



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118146381 A

(43) 申请公布日 2024.06.07

(21) 申请号 202311602780.2 C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.16 C12N 15/13 (2006.01)

(66) 本国优先权数据 C12N 15/62 (2006.01)

PCT/CN2020/137164 2020.12.17 CN A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据
202180093966.2 2021.12.16

(71) 申请人 合肥梧桐生物科技有限公司
地址 230091 安徽省合肥市经开区宿松路
3963号智能科技园2期2号厂房1层西

(72) 发明人 贺玲 汪霖 王维

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 张奎燕

(51) Int. Cl.

C07K 16/40 (2006.01)

权利要求书3页 说明书102页
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

GUCY2C结合分子及其用途

(57) 摘要

提供了结合至GUCY2C的单结构域抗体,以及包含所述单结构域抗体的嵌合抗原受体。还提供了包含所述嵌合抗原受体的工程化免疫效应细胞(例如T细胞)。还提供了治疗疾病或病症的药物组合物、试剂盒和方法。

1. 一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),其包含:

- (i) 含氨基酸序列 X_1YGMX_2 的CDR1,其中 X_1 是A、I或V,并且 X_2 是D或G(SEQ ID NO:64);
- (ii) 含氨基酸序列 $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ 的CDR2,其中 X_3 是A、S或T; X_4 是F、W或Y; X_5 是S或T; X_6 是E、N或T; X_7 是A、S或T;并且 X_8 是K或Q(SEQ ID NO:65);以及
- (iii) 含氨基酸序列 $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ 的CDR3,其中 X_9 是A、E或P; X_{10} 是P或T; X_{11} 是S或T;并且 X_{12} 是G或V(SEQ ID NO:66)。

2. 如权利要求1所述的抗GUCY2C sdAb,其中所述CDR1包含选自SEQ ID NO:19至26组成的组的氨基酸序列;所述CDR2包含选自SEQ ID NO:27至34组成的组的氨基酸序列;并且所述CDR3包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗GUCY2C sdAb,其包含:

- (i) 含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;
- (ii) 含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;
- (iii) 含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;
- (iv) 含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;
- (v) 含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3;
- (vi) 含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;
- (vii) 含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3;或
- (viii) 含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。

4. 一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),其包含:

- (i) 分别具有如SEQ ID NO:3中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;
- (ii) 分别具有如SEQ ID NO:4中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;
- (iii) 分别具有如SEQ ID NO:5中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;
- (iv) 分别具有如SEQ ID NO:6中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;
- (v) 分别具有如SEQ ID NO:7中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;
- (vi) 分别具有如SEQ ID NO:8中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和

CDR3;

(vii) 分别具有如SEQ ID NO:9中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;或

(viii) 分别具有如SEQ ID NO:10中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

5. 如权利要求4所述的抗GUCY2C sdAb,其中所述CDR1、CDR2或CDR3是根据Kabat编号方案、IMGT编号方案、AbM编号方案、Chothia编号方案、Contact编号方案或其组合确定。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其还包含一个或多个如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中的任一者中所示的FR区。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中的任一者的氨基酸序列。

8. 如权利要求1至6中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其中抗GUCY2C sdAb包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中任一者的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9. 如权利要求1至5中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其中抗GUCY2C sdAb是骆驼科动物sdAb。

10. 如权利要求1至5中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其中抗GUCY2C sdAb是人源化sdAb。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的抗GUCY2C sdAb,其中所述抗GUCY2C sdAb与剂以基因方式融合或以化学方式缀合。

12. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:

(a) 细胞外抗原结合结构域,所述细胞外抗原结合结构域包含权利要求1至10中任一项所述的抗GUCY2C sdAb;

(b) 跨膜结构域;和

(c) 细胞内信号传导结构域。

13. 如权利要求12所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域还包含一个或多个另外的抗原结合结构域。

14. 如权利要求12或权利要求13所述的CAR,其中所述跨膜结构域来源于选自由以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。

15. 如权利要求14所述的CAR,其中所述跨膜结构域来源于CD8 α 。

16. 如权利要求12至15中任一项所述的CAR,其中所述细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。

17. 如权利要求16所述的CAR,其中所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。

18. 如权利要求16或权利要求17所述的CAR,其中所述细胞内信号传导结构域还包含共刺激信号传导结构域。

19. 如权利要求18所述的CAR,其中所述共刺激信号传导结构域来源于选自由以下组成

的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及其组合。

20. 如权利要求20所述的CAR,其中所述共刺激信号传导结构域来源于CD137。

21. 如权利要求12至20中任一项所述的CAR,其还包含位于所述细胞外抗原结合结构域的C端与所述跨膜结构域的N端之间的铰链结构域。

22. 如权利要求21所述的CAR,其中所述铰链结构域来源于CD8 α 。

23. 如权利要求12至22中任一项所述的CAR,其还包含位于多肽的N端处的信号肽。

24. 如权利要求23所述的CAR,其中所述信号肽来源于CD8 α 。

25. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含(i)选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55;或(ii)与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55中任一者的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

26. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求1至10中任一项所述的抗GUCY2C sdAb的核酸序列。

27. 如权利要求26所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:11至18的核酸序列。

28. 一种载体,其包含权利要求27所述的分离的核酸。

29. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求14至25中任一项所述的CAR的核酸序列。

30. 如权利要求29所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:56至63的核酸序列。

31. 一种载体,其包含权利要求30所述的分离的核酸。

32. 一种工程化免疫效应细胞,其包含权利要求14至25中任一项所述的CAR、权利要求29或权利要求30所述的分离的核酸,或权利要求31所述的载体。

33. 如权利要求32所述的工程化免疫效应细胞,其中所述免疫效应细胞是T细胞。

34. 一种药物组合物,其包含权利要求1至10中任一项所述的抗GUCY2C sdAb、权利要求32或权利要求33所述的工程化免疫效应细胞,或权利要求28或权利要求31所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

35. 一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求1至10中任一项所述的抗GUCY2C sdAb、权利要求32或权利要求33所述的工程化免疫效应细胞,或权利要求34所述的药物组合物。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述疾病或病症是GUCY2C相关疾病或病症。

37. 如权利要求35所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

38. 如权利要求36所述的方法,其中所述疾病或病症是结直肠癌。

39. 如权利要求36所述的方法,其中所述疾病或病症是胃癌。

40. 如权利要求36所述的方法,其中所述疾病或病症是食道癌。

GUCY2C结合分子及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为2021年12月16日提交的、发明名称为“GUCY2C结合分子及其用途”、申请号为202180093966.2的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求2020年12月17日提交的国际申请号PCT/CN2020/137164的优先权益，该申请以引用的方式整体并入本文中并用于所有目的。

[0004] 1. 领域

[0005] 本公开涉及抗GUCY2C单结构域抗体、嵌合抗原受体、工程化免疫效应细胞及其使用方法。本公开还涉及用于治疗用途的细胞的激活和扩增，尤其是基于嵌合抗原受体的T细胞免疫疗法。

背景技术

[0006] 结直肠癌是全球最常见的癌症类型之一，占有肿瘤病例的约10%和所有癌症死亡病例的8.5%。结直肠癌的发病逐渐趋于年轻化，并且40岁以下患者的数量占有结直肠癌患者的2%-8%。目前，结直肠癌的治疗以手术、放射疗法和化学疗法的组合为主。大多数早期患者经传统疗法治疗后预后良好，但对于转移的结直肠癌患者，预后较差，而且5年存活率很低。当前的治疗不能消除潜伏的残留肿瘤细胞，也不能抑制转移的生长。嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞疗法是一种新兴且有前途的癌症免疫疗法。

[0007] 促进肠道肿瘤产生的结肠上皮细胞的不平衡稳态是由鸟苷酸环化酶C(GUCY2C; GCC)配体缺乏引起的(Waldman, S.A.和M. Camilleri, Gut, 67(8):1543-1552(2018))。GUCY2C是N-连接糖蛋白的鸟苷酸环化酶受体家族的成员，并且是一种肠组织特异性多肽。它在位于小肠至直肠的肠粘膜中的上皮细胞中表达，但在正常的胃和食道组织中不表达。GUCY2C受体可通过环磷酸鸟嘌呤(cGMP)依赖性机制调控小肠粘膜上皮细胞的增殖和分化。经显示，GUCY2C在原发性结直肠癌细胞中稳定表达，并且GUCY2C在转移性结直肠癌细胞中的表达量是正常肠上皮细胞中的表达量的2-10倍(Carrithers等人, Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(25):14827-14832(1996))，使GUCY2C成为治疗结直肠癌的潜在靶标。本领域需要改良的GUCY2C结合分子和工程化的靶向GUCY2C的细胞，例如用于更有效或高效的CAR-T疗法。

发明内容

[0008] 一方面，本文提供一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb)，其包含：(i) 含氨基酸序列 X_1YGMX_2 的CDR1，其中 X_1 是A、I或V，并且 X_2 是D或G(SEQ ID NO:64)；(ii) 含氨基酸序列 $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ 的CDR2，其中 X_3 是A、S或T； X_4 是F、W或Y； X_5 是S或T； X_6 是E、N或T； X_7 是A、S或T；并且 X_8 是K或Q(SEQ ID NO:65)；以及(iii) 含氨基酸序列 $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ 的CDR3，其中 X_9 是A、E或P； X_{10} 是P或T； X_{11} 是S或T；并且 X_{12} 是G或V(SEQ ID NO:66)。

[0009] 在一些实施方案中，CDR1包含选自由SEQ ID NO:19至26组成的组的氨基酸序列；CDR2包含选自由SEQ ID NO:27至34组成的组的氨基酸序列；并且CDR3包含选自由SEQ ID

NO:35至42组成的组的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含:(i)含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;(ii)含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;(iii)含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;(iv)含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;(v)含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3;(vi)含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;(vii)含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3;或(viii)含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1;含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。

[0011] 在一些实施方案中,本文提供一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),其包含:(i)分别具有如SEQ ID NO:3中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(ii)分别具有如SEQ ID NO:4中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(iii)分别具有如SEQ ID NO:5中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(iv)分别具有如SEQ ID NO:6中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(v)分别具有如SEQ ID NO:7中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(vi)分别具有如SEQ ID NO:8中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;(vii)分别具有如SEQ ID NO:9中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;或(viii)分别具有如SEQ ID NO:10中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,CDR1、CDR2或CDR3是根据Kabat编号方案、IMGT编号方案、AbM编号方案、Chothia编号方案、Contact编号方案或其组合确定。

[0012] 在一些实施方案中,本文所提供的sdAb还包含一个或多个如SEQ ID NO:3至10中的任一者中所示的FR区。

[0013] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含SEQ ID NO:3至10中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含与SEQ ID NO:3至10中的任一者的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

[0014] 在一些实施方案中,抗GUCY2C sdAb是骆驼科动物sdAb。在其它实施方案中,抗GUCY2C sdAb是人源化sdAb。

[0015] 在一些实施方案中,抗GUCY2C sdAb与一种剂以基因方式融合或以化学方式缀合。

[0016] 在另一方面,本文提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)含本文所提供的抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。

[0017] 在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域还包含一个或多个另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于选自CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组的分子。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD8 α 。

[0018] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号

传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。

[0019] 在其它实施方案中,细胞内信号传导结构域还包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于选自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于CD137。

[0020] 在一些实施方案中,本文所提供的CAR还包含位于细胞外抗原结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域来源于CD8 α 。

[0021] 在一些实施方案中,本文所提供的CAR还包含位于多肽的N端的信号肽。在一些实施方案中,信号肽来源于CD8 α 。

[0022] 在一些实施方案中,本文提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:(i)选自由SEQ ID NO:48至55组成的组的氨基酸序列;或(ii)与SEQ ID NO:48至55中的任一序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0023] 另一方面,本文提供一种分离的核酸,该分离的核酸包含编码本文所提供的抗GUCY2C sdAb的核酸序列。在一些实施方案中,本文所提供的分离的核酸包含SEQ ID NO:11至18的核酸序列。

[0024] 在另一方面,本文提供一种包含分离的核酸的载体,该分离的核酸编码本文所提供的单结构域抗体。

[0025] 在另一方面,本文提供一种分离的核酸,该分离的核酸包含编码本文所提供的CAR的核酸序列。在一些实施方案中,本文所提供的分离的核酸包含SEQ ID NO:56至63的核酸序列。

[0026] 在又另一方面,本文提供一种包含分离的核酸的载体,该分离的核酸编码本文所提供的CAR。

[0027] 在又另一方面,本文提供一种工程化免疫效应细胞,该细胞包含本文所提供的CAR、分离的核酸或载体。在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。

[0028] 在又另一方面,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含本文所提供的抗GUCY2C sdAb、工程化免疫效应细胞或载体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0029] 在又另一方面,本文提供了一种治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所提供的抗GUCY2CsdAb、工程化免疫效应细胞或药物组合物。在一些实施方案中,疾病或病症是GUCY2C相关疾病或病症。在一些实施方案中,疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,疾病或病症是结直肠癌、胃癌或食道癌。

附图说明

[0030] 图1显示了噬菌体抗体文库群落的电泳图。第一泳道是DL2000DNA标记物,最后一个泳道是质粒pComb3XSS的阴性对照,并且1-23是单克隆噬菌体抗体库。选出23个单克隆,其中22个单克隆是阳性克隆,并且插入率是96%。

[0031] 图2显示了在抗体筛选过程中VHH克隆的OD450值。

[0032] 图3显示了本文所提供的示例性VHH结构域的比对。

[0033] 图4A显示了转化的载体pLVX-WT-G1的示意图。pLVX-Puro的CMV启动子被EF-1a启动子替代,并且在EF-1a启动子之后添加了CD8铰链、CD8跨膜结构域、4-1BB和CD3 ζ 。

[0034] 图4B显示了有关用抗羊驼IgG、VHH结构域二抗染色的CAR-T细胞的阳性率的流式细胞分析。

[0035] 图5显示了以2:1的效应物:靶细胞比率共培养24小时的被GFP转染的T84和各种抗GUCY2C CAR-T细胞的荧光照片。共培养的各种CAR-T细胞系有(A)克隆C08、(B)克隆C12、(C)克隆C13、(D)克隆C15、(E)克隆C21、(F)克隆C27、(G)克隆C30、(H)克隆C31、(I)T细胞、(J)仅T84细胞和(J)含细胞裂解剂的T84细胞。

[0036] 图6显示了直方图,示出各种抗GUCY2C CAR-T细胞的特异性细胞溶解活性。将CAR-T细胞和T细胞与T84细胞以2:1的效应物:靶细胞比率共培养。在共培养结束时,计算T84细胞的特异性细胞裂解百分比。

[0037] 图7A显示了在T84肿瘤NCG小鼠模型中抗GUCY2C CAR-T治疗后的肿瘤生长情况。通过皮下注射对免疫缺陷的NCG小鼠注射 5×10^6 个表达荧光素酶的T84结直肠癌细胞,并在第14天,通过尾静脉注射用 3×10^6 个T细胞或克隆C08 CAR-T细胞治疗。实线:注射的T细胞,虚线:注射的克隆C08 CAR-T细胞。图7B显示了在T84肿瘤NCG小鼠模型中抗GUCY2C CAR-T治疗后的肿瘤生长情况。通过皮下注射对免疫缺陷的NCG小鼠注射 5×10^6 个表达荧光素酶的T84结直肠癌细胞,并在第14天,通过尾静脉注射用 3×10^6 个T细胞、克隆C12 CAR-T细胞或克隆C13 CAR-T治疗。实线:注射的T细胞,点线:注射的克隆C12 CAR-T细胞,虚线:注射的克隆C13 CAR-T细胞。图7C显示了在T84肿瘤NCG小鼠模型中抗GUCY2C CAR-T治疗后的肿瘤生长情况。通过皮下注射对免疫缺陷的NCG小鼠注射 5×10^6 个表达荧光素酶的T84结直肠癌细胞,并在第14天,通过尾静脉注射用 3×10^6 个T细胞、克隆C15 CAR-T细胞或克隆C21 CAR-T治疗。实线:注射的T细胞,点线:注射的克隆C15 CAR-T细胞,虚线:注射的克隆C21 CAR-T细胞。

[0038] 5.详细描述

[0039] 本公开部分地基于结合GUCY2C的新型单结构域抗体(例如VHH结构域)、嵌合抗原受体或包含其的工程化细胞,及其改善的特性。

[0040] 5.1.定义

[0041] 本文描述或引用的技术和程序包括本领域技术人员使用常规方法基本上充分理解和/或通常使用的那些技术和程序,例如在以下参考文献中描述的广泛使用的方法: Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版, 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编, 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An编辑, 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar编辑, 2010); 以及 *Antibody Engineering* 第1卷和第2卷 (Kontermann和Dübel编辑, 第2版, 2010)。除非本文另外定义, 否则本说明书中使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解相同的含义。出于解释本说明书的目的, 以下关于术语的描述将适用, 并且只要合适, 以单数使用的术语也将包括复数, 反之亦然。如果对术语的任何描述与以引用的方式并入本文中的任何文件相矛盾, 则应以下文所陈述的术语的描述为准。

[0042] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用, 并以最广义使用, 并且具体涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、多克隆或单价抗体、多价抗体、由至少两个完整抗体形

成的多特异性抗体(例如双特异性抗体,只要它们表现出所希望的生物活性)、单链抗体和其片段(例如结构域抗体),如下文所描述。抗体可以是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和/或亲和力成熟抗体,以及来自其它物种,例如来自小鼠、兔、美洲驼等的抗体。术语“抗体”意图包括在免疫球蛋白多肽类别内的B细胞的多肽产物,它能够结合至特定分子抗原并由两对相同的多肽链构成,其中每一对具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),每条链的每个氨基末端部分包括约100至约130个或更多氨基酸的可变区,并且每条链的每个羧基末端部分包括恒定区。参见例如Antibody Engineering (Borrebaeck编辑,第2版,1995);和Kuby, Immunology (第3版,1997)。抗体还包括但不限于合成抗体;重组产生的抗体;单结构域抗体,包括来自骆驼科物种(例如美洲驼或羊驼)的单结构域抗体,或其人源化变体;胞内抗体;抗独特型(抗Id)抗体,以及上述任一者的功能片段(例如抗原结合片段),所述功能片段是指抗体重链或轻链多肽中保留作为片段所来源的抗体的一些或全部结合活性的一部分。功能片段(例如抗原结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。具体点说,本文所提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如抗原结合结构域或含有结合至抗原的抗原结合位点的分子(例如抗体的一个或多个CDR)。此类抗体片段可以见于例如Harlow和Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers编辑,1995); Huston等人,1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun和Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515;以及Day, Advanced Immunochemistry (第2版,1990)中。本文所提供的抗体可以属于任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。抗体可能既不是激动性的也不是拮抗性的。

[0043] “抗原”是抗体可以选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其它天然存在的或合成的化合物。在一些实施方案中,靶抗原是多肽。在某些实施方案中,抗原与细胞相关,例如存在于细胞上或细胞内。

[0044] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL与至少重链恒定区CH1、CH2和CH3的抗体。恒定区可以包括人恒定区或其氨基酸序列变体。在某些实施方案中,完整抗体具有一种或多种效应功能。

[0045] “单链Fv”,又缩写为“sFv”或“scFv”是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽还包含VH与VL结构域之间的多肽接头,该接头使得sFv能够形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述,参见Plückthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenburg和Moore编辑, Springer-Verlag, New York, 第269-315页(1994)。

[0046] 术语“仅重链抗体”或“HCAb”是指这样一种功能性抗体,该抗体包含重链,但缺少通常在4链抗体中发现的轻链。已知骆驼科动物(如骆驼、美洲驼或羊驼)会产生HCAb。

[0047] 如本文所使用,“单结构域抗体”或“sdAb”是指单个单体可变抗体结构域并且能够结合抗原(例如结合至GUCY2C的单结构域抗体)。单结构域抗体包括如本文所描述的VHH结构域。单结构域抗体的实例包括但不限于天然缺乏轻链的抗体,例如来自骆驼科物种(例如美洲驼)的抗体、源自常规4链抗体的单结构域抗体、工程化抗体和除源自抗体的结构域支

架外的单结构域支架。单结构域抗体可源自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、山羊、兔和牛。例如,单结构域抗体可源自骆驼科物种,例如骆驼、美洲驼、单峰骆驼、羊驼和原驼中产生的抗体,如本文所述。除骆驼科以外的其它物种也可能产生天然缺乏轻链的重链抗体;源自此类其它物种的VHH在本公开的范围。在一些实施方案中,本文所提供的单结构域抗体(例如VHH)具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。单结构域抗体可以与本文所述的另一个分子(例如剂)以基因方式融合或以化学方式缀合。单结构域抗体可以是较大结合分子的一部分(例如多特异性抗体或嵌合抗原受体)。

[0048] 术语“结合(binds)”或“结合(binding)”是指分子之间的相互作用,包括例如形成复合物。相互作用可以是例如非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可以包括通过共价或非共价键、相互作用或力保持在一起的两个或更多个分子的结合。抗体上的单一抗原结合位点与靶分子(例如抗原)的单一表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体或功能片段对该表位的亲和力。结合分子(例如抗体)与单价抗原($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)的解离速率(k_{off})与缔合速率(k_{on})的比率是解离常数 K_D ,它与亲和力呈反相关。 K_D 值越低,则抗体的亲和力越高。 K_D 值因抗体和抗原的不同复合物而异,并且取决于 k_{on} 和 k_{off} 。本文所提供的抗体的解离常数 K_D 可以使用本文所提供的任何方法或本领域技术人员众所周知的任何其它方法确定。在一个结合位点处的亲和力并不总是反映抗体和抗原之间相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇的复杂抗原(如多价抗原)与含有多个结合位点的抗体接触时,抗体与抗原在一个位点处的相互作用将增加在另一个位点处发生反应的可能性。多价抗体和抗原之间的这种多重相互作用的强度称为亲合力。

[0049] 关于本文所描述的结合分子的术语,如“结合至”、“特异性结合至”和类似术语在本文中也可互换使用并且指特异性结合至抗原的抗原结合结构域的结合分子,例如多肽。结合至或特异性结合至抗原的结合分子或抗原结合结构域可以例如通过免疫测定、Octet[®]、Biacore[®]或本领域技术人员已知的其它技术来鉴定。在一些实施方案中,经使用实验技术,例如放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)确定,当结合分子或抗原结合结构域以比结合任何交叉反应性抗原高的亲和力结合至抗原时,该结合分子或抗原结合结构域结合至或特异性结合至抗原。典型地,特异性或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且可能是背景的超过10倍。关于结合特异性的论述,参见例如Fundamental Immunology 332-36(Paul编辑,第2版,1989)。在某些实施方案中,例如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或RIA确定,结合分子或抗原结合结构域与“非靶标”蛋白的结合程度小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原结合的约10%。结合至抗原的结合分子或抗原结合结构域包括能够以足够的亲和力结合抗原的结合分子或抗原结合结构域,使得该结合分子可用作例如靶向抗原时的治疗剂和/或诊断剂。在某些实施方案中,结合至抗原的结合分子或抗原结合结构域具有小于或等于1 μ M、800nM、600nM、550nM、500nM、300nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域结合至抗原的表位,该表位在不同物种的抗原间是保守的。

[0050] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“嵌合”序列,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相

同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们表现出所希望的生物活性即可(参见美国专利号4,816,567;和Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-55)。嵌合序列可包括人源化序列。

[0051] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可以包含非人(例如骆驼科动物、鼠类、非人灵长类动物)抗体的“人源化”形式的部分,所述部分包括来自人免疫球蛋白(例如接受者抗体)的序列,其中天然CDR残基被来自非人类物种(例如供体抗体),例如骆驼科动物、小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的具有所需特异性、亲和力和能力的相应CDR的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白序列的一个或多个FR区残基被相应非人残基置换。此外,人源化抗体可包含在接受者抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。人源化抗体重链或轻链可包含至少一个或多个可变区的基本上全部,其中全部或基本上全部的CDR对应于非人免疫球蛋白的那些CDR,并且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。在某些实施方案中,人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白的Fc的至少一部分。关于进一步详情,参见Jones等人,Nature 321:522-25(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-29(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-96(1992);Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89(1992);美国专利号6,800,738、6,719,971、6,639,055、6,407,213和6,054,297。

[0052] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“完全人抗体”或“人抗体”的部分,其中这些术语在本文中可互换使用并且指包含人可变区和例如人恒定区的抗体。结合分子可包含单结构域抗体序列。在特定实施方案中,这些术语是指包含人来源的可变区和恒定区的抗体。在某些实施方案中,“完全人”抗体还可包括结合多肽并由核酸序列编码的抗体,所述核酸序列是人种系免疫球蛋白核酸序列的天然存在的体细胞变体。术语“完全人抗体”包括具有与Kabat等人所述的人种系免疫球蛋白序列对应的可变区和恒定区的抗体。(参见Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。“人抗体”是这样一种抗体,该抗体具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或是使用任何用于制备人抗体的技术产生。人抗体的这一定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术产生,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581(1991))和酵母展示文库(Chao等人,Nature Protocols 1:755-68(2006))。还可使用以下中所描述的方法制备人单克隆抗体:Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77(1985);Boerner等人,J.Immunol.147(1):86-95(1991);以及van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。可以通过将抗原施用给转基因动物来制备人抗体,该转基因动物已经被修饰成响应于抗原激发而产生此类抗体,但其内源基因座已失活,例如小鼠(参见例如Jakobovits,Curr.Opin.Biotechnol.6(5):561-66(1995);Brüggemann和Taussing,Curr.Opin.Biotechnol.8(4):455-58(1997);以及美国专利号6,075,181和6,150,584,关于XENOMOUSE™技术)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,另参见例如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:3557-62(2006)。

[0053] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“重组人抗体”的部分,其中该短语包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的人抗体,例如使用转染到宿主细胞中

的重组表达载体表达的抗体；从重组、组合人抗体文库中分离的抗体；从对于人免疫球蛋白基因为转基因和/或转染色体的动物（例如小鼠或牛）中分离的的抗体（参见例如Taylor, L.D.等人, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 (1992)）；或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体可具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区（参见Kabat, E.A.等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242）。然而,在某些实施方案中,此类重组人抗体经历体外诱变（或者,当使用针对人Ig序列的转基因动物时,经历体内体细胞诱变）并因此,重组抗体VH和VL区的氨基酸序列是这样一些序列,虽然这些序列来源于人种系VH和VL序列并与其相关,但在体内可能不天然存在于人抗体种系谱系中。

[0054] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“单克隆抗体”的一部分,其中如本文所使用,该术语是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,例如构成该群体的个别抗体除了可能天然存在的可能少量存在的突变或众所周知的翻译后修饰（例如氨基酸异构化或脱酰胺、甲硫氨酸氧化或天冬酰胺或谷氨酰胺脱酰胺）外均相同,每个单克隆抗体通常会识别抗原上的单个表位。在特定实施方案中,如本文所使用,“单克隆抗体”是由单个杂交瘤或其它细胞产生的抗体。术语“单克隆”不限于任何特定的用于制备抗体方法。例如,可用于本公开中的单克隆抗体可通过最先由Kohler等人, *Nature* 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法制备,或者可以在细菌或真核动物或植物细胞中使用重组DNA方法制备（参见例如美国专利号4,816,567）。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等人, *Nature* 352:624-28 (1991) 和Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-97 (1991) 中所描述的技术,从噬菌体抗体文库分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法是本领域众所周知的。参见例如 Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑,第5版,2002)。

[0055] 典型的4链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的异四聚体糖蛋白。在IgG的情况下,4链单元一般是约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而取决于H链同种型,两条H链通过一个或多个二硫键相互连接。每条H和L链还具有规律间隔的链内二硫桥。每条H链在N端都有一个可变结构域(VH),随后是 α 和 γ 链各自的三个恒定结构域(CH)以及 μ 和 ϵ 同种型的四个CH结构域。每条L链在N端都有一个可变结构域(VL),其另一端是一个恒定结构域(CL)。VL与VH对齐,并且CL与重链的第一个恒定结构域(CH1)对齐。特定氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH和VL的配对一起形成单个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和特性,参见例如 Basic and Clinical Immunology 71 (Stites等人编辑,第8版,1994); 和 Immunobiology (Janeway等人编辑,第5版,2001)。

[0056] 术语“Fab”或“Fab区”是指结合至抗原的抗体区。常规IgG通常包含两个Fab区,各自位于Y形IgG结构的两个臂中的一个上。各Fab区通常由重链和轻链各自的一个可变区和一个恒定区构成。更具体点说,Fab区中重链的可变区和恒定区是VH和CH1区,而Fab区中轻链的可变区和恒定区是VL和CL区。根据本公开,Fab区中的VH、CH1、VL和CL可以按各种方式布置以赋予抗原结合能力。例如,VH和CH1区可以在一个多肽上,而VL和CL区可以在不同多肽上,类似于常规IgG的Fab区。或者,VH、CH1、VL和CL区可以都在同一多肽上并以不同的次序取向,以下节将更详细地描述。

[0057] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V区”或“V结构域”是指抗体轻链或重链中一般位于轻链或重链氨基末端处的部分,所述部分在重链中的长度是约120至130个氨基酸,而在轻链中的长度是约100至110个氨基酸,并且被用于各特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中。重链的可变区可称为“VH”。轻链的可变区可称为“VL”。术语“可变”是指可变区某些区段的序列在各抗体间差异很大的事实。V区介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并未在可变区的110个氨基酸跨度中均匀分布。实际上,V区由通过各自约9-12个氨基酸长的可变性较大(例如极大可变性)的较短区域(称为“高变区”)隔开的具有约15-30个氨基酸的可变性较小(例如相对不变)的伸长(称为骨架区(FR))组成。重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR,它们主要呈 β 折叠构象,由三个高变区连接,形成连接 β 折叠结构的环,并且在一些情形中形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见例如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版,1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。不同抗体的可变区的序列差异很大。在特定实施方案中,可变区是人可变区。

[0058] 术语“根据Kabat的可变区残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变型是指以上Kabat等人中的抗体汇编中用于重链可变区或轻链可变区的编号系统。使用这一编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入的较少或额外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包括在残基52之后的单氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在残基82之后的三个插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可以通过比对抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列来确定给定抗体的残基的Kabat编号。Kabat编号系统一般在提到可变结构域中的残基时使用(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)(例如Kabat等人,同上)。“EU编号系统”或“EU索引”一般在提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如以上Kabat等人中报导的EU索引)。“Kabat中的EU索引”是指人IgG 1 EU抗体的残基编号。其它编号系统已通过例如AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon描述。

[0059] 当关于抗体使用时,术语“重链”是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120至130个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括恒定区。恒定区可以是五种不同类型(例如同种型)中的一种,基于重链恒定区的氨基酸序列,称为alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ϵ)、gamma(γ)和mu(μ)。不同的重链大小不同: α 、 δ 和 γ 含有大约450个氨基酸,而 μ 和 ϵ 含有大约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生五个众所周知的抗体类别(例如同种型),即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括IgG的四个亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0060] 当关于抗体使用时,术语“重链”是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100至约110个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括恒定区。轻链的大致长度是211至217个氨基酸。根据恒定结构域的氨基酸序列,存在两种不同的类型,称为kappa(κ)或lambda(λ)。

[0061] 如本文所使用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换使用。“CDR”是指在免疫球蛋白(Ig或抗体)VH β -折叠骨架的非骨架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,

或在抗体VL β -折叠骨架的非骨架区内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是散布在骨架区序列中的可变区序列。

[0062] CDR区是本领域技术人员众所周知的并且已经由众所周知的编号系统定义。例如,Kabat互补决定区(CDR)是基于序列可变性并且是最常用的(参见例如Kabat等人,同上)。而Chothia是指结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-17(1987))。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端取决于环的长度而在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入序列置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,该环在32处结束;如果只有35A存在,则该环在33处结束;如果35A和35B都存在,则该环在34处结束)。AbM高变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的权衡,并被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用(参见例如Antibody Engineering第2卷(Kontermann和Dübel编辑,第2版,2010))。“contact”高变区是基于对可获得的复杂晶体结构的分析。另一个被开发并广泛采用的通用编号系统是ImMunoGeneTics (IMGT) InformationSystem[®] (Lafranc等人, Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT是一个集成信息系统,专用于人和其它脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHC)。在本文中,CDR是对氨基酸序列和在轻链或重链内的位置提及。由于CDR在免疫球蛋白可变结构域结构中的“位置”在各物种间保守并且存在于称为环的结构中,故通过使用根据结构特征比对可变结构域序列的编号系统,将很容易鉴别CDR和骨架残基。这一信息可用于将来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基移植和替换到通常来自人抗体的接受骨架中。Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-70(2001)开发了一个额外的编号系统(AHon)。编号系统,包括例如Kabat编号和IMGT独特编号系统之间的对应关系,是本领域技术人员众所周知的(参见例如Kabat,同上;Chothia和Lesk,同上;Martin,同上;Lefranc等人,同上)。来自这些高变区或CDR中的每一者的残基在下表6中举例说明。

[0063] 表6. 根据各种编号系统的示例性CDR

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 或 L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 或 L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 或 L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (Kabat 编号)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Chothia 编号)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 或 H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 或 H95--H102	H93--H101	H105-H117

[0066] 给定CDR的边界可取决于用于标识的方案而变化。因此,除非另外说明,否则术语给定抗体或其区域,例如可变区的“CDR”和“互补决定区”,以及抗体或其区域的个别CDR(例如CDR-H1、CDR-H2),应被理解为涵盖由上文所描述的任何已知方案定义的互补决定区。在一些情况下,用于标识一个或多个特定CDR的方案是指定的,例如由IMGT、Kabat、Chothia或Contact方法定义的CDR。在其它情况下,给出了CDR的特定氨基酸序列。应当注意,CDR区也可以由各种编号系统的组合定义,例如Kabat和Chothia编号系统的组合,或Kabat和IMGT编号系统的组合。因此,“如特定VH或VHH中所示的CDR”之类术语包括由上述示例性CDR编号系统定义的任何CDR1,但不限于此。在给出了可变区(例如VHH、VH或VL)后,本领域技术人员应理解,在该区域内的CDR可以由不同的编号系统或其组合来定义。

[0067] 高变区可包含如下“延伸的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3);以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。

[0068] 术语“恒定区”或“恒定结构域”是指轻链和重链的羧基末端部分,它不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应功能,例如与Fc受体的相互作用。该术语是指相对于免疫球蛋白的其它部分(可变区)具有更为保守的氨基酸序列并且含有抗原结合位点的免疫球蛋白分子的一部分。恒定区可以含有重链的CH1、CH2和CH3区以及轻链的CL区。

[0069] 术语“骨架”或“FR”是指侧接CDR的那些可变区残基。FR残基存在于例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体(例如单结构域抗体)、双抗体、线性抗体和双特异性抗体中。FR残基是除高变区残基或CDR残基以外的可变结构域残基。

[0070] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区域,包括例如天然序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226位的氨基酸残基或从Pro230至其羧基端的链段。Fc区的C端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可例如在抗体的产生或纯化期间去除,或通过编码抗体的重链的核酸重组工程化来去除。因此,完整抗体的组成可包含去除了所有K447残基的抗体群、未去除K447残基的抗体群,以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群。“功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应功能”。示例性“效应功能”包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)下调等。此类效应功能一般需要Fc区与结合区或结合结构域(例如抗体可变区或结构域)组合,并且可以使用本领域技术人员已知的各种测定进行评估。“变体Fc区”包含因至少一个氨基酸修饰(例如取代、添加或缺失)而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。在某些实施方案中,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列Fc区中或在亲本多肽Fc区中的约一个至约十个氨基酸取代,或约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区可与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性,或与其具有至少约90%同源性,例如与其具有至少约95%同源性。

[0071] 如本文所使用,“表位”是本领域中的术语并且指结合分子(例如包含单结构域抗体序列的抗体)可以特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象表位、非线性表位或不连续表位。在多肽抗原的情况下,例如,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位)或表位可以包含来自多肽的两个或更多个非连续区域的氨基酸(“构象”表位、“非线性”表位或“不连续”表位)。本领域技术人员应理解,一般而言,线性表位可以取决于或不取

决于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方案中,结合分子结合至一组氨基酸,不管这些氨基酸是否折叠成天然三维蛋白质结构。在其它实施方案中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基展现特定构象(例如弯曲、扭转、转角或折叠)以便识别并结合表位。

[0072] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低它所结合的抗原的生物活性的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。

[0073] “激动剂”或激活抗体是增强或起始它所结合的抗原的信号传导的抗体。在一些实施方案中,激动剂抗体在不存在天然配体的情况下引起或激活信号传导。

[0074] 关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”或“同源性”被定义为在对齐序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后,并且在不将任何保守取代视为序列同一性的部分的情况下,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以通过本领域技能内的多种方式,例如使用公开可得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR) 软体实现比对以达到确定氨基酸序列同一性百分比的目的。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0075] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(例如CAR或sdAb)针对抗原的特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所使用,术语“多特异性”表示抗原结合蛋白(例如CAR或sdAb)具有两个或更多个抗原结合位点,其中至少两个结合不同的抗原。如本文所使用,“双特异性”表示抗原结合蛋白(例如aCAR或sdAb)具有两种不同的抗原结合特异性。如本文所使用,术语“单特异性”CAR表示具有一个或多个结合位点并且每个结合位点结合相同抗原的抗原结合蛋白(例如CAR或sdAb)。

[0076] 如本文所使用,术语“价”表示抗原结合蛋白(例如CAR或sdAb)中存在指定数目的结合位点。例如,天然抗体或全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。因此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示抗原结合蛋白(例如CAR或sdAb)中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0077] 如本文所使用,“嵌合抗原受体”或“CAR”是指基因工程化受体,这些受体可用于将一种或多种抗原特异性移植到免疫效应细胞,例如T细胞上。一些CAR又被称为“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”或“嵌合免疫受体”。在一些实施方案中,CAR包含T细胞和/或其它受体的对一种或多种抗原(例如肿瘤抗原)具有特异性的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。“CAR-T细胞”是指表达CAR的T细胞。

[0078] 术语“多肽”和“肽”以及“蛋白质”可在本文中互换使用,并且指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性或分支的,它可以包含经过修饰的氨基酸,并且它可以散布有非氨基酸。这些术语还涵盖经历天然修饰或通过介入进行修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物的多肽,包括但不限于非天然氨基酸,以及本领域已知的其它修饰。应当理解,因为本公开的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其它成员,所以在某些实施方案中,“多肽”可以作为单链或作为两条或多条缔合的链出现。

[0079] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,意思指任何长度的核苷酸聚合物并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基,和/或其类似物,或是可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核

苷酸可包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸及其类似物。如本文所使用,“寡核苷酸”是指短的、一般是单链的合成多核苷酸,其长度一般是但未必小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不相互排斥。以上关于多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。产生本公开的结合分子的细胞可以包括亲本杂交瘤细胞,以及引入了编码抗体的核酸的细菌和真核宿主细胞。除非另有说明,否则本文所公开的任何单链多核苷酸序列的左手端是5'端;双链多核苷酸序列的左手方向称为5'方向。新生RNA转录物的5'到3'添加方向称为转录方向;DNA链上具有与RNA转录物相同的序列并且位于RNA转录物5'端的5'的序列区域被称为“上游序列”;DNA链上具有与RNA转录物相同的序列并且位于RNA转录物3'端的3'的序列区域称为“下游序列”。

[0080] “分离的核酸”是基本上与天然地伴随天然序列的其它基因组DNA序列以及蛋白质或复合物(如核糖体和聚合酶)分开的核酸,例如RNA、DNA或混合核酸。“分离的”核酸分子是与存在于该核酸分子的天然来源中的其它核酸分子分开的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,例如cDNA分子,当通过重组技术产生时可以基本上不含其它细胞材料或培养基,或者当化学合成时可基本上不含化学前体或其它化学品。在一个特定实施方案中,一个或多个编码单结构域抗体或本文所述抗体的核酸分子是分离或纯化的。所述术语包含从其天然存在的环境中移出的核酸序列,并且包括重组或克隆的DNA分离物以及化学合成的类似物或由异源系统生物合成的类似物。基本上纯的分子可以包括该分子的分离形式。具体而言,编码本文所述的CAR或sdAb的“分离的”核酸分子是被鉴别并与至少一种污染物核酸分子分开的核酸分子,该污染物核酸分子在其生产环境中通常与之缔合。

[0081] 术语“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所需的DNA序列。适合例如原核生物的控制序列包括启动子、任选存在的操纵子序列及核糖体结合位点。已知真核细胞可利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0082] 如本文所使用,术语“操作性连接”和类似短语(例如基因融合)在关于核酸或氨基酸使用时,分别是指核酸序列或氨基酸序列的操作性连接,彼此呈功能关系。例如,操作性连接的启动子、增强子元件、开放阅读框、5'和3' UTR以及终止子序列引起核酸分子(例如RNA)的准确产生。在一些实施方案中,操作性连接的核酸元件引起开放阅读框的转录并最终产生多肽(即,开放阅读框的表达)。作为另一个例子,操作性连接的肽是其中使功能结构域彼此以适当距离放置以赋予每个结构域预期功能的肽。

[0083] 术语“载体”是指用于运载或包括核酸序列以将该核酸序列引入宿主细胞中的物质,所述核酸序列包括例如编码如本文所述的结合分子(例如抗体)的核酸序列。适用的载体包括例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,它们可以包括用于稳定整合到宿主细胞染色体中的选择序列或标记物。另外,载体可以包括一种或多种选择性标记物基因和适当的表达控制序列。可以包括的选择性标记物基因例如提供对抗生素或毒素的抗性、补充营养缺陷或供应培养基中没有的关键养分。表达控制序列可以包括本领域众所周知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当要共表达两个或更多个核酸分子(例如抗体重链和轻链或抗体VH和VL)时,两个核酸分子可以被插入例如单个表达载体中或独立表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以操作性连接至一个共同的表达控制序列或连接至不同的表达控制序列,例如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以使用本领域众所周知的方法确认核酸分子引入宿主细胞中。此类方法包括例如核

酸分析,例如RNA印迹或mRNA的聚合酶链反应(PCR)扩增、用于基因产物表达的免疫印迹,或其它适合的测试引入的核酸序列或其相应基因产物的表达的分析方法。本领域技术人员应理解,核酸分子以足以产生所需产物的量表达,并且还应理解,可以使用本领域中众所周知的方法优化表达水平以获得充分表达。

[0084] 如本文所使用,术语“宿主”是指动物,例如哺乳动物(例如人)。

[0085] 如本文所使用,术语“宿主细胞”是指可以用核酸分子转染的特定受试者细胞和此类细胞的后代或潜在后代。由于在后续数代中可能发生的突变或环境影响或者核酸分子整合到宿主细胞基因组中,此类细胞的后代可能与用核酸分子转染的亲本细胞不同。

[0086] 如本文所使用,术语“自体”意图指作为任何材料的来源的个体与稍后重新引入该材料的个体是同一名称个体。

[0087] “同种异体”是指移植物来源于同一物种的不同个体。

[0088] 如本文所使用,术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代受试者细胞及其后代。

[0089] 如本文所使用,术语“药学上可接受的”意思指被联邦监管机构或州政府批准或者在美国药典、欧洲药典或其它通常认可的药典上列出可用于动物并且更具体地说用于人。

[0090] “赋形剂”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或囊封材料。赋形剂包括例如囊封材料或添加剂,例如吸收促进剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载体、包衣剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、保湿剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、杀菌剂、甜味剂、增溶剂、润湿剂及其混合物。术语“赋形剂”也可以指稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全或不完全)或媒介物。

[0091] 在一些实施方案中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;和/或非离子性表面活性剂,如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。药学上可接受的赋形剂的其它实例描述于Remington和Gennaro, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (第18版,1990)中。

[0092] 在一个实施方案中,每种组分在与药物配制物的其它成分相容的意义上是“药学上可接受的”,并且适合与人和动物的组织或器官接触使用而没有过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或者其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。参见例如Lippincott Williams和Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 第6版; Rowe等人编辑; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; *Handbook of Pharmaceutical Additives*, 第3版; Ash和Ash编辑; Gower Publishing Company: 2007; *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*, 第2版; Gibson编辑; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是pH缓冲水溶液。

[0093] 在一些实施方案中,赋形剂是无菌液体,如水和油,包括石油、动物来源的油、植物来源的油或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如药物组合物)时,水是示例性赋形剂。也可采用盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂,尤其是对于可注射溶液而言。赋形剂还可以包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。必要时,组合物还可以含有微量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可以呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释配制物等形式。口服组合物,包括配制物在内,可包括标准赋形剂,如医药级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁等。

[0094] 组合物,包括药物化合物在内,可以含有例如呈分离或纯化形式的结合分子(例如抗体)以及适量的赋形剂。

[0095] 如本文所使用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以产生所希望结果的单结构域抗体或包含剂的治疗分子和本文所提供的单结构域抗体或药物组合物的量。

[0096] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。如本文所使用,在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如非灵长类动物或灵长类动物(例如人)。在特定实施方案中,受试者是人。在一个实施方案中,受试者是被诊断患有疾病或病症的哺乳动物,例如人。在另一实施方案中,受试者是有发展疾病或病症的风险哺乳动物,例如人。

[0097] “施用(Administer)”或“施用(administration)”是指将存在于体外的物质注射或以其它方式物理地递送到患者体内的行为,如通过粘膜、皮内、静脉内、肌肉内递送和/或本文所述或本领域已知的任何其它物理递送方法递送。

[0098] 如本文所使用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指由施用一种或多种疗法引起的疾病或疾患的进展、严重程度和/或持续时间的减少或改善。治疗可以通过评估是否存在与潜在病症相关的一种或多种症状的减少、减轻和/或缓和使得观察到患者的改善来确定,不过,患者可能仍然受到潜在病症的折磨。术语“治疗”包括管理和改善疾病。术语“管理(manage)”、“管理(managing)”和“管理(management)”是指受试者从疗法中获得的有益作用,该疗法不一定引起疾病的治愈。

[0099] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”是指降低疾病、病症、疾患或相关症状(例如糖尿病或癌症)发作(或复发)的可能性。

[0100] 如本文所使用,“延迟”癌症的发展是指推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定和/或延期疾病的发展。取决于病史和/或所治疗的个体,这种延迟可以有不同的时间长度。正如本领域技术人员显而易见的,足够或显著的延迟实际上可以包括预防,因为个体不会发展疾病。“延迟”癌症发展的方法是当与不使用所述方法相比较时在给定时间范围内降低疾病发展的可能性和/或在给定时间范围内减小疾病程度的方法。这种比较典型地基于使用统计上显著数量的个体进行的临床研究。癌症的发展可以使用标准方法检测,包括但不限于计算机轴向断层扫描(CAT扫描)、磁共振成像(MRI)、腹部超声、凝血测试、动脉造影或活组织检查。发展还可以指最初可能无法检测到的癌症进展,包括发生、复发和发作。

[0101] 如本文所使用,“GUCY2C相关疾病或病症”是指包含表达GUCY2C的细胞或组织的疾病或病症。在一些实施方案中,GUCY2C相关疾病或病症包含异常表达GUCY2C的细胞。在其它实施方案中,GUCY2C相关疾病或病症包含其中或其上缺乏GUCY2C的细胞。

[0102] 术语“约”和“大约”是指在给定值或范围的20%以内、15%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内或更小。

[0103] 除非上下文另外明确规定,否则如在本公开和权利要求书中所使用,单数形式“一个(种)”和“所述”包括复数个(种)提及物。

[0104] 应理解,每当本文中用术语“包含”来描述实施方案时,还提供以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似实施方案。还应理解,每当本文中用短语“基本上由……组成”来描述实施方案时,还提供以“由……组成”描述的其它类似实施方案。

[0105] 在如“A与B之间”或“A-B之间”之类短语中使用的术语“之间”是指包括A和B两者的范围。

[0106] 本文在如“A和/或B”之类短语中使用的术语“和/或”意图包括A和B两者;A或B;A(单独);和B(单独)。同样,在如“A、B和/或C”之类短语中使用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0107] 5.2. 单结构域抗体

[0108] 5.2.1. 与GUCY2C结合的单结构域抗体

[0109] 一方面,本文提供了能够结合GUCY2C的单结构域抗体(例如VHH结构域)。

[0110] 在一些实施方案中,本文所提供的单结构域抗体(例如VHH结构域)结合至人GUCY2C。在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体调节一种或多种GUCY2C活性。在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体是拮抗剂抗体。

[0111] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体以 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)结合至GUCY2C(例如人GUCY2C)。本领域已知多种测量结合亲和力的方法,其中任何一种都可以用于本公开的目的,所述方法包括通过例如用所关注抗体的Fab形式及其抗原进行的RIA(Chen等人,1999,J.Mol Biol 293:865-81);通过生物层干涉测量法(BLI)或表面等离子共振(SPR)测定;通过使用例如Octet®Red96系统的Octet®;或通过使用例如Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000的Biacore®。“缔合速率(on-rate)”或“缔合速率(rate of association)”或“缔合速率(association rate)”或“kon”也可以使用上述相同的生物层干涉测量法(BLI)或表面等离子共振(SPR)技术,使用例如Octet®Red96、Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000系统来确定。

[0112] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体是VHH结构域。本文所提供的示例性VHH结构域如下文第6节中所述产生,并且这些VHH结构域被称为C8、C12、C13、C15、C21、C27、C30和C31,又如下表7所示。

[0113] 因此,在一些实施方案中,本文所提供的单结构域抗体包含C8、C12、C13、C15、C21、C27、C30和/或C31中任一者的一个或多个CDR序列。在一些实施方案中,本文提供结合至GUCY2C的单结构域抗体,其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中CDR序列选自C8、C12、C13、C15、C21、C27、C30和/或C31中的那些。

[0114] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含含有氨基酸序列 X_1YGMX_2 的CDR1,其中 X_1 是A、I或V,并且 X_2 是D或G(SEQ ID NO:64)。在一些实施方案中,本文提供的抗

GUCY2CsdAb包含含有氨基酸序列 $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ 的CDR2,其中 X_3 是A、S或T; X_4 是F、W或Y; X_5 是S或T; X_6 是E、N或T; X_7 是A、S或T;并且 X_8 是K或Q(SEQ ID NO:65)。在其它实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含含有氨基酸序列 $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ 的CDR3,其中 X_9 是A、E或P; X_{10} 是P或T; X_{11} 是S或T;并且 X_{12} 是G或V(SEQ ID NO:66)。

[0115] 在一些实施方案中,本文所提供的抗GUCY2C sdAb包含:含有氨基酸序列 X_1YGMX_2 的CDR1,其中 X_1 是A、I或V,并且 X_2 是D或G(SEQ ID NO:64);含有氨基酸序列 $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ 的CDR2,其中 X_3 是A、S或T; X_4 是F、W或Y; X_5 是S或T; X_6 是E、N或T; X_7 是A、S或T;并且 X_8 是K或Q(SEQ ID NO:65);以及含有氨基酸序列 $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ 的CDR3,其中 X_9 是A、E或P; X_{10} 是P或T; X_{11} 是S或T;并且 X_{12} 是G或V(SEQ ID NO:66)。

[0116] 表7. 示例性单结构域抗体

克隆 ID	VHH 结构域 (aa)	CDR1	CDR2	CDR3	
[0117]	C8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
	C12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 36
	C13	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 37
[0118]	C15	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 38
	C21	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39
	C27	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 40
	C30	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 41
	C31	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 42

[0119] 在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的一个、两个或全部三个CDR。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0120] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示

CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:3中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0121] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:4中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0122] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:5中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0123] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR2的氨基酸序

列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:6中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0124] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:7中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0125] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:8中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同

骨架。

[0126] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:9中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0127] 在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR1的氨基酸序列的CDR1。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含具有如SEQ ID NO:10中所示CDR2的氨基酸序列的CDR2。在其它实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR3的氨基酸序列的CDR3(例如SEQ ID NO:3或6)。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR1和CDR2的氨基酸序列的CDR1和CDR2。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR1和CDR3的氨基酸序列的CDR1和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR2和CDR3。在一些实施方案中,单结构域抗体具有含如SEQ ID NO:10中所示CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。CDR序列可以根据众所周知的编号系统确定。在一些实施方案中,CDR根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR根据Contact编号。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0128] 在一些实施方案中,本文提供了一种结合至GUCY2C的单结构域抗体,该抗体包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中(i) CDR1包含SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26的氨基酸序列;(ii) CDR2包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34的氨基酸序列;和/或(iii) CDR3包含SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0129] 在其它实施方案中,本文提供了一种结合至GUCY2C的单结构域抗体,该抗体包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中(i)CDR1包含与SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;(ii)CDR2包含与SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和/或(iii)CDR3包含与SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0130] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0131] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0132] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0133] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0134] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0135] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0136] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0137] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体(sdAb),该sdAb包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1;含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是骆驼科动物的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗GUCY2C单结构域抗体包含接受人骨架,例如人免疫球蛋白骨架或人共同骨架。

[0138] 在一些实施方案中,单结构域抗体还包含C8、C12、C13、C15、C21、C27、C30和/或C31的一个或多个骨架区。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:7的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:8的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:9的序列。在一些实施方案中,单结构域抗体包含一个或多个源自VHH结构域的骨架,该VHH结构域包含SEQ ID NO:10的序列。

[0139] 在一些实施方案中,本文所提供的单结构域抗体是人源化单结构域抗体。

[0140] 本文所描述的骨架区是基于CDR编号系统的边界确定。换句话说,如果CDR由例如Kabat、IMGT或Chothia决定,则骨架区是从N端到C端呈以下形式的可变区中CDR周围的氨基酸残基:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。例如,FR1定义为通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的在CDR1氨基酸残基N端的氨基酸残基,FR2定义为通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的在CDR1与CDR2氨基酸残基之间的氨基酸残基,FR3定义为通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的在CDR2与CDR3氨基酸残基之间的氨基酸残基,并且FR4定义为通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的在CDR3氨基酸残基C端的氨基酸残基。

[0141] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多肽。

[0142] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽。

[0143] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的多肽。

[0144] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的多肽。

[0145] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的多肽。

[0146] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的多肽。

[0147] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了一种包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的多肽。

[0148] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的多肽。

[0149] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗GUCY2C抗体或其抗原结合片段,它与本文所描述的抗GUCY2C单结构域抗体中的任一者竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,竞争性结合可使用ELISA测定来确定。例如,在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体与包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体竞争特异性结合至GUCY2C。

[0150] 在一些实施方案中,可以例如通过组合丙氨酸扫描来定位功能性表位,以鉴别GUCY2C蛋白中与本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体相互作用所必需的氨基酸。在一些实施方案中,结合至GUCY2C的抗GUCY2C单结构域抗体的构象和晶体结构可用于鉴别表位。在

一些实施方案中,本公开提供了一种抗体,该抗体特异性结合至与本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体中的任一者所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。在一些实施方案中,提供了一种抗体,该抗体结合至与包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗GUCY2C单结构域抗体所结合相同的表位。

[0151] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含相对于抗体C8、C12、C13、C15、C21、C27、C30和C31中的任一者具有一定同一性百分比的氨基酸序列。

[0152] 两个序列(例如氨基酸序列或核酸序列)之间的同一性百分比可以使用数学算法来确定。用于比较两个序列的数学算法的一个非限制性实例是如修改自Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:58735877 (1993)的Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:22642268 (1990)的算法。这种算法被并入Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)的NBLAST和XBLAST程序。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如评分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如评分=50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得空位比对用于比较目的,可以如Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)中所描述,利用Gapped BLAST。或者,可以使用PSI BLAST进行迭代搜索,以检测各分子之间的远近关系(同前)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,可以使用对应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如National Center for Biotechnology Information (NCBI), 万维网 ncbi.nlm.nih.gov)。用于比较序列的数学算法的另一个非限制性实例是Myers和Miller, *CABIOS* 4:11-17 (1998)的算法。这种算法被并入ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12及空位罚分4。两个序列之间的同一性百分比可以在允许存在或不存在空位的情况下,使用与上文所述类似的技术确定。在计算同一性百分比时,典型地只计算精确匹配。

[0153] 在一些实施方案中,提供了一种抗GUCY2C单结构域抗体,该抗体包含与选自SEQ ID NO:3至10的氨基酸序列具有至少约75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中任一者的序列同一性的VHH结构域。在一些实施方案中,具有至少约75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者的同一性的VHH序列相对

于参照序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗GUCY2C单结构域抗体保留结合至GUCY2C的能力。在一些实施方案中,在选自SEQ ID NO:3至10中的氨基酸序列中总计有1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,取代、插入或缺失在CDR外部的区域(即,在FR中)发生。任选地,抗GUCY2C单结构域抗体包含选自SEQ ID NO:3至10的氨基酸序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0154] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0155] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0156] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0157] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0158] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0159] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0160] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0161] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的VHH结构域,其中该单结构域抗体结合至GUCY2C。

[0162] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C结合蛋白,其包含上述抗GUCY2C单结构域抗体中的任一者。在一些实施方案中,GUCY2C结合蛋白是单克隆抗体,包括骆驼抗体、

嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中,抗GUCY2C抗体是抗体片段,例如VHH片段。在一些实施方案中,抗GUCY2C抗体是全长仅重链抗体,该抗体包含任何抗体类别或同种型如IgG1或IgG4的Fc区。在一些实施方案中,Fc区具有减弱或最低的效应功能。在一些实施方案中,GUCY2C结合蛋白是包含本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体的融合蛋白。在其它实施方案中,GUCY2C结合蛋白是包含本文所提供的抗GUCY2C单结构域抗体的多特异性抗体。其它示例性GUCY2C结合分子在以下节中将更详细地描述。

[0163] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案中的任一者的抗GUCY2C抗体(例如抗GUCY2C单结构域抗体)或抗原结合蛋白可以单独或组合地并入任何特征,如以下5.2.2至5.2.7节中所描述。

[0164] 5.2.2. 单结构域抗体变体

[0165] 除了本文所述的结合至GUCY2C的单结构域抗体之外,设想的是,可以制备本文所述的结合至GUCY2C的单结构域抗体的变体。例如,通过将适当核苷酸变化引入编码DNA中,和/或通过合成所需的抗体或多肽来制备单结构域抗体变体。本领域技术人员理解氨基酸变化可以改变单结构域抗体的翻译后加工。

[0166] 变异可以是编码单结构域抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,该取代、缺失或插入引起与原始抗体或多肽序列相比氨基酸序列变化。用于进行取代诱变的所关注位点包括CDR及FR。

[0167] 氨基酸取代可以是将一个氨基酸置换成结构和/或化学特性类似的另一个氨基酸的结果,例如将亮氨酸置换成丝氨酸,例如保守氨基酸置换。本领域技术人员已知的标准技术可用于在编码本文所提供的分子的核苷酸序列中引入突变,包括例如引起氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可任选地在约1至5个氨基酸的范围内。在某些实施方案中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在一个特定实施方案中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。允许的变异可以通过在序列中系统地插入、缺失或取代氨基酸并针对亲本抗体所表现的活性测试所得变体来确定。

[0168] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有多个残基的多肽范围内的氨基和/或羧基末端融合物,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。

[0169] 通过保守氨基酸取代产生的单结构域抗体包括在本公开中。在保守氨基酸取代中,氨基酸残基被具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基置换。如上文所描述,具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。或者,可以沿全部或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和诱变引入突变,并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴别保留活性的突变体。诱变后,可表达编码的蛋白质并且可确定蛋白质的活性。可以进行保

守(例如在具有相似特性和/或侧链的氨基酸基团组内)取代,以维持或不明显改变特性。示例性取代示于下表中。

[0170] 表8.氨基酸取代

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0172] 氨基酸可根据其侧链特性的相似性进行分组(参见例如Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (第2版, 1975)): (1) 非极性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 不带电的极性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性: Asp (D)、Glu (E); 以及 (4) 碱性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。或者, 天然存在的残基可根据共同的侧链特性分为以下组: (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性: Asp、Glu; (4) 碱性: His、Lys、Arg; (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 以及 (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。例如, 任何不参与维持单结构域抗体的正确构象的半胱氨酸残基也可以被例如另一个氨基酸如丙氨酸或丝氨酸取代, 以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。非保守取代将需要将这类别中的一者的成员换成另一类别。

[0173] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高

变区残基。一般来说,所得到的选择用于进一步研究的变体相对于亲本抗体将具有某些生物特性的改变(例如改善)(例如增加的亲和力、降低的免疫原性)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,该抗体可以便利地例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术,如本文中所描述的那些技术产生。简单点说,使一个或多个CDR残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并针对特定生物活性(例如结合亲和力)对其进行筛选。

[0174] 可在CDR中进行改变(例如取代),例如以提高抗体亲和力。可以对CDR“热点”,即,由在体细胞成熟过程期间经历高频率突变的密码子所编码的残基(参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196(2008)),和/或SDR(a-CDR)进行此类改变,并测试所得到的变体抗体或其片段的结合亲和力。通过构建二级文库并从中重新选择来进行亲和力成熟已在例如Hoogenboom等人的*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入被选择用于成熟的可变基因中。然后,创建二级文库。然后,筛选文库以鉴别具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及CDR指导的方法,在所述方法中,将若干CDR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴别涉及抗原结合的CDR残基。关于亲和力成熟的更详细描述提供于以下节中。

[0175] 在一些实施方案中,取代、插入或缺失可在一或多个CDR内发生,只要这些改变不会基本上减弱抗体结合抗原的能力即可。例如,可以对CDR进行不会基本上降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文所提供的保守取代)。在本文所提供的变体VHH序列的一些实施方案中,每个CDR或是未改变的,或是含有不止一个、两个或三个氨基酸取代。

[0176] 用于鉴别抗体中可作为诱变靶标的残基或区域的一种有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells, *Science*, 244:1081-1085(1989)中所述。在这一方法中,鉴别一个残基或一组靶残基(例如带电残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并将其用中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)置换以确定抗体与抗原之相互作用是否受影响。可以在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置引入其它取代。替代地或另外,利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴别抗体与抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代的候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0177] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽范围内的氨基和/或羧基末端融合物,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体N端或C端与酶(例如对于ADEPT)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0178] 可以使用本领域已知的方法,例如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变进行变异。可以对克隆的DNA进行定点诱变(参见例如Carter, *Biochem J.* 237:1-7(1986);和Zoller等人, *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500(1982))、盒式诱变(参见例如Wells等人, *Gene* 34:315-23(1985))或其它已知技术以产生单结构域抗体变体DNA。

[0179] 在一些实施方案中,对本文所提供的单结构域抗体进行化学修饰,例如通过将任何类型的分子共价连接至单结构域抗体进行化学修饰。抗体衍生物可以包括经过化学修饰的抗体,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、用已知保护/阻断基团衍

生、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接或与一个或多个免疫球蛋白结构域(例如Fc或Fc的一部分)缀合进行化学修饰。多种化学修饰中的任一者都可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、配制、衣霉素的代谢合成等。此外,抗体可含有一种或多种非经典氨基酸。

[0180] 在一些实施方案中,讲本文所提供的抗体被改变以增加或降低抗体糖基化的程度。可通过改变氨基酸序列以便产生或去除一个或多个糖基化位点,便利地达成抗体上糖基化位点的添加或缺失。

[0181] 当本文所提供的单结构域抗体与Fc区融合时,可以改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含分支的、双触角寡糖,该寡糖一般通过与Fc区中CH2结构域的Asn297的N键联来连接。参见例如Wright等人,TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接至双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本文所提供的结合分子中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善的特性的变体。

[0182] 在其它实施方案中,当本文所提供的单结构域抗体与Fc区融合时,本文所提供的抗体变体可具有缺少(直接或间接)连接至所述Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。如例如WO 2008/077546中所述,如用MALDI-TOF质谱法测量,通过相对于与Asn 297连接的所有糖结构(例如复合、杂交及高甘露糖结构)的总和计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量来确定岩藻糖的量。Asn297是指位于Fc区中约297位(Fc区残基的EU编号)处的天冬酰胺残基;然而,归因于抗体中的微小序列变化,Asn297也可能位于第297位上游或下游约±3个氨基酸处,即,在第294位与第300位之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108和US 2004/0093621。与“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体相关的公布的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷性Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108;和WO 2004/056312,尤其是实施例11),和基因敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0183] 包含本文所提供的单结构域抗体的结合分子还具有平分型寡糖,例如其中连接至Fc区的双触角寡糖被GlcNAc平分。此类变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的变体。此类变体可以具有改善的CDC功能。此类变体描述于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;和WO 1999/22764中。

[0184] 在包含本发明单结构域抗体和Fc区的分子中,可以将一种或多种氨基酸修饰引入

Fc区中,由此产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0185] 在一些实施方案中,本申请涵盖变体,所述变体具有一些但非所有效应功能,使其成为合乎应用需要的候选物,在所述应用中,结合分子的体内半衰期很重要,而某些效应功能(如补体和ADCC)是不必要的或是有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的减少/耗尽。例如,可进行Fc受体(FcR)结合测定以确保结合分子缺乏Fc γ R结合能力(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于评估所关注分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362中(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。或者,可使用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI))。对于此类测定有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代地或另外,可在体内,例如在动物模型中(如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998))中所公开的动物模型中),评估所关注分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域已知的方法来实施FcRn结合和体内清除/半衰期确定(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0186] 具有降低的效应功能的结合分子包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两者或更多者处具有取代的Fc突变体,包括残基265和297取代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0187] 描述了与FcR结合改善或减少的某些变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312;以及Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0188] 在一些实施方案中,变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸取代的Fc区,例如在Fc区第298位、第333位和/或第334位(残基的EU编号)具有取代的Fc区。在一些实施方案中,在Fc区中产生改变以使C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)改变(即,提高或降低),例如美国专利号6,194,551、WO 99/51642及Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所描述。

[0189] 具有延长的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的结合分子描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)中,该FcRn负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。这些分子包含一个Fc区,其中具有一个或多个改善Fc区与FcRn的结合的取代。此类Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一个或多个处,例如在Fc区残基434处具有取代(美国专利号7,371,826)的变

体。关于Fc区变体的其它实例,另参见Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0190] 在一些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化抗体,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在一些实施方案中,被取代的残基出现在抗体的可接近位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点处,并且可以用于将抗体与其它部分,如与药物部分或接头-药物部分缀合,由此产生免疫缀合物,如本文进一步所描述。

[0191] 5.2.3. 体外亲和力成熟

[0192] 在一些实施方案中,与亲本抗体相比具有改善的特性如亲和力、稳定性或表达水平的抗体变体可以通过体外亲和力成熟来制备。与自然原型一样,体外亲和力成熟是基于突变和选择的原则。将抗体文库展示于生物体(例如噬菌体、细菌、酵母或哺乳动物细胞)的表面上或与其编码mRNA或DNA缔合(例如共价或非共价缔合)。展示抗体的亲和力选择允许分离携带编码抗体的遗传信息的生物体或复合物。使用噬菌体展示等展示方法进行两轮或三轮突变和选择通常会产亲和力在低纳摩尔浓度范围内的抗体片段。亲和力成熟抗体可对靶抗原具有纳摩尔浓度或甚至是皮摩尔浓度的亲和力。

[0193] 噬菌体展示是一种广泛用于抗体展示和选择的方法。抗体以与噬菌体衣壳蛋白的融合物形式展示于Fd或M13噬菌体的表面上。选择涉及暴露于抗原以使噬菌体展示的抗体结合其靶,这一过程称为“淘选”。将与抗原结合的噬菌体回收并用于感染细菌以产生噬菌体用于另外数轮选择。有关评述,参见例如Hoogenboom,Methods.Mol.Biol.178:1-37(2002);以及Bradbury和Marks,J.Immunol.Methods 290:29-49(2004)。

[0194] 在酵母展示系统中(参见例如Boder等人,Nat.Biotech.15:553-57(1997);和Chao等人,Nat.Protocols 1:755-68(2006)),抗体可与酵母凝集素蛋白Aga2p的粘附亚基融合,通过与Aga1p的二硫键连接至酵母细胞壁上。通过Aga2p展示蛋白质将投射蛋白质远离细胞表面,由此最大限度地减少与酵母细胞壁上其它分子的潜在相互作用。使用磁性分离和流式细胞术筛选文库以选出具有改善的亲和力或稳定性的抗体。与所关注的可溶性抗原的结合是通过用生物素化抗原和二次试剂如与荧光团缀合的链霉亲和素(streptavidin)标记酵母确定的。抗体表面表达的变化可以通过侧接单链抗体(例如scFv)的血凝素或c-Myc表位标签进行免疫荧光标记来测量。经显示,表达与展示的蛋白质的稳定性相关,并因此可以针对改善的稳定性以及亲和力选择抗体(参见例如Shusta等人,J.Mol.Biol.292:949-56(1999))。酵母展示的另一优势是展示的蛋白质在真核酵母细胞的内质网中利用内质网分子伴侣和质量控制机制进行折叠。在完成成熟后,就可以在展示于酵母表面上时方便地“滴定”抗体亲和力,无需对每个克隆进行表达和纯化。酵母表面展示的一个理论局限是功能文库的大小可能比其它展示方法的小;然而,最近的一种方法使用酵母细胞的交配系统产生了估计大小为 10^{14} 的组合多样性(参见例如美国专利公开2003/0186374;和Blaise等人,Gene 342:211-18(2004))。

[0195] 在核糖体展示中,产生抗体-核糖体-mRNA (ARM) 复合物,以便在无细胞系统中进行选择。编码特定抗体文库的DNA文库与缺少终止密码子的间隔序列基因融合。这个间隔序列在翻译时仍然连接至肽基tRNA并占据核糖体隧道,并由此使所关注的蛋白质能够从核糖体中突出并折叠。由此产生的mRNA、核糖体和蛋白质的复合物可以与表面结合的配体结合,从

而允许通过用配体进行亲和捕获同时分离抗体及其编码mRNA。接着,将核糖体结合的mRNA逆转录为cDNA,然后可以进行诱变并用于下一轮选择(参见例如Fukuda等人*Nucleic Acids Res.* 34:e127 (2006))。在mRNA展示中,使用嘌呤霉素作为衔接分子建立抗体与mRNA之间的共价键(Wilson等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-55 (2001))。

[0196] 由于这些方法完全在体外进行,故与其它选择技术相比,它们具有两个主要优势。第一个优势是,文库的多样性不受细菌细胞转化效率的限制,而仅受试管中存在的核糖体和不同mRNA分子的数量限制。第二个优势是,在每一轮选择之后可以很容易地引入随机突变,例如通过非校对聚合酶引入随机突变,因为在任何多样化步骤之后都不需要转换文库。

[0197] 在一些实施方案中,可以使用哺乳动物展示系统。

[0198] 也可以以靶向方式或通过随机引入将多样性引入抗体文库的CDR中。前一种方法包括通过高水平或低水平诱变或靶向具有体细胞超突变的孤立热点依次靶向抗体的所有CDR(参见例如Ho等人,*J. Biol. Chem.* 280:607-17 (2005))或怀疑因实验或结构原因而会影响亲和力的残基。也可以通过DNA改组或类似技术替换天然多样化的区域来引入多样性(参见例如Lu等人,*J. Biol. Chem.* 278:43496-507 (2003);美国专利号5,565,332和6,989,250)。替代技术以延伸到骨架区残基中的高变环为目标(参见例如Bond等人,*J. Mol. Biol.* 348:699-709 (2005)),采用CDR中的环缺失和插入,或使用基于杂交的多样化(参见例如美国专利公开号2004/0005709)。在CDR中产生多样性的其它方法公开于例如美国专利号7,985,840中。可用于产生抗体文库和/或抗体亲和力成熟的其它方法公开于例如美国专利号8,685,897和8,603,930,以及美国公开号2014/0170705、2014/0094392、2012/0028301、2011/0183855和2009/0075378中,各自都以引用的方式并入本文。

[0199] 文库的筛选可以通过本领域已知的各种技术完成。例如,单结构域抗体可以被固定于固体支持物、柱、针或纤维素/聚(偏二氟乙烯)膜/其它过滤器上,在固定于吸附板上或用于细胞分选的宿主细胞上表达,或与生物素缀合以用涂有链霉亲和素的珠粒捕获或用于任何其它淘选展示文库的方法中。

[0200] 关于体外亲和力成熟方法的评述,参见例如Hoogenboom,*Nature Biotechnology* 23:1105-16 (2005);Quiroz和Sinclair,*Revista Ingeneria Biomedica* 4:39-51 (2010);以及其中的参考文献。

[0201] 5.2.4. 单结构域抗体的修饰

[0202] 单结构域抗体的共价修饰包括在本公开的范围。共价修饰包括使单结构域抗体的靶氨基酸残基与有机衍生剂反应,该有机衍生剂能够与单结构域抗体的选定侧链或者N端或C端残基反应。其它修饰包括谷氨酰胺和天冬酰胺残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰胺和天冬酰胺残基;脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸的 α -氨基和组氨酸侧链的甲基化(参见例如Creighton,*Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (1983));N-末端胺的乙酰化;以及任何C端羧基的酰胺化。

[0203] 包括在本公开范围内的单结构域抗体的其它类型共价修饰包括如上所述改变抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如Beck等人,*Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482-501 (2008);和Walsh,*Drug Discov. Today* 15:773-80 (2010)),并将抗体连接至多种非蛋白质聚合物中的一者,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯,其连接方式例如美国专利号

4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中所述。本公开的结合至GUCY2C的单结构域抗体也可以与一个或多个免疫球蛋白恒定区或其部分(例如Fc)基因融合或缀合以延长半衰期和/或赋予已知的Fc介导的效应功能。

[0204] 本公开的结合至GUCY2C的单链抗体还可以被修饰用于形成嵌合分子,所述嵌合分子包含结合至GUCY2C的单链抗体与另一异源多肽或氨基酸序列,例如表位标签(参见例如Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33 (2003))或IgG分子的Fc区(参见例如Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42 (Chamow和Ashkenazi编辑,1999))的融合物。结合至GUCY2C的单链抗体也可用于产生结合GUCY2C的嵌合抗原受体(CAR),下文将更详细地描述。

[0205] 本文还提供融合蛋白,所述融合蛋白包含本公开的结合至GUCY2C的单链抗体和异源多肽。在一些实施方案中,与抗体基因融合或化学缀合的异源多肽可用于将抗体靶向具有细胞表面表达的GUCY2C的细胞。

[0206] 本文还提供了结合至GUCY2C抗原的抗体组。在特定实施方案中,抗体组具有不同的缔合速率、不同的解离速率、对GUCY2C抗原的不同亲和力和/或对GUCY2C抗原的不同特异性。在一些实施方案中,所述组包含约10至约1000种或更多种抗体或由其组成。抗体组可用于例如96孔板或384孔板中,用于ELISA等测定。

[0207] 5.2.5. 人源化单结构域抗体

[0208] 本文所描述的单结构域抗体包括人源化单结构域抗体。将来自骆驼科物种的单结构域抗体人源化的一般策略已有描述(参见例如Vincke等人, *J. Biol. Chem.*, 284(5):3273-3284 (2009))并且可用于产生如本文所公开的人源化VHH结构域。来自骆驼科物种的人源化单结构域抗体的设计可包括VHH中的标志性残基,例如残基11、37、44、45和47(根据Kabat的残基编号)(Muyldermans, *Reviews Mol Biotech* 74:277-302 (2001))。

[0209] 人源化抗体,例如本文所公开的人源化单结构域抗体,也可以使用本领域已知的多种技术产生,包括但不限于CDR移植(欧洲专利号EP 239,400;国际公开号WO 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089);镶饰或表面重塑(欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka等人, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994);和Roguska等人, *PNAS* 91:969-973 (1994));链改组(美国专利号5,565,332);以及例如美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、WO 9317105;Tan等人, *J. Immunol.* 169:111925 (2002);Caldas等人, *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000);Morea等人, *Methods* 20(3):267-79 (2000);Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997);Roguska等人, *Protein Eng.* 9(10):895904 (1996);Couto等人, *Cancer Res.* 55(23Supp):5973s-5977s (1995);Couto等人, *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995);Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994);及Pedersen等人, *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994)中所公开的技术。另参见美国专利公开号US 2005/0042664 A1(2005年2月24日),各自以引用的方式整体并入本文。

[0210] 在一些实施方案中,本文所提供的单结构域抗体可以是结合至GUCY2C(包括人GUCY2C)的人源化单结构域抗体。例如,本公开的人源化单链抗体可包含SEQ ID NO:3至10中所示的一个或多个CDR。用于将非人抗体人源化的各种方法是本领域已知的。例如,人源化抗体可具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被

称为“输入”残基,通常获自“输入”可变结构域。可以例如遵循Jones等人,Nature 321:522-25(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-27(1988);和Verhoeyen等人,Science 239:1534-36(1988))的方法,通过用高变区序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。

[0211] 在一些情况下,人源化抗体是通过CDR移植构建的,其中亲本非人抗体的CDR的氨基酸序列被移植到人抗体骨架上。例如,Padlan等人确定CDR中只有约三分之一的残基实际接触抗原,并将这些残基称为“特异性决定残基”或SDR(Padlan等人,FASEB J.9:133-39(1995))。在SDR移植技术中,只有SDR残基被移植到人抗体骨架上(参见例如Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005))。

[0212] 用于制备人源化抗体的人可变结构域的选择对于降低抗原性可能很重要。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选非人抗体的可变结构域的序列。可以选择最接近非人抗体的序列的人序列作为人源化抗体的人骨架(Sims等人,J.Immunol.151:2296-308(1993);和Chothia等人.,J.Mol.Biol.196:901-17(1987))。另一种方法使用来源于特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定骨架。相同的骨架可用于若干不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89(1992);和Presta等人,J.Immunol.151:2623-32(1993))。在一些情况下,所述骨架来源于最丰富的人亚类 V_L6 亚组I(V_L6I)和 V_H 亚组III(V_HIII)的共有序列。在另一种方法中,使用了人种系基因作为骨架区的来源。

[0213] 在称为超人源化的基于CDR比较的替代范例中,FR同源性是无关紧要的。所述方法由以下组成:将非人序列与功能性人种系基因谱系相比较。然后,选择编码与鼠序列相同或密切相关的典型结构的那些基因。接下来,在与非人抗体共有经典结构的基因中,选出在CDR内具有最高同源性的那些基因作为FR供体。最后,将非人CDR移植到这些FR上(参见例如Tan等人,J.Immunol.169:1119-25(2002))。

[0214] 一般来说,还希望将抗体人源化,同时保留它们对抗原的亲力和其它有利的生物特性。为实现这一目标,根据一种方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可用的并且为本领域技术人员所熟悉。可使用说明并展示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。这些程序包括例如WAM(Whitelegg和Rees,Protein Eng.13:819-24(2002))、Modeller(Sali和Blundell,J.Mol.Biol.234:779-815(1993))和Swiss PDB Viewer(Guex和Peitsch,Electrophoresis 18:2714-23(1997))。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从接受体和输入序列中选择FR残基并将其组合,由此实现所希望的抗体特征,例如增加的对靶抗原的亲合力。一般而言,高变区残基直接地并且最显著地参与影响抗原结合。

[0215] 抗体人源化的另一种方法是基于称为人呈递肽段(Human String Content,HSC)的抗体人性的指标。这一方法将小鼠序列与人种系基因谱系相比较,并将差异计为HSC。然后,通过将其HSC最大化而不是使用全局同一性度量产生多种不同的人源化变体,由此将靶序列人源化(Lazar等人,Mol.Immunol.44:1986-98(2007))。

[0216] 除了上述方法外,还可以使用经验方法来产生并选择人源化抗体。这些方法包括基于产生大型人源化变体文库并使用富集技术或高通量筛选技术选择最佳克隆的方法。抗

体变体可以从噬菌体、核糖体和酵母展示文库以及通过细菌菌落筛选分离(参见例如 Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16 (2005); Dufner等人, *Trends Biotechnol.* 24:523-29 (2006); Feldhaus等人, *Nat. Biotechnol.* 21:163-70 (2003); 和 Schlapschy等人, *Protein Eng. Des. Sel.* 17:847-60 (2004))。

[0217] 在FR文库方法中,在FR中的特定位置处引入一组残基变体,然后筛选文库以选择最能支持移植的CDR的FR。待取代的残基可以包括被鉴别为可能促成CDR结构(参见例如 Foote和Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-99 (1992)),或来自 Baca等人 *J. Biol. Chem.* 272:10678-84 (1997) 所鉴别的更有限的靶残基集合的一些或所有“Vernier”残基。

[0218] 在FR改组中,将整个FR与非人CDR组合,而不是创建所选残基变体的组合文库(参见例如 Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005))。可以使用一步FR改组方法。这种方法已被证明是有效的,因为由此得到的抗体表现出改善的生物化学和物理化学特性,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性(参见例如 Damschroder等人, *Mol. Immunol.* 44:3049-60 (2007))。

[0219] “人性化(humaneering)”方法基于实验鉴别基本的最低特异性决定簇(minimum specificity determinant, MSD),并基于非人片段依序置换至人FR文库中以及结合评估。这种方法典型地会引起来自具有不同人V区段CDR的多个亚类的抗体的表位保留和鉴别。

[0220] “人工程化”方法涉及通过对抗体氨基酸序列进行特定改变来改变非人抗体或抗体片段,由此产生在人体中具有降低的免疫原性,但仍保留原始非人抗体所希望的结合特性的经修饰的抗体。一般来说,这一技术涉及将非人抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中等风险”或“高风险”残基。分类是使用全局风险/回报计算进行的,该计算评价了进行特定替换(例如对于在人体中的免疫原性)的预测收益与取代会影响所得到的抗体的折叠的风险。打算在非人抗体序列的给定位置(例如低风险或中等风险)处取代的特定人氨基酸残基可以通过将来自非人抗体可变区的氨基酸序列与特定或共同人氨基酸序列的相应区域比对来选择。可以根据比对,用非人序列中低风险或中等风险位置的氨基酸残基取代为人抗体序列中的相应残基。制备人工程化蛋白质的技术更详细地描述于以下中: Studnicka等人, *Protein Engineering* 7:805-14 (1994); 美国专利号5,766,886、5,770,196、5,821,123和5,869,619;以及PCT公布WO 93/11794。

[0221] 可以使用例如 Composite Human Antibody™ technology (Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom) 产生复合人抗体。为了产生复合人抗体,由多个人抗体可变区序列的片段以避免T细胞表位的方式设计可变区序列,由此使所得抗体的免疫原性最小。

[0222] 去免疫化抗体是去除了T细胞表位的抗体。用于制备去免疫化抗体的方法已有描述。参见例如 Jones等人, *Methods Mol Biol.* 525:405-23 (2009), xiv; 以及 De Groot等人, *Cell. Immunol.* 244:148-153 (2006))。去免疫化抗体包含T细胞表位耗尽的可变区和人恒定区。简单点说,克隆抗体的可变区,随后通过在T细胞增殖测定中测试来源于抗体可变区的重叠肽来鉴别T细胞表位。通过计算机方法鉴别T细胞表位,以鉴别出与人II类MHC结合的肽。在可变区中引入突变以废除与人II类MHC的结合。然后,利用突变的可变区来产生去免疫化抗体。

[0223] 5.2.6. 单结构域抗体的制备

[0224] 本文所提供的单结构域抗体(如VHH)可使用本领域已知的方法获得,例如通过对

骆驼科物种(如骆驼或美洲驼)进行免疫并从中获得杂交瘤,或通过使用本领域已知的分子生物学技术克隆单结构域抗体文库,随后利用ELISA,用未选择的文库的单个克隆或通过使用噬菌体展示进行选择。例如,制备单结构域抗体的方法已在例如Els Pardon等人,Nature Protocol,9(3):674(2014)中有所描述。

[0225] 本文所提供的单结构域抗体可以通过培养用含有单结构域抗体编码核酸的载体转化或转染的细胞来产生。可以使用标准重组技术获得编码本公开的抗体的多肽组分的多核苷酸序列。可以从如杂交瘤细胞或B细胞等抗体生产细胞中分离所需多核苷酸序列并测序。或者,可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。在获得后,就将编码多肽的序列插入到能够在宿主细胞中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。许多可用的且本领域已知的载体均可用于本公开的目的。适当载体的选择将主要取决于打算插入载体中的核酸的大小和打算用载体转化的特定宿主细胞。适于表达本公开抗体的宿主细胞包括原核生物,例如古细菌和真细菌,包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体;真核微生物,例如丝状真菌或酵母;无脊椎动物细胞,例如昆虫或植物细胞;以及脊椎动物细胞,例如哺乳动物宿主细胞系。将宿主细胞用上述表达载体转化并在适当改良的用于诱导启动子、选择转化株或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中进行培养。使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法纯化由宿主细胞产生的抗体。

[0226] 包括载体构建、表达和纯化在内的抗体生产方法进一步描述于Plückthun等人,Antibody Engineering:Producing antibodies in Escherichia coli:From PCR to fermentation 203-52(McCafferty等人编辑,1996);Kwong和Rader,E.coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments,inCurrent Protocols in Protein Science(2009);Tachibana和Takekoshi,Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli,inAntibody Expression and Production(Al-Rubeai编辑,2011);以及Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic(An编辑,2009)中。

[0227] 当然,可以设想可采用本领域中众所周知的替代方法制备抗GUCY2C单结构域抗体。例如,可以使用固相技术,通过直接肽合成来产生适当的氨基酸序列或其部分(参见例如Stewart等人,Solid-Phase Peptide Synthesis(1969);和Merrifield,J.Am.Chem.Soc.85:2149-54(1963))。可以使用手动技术或通过自动化进行体外蛋白质合成。抗GUCY2C抗体的各个部分可以分别通过化学方式合成并使用化学或酶促方法组合以产生所需的抗GUCY2C抗体。或者,可以从被工程化用于表达抗体的转基因动物的细胞或体液如乳汁中纯化出抗体,例如美国专利号5,545,807和5,827,690中所公开的。

[0228] 具体而言,单结构域抗体或本文所提供的其它GUCY2C结合物可通过如下方式产生:对美洲驼进行免疫,进行单B细胞分选、采用V基因提取、克隆GUCY2C结合物如VHH-Fc融合物,然后进行小规模表达和纯化。可以对结合至GUCY2C的单结构域抗体和其它分子进行额外筛选,包括针对ELISA阳性、BLI阳性和 K_D 小于100nM中的一者或多者选择。这些选择标准可以按照下面第6节中的描述进行组合。此外,可以测定单个VHH结合物(和其它结合至GUCY2C的分子)结合至表GUCY2C的细胞的能力。这种测定可以使用表达GUCY2C的细胞进行的FACS分析,并测量荧光标记的VHH分子的平均荧光强度(MFI)来进行。下文将更详细地描述上述各个方面。

[0229] 多克隆抗体一般是通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物

体内产生的。使用双功能或衍生化剂将相关抗原与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质,例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合可能是有用的,所述双功能或衍生化剂例如为马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中R和 R^1 独立地为低级烷基。可以使用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂(单磷酸脂质A、合成的海藻糖二分支霉菌酸酯(trehalose dicorynomycolate))。免疫方案可由本领域技术人员选择,无需过多实验。

[0230] 例如,通过将例如100 μg 或5 μg 蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合并在多个部位皮内注射该溶液,使动物针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫。一个月后,利用在弗氏完全佐剂中原始量的1/5至1/10的肽或缀合物,通过在多个部位皮下注射来对动物加强免疫。七至十四天后,对动物抽血并测定血清中的抗体滴度。对动物加强免疫,直至滴度稳定。缀合物也可以在重组细胞培养物中以蛋白质融合物形式制备。此外,聚集剂如明矾也适用于增强免疫反应。

[0231] 从基本上均质的抗体群体获得单克隆抗体,所述基本上均质的抗体群体即,构成该群体的各个抗体除了可能以微量存在的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)外是相同的。因此,修饰语“单克隆”表明抗体的特性不是离散抗体的混合物。例如,单克隆抗体可使用最先由Kohler等人,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或者可以使用重组DNA方法制备(美国专利号4,816,567)。

[0232] 在杂交瘤方法中,对适当宿主动物进行免疫以诱发淋巴细胞产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体。或者,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。然后,使用适合的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0233] 免疫剂典型地包括抗原蛋白或其融合变体。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), 第59-103页。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞。将如此制备的杂交瘤细胞接种于适合的培养基中并生长,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。优选的永生化骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生产细胞稳定高水平产生抗体并且对培养基如HAT培养基敏感的细胞。

[0234] 测定生长杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生情况。可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对所需抗原的单克隆抗体的存在情况。此类技术和测定是本领域已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson等人的Anal. Biochem., 107:220(1980)中的Scatchard分析确定。

[0235] 在鉴别出产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,就可以将克隆通过有限稀释程序亚克隆并利用标准方法使其生长(Goding, 同上)。适合此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞还可以在哺乳动物体内以肿瘤形式生长。

[0236] 由亚克隆分泌的单克隆抗体宜通过常规免疫球蛋白纯化程序,如蛋白质A-琼脂糖凝胶(Sepharose)、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法从培养基分离。

[0237] 单克隆抗体也可通过重组DNA方法制备,例如美国专利号4,816,567以及如上文所描述的那些方法。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合至编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离并测序。杂交瘤细胞用作此类DNA的优选来源。分离后,就可将DNA放入表达载体中,接着将表达载体转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以便在这些重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于细菌中编码抗体的DNA的重组表达的评论文章包括Skerra等人*Curr.Opinion in Immunol.*,5:256-262(1993);和Pliickthun,*Immunol.Revs.*130:151-188(1992)。

[0238] 在另一实施方案中,可以从使用McCafferty等人,*Nature*,348:552-554(1990)中描述的技术生成的抗体噬菌体文库中分离抗体。Clackson等人,*Nature*,352:624-628(1991);和Marks等人,*J.Mol.Biol.*,222:581-597(1991)。随后的出版物描述了通过链改组(Marks等人,*Bio/Technology*,10:779-783(1992))以及组合感染和体内重组作为构建极大噬菌体文库的策略(Waterhouse等人,*Nucl.Acids Res.*,21:2265-2266(1993))产生高亲和力(nM范围)人抗体。因此,这些技术为用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行的供选方案。

[0239] 也可以例如通过取代编码序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,*Proc.Natl Acad.Sci.USA*,81:6851(1984)),或通过共价接合非免疫球蛋白多肽的全部编码序列或部分编码序列对DNA进行修饰。此类非免疫球蛋白多肽可以被取代以产生包含一个对抗原具有特异性的抗原组合位点和另一个对不同抗原具有特异性的抗原组合位点的嵌合二价抗体。

[0240] 嵌合或杂合抗体也可以使用合成蛋白质化学中的已知方法在体外制备,所述方法包括那些涉及交联剂的方法。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的适合试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚氨酸酯。

[0241] 对于真核细胞表达,载体组分一般包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、复制起点、一个或多个标记物基因以及增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0242] 用于真核宿主的载体还可以是插入物,该插入物编码信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N端处具有特定切割位点的其它多肽。所选异源信号序列优选地是由宿主细胞识别并加工(即,被信号肽酶切割)的序列。在哺乳动物细胞表达中,可使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。可将此类前体区域的DNA与编码本申请抗体的DNA连接于阅读框内。

[0243] 一般来说,哺乳动物表达载体并不需要复制起始点组分(典型地仅使用SV40起点,因为它含有早期启动子)。

[0244] 表达载体和克隆载体可含有选择基因,又称为选择性标记物。选择基因可编码如下蛋白质,该蛋白质赋予对抗生素或其它毒素,例如氨苄青霉素(ampicillin)、新霉素(neomycin)、氨甲蝶呤(methotrexate)或四环素的抗性;补充营养缺陷;或提供从复合培养基中无法获得的关键养分。

[0245] 选择方案的一个实例利用了药物来使宿主细胞的生长停滞。那些用异源基因成功转化的细胞产生赋予药物抗性的蛋白质,并因此在选择方案中存活。这种显性选择的实例使用了药物新霉素、霉酚酸和潮霉素(hygromycin)。

[0246] 用于哺乳动物细胞的适合选择性标记物的另一个实例是能够鉴别有能力摄取编码本申请抗体的核酸的细胞的选择性标记物。例如,首先通过在含有氨甲蝶呤(Mtx;DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有的转化体来鉴别用DHFR选择基因转化的细胞。当采用野生型DHFR时,示例性适当宿主细胞是缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。或者,通过使细胞在含有针对选择性标记物的选择剂如氨基糖苷类抗生素的培养基中生长,可选出用编码多肽的DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种选择性标记物如氨基糖苷类3'-磷酸转移酶(APH)转化或共转化的宿主细胞(尤其是含有内源性DHFR的野生型宿主细胞)。

[0247] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物体识别并且可操作地连接至编码所需多肽序列的核酸的启动子。真核基因具有富含AT的区域,该区域位于转录起始位点上游约25至30个碱基处。可包括在许多基因的转录起始位点上游70至80个碱基处发现的另一个序列。大部分真核基因的3'端可以是用于在编码序列的3'端添加poly A尾的信号序列。所有这些序列均可插入真核表达载体中。

[0248] 哺乳动物宿主细胞中由载体进行的多肽转录可例如受启动子控制,所述启动子获自病毒基因组,如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40);异源哺乳动物的启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子;热休克启动子,条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0249] 通常通过将增强子序列插入载体中来增加高等真核细胞对编码本公开抗体的DNA的转录。现已知许多来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。实例包括位于复制起始点后侧(late side)(bp 100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起始点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件,另参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)。增强子可剪接至载体中多肽编码序列5'或3'的位置处,但是优选位于启动子5'的位点处。

[0250] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还含有终止转录和使mRNA稳定所需的序列。此类序列通常可得自真核或病毒DNA或cDNA的5'端且有时是3'端非翻译区。这些区域含有编码多肽的mRNA的非翻译部分中转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分为牛生长激素聚腺苷酸化区。

[0251] 用于克隆或表达本文载体中的DNA的适合宿主细胞包括本文所描述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。在培养物(组织培养物)中繁殖脊椎动物细胞已成为一种常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例有由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7,ATCC CRL-1651);人胚肾细胞系(293细胞或被亚克隆用于以悬浮培养方式生长的293细胞;Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL-10);中国仓鼠卵巢巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠塞特利氏细胞(mouse sertoli cell)(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL-2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL-34);布法罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL-75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,Annals

N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

[0252] 宿主细胞可用上述表达或克隆载体转化以产生抗体并在适当改良的用于诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中进行培养。

[0253] 用于产生本申请的抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售的培养基,例如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基(Minimal Essential Medium, MEM), Sigma)、RPMI-1640(Sigma)以及达尔伯克氏改良型伊格尔氏培养基((Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), Sigma), 适于培养宿主细胞。此外, Ham等人, Meth.Enz.58:44(1979); Barnes等人, Anal.Biochem.102:255(1980); 美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利号Re.30,985中所描述的培养基中的任一者均可用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一者均可根据需要补充激素和/或其它生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁及磷酸盐)、缓冲剂(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷和胸苷)、抗生素(例如GENTAMYCIN™药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔浓度范围内的最终浓度存在的无机化合物), 以及葡萄糖或等量的能量源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其它必要补充剂。培养条件, 例如温度、pH等, 是先前用于被选择用于表达的宿主细胞的条件, 并且对于普通技术人员而言将是显而易见的。

[0254] 当使用重组技术时, 抗体可以在细胞内、周质空间中产生, 或直接分泌到培养基中。如果在细胞内产生抗体, 则作为第一个步骤, 通过例如离心或超滤来去除颗粒状碎片, 如宿主细胞或裂解的片段。在将抗体分泌到培养基中的情况下, 一般首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器, 例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元对来自这些表达系统的上清液进行浓缩。蛋白酶抑制剂如PMSF可包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解, 并且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0255] 由细胞制备的蛋白质组合物可以使用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法纯化, 其中亲和色谱法是优选的纯化技术。连接亲和配体的基质通常是琼脂糖, 但也可以使用其它基质。与琼脂糖相比, 机械稳定的基质如受控孔径玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯可实现更快的流动速率和更短的处理时间。取决于待回收的抗体, 也可使用其它蛋白质纯化技术, 例如在离子交换柱上进行的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱、在肝素SEPHAROSE™上进行的色谱分析、在阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)上进行的色谱分析、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。在任何初步纯化步骤之后, 可以对包含所关注抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用色谱。

[0256] 可以使用标准重组技术获得编码本公开的抗体的聚核酸序列。所需聚核酸序列可以从如杂交瘤细胞等抗体产生细胞中分离并测序。或者, 可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。在获得后, 就将编码多肽的序列插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。许多可用的且本领域已知的载体均可用于本公开的目的。适当载体的选择将主要取决于打算插入载体中的核酸的大小和打算用载体转化的特定宿主细胞。每个载体包含不同的成分, 这取决于它的功能(异源多核苷酸的扩增或表达, 或两者兼而有之)及它与它所在的特定宿主细胞的相容性。载体组分一般包括但不限于以下中的一者或多者: 复制起点、选择标记物基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入序列和转录终止序列。

[0257] 一般来说,将含有复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用,所述复制子和控制序列来源于与宿主细胞相容的物种。载体通常带有一个复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如,大肠杆菌典型地使用pBR322转化,pBR322是一种来源于大肠杆菌物种的质粒。用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例在Carter等人的美国专利号5,648,237中有详细描述。

[0258] 此外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体也可作为转化载体与这些宿主结合使用。例如,噬菌体如GEM™-11可用于制备可用于转化易感宿主细胞如大肠杆菌LE392的重组载体。

[0259] 本申请的表达载体可包含编码各多肽组分的两个或更多个启动子-顺反子对。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调控序列。原核启动子典型地分为两类,即,诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化,例如养分的存在或不存在或者温度的变化而起始在其控制下的顺反子的转录水平增加的启动子。

[0260] 被多种潜在宿主细胞识别的众多启动子是众所周知的。通过用限制酶消化从源DNA中去除启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中,可以将选定的启动子可操作地连接到编码本公开抗体的顺反子DNA。天然启动子序列和许多异源启动子均可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,使用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们一般允许更高的转录和更高的靶基因表达产率。

[0261] 适于与原核宿主一起使用的启动子包括PhoA启动子、-内酰胺酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子如tac或trc启动子。然而,在细菌中有功能的其它启动子(例如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是适合的。它们的核酸序列已经公布,从而使技术人员能够使用接头或衔接子将它们可操作地连接到编码靶肽的顺反子上(Siebenlist等人Cell 20:269(1980)),由此提供任何所需的限制性位点。

[0262] 一方面,重组载体内的每个顺反子都包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组分。一般来说,信号序列可以是载体的组分,或者它可以是插入载体中的靶多肽DNA的一部分。选择用于本发明的目的的信号序列应当是被宿主细胞识别并加工(即,被信号肽酶切割)的序列。对于不能识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞,可将信号序列用原核信号序列取代,所述原核信号序列选自例如由以下组成的组:碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。

[0263] 在一些实施方案中,根据本公开的抗体可以在宿主细胞的细胞质中产生,并因此不需要在每个顺反子内都存在分泌信号序列。某些宿主株(例如大肠杆菌trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,由此允许表达的蛋白质亚基的正确折叠和组装。

[0264] 适于表达本公开抗体的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的实例包括埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌)、杆菌属(*Bacilli*) (例如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))、肠杆菌属(*Enterobacteria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)种(例如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*))、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、根瘤菌属(*Rhizobia*)、透明颤菌属(*Vitreoscilla*)或副球菌属(*Paracoccus*)。在一些实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中,使用大肠杆菌细胞作为宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110

(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219页; ATCC 寄存号 27, 325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R 的菌株 33D3 (美国专利号 5, 639, 635)。其它菌株及其衍生物, 例如大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC 31, 608) 也是适合的。这些实例是示例性的而非限制性的。用于构建具有确定的基因型的任何上述细菌的衍生物的方法是本领域已知的并且描述于例如 Bass 等人, Proteins, 8: 309-314 (1990) 中。一般需要考虑复制子在细菌细胞中的复制能力来选择适当的细菌。例如, 当使用众所周知的质粒如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属或沙门氏菌属种可适合地用作宿主。

[0265] 典型地, 宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶, 并且可能需要将额外的蛋白酶抑制剂掺入细胞培养物中。

[0266] 将宿主细胞用上述表达载体转化并在适当改良的用于诱导启动子、选择转化株或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中进行培养。转化是指将 DNA 引入原核宿主中, 使 DNA 可复制, 无论是作为染色体外元件还是通过染色体整合体复制。取决于所使用的宿主细胞, 转化是使用适合此类细胞的标准技术完成的。使用氯化钙进行的钙处理一般被用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用了聚乙二醇/DMSO。又另一种使用的技术是电穿孔。

[0267] 使用于产生本申请的抗体的原核细胞在本领域已知并且适于培养所选宿主细胞的培养基中生长。适合培养基的实例包括 luria 肉汤 (LB) 加上必要的营养补充剂。在一些实施方案中, 培养基还含有基于表达载体的构建选择的选择剂, 以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。例如, 将氨苄青霉素添加到培养基中以使表达氨苄青霉素抗性基因的细胞生长。

[0268] 除了碳源、氮源和无机磷酸盐源之外, 还可以包括适当浓度的任何必要补充物, 这些补充物是单独引入的或以与另一种补充物或培养基如复合氮源的混合物形式引入的。任选地, 培养基可以含有一种或多种选自以下组成的组的还原剂: 谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、硫代乙醇酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。将原核宿主细胞在适合温度和 pH 值下培养。

[0269] 如果在本申请的表达载体中使用诱导型启动子, 则在适合启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。在本申请的一方面, 使用了 PhoA 启动子控制多肽的转录。因此, 将转化的宿主细胞在限制磷酸盐培养基中培养以进行诱导。优选地, 限制磷酸盐的培养基是 C.R.A.P 培养基 (参见例如 Simmons 等人, J. Immunol. Methods 263: 133-147 (2002))。如本领域所知, 根据所用载体构建体, 可以使用多种其它诱导剂。

[0270] 本公开的表达抗体被分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收典型地涉及破坏微生物, 一般通过渗透冲击、超声处理或裂解等方式进行。一旦细胞被破坏, 就可以通过离心或过滤去除细胞碎片或整个细胞。可以例如通过亲和树脂色谱法进一步纯化蛋白质。或者, 可以将蛋白质转运到培养基中并在其中分离。可以从培养物中取出细胞, 过滤并浓缩培养物上清液以进一步纯化所产生的蛋白质。可以使用如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和 Western 印迹测定等公知方法进一步分离并鉴别所表达的多肽。

[0271] 或者,通过发酵方法产生大量蛋白质。各种大规模补料分批发酵程序均可用于产生重组蛋白。为了提高本公开抗体的产量和质量,可以修改各种发酵条件。例如,经证实,伴侣蛋白有助于细菌宿主细胞中产生的异源蛋白的正确折叠和溶解。Chen等人,J Bio Chem 274:19601-19605 (1999);美国专利号6,083,715;美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17100-17105 (2000);Ramm和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17106-17113 (2000);Arie等人,Mol.Microbiol.39:199-210 (2001)。

[0272] 为了最大限度地减少表达的异源蛋白质(尤其是对蛋白水解敏感的那些)的蛋白水解,可将某些蛋白水解酶缺陷型宿主菌株用于本发明,如例如美国专利号5,264,365;美国专利号5,508,192;Hara等人,Microbial Drug Resistance,2:63-72 (1996)中所描述。用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的蛋白水解酶缺陷型大肠杆菌菌株可在编码本申请抗体的表达系统中用作宿主细胞。

[0273] 本文所产生的抗体可被进一步纯化以获得基本上均质的制剂用于进一步测定和使用。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是适合纯化程序的示例:在免疫亲和柱或离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上或在阳离子交换树脂如DEAE上进行的色谱分析、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀以及使用例如Sephadex G-75进行的凝胶过滤。在一些实施方案中,可使用固定在固相上的蛋白质A进行本公开结合分子的免疫亲和纯化。固定有蛋白质A的固相优选为包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选为可控孔径玻璃柱或硅胶柱。在一些实施方案中,柱被涂有甘油等试剂,以试图防止污染物的非特异性粘附。然后,洗涤固相以去除非特异性结合到固相上的污染物。最后,通过洗脱从固相中回收所关注抗体。

[0274] 5.2.7. 包含单结构域抗体的结合分子

[0275] 另一方面,本文提供了一种结合分子,该结合分子包含本文所提供的单结构域抗体(例如针对GUCY2C的VHH结构域)。除了如以下第5.3节所述的本文所提供的嵌合抗原受体(CAR)外,在一些实施方案中,本文所提供的针对GUCY2C的单结构域抗体是其它结合分子的一部分。本文描述了本公开的示例性结合分子,例如融合蛋白和免疫缀合物。

[0276] 在各个实施方案中,本文所提供的单结构域抗体可以与另一剂,例如基于蛋白质的实体以基因方式融合或以化学方式缀合。单结构域抗体可以与剂以化学方式缀合,或与剂以其它方式非共价缀合。所述试剂可以是肽或抗体(或其片段)。

[0277] 因此,在一些实施方案中,本文提供了与异源蛋白质或多肽(或其片段,例如具有约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450或约500个氨基酸,或超过500个氨基酸的多肽)以重组方式融合或以化学方式缀合(共价或非共价缀合)的单结构域抗体(例如VHH结构域)以产生融合蛋白,及其用途。具体点说,本文提供了包含本文所提供的单结构域抗体的抗原结合片段(例如CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白。

[0278] 此外,本文所提供的抗体可以与标记物或“标签”序列如肽融合,以促进纯化。在特定实施方案中,标记物或标签氨基酸序列是六组氨酸肽、血凝素(“HA”)标签和“FLAG”标签。

[0279] 用于将部分(包括多肽)与抗体融合或缀合的方法是已知的(参见例如Arnon等人, Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld等人编辑,1985);

Hellstrom等人, *Antibodies for Drug Delivery, Controlled Drug Delivery* 623-53 (Robinson等人编辑, 第2版, 1987); Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review*, in *Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475-506 (Pinchera等人编辑, 1985); *Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303-16 (Baldwin等人编辑, 1985); Thorpe等人, *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982); 美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、5,723,125、5,783,181、5,908,626、5,844,095和5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT公开WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631和WO 99/04813; Ashkenazi等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-39 (1991); Traunecker等人, *Nature*, 331:84-86 (1988); Zheng等人, *J. Immunol.* 154:5590-600 (1995); 以及Vil等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-41 (1992)。

[0280] 融合蛋白可以例如通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)技术产生。DNA改组可用于改变本文所提供的单结构域抗体的活性,所述抗体包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的抗体(参见例如美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458; Patten等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33 (1997); Harayama, *Trends Biotechnol.* 16 (2):76-82 (1998); Hansson等人, *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999); 以及Lorenzo和Blasco, *Biotechniques* 24 (2):308-13 (1998)。抗体或编码的抗体可在重组前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其它方法进行随机诱变而改变。编码本文所提供的抗体的多核苷酸可以与一或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0281] 在一些实施方案中,将本文所提供的单结构域抗体(例如VHH结构域)与第二抗体缀合以形成抗体异源缀合物。

[0282] 在各个实施方案中,单结构域抗体与剂以基因方式融合。基因融合可以通过在单结构域抗体与剂之间放置接头(例如多肽)来实现。接头可以是柔性接头。

[0283] 在各个实施方案中,将单结构域抗体与治疗分子以基因方式缀合,利用铰链区将单结构域抗体连接至治疗分子。

[0284] 本文还提供了用于制备本文所提供的各种融合蛋白的方法。上文第5.2.6节中描述的各种方法也可用于制备本文所提供的融合蛋白。

[0285] 在一个特定实施方案中,本文所提供的融合蛋白是重组表达的。本文所提供的融合蛋白的重组表达可能需要构建含有编码蛋白质或其片段的多核苷酸的表达载体。在获得编码本文所提供的蛋白质或其片段的多核苷酸后,就可以使用本领域众所周知的技术,通过重组DNA技术产生用于产生所述分子的载体。因此,本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可使用本领域技术人员众所周知的方法构建含有编码序列以及适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体,所述载体包含可操作地连接至启动子的编码本文所提供的融合蛋白或其片段,或CDR的核苷酸序列。

[0286] 可以通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养被转染的细胞以产生本文所提供的融合蛋白。因此,本文还提供了含有编码本文所提供的融合蛋白

或其片段的多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸可操作地连接至异源启动子。

[0287] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文所提供的融合蛋白。此类宿主表达系统代表了可以产生并随后纯化所关注的编码序列的媒介物,而且还代表当用适当核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所提供的融合蛋白的细胞。这些包括但不限于微生物,例如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如毕赤酵母);用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或带有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、NS0和3T3细胞),该构建体含有来源于哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)的启动子。细菌细胞如大肠杆菌,或真核细胞,尤其是对于表达整个重组抗体分子,可用于表达重组融合蛋白。例如,哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),联合载体如来自人巨细胞病毒的主要立即早期基因启动子元件是抗体或其变体的有效表达系统。在一个特定实施方案中,编码本文所提供的融合蛋白的核苷酸序列的表达受组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调控。

[0288] 在细菌系统中,可以根据所表达的融合蛋白的预定用途有利地选择多种表达载体。例如,当要产生大量此类融合蛋白时,为了产生融合蛋白的药物组合物,引导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可能是需要的。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO 12:1791(1983)),其中编码序列可以单独连接到载体中与lac Z编码区同框,由此产生融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke和Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等。pGEX载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,此类融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附并结合至基质谷胱甘肽琼脂糖珠粒上,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱,从裂解的细胞中容易地纯化。pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,由此使克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0289] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可以将所关注的编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后,可以通过体外或体内重组将这一嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区域(例如区域E1或E3)将产生重组病毒,该重组病毒是有活力的并且能够在受感染的宿主中表达融合蛋白(例如参见Logan和Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359(1984))。插入的编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同步,以确保整个插入序列的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源,如天然来源和合成来源。可以通过包括适当转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见例如Bittner等人,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0290] 此外,可选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)对于蛋白质的功能可能极为重要。不同的宿主细胞对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰具有特有的特异性机

制。可以选择适当细胞系或宿主系统来确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具有供初级转录物适当加工、基因产物糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不会内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。

[0291] 对于重组蛋白的长期、高产率生产,可利用稳定表达。例如,可以将稳定表达融合蛋白的细胞系工程化。可以用受适当表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的DNA和选择性标记物来转化宿主细胞,而非使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外来DNA之后,可使工程化细胞在增菌培养基(enriched media)中生长1-2天,随后将其转入选择性培养基中。重组质粒中的选择性标记物赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定地整合到它们的染色体中并生长形成噬斑,该噬斑又可以被克隆并扩增成细胞系。这一方法可有利地用于将表达融合蛋白的细胞系工程化。此类工程化细胞系可能特别适用于筛选和评价与结合分子直接或间接相互作用的组合物。

[0292] 可以使用多种选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11:223(1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska和Szybalski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202(1992))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,Cell 22:8-17(1980))基因可分别用于tk-细胞、hgp^rt-细胞或ap^rt-细胞。此外,抗代谢物抗性也可用作选择以下基因的基础:dhfr,它赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人, Natl.Acad.Sci.USA 77:357(1980));O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527(1981));gpt,它赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan和Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072(1981));neo,它赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu和Wu,Biotherapy 3:87-95(1991));Tolstoshev,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596(1993);Mulligan,Science 260:926-932(1993);以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62:191-217(1993);May,TIB TECH 11(5):155-215(1993);以及hygro,它赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,Gene 30:147(1984))。可以常规地应用重组DNA技术领域通常已知的方法来选择所需的重组克隆,并且此类方法描述于例如以下中:Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);以及第12章和第13章,Dracopoli等人(编辑),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colberre-Garapin等人,J.Mol.Biol.150:1(1981),各文献以引用的方式整体并入本文中。

[0293] 可以通过载体扩增来增加融合蛋白的表达水平(相关评述,请参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达融合蛋白的载体系统中的标记物可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记物基因的拷贝数。由于扩增的区域与融合蛋白基因相关,故融合蛋白的产量也会增加(Crouse等人,Mol.Cell.Biol.3:257(1983))。

[0294] 宿主细胞可以用本文所提供的多种表达载体共转染。载体可含有相同的选择性标记物,由此使对应编码多肽能够同等的表达。或者,可以使用编码并能够表达多种多肽的单

一载体。编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0295] 在通过重组表达产生了本文所提供的融合蛋白后,就可以通过本领域已知的用于纯化多肽(例如免疫球蛋白分子)的任何方法,例如通过色谱法(例如离子交换色谱;亲和色谱,特别是在蛋白质A后通过针对特定抗原进行的亲和色谱;大小限定的柱色谱法,和Kappa select亲和色谱)、离心、差异溶解度,或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术对其进行纯化。此外,本文所提供的融合蛋白分子可与本文所描述或本领域另外已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0296] 在一些实施方案中,本公开还提供了免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的本文所描述的抗体中的任一者(如抗GUCY2C单结构域抗体),所述细胞毒性剂例如为化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素;细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素;或其片段)或放射性同位素。

[0297] 在一些实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于类美登素(maytansinoid)(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);奥瑞他汀(auristatin),例如单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588,以及7,498,298);海兔毒素(dolastatin);卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);以及Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环霉素(anthracycline),例如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤(methotrexate);长春地辛(vindesine);紫杉烷类(taxane),例如多西他赛(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他赛(larotaxel)、替司他赛(tesetaxel)和奥他赛(ortataxel);单端孢霉烯;以及CC1065。

[0298] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述酶活性毒素包括但不限于白喉(diphtheria)A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素(exotoxin)A链(来自绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思子毒素(abrin)A链、蒴莲素(modeccin)A链、 α -帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、多花白树毒蛋白(gelonin)、有丝分裂毒素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)及单端孢霉烯。

[0299] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合形成放射性缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于产生放射性缀合物。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素。当将放射性缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁扫描研究的放射性原子,例如^{99m}Tc或I123,或用于核磁共振(NMR)成像(又

称为磁共振成像, mri) 的自旋标记, 例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0300] 可使用多种双官能蛋白质偶合剂使抗体与细胞毒性剂缀合, 所述双官能蛋白质偶合剂为例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基) 丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基) 环己烷-1-甲酸酯 (SMCC)、亚胺基硫杂环戊烷 (IT)、酰亚胺酯的双官能衍生物 (如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐 (dimethyl adipimidate HCl))、活性酯 (如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛 (如戊二醛)、双叠氮基化合物 (如双 (对叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (如双 (对重氮苯甲酰基) -乙二胺)、二异氰酸酯 (如2,6-二异氰酸甲苯酯) 以及双活性氟化合物 (如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如, 可以如Vitetta等人, Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酰苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见 W094/11026。

[0301] 接头可以是促进缀合剂在细胞中释放的“可裂解接头”, 但本文也涵盖不可裂解接头。用于本公开的缀合物中的接头包括但不限于酸不稳定性接头 (例如脘接头)、含二硫基的接头、肽酶敏感性接头 (例如包含氨基酸, 例如包含缬氨酸和/或瓜氨酸的肽接头, 如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、光不稳定性接头、二甲基接头、硫醚接头或设计用于避开多药转运蛋白介导的抗性的亲水性接头。

[0302] 本文的免疫缀合物或ADC涵盖但不限于用交联剂试剂制备的此类缀合物, 包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SLAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB, 以及SVSB (琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜) 苯甲酸酯), 这些是可商购的 (例如购自美国伊利诺伊州罗克福德的Pierce Biotechnology, Inc.)。

[0303] 在其它实施方案中, 本文所提供的抗体与例如诊断分子缀合或重组融合。此类诊断和检测可以例如通过使抗体与可检测物质偶合来实现, 所述可检测物质包括但不限于各种酶, 例如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 辅基, 例如但不限于链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素; 荧光材料, 例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光材料, 例如但不限于鲁米诺; 生物发光材料, 例如但不限于荧光素酶、萤光素或水母发光蛋白; 化学发光材料, 例如 ^{225}Ac γ 发射、俄歇发射 (Auger-emitting)、 β 发射、 α 发射或正电子发射放射性同位素。

[0304] 5.3. 嵌合抗原受体

[0305] 另一方面, 本文提供一种嵌合抗原受体 (CAR), 该CAR包含细胞外抗原结合结构域, 该细胞外抗原结合结构域包含至少一个本文所提供的结合至GUCY2C的单结构域抗体 (例如VHH)。举例说明了包含本发明的VHH结构域的示例性CAR (即, 基于VHH的CAR), 并且它们的优越作用如下文第6节所述展示。

[0306] 在一些实施方案中, 本文所提供的嵌合抗原受体 (CAR) 包含多肽, 该多肽包含: (a) 细胞外抗原结合结构域, 该细胞外抗原结合结构域包含至少一种本文所提供的特异性结合至GUCY2C的单结构域抗体 (sdAb), 以及任选地一种或多种额外的结合结构域; (b) 跨膜结构域; 和 (c) 细胞内信号传导结构域。以下将更详细地描述每个组分和额外区域。

[0307] 5.3.1. 细胞外抗原结合结构域

[0308] 本文所述的CAR的细胞外抗原结合结构域包含一个或多个(例如1、2、3、4、5、6个或更多个中的任一者)单结构域抗体。单结构域抗体可以通过肽键或通过肽接头直接相互融合。

[0309] 单结构域抗体

[0310] 本公开的CAR包含细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域包含一种或多种单结构域抗体。sdAb可以具有相同或不同的来源,并且具有相同或不同的大小。示例性sdAb包括但不限于来自仅重链抗体(例如VHH或V_{NAR})的重链可变结构域、天然缺乏轻链的结合分子、来源于常规4链抗体的单结构域(例如V_H或V_L)、人源化仅重链抗体、由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人单结构域抗体,以及非抗体来源的工程化结构域和单结构域支架。本领域已知的或由本公开所开发的任何sdAb,包括本公开上文所述的单结构域抗体,均可用于构建本文所述的CAR。sdAb可来源于任何物种,包括但不限于小鼠、大鼠、人、骆驼、美洲驼、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。本文所涵盖的单结构域抗体还包括来自骆驼科和鲨鱼以外的物种的天然存在的单结构域抗体分子。

[0311] 在一些实施方案中,sdAb来源于天然存在的单结构域抗原结合分子,称为不含轻链的重链抗体(本文又称为“仅重链抗体”)。此类单结构域分子公开于例如WO 94/04678和Hamers-Casterman,C.等人,Nature 363:446-448(1993)中。为清楚起见,来源于天然缺乏轻链的重链分子的可变结构域在本文中称为VHH,以将其与四链免疫球蛋白的常规V_H相区别。这样的VHH分子可以来源于在骆驼科动物中,例如在骆驼、美洲驼、小羊驼、单峰骆驼、羊驼和原驼中产生的抗体。除了骆驼科动物之外的其它物种也可以产生天然缺乏轻链的重链分子,并且此类VHH在本公开的范围。此外,还涵盖VHH的人源化形式以及其它修饰和变体并且它们在本公开的范围。

[0312] 来自骆驼科动物的VHH分子是IgG分子的约1/10。它们是单一多肽,并且可能非常稳定,能抵抗极端的pH值和温度条件。另外,它们还可以抵抗蛋白酶的作用,而常规的4链抗体则不能。此外,体外表达VHH产生高产量、正确折叠的功能性VHH。此外,在骆驼科动物中产生的抗体可以识别不同于在体外通过使用抗体文库或通过骆驼科动物以外的哺乳动物进行免疫而产生的抗体所识别的那些表位的表位(参见例如W09749805)。因此,包含一个或多个VHH结构域的多特异性或多价CAR可以比包含来源于常规4链抗体的抗原结合片段的多特异性或多价CAR更高效地与靶标相互作用。由于已知VHH会结合到“不寻常的”表位,例如空腔或凹槽,故包含此类VHH的CAR的亲和力可能比常规多特异性多肽更适合治疗性治疗。

[0313] 在一些实施方案中,sdAb来源于在软骨鱼中发现的免疫球蛋白的可变区。例如,sdAb可以来源于在鲨鱼血清中发现的称为新型抗原受体(Novel Antigen Receptor,NAR)的免疫球蛋白同种型。WO 03/014161和Streltsov,Protein Sci.14:2901-2909(2005)中描述了产生来源于NAR可变区(“IgNAR”)的单结构域分子的方法。

[0314] 在一些实施方案中,sdAb是重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼化的、去免疫的和/或体外产生的(例如通过噬菌体展示选择)。在一些实施方案中,骨架区的氨基酸序列可通过骨架区中特定氨基酸残基的“骆驼化”来改变。骆驼化是指将来自常规4链抗体的(天然存在的)V_H结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基替换或取代为在重链抗体VHH结构域中相应位置处出现的一个或多个氨基酸残基。这可以通过本领域中已知的方式执行,

该方式对于本领域的技术人员来说是显而易见的。此类“骆驼化”取代优选在形成和/或存在于 V_H - V_L 界面处和/或所谓的骆驼科动物标志残基处的氨基酸位置处插入,如本文所定义(参见例如WO 94/04678;Davies和Riechmann FEBS Letters 339:285-290(1994);Davies和Riechmann,Protein Engineering 9(6):531-537(1996);Riechmann,J.Mol.Biol.259:957-969(1996);以及Riechmann和Muylldermans,J.Immunol.Meth.231:25-38(1999))。

[0315] 在一些实施方案中,sdAb是由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人单结构域抗体。参见例如US20090307787、美国专利号8,754,287、US20150289489、US20100122358和WO2004049794。在一些实施方案中,sdAb是亲和力成熟的。

[0316] 在一些实施方案中,针对特定抗原或靶标的天然存在的VHH结构域可以从骆驼科动物VHH序列的(天然或免疫)文库中获得。此类方法可能涉及或可能不涉及使用所述抗原或靶标或其至少一部分、片段、抗原决定簇或表位,使用本领域已知的一种或多种筛选技术来筛选此类文库。或者,可以使用来源于(天然或免疫)VHH文库的改良的合成或半合成文库,例如通过随机诱变和/或CDR改组等技术从(天然或免疫)HH文库获得的VHH文库。

[0317] 在一些实施方案中,单结构域抗体是从常规四链抗体产生的。参见例如EP 0 368 684;Ward等人,Nature,341(6242):544-6(1989);Holt等人,Trends Biotechnol.,21(11):484-490(2003);WO 06/030220;和WO 06/003388。

[0318] 在一些实施方案中,本文所提供的细胞外抗原结合结构域包含至少一个结合结构域,并且该至少一个结合结构域包含如本文所提供的结合至GUCY2C的单结构域抗体,例如以上第5.2节中所描述的抗GUCY2C单结构域抗体。

[0319] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb是如上文第5.2节中所述的抗GUCY2C sdAb,包括例如表7中的VHH结构域以及具有表7中那些VHH结构域中任一者的一个、两个或全部三个CDR的那些。在一些实施方案中,抗GUCY2C sdAb是骆驼科动物的、嵌合的、人的或人源化的。

[0320] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其它实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2CsdAb包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0321] 在其它实施方案中,细胞外抗原结合结构域包含两个或更多个抗原结合结构域。在这两个或更多个抗原结合结构域中,至少一个是与本文所提供的GUCY2C结合的VHH。在一些实施方案中,一个或多个另外的结合结构域也是结合至GUCY2C的VHH。在其它实施方案中,一个或多个另外的结合结构域结合至一个或多个另外的不同抗原,例如靶向一种或多种另外的不同抗原的1、2、3、4个或更多个另外的单结构域抗体结合区(sdAb)。

[0322] 在一些实施方案中,本文提供一种多价(例如二价和三价)CAR,该CAR包含多肽,所

述多肽包含：(a) 包含两个或更多个特异性结合至GUCY2C的单结构域抗体(sdAb)的细胞外抗原结合结构域；(b) 跨膜结构域；和(c) 细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，细胞外抗原结合结构域包含两个特异性结合至本文所提供的GUCY2C的单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中，细胞外抗原结合结构域包含三个特异性结合至本文所提供的GUCY2C的单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中，所述两种或更多种抗GUCY2C sdAb选自上文第5.2节中描述的那些抗GUCY2C sdAb，包括例如表7中的VHH结构域以及具有表7中的VHH结构域中的任一者的一个、两个或全部三个CDR的那些。在一些实施方案中，抗GUCY2CsdAb是骆驼科动物的、嵌合的、人的或人源化的。在一些实施方案中，两种或更多种抗GUCY2C sdAb各自独立地选自包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的抗GUCY2CsdAb。

[0323] 在其它实施方案中，本文提供了一种多特异性(例如双特异性和三特异性)CAR，该CAR包含多肽，所述多肽包含：(a) 包含特异性结合至GUCY2C的第一单结构域抗体(sdAb)的细胞外抗原结合结构域；(b) 跨膜结构域；和(c) 细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，CAR还包含特异性结合至第二抗原(例如第二肿瘤抗原)的第二单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中，CAR还包含特异性结合至第二抗原(例如第二肿瘤抗原)的第二单结构域抗体(sdAb)；和特异性结合至第三抗原(例如第三肿瘤抗原)的第三单结构域抗体(sdAb)。

[0324] 在一些实施方案中，由本公开的CAR所靶向的额外抗原是细胞表面分子。可以选择识别在与特殊疾病状态相关的靶细胞上充当细胞表面标志物的抗原的单结构域抗体。在一些实施方案中，抗原是肿瘤抗原。肿瘤表达许多蛋白质，这些蛋白质可以用作免疫反应的靶抗原，特别是T细胞介导的免疫反应。由CAR靶向的抗原可以是单个患病细胞上的抗原，或是在各自促成疾病的不同细胞上表达的抗原。由CAR靶向的抗原可能直接或间接参与疾病。在一些实施方案中，肿瘤抗原包含一种或多种与恶性肿瘤相关的抗原癌症表位。在一些实施例中，肿瘤抗原是肿瘤异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA是肿瘤细胞所特有的，并且不会出现在体内其它细胞上。TAA相关抗原不是肿瘤细胞独有的，而是在不能诱导对该抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达的。肿瘤上抗原的表达可在使免疫系统能够对抗原作出反应的条件下发生。TAA可以是在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原，此时免疫系统不成熟，并且无法做出反应，或者它们可以是通常在正常细胞上以极低水平存在但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。

[0325] 除了本文所提供的一个或多个抗原结合结构域之外，本文所提供的CAR还可以包含以下中的一者或多者：接头(例如肽接头)、跨膜结构域、铰链区、信号肽、细胞内信号传导结构域、共刺激信号传导结构域，其各自在以下都有更详细地描述。

[0326] 例如，在一些实施方案中，细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(例如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中，细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中，共刺激信号传导结构域来源于选自由以下组成的组的共刺激分子：CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。在一些实施方案中，共刺激信号传导结构域来源于CD137。在一些实施方案中，GUCY2C

CAR还包含位于细胞外抗原结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域(例如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,GUCY2C CAR还包含位于多肽的N端的信号肽(例如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N端到C端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137(4-1BB)的共刺激信号传导结构域以及来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些特定实施方案中,本文所提供的CAR从N端到C端包含:包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的CD8信号肽、包含一个或多个本文所提供的sdAb的细胞外抗原结合结构域、包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CD8铰链,包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CD8跨膜区、包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的4-1BB共刺激信号传导结构域以及包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,GUCY2C CAR是单特异性的。在一些实施方案中,GUCY2C CAR是单价的。在其它实施方案中,GUCY2C CAR是多价的。

[0327] 5.3.2. 信号肽

[0328] 本公开的CAR可以在多肽的N端处包含信号肽(又称为信号序列)。一般来说,信号肽是使多肽靶向细胞中所需位点的肽序列。在一些实施方案中,信号肽使效应分子靶向细胞的分泌途径并将允许效应分子整合和锚定至脂质双层中。适用于本文所述的CAR中的信号肽,包括天然存在的蛋白质的信号序列或合成的、非天然存在的信号序列,对于本领域技术人员而言将是显而易见的。在一些实施方案中,信号肽来源于选自由CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。在一些实施方案中,信号肽来源于CD8 α 。在一些实施方案中,CD8 α 的信号肽包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0329] 5.3.3. 铰链区

[0330] 本公开的CAR可以包含位于细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间的铰链结构域。铰链结构域是一种氨基酸区段,其一般存在于蛋白质的两个结构域之间,并且可以允许蛋白质的柔性和一个或两个结构域相对于彼此的移动。可以使用提供效应分子的此类柔性和其细胞外抗原结合结构域相对于跨膜结构域的任何氨基酸序列。

[0331] 铰链结构域可含有约10-100个氨基酸,例如约15-75个氨基酸、20-50个氨基酸或30-60个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,铰链结构域可以是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70或75个氨基酸的长度中的至少约任一种长度。

[0332] 在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域已知包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域均适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分并且赋予嵌合受体柔性。在一些实施方案中,铰链结构域来源于CD8 α 。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8 α 铰链结构域的一部分,例如含有CD8 α 的铰链结构域的至少15个(例如20、25、30、35或40个)连续氨基酸的片段。在一些实施方案中,CD8 α 的铰链结构域包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。

[0333] 抗体的铰链结构域,例如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体的铰链结构域,也适用于本文所述的pH依赖性嵌合受体系统。在一些实施方案中,铰链结构域是接合抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域属于抗体并且包含抗体的铰链结构域和抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域以及抗体的

CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中,抗体是IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区以及CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0334] 非天然存在的肽也可用作本文所述的嵌合受体的铰链结构域。在一些实施方案中,在Fc受体的细胞外配体结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域是肽接头,例如(GxS)_n接头,其中x和n可以独立地是3与12之间的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。

[0335] 5.3.4. 跨膜结构域

[0336] 本公开的CAR包含可与细胞外抗原结合结构域直接或间接融合的跨膜结构域。跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。如本文所使用,“跨膜结构域”是指在细胞膜,优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。适用于本文所述的CAR中的跨膜结构域可获自天然存在的蛋白质。或者,它可以是合成的、非天然存在的蛋白质片段,例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

[0337] 跨膜结构域基于跨膜结构域的三维结构而进行分类。例如,跨膜结构域可以形成 α 螺旋、多于一个 α 螺旋的复合物、 β 桶或能够跨越细胞的磷脂双层的任何其它稳定结构。此外,跨膜结构域还可以或替代地基于跨膜结构域拓扑结构分类,包括跨膜结构域跨膜的次数和蛋白质的取向。例如,单次跨膜蛋白跨过细胞膜一次,而多次跨膜蛋白跨过细胞膜至少两次(例如2、3、4、5、6、7次或更多次)。膜蛋白可取决于它们的末端和跨膜区段相对于细胞内外的拓扑结构而定义为I型、II型或III型。I型膜蛋白具有单个跨膜区,并且其取向使得蛋白质的N端存在于细胞脂质双层的细胞外侧,而蛋白质的C端存在于细胞质侧。II型膜蛋白也具有单个跨膜区,但其取向使得蛋白质的C端存在于细胞脂质双层的细胞外侧,而蛋白质的N端存在于细胞质侧。III型膜蛋白具有多个跨膜区段,并且可基于跨膜区段的数量以及N端和C端的位置进一步细分。

[0338] 在一些实施方案中,本文所述的CAR的跨膜结构域来源于I型单次跨膜蛋白。在一些实施方案中,来自多次跨膜蛋白的跨膜结构域也可适用于本文所述的CAR。多次跨膜蛋白可包含复合(至少2、3、4、5、6、7个或更多个) α 螺旋或 β 折叠结构。在一些实施方案中,多次跨膜蛋白的N端和C端存在于脂质双层的相对侧,例如蛋白质的N端存在于脂质双层的细胞质侧并且蛋白质的C端存在于细胞外侧。

[0339] 在一些实施方案中,CAR的跨膜结构域包含选自以下各项的跨膜结构域的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C。在一些实施方案中,跨膜结构域来

源于选自自由以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。

[0340] 在一些特定实施方案中,跨膜结构域来源于CD8a。在一些实施方案中,跨膜结构域是包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的CD8 α 的跨膜结构域。

[0341] 用于本文所述的CAR中的跨膜结构域还可包含合成的、非天然存在的蛋白质区段的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的、非天然存在的 α 螺旋或 β 折叠。在一些实施方案中,所述蛋白质区段是至少约20个氨基酸,例如至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个氨基酸。合成跨膜结构域的实例是本领域已知的,例如见于美国专利号7,052,906和PCT公开号WO 2000/032776,其相关公开内容以引用的方式并入本文中。

[0342] 本文所提供的跨膜结构域可包含跨膜区和位于跨膜结构域C端侧的细胞质区。跨膜结构域的细胞质区可以包含三个或更多个氨基酸,并且在一些实施方案中,有助于跨膜结构域在脂质双层中定向。在一些实施方案中,在跨膜结构域的跨膜区中存在一个或多个半胱氨酸残基。在一些实施方案中,在跨膜结构域的细胞质区中存在一个或多个半胱氨酸残基。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区包含带正电氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

[0343] 在一些实施方案中,跨膜结构域的跨膜区包含疏水性氨基酸残基。在一些实施方案中,本文所提供的CAR的跨膜结构域包含人工疏水性序列。例如,在跨膜结构域的C端可能存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体。在一些实施方案中,跨膜区主要包含疏水性氨基酸残基,例如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一些实施方案中,跨膜区是疏水性的。在一些实施方案中,跨膜区包含聚亮氨酸-丙氨酸序列。蛋白质或蛋白质区段的亲疏水性或者疏水性或亲水性特征可以通过本领域已知的任何方法,例如Kyte和Doolittle亲疏水性分析进行评估。

[0344] 5.3.5. 细胞内信号传导结构域

[0345] 本公开的CAR包含细胞内信号传导结构域。细胞内信号传导结构域负责激活表达CAR的免疫效应细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的专有功能。例如,T细胞的效应功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“细胞质信号传导结构域”是指转导效应功能信号并引导细胞执行专有功能的蛋白质的部分。虽然通常可以使用整个细胞质信号传导结构域,但在许多情况下,没有必要使用整条链。就使用细胞质信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可以用来替代完整链,只要它转导效应功能信号即可。因此,术语细胞质信号传导结构域意图包括足以转导效应功能信号的细胞质信号传导结构域的任何截短部分。

[0346] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含基本上由免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域组成的细胞内信号传导结构域。“初级细胞内信号传导结构域”是指以刺激方式起作用以诱导免疫效应功能的细胞质信号传导序列。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域包含称为免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的信号传导基序。如本文所使用,“ITAM”是一种保守的蛋白质基序,一般存在于许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部。这一基序可以包含由6-8个氨基酸隔开的氨基酸序列YxxL/I的两个重复,其中每个x独立地是任何氨基酸,产生保守基序YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。信号传导分子内的ITAM对于细胞内信号传导

很重要,细胞内信号转导至少部分由信号传导分子激活后ITAM中酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM还可以用作参与信号传导路径的其它蛋白质的对接位点。示例性的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列包括来源于CD3 ζ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (Fc ϵ Rib)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的序列。

[0347] 在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域由CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域组成。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域是野生型CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些实施方案中,野生型CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号结构域是CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域的功能突变体,该功能突变体包含一个或多个突变,例如Q65K。

[0348] 5.3.6. 共刺激信号传导结构域

[0349] 除了刺激抗原特异性信号外,许多免疫效应细胞还需要共刺激,以促进细胞增殖、分化和存活,以及激活细胞的效应功能。在一些实施方案中,CAR包含至少一个共刺激信号传导结构域。如本文所使用,术语“共刺激信号传导结构域”是指介导细胞内的信号转导以诱导如效应功能等免疫反应的蛋白质的至少一部分。本文所描述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,该结构域转导信号并调节由免疫细胞介导的反应,所述免疫细胞例如为T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞。“共刺激信号传导结构域”可以是共刺激分子的细胞质部分。术语“共刺激分子”是指免疫细胞(如T细胞)上的同源结合配偶体,它与共刺激配体特异性结合,由此介导免疫细胞的共刺激反应,例如但不限于增殖和存活。

[0350] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含单一共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个(例如约2、3、4个或更多个中的任一者)共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个相同的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含来自不同共刺激蛋白,例如来自本文所述的任何两种或更多种共刺激蛋白的两个或更多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含初级细胞内信号传导结构域(例如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)和一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述一个或多个共刺激信号传导结构域和所述初级细胞内信号传导结构域(例如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)通过任选的肽接头彼此融合。所述初级细胞内信号传导结构域和所述一个或多个共刺激信号传导结构域可以按任何适合的次序布置。在一些实施方案中,所述一个或多个共刺激信号结构域位于跨膜结构域与初级细胞内信号传导结构域(例如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)之间。多个共刺激信号传导结构域可以提供附加或协同的刺激作用。

[0351] 宿主细胞(例如免疫细胞)中共刺激信号传导结构域的激活可以诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬特性、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激分子的共刺激信号传导结构域可以适合用于本文所述的CAR中。共刺激信号传导结构域的类型基于例如以下因素选择:表达效应分子的免疫效应细胞的类型(例如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)和所需的免疫效应功能(例如ADCC效应)。用于CAR中的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,包括但不限于

B7/CD28家族的成员(例如B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6);TNF超家族的成员(例如4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- α /TNF- β 、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、REIT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 和TNF RII/TNFRSF1B);SLAM家族的成员(例如2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150);以及任何其它共刺激分子,例如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、GUCY2C0、CD300a/LMIR1、I类HLA、HLA-DR、伊卡洛斯(Ikaros)、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、树突状细胞C型植物血凝素(Dectin)-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)和NKG2C。

[0352] 在一些实施方案中,所述一个或多个共刺激信号传导结构域选自由以下组成的组:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合至CD83的配体。

[0353] 在一些实施方案中,本公开的CAR中的细胞内信号传导结构域包含来源于CD137的共刺激信号传导结构域(即,4-1BB)。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域和CD137的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的CD137的共刺激信号传导结构域。

[0354] 本文所描述的共刺激信号传导结构域中任一者的变体也在本公开的范围内,由此使共刺激信号传导结构域能够调节免疫细胞的免疫反应。在一些实施方案中,与野生型对应物相比,共刺激信号传导结构域包含至多10个氨基酸残基变异(例如1、2、3、4、5或8个)。此类包含一个或多个氨基酸变异的共刺激信号传导结构域可称为变体。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基突变可以引起信号转导增加和免疫反应刺激的增强。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基突变可以引起信号转导减少和免疫反应刺激的减弱。

[0355] 5.3.7. 肽接头

[0356] 本文所述的多特异性或多价CAR中的各种单结构域抗体可以通过肽接头彼此融合。在一些实施方案中,单结构域抗体在没有任何肽接头的情况下直接相互融合。连接不同单结构域抗体(例如VHH)的肽接头可以相同或不同。CAR的不同结构域也可以通过肽接头相互融合。

[0357] CAR中的每个肽接头可以取决于单结构域抗体和/或各种结构域的结构和/或功能特征而具有相同或不同的长度和/或序列。每个肽接头可以独立地选择和优化。CAR中使用的肽接头的长度、柔性程度和/或其它特性可能会对特性具有一定影响,所述特性包括但不限于对一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力。例如,可以选择较长的肽接头以确保两个相邻的结构域不会在空间上相互干扰。在一些实施方案中,短肽接头可以安置于CAR的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些实施方案中,肽接头包含柔性

残基(例如甘氨酸和丝氨酸),以使得相邻结构域可以相对于彼此自由移动。例如,甘氨酸-丝氨酸双联体可以是适合的肽接头。

[0358] 肽接头可以具有任何适合的长度。在一些实施方案中,肽接头是至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100或更多个氨基酸中至少约任一者的长度。在一些实施方案中,肽接头不超过100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5个或更少氨基酸的长度中的至少约任一者的长度。在一些实施方案中,肽接头的长度是约1个氨基酸至约10个氨基酸、约1个氨基酸至约20个氨基酸、约1个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约25个氨基酸、约5个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约30个氨基酸长、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸,或约1个氨基酸至约100个氨基酸中的任一者。

[0359] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如,来源于仅重链抗体的铰链区的序列可用作接头。参见例如W01996/34103。在一些实施方案中,肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括但不限于甘氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其它柔性接头。

[0360] 本领域已知的其它接头,例如,如W02016014789、W02015158671、W02016102965、US20150299317、W02018067992、US7741465、Colcher等人,J.Nat.Cancer Inst.82:1191-1197(1990)以及Bird等人,Science 242:423-426(1988)中所描述的接头,也可以包括在本文所提供的CAR中,各文献的公开内容均以引用的方式并入本文中。

[0361] 5.3.8. 示例性CAR

[0362] 示例性单价CAR的产生如下文第6节中所示,例如C8-CAR、C12-CAR、C13-CAR、C15-CAR、C21-CAR、C27-CAR、C30-CAR和C31-CAR。

[0363] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0364] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0365] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0366] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0367] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0368] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0369] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0370] 在一些实施方案中,本文提供了一种CAR,该CAR包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0371] 在某些实施方案中,本文所提供的CAR包含相对于下文第6节中举例说明的任一种

CAR具有一定百分比同一性的氨基酸序列。

[0372] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0373] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0374] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0375] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0376] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0377] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0378] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0379] 在一些实施方案中,本文提供了一种GUCY2C CAR,该CAR包含如下多肽,所述多肽与SEQ ID NO:55的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0380] 在一些实施方案中,本文提供一种分离的核酸,该分离的核酸编码本文所提供的GUCY2C CAR中的任一者。下文提供了关于核酸序列和载体的更详细描述。

[0381] 5.4. 工程化免疫效应细胞

[0382] 在又一方面,本文提供了包含本文所描述的CAR中的任一者的宿主细胞(例如免疫效应细胞)。

[0383] 因此,在一些实施方案中,本文提供了一种包含CAR的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a) 包含一种或多种抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b) 跨膜结构域;和(c) 细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb是如上文第5.2节中所述的抗GUCY2C sdAb,包括例如表7中的VHH结构域以及具有表7中的那些VHH结构域中任一者的一个、两个或全部三个CDR的那些。具体点说,在一些实施方案中,本文所提供的工程化免疫效应细胞的CAR中的抗GUCY2C sdAb包含:(i) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;(ii) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;(iii) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的

CDR1;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;(v)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3;(vi)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;(vii)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3;或(viii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,抗GUCY2C sdAb是骆驼科动物的、嵌合的、人的或人源化的。在一些实施方案中,跨膜结构域选自自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(例如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于选自自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。在一些实施方案中,CAR还包含位于细胞外抗原结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域(例如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,CAR还包含位于多肽的N端的信号肽(例如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N端到C端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域以及来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0384] 在一些实施方案中,本文提供了一种包含CAR的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),所述CAR包含如下多肽,所述多肽包含:(a)包含一种或多种抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其它实施方案中,本文提供了一种包含CAR的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),所述CAR包含如下多肽,所述多肽包含:(a)包含一种或多种抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域选自自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(例如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于选自自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。在一些实施方案中,CAR还包含位于细胞外抗原结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域(例如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,CAR还包含位于多肽的N端的信号肽(例如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N端到C

端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域以及来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0385] 在一些实施方案中,本文提供一种包含CAR的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),所述CAR包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55。在一些实施方案中,本文提供一种包含CAR的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),该CAR包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55。

[0386] 在其它实施方案中,提供了一种包含多特异性(例如双特异性或三特异性)嵌合抗原受体(CAR)的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),所述嵌合抗原受体包含如下多肽,该多肽包含:(a)包含特异性结合至GUCY2C的第一单结构域抗体(sdAb)和一个或多个另外的抗原结合域的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一sdAb和/或另外的sdAb是骆驼科动物的、嵌合的、人的或人源化的。在一些实施方案中,第一单结构域抗体和另外的单结构域抗体通过肽键或肽接头彼此融合。在一些实施方案中,肽接头的长度不超过约50个(例如不超过35、25、20、15、10或5个中的约任何一者)氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域选自由以下组成的组:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(例如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域来源于选自由以下组成的组的共刺激分子:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83的配体以及它们的组合。在一些实施方案中,多特异性CAR还包含位于细胞外抗原结合结构域的C端与跨膜结构域的N端之间的铰链结构域(例如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,多特异性CAR还包含位于多肽的N端的信号肽(例如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N端到C端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域以及来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0387] 在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞。在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是自体的。在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是同种异体的。

[0388] 还提供了包含(或表达)两种或更多种不同CAR的工程化免疫效应细胞。本文所述CAR中任何两者或更多者可以组合表达。CAR可以靶向不同的抗原,由此提供协同或累加作用。两种或更多种CAR可以在同一载体或不同的载体上编码。

[0389] 工程化免疫效应细胞还可以表达一种或多种治疗性蛋白质和/或免疫调节剂,例如免疫检查点抑制剂。参见例如国际专利申请号PCT/CN2016/073489和PCT/CN2016/087855,各案以引用的方式整体并入本文中。

[0390] 5.4.1. 载体

[0391] 本公开提供了用于克隆和表达本文所述CAR中的任一者的载体。在一些实施方案

中,载体适合于在真核细胞例如哺乳动物细胞中复制和整合。在一些实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘载体、单纯疱疹病毒载体及其衍生物。病毒载体技术在本领域中是众所周知的并且在例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 以及其它病毒学和分子生物学手册中有描述。

[0392] 已经开发出许多基于病毒的系统用于将基因转移至哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因传递系统提供了一个便利的平台。可以使用本领域已知的技术将异源核酸插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后,可以分离重组病毒并在体外或离体将其递送至工程化哺乳动物细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一些实施方案中,使用慢病毒载体。在一些实施方案中,使用自灭活慢病毒载体。例如,携带免疫调节剂(例如免疫检查点抑制剂)编码序列的自灭活慢病毒载体和/或携带嵌合抗原受体的自灭活慢病毒载体可以用本领域已知的方案进行包装。所得到的慢病毒载体可用于使用本领域已知的方法转导哺乳动物细胞(例如原代人T细胞)。来源于慢病毒等逆转录病毒的载体是实现长期基因转移的适合工具,因为它们允许转基因长期稳定整合以及其在后代细胞中的繁殖。慢病毒载体还具有低免疫原性,并且可以转导非增殖细胞。

[0393] 在一些实施方案中,载体包含编码本文所述CAR的核酸中的任一者。可以使用本领域中任何已知的分子克隆方法,包括例如使用限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择性标记物,将核酸克隆到载体中。在一些实施方案中,核酸可操作地连接至启动子。已经探索了用于在哺乳动物细胞中进行基因表达的多种启动子,并且本领域中已知的任何启动子都可以用于本公开中。启动子可大致分为组成型启动子或调控型启动子,例如诱导型启动子。

[0394] 在一些实施方案中,编码CAR的核酸可操作地连接至组成型启动子。组成型启动子允许异源基因(又称为转基因)在宿主细胞中组成型表达。本文涵盖的示例性组成型启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、人延伸因子-1 α (hEF1 α)、泛素C启动子(UbiC)、磷酸甘油激酶启动子(PGK)、猿猴病毒40早期启动子(SV40)和与CMV早期增强子(CAGG)偶合的鸡 β -肌动蛋白启动子。这种组成型启动子驱动转基因表达的效率已在大量研究中得到广泛比较。例如,Michael C. Milone等人比较了CMV、hEF1 α 、UbiC和PGK在原代人T细胞中驱动嵌合抗原受体表达的效率,并得出结论,hEF1 α 启动子不仅诱导最高水平的转基因表达,而且还最佳地维持在CD4和CD8人T细胞中(*Molecular Therapy*, 17(8):1453-1464(2009))。在一些实施方案中,编码CAR的核酸可操作地连接至hEF1 α 启动子。

[0395] 在一些实施方案中,编码CAR的核酸可操作地连接至诱导型启动子。诱导型启动子属于调控型启动子类别。诱导型启动子可通过一种或多种条件诱导,例如物理条件、工程化免疫效应细胞的微环境或工程化免疫效应细胞的生理状态、诱导物(即,诱导剂)或其组合。

[0396] 在一些实施方案中,诱导条件不诱导在工程化哺乳动物细胞中和/或接受药物组合物的受试者中内源基因的表达。在一些实施方案中,诱导条件选自由以下组成的组:诱导物、辐射(例如电离辐射、光)、温度(例如热)、氧化还原状态、肿瘤环境和工程化哺乳动物细胞的活化状态。

[0397] 在一些实施方案中,载体还含有选择性标记物基因或报告基因以从通过慢病毒载体转染的宿主细胞群中选择表达CAR的细胞。选择性标记物和报告基因都可以侧接适当调

控序列,以便能在宿主细胞中进行表达。例如,载体可含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调控核酸序列的表达的启动子。

[0398] 在一些实施方案中,载体包含不止一种编码CAR的核酸。在一些实施方案中,载体包含如下核酸,该核酸包含编码第一CAR的第一核酸序列和编码第二CAR的第二核酸序列,其中第一核酸通过编码自裂解肽的第三核酸序列可操作地连接至第二核酸。在一些实施方案中,自裂解肽选自自由以下组成的组:T2A、P2A和F2A。

[0399] 5.4.2. 免疫效应细胞

[0400] “免疫效应细胞”是可以执行免疫效应功能的免疫细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞至少表达Fc γ RIII并发挥ADCC效应功能。介导ADCC的免疫效应细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0401] 在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4+/CD8-、CD4-/CD8+、CD4+/CD8+、CD4-/CD8-或其组合。在一些实施方案中,T细胞在表达CAR并结合至靶细胞如GUCY2C+肿瘤细胞后产生IL-2、TFN和/或TNF。在一些实施方案中,CD8+T细胞在表达CAR并结合至靶细胞后溶解抗原特异性靶细胞。

[0402] 在一些实施方案中,免疫效应细胞是NK细胞。在其它实施方案中,免疫效应细胞可以是确定的细胞系,例如NK-92细胞。

[0403] 在一些实施方案中,免疫效应细胞由干细胞,例如造血干细胞、多能干细胞、iPS或胚胎干细胞分化得到。

[0404] 工程化免疫效应细胞通过将CAR引入免疫效应细胞如T细胞中来制备。在一些实施方案中,通过转染任一种分离的核酸或任一种上述载体将CAR引入免疫效应细胞中。在一些实施方案中,通过将蛋白质插入细胞膜中,同时使细胞穿过微流体系统,例如CELL SQUEEZE[®],将CAR引入免疫效应细胞中(参见例如美国专利申请公开号20140287509)。

[0405] 将载体或分离的核酸引入哺乳动物细胞中的方法是本领域已知的。所述载体可以通过物理、化学或生物学方法转移到免疫效应细胞中。

[0406] 用于将载体引入免疫效应细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀法、脂质转染法、粒子轰击法、显微注射法、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见例如Sambrook等人,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,ColdSpring Harbor Laboratory,New York。在一些实施方案中,通过电穿孔将载体引入细胞中。

[0407] 用于将载体引入免疫效应细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体已成为将基因插入哺乳动物细胞,例如人细胞中的最广泛使用的方法。

[0408] 用于将载体引入免疫效应细胞中的化学方法包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。

[0409] 在一些实施方案中,编码本文所述的任何CAR的RNA分子可通过常规方法(例如体外转录)制备,然后通过已知方法如mRNA电穿孔将其引入免疫效应细胞中。参见例如Rabinovich等人,Human Gene Therapy 17:1027-1035(2006)。

[0410] 在一些实施方案中,在引入载体或分离的核酸后,使经过转导或转染的免疫效应

细胞离体繁殖。在一些实施方案中,培养经过转导或转染的免疫效应细胞以使其繁殖至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中的任何时间。在一些实施方案中,对经过转导或转染的免疫效应细胞进一步评价或筛选以选出工程化哺乳动物细胞。

[0411] 可使用报告基因鉴别可能被转染的细胞并评价调控序列的功能。一般而言,报告基因是不存在于接受者生物体或组织中或者并非由接受者生物体或组织表达的基因,该基因编码的多肽的表达通过一些易于检测的特性,例如酶活性来表现。在将DNA引入接受者细胞中后的适当时间测定报告基因的表达。适合的报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei等人,FEBS Letters 479:79-82(2000))。适合的表达系统是众所周知的并且可以使用已知技术制备或商购获得。

[0412] 确认工程化免疫效应细胞中编码CAR的核酸存在的其它方法包括例如本领域技术人员众所周知的分子生物学测定,例如Southern印迹和Northern印迹、RT-PCR和PCR;生化测定,例如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学方法(例如ELISA和Western印迹)检测。

[0413] 5.4.3. T细胞的来源

[0414] 在一些实施方案中,在对T细胞进行扩增和基因修饰之前,从受试者获得T细胞的来源。T细胞可自多种来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中,可使用本领域中可获得的多种T细胞系。在一些实施方案中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的多种技术,例如Ficoll™分离,从受试者收集的一个单位的血液中获得。在一些实施方案中,细胞是通过单采术从个体的循环血液获得。单采术产物典型地含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施方案中,可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞放入适当缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在一些实施方案中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。在没有钙存在下进行的初始激活步骤可能使激活作用放大。本领域普通技术人员易于理解,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法完成,例如通过使用半自动“流通式”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5),根据制造商的说明进行。洗涤后,可将细胞再悬浮于多种生物相容性缓冲液中,例如不含Ca²⁺、不含Mg²⁺的PBS、PlasmaLyte A或其它含或不含缓冲剂的盐水溶液。或者,可以去除单采术样品中不需要的组分,并将细胞直接再悬浮于培养基中。

[0415] 在一些实施方案中,T细胞是通过裂解红细胞并耗尽单核细胞从外周血淋巴细胞分离,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘洗进行。可以通过正选择或负选择技术进一步分离特定T细胞亚群,例如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,在一些实施方案中,T细胞是通过与缀合抗CD3/抗CD28(即,3×28)的珠粒,例如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T一起培育足够长的时间段来分离,以对所希望的T细胞进行正选择。在一些实施方案中,所述时间段是约30分钟。在另一实施方案中,时间段的范围从30分钟到36小时或更长时间以及其间的所有整数值。在另一实施方案中,时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在一些实施方案中,时间段是10至24小时。在一些实施方案中,培

育时间段是24小时。对于从白血病患者分离T细胞,使用较长的培育时间,例如24小时,可以增加细胞产量。与其它细胞类型相比,在存在较少T细胞的任何情况下,可以使用较长的培育时间来分离T细胞,例如从肿瘤组织或免疫功能不全个体体内分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。此外,使用较长的培育时间可以增加CD8⁺T细胞的捕获效率。因此,在一些实施方案中,通过简单地缩短或延长允许T细胞结合至CD3/CD28珠粒的时间和/或通过增加或减少珠粒与T细胞的比率,可以优先选择在起始培养时或在过程期间的其它时间点时的T细胞亚群。此外,通过增加或减少珠粒或其它表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以优先选择在起始培养时或其它所需时间点时的T细胞亚群。技术人员将认识到,也可以使用多轮选择。在一些实施方案中,可能需要执行选择程序并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。“未选择的”细胞也可以再经历多轮选择。

[0416] 利用针对负选择的细胞特有的表面标记物的抗体的组合,可以通过负选择富集T细胞群。一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,该方法使用针对负选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物典型地包括针对CD14、GUCY2C、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可能需要富集或正选择典型地表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的调节性T细胞。或者,在某些实施方案中,通过缀合抗C25的珠粒或其它类似的选择方法耗尽调节性T细胞。

[0417] 为了通过正选择或负选择分离所需的细胞群,可以改变细胞的浓度和表面(例如颗粒,如珠粒)。在某些实施方案中,可能需要明显减少珠粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/毫升的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/毫升的浓度。在另一实施方案中,使用超过1亿个细胞/毫升。在另一实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/毫升的细胞浓度。在又另一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500或10000万个细胞/毫升的细胞浓度。在另一实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/毫升的浓度。使用高浓度可能会引起增加的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更高效地捕获可能较弱地表达所关注靶抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞,或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群可能具有治疗价值,而这将是期望获得的。在一些实施方案中,使用高浓度细胞允许更高效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0418] 在一些实施方案中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过明显稀释T细胞和表面(例如颗粒,如珠粒)的混合物,将最大限度地减少颗粒与细胞之间的相互作用。这将选择表达大量所需抗原以结合到颗粒上的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达较高水平的CD28,并且在稀释浓度下其捕获效力高于CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,使用的细胞浓度是 5×10^6 个/毫升。在一些实施方案中,使用的浓度可以是约 1×10^5 个/毫升至 1×10^6 个/毫升,以及其间的任何整数倍。

[0419] 在一些实施方案中,细胞可以在2-10°C或室温下在旋转器上以不同速度培育不同时间长度。

[0420] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻。不受理论的束缚,冷冻和随后的解冻步骤可以通过去除细胞群中的粒细胞并在某种程度上去除单核细胞而提供更均一的产物。

在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮于冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并且在这一情形中 useful,但一种方法涉及使用含有20% DMSO和8% 人血清白蛋白的PBS,或含有10% 葡聚糖40和5% 右旋糖、20% 人血清白蛋白和7.5% DMSO,或31.25% plasmalyte-A、31.25% 右旋糖5%、0.45% NaCl、10% 葡聚糖40和5% 右旋糖、20% 人血清白蛋白和7.5% DMSO的培养基或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它适合的细胞冷冻培养基。然后,将细胞以每分钟1°的速度冷冻至-80°C,并储存在液氮储罐的气相中。可以使用其它控制性冷冻方法以及在-20°C或液氮中立即不受控制的冷冻的方法。

[0421] 在一些实施方案中,如本文所述,将冷冻保存的细胞解冻并进行洗涤,并在激活前在室温下静置一小时。

[0422] 本公开还涵盖在可能需要本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采术产物。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩增的细胞源,并分离和冷冻所需的细胞,例如T细胞,以供以后用于T细胞疗法,用于治疗可获益于T细胞疗法的多种疾病或疾患,例如本文所述的那些。在一个实施方案中,血液样品或单采术成分取自基本上健康的受试者。在某些实施方案中,血液样品或单采术成分取自有发展疾病风险但尚未发展疾病的基本上健康的受试者,并且分离和冷冻所关注的细胞备用。在某些实施方案中,T细胞可以被扩增、冷冻并在以后使用。在某些实施方案中,在如本文所述诊断出特定疾病后不久但在任何治疗之前,从患者收集样品。在另一实施方案中,在多种相关治疗模式之前,从来自受试者的血液样品或单采术成分分离细胞,所述治疗包括但不限于用例如以下剂治疗:那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化学疗法、放射、免疫抑制剂如环孢菌素(cyclosporin)、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤(methotrexate)、霉酚酸酯和FK506、抗体或其它免疫消融剂如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和照射。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导(雷帕霉素)很重要的p70S6激酶(Liu等人,Cell 66: 807-815 (1991); Henderson等人,Immun 73:316-321 (1991); Bierer等人,Curr.Opin.Immun.5:763-773 (1993))。在另一实施方案中,将患者的细胞分离并冷冻以供以后与骨髓或干细胞移植、使用化学治疗剂如氟达拉滨、外照射放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH进行的T细胞消融疗法结合使用(例如在所述疗法之前、同时或之后使用)。在另一实施方案中,细胞被预先分离并且可以被冷冻以供以后用于B细胞消融疗法之后的治疗,例如与GUCY2C反应的剂,例如Rituxan。

[0423] 在一些实施方案中,T细胞是在治疗后直接从患者获得的。就这一点而言,据观察,在某些癌症治疗之后,特别是使用破坏免疫系统的药物治疗后,在治疗后不久患者通常从治疗中恢复的时期内,获得的T细胞的质量可能是最佳的或它们离体扩增的能力得到改善。同样,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可处于增强植入和体内扩增的较佳状态。因此,经考虑,在本公开的上下文中,在这一恢复阶段期间收集血细胞,包括T细胞、树突状细胞或造血谱系的其它细胞。此外,在某些实施方案中,可使用动员(例如用GM-CSF动员)和调理方案在受试者体内创造有利于尤其是在治疗后确定的时间窗口期间特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增的条件。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突状细胞和免疫系统的其它细胞。

[0424] 5.4.4. T细胞的激活和扩增

[0425] 在一些实施方案中,在使用本文所述的CAR对T细胞进行基因修饰之前或之后,一般可使用例如美国专利号6,352,694、6,534,055、6,905,680、6,692,964、5,858,358、6,887,466、6,905,681、7,144,575、7,067,318、7,172,869、7,232,566、7,175,843、5,883,223、6,905,874、6,797,514、6,867,041;以及美国专利申请公开号20060121005中所描述的方法来激活并扩增细胞。

[0426] 一般来说,T细胞可以通过与附接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞表面上共刺激分子的配体的表面接触来扩增。具体点说,可以如本文所述,例如通过使T细胞群与抗CD3抗体或其抗原结合片段或者固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过使T细胞群与蛋白激酶C激活物(例如苔藓抑素(bryostatin))以及钙离子载体接触来刺激T细胞群。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用了结合该辅助分子的配体。例如,T细胞群可以在适合刺激T细胞增殖的条件下与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD3抗体的实例包括UCHT1、OKT3、HIT3a(BioLegend, San Diego, US),可以如同本领域公知的其它方法一般使用(Graves J等人, *J. Immunol.* 146:2102(1991); Li B等人, *Immunology* 116:487(2005); Rivollier A等人, *Blood* 104:4029(2004))。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France),可以如同本领域公知的其它方法一般使用(Berg等人, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977(1998); Haanen等人, *J. Exp. Med.* 190(9):13191328(1999); Garland等人, *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63(1999))。

[0427] 在一些实施方案中,T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以通过不同的方案提供。例如,提供每个信号的剂可以在溶液中或与表面偶合。当与表面偶合时,所述剂可与同一表面(即,以“顺式”形式)或独立的表面(即,以“反式”形式)偶合。或者,一种剂可以与表面偶合,而另一种药剂在溶液中。在一个实施方案中,提供共刺激信号的剂结合到细胞表面并且提供初级激活信号的剂在溶液中或与表面偶合。在某些实施方案中,两种剂都可以在溶液中。在另一实施方案中,所述剂可以是可溶形式,然后与表面交联,例如表达Fc受体的细胞或者将结合所述剂的抗体或其它结合剂。就这一点而言,关于人工抗原呈递细胞(aAPC),参见例如美国专利申请公开号20040101519和20060034810,在本公开的某些实施方案中考虑将aAPC用于激活和扩增T细胞。

[0428] 在一些实施方案中,将T细胞与涂有剂的珠粒组合,随后将珠粒和细胞分离,然后培养细胞。在一个替代性实施方案中,在培养之前,所述涂有剂的珠粒和细胞未被分离,而是一起培养。在另一实施方案中,首先通过施加力,例如磁力来浓缩珠粒和细胞,使细胞表面标志物的连接增加,由此诱导细胞刺激。

[0429] 例如,可以通过使附接有抗CD3和抗CD28的顺磁性珠粒(3×28 个珠粒)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一个实施方案中,将细胞(例如 10^4 至 4×10^8 个T细胞)和珠粒(例如推荐滴度为1:100的抗CD3/CD28 MACSi珠粒)组合于缓冲液,优选PBS(不含二价阳离子,如钙和镁)中。本领域的普通技术人员可以容易地理解,可以使用任何细胞浓度。例如,样品中靶细胞可能非常稀少,仅占样品的0.01%,或者整个样品(即,100%)可包含所关注的靶细胞。因此,任何细胞数量都在本公开的情形中。在某些实施方案中,可能需要明显减小将颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用约20亿个细胞/毫升的浓度。在另一实施方案中,使用超过1亿个细

胞/毫升。在另一实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/毫升的细胞浓度。在又另一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500或10000万个细胞/毫升的细胞浓度。在另一实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/毫升的浓度。使用高浓度可能会引起增加的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更高效地捕获可能较弱地表达所关注靶抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞。此类细胞群可能具有治疗价值,并且在某些实施方案中将是期望获得的。例如,使用高浓度细胞允许更高效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0430] 在一些实施方案中,混合物可培养数小时(约3小时)至约14天或在两者之间的任何以小时计的整数值。在另一实施方案中,混合物可以培养21天。在一个实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养约八天。在另一实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养2-3天。还可能需若干刺激周期,由此使T细胞的培养时间可以是60天或更长时间。适合T细胞培养的条件包括适当培养基(例如最低必需培养基或RPMI培养基1640,或X-vivo 15(Lonza)),该培养基可含有增殖和生存力所必需的因子,包括血清(例如胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α ,或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂,如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,其中添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,或者不含血清或补充有适量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使T细胞生长和扩增的量的一种或多种细胞因子。抗生素,例如青霉素和链霉素,只包括在实验培养物中,而不包括在打算输注给受试者的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所必需条件下,例如适当温度(例如37 $^{\circ}$ C)和大气(例如空气加5% CO₂)。暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如,典型的血液或单采的外周血单核细胞产物具有多于细胞毒性或抑制性T细胞群(TC, CD8⁺)的辅助T细胞群(TH, CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体而离体扩增的T细胞产生T细胞群,该T细胞群在约第8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,该T细胞群包含越来越庞大的TC细胞群。因此,根据治疗的目的,给受试者输注主要由TH细胞组成的T细胞群可以是有利的。类似地,如果已经分离出一个抗原特异性的TC细胞亚群,则将该亚群扩增至更大程度可以是有利的。

[0431] 另外,除了CD4和CD8标志物以外,其它表型标志物也有显著变化,但在很大程度上在细胞扩增过程中是可重现的。因此,这种重现性使得能够有能力定制用于特定目的的激活的T细胞产物。

[0432] 5.5. 多核苷酸

[0433] 在某些实施方案中,本公开提供了编码结合至GUCY2C的单结构域抗体和包含本文所述的结合至GUCY2C的单结构域抗体的融合蛋白的多核苷酸。本公开的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链的或单链的,并且单链可以是编码链或非编码(反义)链。在一些实施方案中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施方案中,多核苷酸是合成多核苷酸。

[0434] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:3序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:11的核酸。

[0435] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:4序列的

单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:12的核酸。

[0436] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:5序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:13的核酸。

[0437] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:6序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:14的核酸。

[0438] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:7序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:15的核酸。

[0439] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:8序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:16的核酸。

[0440] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:9序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:17的核酸。

[0441] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:10序列的单结构域抗体的序列,例如具有SEQ ID NO:18的核酸。

[0442] 在某些实施方案中,本公开提供了编码本文所提供的GUCY2C CAR的多核苷酸。本公开的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链的或单链的,并且单链可以是编码链或非编码(反义)链。在一些实施方案中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施方案中,多核苷酸是合成多核苷酸。

[0443] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:48序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:56的核酸。

[0444] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:49序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:57的核酸。

[0445] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:50序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:58的核酸。

[0446] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:51序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:59的核酸。

[0447] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:52序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:60的核酸。

[0448] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:53序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:61的核酸。

[0449] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:54序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:62的核酸。

[0450] 在示例性实施方案中,本文所提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:55序列的CAR的序列,例如具有SEQ ID NO:63的核酸。

[0451] 本公开还涉及本文所述的多核苷酸的变体,其中所述变体编码例如本公开的结合GUCY2C的单结构域抗体或CAR的片段、类似物和/或衍生物。在一些实施方案中,本公开提供一种多核苷酸,该多核苷酸包含具有与编码本公开的结合GUCY2C的单结构域抗体或CAR的多核苷酸有至少约75%同一性、至少约80%同一性、至少约85%同一性、至少约90%同一性、至少约95%同一性并且在一些实施方案中至少约96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列的多核苷酸。如本文所使用,短语“具有与参照核苷酸序列有至少例如95%同一性的

核苷酸序列的多核苷酸”旨在表示,除对于参照核苷酸序列中每100个核苷酸,该多核苷酸序列可以包括至多五个点突变外,该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同。换句话说,为了获得具有与参照核苷酸序列有至少95%同一性的核苷酸序列的多核苷酸,参照序列中至多5%的核苷酸可以被缺失或被另一种核苷酸置换,或者占参照序列的总核苷酸中至多5%数目的核苷酸可以被插入到参照序列中。参照序列的这些突变可以出现在参照核苷酸序列的5'或3'末端位置处或这些末端位置之间的任何位置处,或者个别地散布于参照序列的核苷酸间,或者散布于参照序列内的一个或多个连续基团中。

[0452] 多核苷酸变体可以在编码区、非编码区或两者含有改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失但不改变所编码多肽的特性或活性的改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体包含不会引起多肽的氨基酸序列的变化的沉默取代(由遗传密码的简并性引起)。多核苷酸变体可以出于多种原因产生,例如为了优化针对特定宿主的密码子表达(即,将人mRNA中的密码子变为细菌宿主如大肠杆菌偏好的密码子)。在一些实施方案中,多核苷酸变体在序列的非编码区或编码区中包含至少一个沉默突变。

[0453] 在一些实施方案中,产生多核苷酸变体来调节或改变所编码多肽的表达(或表达水平)。在一些实施方案中,产生多核苷酸变体以增加所编码多肽的表达。在一些实施方案中,产生多核苷酸变体以降低所编码多肽的表达。在一些实施方案中,与母体多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有增加的所编码多肽的表达。在一些实施方案中,与亲本多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有减少的所编码多肽的表达。

[0454] 还提供载体,所述载体包含一个或多个本文所提供的核酸分子。在一个实施方案中,可以将核酸分子并入重组表达载体中。本公开提供了重组表达载体,所述重组表达载体包含本公开的核酸中的任一者。如本文所使用,术语“重组表达载体”是指经过基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列,并且载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时,该构建体允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本文所述的载体并非整体天然存在的;然而,载体的各部分可以是天然存在的。所描述的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,它们可以是单链或双链的、合成的或部分地从天然来源获得的,并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接,或两种类型的连接。非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连接不会阻碍载体的转录或复制。

[0455] 在一个实施方案中,本公开的重组表达载体可以是任何适合的重组表达载体,并且可用于转化或转染任何适合的宿主。适合的载体包括被设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者的载体,例如质粒和病毒。载体可以选自由以下组成的组:pUC系列(Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, Md.)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pET系列(Novagen, Madison, Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)和pEX系列(Clontech, Palo Alto, Calif.)。可以使用噬菌体载体,例如λGT10、λGT11、λEMBL4和λMM1149、λZapII(Stratagene)。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI01.2、pBI121、pBI101.3和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体,例如γ逆转录病毒载体。

[0456] 在一个实施方案中,重组表达载体是使用例如上述Sambrook等人和上述Ausubel

等人中所描述的标准重组DNA技术制备的。环状或线性表达载体的构建体可以制备成含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可以来源于例如ColE1、SV40、2 μ 质粒、 λ 、牛乳头瘤病毒等。

[0457] 重组表达载体可包含调控序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,它们视情况对打算引入载体的宿主类型(例如细菌、植物、真菌或动物)具有特异性,并考虑载体是基于DNA还是基于RNA的。

[0458] 重组表达载体可以包括一种或多种标记物基因,这些基因允许选择转化或转染的宿主。标记物基因包括杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中进行补充以提供原养型等。用于所述表达载体的适合的标记物基因包括例如新霉素/G418抗性基因、组氨酸x抗性基因、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0459] 重组表达载体可包含可操作地连接至本公开的核苷酸序列的天然或标准启动子。启动子的选择,例如强启动子、弱启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子和发育特异性启动子,在技术人员的普通技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技能范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、RSV启动子、SV40启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。

[0460] 重组表达载体可被设计用于瞬时表达、稳定表达或两者。此外,还可以制备重组表达载体用于组成型表达或诱导型表达。

[0461] 另外,可以将重组表达载体制备成包括自杀基因。如本文所使用,术语“自杀基因”是指使表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是这样一种基因,该基因赋予表达该基因的细胞对剂例如药物的敏感性,并且当细胞接触或暴露于该剂时使该细胞死亡。自杀基因是本领域已知的并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0462] 在某些实施方案中,多核苷酸是分离的。在某些实施方案中,多核苷酸是基本上纯的。

[0463] 还提供了宿主细胞,所述宿主细胞包含本文所述的核酸分子。宿主细胞可以是含有异源核酸的任何细胞。异源核酸可以是载体(例如表达载体)。例如,宿主细胞可以是来自以任何方式选择、修饰、转化、生长、使用或操作的任何生物体的细胞,用于由细胞产生物质,例如由细胞表达基因、DNA或RNA序列、蛋白质或酶。可以确定适当的宿主。例如,可以基于载体骨架和期望的结果来选择宿主细胞。举个例子,可以将质粒或粘粒引入原核生物宿主细胞中,用于复制几种类型的载体。细菌细胞,例如但不限于DH5 α 、JM109和KCB、SURE®感受态细胞和SOLOPACK Gold细胞,可用作载体复制和/或表达的宿主细胞。此外,大肠杆菌LE392等细菌细胞也可用作噬菌体病毒的宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于酵母(例如YPH499、YPH500和YPH501)、昆虫和哺乳动物。用于载体复制和/或表达的哺乳动物真核宿主细胞的实例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、Saos、PCI2、SP2/0(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, CRL-1581)、NS0(欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures, ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503)、FO(ATCC CRL-1646)和Ag653(ATCC CRL-1580)鼠细胞系。示例性人骨髓瘤细胞系是U266(ATCC CRL-TIB-196)。其它有用

的细胞系包括来源于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的细胞系,例如CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD)、CHO-K1 (ATCC CRL-61) 或DG44。

[0464] 5.6. 药物组合物

[0465] 一方面,本公开还提供药物组合物,所述药物组合物包含本公开的单结构域抗体、包含单结构域抗体的结合分子或治疗分子,或工程化免疫效应细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的本公开的单结构域抗体、包含该单结构域抗体的结合分子或治疗分子,或工程化免疫效应细胞,以及药学上可接受的赋形剂。

[0466] 在一些实施方案中,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的本文所提供的单结构域抗体和药学上可接受的赋形剂。

[0467] 在一些实施方案中,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的治疗分子(例如融合蛋白、免疫缀合物和多特异性结合分子),所述治疗分子包含本文所提供的单结构域抗体;和药学上可接受的赋形剂。

[0468] 在其它实施方案中,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的包含本文所提供的单结构域抗体的CAR和药学上可接受的赋形剂。

[0469] 在其它实施方案中,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的本文所提供的工程化免疫效应细胞和药学上可接受的赋形剂。

[0470] 在其它实施方案中,本文提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的本文所提供的核酸(例如在载体中)和药学上可接受的赋形剂,例如适于基因疗法。

[0471] 在一个特定实施方案中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全或不完全弗氏佐剂)、载剂或媒介物。药物赋形剂可以是无菌液体如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。也可采用盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂。适合药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。必要时,组合物还可以含有微量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放配制物等形式。适合的药物赋形剂的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA中。此类组合物将含有预防或治疗有效量的本文所提供的活性成分,例如呈纯化形式,以及适量的赋形剂,以便提供适合施用给患者的形式。配制物应适合施用模式。

[0472] 在一些实施方案中,赋形剂的选择部分地由特定细胞、结合分子和/或抗体和/或施用方法决定。因此,存在多种适合的配制物。

[0473] 典型地,可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠;防腐剂;等渗剂;稳定剂;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);螯合剂,例如EDTA;和/或非离子表面活性剂。

[0474] 尤其是当稳定性取决于pH值时,缓冲剂可用于将pH值控制在优化治疗效果的范围。适用于本公开的缓冲剂包括有机酸和无机酸及其盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。此外,缓冲剂可包含组氨酸和三甲胺盐,例如Tris。

[0475] 可以添加防腐剂以延缓微生物的生长。适用于本公开的防腐剂包括十八烷基二甲

基苯甲基氯化铵;六甲氯铵(hexamethonium chloride);苯扎卤铵(benzalkonium halide)(例如苯扎氯铵、苯扎溴铵、苯扎碘铵)、苄索氯铵(benzethonium chloride);硫柳汞、苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,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。

[0476] 可以存在张力剂,有时称为“稳定剂”,以调整或维持组合物中液体的张力。当与蛋白质和抗体等带电大分子一起使用时,它们通常被称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用,由此降低分子间和分子内相互作用的可能性。示例性张力剂包括多元糖醇、三元或更高级糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0477] 另外的示例性赋形剂包括:(1)增积剂、(2)溶解增强剂、(3)稳定剂以及(4)防止变性或粘附到容器壁上的剂。此类赋形剂包括:多元糖醇(列举于上);氨基酸,如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,例如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌糖(myoinisitose)、肌醇(myoinisitol)、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环糖醇(例如肌醇(inositol))、聚乙二醇;含硫还原剂,如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠等;低分子量蛋白质,如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其它免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖,如棉子糖;以及多糖,如糊精或葡聚糖。

[0478] 可以存在非离子型表面活性剂或清洁剂(又称为“润湿剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白质免于发生搅动诱导的聚集,这也允许配制物暴露于剪切表面应力,而不会引起活性治疗性蛋白质或抗体的变性。适合的非离子型表面活性剂包括例如聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等);泊洛沙姆(polyoxamer)(184、188等);**PLURONIC®**多元醇;**TRITON®**;聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(**TWEEN®-20**、**TWEEN®-80**等);聚桂醇(lauromacrogol)400;硬脂酸聚羟氧40酯;聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60;单硬脂酸甘油酯;蔗糖脂肪酸酯;甲基纤维素;以及羧甲基纤维素。可以使用的阴离子清洁剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子清洁剂包括苯扎氯铵或苄索氯铵。

[0479] 为了将药物组合物用于体内施用,它们优选是无菌的。可通过经无菌滤膜过滤来使药物组合物无菌。一般可将药物组合物放到具有无菌接管口的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0480] 施用途径遵循已知的和公认的方法,例如通过以适合的方式单次或多次推注或经长时间输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径注射或输注;体表施用;吸入;或通过持续释放或延长释放方式施用。

[0481] 在另一实施方案中,药物组合物可以作为控制释放或持续释放系统提供。在一个实施方案中,可以使用泵来实现控制释放或持续释放(参见例如Sefton, Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201-40(1987);Buchwald等人,Surgery 88:507-16(1980);以及Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:569-74(1989))。在另一实施方案中,可使用聚合物材料实现预防剂或治疗剂(例如本文所述的融合蛋白)或本文所提供的组合物的控制释放或持续释放(参见例如Medical Applications of Controlled Release(Langer和Wise编,1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance(Smolten和

Ball编,1984);Ranger和Peppas,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61-126(1983);Levy等人,Science 228:190-92(1985);During等人,Ann.Neurol.25:351-56(1989);Howard等人,J.Neurosurg.71:105-12(1989);美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326;PCT公开号W0 99/15154和W0 99/20253)。持续释放配制物中使用的聚合物实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酞、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)以及聚原酸酯。在一个实施方案中,持续释放配制物中使用的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,储存稳定,无菌并且是生物可降解的。在另一实施方案中,控制释放或持续释放系统可以放在特定靶组织,例如鼻孔或肺的附近,由此只需要全身剂量的一部分即可(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release第2卷,115-38(1984))。控制释放系统论述于例如Langer,Science 249:1527-33(1990)中。本领域技术人员已知的任何技术都可用于产生包含一种或多种本文所述的剂的持续释放配制物(参见例如美国专利号4,526,938;PCT公开号W0 91/05548和W0 96/20698;Ning等人,Radiotherapy&Oncology 39:179-89(1996);Song等人,PDA J.of Pharma.Sci.&Tech.50:372-97(1995);Cleek等人,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-54(1997);以及Lam等人,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-60(1997))。

[0482] 本文所述的药物组合物还可以含有多于一种治疗特定适应症所需的活性化合物或剂。或者或另外,所述组合物可包含细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。此类分子适合以有效达成预定目的的量组合存在。

[0483] 活性成分还可以被覆埋于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊中,例如覆埋于分别在胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或微乳液中的羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0484] 多种组合物和递送系统是已知的并且可以与本文所提供的治疗剂一起使用,包括但不限于囊封于脂质体、微粒、微胶囊、能够表达本文所提供的单结构域抗体或治疗分子的重组细胞中,构建核酸作为逆转录病毒或其它载体等的一部分。

[0485] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量(例如治疗有效量或预防有效量)的结合分子和/或细胞。在一些实施方案中,治疗或预防功效是通过受治疗受试者的定期评估来监测。对于历经数天或更长时间的重复施用,取决于疾患,重复治疗直至疾病症状出现所希望的抑制为止。然而,其他给药方案也可为有用的并且可以被确定的。

[0486] 5.7.方法和用途

[0487] 另一方面,本文提供了本文所提供的GUCY2C结合分子的使用方法和用途,所述结合分子包括抗GUCY2C VHH、嵌合抗原受体(CAR)和/或表达重组受体的工程化细胞。

[0488] 5.7.1.治疗方法和用途

[0489] 此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如涉及将分子、细胞或含有它们的组合物施用给患有表达GUCY2C或与GUCY2C表达相关和/或其中细胞或组织表达GUCY2C的疾病、疾患或病症的受试者。在一些实施方案中,所述分子、细胞和/或组合物是以有效量施用以

实现疾病或病症的治疗。用途包括抗体和细胞在此类方法和治疗中的用途,以及在制备药剂以实施此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,所述方法通过向患有或疑似患有疾病或疾患的受试者施用抗体或细胞或者包含它们的组合物来实施。在一些实施方案中,所述方法由此治疗受试者的疾病或病症。

[0490] 在一些实施方案中,本文所提供的治疗引起疾病或病症,或者症状、不良反应或结果,或与其相关的表型的完全或部分改善或减轻。理想的治疗效果包括但不限于:预防疾病的发生或复发;缓解症状;减轻疾病的任何直接或间接病理学后果;预防转移;降低疾病进展的速率;改善或缓和疾病状态;以及缓解或改善预后。这些术语包括但不暗示完全治愈疾病或者完全消除任何症状或对所有症状或结果的影响。

[0491] 如本文所使用,在一些实施方案中,本文所提供的治疗延迟疾病或病症的发展,例如延缓、阻碍、减慢、延迟、稳定、抑制和/或推迟疾病(例如癌症)的发展。取决于病史和/或所治疗的个体,这种延迟可以有不同的时间长度。本领域技术人员将显而易见,充分或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会发展疾病或病症。例如,可延迟晚期癌症,如转移的发展。在其它实施方案中,本文所提供的方法或用途预防疾病或病症。

[0492] 在一些实施方案中,疾病或病症是GUCY2C相关疾病或病症。在一些实施方案中,疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,癌症是结直肠癌、胃癌或食道癌。

[0493] 在一些实施方案中,所述方法包括过继细胞疗法,由此将表达所提供的靶向GUCY2C的CAR的基因工程化细胞施用给受试者。此类施用可以通过靶向GUCY2C的方式促进细胞激活(例如T细胞激活),由此靶向破坏疾病或病症的细胞。

[0494] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞或含有所述细胞的组合物施用给受试者、组织或细胞,例如患有、有风险或疑似患有疾病或病症的受试者、组织或细胞。在一些实施方案中,将细胞、群体和组合物施用给患有待治疗的特定疾病或病症的受试者,例如通过过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法进行治疗。在一些实施方案中,将细胞或组合物施用给受试者,例如患有疾病或病症或者有患疾病或病症风险的受试者。在一些实施方案中,所述方法由此治疗例如改善疾病或病症的一种或多种症状,例如通过减轻表达GUCY2C的癌症中的肿瘤负担。

[0495] 施用细胞用于过继细胞疗法的方法是已知的,如例如美国专利申请公开号2003/0170238;美国专利号4,690,915;Rosenberg, Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85(2011); Themeli等人, Nat Biotechnol. 31(10):928-933(2013); Tsukahara等人, Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9(2013);以及Davila等人, PLoS ONE 8(4):e61338(2013)所述。这些方法可以与本文所提供的方法和组合物结合使用。

[0496] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继T细胞疗法)是通过自体转移进行,其中将细胞从打算接受该细胞疗法的受试者或来源于这名受试者的样品分离和/或以其它方式制备。因此,在一些方面,细胞来源于需要治疗的受试者,并且将这些细胞在分离和处理后施用给同一受试者。在其它实施方案中,细胞疗法(例如过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中将细胞从受试者分离和/或以其它方式制备,该受试者并非打算接受或最终会接受该细胞疗法的受试者,例如第一名受试者。在此类实施方案中,接着,将细胞施用给同一物种的不同受试者,例如第二名受试者。在一些实施方案中,第一名受试者和第二名受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一名受试者和第二名受试者在遗传上相似。在一

些实施方案中,第二名受试者表达与第一名受试者相同的HLA类别或超型。

[0497] 在一些实施方案中,被施用细胞、细胞群或组合物的受试者是灵长类动物,例如人。受试者可以是男性或女性,并且可以是任何适合的年龄,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。在一些实例中,受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果的经过验证的动物模型。

[0498] GUCY2C结合分子,例如VHH和含有VHH的嵌合受体以及表达它们的细胞,可以通过任何适合的方式施用,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下注射(subconjunctival injection)、结膜下注射、眼球筋膜下注射、眼球后注射、眼球周注射或后巩膜旁递送。在一些实施方案中,它们通过肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要用于局部治疗,则通过病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0499] 有效预防和/或治疗疾病或疾患的本文所提供的预防剂或治疗剂的量可通过标准临床技术确定。有效剂量可由体外或动物模型测试系统得到的剂量-反应曲线外推的得到。为预防或治疗疾病,结合分子或细胞的适当剂量将取决于待治疗疾病或病症的类型、结合分子的类型、疾病或病症的严重程度和病程、治疗剂是出于预防还是治疗目的施用、既往疗法、患者的病史和对剂的反应,以及主治医师的判断。在一些实施方案中,所述组合物、分子和细胞抗体适于一次性或经一系列治疗施用给患者。

[0500] 例如,取决于疾病的类型和严重程度,抗体的剂量可包括约10ug/kg至100mg/kg或更多。可以间歇地施用多次剂量。可最初施用较高负荷剂量,随后施用一次或多次较低剂量。在所述药物组合物包含本文所述的单结构域抗体中的任一者的一些实施方案中,所述药物组合物以每天约10ng/kg至约100mg/kg个体的体重或更多的剂量施用,例如约1mg/kg/天至10mg/kg/天,这取决于施用途径。文献中提供了关于特定剂量和递送方法的指导(参见例如美国专利号4,657,760、5,206,344和5,225,212)。

[0501] 在含有结合分子的基因工程化细胞的情况下,在一些实施方案中,可以向受试者施用范围为约一百万至约一十亿个细胞和/或每千克体重该数量的细胞。在药物组合物包含本文所述的工程化免疫细胞中的任一者的一些实施方案中,所述药物组合物以约 10^4 至 10^9 个细胞/千克个体的体重的剂量施用。剂量可取决于疾病或病症和/或患者和/或其它治疗特有的属性而变化。

[0502] 在一些实施方案中,药物组合物被施用一次。在一些实施方案中,药物组合物被施用多次(例如2、3、4、5、6次或更多次中的任一者)。在一些实施方案中,药物组合物在给药周期期间被施用一次或多次。给药周期可以是例如1、2、3、4、5周或更多周,或1、2、3、4、5个月或更多个月。特定患者的最佳剂量和治疗方案可以由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病征象并相应地调整治疗来确定。

[0503] 在一些实施方案中,将细胞或抗体作为组合治疗的一部分施用,例如与另一种治疗干预,例如另一种抗体或工程化细胞或受体或剂,例如细胞毒性剂或治疗剂同时或以任何顺序依次施用。

[0504] 在一些实施方案中,将细胞或抗体与一种或多种另外的治疗剂或结合另一种治疗干预共施用,即,同时或以任何顺序依次施用。在一些情况下,将细胞与另一种疗法在足够接近的时间共施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些

实施方案中,细胞或抗体在一种或多种另外的治疗剂之前施用。在一些实施方案中,细胞或抗体在一种或多种另外的治疗剂之后施用。

[0505] 在某些实施方案中,在将细胞施用给哺乳动物(例如人)后,就通过多种已知方法中的任一种来测量工程化细胞群和/或抗体的生物活性。要评估的参数包括工程化或天然T细胞或其它免疫细胞与抗原的特异性结合,在体内例如通过成像测量,或离体例如通过ELISA或流式细胞术测量。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何适合方法,例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009);和Herman等人.J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中所描述的细胞毒性测定来测量工程化细胞破坏靶细胞的能力。在某些实施方案中,细胞的生物活性也可以通过测定某些细胞因子如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量。在一些方面,生物活性通过评估临床结果,例如肿瘤负担或负荷的降低来测量。

[0506] 在一些特定实施方案中,本文提供一种用于治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用结合分子,该结合分子包含如以上第5.2节中所描述的结合至GUCY2C的单结构域抗体,包括例如具有表7中的CDR的那些,例如抗GUCY2C sdAb包含:(i)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3;(ii)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;(iii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;(v)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3;(vi)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;(vii)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3;或(viii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,adAb包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,疾病或病症是GUCY2C相关疾病或病症。在一些实施方案中,疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,癌症是结直肠癌、胃癌或食道癌。

[0507] 在其它实施方案中,本文提供了一种用于治疗疾病或病症的方法,该方法包括向受试者施用如第5.4节中所提供的工程化免疫效应细胞(例如T细胞),包括例如第5.3节中所提供的包含CAR的细胞。在一些实施方案中,向受试者施用的工程化免疫细胞包含CAR,所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含一种或多种抗GUCY2C sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中抗GUCY2C sdAb是如上文第5.2节中所述,包括例如具有表7中的CDR的那些,例如抗GUCY2C sdAb包含:(i)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:35的氨基

酸序列的CDR3; (ii) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3; (iii) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3; (iv) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3; (v) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3; (vi) 包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3; (vii) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3; 或 (viii) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3。本发明工程化细胞的CAR中的sdAb还包括包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的sdAb, 以及包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的sdAb。在一些实施方案中, 施用给受试者的工程化免疫细胞包含CAR, 该CAR包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55, 或包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽: SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55。在一些实施方案中, 疾病或病症是GUCY2C相关疾病或病症。在一些实施方案中, 疾病或病症是癌症。在一些实施方案中, 癌症是结直肠癌、胃癌或食道癌。

[0508] 5.7.2. 诊断和检测方法及用途

[0509] 在另一方面, 本文所提供的方法涉及使用本文所提供的结合分子, 例如结合GUCY2C的VHH和含有此类VHH的分子(例如缀合物和复合物)进行特定治疗与一种或多种组织或细胞类型的结合的检测、预后、诊断、分期、确定, 和/或告知受试者治疗决策的方法, 所述方法例如通过检测GUCY2C和/或抗体所识别的其表位的存在进行。

[0510] 在一些实施方案中, 提供了用于诊断或检测方法中的抗GUCY2C抗体(例如本文所述的抗GUCY2C单结构域抗体中的任一者)。在另一方面, 提供一种检测生物样品中GUCY2C的存在的方法。在某些实施方案中, 所述方法包括检测生物样品中GUCY2C蛋白的存在。在某些实施方案中, GUCY2C是人GUCY2C。在一些实施方案中, 所述方法是与表达GUCY2C的疾病或病症相关的诊断和/或预后方法。一些实施方案中, 所述方法包括将生物样品与抗体一起施用和/或用抗体探测生物样品, 和/或将抗体施用给受试者。在某些实施方案中, 生物样品包括细胞或组织或其部分, 例如肿瘤或癌组织或活组织检查样品或其切片。在某些实施方案中, 接触在允许抗GUCY2C抗体与样品中存在的GUCY2C结合的条件下进行。在一些实施方案中, 该方法还包括检测抗GUCY2C抗体与样品中的GUCY2C之间是否形成复合物, 例如检测这种结合的存在或不存在或水平。此方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中, 抗GUCY2C抗体被用于选择有资格用抗GUCY2C抗体或工程化抗原抗体治疗的受试者, 例如其中GUCY2C是

用于选择患者的生物标记物。

[0511] 在一些实施方案中,使样品如细胞、组织样品、裂解物、组合物或来源于它们的其它样品与抗GUCY2C抗体接触并确定或检测抗体与样品(例如样品中的GUCY2C)之间的结合或复合物的形成。当与相同组织类型的参照细胞相比,展示或检测到测试样品中的结合时,它可能表明存在相关疾病或病症,和/或含有所述抗体的治疗剂将特异性结合至与作为样品来源的组织或细胞或其它生物材料相同或属于同一类型的组织或细胞。在一些实施方案中,样品来自人组织并且可以来自患病和/或正常组织,例如来自患有待治疗疾病或病症的受试者和/或来自与该受试者相同的物种但未患待治疗疾病或病症的受试者。在一些情况下,正常组织或细胞来自患有待治疗疾病或病症的受试者,但其本身不是患病细胞或组织,例如来自与给定受试者体内存在的癌症相同或不同的器官的正常组织。

[0512] 可以使用本领域已知的用于检测特异性抗体-抗原结合的多种方法。示例性免疫测定包括荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、比浊抑制免疫测定(nephelometric inhibition immunoassay, NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。可以使用指示剂部分或标记基团来满足该方法各种用途的需求,这些通常由测定设备的可用性和相容免疫测定程序决定。示例性标记包括放射性核素(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P 和/或铬(^{51}Cr)、钴(^{57}Co)、氟(^{18}F)、钆(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、锗(^{68}Ge)、钬(^{166}Ho)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、碘(^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、镧(^{140}La)、镥(^{177}Lu)、锰(^{54}Mn)、钼(^{99}Mo)、钯(^{103}Pd)、磷(^{32}P)、镨(^{142}Pr)、钷(^{149}Pm)、铼(^{186}Re 、 ^{188}Re)、铑(^{105}Rh)、钌(^{97}Ru)、钐(^{153}Sm)、钪(^{47}Sc)、硒(^{75}Se)、(^{85}Sr)、硫(^{35}S)、锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、锡(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、氦(^3H)、氙(^{133}Xe)、镱(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、钇(^{90}Y)、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶或 β -半乳糖苷酶)、荧光部分或蛋白质(例如荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP或BFP)或发光部分(例如由加利福尼亚州帕洛阿托(Palo Alto, Calif.)的Quantum Dot Corporation供应的QdotTM纳米粒子)。用于进行上述各种免疫测定的各种通用技术是已知的。

[0513] 在某些实施方案中,提供了标记的抗体(例如抗GUCY2C单结构域抗体)。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(例如荧光、发色团、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记),以及间接检测,例如通过酶促反应或分子相互作用检测的部分,例如酶或配体。在其它实施方案中,抗体未被标记,并且其存在可以使用结合至任何抗体的被标记的抗体来检测。

[0514] 5.8. 试剂盒和制品

[0515] 还提供了包含本文所述的单结构域抗体、嵌合抗原受体或工程化免疫效应细胞中的任一者的试剂盒、单位剂量和制品。在一些实施方案中,提供一种试剂盒,该试剂盒含有本文所述的药物组合物中的任一者并且优选地提供其使用说明。

[0516] 本申请的试剂盒在适合的包装中。适合的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、柔性包装(例如密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。试剂盒可以任选地提供另外的组分,例如缓冲液和解释信息。因此,本申请还提供了制品,所述制品包括小瓶(例如密封小瓶)、瓶子、广口瓶、柔性包装等。

[0517] 所述制品可包含容器及在该容器上或与该容器相关联的标签或药品说明书。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。所述容器可由如玻璃或塑料等多种材料形成。一般来说,所述容器装有有效治疗本文所述的疾病或病症(例如癌症)的组合物,并且可具有无

菌接取口(例如该容器可以是具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。标签或药品说明书指示所述组合物被用于治疗个体的特定疾患。标签或药品说明书还将包含有关将组合物施用给个体的说明。标签可以指示关于复原和/或使用的指导。装有药物组合物的容器可以是多次使用的小瓶,由此允许复原配制物的重复施用(例如2-6次施用)。药品说明书是指示市售治疗产品的包装中惯常包括的说明,所述说明含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。另外,所述制品还可包括包含药学上可接受的缓冲液的第二容器,所述缓冲液例如为注射用抑菌水(BWFT)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可包括从商业和用户的观点看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0518] 试剂盒或制品可包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明,以足以在药房,例如医院药房和配药房中储存和使用的量包装。

[0519] 为简明起见,本文使用了某些缩写词。一个实例是表示氨基酸残基的单字母缩写。氨基酸及其对应的三字母和单字母缩写如下:

	氨基酸	三字母	单字母
	丙氨酸	Ala	(A)
	精氨酸	Arg	(R)
	天冬酰胺	Asn	(N)
	天冬氨酸	Asp	(D)
	半胱氨酸	Cys	(C)
	谷氨酸	Glu	(E)
	谷氨酰胺	Gln	(Q)
	甘氨酸	Gly	(G)
	组氨酸	His	(H)
[0520]	异亮氨酸	Ile	(I)
	亮氨酸	Leu	(L)
	赖氨酸	Lys	(K)
	甲硫氨酸	Met	(M)
	苯丙氨酸	Phe	(F)
	脯氨酸	Pro	(P)
	丝氨酸	Ser	(S)
	苏氨酸	Thr	(T)
	色氨酸	Trp	(W)
	酪氨酸	Tyr	(Y)
	缬氨酸	Val	(V)

[0521] 本公开在本文中大体上使用描述多个实施方案的肯定性语言进行公开。本公开还特定地包括完全或部分地排除物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析等特

定主题的实施方式。因此,即使本公开在本文中大体上未通过本公开不包括的内容来表述,但本文中仍公开未明确包括在本公开中的各个方面。

[0522] 已描述本公开的多个实施方式。然而,应理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可作出各种修改。因此,以下实施例打算说明而非限制权利要求书中所描述的本公开的范围。

实施例

[0523] 以下是研究中所使用的各种方法和材料的描述,并且为本领域普通技术人员提供有关如何进行和使用本公开的完整公开内容和描述,而不意图限制发明人视为其公开内容的范围,也不打算代表以下实验为所进行且可以进行所有实验。应当理解,未必执行以现在时编写的示例性描述,而是可以执行这些描述以生成与本公开的教导内容相关联的数据等。已经努力确保关于所使用的数值(例如量、百分比等)的准确性,但也应考虑一些实验误差和偏差。

[0524] 6.1. 实施例1-抗GUCY2C VHH的制备

[0525] 羊驼的免疫

[0526] 人工合成的GUCY2C蛋白的细胞外区域由南京金斯瑞生物技术有限公司(Nanjing GenScript Biotechnology Co.,Ltd.)合成(序列UniProtKB:P25092,Ser24-Gln430)以用于羊驼免疫。它包含SEQ ID NO:1的核酸序列和SEQ ID NO:2的氨基酸序列(见表1)。每次将100ug GUCY2C蛋白与佐剂等体积混合。仅在初次免疫中使用弗氏完全佐剂,而其它免疫则使用弗氏不完全佐剂。羊驼每周免疫七次,以刺激B细胞表达抗原特异性纳米抗体。在免疫期间,抽取少量羊驼的外周血进行抗体滴度测试。免疫后,抽取200ml羊驼的外周血,并用Trizol提取总RNA。

[0527] 表1.GUCY2C肽序列

[0528]	描述	序列	SEQ ID NO.
--------	----	----	------------

[0529]

<p>GUCY2C 蛋白 (Ser24-Gln430) (核酸)</p>	<p>TCTCAAGTGTCCCAGAACTGCCACAACG GCAGCTACGAGATCAGCGTGCTGATGATG GGCAACAGCGCCTTTGCCGAGCCTCTGA AGAACCTGGAAGATGCCGTGAACGAAGG CCTGGAAATCGTGCGAGGCAGACTGCAG AATGCCGGCCTGAACGTGACCGTGAACG CCACCTTTATGTACAGCGACGGCCTGATC CACAACAGCGGCGACTGTAGAAGCAGCA CCTGTGAAGGACTGGACCTGCTGCGGAA GATCAGCAACGCCAGAGAATGGGCTGT GTGCTGATCGGCCCTAGCTGCACCTACAG CACCTTCCAGATGTACCTGGACACCGAGC TGAGCTACCCCATGATCAGCGCCGGATCT TTCGGCCTGAGCTGCGACTACAAAGAGA CACTGACCCGGCTGATGAGCCCCGCCAG AAAGCTGATGTACTTCTGGTCAACTTCT GGAAAACGAACGACCTGCCTTTCAAGAC CTACAGCTGGTCCACCAGCTACGTGTACA AGAACGGCACCGAGACAGAGGACTGCTT CTGGTATCTGAACGCCCTGGAAGCCAGCG TGTCTACTTTTCTCACGAGCTGGGCTTC AAGGTGGTGCTGCGGCAGGACAAAGAGT TCCAGGACATCCTGATGGACCACAACCGG AAGTCCAACGTGATCATCATGTGCGGCGG ACCCGAGTTCCTGTACAAGCTGAAAGGC GATAGAGCCGTGGCCGAGGACATCGTGAT CATTCTGGTGGATCTGTTCAACGACCAGT ACTTCGAGGACAATGTGACAGCCCCTGAC TACATGAAGAACGTGCTGGTGCTGACACT GAGCCCCGGCAACAGTCTGCTGAACAGC AGCTTCAGCCGGAATCTGAGCCCCACCA AGAGAGATTTGCCCCTGGCCTACCTGAAC GGCATCCTGCTGTTTGGCCACATGCTGAA GATCTTTCTCGAAAACGGCGAGAACATCA CGACCCCTAAGTTCGCCACGCCTTCCGG AACCTGACCTTCGAGGGATATGACGGCCC CGTGACACTGGATGACTGGGGAGATGTG GACAGCACAATGGTGCTGCTGTACACCAG CGTGGACACCAAAAAGTACAAAGTGCTG CTGACCTACGACACCCACGTGAACAAGA CATACCCCGTGGACATGAGCCCTACCTTC ACATGGAAGAACAGCAAGCTGCCCAACG ACATCACCGGCAGAGGACCTCAG</p>	<p>SEQ ID NO: 1</p>
--	--	-------------------------

[0530]	<p>GUCY2C 蛋白 (Ser24-Gln430) (氨基酸)</p> <p>SQVSNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLK NLEDAVNEGLEIVRGRQLQAGLNVTVNATF MYSGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNA QRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMI SAGSFGLSCDYKETLTRLMSARKLMYFLV NFWKTNDLPFKTYSWSTSIVYKNGTETED CFWYLNALASVSYFSHELGFKVVLRQDK EFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLG DRAVAEDIVIILVDFNDQYFEDNVTAPDY MKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDF ALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITPKFA HAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVL LYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDM PTFTWKNKLPNDITGRGPQ</p>	<p>SEQ ID NO: 2</p>
--------	--	-------------------------

[0531] 纳米抗体噬菌体文库的构建

[0532] 使用提取的总RNA,通过逆转录试剂盒PrimeScript II第1链cDNA合成试剂盒(Takara)合成cDNA,并通过两步PCR扩增VHH链。通过第一次PCR获得重链抗体基因。使用cDNA作为PCR模板,将覆盖免疫球蛋白IgG的上游和下游引物添加至PCR系统中以扩增IgG的不同亚型,然后通过TaKaRa MiniBEST琼脂糖凝胶DNA提取试剂盒回收IgG2和IgG3基因。通过第二次PCR获得带有限制位点的VHH基因。将通过第一次PCR回收的基因片段用作模板。将覆盖含SacI和SpeI限制位点的IgG2和IgG3重链区的VHH序列的引物添加至PCR系统中以扩增大量VHH DNA用于噬菌体文库。最后,用DNA纯化试剂盒纯化PCR产物。

[0533] VHH基因和pComb3XSS的限制性消化、连接、电转化和噬菌体文库鉴别

[0534] 将在第二次PCR中获得的VHH基因序列和质粒pComb3XSS(addgene)用限制酶SacI(NEB)和SpeI(NEB)消化,并放入37°C水浴,保持4小时。纯化并回收后,将样品与T4 DNA连接酶一起在4°C培育过夜。然后,将200ug重组质粒添加至TG1大肠杆菌感受态细胞中并用电穿孔仪进行电穿孔。然后,添加SOC培养基并将混合物在37°C的恒温箱中旋转1小时。取200μL按10倍梯度稀释的细菌溶液刮于2×YT固体板上,并将细菌在37°C恒温箱中培养过夜。次日,根据板上的菌落数计算文库容量为 1×10^8 个CFU。随机选取二十三个克隆,并将设计用于pComb3XSS的上游和下游引物添加至PCR反应系统中进行菌落PCR反应。确定噬菌体文库的插入率为95%以上(图1)。随机选取100个克隆并送往安徽通用生物有限公司(Anhui Generalbio Co.,Ltd.)进行测序。有效插入率大于90%,证明建文库成功构建。

[0535] 针对GUCY2C蛋白的纳米抗体筛选

[0536] 将蛋白质GUCY2C溶解于0.1mM pH7.2 PBS中,取5ug蛋白质包被于高亲和力ELISA板上,并在4°C培育过夜。次日,去除包被蛋白,并添加5%BSA,将ELISA板在室温密封2小时。去除封闭溶液,然后将 1×10^{11} CFU噬菌体添加至ELISA板上,并在室温培育1小时。将未结合的噬菌体用PBST(PBS+0.05%Tween20)洗涤8次。将结合的噬菌体用0.1M pH2.0甘氨酸洗脱8分钟,并添加2M Tris以停止反应。将洗脱的噬菌体用于对数生长期的TG1菌感染,并将噬菌体从TG1细菌扩增并纯化以用于下一轮筛选。重复相同的筛选方法3次,并利用连续筛选的噬菌体,通过Elisa检测阳性克隆。

[0537] 将3轮筛选的噬菌体转染至HB2151细菌中,并取100uL受感染的HB2151细菌刮于2×YT-AG固体培养皿的表面上。挑取96个单克隆并添加至2×YT培养基中,然后在96深孔板

中培养。当细菌生长到对数生长期时,在培养基中加入0.8mM IPTG,并在25℃培养过夜。将培养基上清液添加到两个对照孔中所包含的1 μ g/ml GUCY2C包被的ELISA板中。在37℃培育2小时后,用PBST洗涤板3次。将过氧化物酶AffiniPure山羊抗羊驼IgG (Peroxidase AffiniPure Goat anti-Alpaca IgG)VHH结构域(Jackson Immuno Research)添加至到Elisa板中,在37℃培育1小时并用PBST洗涤3次。添加TMB溶液,保持20分钟,然后用2M硫酸停止反应。在微孔板读取器上读取在450nm波长处的吸光度值(图2)。吸光度值是阴性对照的2.1倍的克隆被认为是阳性克隆并送去测序。

[0538] 示例性VHH结构域的氨基酸和核酸序列显示于表2中,并且这些示例性VHH结构域的示例性CDR序列(根据Kabat编号系统)显示于下表3中。这些示例性VHH结构域的比对如图3中所示,图中显示了这些完整序列以及CDR区中有较高百分比的共享氨基酸。CDR1具有共同序列 X_1YGMX_2 ,其中 X_1 是A、I或V,并且 X_2 是D或G(SEQ ID NO:64)。CDR2具有共同序列 $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$,其中 X_3 是A、S或T; X_4 是F、W或Y; X_5 是S或T; X_6 是E、N或T; X_7 是A、S或T;并且 X_8 是K或Q(SEQ ID NO:65)。CDR3具有共同序列 $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$,其中 X_9 是A、E或P; X_{10} 是P或T; X_{11} 是S或T; X_{12} 是G或V(SEQ ID NO:66)。

[0539] 表2. 示例性VHH结构域的核酸和氨基酸序列

[0540]

描述	序列	SEQ ID NO.
C08 (氨基酸)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIF RAYGMGWYRQAPGKQREMVAIWLSGRT EYADAVQGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCNAGPPTATSVRQYWGGGTQ VTVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 3
C12 (氨基酸)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIF RAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGRS TYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLK PEDTAVYYCNAGPTTASSVRQYWGGGTQ VTVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 4
C13 (氨基酸)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIF RAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGRT TYTDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCNAGAPTASSGRQYWGGGTQ VTVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 5
C15 (氨基酸)	MQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASSNI FRAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGR STYTDAVQGRFTISRDNKNTVYLQMNNL KPEDTAVYYCNAGPTTASSVRQYWGGGT QVTVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 6
C21 (氨基酸)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIF RIYGMDWYRQAPGKQREIVATIYLSGRTTY SDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCNAGEPTASSVRQYWGGGTQVT VSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 7
C27 (氨基酸)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIF KIYGMDWYRQAPGKQREIVATIYLSGRTT YSDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLKP EDTAVYYCNAGETTASSVRQYWGGGTQV TVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 8
C30 (氨基酸)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF RVYGMDWYRQAPGKQRELVASIFLSGRTN YADAVKGRFTLSRDNKNTMYLQMNSLK PEDTAVYYCNAGETTASSVRQYWGGGTQ VTVSSEPKTPKP	SEQ ID NO: 9

[0541]

C31 (氨基酸)	MAVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF RVYGMDWYRQAPGKQRELVASIWLSGRT NYADAVKGRFTLSRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCNAGETTASSVRQYWGQGT QVTISSEPKTPKP	SEQ ID NO: 10
C08 (核酸)	ATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACA TCTTCAGAGCCTATGGCATGGGGTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAAA TGGTCGCGGCTATTTGGCTCAGTGGTCGC ACAGAGTATGCTGACGCCGTGCAGGGCC GATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCCAA GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTCCCCCTACAGCAACT TCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGGA CCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAA GACACCAAACCA	SEQ ID NO: 11
C12 (核酸)	ATGCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACA TCTTCAGAGCCTATGGCATGGATTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGAAAGCAGCGCGAAA TGGTCGCGACTATCTGGCTGAGTGGTCGC TCAACGTATACTGACGCCGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAAC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTCCCACTACGGCAAG TTCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCA AGACACCAAACCA	SEQ ID NO: 12
C13 (核酸)	ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACA TCTTCAGAGCCTATGGCATGGACTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAAA TGGTCGCGACTATCTGGCTTAGTGGTCGC ACAACGTATACTGACGCCGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA	SEQ ID NO: 12

[0542]

	GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTGCCCTACGGCAAG TTCCGGCCGTCAATACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCA AGACACCAAAAACCA	
C15 (核酸)	ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGGGTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAATA TCTTTAGAGCCTATGGCATGGATTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGAAAGCAGCGCGAAA TGGTCGCGACTATCTGGCTGAGTGGTCGC TCAACGTATACTGACGCCGTACAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAAC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTCCCACTACGGCAAG TTCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCA AGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 14
C21 (核酸)	ATGCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTACAAGCTCTTCAAACA TCTTCAGAATCTATGGCATGGACTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAAA TAGTCGCGACTATCTATCTTAGTGGTCGC ACAACGTATAGTGACGCCGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GGACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTGAACCTACGGCAAG TTCCGTCCGTCACTACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCA AGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 15
C27 (核酸)	ATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTACAAGCTCTTCAAACA TCTTCAAATCTATGGCATGGACTGGTAC CGCCAGGCTCCAGGGAACAGCGCGAAA TAGTCGCGACTATCTATCTTAGTGGTCGC ACAACGTATAGTGACGCCGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA	SEQ ID NO: 16

[0543]	GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACACC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATT ACTGTAATGCAGGTGAAACTACGGCAAG TCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGG ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCA AGACACCAAACCA	
[0544]	C30 (核酸) ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGC ATCTTCAGAGTCTATGGCATGGACTGGTA CCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGA GTTGGTCGCGTCTATTTTCTTAGTGGTA GGACAAACTATGCAGACGCCGTGAAGGG CCGATTCACGCTCTCCAGAGATAACGCCA AGAATACTATGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTA TTGTAATGCAGGTGAAACTACGGCAAGT TCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGGA CCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAA GACACCAAACCA	SEQ ID NO: 17
[0544]	C31 (核酸) ATGGCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGC ATCTTCAGAGTCTATGGCATGGACTGGTA CCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGA GTTGGTCGCGTCTATTTGGCTTAGTGGTA GGACAAACTATGCAGACGCCGTGAAGGG CCGATTCACGCTCTCCAGAGATAACGCCA AGAATACGATGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTA TTGTAATGCAGGTGAAACTACGGCAAGT TCCGTCCGTCAATACTGGGGCCAGGGGA CCCAGGTCACCATCTCCTCGGAACCCAA GACACCAAACCA	SEQ ID NO: 18

[0545] 表3. 示例性VHH结构域的CDR氨基酸序列

描述	序列	SEQ ID NO.
[0546] C08-CDR1	AYGMG	SEQ ID NO: 19
C12-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 20
C13-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 21
C15-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 22
C21-CDR1	IYGMD	SEQ ID NO: 23
C27-CDR1	IYGMD	SEQ ID NO: 24
C30-CDR1	VYGMD	SEQ ID NO: 25
C31-CDR1	VYGMD	SEQ ID NO: 26
C08-CDR2	AIWLSGRTEYADAVQG	SEQ ID NO: 27
C12-CDR2	TIWLSGRSTYTDVAVKG	SEQ ID NO: 28
C13-CDR2	TIWLSGRTTYTDVAVKG	SEQ ID NO: 29
C15-CDR2	TIWLSGRSTYTDVAVQG	SEQ ID NO: 30
C21-CDR2	TIYLSGRTTYSDAVKG	SEQ ID NO: 31
C27-CDR2	TIYLSGRTTYSDAVKG	SEQ ID NO: 32
C30-CDR2	SIFLSGRNTYADAVKG	SEQ ID NO: 33
C31-CDR2	SIWLSGRNTYADAVKG	SEQ ID NO: 34
[0547] C08-CDR3	GPPTATSVRQY	SEQ ID NO: 35
C12-CDR3	GPTTASSVRQY	SEQ ID NO: 36
C13-CDR3	GAPTASSGRQY	SEQ ID NO: 37
C15-CDR3	GPTTASSVRQY	SEQ ID NO: 38
C21-CDR3	GEPTASSVRQY	SEQ ID NO: 39
C27-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 40
C30-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 41
C31-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 42

[0548] 6.2. 实施例2-嵌合抗原受体的构建

[0549] 使用pLVX-Puro载体作为模板对载体pLVX-WT-G1进行修饰,其中将pLVX-Puro载体中的CMV启动子转化进EF1a启动子,并将嵌合抗原受体的部分序列插入在启动子后的EF1a中。所述序列由CD8铰链、CD8跨膜区、4-1BB和CD3z组成,其氨基酸序列分别为SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 46,如下表4中所示。转化的载体示于图4A中。将包含CD8信号肽和抗GUCY2C VHH的优化序列通过连接插入到pLVX-WT-G1载体的CD8铰链后以构建基于抗GUCY2C VHH的嵌合抗原受体载体pLVX-WT-G1-VHH-CAR。CD8信号肽包含SEQ ID NO: 47的氨基酸序列(见表41)。

[0550] 示例性构建的嵌合抗原受体的氨基酸和核酸序列如表5中所示。

[0551] 表4. 示例性CAR中各区域的序列

	描述	序列	SEQ ID NO.
[0552]	CD8 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACD	SEQ ID NO: 43
	CD8 TM	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY C	SEQ ID NO: 44
	4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	SEQ ID NO: 45
[0553]	CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	SEQ ID NO: 46
	CD8 单肽	MALPVTALLLPLALLLHAARP	SEQ ID NO: 47

[0554] 表5. 示例性CAR的序列

[0555]

描述	序列	SEQ ID NO.
C08-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMG WYRQAPGKQREMVAIWL SGRTEYADA VQGRFTVSRDNAKNTVYLQMNSLKPED TAVYYCNAGPPTATSVRQYWGQGTQVT VSSEPKTPKPTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	SEQ ID NO: 48
C12-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMD WYRQAPGKQREMVATIWL SGRSTYTDA VKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPED TAVYYCNAGPTTASSVRQYWGQGTQVT VSSEPKTPKPTSTTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	SEQ ID NO: 49
C13-CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVES	SEQ ID NO:

[0556]

(氨基酸)	GGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMD WYRQAPGKQREMVATIWL SGRTTYTDA VKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDT AVYYCNAGAPTASSGRQYWGQGTQVT SSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	50
C15-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMD WYRQAPGKQREMVATIWL SGRSTYTDA VQGRFTISRDN AKNTVYLQMNNLKPED TAVYYCNAGPTTASSVRQYWGQGTQVT VSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	SEQ ID NO: 51
C21-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIFRIYGMD WYRQAPGKQREIVATIYLSGRTTYSDAV KGRFTISRDN AKDTVYLQMNSLKPEDTA VYYCNAGEPTASSVRQYWGQGTQVTVS SEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR	SEQ ID NO: 52
C27-CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVES	SEQ ID NO:

[0557]

(氨基酸)	GGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIFKIYGMD WYRQAPGKQREIVATIYLSGRTTYSDAV KGRFTISRDNANTVYVYLMNTLKPEDTA VYYCNAGETTASSVRQYWGQGTQVTVS SEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR	53
C30-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVYGM WYRQAPGKQRELVASIFLSGRTNYADAV KGRFTLSRDNAKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCNAGETTASSVRQYWGQGTQVTV SSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 54
C31-CAR (氨基酸)	MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVYGM WYRQAPGKQRELVASIWLSGRTNYADA VKGRFTLSRDNAKNTMYLQMNSLKPED TAVYYCNAGETTASSVRQYWGQGTQVT ISSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 55
C08-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0558]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGGA GTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAACCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTATGGC ATGGGGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAAATGGTCGCGGCTATT TGGCTCAGTGGTCGCACAGAGTATGCT GACGCCGTGCAGGGCCGATTCACCGTC TCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGT GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCGTCCTATTACTGTAAT GCAGGTCCCCCTACAGCAACTTCCGTC CGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACA CCAAACCAACTAGTACCACGACGCCA GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT GGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT TTA CTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	56
C12-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0559]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAGGTACAGCTGGTGGG GTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAACCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTATGGC ATGGATTGGTACCGCCAGGCTCCAGGA AAGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTATC TGGCTGAGTGGTCGCTCAACGTATACT GACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATC TCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGT GTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACC TGAGGACACGGCCGTCCTATTACTGTAAT GCAGGTCCCCTACGGCAAGTTCCGTC CGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACA CCAAAACCAACTAGTACCACGACGCCA GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT GGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT TACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	57
C13-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0560]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGGGA GTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAACCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTATGGC ATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTATC TGGCTTAGTGGTCGCACAACGTATACT GACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATC TCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGT GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCGTCCTATTACTGTAAT GCAGGTGCCCTACGGCAAGTTCCGGC CGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACA CCAAACCAACTAGTACCACGACGCCA GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT GGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT TTA CTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	58
C15-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0561]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGGGA GTCTGGGGGAGGGGTGGTGCAACCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTTCAAATATCTTTAGAGCCTATGG CATGGATTGGTACCGCCAGGCTCCAGG AAAGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTAT CTGGCTGAGTGGTCGCTCAACGTATAC TGACGCCGTACAGGGCCGATTCACCAT CTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGG TGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTA ATGCAGGTCCCCTACGGCAAGTTCCG TCCGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGA CACCAAAACCAACTAGTACCACGACGC CAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC CTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGC GGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGG GGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACAT CTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGG GGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACC CTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAA ACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTA TGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAG AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACT GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG CAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	59
C21-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0562]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAGGTACAGCTGGTGG GTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAACCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAAG CTCTTCAAACATCTTCAGAATCTATGGC ATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAGCAGCGCGAAATAGTCGCGACTATC TATCTTAGTGGTCGCACAACGTATAGTG ACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGGACACGGTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAT GCAGGTGAACCTACGGCAAGTTCCGTC CGTCAGTACTGGGGCCAGGGGACCCA GGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGAC ACCAAAACCAACTAGTACCACGACGCC AGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGC CCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCC TGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG GCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGG GCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATC TGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGG GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCC TTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTAT GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAG AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGG ACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAA CCCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACT GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG CAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	60
C27-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0563]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTGGGA GTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAACCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAAG CTCTTCAAACATCTTCAAATCTATGGC ATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGG AAACAGCGCGAAATAGTCGCGACTATC TATCTTAGTGGTCGCACAACGTATAGTG ACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTG TATCTGCAAATGAACACCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAT GCAGGTGAAACTACGGCAAGTTCCGTC CGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACA CCAAAACCAACTAGTACCACGACGCCA GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT GGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT TACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG AGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA	61
C30-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

[0564]

(核酸)	CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGGGA GTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGAAGCATCTTCAGAGTCTATGG CATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGG GAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCGTCTAT TTTTCTTAGTGGTAGGACAAACTATGCA GACGCCGTGAAGGGCCGATTCACGCTC TCCAGAGATAACGCCAAGAATACTATGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTAATGC AGGTGAAACTACGGCAAGTTCCGTCCG TCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGT CACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACACC AAAACCAACTAGTACCACGACGCCAGC GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGC GCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCG GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGG GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTC CTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTT ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTC CTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA GACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAG AGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACG CCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAC CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC CTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTGC AGAAAGATAAGATGGCCGGAGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA GGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA GGCCCTGCCCCCTCGCTAA	62
C31-CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC	SEQ ID NO:

<p>(核酸)</p>	<p>CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCGGCGGTGCAGCTGGTGG GTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGAAGCATCTTCAGAGTCTATGG CATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGG GAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCGTCTAT TTGGCTTAGTGGTAGGACAAACTATGC AGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACGCT CTCCAGAGATAACGCCAAGAATACGAT GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTAAT GCAGGTGAAACTACGGCAAGTTCCGTC CGTCAATACTGGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCATCTCCTCGGAACCCAAGACA CAAAACCAACTAGTACCACGACGCCA GCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCT GGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGG TCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT TTA CTGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGA AGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGA GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC GCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAAGAAGGCCTGTACAATGAACTG CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCC TTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGCTAA</p>	<p>63</p>
-------------	--	-----------

[0565]

[0566] 慢病毒包装

[0567] 利用DMEM/10%FBS作为培养基来回收293T细胞,并在37℃、5%CO2恒温箱中培养。

在包装病毒的前一天,将细胞消化并在25cm²烧瓶中培养至50%汇合。感染细胞时,将载体pLVX-WT-G1-VHH-CAR与辅助载体VSVG和GAG-pol按比例混合,并在室温培育5分钟。将感染试剂PEI MAX和质粒混合物混合并在室温培育20分钟以形成DNA-感染试剂化合物,将其添加至293T细胞培养基中。在37℃、5%CO₂恒温箱中培育6小时后,将上清液换成完全培养基,并在37℃、5%CO₂恒温箱中培育。48小时和72小时后,收获一次病毒。然后,通过离心浓缩病毒并用于测试病毒滴度。

[0568] CAR-T细胞制备

[0569] 使用Ficoll试剂从人外周血中提取单核细胞,并使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(stemcell)分选CD3+细胞。将细胞调至最大 5×10^7 个细胞/毫升,每管0.5ml,并将25ul RapidSpheres添加至各管中。在室温下混合后,将样品插入磁力架中并在室温培育3分钟。收集流出物并离心以获得CD3+细胞。将分选的CD3+细胞用x-vivo15培养基再悬浮后培育。将细胞在24孔板中以 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/孔培养,并添加x-vivo15培养基至0.5ml。将CD3/CD28珠粒以1:1的比率添加至分选细胞中,并补充IL2至100IU/ml最终浓度,然后在37℃、5%CO₂恒温箱中培育过夜。

[0570] 然后,使用新鲜培养基并将 1×10^6 个T细胞在96孔板中培养过夜。次日,将浓缩的VHH-CAR病毒添加至T细胞中并共培养6小时。离心后,更换新鲜的x-vivo15培养基,并补充IL2至100IU/ml最终浓度,然后继续在37℃、5%CO₂恒温箱中培养。数次继代培养后,使用流式细胞术检测CAR-T细胞的阳性率。

[0571] CAR-T细胞的阳性检出率

[0572] 将收集并计数后的各种CAR-T细胞再悬浮于PBS中。用PBS洗涤两次后,向反应系统中添加1:1000稀释的缀合Alexa Fluor 647的AffiniPure山羊抗羊驼IgG VHH Domain (Jackson ImmunoResearch)二抗,并在室温培育1小时,用PBS洗涤两次,然后用流式细胞仪检测(参见图4B)。如图所示,C08、C12、C13、C15、C21、C27、C30和C31的阳性率分别为91.86%、20.32%、23.62%、46.41%、30.61%、90.28%、86.89%和67.78%。

[0573] T84-Luci-eGFP细胞的制备

[0574] 将 1×10^5 个细胞/100μl T84细胞铺板至24孔板中。次日,当细胞在每个孔中生长到60%-70%时,将100ul pLVX-Luci-eGFP病毒(病毒滴度: $0.5-1 \times 10^8$ TU/ml)加入T84细胞中。然后,添加300ul完全培养基并使细胞在37℃、5%CO₂恒温箱中生长。每天观察细胞密度,并且当细胞密度达到80%-90%时,对细胞进行继代培养。当阳性率达到超过95%时,使用T84细胞进行细胞毒性测定和动物实验。

[0575] 6.3. 实施例3-CAR-T细胞细胞毒性测定

[0576] 将 1×10^5 个/毫升靶细胞铺板至96孔板中,并使其在37℃、5%CO₂恒温箱中生长过夜。将T细胞(阴性对照)和各种CAR-T细胞与靶细胞以E:T(效应细胞:靶细胞)=2:1混合。将细胞培养基的体积补足至每孔200μl,然后在37℃、5%CO₂恒温箱中培育24小时。弃去细胞培养基,并将细胞用PBS洗涤细胞一次。每孔添加100μl Bright-Glo荧光素酶底物,在室温培育5分钟。将100ul上清液转移至白板上,用微孔板读取器检测(参见图5和图6)。结果展示对表达C8-CAR、C12-CAR、C13-CAR、C15-CAR、C21-CAR、C27-CAR、C30-CAR和C31-CAR的所有测试CAR-T细胞的细胞毒性。

[0577] 6.4. 实施例4-CAR-T细胞的体内活性

[0578] 使用NCG小鼠模型在体内测试抗GUCY2C CAR-T细胞消除结肠癌的能力。将处于良好生长条件的T84-Luci-eGFP细胞制备成 1×10^8 个细胞/毫升的浓度,并将其皮下注射到NCG雌性小鼠右前肢的腋窝中。每只小鼠注射 5×10^6 个细胞,并且注射体积是0.05ml。细胞注射后约2周,肿瘤体积是约 $100-150\text{mm}^3$ 。每只小鼠通过尾静脉注射 3×10^6 个CAR-T细胞。每2至3天用卡尺测量肿瘤大小。每周一次对小鼠进行体内荧光成像。将0.1ml荧光素底物注射至小鼠腹部的皮下部分中,并在8分钟后麻醉小鼠。将麻醉的小鼠放入PerkinElmer小动物活体光学成像系统 (IVIS Lumina LT) 中进行拍照检测。注射CAR-T细胞后,每周抽取100ul小鼠血液,并通过流式细胞术和qPCR监测小鼠体内残留的CAR-T细胞。结果示于图7A至图7C中,显示了测试的表达C8-CAR、C12-CAR、C13-CAR、C15-CAR和C21-CAR的本文所提供的示例性CAR-T细胞展示出优良的体内抗癌活性。

[0579] 本文所引用的所有专利、公开的申请和参考文献的教导内容以引用的方式整体并入。尽管已经具体地显示和描述示例性实施方案,但本领域技术人员应理解,在不背离所附权利要求书所涵盖的实施方案的范围的情况下,可对其中的形式和细节作出各种变化。

[0580] 根据前述,应了解,尽管本文已出于说明的目的描述具体实施方案,但在不偏离本文所提供的精神和范围的情况下可作出各种修改。以上提到的所有参考文献都以引用的方式整体并入本文中。

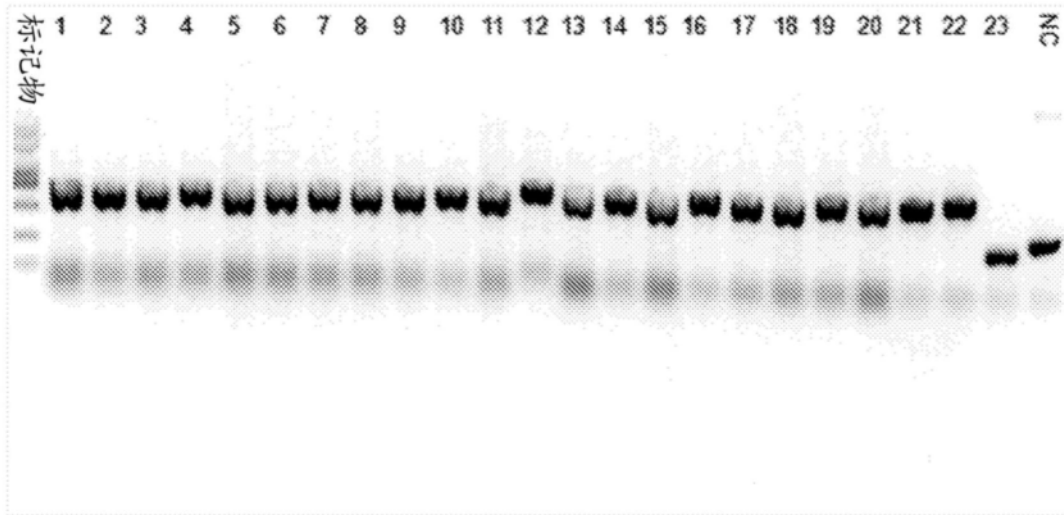


图1

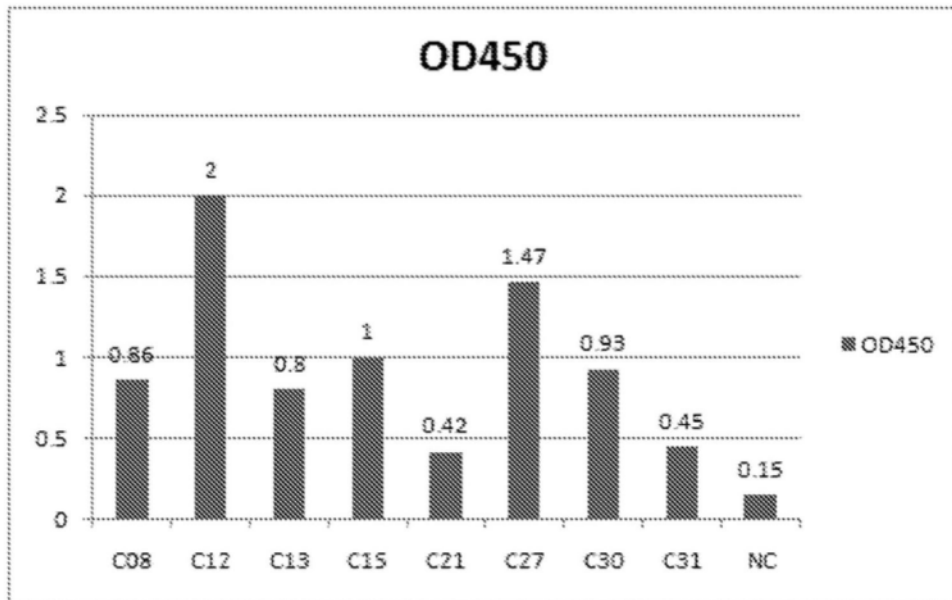


图2

使用 SnapGene® 创建

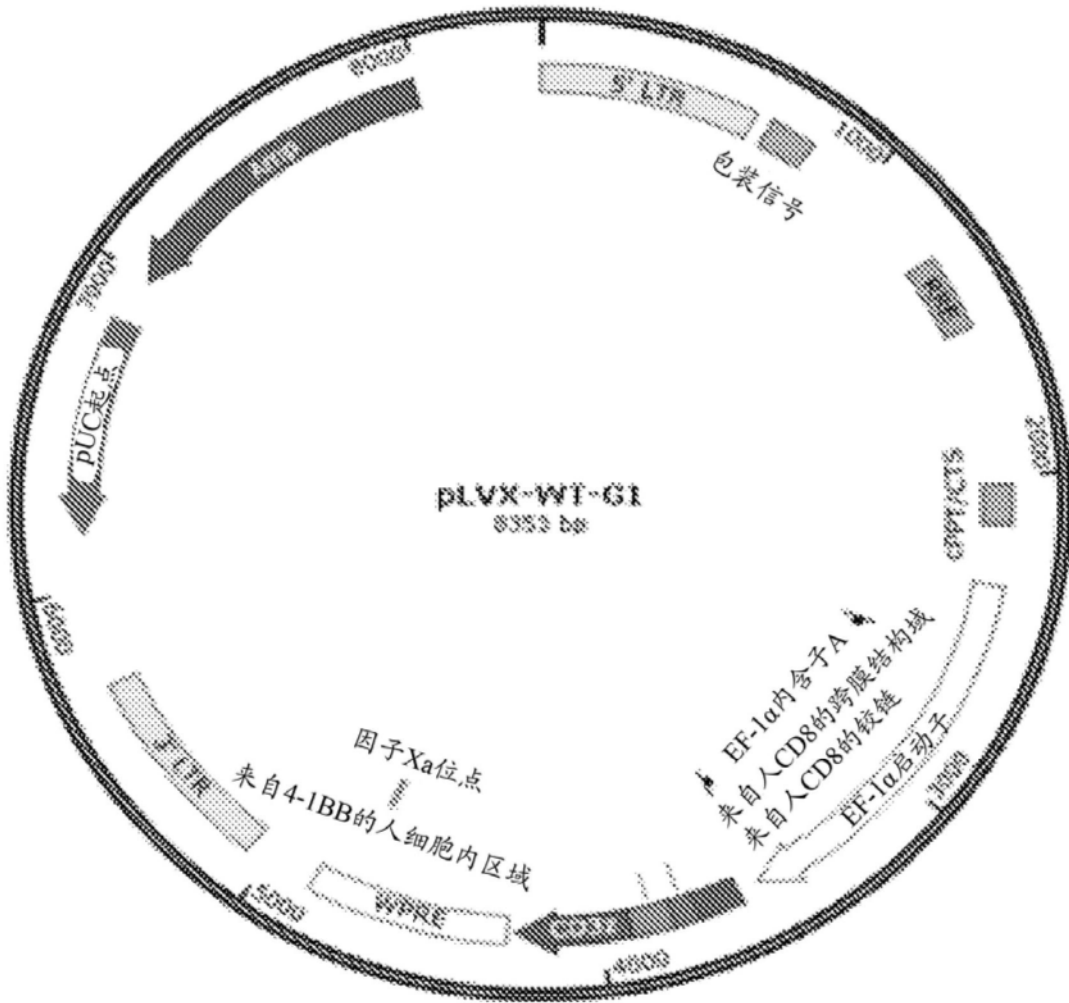


图4A

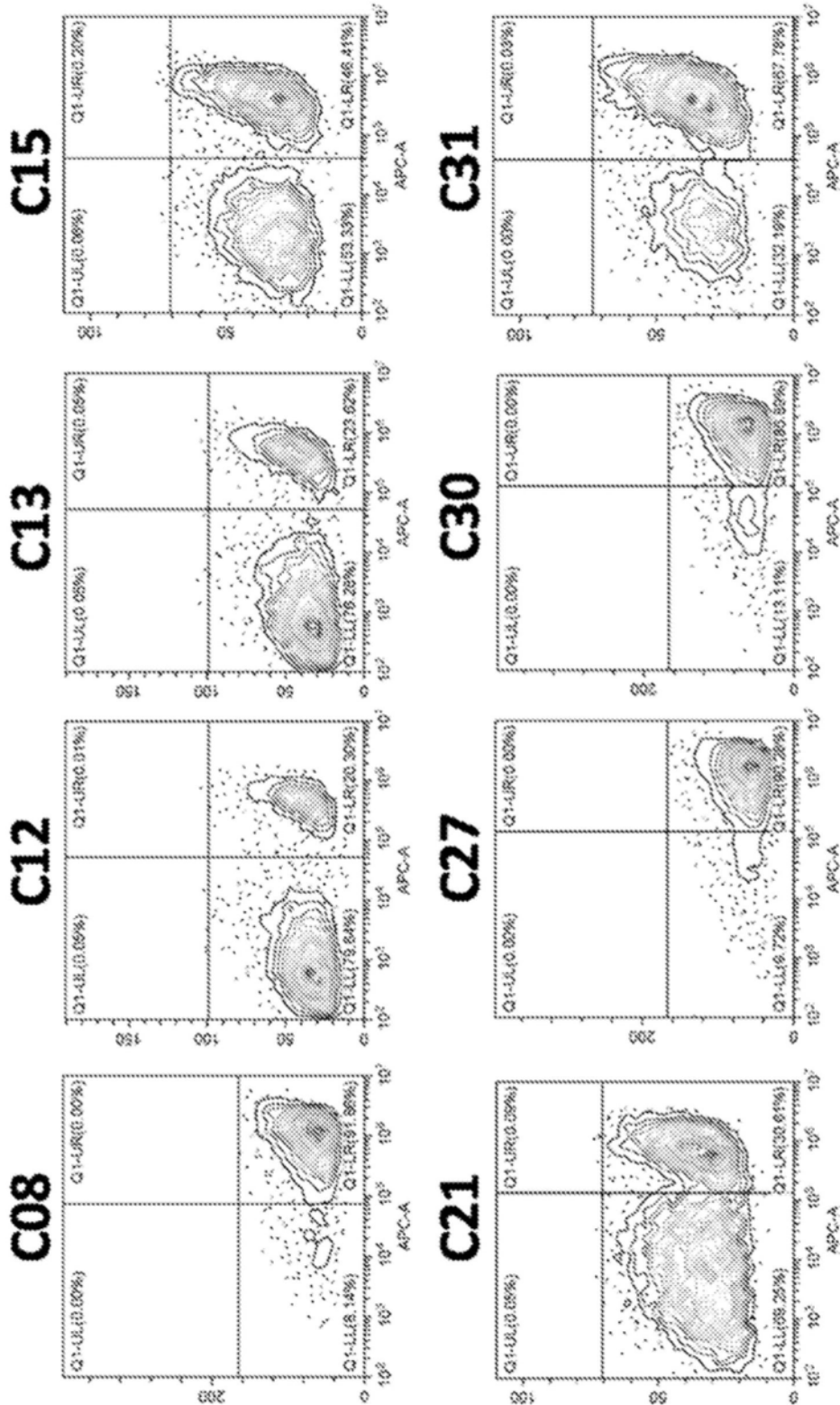


图4B

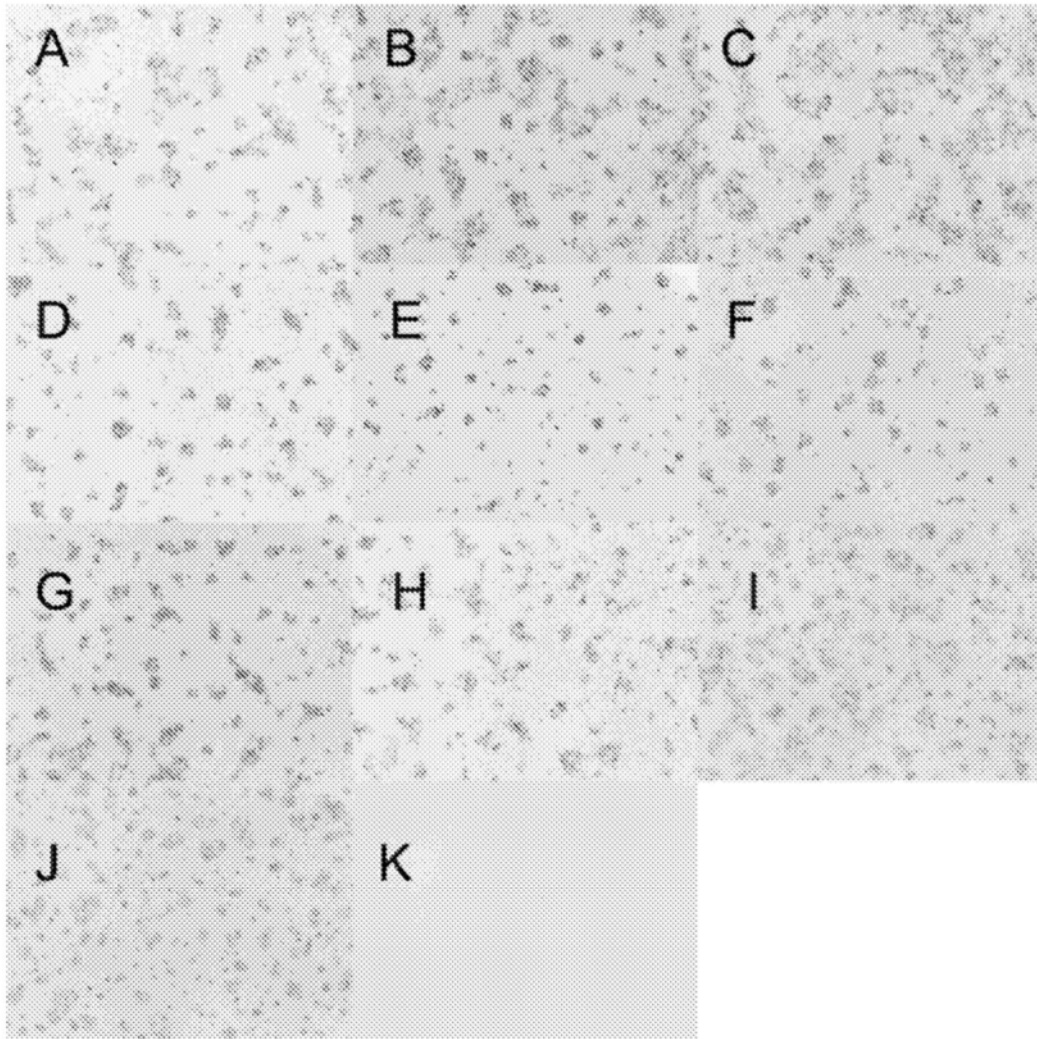


图5

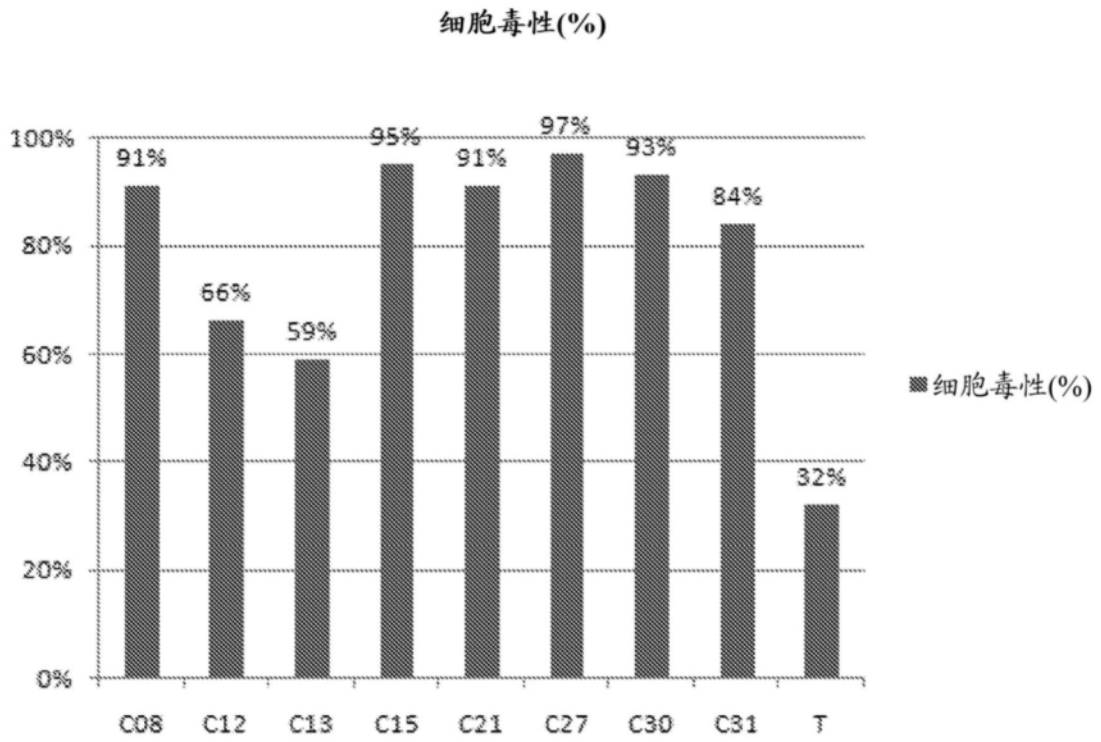


图6

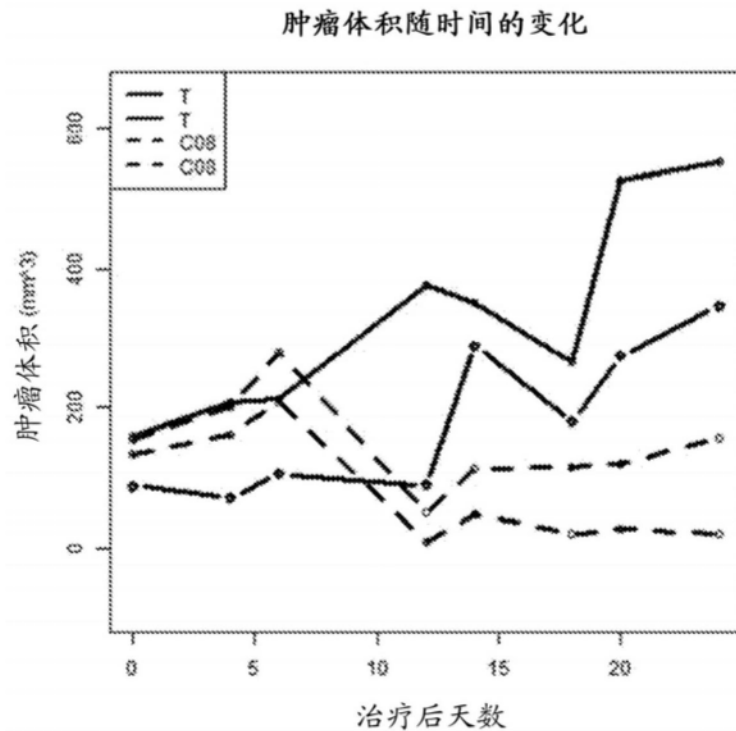


图7A

肿瘤体积随时间的变化

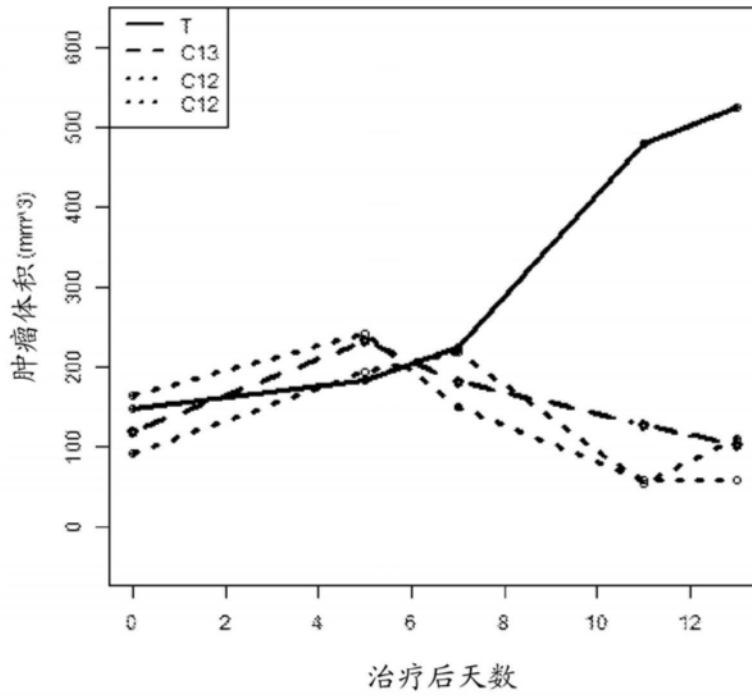


图7B

肿瘤体积随时间的变化

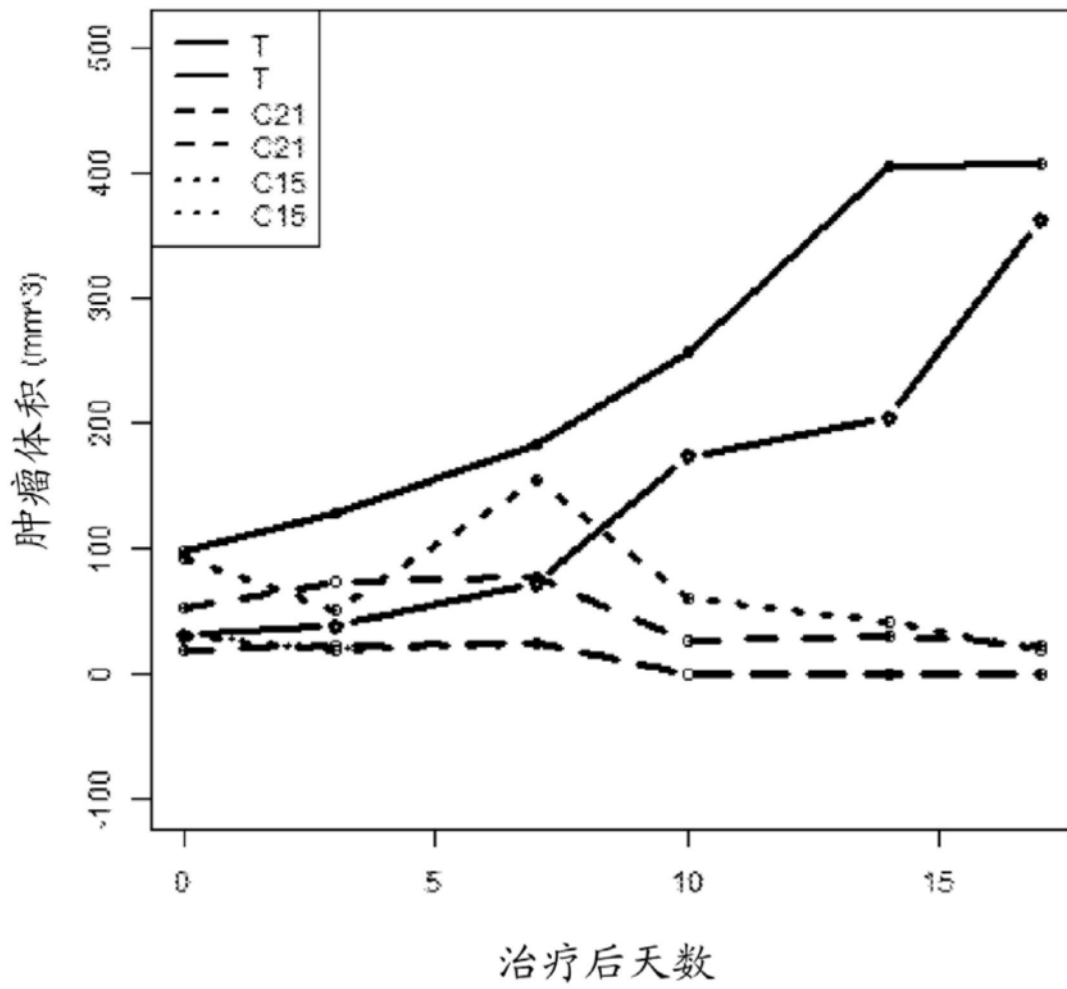


图7C