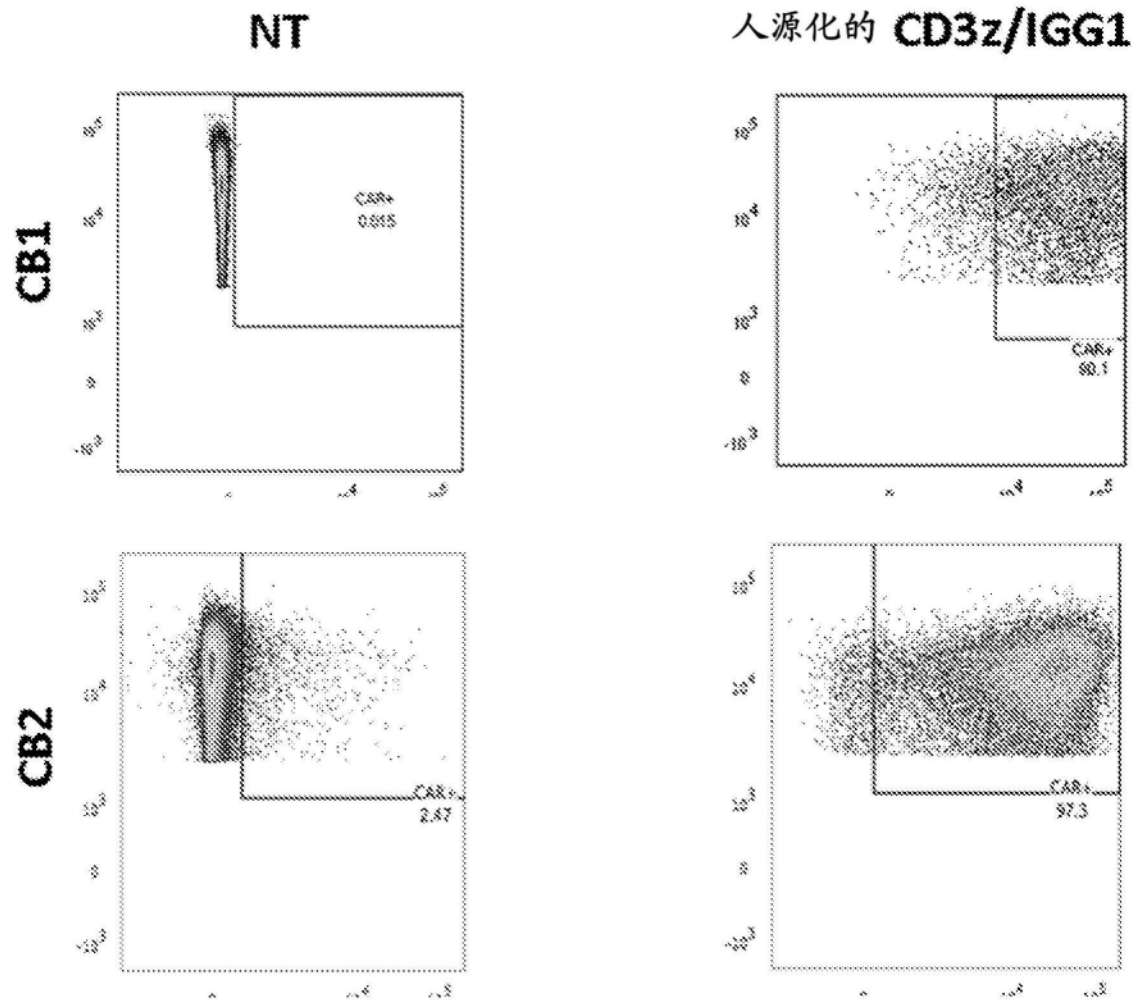


图11B

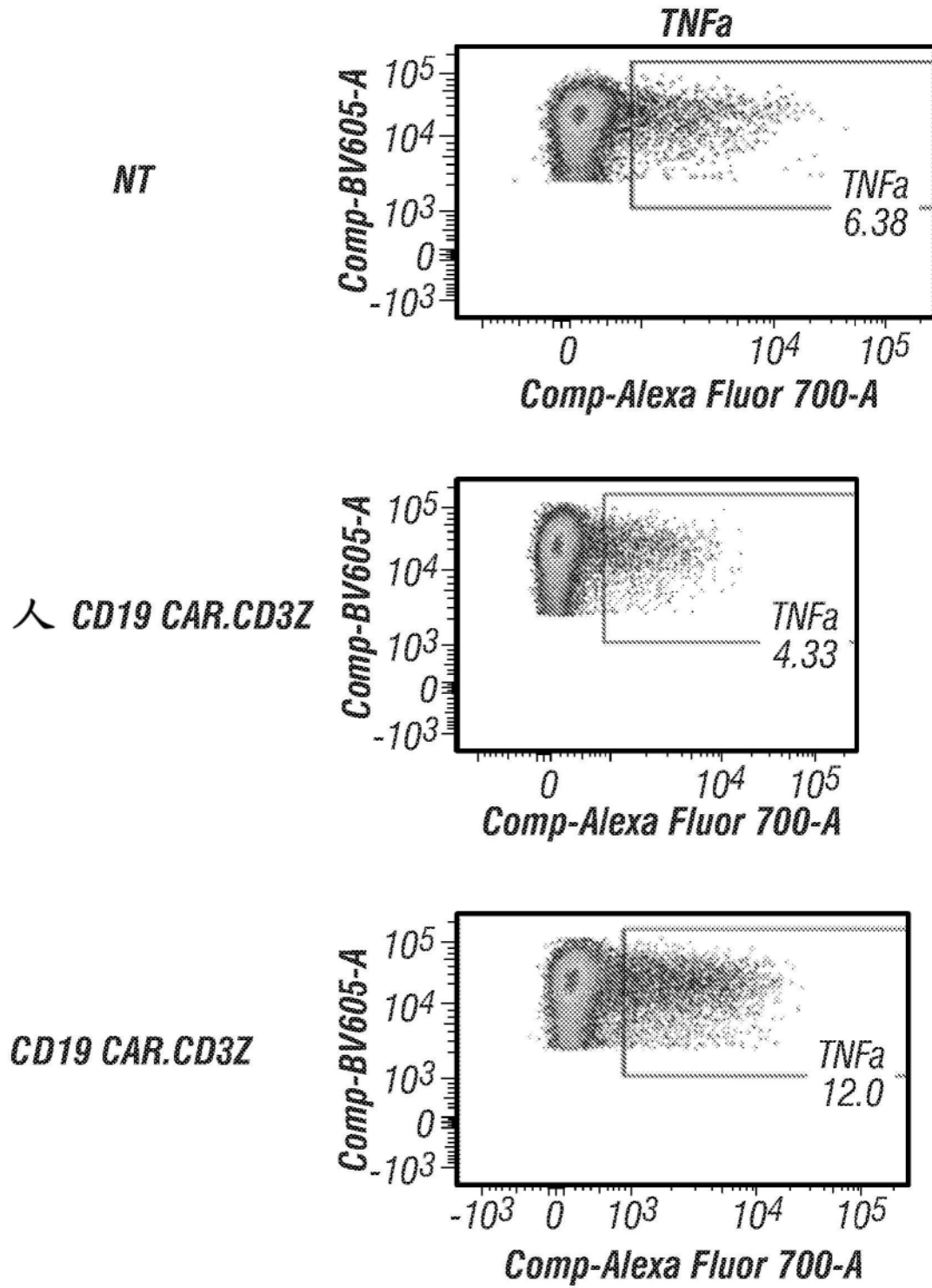


图11C

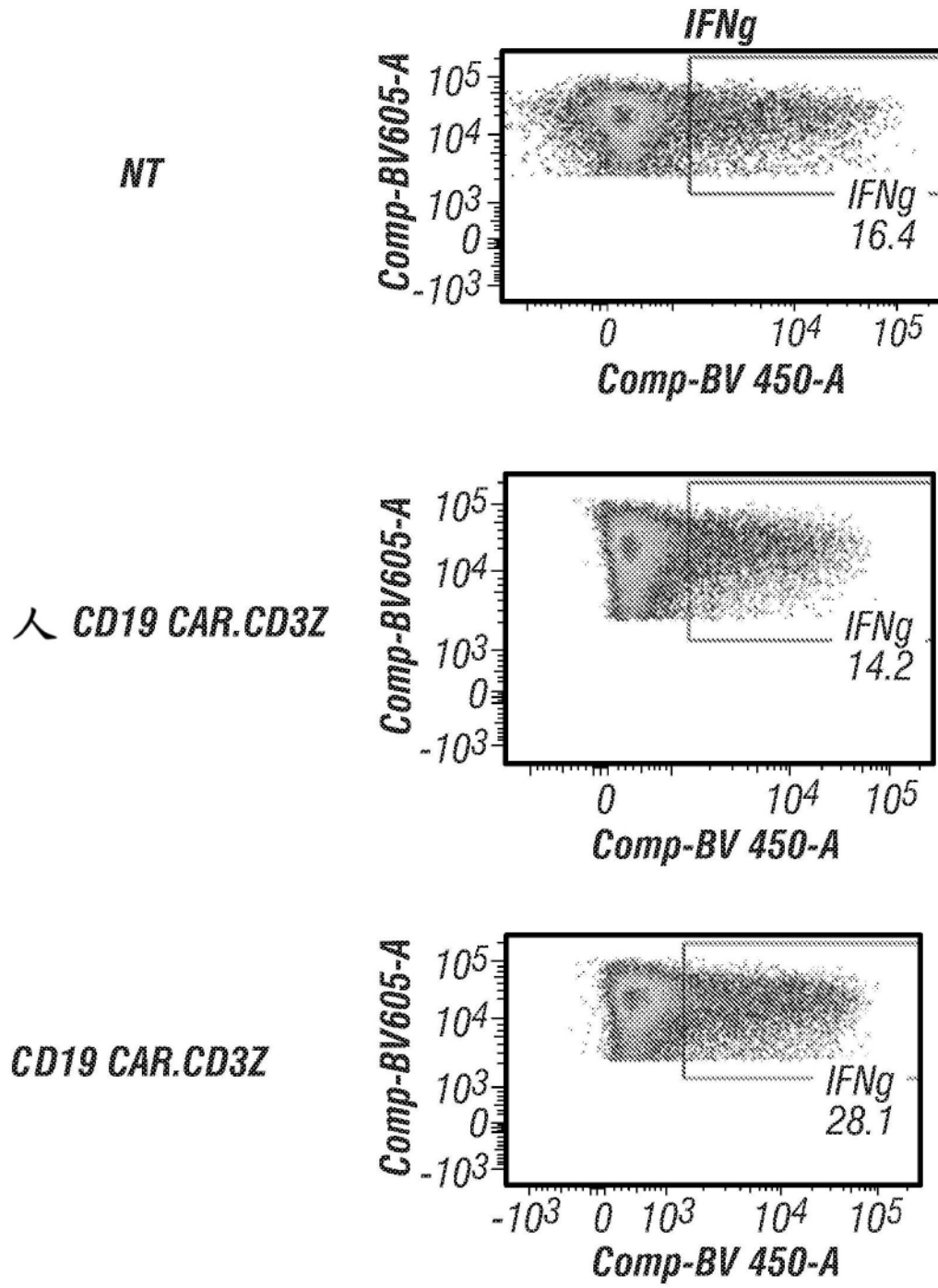


图11C续1

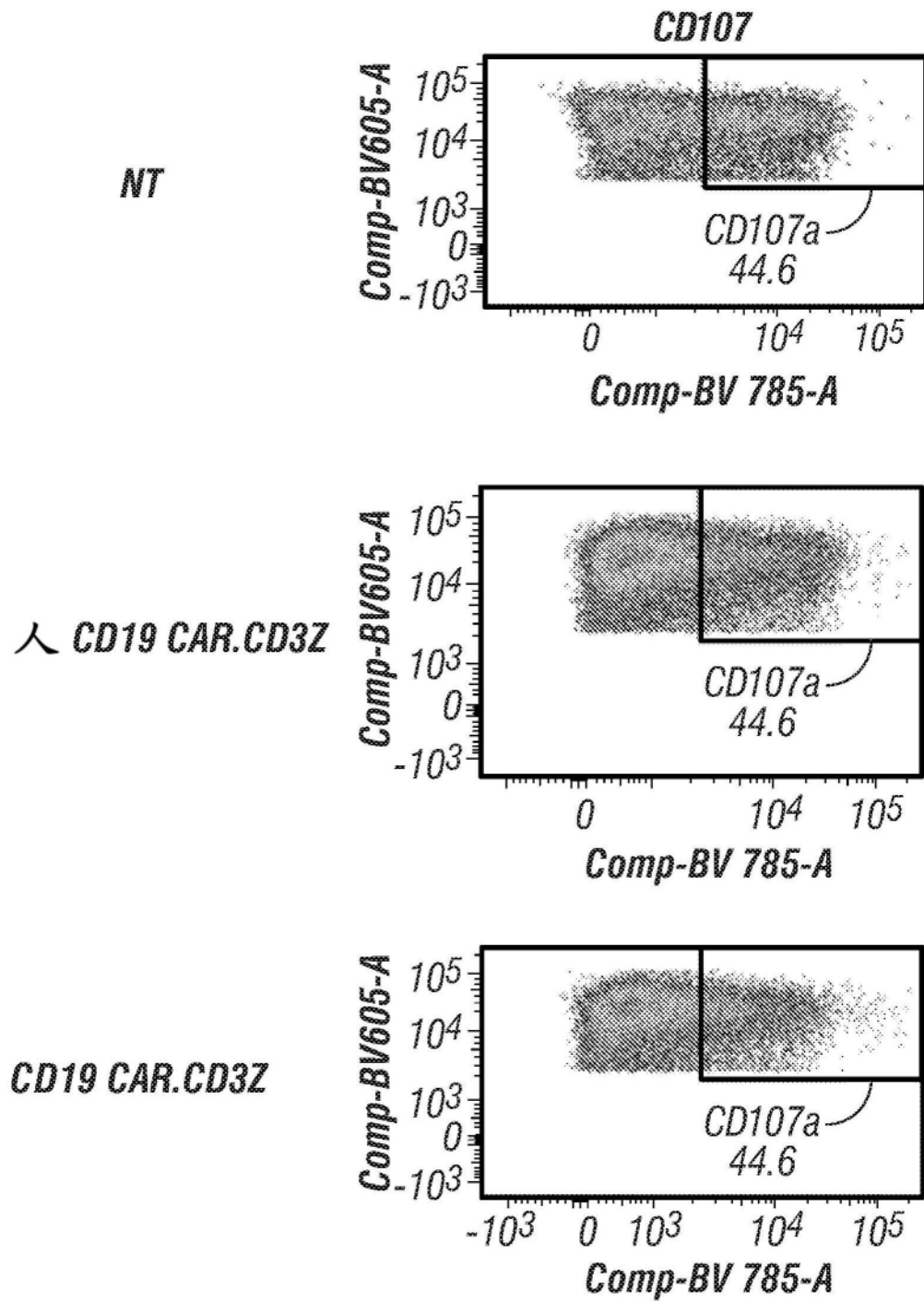


图11C续2

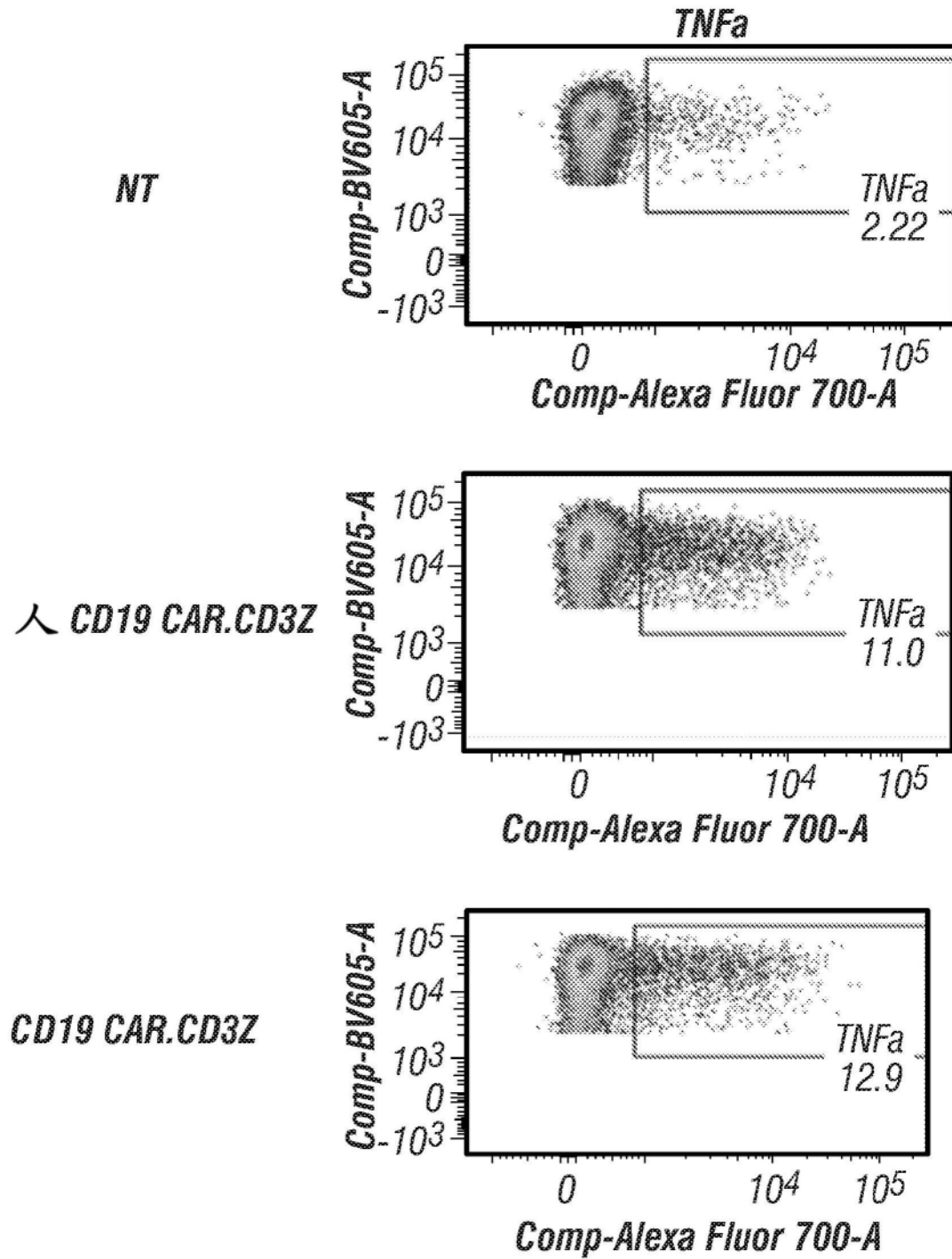


图11D

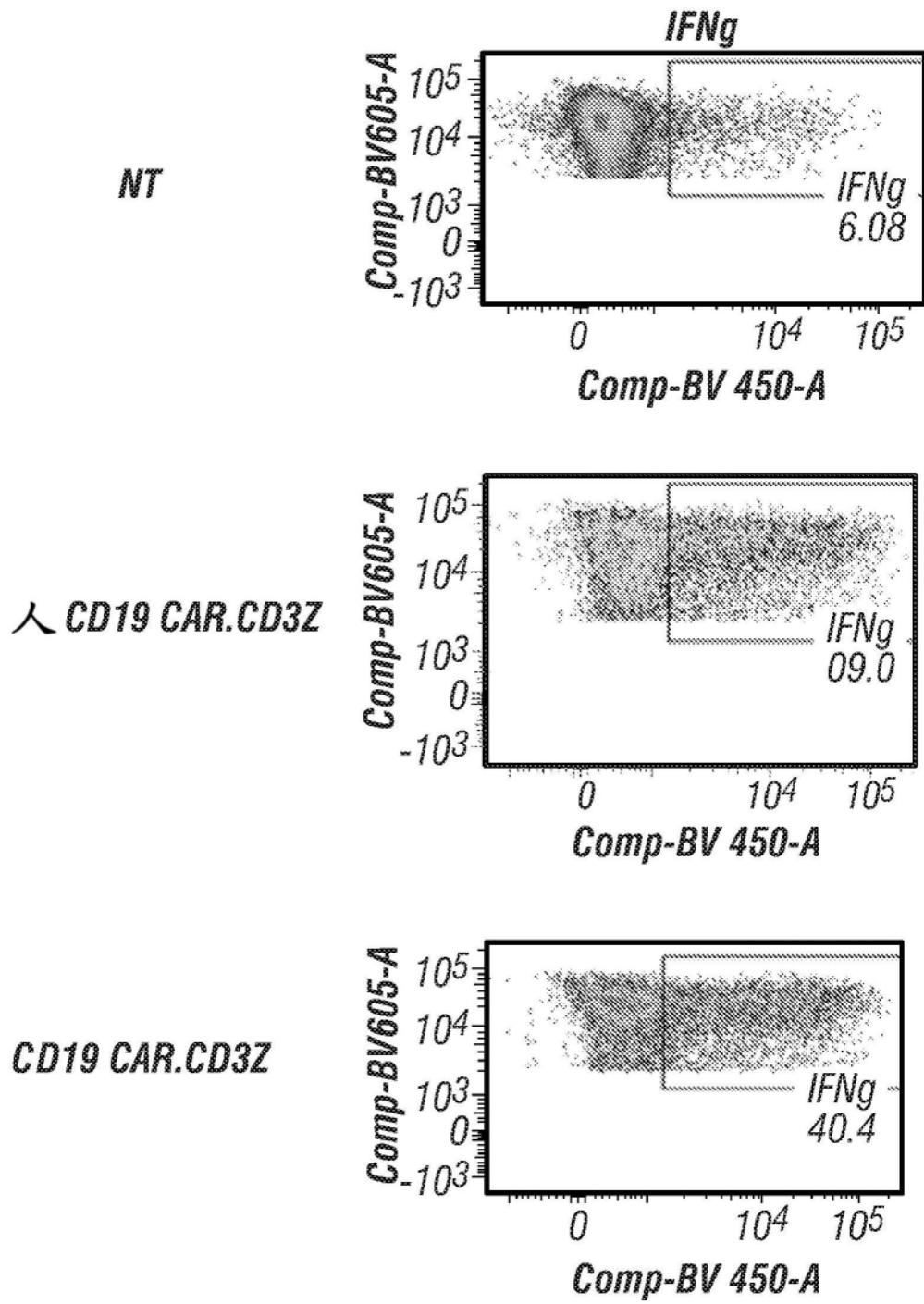


图11D续1

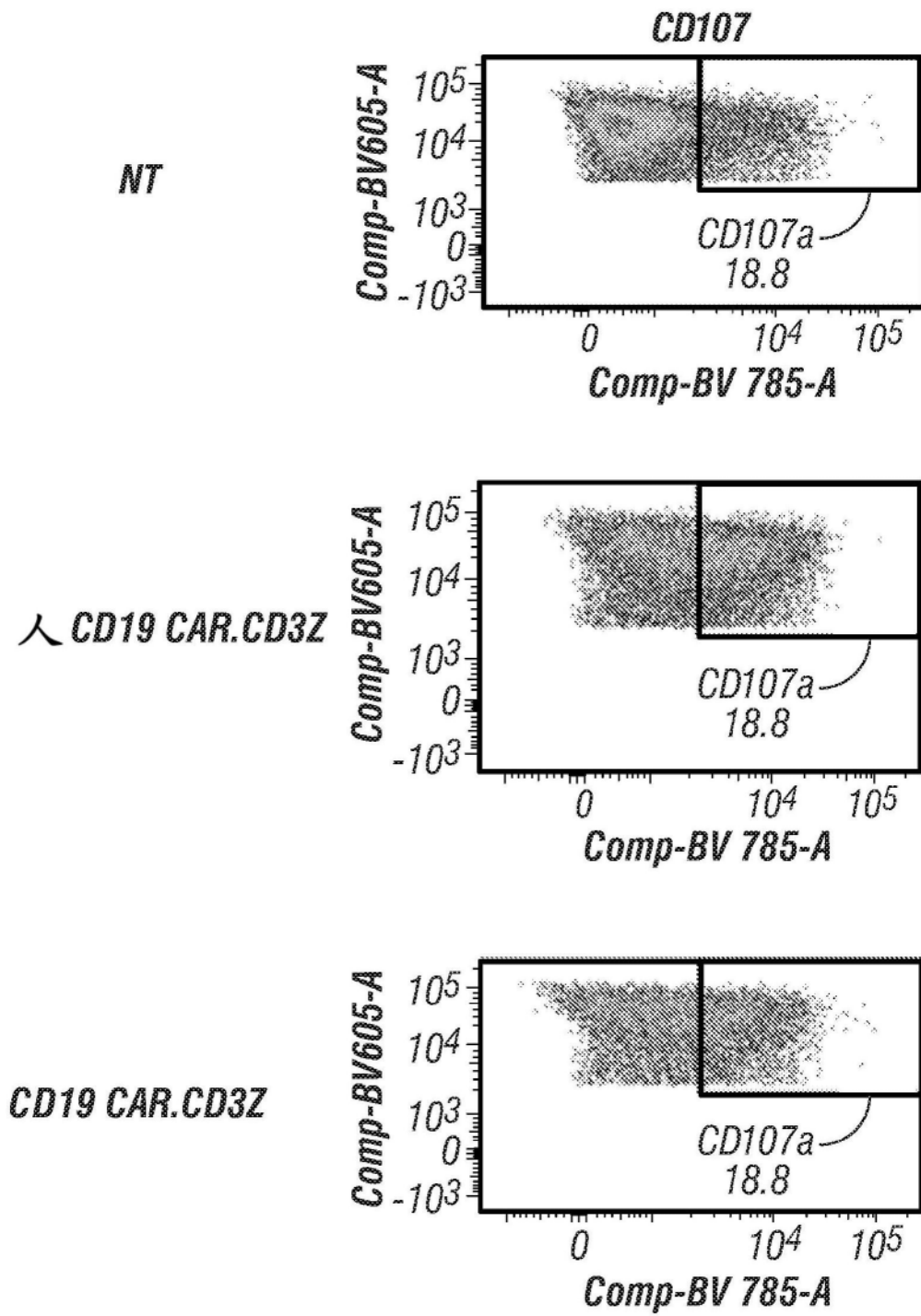


图11D续2

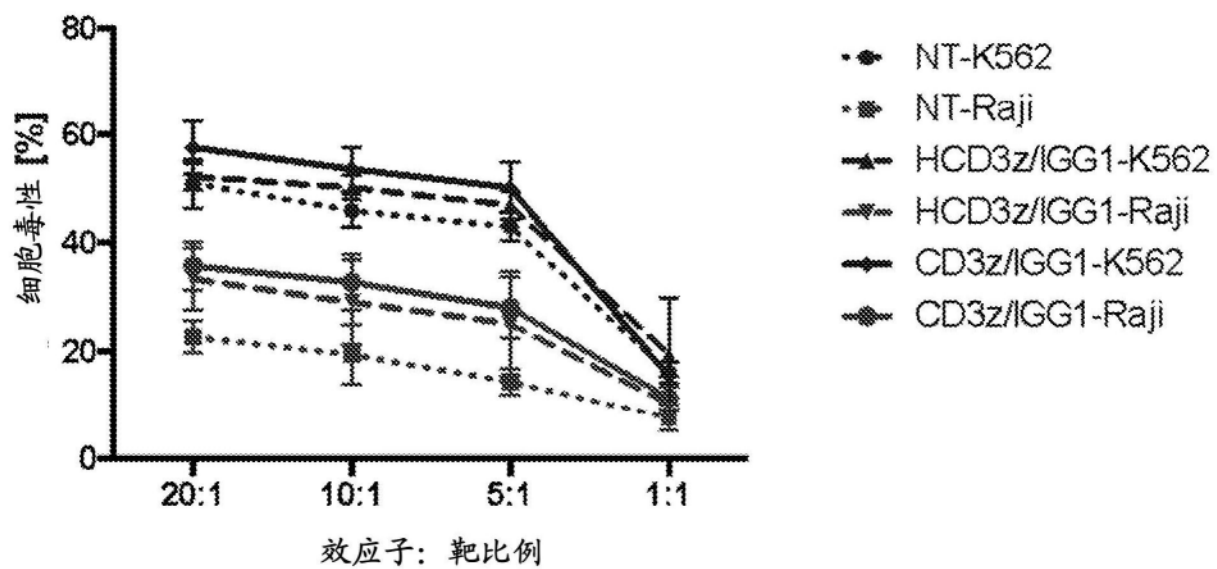


图11E

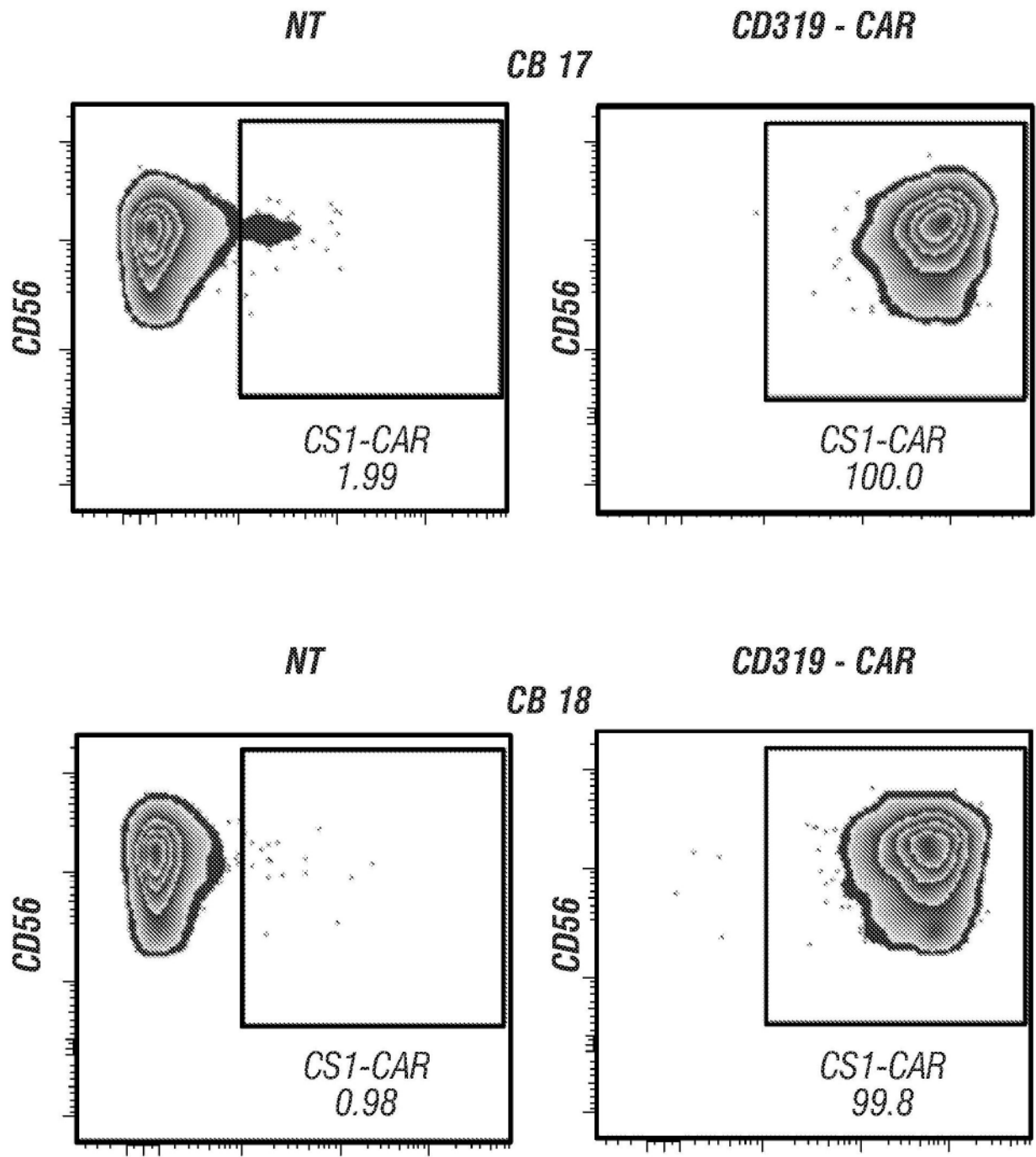


图12A

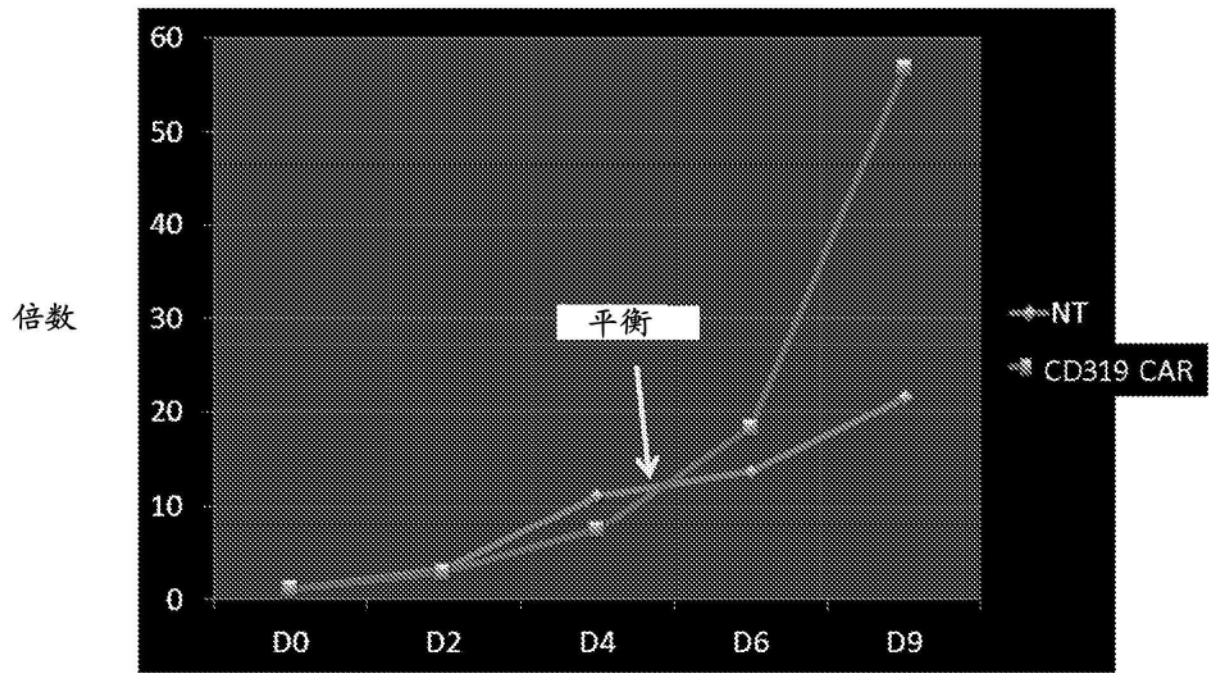


图12B

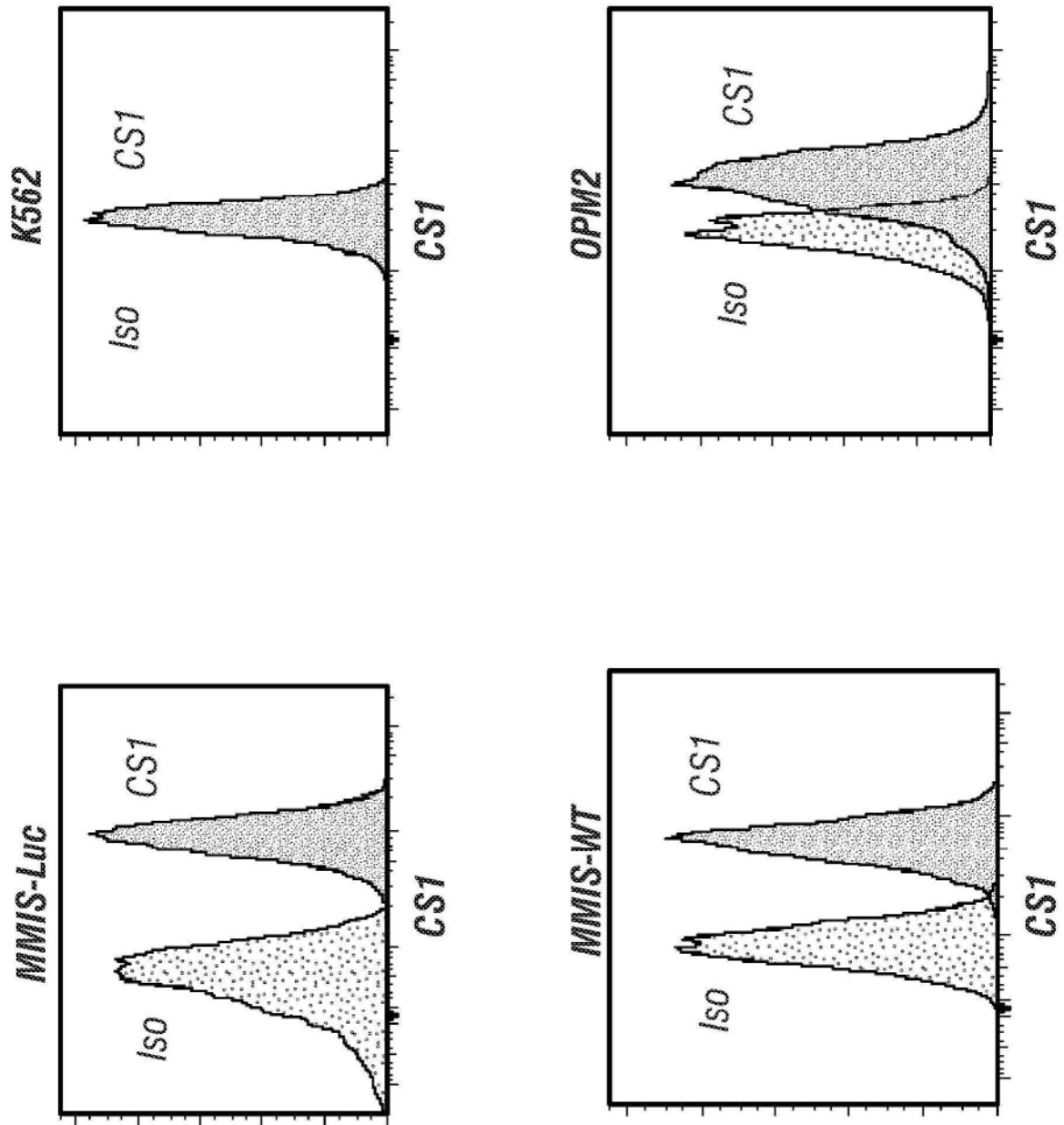


图12C

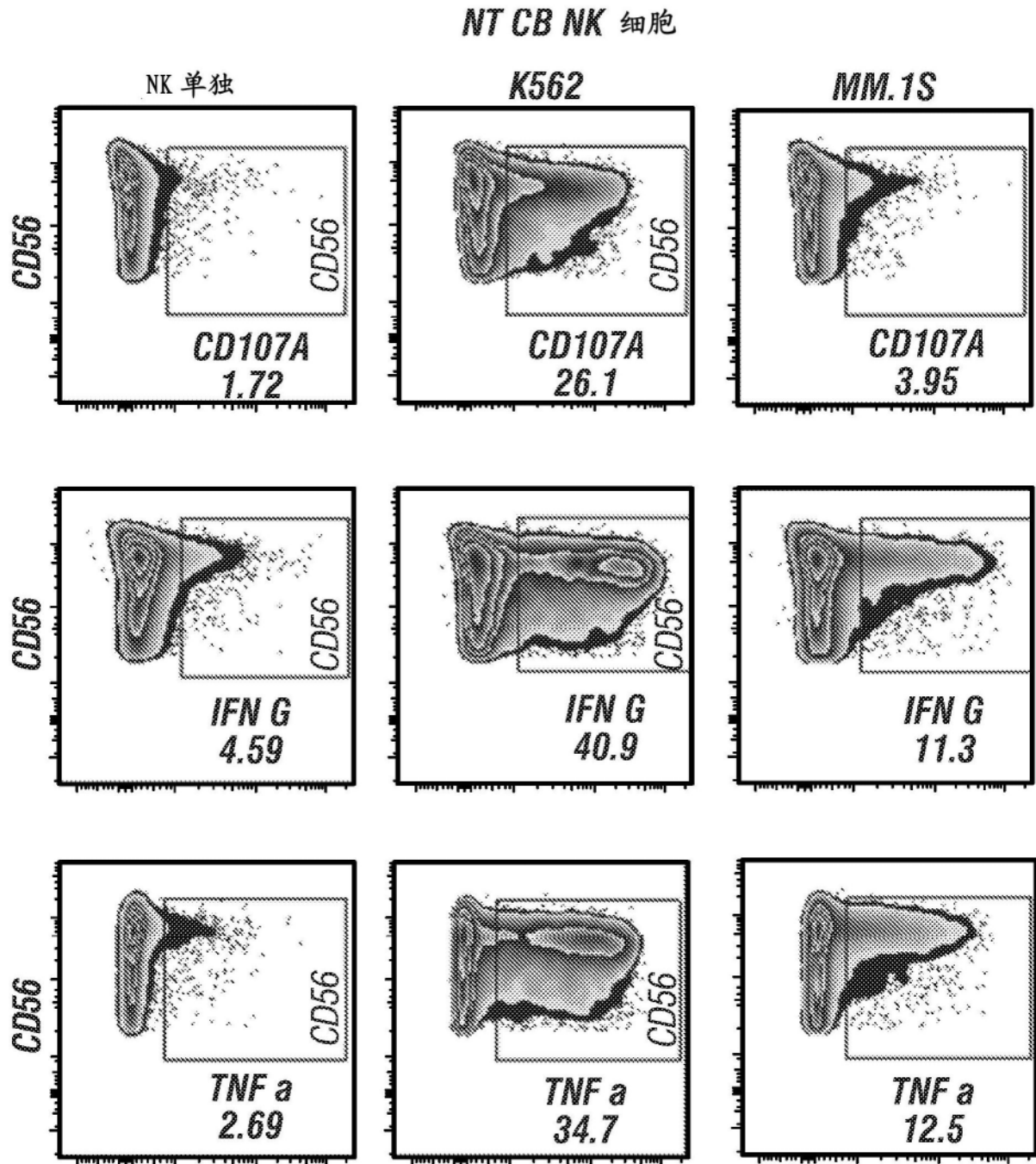


图12D

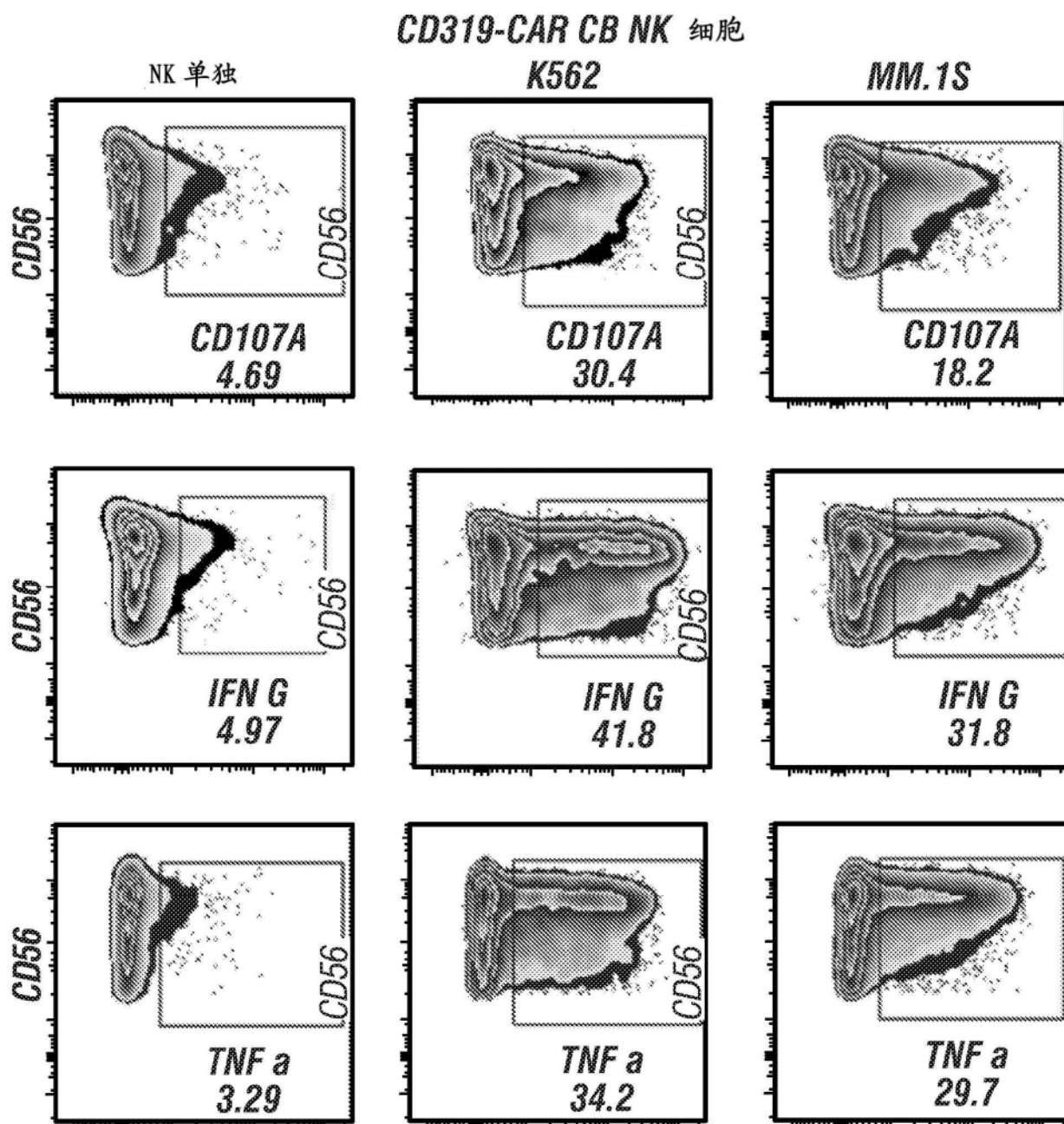


图12D续

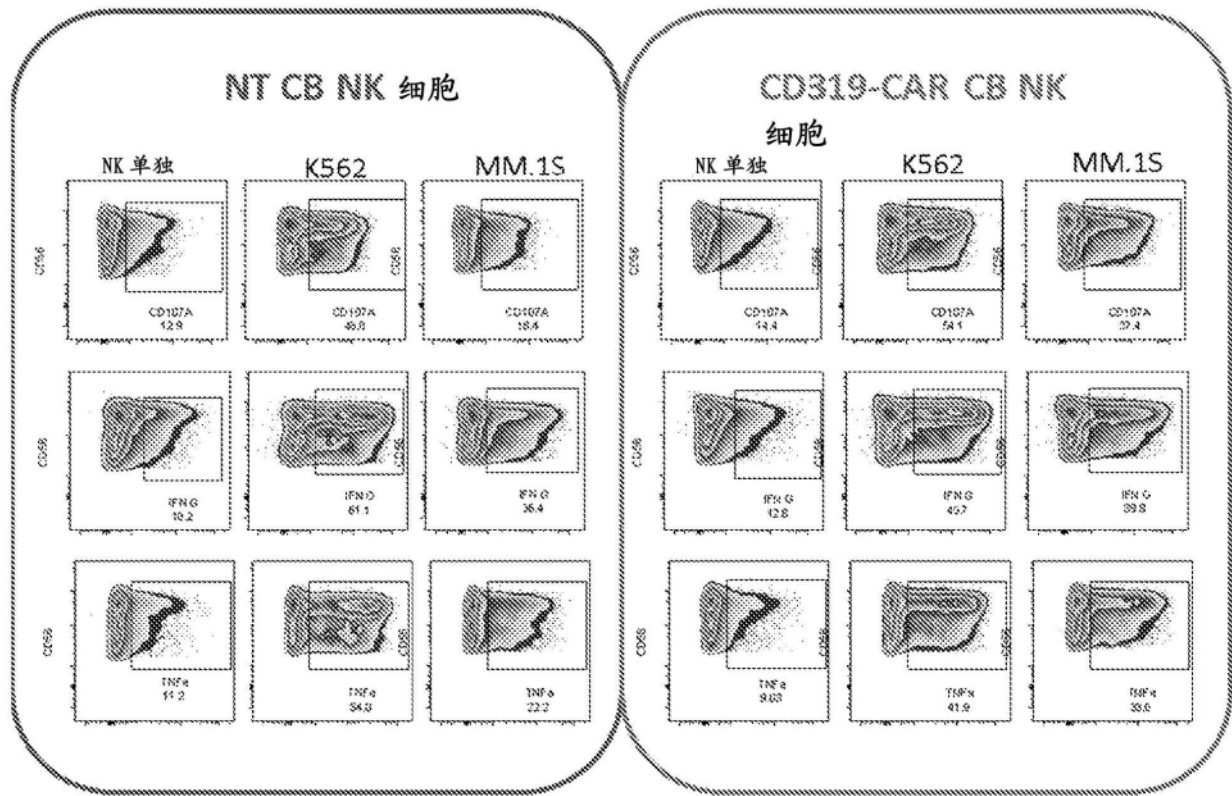


图12E

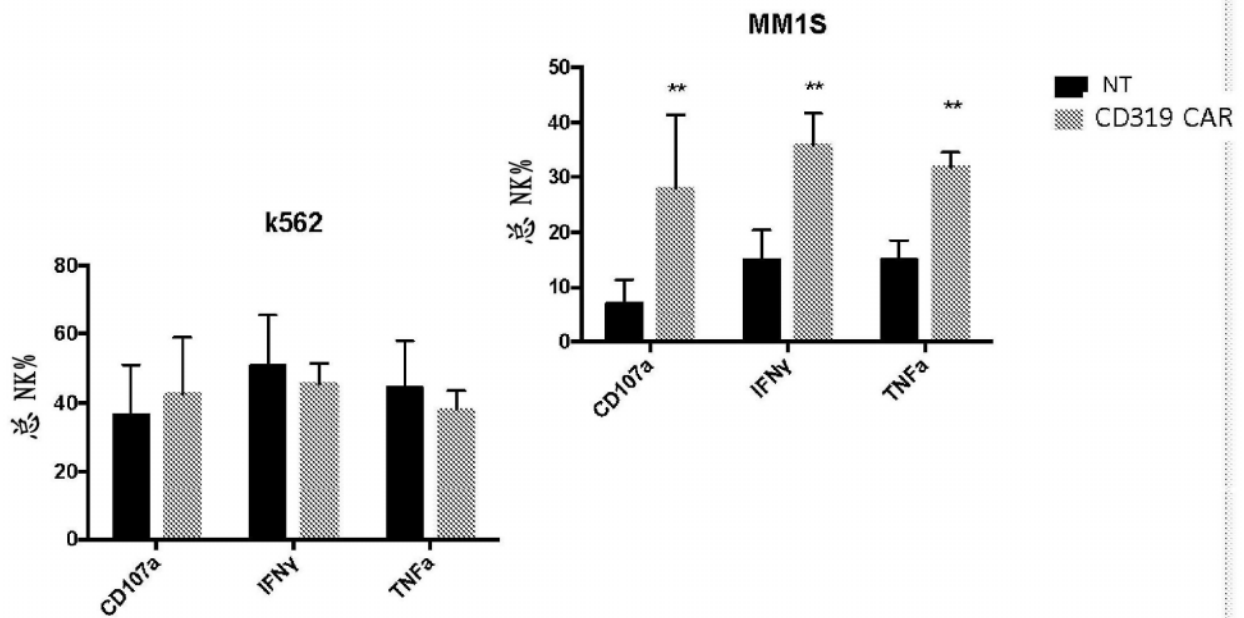


图12F

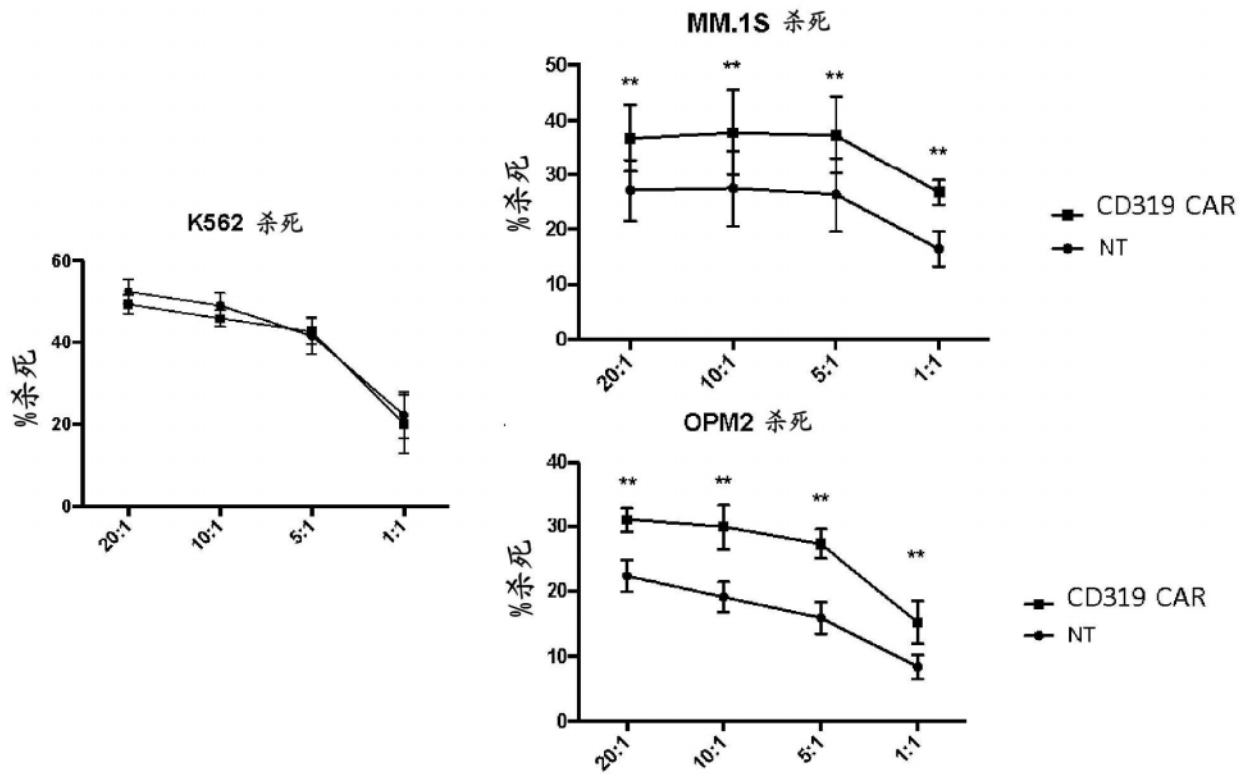


图12G

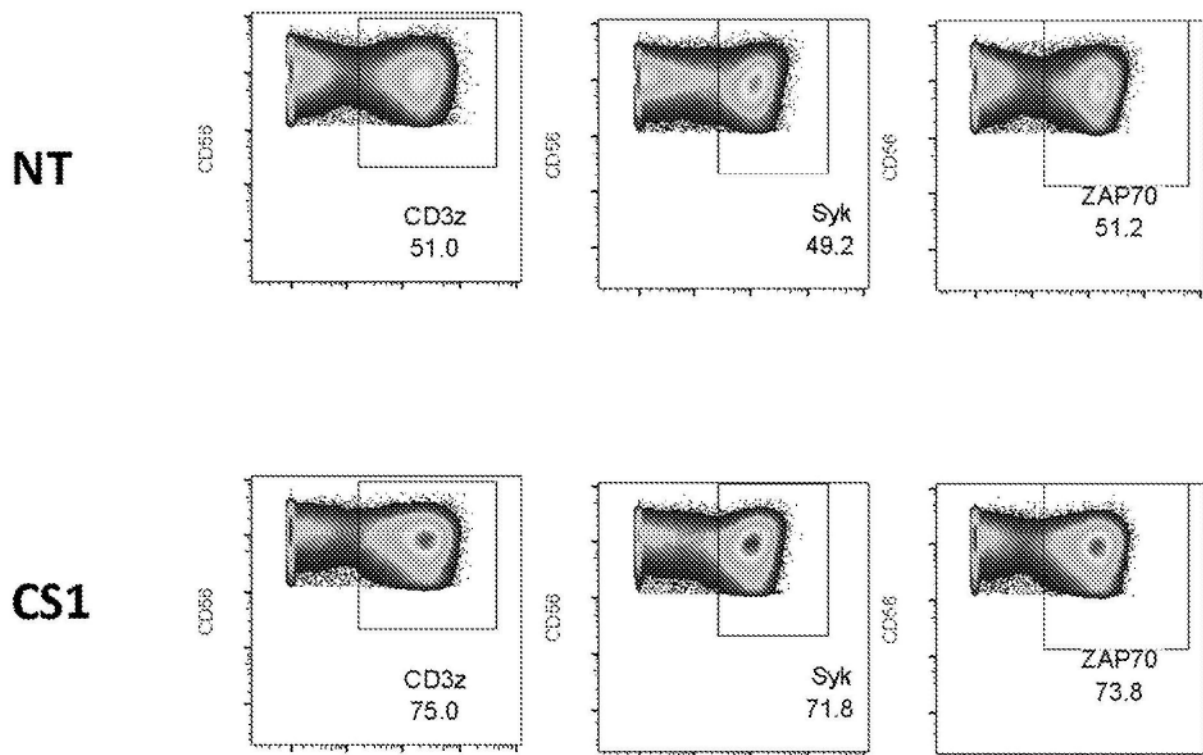


图12H

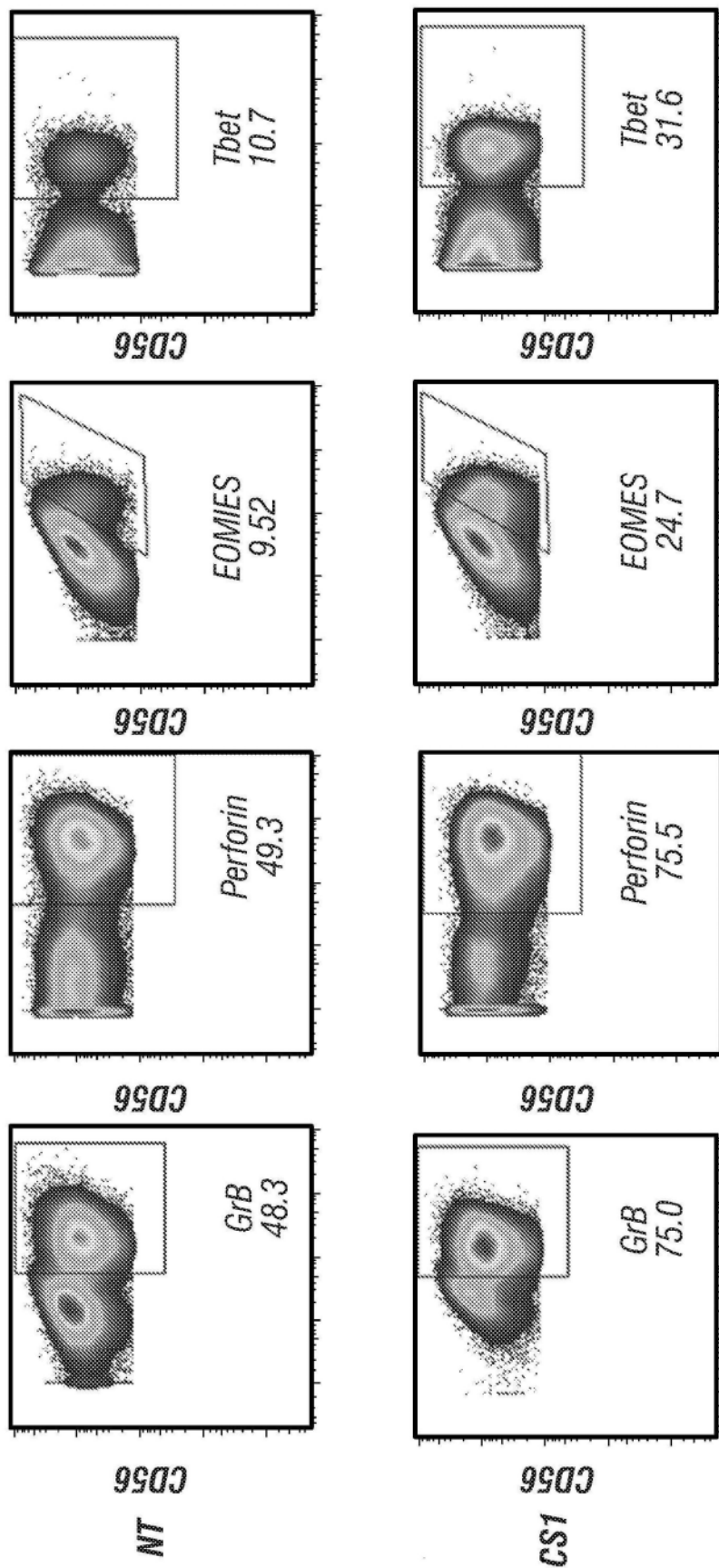


图12I