



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114450397 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 06

(21) 申请号 202080067274.6

(22) 申请日 2020.07.30

(30) 优先权数据

62/881,467 2019.08.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/044159 2020.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/021989 EN 2021.02.04

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

申请人 斯隆-凯特琳癌症研究协会

癌症与相关疾病纪念医院

(72) 发明人 D·A·谢恩伯格 L·佩拉罗

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

专利代理师 龙淳 叶占洋

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/15 (2015.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

权利要求书4页 说明书45页

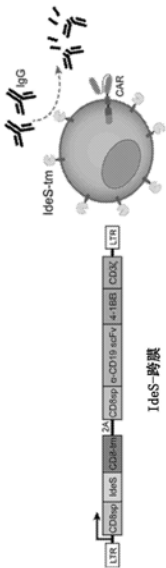
序列表27页 附图13页

(54) 发明名称

用于改善免疫疗法的细胞及其用途

(57) 摘要

本公开的主题提供用于改进的免疫疗法的细胞和组合物以及使用这些细胞和组合物的方法。它涉及包含配体识别受体(例如抗原识别受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))和IgG-降解酶或其片段的细胞。IgG-降解酶快速裂解IgG。IgG-降解酶可用作抵抗宿主体液应答的生物分子屏障。细胞对宿主体液应答(例如,抗体驱动的宿主体液应答)的抵抗力增加,这允许细胞延长持久性,从而增强细胞的活性。



1. 一种细胞,其包含:
 - (a) 配体识别受体,和
 - (b) IgG-降解酶或其片段。
2. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述IgG-降解酶是分泌的。
3. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述IgG-降解酶是膜结合的。
4. 根据权利要求3所述的细胞,其还包含(c) 连接至所述IgG-降解酶的跨膜结构域。
5. 根据权利要求4所述的细胞,其中所述跨膜结构域连接至所述IgG-降解酶的C-端。
6. 根据权利要求4或5所述的细胞,其中连接至所述IgG-降解酶的所述跨膜结构域包含CD8多肽,任选地CD8的跨膜。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的细胞,其中所述IgG-降解酶选自化脓性链球菌(*S. pyogenes*)的IgG-降解酶(IdeS)、马链球菌兽疫亚种(*S. equi subsp. zooepidemicus*)的IgG-降解酶(IdeZ)、马链球菌马亚种(*S. equi subsp. equi.*)的IgG-降解酶(IdeE)、来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的糖苷内切酶(EndoS)和来自化脓性链球菌的链球菌半胱氨酸蛋白酶(SpeB)。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体是外源性的或内源性的。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体是重组表达的。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体由载体表达。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的细胞,其中所述IgG-降解酶由载体表达。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的细胞,其中所述细胞是应答细胞或可激活细胞。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的细胞,其中所述细胞是免疫应答细胞。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、干细胞和正常组织细胞。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体结合抗原。
17. 根据权利要求16所述的细胞,其中所述抗原选自肿瘤抗原、病原体抗原、正常细胞抗原、HLA抗原和同种异体抗原。
18. 根据权利要求16或17所述的细胞,其中所述抗原是肿瘤抗原。
19. 根据权利要求17或18所述的细胞,其中所述肿瘤抗原是CD19。
20. 根据权利要求16或17所述的细胞,其中所述抗原是正常细胞抗原。
21. 根据权利要求16或17所述的细胞,其中所述抗原是HLA抗原或同种异体抗原。
22. 根据权利要求21所述的细胞,其中所述同种异体抗原是次要组织相容性同种异体抗原。
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。
24. 根据权利要求1-23中任一项所述的细胞,其中所述配体识别受体是CAR。
25. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述CAR包含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。
26. 根据权利要求25所述的细胞,其中所述CAR的细胞外抗原结合结构域包含单链可变

片段(scFv)。

27. 根据权利要求25或26所述的细胞,其中所述跨膜结构域包含CD8多肽。

28. 根据权利要求25-27中任一项所述的细胞,其中所述CAR的所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 多肽。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的细胞,其中所述CAR的所述细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导结构域。

30. 根据权利要求29所述的细胞,其中所述至少一个共刺激结构域包含CD28多肽、4-1BB多肽、或其组合。

31. 根据权利要求29或30所述的细胞,其中所述至少一个共刺激结构域包含4-1BB多肽。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的细胞,其中所述IgG-降解酶(a)切割IgG,从而防止IgG抗体杀伤所述细胞,和/或(b)切割IgG,从而允许IgG的残余片段保留与所述细胞的结合,其保护所述细胞免受一种或多种细胞毒性抗体的影响,任选地,所述一种或多种细胞毒性抗体与所述IgG结合相同的表位区域并杀伤所述细胞。

33. 一种组合物,其包含权利要求1-32中任一项所述的细胞。

34. 根据权利要求33所述的组合物,其是还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

35. 根据权利要求33或34所述的组合物,其用于治疗瘤形成。

36. 一种用于产生细胞的方法,所述方法包括将(a)编码配体识别受体的第一多核苷酸和(b)编码IgG-降解酶或其片段的第二多核苷酸引入细胞,其中所述第一和第二核酸序列中的每一个任选地可操作地连接至启动子元件。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在载体中。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体,或编码在mRNA分子中。

39. 一种核酸组合物,其包含(a)编码配体识别受体的第一多核苷酸和(b)编码IgG-降解酶或其片段的第二多核苷酸。

40. 根据权利要求39所述的核酸组合物,其中所述第一多核苷酸可操作地连接至启动子元件。

41. 根据权利要求39或40所述的核酸组合物,其中所述第二多核苷酸可操作地连接至启动子元件。

42. 根据权利要求39-41中任一项所述的核酸组合物,其中所述第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在载体中。

43. 根据权利要求42所述的核酸组合物,其中所述载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体,或编码在mRNA分子中。

44. 一种载体,其包含权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物。

45. 一种试剂盒,其包含权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物或权利要求44所述的载体。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的书面说明书。

47. 一种减少受试者中肿瘤负荷的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物、或权利要求44所述的载体。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述方法减少所述受试者中的肿瘤细胞的数量、减小所述受试者中的肿瘤大小、和/或根除所述受试者中的肿瘤。

49. 一种治疗和/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物、或权利要求44所述的载体。

50. 一种延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物、或权利要求44所述的载体。

51. 根据权利要求44-47中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤或瘤形成选自急性髓性白血病(AML)、淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌和胰腺癌。

52. 根据权利要求49或50所述的方法, 其中所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性狼疮、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、系统性硬化症、胆汁性肝硬化、乳糜泻、轴突神经病、炎性肌病、小脑变性、1型糖尿病和多发性肌炎。

53. 一种在接受器官移植的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥的方法, 包括施用有效量的权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物、或权利要求44所述的载体。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述移植是同种异体移植。

55. 根据权利要求53或54所述的方法, 其中所述受试者在所述器官移植之前接受所述细胞、组合物或核酸组合物。

56. 一种在接受细胞疗法的受试者中减少和/或预防抗体介导的对使用的细胞或组织排斥的方法, 包括施用有效量的权利要求1-32中任一项所述的细胞、权利要求33-35中任一项所述的组合物、权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物、或权利要求44所述的载体。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述细胞和/或组织包含在所述细胞疗法中。

58. 根据权利要求56或57所述的方法, 其中所述细胞和/或组织是自体的或同种异体的。

59. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在疗法中的用途。

60. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在减少肿瘤负荷中的用途。

61. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在治疗和/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病中的用途。

62. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活中的用途。

63. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在接受器官移植的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和组织排斥中的用途。

64. 根据权利要求1-32中任一项所述的细胞在接受细胞疗法的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥中的用途。

65. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在疗法中的用途。

66. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在减少肿瘤负荷中的用途。

67. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在治疗和/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病中的用途。

68. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活中的用途。

69. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在接受器官移植的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和组织排斥中的用途。

70. 根据权利要求33-35中任一项所述的组合物在接受细胞疗法的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥中的用途。

71. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在疗法中的用途。

72. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在减少肿瘤负荷中的用途。

73. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在治疗和/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病中的用途。

74. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活中的用途。

75. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在接受器官移植的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和组织排斥中的用途。

76. 根据权利要求39-43中任一项所述的核酸组合物在接受细胞疗法的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥中的用途。

用于改善免疫疗法的细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年8月1日提交的美国临时专利申请序列号62/881,467的优先权,将其全部内容并入以供参考。

[0003] 资助信息

[0004] 本发明是在来自美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 国家癌症研究所的基金号为P30 CA008747的政府资助下进行的。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,其通过EFS-Web以ASCII格式提交,并将其全部内容并入以供参考。ASCII副本创建于2020年7月28日,名为“072734_1109_ST25.txt”,大小为52,647字节。

技术领域

[0007] 本申请公开的主题提供用于改进的免疫疗法的细胞和组合物以及使用这些细胞和组合物的方法。它涉及包含配体识别受体(例如抗原识别受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))和IgG-降解酶或其片段的细胞。IgG-降解酶快速裂解IgG。IgG-降解酶可用作抵抗宿主体液应答的生物分子屏障。细胞对宿主体液应答(例如,抗体驱动的宿主体液应答)的抵抗力增加,这允许细胞延长持续时间,从而提高细胞的活性。

背景技术

[0008] 合成免疫学和合成生物学利用免疫细胞杀伤肿瘤细胞或治疗其他重要疾病。合成免疫学和生物学快速增长的领域是过继细胞转移、干细胞移植、器官移植、CRISPR基因编辑、基因疗法和CAR-T细胞疗法的使用。在将改变的或工程化的细胞引入受试者的任何情况下,宿主(受试者)可能对该细胞或组织产生免疫应答,因为它是外来的或含有外来基因和蛋白质,而这些外来基因和蛋白质通常不在宿主中发现。这种免疫识别的后果可以是治疗效果的中和、组织或细胞的排斥和/或治疗意图的失败等。因此,需要对宿主体液应答具有增加的抗性的工程化细胞。

发明内容

[0009] 本公开的主题提供包含(a)配体识别受体和(b)IgG-降解酶或其片段的细胞。在某些实施方式中,IgG-降解酶是分泌的。在某些实施方式中,IgG-降解酶是膜结合的。在某些实施方式中,细胞还包含(c)连接至IgG-降解酶的跨膜结构域。跨膜结构域可以连接至IgG-降解酶的C-端。在某些实施方式中,连接至IgG-降解酶的跨膜结构域包含CD8多肽。

[0010] 在某些实施方式中,IgG-降解酶选自化脓性链球菌(*S. pyogenes*)的IgG-降解酶(IdeS)、马链球菌兽疫亚种(*S. equi* subsp. *zooepidemicus*)的IgG-降解酶(IdeZ),马链球菌马亚种(*S. equi* subsp. *equi*.)的IgG-降解酶(IdeE)、来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的糖苷内切酶(EndoS)和来自化脓性链球菌的链球菌半胱氨酸蛋白酶(SpeB)。

[0011] 在某些实施方式中,配体识别受体是外源的或内源的。在某些实施方式中,配体识别受体是重组表达的。在某些实施方式中,配体识别受体由载体表达。在某些实施方式中,IgG-降解酶由载体表达。

[0012] 在某些实施方式中,细胞是应答细胞。在某些实施方式中,细胞是应答细胞,例如免疫应答细胞。在某些实施方式中,细胞是可激活细胞。在某些实施方式中,细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、干细胞和正常组织细胞(例如,来自肾、肝、肺、骨髓或胰腺)及其组合。在某些实施方式中,细胞是T细胞。

[0013] 在某些实施方式中,配体识别受体结合抗原。抗原可以是肿瘤抗原、病原体抗原、正常细胞抗原、HLA抗原或同种异体抗原。在某些实施方式中,抗原是正常细胞抗原。在某些实施方式中,同种异体抗原是次要组织相容性同种异体抗原。

[0014] 在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原是CD19。

[0015] 在某些实施方式中,配体识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方式中,配体识别受体是CAR。在某些实施方式中,CAR包含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。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 多肽。在某些实施方式中,跨膜结构域包含CD8多肽。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,至少一个共刺激结构域包含CD28多肽、4-1BB多肽、或其组合。在某些实施方式中,其中至少一个共刺激结构域包含4-1BB多肽。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含两个共刺激信号传导结构域。

[0016] 在某些实施方式中,IgG-降解酶切割IgG,从而防止IgG抗体杀伤细胞。在某些实施方式中,IgG-降解酶切割IgG,从而允许IgG的残余片段保留与细胞的结合,这保护细胞免受一种或多种细胞毒性抗体的影响。在某些实施方式中,一种或多种细胞毒性抗体与IgG结合相同的表位区域并杀伤细胞。因此,该过程创建了一个保护屏障。

[0017] 本公开的主题还提供包含本文所述细胞的组合物。在某些实施方式中,该组合物是进一步包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方式中,该组合物用于治疗瘤形成。

[0018] 此外,本公开的主题提供用于产生本文公开的细胞的方法。在某些实施方式中,该方法包括将(a)编码配体识别受体的第一多核苷酸和(b)编码IgG-降解酶或其片段的第二多核苷酸引入细胞。在某些实施方式中,(a)和/或(b)以遗传方式引入细胞。在某些实施方式中,第一多核苷酸任选地可操作地连接至启动子元件。在某些实施方式中,第二多核苷酸任选地可操作地连接至启动子元件。在某些实施方式中,第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在载体中。在某些实施方式中,第一和第二多核苷酸包含在两个不同的载体中。在某些实施方式中,载体是逆转录病毒载体。在某些实施方式中,载体是慢病毒载体。在某些实施方式中,载体编码在mRNA分子中。

[0019] 本公开的主题还提供核酸组合物。在某些实施方式中,核酸组合物包含(a)编码配体识别受体的第一多核苷酸和(b)编码IgG-降解酶或其片段的第二多核苷酸。在某些实施方式中,第一多核苷酸可操作地连接至启动子元件。在某些实施方式中,第二多核苷酸可操作地连接至启动子元件。在某些实施方式中,第一和第二多核苷酸中的一个或两个包含在

载体中。在某些实施方式中,第一和第二多核苷酸包含在两个不同的载体中。在某些实施方式中,载体是逆转录病毒载体。在某些实施方式中,载体是慢病毒载体。在某些实施方式中,载体编码在mRNA分子中。

[0020] 还提供包含本文所述的核酸组合物的载体。

[0021] 本公开的主题还提供包含本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸组合物或本文所述的载体的试剂盒。在某些实施方式中,该试剂盒还包含用于治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的书面说明书。

[0022] 本公开的主题还提供各种方法。本公开的主题提供减少受试者中肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸组合物或本文所述的载体。在某些实施方式中,该方法减少受试者体内的肿瘤细胞的数量、减小受试者体内的肿瘤大小、和/或根除受试者体内的肿瘤。

[0023] 本公开的主题提供治疗和/或预防瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸组合物或本文所述的载体。

[0024] 本公开的主题提供延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸组合物或本文所述的载体。

[0025] 在某些实施方式中,瘤形成选自急性髓性白血病(AML)、淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌和胰腺癌。

[0026] 本公开的主题提供在接受器官移植的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥的方法。在某些实施方式中,该移植是同种异体移植(allograft)。在某些实施方式中,该受试者在该器官移植之前接受该细胞、组合物或核酸组合物。

[0027] 本公开的主题还提供在接受细胞疗法的受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥的方法。在某些实施方式中,该细胞和/或组织是自体的或同种异体的。在某些实施方式中,该细胞和/或组织用于细胞疗法。

[0028] 在某些实施方式中,该方法包括施用有效量的本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸组合物或本文所述的载体。

附图说明

[0029] 图1A和1B描述根据本发明公开主题的某些实施方式的载体和细胞。图1A描述根据本发明公开主题的某些实施方式的载体和细胞,例如,IgG-降解酶在细胞上。图1B描述根据本发明公开主题的某些实施方式的载体和细胞,例如,IgG-降解酶从细胞中分泌。

[0030] 图2描述哺乳动物细胞中的IdeS表达。HEK293t细胞用IdeS的膜结合(IdeS-tm)和分泌(IdeS-sec)型瞬时转染。细胞裂解物和上清液通过使用抗HA抗体的蛋白质免疫印迹分析,并分别在细胞或分泌液中检测到IdeS蛋白质。未转导的HEK293t细胞没有显示IdeS蛋白质。(每个凝胶中的左侧泳道是分子量标志物)。

[0031] 图3A-3C描述细胞表达的IdeS切割活性随时间的变化。HEK 293t细胞用IdeS-tm瞬时转染。图3A示出转染后48小时,其中将IgG添加到24孔板的孔中,然后在不同时间点取出

并使用Laemmli缓冲液淬灭。样品通过SDS-PAGE分析。图3B示出用考马斯(Coomassie)染色的凝胶。切割的Ig在5分钟内出现并随时间增加。图3C示出抗人Fc特异性抗体的印迹。切割的Ig作为Fc片段在5分钟内出现并随时间增加。

[0032] 图4A和4B描述通过IdeS的切割。使用基于ELISA的测定来分析IdeS对IgG的切割程度。图4A示出使用重组IdeS检测的标准曲线验证。图4B示出通过蛋白质免疫印迹确认HEK293t细胞中IdeS的表达以及通过ELISA在不同时间点评估的切割活性。

[0033] 图5A-5B描述细胞分泌的IdeS可以切割结合在相邻细胞上的抗体。Raji细胞与利妥昔单抗(Rituximab)一起孵育30分钟。然后将Raji细胞与表达仅19BBz构建体、IdeS-tm 19BBz或IdeS-sec 19BBz的HEK293t共培养过夜。切割程度使用标记的抗-Fc二级抗体评估,并通过流式细胞术测量。图5A代表示出Raji细胞的抗-Fc荧光程度的直方图。图5B示出具有每个直方图的平均荧光强度(MFI)的条形图。

[0034] 图6描述本发明的细胞对肿瘤细胞的杀伤。未转导的T细胞、包含19BBz CAR和膜结合IdeS的T细胞、包含19BBz CAR和分泌IdeS的T细胞以及19BBz CAR T细胞与表达萤火虫荧光素酶的Raji细胞一起孵育18小时。Raji细胞的细胞活力通过添加荧光素和测量生物发光来评估。IdeS屏蔽的CAR T细胞在功能上与未屏蔽的CAR T细胞一样活跃。

[0035] 图7描述本发明公开主题的细胞受到保护免受补体依赖性细胞毒性(CDC)。未转导的T细胞、包含19BBz CAR和膜结合IdeS的T细胞、包含19BBz CAR和分泌IdeS的T细胞和19BBz CAR T细胞用不同浓度的兔抗胸腺细胞球蛋白(ATG)处理,然后加入兔血清并孵育一小时。细胞活力通过Cell Titer Glo测量。包含19BBz CAR和膜结合IdeS的T细胞以及包含19BBz CAR和分泌IdeS的T细胞切割IgG的Fc片段,从而逃避CDC并保持存活。

[0036] 图8描述本发明公开主题的细胞的示例性作用机制。IgG抗体与细胞表面抗原和受体结合,通过CDC、ADCC和调理作用导致细胞死亡。本发明的细胞表达IdeS,这是一种在铰链区下方切割IgG、释放Fc片段的酶。本发明公开主题的细胞仍然包被在F(ab')₂片段中,这阻止了进一步的抗体结合。

[0037] 图9描述表达IdeS的CAR T细胞的活性。表达IdeS的CAR T细胞切割IgG Fc并保持F(ab')₂屏障。CAR T细胞用1μg/mL的抗胸腺细胞球蛋白(ATG)处理并孵育过夜。细胞用抗-Fc(上)或抗-Fab(下)标记的抗体洗涤和分析。中值荧光强度绘制在右侧的条形图中。

[0038] 图10描述本公开的细胞受到保护免受抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。IdeS-tm 19BBz T细胞、IdeS-sec 19BBz T细胞和不含IdeS的19BBz T细胞用不同剂量的抗胸腺细胞球蛋白(ATG)处理,随后用人PBMC处理。与不含IdeS的19BBz T细胞相比,IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞都受到保护免于裂解。

[0039] 图11A-11C描述本公开的细胞可以切割来自肾移植患者的血清IgG并且受到保护免受CDC。图11A描述源自肾移植患者(患者2)的含有引起排斥的抗-HLA抗体的血清通过流式细胞术显示结合A02+细胞。图11B描述来自患者2的血清被A02+IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞裂解,如流式细胞术所证实。图11C描述A02+IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞也受到保护免受由患者2血清介导的补体杀伤(CDC)。

[0040] 图12描述本公开的细胞在体内切割人多克隆IgG。人T细胞用不含IdeS CAR的19BBz(左起泳道:#1-2)或IdeS-tm 19BBz CAR(跨膜形式)(左起泳道:#3-5)和IdeS-sec 19BBz(分泌形式)(左起泳道:#6-8)转导。在NSG小鼠中腹腔内注射(i.p.)CAR T细胞,24小

时后,人多克隆IgG也被腹腔内注射。通过使用PBS进行腹腔内注射灌洗,使用磁性蛋白G珠纯化样品,并使用抗-人Fc-特异性HRP二抗通过蛋白质印迹分析来评估IgG的裂解。在55kDa附近可以观察到未切割的重链(泳道#9),而在25kDa附近存在切割的Fc片段(箭头)。

具体实施方式

[0041] 可以结合附图来理解以实施例的方式给出的以下详细描述,但并不旨在将本公开的主题限于所描述的特定实施方式。

[0042] 本公开的主题提供细胞以及包括这些细胞的组合物,该细胞包括遗传修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞),该免疫应答细胞包含配体识别受体(例如,TCR或CAR)和IgG-降解酶或其片段。本公开的主题还提供产生这些细胞的方法,以及使用这些细胞和包含其的组合物的方法。本公开的主题还提供这些细胞和组合物用于以下用途:减少受试者中的肿瘤负荷,延长患有瘤形成、病原体感染和/或自身免疫性疾病的受试者的存活,治疗和/或预防瘤形成或其他疾病/病症,治疗和/或预防自身免疫性疾病,和/或减少和/或预防受试者中抗体介导的对细胞和/或组织的排斥反应,例如受试者接受器官移植或细胞疗法,其中该细胞和/或组织用于细胞疗法。

[0043] 本公开的主题至少部分基于以下发现:IgG-降解酶(例如IdeS)可以递送和切割IgG,从而增加细胞对宿主体液应答的抵抗力,从而导致延长细胞的持久性和细胞更有效的活性(例如,抗肿瘤活性)。细胞的持久性还可以提高包括这些细胞在内的疗法(例如CAR-T细胞疗法)的成本效益。

[0044] 本公开的主题的非限制性实施方式通过本说明书和实施例进行描述。

[0045] 出于使本公开的主题清楚的目的,而不是通过限制的方式,将详细描述分为以下小节:

[0046] 5.1.定义;

[0047] 5.2.IgG-降解酶;

[0048] 5.3.抗原配体识别受体;

[0049] 5.4.细胞;

[0050] 5.5.组合物和载体;

[0051] 5.6.多肽和类似物;

[0052] 5.7.给药;

[0053] 5.8.剂型;

[0054] 5.9.使用方法;和

[0055] 5.10.试剂盒。

[0056] 5.1.定义

[0057] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供对本公开的主题中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,《微生物学和分子生物学词典》(1994年第2版);剑桥科学技术词典(Walker编辑,1988);遗传学词汇,第5版,R.Rieger等(编辑),Springer Verlag(1991);和Hale&Marham,《哈珀·柯林斯生物学词典》(1991年)。

[0058] 如本文所用,术语“约”或“近似”是指在特定值的可接受误差范围内,如本领域普

通技术人员所确定的,其将部分取决于如何测量或确定该值,即,测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在3个或超过3个标准偏差之内。可替代地,“约”可以表示给定值的至多20%,例如,至多10%,至多5%或至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或方法,该术语可以意指在数值的一个数量级内,例如在一个值的5倍之内或在2倍之内。

[0059] “免疫应答细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞或其祖细胞或其后代。在某些实施方式中,免疫应答细胞是淋巴谱系的细胞或骨髓谱系的细胞。淋巴谱系细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞、B细胞和可分化成淋巴样细胞的干细胞(例如,诱导的多能干细胞)。骨髓谱系细胞的非限制性实例包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞和可分化成骨髓细胞的干细胞。

[0060] “激活免疫应答细胞”是指信号转导的诱导或细胞中蛋白质表达的变化,导致免疫应答的启动。例如,当CD3链响应于配体结合和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITAM)聚集时,就会产生信号转导级联反应。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,其包括在结合受体(例如,CD4或CD8,CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近的许多分子的聚集。膜结合信号分子的这种聚集使CD3链中包含的ITAM基序磷酸化。该磷酸化反过来启动了T细胞激活通路,最终激活转录因子,例如NF- κ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的整体基因表达,从而增加IL-2的产生,促进主调节T细胞蛋白的增殖和表达,进而启动T细胞介导的免疫应答。

[0061] “刺激免疫应答细胞”是指导致强烈和持续的免疫应答的信号。在各种实施方式中,这发生在免疫细胞(例如,T细胞)激活之后或通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体同时介导。接收多种刺激信号对于建立强烈且长期的T细胞介导的免疫应答可能很重要。T细胞可以迅速被抑制并且对抗原无应答。尽管这些共刺激信号的作用可能有所不同,但它们通常会导致基因表达增加,从而产生长寿、增殖性和抗凋亡性T细胞,其对抗原应答强烈,可彻底和持续根除。

[0062] 如本文所用,术语“抗原识别受体”是指能够响应于其与抗原的结合而激活免疫或免疫应答细胞(例如,T细胞)的受体。

[0063] 抗原结合片段包括F(ab')₂和Fab,缺少完整抗体的Fc片段的F(ab')₂和Fab片段。

[0064] 在某些实施方式中,抗体是糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文中简称为V_H)和重链恒定(C_H)区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中简称为V_L)和轻链恒定C_L区组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。V_H区和V_L区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布有更保守的区,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0065] 如本文所用,“CDR”定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,美国国立卫生研究院卫生与公共服务部(1987)。通常,抗体在可变区中包

含三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR提供大多数接触残基,以使抗体与抗原或表位结合。在某些实施方式中,使用Kabat系统勾勒出CDR区域(Kabat,E.A,等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生和公共服务部,NIH出版号91-3242)。

[0066] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是共价连接以形成 $V_H:V_L$ 异二聚体的免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的融合蛋白。 V_H 和 V_L 直接连接或通过肽编码接头(例如10、15、20、25个氨基酸)连接,该接头将 V_H 的N-端与 V_L 的C-端或 V_H 的C-端与 V_L 的N-端相连。接头通常富含甘氨酸以提高柔韧性,并富含丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度。尽管去除了恒定区并引入了接头,scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由如Huston等(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)所述的包括 V_H 和 V_L 编码序列的核酸表达。还参见美国专利第5,091,513号,第5,132,405号和第4,956,778号。以及美国专利公开号20050196754和20050196754。已经描述了具有抑制活性的拮抗scFv(参见,例如,Zhao等,Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51;Peter等,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012年8月12日;Shieh等,J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife等,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。已经描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见,例如,Peter等,J Bioi Chern 2003 25278(38):36740-7;Xie等,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等,Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0067] 如本文所用,术语“亲和力”是指结合强度的量度。亲和力可取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学拟合的紧密度,它们之间接触面积的大小和/或带电和疏水基团的分布。如本文所用,术语“亲和力”还包括“亲合力”,其是指在形成可逆复合物之后抗原-抗体键的强度。计算抗体对抗原的亲合力的方法是本领域已知的,包括但不限于各种抗原结合实验,例如功能测定法(例如流式细胞术测定法)。

[0068] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包含与能够激活或刺激免疫或免疫应答细胞的细胞内信号传导结构域融合的细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域的分子。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含scFv。scFv可以源自融合抗体的可变重和轻区。替代地或另外,scFv可以衍生自Fab's(而不是抗体,例如获自Fab文库)。在某些实施方式中,将scFv融合至跨膜结构域,然后融合至细胞内信号传导结构域。

[0069] 如本文所用,术语“核酸分子”包括编码目的多肽(例如,IL-36多肽)或其片段的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列100%同源性或同一性,而是可以表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”或“基本同源性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在各种严格条件下在互补多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)或其部分之间形成双链分子的配对。(参见,例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0070] 例如,严格的盐浓度通常将小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,例如小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。在没有有机溶剂例如甲酰胺的情况下可以获得低严格度的杂交,而在至少约35%的甲酰胺,例如至少约

50%的甲酰胺的存在下可以获得高严格度的杂交。严格的温度条件通常将包括至少约30℃,至少约37℃,或至少约42℃的温度。改变其它参数,例如杂交时间、去污剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度、以及包含或排除载体DNA是本领域技术人员众所周知的。通过根据需要组合这些各种条件来实现各种严格度。在某些实施方式中,杂交将在30℃下750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中进行。在某些实施方式中,杂交将在37℃下500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%SDS、35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精DNA(ssDNA)中进行。在某些实施方式中,杂交将在42℃下250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中进行。在这些条件下有用的变化对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0071] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤的严格度也会有所不同。洗涤严格条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上所述,可以通过降低盐浓度或通过提高温度来提高洗涤严格度。例如,洗涤步骤的严格盐浓度可以小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,例如,小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常将包括至少约25℃,至少约42℃或至少约68℃的温度。在某些实施方式中,洗涤步骤将在25℃下30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中,洗涤步骤将在42℃下15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中,洗涤步骤将在68℃下15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。这些条件的其它变化对于本领域技术人员将是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员众所周知的,并且描述于例如Benton和Davis(Science 196:180, 1977);Grunstein和Rogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等(《分子生物学最新研究方法》,威利科学出版社,纽约,2001年);Berger和Kimmel(分子克隆技术指南,1987年,纽约学术出版社);和Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》,纽约冷泉港实验室出版社。

[0072] “基本同一性”或“基本同源性”是指与参考氨基酸序列(例如,本文所述的任意氨基酸序列)或参考核酸序列(例如,本文描述的任意核酸序列)表现出至少约50%同源性或同一性的多肽或多核苷酸。在某些实施方式中,这样的序列与用于比较的氨基酸序列或核酸序列具有至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性。

[0073] 序列同一性可以通过使用序列分析软件(例如,威斯康星大学生物技术中心遗传学计算机组的序列分析软件包,威斯康星州麦迪逊市53705大学大道1710号,BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)进行测量。这样的软件通过将同源性程度分配给各种取代、缺失和/或其它修饰来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中e-3和e-100之间的概率得分指示密切相关的序列。

[0074] “类似物”是指具有参考多肽或核酸分子功能的结构相关的多肽或核酸分子。

[0075] 如本文所用,术语“配体”是指与受体结合的分子。在某些实施方式中,配体与另一细胞上的受体结合,从而允许细胞间识别和/或相互作用。

[0076] 如本文所用,术语“组成型表达”或“组成型表达的”是指在所有生理条件下表达或表达的。

[0077] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何状况、疾病或病症,例

如肿瘤和细胞的病原体感染。

[0078] “有效量”是指足以具有治疗作用的量。在某些实施方式中，“有效量”是足以阻止、改善或抑制肿瘤的持续增殖、生长或转移(例如,侵袭或迁移)的量。

[0079] “增强耐受性”是指阻止靶向移植的器官或组织的自反应性细胞或免疫应答性细胞的活性。

[0080] “内源性”是指多核苷酸或多肽通常在细胞或组织中表达。

[0081] “外源性”是指多核苷酸或多肽不是内源性存在细胞中的。因此,术语“外源性”将涵盖在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽,例如外源、异源和过表达的核酸分子和多肽。“外源性”核酸是指天然野生型细胞中不存在的核酸。例如,外源性核酸可通过序列、位置/定位或两者而不同于内源性对应物。为了清楚起见,外源性核酸相对于其天然内源性对应物可以具有相同或不同的序列。可以通过遗传工程将其引入细胞本身或其祖细胞,并且可以任选地将其连接至替代控制序列,例如非天然启动子或分泌序列。

[0082] “异源核酸分子或多肽”是指通常不存在于细胞或得自细胞的样品中的核酸分子(例如cDNA、DNA或RNA分子)或多肽。该核酸可以来自另一个生物,或者可以是例如通常不在细胞或样品中表达的mRNA分子。

[0083] “调节”是指正或负改变。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0084] “增加”是指正改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0085] “减少”是指负改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0086] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯净的”是指物质在不同程度上不含在其原始状态下通常与其伴随的组分。“分离”表示与原始来源或环境的分离度。“纯化”表示分离度高于分离。“纯化的”或“生物纯净的”蛋白质充分不含其它物质,以使任何杂质均不会实质性地影响蛋白质的生物学特性或引起其它不利后果。也就是说,如果核酸或肽通过重组DNA技术生产而基本不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者通过化学合成而基本不含化学前体或其它化学品,则其是纯化的。纯度和均质性通常使用分析化学技术确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。对于可以进行修饰(例如磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,可以将其分别纯化。

[0087] “分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0088] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合细胞上存在的特定抗原决定簇或抗原决定簇组的结构域。

[0089] “瘤形成”是指以细胞或组织的病理性增生及其随后向其它组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。瘤形成的生长通常是不受控制的和进行性的,并且在不引起正常细胞增殖或者导致正常细胞增殖停止的条件下发生。瘤形成可影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自以下的器官:膀胱、骨骼、大脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道,子宫和阴道、或其组织或细胞

类型。瘤形成包括癌症,例如肉瘤、肿瘤或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0090] “受体”是指存在于细胞膜上的多肽或其部分或片段,其选择性地结合至少一种配体。在某些实施方式中,配体是抗原。抗原可以是肿瘤抗原、病原体抗原或正常细胞抗原、HLA抗原或同种异体抗原(例如,次要组织相容性同种异体抗原)。

[0091] “识别”是指选择性地结合靶标,例如配体(例如抗原)。例如,识别肿瘤的细胞(例如,T细胞)可以表达与肿瘤抗原结合的受体(例如TCR或CAR)。

[0092] 如本文所用,术语“配体识别受体”是指能够配体识别受体。

[0093] “参考”或“对照”是指比较的标准。例如,可以将表达CAR和scFv的细胞的scFv-抗原结合水平与仅表达CAR的相应细胞的scFv-抗原结合水平进行比较。

[0094] “分泌的”是指多肽例如通过分泌通路通过内质网、高尔基体、以及作为在细胞质膜上瞬时融合从而将多肽释放到细胞外的囊泡而从细胞释放。

[0095] “特异性结合”是指多肽或其片段识别并结合目的生物分子(例如多肽)但基本上不识别并结合样品(例如生物样品,其自然包括本公开的多肽)中其它分子。

[0096] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”是指与正常或非IS赘生性细胞相比在肿瘤细胞上唯一或差异表达的抗原(例如,多肽)。在某些实施方式中,肿瘤抗原包括由肿瘤表达的任何多肽,其能够通过抗原识别受体(例如,CD19,MUC-16)激活或诱导免疫应答或能够通过受体-配体结合(例如CD47,PD-L1/L2,B7.1/2)抑制免疫应答。

[0097] 术语“包含”,“包括”旨在具有美国专利法中赋予它们的广义含义,并且可以表示“含有”,“包含”等。

[0098] 如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的治疗作用包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态、和缓解或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗不仅可以预防在受影响或诊断的受试者或怀疑患有该病症的受试者中由于病症引起的恶化,而且治疗可以在有患病症或怀疑患有该病症风险的受试者中预防该病症的发作或该病症的症状。

[0099] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类、灵长类动物、农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。非人动物受试者的非限制性实例包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;牛;马;和非人灵长类动物,例如猿和猴子。如本文所用,术语“免疫受损的”是指具有免疫缺陷的受试者。该受试者非常容易遭受机会性感染,这种感染是由通常不会在免疫系统健康的人中引起疾病的生物体引起的,但是会影响免疫系统功能差或免疫系统受抑制的人。

[0100] 在以下公开中描述了本发明公开主题的其它方面,并且在本发明公开主题的范围

内。

[0101] 5.2. IgG-降解酶

[0102] 本公开的细胞包含IgG-降解酶。

[0103] IgG-降解酶能够切割IgG。IgG在人体免疫系统中起重要的保护作用,但也与类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性狼疮等疾病的发病机制有关,其中已将去除IgG用作治疗这些自身免疫性疾病的治疗途径(Johansson等,PLoS ONE (2008);3:1-6;Berta等,The International Journal of Artificial Organs (1994);17:603-608;Stummvoll等,

Annals of the Rheumatic Diseases (2005);64:1015-1021)。此外,宿主IgG在同种异体移植中发挥重要作用,其中HLA供体之间的不相容导致抗体介导的对同种异体移植排斥(Loupy等,New England Journal of Medicine (2018);379:1150-1160)。

[0104] IdeS在同种异体移植之前在人体中进行了脱敏评估。在这项研究中,25名患者中有24名在接受IdeS治疗后能够接受HLA不相容的移植,该治疗可迅速去除所有供体特异性抗体(Jordan等,New England Journal of Medicine (2017);377:442-453;Lonze等,Annals of Surgery (2018);268:488-496)。

[0105] 研究表明,IgG-降解酶具有积极的治疗效果。例如,已证明IdeS在特发性血小板减少症、Goodpasture病和关节炎的动物模型中具有积极的治疗效果(Johansson等,PLoS ONE (2008);3:1-6;Yang等,Nephrology Dialysis Transplantation (2010);25:2479-2486;Nandakumar等,Arthritis and Rheumatism (2007);56:3253-3260)。

[0106] IgG-降解酶可以切割IgG,从而防止IgG抗体杀伤细胞。另外或可替代地,IgG-降解酶可以切割IgG,从而允许IgG的剩余片段保留与细胞的结合,这保护细胞免受一种或多种细胞毒性抗体的影响。在某些实施方式中,一种或多种细胞毒性抗体与IgG结合相同的表位区域或与IgG交叉竞争结合相同的表位区域,从而杀伤细胞。因此,该过程创建了一个保护屏障。

[0107] IgG-降解酶可用于保护包含配体识别受体(例如,CAR或TCR)的细胞免受宿主体液应答。宿主体液应答的非限制性实例包括抗体驱动的宿主免疫应答(例如抗-CAR抗体)、针对新氨基酸序列的宿主体液应答、针对外源序列的宿主体液应答、针对融合点序列的宿主体液应答、针对同种异体抗原(例如次要组织相容性同种异体抗原)的宿主体液应答,针对HLA抗原的宿主体液应答,针对其它等位基因的宿主体液应答,针对蛋白质或碳水化合物表达变化的宿主体液应答,针对蛋白质翻译后修饰的宿主体液应答,针对由宿主细胞和输注细胞之间的差异得出的宿主体液应答。这可能包括预先存在的应答或由细胞输注刺激的应答。来自宿主体液应答的保护防止细胞死亡或中和,为细胞提供增加的持久性、改善的活性(例如,抗肿瘤活性、增殖、细胞因子分泌、溶细胞参与或特异工程化到细胞中的其它功能。增加细胞的持久性和功能也可以降低任何包含细胞的疗法的成本。例如,CAR-T细胞疗法的成本非常高,例如,一次性输液高达数十万美元(Lin,等,Journal of Clinical Oncology (2018);36:3192-3202)。改善CAR-T细胞的持久性可以改善这类治疗的成本效益。

[0108] IgG-降解酶的非限制性实例包括化脓性链球菌(*S. pyogenes*)的IgG-降解酶(IdeS)、马链球菌兽疫亚种(*S. equi* subsp. *zooepidemicus*)的IgG-降解酶(IdeZ)、马链球菌马亚种(*S. equi* subsp. *equi*.)的IgG-降解酶(IdeE)、来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的糖苷内切酶(EndoS)和来自化脓性链球菌的链球菌半胱氨酸蛋白酶(SpeB)。

[0109] IdeE和IdeZ源自马链球菌(*Streptococcus equi*) (Lannergård等,FEMS Microbiology Letters (2006);262:230-235)。IdeE和IdeZ各自切割IgG铰链区下方的Fc区,其中该区包含位点LLGGP。

[0110] EndoS是一种内切糖苷酶,可去除IgG γ 链上的聚糖部分,从而干扰IgG与Fc受体的相互作用(Collin等,EMBO J. (2001);20(12):3046-3055。

[0111] 在某些实施方式中,IgG-降解酶能够干扰IgG和Fc受体之间的相互作用。在某些实施方式中,IgG-降解酶是内肽酶,例如IdeS、IdeZ、IdeE和SpeB。在某些实施方式中,IgG-降

解酶是IgG特异性内肽酶,例如IdeS、IdeZ和IdeE。在某些实施方式中,IgG-降解酶是糖苷内切酶,例如EndoS。

[0112] 在某些实施方式中,IgG-降解酶是IdeS。细菌已经进化出复杂的策略来逃避人类免疫系统,例如释放蛋白水解酶以避免调理素作用和吞噬作用(Potempa等,Biol Chem. (2012);393:873-888)。化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)分泌一种IgG-降解酶,该酶在铰链区下方切割IgG,产生Fab和Fc片段。

[0113] IdeS是一种对免疫球蛋白G具有高度特异性的半胱氨酸蛋白酶,它不会切割免疫球蛋白A、M、E和D(Von等,EMBO Journal (2002);21:1607-1615,以及Johansson等,PLoS ONE (2008);3:1-6)。虽然IdeS本身具有潜在的免疫原性,但这种酶应该也保护自己免受宿主免疫应答的影响,这是其自然目标。IdeS在铰链区下方切割IgG,从而释放Fc片段并且F(ab')₂片段保持完整(von Pawel-Rammingen等,EMBO J. (2002);21(7):1607-15)。

[0114] 在某些实施方式中,IdeS具有与如下提供的具有GenBank No:AEJ35177.1 (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%的同源性或同一性(本文中的同源性和同一性可使用标准软件比如BLAST或FASTA确定)的氨基酸序列,或其片段,和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,IdeS包含或具有作为SEQ ID NO:1的连续部分的氨基酸序列,其为至少约20个,或至少约30个,或至少约40个,或至少约50个,或至少约60个,或至少约70个,或至少约100个,或至少约200个,或至少约300个,至多341个氨基酸长度。可替代的或另外,在非限制性的各种实施方式中,IdeS包含或具有SEQ ID NO:1的氨基酸1至341、30至341、1至50、50至100、100至150、150至200或200至341的氨基酸序列。在某些实施方式中,IdeS包含或具有SEQ ID NO:1的氨基酸30至341。SEQ ID NO:1在下文提供。

[0115] 1 MRKRCYSTSA VVLA AVTLFA LSVDRGVIAD SFSANQEIRY SEVTPYHVTS VWTGKVTPPA
61 KFTQGEDVFH APYVANQGWY DITKTFNGKD DLLCGAATAG NMLHWWFDQN KEKIEAYLKK
121 HPDKQKIMFG DQELLDVRKV INTKGDQTN ELFN YFRDKA FPGLSARRIG VMPDLVDMF
181 INGYYLNVYK TQTTDVNRTY QEKDRRG G I F DAVFTRGDQS KLLTSRHDFK EKNLKEISDL
241 IKKELTEGKA LGLSHTYANV RINHVINLWG ADFDSNGNLK AIYVTDSDSN ASIGMKKYFV
301 GVNSAGKVAI SAKEIKEDNI GAQVLGLFTL STGQDSWNQT N [SEQ ID NO: 1]

[0116] 编码SEQ ID NO:1的氨基酸30至341的示例性核酸序列如SEQ ID NO:2所示,其在下文提供。

[0117]

GACTCTTTTAGTGCCAATCAAGAAATCCGATATAGCGAGGTGACTCCTTACCATGTAACCTCTGTGTGGACC
AAGGGAGTTACCCACCAGCCAAGTTCACGCAGGGTGAGGACGTATTTACGCACCGTACGTAGCTAACCAG
GGTTGGTACGACATCACTAAGACCTTCAATGGGAAAGACGATCTTTTGTGTGGTGCCGCAACGGCGGGCAAC
ATGCTGCACTGGTGGTTCGACCAAAACAAGGAGAAGATCGAAGCGTACTTGAAGAAACACCCAGACAAACAG
AAAATCATGTTTGGAGACCAGGAGCTCCTGGATGTGAGAAAGGTAATCAACACTAAAGGTGACCAAACAAAC
AGTGAACTTTTTAACCTATTTTCGGGACAAGGCGTTTCCAGGATTGAGTGCCAGAAGAATCGGCGTAATGCCT
GACCTCGTGCTTGACATGTTCAATGGATACTATCTCAATGTATATAAGACCCAAACCACAGATGTTAAT
CGAACTTATCAGGAGAAGGATAGAAGGGGAGGAATATTTGATGCCGTTTTTACTCGAGGAGACCAGTCTAAG
CTCTTGACCAGCAGGCACGACTTCAAAGAGAAGAATCTTAAAGAAATATCTGATCTCATAAAGAAGGAAGT
ACGGAAGGCAAAGCGCTGGGACTTTCCCATACGTATGCCAATGTAAGAATCAATCATGTCATAAACCTTTGG
GGTGCTGATTTTCGATTCTAATGGAAATCTTAAGGCTATATATGTTACTGATTCCGACTCCAACGCGTCTATT
GGCATGAAAAAATACTTCGTCGGGGTGAAGTCTCAGCAGGAAAGGTCGCAATATCTGCTAAGGAAATTAAGGAA
GACAACATAGGGGCGCAAGTGCTGGGTCTCTTCACCCTTTCCACCGCCAAGACTCCTGGAATCAAACAAAT
[SEQ ID NO: 2]

[0118] 在某些实施方式中，IgG-降解酶与细胞结合（也称为“膜结合的IgG-降解酶”）。参见例如图1A。对于膜结合的IgG-降解酶，该酶融合或附着于跨膜结构域，该跨膜结构域能够使酶结合或附着于细胞。参见例如图1A。跨膜结构域可以连接至IgG-降解酶的C-端或N-端。在某些实施方式中，跨膜结构域连接至IgG-降解酶的C-端。参见例如图1A。

[0119] 跨膜结构域可以是分子或蛋白质的跨膜结构域或其部分。跨膜结构域可包含CD8多肽（例如CD8的跨膜结构域或其部分）、CD28多肽（例如CD28的跨膜结构域或其部分）、CD3 ζ 多肽（例如CD3 ζ 的跨膜结构域或其部分）、CD4多肽（例如，CD4的跨膜结构域或其部分）、4-1BB多肽（例如，4-1BB的跨膜结构域或其部分）、OX40多肽（例如，OX40的跨膜结构域或其部分）、ICOS多肽（例如ICOS的跨膜结构域或其部分）、合成肽（不基于与免疫应答相关的蛋白质）、或其组合。

[0120] 在某些实施方式中，与IgG-降解酶融合的跨膜结构域是CD8多肽。在某些实施方式中，CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:27的氨基酸137至207。SEQ ID NO:3在下文提供。

[0121]

PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN
[SEQ ID NO: 3]

[0122] 编码SEQ ID NO:3的氨基酸的示例性核酸序列如SEQ ID NO:4所示，其在下文提供。

[0123]

CCAACTACTACTCCCGCACCGAGACCGCCCACTCCTGCTCCACGATTGCCTCCCAACCTCTTAGCTTGAGA
CCGGAAGCATGTTCGGCTGCGGCCGGTGGCGCAGTACATACTCGCGCCTGGACTTTGCGTGCGACATATAC
ATTTGGGCACCCCTGGCCGGCACTTGCGGAGTTTTGCTGCTGTCTCTCGTGATAACTCTCTATTGTAAC
[SEQ ID NO: 4]

[0124] 在某些实施方式中，IgG-降解酶由细胞分泌（也称为“分泌的IgG-降解酶”）。参见例如图1B。对于分泌的IgG-降解酶，该酶不融合或附着于跨膜结构域，从而该酶从细胞分泌或释放至细胞外环境或细胞附近。参见例如图1B。

[0125] 在某些实施方式中，IgG-降解酶与信号肽（也称为“前导序列”）连接或融合。如本文所用，“信号序列”或“前导序列”是指存在于多肽或蛋白质的N-端的肽序列（例如，约5、10、15、20、25或30个氨基酸）或其片段以指导其运输，例如将IgG-降解酶运输至细胞膜，或将配

体识别受体(例如,CAR)运输至细胞膜。

[0126] 示例性信号序列包括但不限于CD4信号肽、IgG重链信号肽、IL-2信号序列(例如,具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的人IL-2信号肽或具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的小鼠IL-2信号肽)、κ信号序列(例如,具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的人κ信号序列或具有SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的小鼠κ信号序列)、CD8信号序列(例如,具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的人CD8信号肽或具有SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的截短的人CD8信号肽)、白蛋白信号序列(例如:具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的人白蛋白信号序列)和催乳素信号序列(例如,具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的人催乳素信号序列)。SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:12在下文提供。

MYRMQLLSICIALSLALVTNS [SEQ ID NO: 5]

MYSMQLASCVTTLTLVLLVNS [SEQ ID NO: 6]

METPAQLLFLLLLWLPDTTG [SEQ ID NO: 7]

[0127] METDTLLLWVLLLWVPGSTG [SEQ ID NO: 8]

MALPVTALLLPLALLLHAARP [SEQ ID NO: 9]

MALPVTALLLPLALLLHA [SEQ ID NO: 10]

MKWVTFISLLFSSAYS [SEQ ID NO: 11]

MDSKGSSQKGSRLLLLVLVSNLLLCQGVVS [SEQ ID NO: 12]

[0128] 在某些实施方式中,IgG-降解酶与CD8信号序列连接或融合。在某些实施方式中,CD8信号序列包含或具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0129] 编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:13所示,其在下文提供。

[0130] ATGGCCCTTCCGGTGACGGCGCTTCTCCTCCCTTTGGCGCTTCTTCTGCACGCT [SEQ ID NO: 13]

[0131] 在某些实施方式中,IgG-降解酶由载体表达。IgG-降解酶的表达可以通过任何合适的方法检测,包括但不限于免疫印迹、PCR、ELISA、质谱和流式细胞术。

[0132] 5.3. 配体识别受体

[0133] 本公开的细胞包含并提供配体识别受体。任何能够与配体结合的受体都可以是本发明的配体识别受体。配体识别受体的非限制性实例包括与目标抗原结合的抗原识别受体、细胞粘附分子、细胞因子受体(例如,白细胞介素或细胞因子受体,比如Fas配体或TGFβ受体、Trail、TCR、IgG、CAR、NK抑制受体、生长因子受体比如EGFR或FGFR、肽配体或粘附分子、碳水化合物受体、G蛋白受体等)、以及Fc受体。受体可以是单价或多价的。配体识别受体可以是内源的或外源的。配体识别受体可以重组表达。在某些实施方式中,配体识别受体由载体表达。

[0134] 在某些实施方式中,配体识别受体是与目标抗原结合的抗原识别受体。抗原识别受体的非限制性实例包括嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)、IgG、B细胞受体(BCR)、IgM、IgD和IgE。

[0135] 在某些实施方式中,配体识别受体是嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方式中,配体识别受体是T细胞受体(TCR)。

[0136] 在某些实施方式中,配体识别受体结合抗原。抗原可以是肿瘤抗原、病原体抗原、正常细胞抗原(例如,用于自身免疫性疾病或器官移植)、HLA抗原或同种异体抗原(例如,次

要组织相容性同种异体抗原)。

[0137] 5.3.1. 抗原

[0138] 在某些实施方式中,配体识别受体与抗原结合,该抗原是肿瘤抗原。任何肿瘤抗原(抗原肽)可以用于本文所述的肿瘤相关的实施方式中。抗原来源包括但不限于癌蛋白。抗原可以表达为肽或完整蛋白或其部分。完整蛋白或其部分可以是天然的或诱变的。肿瘤抗原的非限制性实例包括碳酸酐酶IX(CAIX)、癌胚抗原(CEA)、CD2、CD8、CD7、CD 10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CLL1、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、CD123、CD44V6、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如细胞表面抗原)、HPV E6或E7肽、EBV肽、MAGE肽、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2,3,4(erb-B2,3,4)、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体- α 、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、白介素13受体亚基 α -2(IL-13R α 2)、 κ -轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1CAM)、黑色素瘤抗原家族A,1(MAGE-A1)、粘蛋白16(MUC16)、粘蛋白1(MUC1)、间皮素(MSLN)、ERBB2、MAGE A3、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、存活蛋白、hTERT、EphA2、NKG2D配体、癌-睾丸抗原NY-ESO-1、瘤胚抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、ROR1、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)和Wilms肿瘤蛋白(WT-1)、BCMA、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME和ERBB。

[0139] 在某些实施方式中,配体识别受体结合CD19。在某些实施方式中,配体识别受体结合鼠CD19多肽。在某些实施方式中,鼠CD19多肽包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0140] RPQKSLLEVEEGGNVLPCLPDSSPVSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGLHVGS LGILLVIVNVSDH
MGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLRNRSSGSHRSTSGSQLYVWAKDHPKV
WGTKPVCAPRGSSLNQSLINQDLTVAPGSTLWLSCGVPPVPVAKGSISWTHVHPRRPNVSLLSLSLGGEHPV
REMWWGSLLLLPQATALDEGTYCYCLRGNTIERHV KVIARS A VWLWLLRTGG [SEQ ID NO:14]

[0141] 在某些实施方式中,配体识别受体结合CD19多肽。在某些实施方式中,配体识别受体结合人CD19多肽。在某些实施方式中,人CD19多肽包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0142] PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQM
GGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDR
PEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRP
ARDMWVME TGLLLPRATAQDAGKYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [SEQ ID NO:15]

[0143] 在某些实施方式中,配体识别受体结合至人或鼠CD19蛋白的细胞外结构域。

[0144] 在某些实施方式中,配体识别受体结合病原体抗原,例如用于治疗和/或预防病原体感染或其它感染性疾病,例如在免疫受损的受试者中。病原体的非限制性实例包括能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫和原生动物。

[0145] 病毒的非限制性实例包括逆转录病毒科(Retroviridae)(例如,人免疫缺陷病毒,例如HIV-1(也称为HDTV-III、LAVE或HTLV-III/LAV或HIV-III;以及其它分离株,例如HIV-LP);小RNA病毒科(Picornaviridae)(例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);杯状病毒科(Calciviridae)(例如引起肠胃炎的菌株);披膜病毒科(Togaviridae)(例如马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(Flaviridae)(例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒);冠状病毒科(Coronaviridae)(例如冠状病毒);弹状病毒科

(Rhabdoviridae) (例如水疱性口炎病毒、狂犬病病毒);丝状病毒科(Filoviridae) (例如埃博拉病毒);副粘病毒科(Paramyxoviridae) (例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒);正粘病毒科(Orthomyxoviridae) (例如流行性感冒病毒);布尼亚病毒科(Bunyaviridae) (例如汉坦病毒、bunza病毒、静脉病毒和奈拉病毒);沙粒病毒科(Arenaviridae) (出血热病毒);呼肠病毒科(Reoviridae) (例如呼肠孤病毒、奥比病毒(orbiviruses) 和轮状病毒);双RNA病毒科(Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae) (乙型肝炎病毒);细小病毒科(Parvoviridae) (细小病毒);乳多空病毒科(Papovaviridae) (乳头瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒科(Adenoviridae) (大多数腺病毒);疱疹病毒科(Herpesviridae) (单纯疱疹病毒(HSV) 1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒);痘病毒科(Poxviridae) (天花病毒、牛痘病毒、痘病毒);和虹膜病毒科(Iridoviridae) (例如非洲猪瘟病毒);以及未分类的病毒(例如,丁型肝炎的病原体(被认为是乙肝病毒的缺陷卫星),非甲、非乙型肝炎的病原体(类1=内部传播;类2=经肠胃外传播(即,丙型肝炎);诺沃克和相关病毒,以及星状病毒)。

[0146] 细菌的非限制性实例包括葡萄球菌(*Staphylococci*)、链球菌(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌属(*Pseudomonas species*) 和沙门氏菌属(*Salmonella species*)。感染性细菌的具体实例包括但不限于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria sp.*) (例如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌(*M. goodii*))、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、奈瑟氏菌淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌(viridans组)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌(厌氧属)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属(pathogenic *Campylobacter sp.*)、肠球菌属(*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、无水芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium sp.*)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属(*Bacteroides sp.*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、密螺旋体(*Treponema pallidum*)、雅司螺旋体(*Treponema pertenue*)、钩端螺旋体(*Leptospira*)、立克次氏体(*Rickettsia*) 和衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*)。

[0147] 在某些实施方式中,病原体抗原是存在于巨细胞病毒(CMV) 中的病毒抗原,存在于爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus) (EBV) 中的病毒抗原,存在于人类免疫缺陷病毒(HIV) 中的病毒抗原、存在于人乳头瘤病毒(HPV) 中的病毒抗原、或存在于流感病毒中的病毒抗原。

[0148] 在某些实施方式中,配体识别受体结合同种异体抗原,比如HLA分子,和次要组织相容性同种异体抗原。

[0149] 5.3.2.T细胞受体 (TCR)

[0150] 在某些实施方式中,配体识别受体是TCR。TCR是一种二硫键连接的异二聚体蛋白质,由两条可变链组成,表达为与不变CD3链分子复合的一部分。TCR存在于T细胞表面,负责将抗原识别为与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽。在某些实施方式中,TCR包含 α 链和 β 链(分别由TRA和TRB编码)。在某些实施方式中,TCR包含 γ 链和 δ 链(分别由TRG和TRD编码)。

[0151] TCR的每条链由两个细胞外结构域组成:可变(V)区和恒定(C)区。恒定区靠近细胞膜,然后是跨膜区和短的细胞质尾。可变区与肽/MHC复合物结合。两条链的可变结构域均具有三个互补决定区(CDR)。

[0152] 在某些实施方式中,TCR可以与三个二聚信号传导模块CD3 δ/ϵ 、CD3 γ/ϵ 和CD247 ζ/η 或 ζ/η 形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC(肽/MHC)结合时,表达TCR复合物的T细胞得以激活。

[0153] 在某些实施方式中,配体识别受体是内源性TCR。在某些实施方式中,配体识别受体是外源性TCR。在某些实施方式中,配体识别受体是重组TCR。在某些实施方式中,配体识别受体是非天然存在的TCR。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR相差至少一个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR相差至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100或更多个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR从天然存在的TCR修饰至少一个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR从天然存在的TCR修饰至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100或更多个氨基酸残基。

[0154] 5.3.3.嵌合抗受体 (CAR)

[0155] 在某些实施方式中,配体识别受体是CAR。CAR是工程化的受体,其将目的特异性移植或赋予免疫效应细胞。CAR可用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上;通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0156] 共有三代CAR。“第一代”CAR通常由胞外抗原结合结构域(例如scFv)组成,该结构域与跨膜结构域融合,而跨膜结构域与细胞质/细胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别,并通过单个融合分子中的CD3 ζ 链信号传导结构域激活CD4⁺和CD8⁺T细胞,而与HLA介导的抗原呈递无关。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的细胞内信号传导结构域添加到CAR的细胞质尾区,以向T细胞提供其它信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如CD28或4-1BB)和激活(CD3 ζ)的CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是第一代CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是第二代CAR。

[0157] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(体现为例如scFv或其类似物)与抗原结合的解离常数(K_d)为约 5×10^{-7} M或更小。在某些实施方式中, K_d 为约 5×10^{-7} M或更小,约 1×10^{-7} M或更小,约 5×10^{-8} M或更小,约 1×10^{-8} M或更小,约 5×10^{-9} M或更小,约 1×10^{-9} M或更小,约 5×10^{-10} M或更小,约 1×10^{-10} M或更小,约 5×10^{-11} M或更小,约 1×10^{-11} M或

更小,约 5×10^{-12} M或更小,或约 1×10^{-12} M或更小。

[0158] 细胞外抗原结合结构域(例如,在scFv或其类似物中)的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、FACS分析法、生物测定法(例如生长抑制)、表面等离子体共振、WesternBlot测定法、本领域已知的其它测定法来测定。这些测定法中的每一种通常通过采用对目标复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体或scFv)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记并用于放射免疫测定法(RIA)(参见,例如,Weintraub,B.,放射免疫测定的原理,放射配体测定技术的第七培训课程,内分泌学会,1986年3月,并入本文以供参考)。放射性同位素可通过诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方法或通过放射自显影来检测。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域用荧光标志物标记。荧光标志物的非限制性示例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Azurite和mKalamal)、青色荧光蛋白(例如ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus和YPet)。

[0159] 根据本公开的主题,CAR可以包含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,其中细胞外抗原结合结构域特异性结合抗原,例如肿瘤抗原或病原体抗原。

[0160] 5.3.3.1.CAR的细胞外抗原结合结构域

[0161] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含scFv。在某些实施方式中,scFv是人scFv。在某些实施方式中,scFv是人源化的scFv。在某些实施方式中,scFv是鼠scFv。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含Fab,其任选地被交联。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含F(ab)₂。在某些实施方式中,任何前述分子可包含在具有异源序列的融合蛋白中以形成CAR的细胞外抗原结合结构域。

[0162] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含鼠scFv。在某些实施方式中,本公开的CAR的细胞外抗原结合结构域包含与人CD19结合的scFv。

[0163] 在某些实施方式中,scFv包含重链可变区(V_H),其包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,scFv包含轻链可变区(V_L),其包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,scFv包含V_H和V_L,其中V_H包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,V_L包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,任选地在V_H和V_L之间具有(iii)接头序列,例如接头肽。

[0164] 如本文所用,“接头”指共价连接两个或更多个多肽或核酸以使它们彼此连接的官能团(例如化学或多肽)。如本文所用,“肽接头”是指用于将两种蛋白质偶联在一起(例如,偶联V_H和V_L结构域)的一个或更多个氨基酸。

[0165] 在某些实施方式中,接头包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,其在下文提供。

[0166] GGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 18]

[0167] 在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含V_H,其包含与SEQ ID NO:16具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性或同一性的氨基酸序列。例如,CAR的细胞外抗原结合结构域包含V_H,其包含与SEQ ID NO:16具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含V_H,其包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含 V_L , 其包含与SEQ ID NO:17具有至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列。例如, CAR的细胞外抗原结合结构域包含 V_L , 其包含与SEQ ID NO:17具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99% 同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含 V_L , 其包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。某些实施方式, CAR的细胞外抗原结合结构域包含 V_H 和 V_L , V_H 包含与SEQ ID NO:16具有至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列, V_L 包含与SEQ ID NO:17具有至少约80% (例如, 至少约85%、至少约90%或至少约95%) 同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中, 细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的 V_H 和含有如SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的 V_L 。

[0169] 在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR1, 含有如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR2和含有如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR3。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的 V_H CDR1, 含有如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的 V_H CDR2和含有如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的 V_H CDR3。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR1, 含有如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR2和含有如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR3。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的 V_L CDR1, 含有如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的 V_L CDR2和含有如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的 V_L CDR3。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR1, 含有如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR2, 含有如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_H CDR3, 含有如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR1, 含有如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR2和含有如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列或其保守修饰的 V_L CDR3。在某些实施方式中, CAR的细胞外抗原结合结构域包含含有如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的 V_H CDR1, 含有如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的 V_H CDR2, 含有如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的 V_H CDR3, 含有如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的 V_L CDR1, 含有如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的 V_L CDR2和含有如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的 V_L CDR3。

[0170] 在某些实施方式中, 细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的scFv, 并且特异性结合人CD19多肽 (例如, 含有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的人CD19多肽)。在某些实施方式中, 编码SEQ ID NO:25的氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:26所示。

[0171] SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:26在下文提供。

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKG
 QATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 16]
 DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSG
 SGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [SEQ ID NO: 17]
 GYAFSSY [SEQ ID NO: 19]
 YPGDGD [SEQ ID NO: 20]
 KTISSVVDFYFDY [SEQ ID NO: 21]
 KASQNVGTNVA [SEQ ID NO: 22]
 SATYRNS [SEQ ID NO: 23]
 QQYNRYPYT [SEQ ID NO: 24]

[0172] EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [SEQ ID NO: 25]

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCT
 TCTGGCTATGCATTAGTACTGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATT
 GGACAGATTTATCTGGAGATGGTGATACATACTACAATGGAAGTTCAAGGCTCAAGCCACACTGACTGCA
 GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGT
 GCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
 TCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCAGGAGTCT
 CCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACT
 AATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAAC
 AGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAG
 TCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAG
 CTGGAGATCAAACG [SEQ ID NO: 26]

[0173] 如本文所用,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变本公开的包含氨基酸序列的CAR(例如,CAR的细胞外抗原结合结构域)的结合特征的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本公开的CAR的人scFv中。氨基酸可根据其物理化学性质(例如电荷和极性)分为几组。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被相同组内的氨基酸取代的氨基酸取代。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸,中性电荷氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。另外,氨基酸可以按极性分类:极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或更多个氨基酸残基可以被来自相同组的其它氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的功能测定法测试改变的抗体的保留功能(即,上述(c)至(1)所示的功能)。在某些实施方式中,在指定序列或CDR区内不超过一个、不超过两个、不超过三个、不超过四个、不超过五个残基被改变。

[0174] 相对于指定序列,含有与指定序列(例如,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17)具有至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)同源性或同一性的 V_H 和/或 V_L 氨基酸序列可以包含取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但保留结合靶抗原(例如,CD19)的能力。在某些实施方式

中,在指定序列(例如,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17)中,总共1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在某些实施方式中,取代、插入或缺失发生在细胞外抗原结合结构域的CDR之外的区(例如,在FR中)。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包含选自SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17(包括该序列(SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17)的翻译后修饰)中的V_H和/或V_L序列。

[0175] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的同源性百分比等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是该序列共享的相同位置数的函数(即,%同源性=相同位置数#/位置总数#×100),其中考虑了空位数和每个空位的长度,需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。

[0176] 可以使用E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))的算法确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比,该算法已合并到ALIGN程序(2.0版)中),使用PAM120重量残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))算法来确定,该算法已被整合到GCG软件包(可从www.gcg.com获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,并且空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0177] 另外或可替代地,本公开的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索以例如识别相关序列。可以使用Altschul等((1990)J.Mol.Biol.215:403-10)的XBLAST程序(2.0版)执行此类搜索。可以使用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的指定序列(例如,scFv m903,m904,m905,m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0178] 5.3.3.2.CAR的跨膜结构域

[0179] 在某些非限制性实施方式中,CAR的跨膜结构域包含跨膜的至少一部分的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚集并且信号被传递到细胞。CAR的跨膜结构域可以包含CD8多肽(例如,CD8的跨膜结构域或其部分)、CD28多肽(例如,CD28的跨膜结构域或其部分)、CD3 ζ 多肽、CD4多肽(例如,CD4的跨膜结构域或其部分)、4-1BB多肽(例如,4-1BB的跨膜结构域或其部分)、OX40多肽(例如,OX40的跨膜结构域或其部分)、ICOS多肽(例如,ICOS的跨膜结构域或其部分)、合成肽(不基于与免疫应答相关的蛋白质)、或其组合。

[0180] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,例如人CD8的跨膜结构域或其部分,或鼠CD8的跨膜结构域。在某些实施方式中,CD8多肽包含或含有与含有如下提供的NCBI参考编号NP_001139345.1(SEQ ID NO:27)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性(本文中的同源性可以使用标准软件,例如BLAST或FASTA确定)的氨基酸序列,或其片段,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD8多肽包含或具有作为SEQ ID NO:27的连续部分的氨基酸序列,其为至少20或至少30或至少40或至少50且至多235个氨基

酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:25的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、137至207、137至209、150至200或200至235的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,该CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:27的氨基酸137至207。

[0181] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLY
LSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR
PPTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCK
CPRPVVKGDKPSLSARYV [SEQ ID NO: 27]

[0182] 编码SEQ ID NO:27的氨基酸137至207的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:28所示,其在下文提供。

[0183] CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGC
CCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTAC
ATCTGGGCGCCCCGTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAC
[SEQ ID NO: 28]

[0184] 在某些实施方式中,CD8多肽包含或含有与含有如下提供的NCBI参考编号AAA92533.1 (SEQ ID NO:29) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性(本文中的同源性可以使用标准软件,例如BLAST或FASTA确定)的氨基酸序列或该序列的片段,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些实施方式中,CD8多肽包含或具有作为SEQ ID NO:27的连续部分的氨基酸序列,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50、或至少60、或至少70、或至少100、或至少200且至多247个氨基酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:29的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219、或200至247的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8多肽,该CD8多肽包含或具有SEQ ID NO:29的氨基酸151至219。SEQ ID NO:29在下文提供。

1 MASPLTRFLS LNLILLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFSAVRDTNN KYVLTILNKFS
[0185] 121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKPVLRT PSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCCKP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 29]

[0186] 在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,例如人CD28的跨膜结构域或其部分,或鼠CD28的跨膜结构域。CD28多肽包含或含有与含有如下提供的NCBI参考编号NP_006130 (SEQ ID NO:30) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列或该序列的片段,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些非限制性实施方式中,CD28多肽包含或具有作为SEQ ID NO:30的连续部分的氨基酸序列,其为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸长度。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD28多肽包含或具有SEQ ID NO:30的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、或200至220的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD28多肽,该CD28多肽包含或具有SEQ ID NO:30的氨基酸153至179。

[0187] SEQ ID NO:30在下文提供:

1 MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
[0188] 61 SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVTFYQLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 30]

[0189] 在某些非限制性实施方式中,CAR还包含将细胞外抗原结合结构域连接至跨膜结构域的间隔区。间隔区可以足够柔韧性以允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进抗原识别。间隔区可以是来自IgG1的铰链区,或者是免疫球蛋白的CH₂CH₃区和CD3的部分,CD28多肽的一部分(例如,SEQ ID NO:30的一部分),CD8多肽的一部分(例如SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:29的一部分),与前述任一项具有至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%同源性或同一性的变体,或合成的间隔序列。

[0190] 5.3.3.3.CAR的细胞内信号传导结构域

[0191] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含可以激活或刺激细胞(例如淋巴谱系的细胞,例如T细胞)的CD3ζ多肽。CD3ζ包含三个ITAM,并在抗原结合后,将激活信号传递给细胞(例如,淋巴谱系的细胞,例如T细胞)。CD3ζ链的细胞内信号传导结构域是来自内源性TCR的信号的主要发送者。在某些实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有与具有NCBI参考编号:NP_932170(SEQ ID No:31)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列,或其片段,和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些非限制性实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有作为SEQ ID NO:31的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个、且至多164个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有SEQ ID NO:31的氨基酸1至164、1至50、50至100、100至150、或150至164的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3ζ多肽,该CD3ζ多肽包含或具有SEQ ID NO:31的氨基酸52至164。

[0192] SEQ ID NO:31在下文提供:

1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
[0193] 61 APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EEYDVLDRRR GRDPGEGGKP QRRKNPQEGF YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 31]

[0194] 在某些实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有与具有NCBI参考编号:NP_001106864.2(SEQ ID No:32)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列,或其片段,和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在某些非限制性实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有作为SEQ ID NO:32的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少约20个、或至少约30个、或至少约40个、或至少约50个、或至少约90个、或至少约100个、且至多188个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD3ζ多肽包含或具有SEQ ID NO:32的氨基酸1至164、1至50、50至100、52至142、100至150、或150至188的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3ζ多肽,该CD3ζ多肽包含或具有SEQ ID NO:32的氨基酸52至142。

[0195] SEQ ID NO:32在下文提供:

1 MKWKVSVLAC ILHVRFPAGE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVIIITALY LRKFSRSEAE
[0196] 61 TAANLQDPNQ LYNELNLGRR EYDVLEKKR ARDPGEGGKQ RRRNPQEGVY NALQKDKMAE
121 AYSEIGTKGE RRRGKGHDGL YQDSHFQAVQ FGNNRREREGRS ELTRTLGLRA RPKACRHHKP
181 LSLPAAVS [SEQ ID NO: 32]

[0197] 在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 多肽, 该多肽包含或具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列, 其在下文提供。

[0198] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEGGKPRRKNPQEGE [SEQ ID NO: 33]

[0199] 编码SEQ ID NO:33的示例性核酸序列如SEQ ID NO:34所示, 其在下文提供。

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTC
[0200] AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTG [SEQ ID NO: 34]

[0201] 在某些非限制性实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域还包含至少一个共刺激信号传导区。在某些实施方式中, 共刺激区包含至少一个共刺激分子或其部分(例如, 共刺激分子的细胞内结构域或其部分)。共刺激信号区可以为细胞提供最佳的淋巴细胞活化。如本文所用, “共刺激分子”是指除抗原识别受体或其配体之外的细胞表面分子, 其是免疫应答细胞对目标抗原的有效应答所必需的。共刺激分子的非限制性实例包括CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、CD2和NKGD2。共刺激分子可以与共刺激配体结合, 共刺激配体是一种在细胞表面表达的蛋白质, 它在与其受体结合后产生共刺激应答, 即当抗原识别受体(例如, CAR)与其靶抗原结合时影响所提供刺激的细胞内应答。共刺激配体包括但不限于4-1BB配体(4-1BBL)、CD80、CD86、CD70、OX40L和ICOSLG。作为一个实例, 4-1BBL可以与4-1BB结合以提供与激活信号结合诱导CAR-T细胞的效应细胞功能的共刺激信号。在美国专利7,446,190(整体并入本文以供参考)中公开了包含细胞内信号传导结构域的CAR, 该细胞内信号传导结构域包含具有4-1BB、ICOS或DAP-10的共刺激信号区域。

[0202] 在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区, 其包含4-1BB多肽(例如, 4-1BB的细胞内结构域或其部分)。4-1BB多肽可包含或具有与具有NCBI参考编号:NP_001552(SEQ ID NO:35)的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%、至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列, 或其片段, 和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中, 4-1BB多肽包含或具有作为SEQ ID NO:35的连续部分的氨基酸序列, 其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多为255个氨基酸。可替代地或另外地, 在非限制性的各种实施方式中, 4-1BB多肽包含或具有SEQ ID NO:35的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200或200至255的氨基酸序列。在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区, 其包含4-1BB的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区, 其包含人4-1BB的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区, 其包含4-1BB多肽, 该4-1BB多肽包含或具有SEQ ID NO:35的氨基酸214至255。SEQ ID NO:35在下文提供。

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
[0203] 121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIIISF FLALTSTALL FLLFFLT LRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 35].

[0204] 编码SEQ ID NO:35的氨基酸214至255的示例性核酸序列如SEQ ID NO:36所示,其在下文提供。

AAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA
[0205] AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
[SEQ ID NO: 36]

[0206] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含CD28多肽(例如,CD28的细胞内结构域或其部分)。CD28多肽可包含或具有与SEQ ID NO:29后SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列,或其片段,和/或可以任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中,CD28多肽包含或具有作为SEQ ID NO:30的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多为220个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,CD28多肽包含或具有SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200、180至220、或200至220的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含CD28的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含人CD28的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中,人CD28具有与SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,人CD28具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含CD28多肽,该CD28多肽包含或具有SEQ ID NO:30的氨基酸180至220。

[0207] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含OX40多肽(例如,OX40的细胞内结构域或其部分)。OX40多肽可包含或具有与具有NCBI参考编号NP_003318.1 (SEQ ID NO:37) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列,或其片段,和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中,OX40多肽包含或具有作为SEQ ID NO:37的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多为277个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性的各种实施方式中,OX40多肽包含或具有SEQ ID NO:37的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、150至200或200至277。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含OX40的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区,其包含人OX40的细胞内结构域或其部分。在某些实施方式中,人OX40具有与SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,人OX40具

有SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。

```

1   MCVGARRLGR  GPCAALLLLG  LGLSTVTGLH  CVGDTYPSND  RCCHECRPGN  GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG  FYNDVVSSKP  CKPCTWCNLR  SGSEKQLCT  ATQDTVCRCR  AGTQPLDSYK
[0208] 121  PGVDCAPCPP  GHFSPGDNQA  CKPWTNCTLA  GKHTLQPASN  SSDAICEDRD  PPATQPQETQ
181  GPPARPITVQ  PTEAWPRTSQ  GPSTRPVEVP  GGRAVAAILG  LGLVLGLLGP  LAILLALYLL
241  RRDQRLPPDA  HKPPGGGSFR  TPIQEEQADA  HSTLAKI [SEQ ID NO: 37]

```

[0209] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区，其包含ICOS多肽（例如，ICOS的细胞内结构域或其部分）。ICOS多肽可包含或具有与具有NCBI参考编号：NP_036224.1 (SEQ ID NO:38) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列，或其片段，和/或可任选地包含至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸取代。在非限制性的某些实施方式中，ICOS多肽包含或具有作为SEQ ID NO:38的连续部分的氨基酸序列，其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多为199个氨基酸。可替代地或另外地，在非限制性的各种实施方式中，ICOS多肽包含或具有SEQ ID NO:38的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150或150至199的氨基酸序列。在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区，其包含ICOS的细胞内结构域。在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导区，其包含人ICOS的细胞内结构域。在某些实施方式中，人ICOS具有与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源性或同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，人ICOS具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0210] SEQ ID NO:38在下文提供：

```

1   MKSGLWYFFL  FCLRIKVLTG  EINGSANYEM  FIFHNGGVQI  LCKYPDIVQQ  FKMQLLKGGQ
61  ILCDLTKTKG  SGNTVSIKSL  KFCHSQLSNN  SVSFFLYNLD  HSHANYFYCN  LSIFDPPPFK
[0211] 121  VTLTGGYLHI  YESQLCCQLK  FWLPIGCAAF  VVVCILGCIL  ICWLTKKKYS  SSVHDPNGEY
181  MFMRAVNTAK  KSRLTDVTL [SEQ ID NO: 38]

```

[0212] 在某些实施方式中，CAR包含两个共刺激信号传导结构域，其中第一共刺激结构域包含4-1BB的细胞内结构域或其部分，并且第二共刺激结构域包含CD28的细胞内结构域或其部分。

[0213] 在某些实施方式中，本公开的CAR还包含诱导型启动子，用于在人细胞中表达核酸序列。用于表达CAR基因的启动子可以是组成型启动子，例如泛素蛋白C (UbiC) 启动子。

[0214] 5.3.3.4. 示例性CAR

[0215] 在某些实施方式中，本公开的细胞包含CAR，其包含与CD19结合的细胞外抗原结合结构域、包含CD8多肽的跨膜结构域（例如，人CD8的跨膜结构域或其部分），和包含CD3 ζ 多肽的细胞内信号传导结构域以及包含4-1BB多肽的共刺激信号区（例如，人4-1BB的细胞内结构域或其部分）。

[0216] 在某些实施方式中，将CAR命名为“19BBz”。在某些实施方式中，CAR（例如，19BBz）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：包含SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的V_H CDR1、包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的V_H CDR2、包含SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的V_H CDR3、包含SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的V_L CDR1、包含SEQ ID NO:23所示

氨基酸序列的V_L CDR2、包含SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的V_L CDR3；包含CD8多肽的跨膜结构域，该CD8多肽包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或SEQ ID NO:27的氨基酸137至207；包含CD3ζ多肽的细胞内信号传导结构域，该CD3ζ多肽包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列，以及包含4-1BB多肽的共刺激信号传导区，该4-1BB多肽包含SEQ ID NO:35的氨基酸214至255。

[0217] 在某些实施方式中，CAR（例如，19BBz）包含与SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性或同一性的氨基酸序列，SEQ ID NO:39在下文提供。

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTA
DKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDYFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS
PKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGDTFTLTITNVQ
[0218] SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO:39]

[0219] 编码SEQ ID NO:39的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:40所示，其在下文提供。

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTTGCAAGGCT
TCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATT
GGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCA
GACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGT
GCAAGAAAGACCATTAGTTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTACCCAGTCT
CCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACT
AATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAAC
AGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAG
TCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGACCAAG
[0220] CTGGAGATCAAACGGGCGGCCGACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACCCCGGCGCCACGATC
GCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTG
GTTATCACCCCTTTACTGCAACAAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA
CTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGA
AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO:40]

[0221] 在某些实施方式中，CAR（例如，19BBz）还包含CD8信号肽。在某些实施方式中，CD8信号肽包含或具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:41所示，其在下文提供。

[0222] ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCA [SEQ ID NO:41]

[0223] 包含CD8信号肽的19BBz的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示，其在下文提供。

[0224]

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNVKQRPQGGLIEWIGQIYPG
DGDNTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWQGTTVTTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDR
FTSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEGGCELVRKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [SEQ ID NO:
42]

[0225] 编码SEQ ID NO:42的氨基酸序列的示例性核酸序列在SEQ ID NO:43所示,其在下文提供。

[0226]

ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAG
TCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTAGT
AGCTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA
GATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACA
GCCTACATGCAGCTCAGCGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGT
TCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGA
TCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCAGGAGTCTCCAAAATTCATGTCCACA
TCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAA
CAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGAC
TATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCG
GCCGCACCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCC
CTGCGCCAGAGGCGTCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
ATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC
AACAAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGC
AGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGATTGGGATGAAA
GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 43]

[0227] 5.4. 细胞

[0228] 本公开的主题提供包含 (a) 配体识别受体 (例如,第3节中公开的配体识别受体) 和 (b) IgG-降解酶 (例如,第2节中公开的IgG-降解酶) 的细胞。在某些实施方式中,配体识别受体能够激活细胞。可以用配体识别受体和IgG-降解酶转导细胞,使得细胞共表达配体识别受体和IgG-降解酶。在某些实施方式中,IgG-降解酶附着于细胞表面。在某些实施方式中,IgG-降解酶不附着于细胞表面,而是从细胞递送或释放。

[0229] 在某些实施方式中,细胞还包含可切割的 (例如,自切割的) 接头 (例如,2A肽,例如,P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽)。在某些实施方式中,细胞还包含P2A肽。在某些实施方式中,P2A肽位于配体识别受体和IgG-降解酶之间。在某些实施方式中,P2A肽包含或具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列,其在下文提供:

[0230] ATNFSLLKQAGDVEENPGP [SEQ ID NO: 44]

[0231] 编码SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的示例性核苷酸序列如SEQ ID NO:45所示,其在下文提供。

[0232] GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT [SEQ ID NO: 45]

[0233] 在某些实施方式中,细胞是应答细胞。在某些实施方式中,细胞是免疫应答细胞。在某些实施方式中,细胞是可激活细胞。在某些实施方式中,细胞是淋巴谱系的细胞。在某些实施方式中,细胞是骨髓谱系的细胞。在某些实施方式中,细胞是来自正常组织的细胞,例如来自肾、肝、肺、骨髓或胰腺。

[0234] 淋巴谱系的细胞可以提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外来物质的检测、宿主外来细胞的检测等。淋巴谱系细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、树突细胞和可分化成淋巴样细胞的干细胞。干细胞可以是多能干细胞(例如,胚胎干细胞和诱导的多能干细胞)。

[0235] 在某些实施方式中,细胞是T细胞。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。本发明公开主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞)、和两种效应记忆T细胞:例如 T_{EM} 细胞和 T_{EMRA} 细胞)、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤性T细胞(NK T细胞)、粘膜相关性不变T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导被感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞的一个子集。患者自身的T细胞可以被基因改造以通过抗原识别受体(例如CAR或TCR)的引入靶向特定的抗原。T细胞可以是 $CD4^+$ T细胞或 $CD8^+$ T细胞。在某些实施方式中,T细胞是 $CD8^+$ T细胞。

[0236] 在某些实施方式中,细胞是NK细胞。自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,它是细胞介导的免疫力的一部分,并在先天免疫应答中起作用。NK细胞不需要事先激活即可对靶细胞执行细胞毒作用。

[0237] 本发明公开主题的人淋巴细胞的类型包括但不限于外周供体淋巴细胞,例如在Sadellain,M.等,2003,Nat Rev Cancer 3:35-45(公开了经遗传修饰以表达CAR的外周供体淋巴细胞),在Morgan,R.A.等,2006 Science 314:126-129(公开了经遗传修饰以表达包含 α 和 β 异二聚体的全长肿瘤抗原识别性T细胞受体复合物的外周供体淋巴细胞),在Panelli,M.C.,等.2000 J Immunol 164:495-504;Panelli,M.C.,等.2000 J Immunol 164:4382-4392(公开了在肿瘤活组织检查中衍生自肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物)和在Dupont,J.,等.2005 Cancer Res 65:5417-5427;Papanicolaou,G.A.,等.2003 Blood 102:2498-2505(选择性地公开了使用人工抗原呈递细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞在体外扩增的抗原特异性外周血白细胞)中公开的那些。

[0238] 细胞(例如,T细胞)可以是自体的、非自体的(例如,同种异体的)、或者是体外从工程化的祖细胞或干细胞衍生的。在某些实施方式中,细胞是同种异体细胞。

[0239] 在某些实施方式中,细胞是骨髓谱系的细胞。骨髓谱系细胞的非限制性实例包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞和可分化成骨髓细胞的干细胞。

[0240] 在某些实施方式中,本公开的细胞用于疗法。在某些实施方式中,本公开的细胞用

于细胞疗法。在某些实施方式中,本公开的细胞用于基因疗法。在某些实施方式中,本公开的细胞用于CRISPR基因疗法。细胞工程领域正在扩大,特别是随着CRISPR-Cas9技术的使用越来越广泛,并且随着多种外源蛋白引入细胞,细胞的免疫原性成为一个重要的问题。免疫原性细胞会迅速从患者体内清除,从而降低其有效性 (Porter等, *Science Translational Medicine* (2015); 7; Maude等, *N Engl J Med.* (2014); 371:1507-1517; Louis等, *Blood* (2011); 118:6050-6056)。基因疗法涉及将外源基因插入通常伴随病毒基因或其它外源辅助基因的细胞中。病毒蛋白,例如用于血友病治疗和其他遗传疾病的AAV病毒,可能会在患者体内持续数月或数年,并作为免疫应答的目标。

[0241] 本公开的细胞可以减轻外来细胞的免疫原性。

[0242] 在某些实施方式中,本公开的细胞用于免疫疗法。在某些实施方式中,本公开的细胞用于过继细胞转移 (ACT)。一种快速出现且个性化的免疫疗法是过继细胞转移 (ACT), 其中将患者的免疫细胞用作治疗癌症的工具 (Kalos等, *Immunity* (2013); 39:49-60)。T细胞可以通过基因工程识别肿瘤细胞,在体外扩增,然后转移回患者体内。有几种类型的ACT,包括嵌合抗原受体 (CAR) T细胞、T细胞受体 (TCR) 工程化T细胞和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) (Rosenberg等, *Nature Reviews Cancer* (2008); 8:299-308)。在ACT中,T细胞经过基因工程改造以识别肿瘤细胞,在体外扩增,然后转移回患者体内。

[0243] CAR T细胞疗法在临床环境中取得了进展,2017年有两种FDA批准的疗法 (Zheng等, *Drug Discovery Today* (2018); 23:1175-1182)。该领域的持续努力正在解决目前CAR T细胞疗法的局限性,以改善其运输和对肿瘤的认识,增加它们的增殖和持久性,并加强我们对其活性的控制 (Lim等, *Cell* (2017); 168:724-740)。需要改进ACT以减少脱靶效应和降低毒性,以及提高整体疗效。在接受CAR T细胞的患者中观察到患者对CAR T细胞的体液应答。这种抗体针对CAR构建蛋白,以及针对来自用于转导的逆转录病毒载体的前病毒蛋白 (Kershaw等, *Clinical Cancer Research* (2006); 12:6106-6115; Lamers等, *Blood* (2011); 117:72-82; Jensen等, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010); 16:1245-1256.7-9)。随着通过使用CRISPR技术将细菌蛋白用于CAR T细胞工程,更重要的是,随着同种异体CAR T细胞的使用变得更加普遍,免疫原性也可能成为一个更普遍的问题 (Jung等, *Molecules and Cells* (2018); 41:717-723; Graham等, *Cells* (2018); 7:155)。

[0244] 本公开的细胞可以提高ACT功效,和/或降低对CAR T细胞抗原性的毒性。

[0245] 本公开的细胞对体液应答具有增加的抵抗力,这允许CAR T细胞的外周持久性延长,从而导致更有效的活性 (例如,抗肿瘤活性)。细胞的持久性延长还可以提高细胞疗法 (例如,通常与非常高的成本相关的ACT) 的成本效益。

[0246] 抗体与CAR-T细胞结合可通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 导致CAR T细胞裂解,从而降低治疗效果。已显示抗独特型抗体可中和CAR T细胞功能 (Lamers等, *Blood* (2011); 117:72-82)。CAR T细胞的有限外周持久性也归因于细胞应答,其中CAR T细胞被内源性T细胞靶向 (Lamers等, *Blood* (2011); 117:72-82; Jensen等, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010); 16:1245-1256)。鉴定了在碳酸酐酶IX (CAIX) 靶向CAR T细胞模型中观察到的负责抗-CAR免疫的表位,其中包括衍生自CAR的互补决定区和框架区的肽序列,以及衍生自SFG逆转录病毒载体的前病毒序列 (Lamers等, *Blood* (2011); 117:72-82)。为解决这个问题而采取的一种方法是将CAR人源化,

以使其具有非免疫原性 (Gonzales等, *Tumor Biology* (2005); 26:31-43)。然而, 这不会解决病毒载体特异性免疫应答, 也不会解决同种异体细胞。本公开的细胞可以克服对外来细胞疗法如CAR T细胞疗法的体液应答, 并且可以防止抗-细胞抗体对细胞活性的中和。

[0247] 文献中优先考虑形成抗-CAR抗体, 然而, 这些疗法的成功存在重大障碍 (Kershaw等, *Clinical Cancer Research* (2006); 12:6106-6115; Lamers等, *Blood* (2011); 117:72-82; Jensen等, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2010); 16:1245-1256; Jung等, *Molecules and Cells* (2018); 41:717-723; Graham等, *Cells* (2018); 7:155)。

[0248] 本发明公开了包含IgG-降解酶 (例如IdeS) 的细胞, 该酶用作抵抗宿主体液应答 (例如潜在抗体) 的生物分子屏障。细胞中IgG-降解酶的表达产生: a) 防止中和抗-CAR抗体, b) 细胞 (例如, 工程化CAR T细胞) 的持久性延长, 和c) 治疗活性窗口延长, 从而产生整体更高的功效。CAR-T细胞领域的其它方法侧重于对CAR T细胞的细胞免疫应答, 例如通过缺失HLA I和TCR (Zhao等, *Journal of Hematology and Oncology* (2018); 11:1-9)。然而, 据发明人所知, 这是第一项直接旨在解决抗体驱动的宿主免疫应答的工作。

[0249] 5.5. 组合物和载体

[0250] 本发明公开主题提供包含本文公开的 (例如, 第2节中公开的) IgG-降解酶和本文公开的 (例如, 第3节中公开的) 配体识别受体的组合物。还提供了包含这种组合物的细胞。

[0251] 在某些实施方式中, IgG-降解酶与第一启动子可操作地连接。在某些实施方式中, 配体识别受体与第二启动子可操作地连接。

[0252] 在某些实施方式中, 组合物还包含可切割的 (例如, 自切割的) 接头 (例如, 2A肽, 例如, P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽)。在某些实施方式中, 组合物还包含P2A肽。在某些实施方式中, P2A肽位于配体识别受体和IgG-降解酶之间。在某些实施方式中, P2A肽包含或具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列。

[0253] 此外, 本发明公开主题提供核酸组合物, 其包含编码本文公开的 (例如, 第2节中公开的) IgG-降解酶的第一多核苷酸和编码本文公开的 (例如, 第3节中公开的) 配体识别受体的第二多核苷酸。还提供包含这种核酸组合物的细胞。

[0254] 在某些实施方式中, 核酸组合物还包含可操作地连接至IgG-降解酶的第一启动子。在某些实施方式中, 核酸组合物还包含可操作地连接至配体识别受体的第二启动子。

[0255] 在某些实施方式中, 第一和第二启动子中的一个或两个是内源的或外源的。在某些实施方式中, 外源启动子选自延伸因子 (EF) -1启动子、CMV启动子、SV40启动子、PGK启动子和金属硫蛋白启动子。

[0256] 在某些实施方式中, 核酸组合物还包含可切割的 (例如, 自切割的) 接头 (例如, 2A肽, 例如, P2A肽、T2A肽、E2A肽和F2A肽)。在某些实施方式中, 核酸组合物还包含P2A肽。在某些实施方式中, P2A肽位于配体识别受体和IgG-降解酶之间。在某些实施方式中, P2A肽包含或具有SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列。该组合物和核酸组合物可以通过本领域已知的方法或本文所述的方法施用于受试者和/或递送到细胞中。

[0257] 细胞 (例如, 免疫应答细胞, 例如, T细胞或NK细胞) 的遗传修饰可以通过用重组DNA构建体转导基本上均质的细胞组成来完成。在某些实施方式中, 逆转录病毒载体 (γ -逆转录病毒或慢病毒) 用于将核酸组合物引入细胞。例如, 可以将编码IgG-降解酶的第一多核苷酸和编码配体识别受体的第二多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中, 并且可以从其内源启动

子、逆转录病毒长末端重复序列或对目的靶细胞类型特异性的启动子驱动表达。也可以使用非病毒载体。

[0258] 对于细胞的初始遗传修饰以包括配体识别受体(例如,CAR或TCR),逆转录病毒载体通常用于转导,然而可以使用任何其它合适的病毒载体或非病毒递送系统。可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中构建配体识别受体和IgG-降解酶。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括但不限于各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如,FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- κ B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎IRES、丙型肝炎IRES、瘟病毒IRES、无杆状病毒IRES、小核糖核酸病毒IRES、脊髓灰质炎病毒IRES和脑心肌炎病毒IRES)和可裂解的接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。逆转录病毒载体和合适的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知各种产生两性病毒的细胞系,包括但不限于PA12(Miller等,(1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317(Miller等,(1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 和CRIP(Danos等,(1988) Proc. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)。非两性粒子也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包膜和本领域已知的任何其它假型化的粒子。

[0259] 可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养,例如通过Bregni等.(1992) Blood 80:1418-1422的方法,或单独用病毒上清液或含有或不含有适当生长因子和聚阳离子的浓缩载体原种培养,例如通过Xu,等.(1994) Exp. Hemat. 22:223-230; 和Hughes,等.(1992) J. Clin. Invest. 89:1817的方法。

[0260] 其它转导病毒载体可用于修饰细胞。在某些实施方式中,所选择的载体表现出高的感染效率和稳定的整合和表达(参见,例如,Cayouette等,Human Gene Therapy 8:423-430,1997;Kido等,Current Eye Research 15:833-844,1996;Bloomer等,Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等,Science 272:263-267,1996;和Miyoshi等,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319,1997)。可以使用的其它病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒和与腺相关的病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如爱泼斯坦-巴尔病毒(也参见例如Miller,Human Gene Therapy 15:14,1990;Friedman,Science 244:1275-1281,1989;Eglitis等,BioTechniques 6:608-614,1988;Tolstoshev等,Current Opinion in Biotechnology 1:55-61,1990;Sharp,The Lancet 337:1277-1278,1991;Cornetta等,Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322,1987;Anderson,Science 226:401-409,1984;Moen,Blood Cells 17:407-416,1991;Miller等,Biotechnology 7:980-990,1989;LeGal La Salle等,Science 259:988-990,1993;和Johnson,Chest 107:77S-83S,1995的载体)。逆转录病毒载体发展地特别好,并已用于临床(Rosenberg等,N. Engl. J. Med 323:370,1990;Anderson等,U.S. Pat. No. 5,399,346)。

[0261] 非病毒方法也可以用于细胞的遗传修饰。例如,可以通过在脂质转染(Feigner等,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413,1987;Ono等,Neuroscience Letters 17:259,1990;Brigham等,Am. J. Med. Sci. 298:278,1989;Staubinger等,Methods in Enzymology 101:512,1983),脱唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸偶联(Wu等,Journal of Biological Chemistry 263:14621,1988;Wu等,Journal of Biological Chemistry 264:16985,1989),或手术条件下的微注射(Wolff等,Science 247:1465,1990)的情况下施用核酸来将核酸分子引入细胞中。其它非病毒的基因转移方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和

原生质体融合的体外转染。脂质体也可能对将DNA递送到细胞中有益。也可以通过将正常核酸转移到可离体培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中来完成将正常基因移植到受试者的受影响组织中,之后,将细胞(或其后代)注射到目标组织中或全身注射。重组受体也可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得。瞬时表达可通过RNA电穿孔获得。

[0262] 任何靶向基因组编辑方法也可用于将本文公开的IgG-降解酶和/或配体识别受体递送至细胞或受试者。在某些实施方式中,CRISPR系统用于递送本文公开的IgG-降解酶和/或配体识别受体。在某些实施方式中,锌指核酸酶用于递送本文公开的IgG-降解酶和/或配体识别受体。在某些实施方式中,TALEN系统用于递送本文公开的IgG-降解酶和/或配体识别受体。

[0263] 成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,该系统包括Cas9(一种能够使用crRNA作为其向导来修饰DNA的蛋白质),CRISPR RNA(crRNA,包含Cas9用来引导其到达宿主DNA正确片段的RNA,以及与tracrRNA结合的区域(通常以发夹环形式),与Cas9形成活性复合物),反式激活crRNA(tracrRNA,与crRNA结合,与Cas9形成活性复合物),以及DNA修复模板的可选片段(可指导细胞修复过程允许插入特定的DNA序列的DNA)。CRISPR/Cas9通常采用质粒转染靶细胞。crRNA需要针对每种应用进行设计,因为这是Cas9用来识别并直接结合细胞中靶DNA的序列。携带CAR表达盒的修复模板还需要针对每种应用进行设计,因为它必须与切口两侧的序列重叠,并为插入序列编码。多个crRNA和tracrRNA可以包装在一起以形成单向导RNA(sgRNA)。该sgRNA可以与Cas9基因连接在一起并制成质粒,以便被转染到细胞中。

[0264] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工限制性酶,通过将锌指DNA结合结构域与DNA裂解结构域结合而产生。锌指结构域可以被工程化以靶向特定的DNA序列,其允许锌指核酸酶靶向基因组内的期望序列。各个ZFN的DNA结合结构域通常包含多个独立的锌指重复序列,并且每个都可以识别多个碱基对。产生新的锌指结构域的最常见方法是结合已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的裂解结构域是来自II型限制性核酸内切酶FokI的非特异性裂解结构域。使用内源性同源重组(HR)机器和带有CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可以用于将CAR表达盒插入基因组。当靶序列被ZFN酶切后,HR机器搜索受损染色体与同源DNA模板之间的同源性,然后在染色体的两个断裂末端之间复制模板的序列,从而将同源DNA模板整合到基因组。

[0265] 转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)是限制性酶,可以工程化为切割DNA的特定序列。TALEN系统的工作原理几乎与ZFN相同。它们是通过将转录激活因子样效应物DNA结合结构域与DNA裂解结构域结合而产生的。转录激活因子样效应物(TALE)由具有两个可变位置的33-34个氨基酸重复基序组成,这些位置对特定核苷酸有很强的识别能力。通过组装这些TALE的阵列,可以对TALE DNA结合结构域进行改造以结合所需的DNA序列,从而指导核酸酶切割基因组中的特定位置。用于多核苷酸疗法的cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)中进行指导,并由任何适当的哺乳动物调节元件或内含子(例如延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调节。例如,如果需要的话,已知优先在特定细胞类型中指导基因表达的增强子可以用于指导核酸的表达。所使用的增强剂可以包括但不限于被表征为组织或细胞特异性增强子的那些。或

者,如果将基因组克隆用作治疗构建体,则可以通过同源调控序列或,如果需要,通过衍生自包括上述任何启动子或调控元件的异源的调控序列来介导调控。

[0266] 所得的细胞可以在与未修饰的细胞相似的条件生长,由此修饰的细胞可以被扩增并用于多种目的。

[0267] 用于递送基因组编辑剂/系统的方法可以根据需要而变化。在某些实施方式中,选择的基因组编辑方法的组分作为核酸组合物(例如,DNA构建体)在一个或多个质粒中递送。在某些实施方式中,通过病毒载体递送组分。常见的递送方法包括但不限于电穿孔、显微注射、基因枪、穿刺(impalefection)、流体静压力、连续输注、超声处理、磁转染、腺相关病毒、病毒载体的包膜蛋白假型、可复制的载体顺式和反式元件、单纯疱疹病毒和化学媒介物(例如寡核苷酸、脂复合物、聚合物小体、多复合物、树状聚合物、无机纳米颗粒和穿透细胞的肽)。

[0268] 本文公开的组合物或核酸组合物可置于基因组中的任何位置。在某些实施方式中,将组合物或核酸组合物置于T细胞基因组内的位点。

[0269] 5.6. 多肽和类似物

[0270] 还包括在本公开主题中的是本文公开的多肽(例如,CD19、4-1BB、CD28、CD3 ζ 和IgG-降解酶或其片段),当在细胞中表达时,以用于所需用途、例如用于增强其抗肿瘤和/或抗肿瘤活性的方式对其进行修饰。本公开的主题提供通过产生序列改变来优化氨基酸序列或核酸序列的方法,以及所修饰的氨基酸序列和核酸序列。这样的改变可以包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本公开的主题还包括本文公开的任何天然存在的多肽的类似物。类似物可以通过氨基酸序列差异、通过翻译后修饰或通过两者与本文公开的天然存在的多肽不同。类似物可表现出与本公开主题的全部或部分天然存在的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的同源性。序列差异的长度是至少5、10、15或20个氨基酸残基,例如至少25、50或75个氨基酸残基,或超过100个氨基酸残基。同样,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其概率得分在 e^{-3} 和 e^{-100} 之间,指示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生,例如乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化;这样的修饰可以在多肽合成或加工过程中或在用分离的修饰酶处理之后发生。类似物也可以通过天然序列的改变而不同于天然存在的多肽。这些包括天然和诱导的遗传变异(例如,如Sambrook,Fritsch和Maniatis,《分子克隆:实验室手册》(第2版),CSH出版社,1989,或Ausubel等,同上,中所述,是由于通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐中的随机诱变或通过位点特异性诱变而产生的)。还包括环化的肽、分子和类似物,其含有除L-氨基酸以外的残基,例如D-氨基酸或非天然存在的或合成的氨基酸,例如 β 或 γ 氨基酸。

[0271] 除了全长多肽,本公开主题还提供本文公开的任何多肽的片段。如本文所用,术语“片段”是指至少5、10、13或15个氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施方式中,片段包含至少60至80、100、200、300或更多个连续氨基酸。片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生,或者可以由正常的蛋白质加工产生(例如,从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸,或者通过替代性的mRNA剪接或替代性蛋白质加工事件去除氨基酸))。

[0272] 非蛋白质类似物具有设计为模仿本文公开的蛋白质(例如,IgG-降解酶)的功能活

性的化学结构。这样的类似物可能超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法在本领域中是众所周知的,并且可以根据这样的方法通过修饰化学结构来进行类似物的合成,以使所得的类似物在细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括但不限于取代替代的R基团和改变参考多肽的特定碳原子处的饱和度。在某些实施方式中,蛋白质类似物对体内降解具有相对抗性,从而在给药后导致更长的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括但不限于以下实施例中描述的那些。

[0273] 5.7. 给药

[0274] 可以将包含本公开的细胞的组合物系统地或直接提供给受试者,以诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗 and/或预防瘤形成、病原体感染或感染性疾病。在某些实施方式中,将本公开的细胞、组合物或核酸组合物直接注射到目的器官(例如,受肿瘤影响的器官)中。或者,例如通过向循环系统(例如,肿瘤脉管系统)给药,将本公开的细胞、组合物或核酸组合物间接地提供给目的器官。可以在施用细胞、组合物或核酸组合物之前,之中或之后提供扩增和分化剂,以增加体外或体内细胞(例如,T细胞(例如,CTL细胞))或NK细胞的产生。

[0275] 本公开的细胞、组合物或核酸组合物可以以任何合适的途径施用,包括但不限于静脉内、皮下、结内、瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内和经皮肤。在某些实施方式中,将本公开的细胞、组合物或核酸组合物腹膜内施用于受试者。通常,将施用至少约 1×10^5 个细胞,最终达到约 1×10^{10} 个或更多。本公开的细胞可以包含不纯或纯化的细胞群体。本领域技术人员可以使用各种众所周知的方法,例如荧光激活细胞分选(FACS),容易地确定群体中本公开的细胞的百分比。在包含本公开的细胞的群体中,纯度的合适范围是约50%至约55%、约55%至约60%、以及约65%至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%,约90%至约95%、以及约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调节(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。可以通过注射、导管等引入细胞。细胞可以由各种谱系的器官或组织组成,包括 10^9 个或至多 10^{11} 个细胞。

[0276] 本公开的组合物可以是包含本公开的细胞或其祖细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。给药可以是自体的或异体的。例如,可以从一个受试者获得细胞或祖细胞,并将其施用于相同受试者或不同的相容受试者。外周血来源的细胞或其后代(例如,体内、离体或体外来源)可通过局部注射施用,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。当施用本公开的主题的治疗组合物(例如,包含本公开的免疫应答细胞的药物组合物)时,可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液剂、悬浮剂、乳剂)。

[0277] 5.8. 剂型

[0278] 包含本公开的细胞的组合物可以方便地以无菌液体制剂的形式提供,例如等渗水溶液剂、悬浮液、乳剂,分散剂或粘性组合物,其可以缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物在某种程度上更方便施用,尤其是通过注射。另一方面,可以在适当的粘度范围内配制粘性组合物以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。

[0279] 可以通过将遗传修饰的免疫应答细胞掺入所需量的适当溶剂中,并根据需要掺入不同量的其它成分来制备无菌注射溶液。这样的组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物也可以冻干。所述组合物可包含辅助物质,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或增粘剂、防腐剂、矫味剂、颜料等,这取决于给药途径和所需制剂。可以参考标准文本,例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,1985年第17版,以引用方式并入本文,以制备合适的制剂,而无需进行过多的实验。

[0280] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。可通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。然而,根据本公开的主题,所使用的任何媒介物、稀释剂或添加剂将必须与遗传修饰的免疫应答细胞或其祖细胞相容。

[0281] 该组合物可以是等渗的,即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。组合物的所需等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的试剂例如葡萄糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其它无机或有机溶质来实现。氯化钠可以是特别适用于含有钠离子的缓冲剂。

[0282] 如果需要,可使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度保持在选定水平。例如,甲基纤维素容易且经济地获得并且易于使用。其它合适的增稠剂包括,例如,黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可以取决于选择的试剂。重要的是要使用能够达到所选粘度的用量。显然,合适载体和其它添加剂的选择将取决于确切的给药途径和特定剂型的性质,例如液体剂型(例如,是否将组合物配制成溶液剂、悬浮液、凝胶剂或其它液体形式,例如定时释放形式或液体填充形式)。

[0283] 对于所治疗的受试者,要施用的细胞数量将有所不同。在某些实施方式中,向受试者(例如,人受试者)施用的本公开的免疫应答细胞为约 10^4 至约 10^{10} 之间、约 10^5 至约 10^9 之间、或约 10^6 至约 10^8 之间。可以以更少的数量施用更有效的细胞。在某些实施方式中,向受试者(例如,人受试者)施用的本公开的免疫应答细胞为约 10^4 至约 10^7 之间、或约 10^5 至约 10^7 之间。在某些实施方式中,向受试者(例如,人受试者)施用的本公开的免疫应答细胞为至少约 1×10^8 、约 2×10^8 、约 3×10^8 、约 4×10^8 或约 5×10^8 。可以根据每个受试者的个体因素,包括其大小、年龄、性别、体重和具体受试者的状况,来确定有效剂量的精确确定。本领域技术人员从本公开和本领域知识中可以容易地确定剂量。

[0284] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中和在方法中施用的细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常,任何添加剂(除一种或多种活性细胞和/或一种或多种试剂外)在磷酸盐缓冲盐水中的存在量为0.001%至50%(重量)溶液,并且活性成分按微克至毫克的顺序存在,例如约0.0001wt%至约5wt%、约0.0001wt%至约1wt%、约0.0001wt%至约0.05wt%或约0.001wt%至约20wt%、约0.01wt%至约10wt%或约0.05wt%至约5wt%。对于要施用于动物或人的任何组合物,可以确定以下结果:毒性,例如通过在合适的动物模型例如啮齿类动物如小鼠中确定致死剂量(LD)和LD50;组合物的剂量,其中的组分浓度和施用组合物的时间,引起合适的反应。根据技术人员,本公开和本文引用的文献的知识,这种确定不需要过度的实验。并且,可以确定连续给药的时间而无需过多的实验。

[0285] 5.9. 使用方法

[0286] 本公开的主题提供向受试者施用本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物的方法,例如,用于治疗或疗法。治疗或疗法的非限制性实例包括免疫疗法(例如,过继细胞转移),细胞疗法(或细胞的疗法),干细胞移植,器官移植,基因疗法(例如,CRISPR基因编辑疗法),病毒输注(例如,AAV),含有核酸、游离核酸或被赋予更稳定的类似物、mRNA或稳定的mRNA的纳米颗粒,或含有主题工程细胞的器官或组织。本公开的细胞、组合物和核酸组合物可用于疗法、治疗或药物中。在某些实施方式中,疗法或治疗需要增加对宿主体液应答的抗性、延长细胞的持久性和/或减轻外来细胞的免疫原性。

[0287] 本公开的主题提供用于治疗 and/或预防受试者的瘤形成的方法。本公开的细胞、组合物和核酸组合物可用于治疗和/或预防受试者的瘤形成。本公开的细胞、组合物和核酸组合物可用于延长患有瘤形成的受试者的存活。

[0288] 本公开的主题提供用于治疗 and/或预防受试者、比如免疫功能低下的人受试者的病原体感染或其他传染病的方法。本公开的细胞、组合物和核酸组合物也可用于治疗 and/或预防受试者、比如免疫功能低下的人受试者的病原体感染或其他传染病。这种方法包括以有效量施用本公开的细胞、本公开的组合物(例如,药物组合物)或本公开的核酸组合物,以实现期望的效果,无论是缓解现有病症还是预防复发。

[0289] 本公开的主题提供用于治疗 and/或预防受试者的自身免疫性疾病的方法。本公开的细胞、组合物和核酸组合物也可用于治疗 and/或预防受试者的自身免疫性疾病。这种方法包括向患有自身免疫性疾病的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物(例如,药物组合物)或本公开的核酸组合物。

[0290] 本公开的主题提供用于受试者中减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥的方法,其中受试者接受器官移植。本公开的细胞、组合物和核酸组合物也可用于减少和/或预防受试者中抗体介导的对细胞和/或组织排斥,其中受试者接受器官移植。这种方法包括向接受器官移植的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物(例如,药物组合物)或本公开的核酸组合物。

[0291] 本公开的主题提供用于减少和/或预防受试者中抗体介导的对体内自体或同种异体细胞和/或组织排斥的方法,其中受试者接受细胞疗法。本公开的细胞、组合物和核酸组合物还可用于减少和/或预防抗体介导的对细胞和/或组织排斥,其中受试者接受细胞疗法。这种方法包括向接受细胞疗法的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物(例如,药物组合物)或本公开的核酸组合物。

[0292] 为了治疗,施用的量是有效产生所需效果的量。可以一次或多次给药来提供有效量。可以大剂量或通过连续灌注来提供有效量。

[0293] “有效量”(或“治疗有效量”)是足以在治疗后产生有益或期望的临床结果的量。可以以一剂或多剂剂量将有效量施用于受试者。就治疗而言,有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其它方式减少疾病病理后果的量。有效量通常由医师根据具体情况确定,并且在本领域技术人员的能力范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时,通常要考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、疾病的严重程度以及所施用的细胞的形式和有效浓度。

[0294] 对于使用抗原特异性T细胞的过继免疫疗法,通常输注约 10^6 - 10^{10} (例如约 10^9)范围内的细胞剂量。在将本公开的细胞施用于宿主并随后分化后,诱导特异性针对特定抗原

的T细胞。

[0295] 瘤形成

[0296] 本公开的主题提供用于治疗 and/或预防受试者中瘤形成的方法。该方法可以包括向患有瘤形成的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物。

[0297] 瘤形成的非限制性实例包括血液癌症(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤、喉癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤和各种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌还包括肿瘤学领域中任何已知的癌,包括但不限于星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、成骨肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌及其肝转移灶、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝癌、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、Wilms' 肿瘤、睾丸肿瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom's 巨球蛋白血症和重链疾病、诸如导管和小叶腺癌的乳腺肿瘤、子宫颈的鳞状和腺癌、子宫和卵巢上皮癌、前列腺腺癌、膀胱移行鳞状细胞癌、B和T细胞淋巴瘤(结节性和弥漫性)浆细胞瘤、急性慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。在某些实施方式中,肿瘤选自血液癌症(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤和喉癌。在某些实施方式中,本公开的细胞、组合物、核酸组合物可以用于治疗和/或预防常规治疗措施不适合的血液癌症(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)或卵巢癌。在某些实施方式中,本公开的细胞、组合物、核酸组合物可用于治疗和/或预防实体瘤。在某些实施方式中,本公开的细胞、组合物、核酸组合物可用于治疗和/或预防瘤形成,瘤形成选自急性髓性白血病(AML)、淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌和胰腺癌。

[0298] 自身免疫性疾病

[0299] 本公开的主题提供用于治疗 and/或预防受试者的自身免疫性疾病的方法。该方法可以包括向患有自身免疫性疾病的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物。自身免疫性疾病的非限制性实例包括类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性狼疮、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、系统性硬化症、胆汁性肝硬化、乳糜泻、轴突神经病、炎性肌病、小脑变性、1型糖尿病和多发性肌炎。

[0300] 美国有超过2000万自身免疫性疾病患者。其中许多,例如狼疮和重症肌无力,都涉及抗体对患者自身组织成分、DNA和细胞的攻击。<https://www.google.com/search?client=firefox-b-l-d&q=incidence+of+immune+disease>。这些疾病几乎没有有效或可治愈的方法。IgG在人体免疫系统中起重要的保护作用,但也与类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性狼疮等疾病的发病机制有关,其中已将去除IgG用作治疗这些自身免疫性疾病的治疗途

径 (Johansson等, PLoS ONE (2008); 3:1-6; Berta等, The International Journal of Artificial Organs (1994); 17:603-608; Stummvoll等, Annals of the Rheumatic Diseases (2005); 64:1015-1021)。本公开的细胞中包含的IgG-降解酶可以消耗攻击宿主细胞的功能性IgG, 从而治疗自身免疫性疾病。

[0301] 抗体介导的排斥

[0302] 本公开的主题提供用于减少和/或预防受试者中抗体介导的对细胞和/或组织排斥的方法。在某些实施方式中, 受试者接受器官移植。在某些实施方式中, 移植是同种异体移植。在某些实施方式中, 受试者在器官移植之前接受本公开的细胞、组合物或核酸组合物。在某些实施方式中, 受试者接受细胞疗法, 例如, 细胞和/或组织 (例如, 自体或同种异体细胞和/或组织) 用于细胞疗法。

[0303] 该方法可以包括向受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物。

[0304] 在美国, 每年有超过36,000名患者使用实体器官移植, 比如肾、肝、肺、心脏和其他器官, 超过100,000名患者正在等待移植。<https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>。这些器官尽可能与患者相匹配, 但对患者造成严重甚至有时是致命后果的免疫抑制是常见的和终生的。在美国的成本是100,000,000,000美元。宿主IgG在同种异体移植中发挥重要作用, 其中HLA供体之间的不相容会导致抗体介导的对同种异体移植排斥 (Loupy等, New England Journal of Medicine (2018); 379:1150-1160)。IdeS在同种异体移植之前在人体中进行了脱敏评估。在这项研究中, 25名患者中有24名在接受IdeS治疗后能够接受HLA不相容的移植, 该治疗可迅速去除所有供体特异性抗体 (Jordan等, New England Journal of Medicine (2017); 377:442-453; Lonze等, Annals of Surgery (2018); 268:488-496)。本公开的细胞中包含的IgG-降解酶可以消耗攻击供体器官细胞的功能性IgG (例如宿主IgG), 从而减少和/或防止抗体介导的与器官移植相关的排斥。

[0305] 受试者可以患有疾病的晚期形式, 在这种情况下, 治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展和/或减轻副作用。受试者可以具有已经对其进行过治疗的病史, 在这种情况下, 治疗目标通常包括降低或延迟复发风险。

[0306] 用于治疗合适的人受试者通常包括可以通过临床标准区分的两个治疗组。患有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是携带临床上可测量的肿瘤的受试者。临床上可测量的肿瘤是一种可以根据肿瘤肿块检测到的肿瘤 (例如, 通过触诊、CAT扫描、超声检查、乳房X线照片或X射线; 单独的阳性生化或组织病理学标志物不足以识别该人群)。向这些受试者施用药物组合物以引发抗肿瘤反应, 以减轻其状况。理想地, 结果是减小了肿瘤块, 但是任何临床改善都可带来益处。临床改善包括降低风险或进展速度或减少肿瘤病理后果。

[0307] 第二组合适的受试者在本领域中称为“佐剂组”。这些是有瘤形成史但对另一种治疗方式有反应的个体。先前的疗法可以包括但不限于手术切除、放射疗法和传统化学疗法。结果, 这些个体没有临床上可测量的肿瘤。然而, 他们被怀疑有在原发肿瘤部位附近或转移的疾病进展风险。该组可以进一步分为高风险和低风险个体。根据在初始治疗之前或之后观察到的特征进行细分。这些特征在临床领域中是已知的, 并且针对每种不同的瘤形成适当地定义。高危亚组的典型特征是肿瘤侵犯了邻近组织或淋巴结受累。

[0308] 另一组具有瘤形成的遗传易感性, 但尚未证实瘤形成的临床体征。例如, 对于与乳

腺癌相关的基因突变测试呈阳性但仍处于育龄的妇女,可能希望接受本文所述的一种或多种细胞进行预防性治疗,以防止瘤形成的发生,直到适合进行预防性手术。

[0309] 由于配体识别受体(例如,与肿瘤抗原结合的抗原识别受体)和增强细胞活性(例如,抗肿瘤活性)的IgG-降解酶表达的结果,过继转移细胞在肿瘤部位具有扩增性和选择性溶细胞活性。此外,在其定位于肿瘤或病毒感染及其增殖之后,细胞(例如,T细胞)将肿瘤或病毒感染位点转变成高传导性环境,以用于广泛涉及生理抗肿瘤或抗病毒应答的多种免疫细胞(肿瘤浸润淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞、树突状细胞和巨噬细胞)。

[0310] 另外,本公开的主题提供用于在例如免疫受损的受试者中治疗和/或预防病原体感染(例如病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动物感染)的方法。该方法可以包括向患有病原体感染的受试者施用有效量的本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物。易于治疗的示例性病毒感染包括但不限于巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和流感病毒感染。

[0311] 可以对本公开的细胞(例如,T细胞)进行进一步修饰,以避免或最小化免疫并发症(称为“恶性T细胞转化”),例如移植物抗宿主病(GvHD),或当健康组织表达与肿瘤细胞相同的靶抗原时,会导致类似于GvHD的结果的风险。该问题的潜在解决方案是将自杀基因改造到本公开的免疫应答细胞中。合适的自杀基因包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型Caspase 9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中,自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可通过施用抗EGFR单克隆抗体(例如西妥昔单抗)来使T细胞消除。EGFRt可以共价连接至本公开的CAR的抗原识别受体的上游。自杀基因可以包含在包含编码本公开的CAR的核酸的载体内。以此方式,在恶性T细胞转化(例如,GVHD)过程中施用旨在激活自杀基因的前药(例如,前药(例如,可以激活iCasp-9的AP1903)),可以触发由自杀基因激活的表达CAR的T细胞的凋亡。将自杀基因掺入本公开的CAR中可提高安全性,并能够在很短的时间内消除大部分CAR T细胞。可以在CAR T细胞输注后的给定时间点抢先消除掺入了自杀基因的本公开的细胞(例如,T细胞),或在毒性的最早迹象时将其消除。

[0312] 5.10. 试剂盒

[0313] 本公开的主题提供用于在受试者中治疗和/或预防瘤形成或病原体感染或自身免疫性疾病的试剂盒,以及用于减少和/或预防受试者中抗体介导的排斥的试剂盒,其中受试者接受器官移植。在某些实施方式中,试剂盒包含有效量的本公开的细胞、本公开的组合物或本公开的核酸组合物。在某些实施方式中,试剂盒包括无菌容器;这样的容器可以是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适合于容纳药物的材料制成。在某些非限制性实施方式中,试剂盒包含编码针对目的抗原的抗原识别受体(例如,CAR或TCR)的分离的核酸分子和编码可表达(和可分泌)形式的IL-36多肽的分离的核酸分子,其可以选择包含在相同或不同的载体中。

[0314] 如果需要的话,将细胞、组合物或核酸组合物与用于将细胞、组合物或核酸组合物施用于患有或有风险发展成瘤形成、病原体感染或自身免疫性疾病的受试者或接受器官移植的受试者的说明书一起提供。说明书通常包括细胞、组合物或核酸组合物用于治疗 and/或预防瘤形成或病原体感染或自身免疫性疾病的使

以下至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防瘤形成、病原体感染或免疫疾病或其症状的剂量表和给药;注意事项;警告;适应症;不适应症;用药信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。这些说明书可以直接打印在容器上(如果有的话),或者作为粘贴在容器上的标签,或者作为单独的纸页、小册子、卡片或文件夹提供在容器内或与容器一起。

[0315] 6. 实施例

[0316] 除非另有说明,否则本公开的实践采用分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术(包括重组技术),其在技术人员的能力范围内。在诸如“分子克隆:实验室手册”,第二版(Sambrook,1989);“寡核苷酸合成”(Gait,1984);“动物细胞培养”(Freshney,1987);“酶学方法”“实验免疫学手册”(Weir,1996);“哺乳动物细胞的基因转移载体”(Miller和Calos,1987年);“分子生物学的当前方法”(Ausubel,1987年);“PCR:聚合酶链反应”,(Mullis,1994年);“免疫学的当前方法”(Coligan,1991年)中充分地解释了这些技术。这些技术适用于本文公开的多核苷酸和多肽的产生,并且因此可以在制备和实施本文公开的主题中考虑。在以下部分中将讨论用于具体实施例的特别有用的技术。

[0317] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供有关如何制备和使用本公开的细胞和组合物的完整公开和描述,而不旨在限制发明人视为其发明的范围。

[0318] 实施例1-生成和体外活性

[0319] 概要

[0320] 生成两种表达IdeS的CAR T细胞,即膜结合形式(IdeS表达为表面膜结合形式)和分泌形式(IdeS从细胞中分泌出来)。如以下所示,在这两种形式中,在体外IdeS都成功地切割IgG。

[0321] 结果

[0322] 构建体和稳定系的产生

[0323] 靶向B细胞肿瘤抗原CD19的CAR T细胞疗法最近获得了FDA的批准(Zheng等,Drug Discovery Today (2018);23:1175-1182)。CD19是一种理想的抗原,因为它对B细胞具有特异性,并且通常不在其他细胞或组织上表达。具有4-1BB/CD3 ζ 信号传导结构域的CD19 CAR已在患者体内和体外得到很好的表征(Brentjens等,Sci Transl Med. (2013);5:177ra38;Pegram等,Blood (2012);119:4133-4141;Kalos等,Science Translational Medicine (2011);3:1-11)。

[0324] 如图1所示,生成膜结合形式构建体(称为“IdeS-tm”;参见图1A)和分泌形式构建体(称为“IdeS-sec”;参见图1B)。这些T细胞经过工程改造以表达靶向CD19的CAR,该CAR包含含有4-1BB多肽和CD3 ζ 多肽的细胞内信号传导结构域和包含CD8多肽的跨膜结构域。该CAR命名为“19BBz”。

[0325] 构建体的设计基于先前报道的使用SFG γ 逆转录病毒载体的方法(Rivière et al.,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995);92:6733-7)。CD8信号肽序列用于将IdeS转运至细胞膜(参见图1A和1B)。为了生成酶的膜结合型,将CD8的跨膜结构域整合到酶的C-端。然后在自切割肽2A之后添加CAR构建体。如图1A和1B所示,CAR构建体包括CD8信号肽序列、抗原特异性scFv(在本例中为抗CD19)、CD8跨膜结构域和4-1BB/CD3 ζ 细胞内信号传导结构域。产生表达CAR的T细胞的过程先前在Brentjens等,Sci Transl Med. (2013);5:177ra38;Parente-Pereira等,Journal

of Biological Methods (2014);1:7中进行了描述。使用构建体转染H29逆转录病毒包装细胞系。衍生自H29细胞的病毒用于产生稳定的PG13逆转录病毒包装细胞系。PG13细胞产生长臂猿白血病病毒 (GALV) 颗粒,用于转导任何细胞系或原代细胞 (Parente-Pereira等, Journal of Biological Methods (2014);1:7)。对外周血单个核细胞 (PBMC) 进行转导以生成CAR T细胞。此外,Galv9产生细胞系用于产生病毒。

[0326] 表达和体外活性

[0327] 使用免疫印迹在模型稳定的T细胞系 (例如Jurkat细胞) 中测试IdeS的稳定表达。使用抗-HA抗体测试细胞系的细胞裂解物和上清液,因为IdeS构建体中包含C-端HA-标签。如图2所示,IdeS的表达可以通过HEK293t细胞的瞬时转染成功地适应哺乳动物细胞。根据IdeS活性以及还有CAR活性评估CART细胞的功能。

[0328] 通过评估IgG的切割程度来测试IdeS的酶活性。使用SDS-PAGE测定以及基于ELISA的测定。图3A-3C示出SDS-PAGE测定的结果。对于SDS-PAGE测定,用IdeS-tm瞬时转染HEK293t细胞。转染后48小时,将IgG添加到24孔板的孔中,然后在不同时间点去除并使用Laemmli缓冲液淬灭。参见图3A。随着时间的推移跟踪人多克隆IgG的切割,并使用SDS-PAGE测定进行检测,该测定通过考马斯和免疫印迹 (图3B和3CC) 可视化。如图3B和3C所示,由HEK293t细胞表达的IdeS在体外是有活性的。

[0329] 图4A和4B示出基于ELISA测定的结果。经过调整的基于ELISA的测定 (Järnum等, Molecular Cancer Therapeutics (2017);16:1887-1897) 用于检测IdeS对IgG的切割。使用重组IdeS,对切割ELISA进行验证 (参见图4A)。HEK293t细胞用分泌型IdeS (“IdeS-sec”) 转染。通过使用抗-HA的免疫印迹测试上清液来验证酶的表达 (参见图4B)。通过应用切割ELISA,证实IdeS-sec在不同时间点有效切割人多克隆IgG (参见图4B)。

[0330] 为了评估IdeS是否可以成功切割与细胞表面结合的抗体,设计一个共培养实验。在共培养实验中,表达IdeS的细胞与表达CD20的Raji细胞和与Raji细胞结合的抗体利妥昔单抗 (Rituximab) 一起孵育。然而,IdeS切割抗体释放Fc片段。如图5所示,分泌IdeS的HEK293t细胞成功切割结合在Raji细胞上的利妥昔单抗的Fc片段。

[0331] CAR T细胞的特异性裂解通过测试对表达荧光素酶的靶细胞的活性来测试,如先前在Dao等.Science Translational Medicine (2013);5:1-11中所公开。以CD19⁺Raji细胞系为肿瘤模型,测定Raji细胞的特异性裂解。对Raji细胞进行修饰以表达萤火虫荧光素酶,这允许基于荧光素酶的杀伤测定。如图6所示,IdeS-tm 19BBz细胞和IdeS-sec 19BBz细胞在体外杀伤Raji细胞的程度与不含IdeS的19BBz细胞相同。因此,向CART细胞添加IdeS不会损害CAR T细胞的杀伤活性。

[0332] 此外,研究了是否可以保护表达IdeS的细胞免受补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的影响。未转导的T细胞、IdeS-tm 19BBz T细胞、IdeS-sec 19BBz T细胞和不含IdeS的19BBz T细胞用不同浓度的兔抗胸腺细胞球蛋白 (ATG) 处理,然后加入兔血清并孵育一小时。通过Cell Titer Glo测量细胞活力。如图7所示,IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞都切割掉了IgG的Fc片段,从而避开了CDC。

[0333] 此外,研究了是否可以保护表达IdeS的细胞免受抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的影响。IdeS-tm 19BBz T细胞、IdeS-sec 19BBz T细胞和不含IdeS的19BBz T细胞用不同剂量的抗胸腺细胞球蛋白 (ATG) 处理,随后用人PBMC处理。细胞毒性使用⁵¹Cr释放测试来测定。如

图10所示,与不含IdeS的19BBz T细胞相比,IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞都受到保护免于裂解。

[0334] 此外,本发明人研究了表达IdeS的细胞是否可以切割来自肾移植患者的血清IgG并免受补体依赖性细胞毒性(CDC)的影响。如图11A所示,通过流式细胞术显示来自肾移植患者(患者2)的含有引起排斥的抗-HLA抗体的血清结合A02+细胞。如图11B所示,患者2的血清被A02+IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞切割,如流式细胞术所验证。如图11C所示,A02+IdeS-tm 19BBz T细胞和IdeS-sec 19BBz T细胞也免受患者2血清介导的补体杀伤(CDC)(右)。

[0335] 作用机制

[0336] 然后,发明人研究了表达IdeS的细胞如何保护自己对抗潜在抗体。图8示出一种建议的作用机制。如图8所示,IgG抗体与细胞表面抗原和受体结合,通过CDC、ADCC和调理作用导致细胞死亡。IdeS在铰链区下方切割IgG,释放Fc片段。表达IdeS的细胞仍然包裹在F(ab')₂片段中,从而阻止进一步的抗体结合。

[0337] 了解分泌的酶相比膜结合的酶的切割机制很重要。膜结合形式允许更多的局部活性,然而,图5中显示的数据表明,分泌形式在反式系统中切割抗体的效率更高。还评估了表达IdeS的细胞的顺式或反式切割的机制。为此目的,使用兔抗小鼠抗体,该抗体靶向scFv的鼠部分。评估IdeS的膜结合型或分泌型是否更有利。

[0338] 这种酶机制的一个重要方面是,由于它在铰链区下方切割IgG,因此F(ab')₂片段保持完整,因此可以保持结合在细胞表面。据观察,使用重组IdeS,随着IdeS浓度的增加,Fc片段从细胞表面去除,而F(ab')₂片段仍然结合在表面上。如图9所示,表达IdeS的CAR T细胞切割IgG Fc并保持F(ab')₂屏障。在将IgG(ATG)添加到表达IdeS的细胞(跨膜或分泌形式)后,IgG以Fab形式与细胞保持结合,而Fc消失。Fc的缺失消除了功能,而结合的Fab阻止新的细胞毒性IgG结合,因此起到了屏障的作用。对于不含IdeS的细胞,这不会发生。

[0339] 这表明残留的F(ab')₂片段在细胞周围形成了一个屏障,将其从潜在的未来体液应答中隐藏起来。通过在上述稳定系中使用膜结合和细胞分泌的IdeS来检验这一假设。使用抗-Fab特异性抗体或抗-Fc特异性抗体,检测IgG的哪个部分仍与细胞结合。还检查该过程的动力学,以了解切割后F(ab')₂片段保持结合多长时间,以及它们是否被完整的IgG竞争掉。

[0340] 结论

[0341] 我们在本实施例中显示的数据表明,表达IdeS的CAR-T细胞在哺乳动物细胞中成功表达,并显示出有效的体外切割活性。此外,在CAR T细胞中加入IdeS不会损害CAR的体外杀伤活性。此外,表达IdeS的CAR-T细胞受到保护,免受补体依赖性细胞毒性(CDC)的影响。

[0342] 实施例2-体内活性

[0343] 概要

[0344] 在本实施例中,研究了实施例1的表达IdeS的CAR T细胞的体内活性。在体内小鼠模型中研究了这些细胞的IgG切割活性和细胞杀伤活性。这些细胞在一个系统中进行测试,在该系统中,它们被抗体靶向,以复制对CAR T细胞的体液免疫原性模型。使用该模型,可以测试细胞的持久性以及肿瘤细胞相对于常规CAR T细胞的杀伤效率。这些实验设计中的一个重要考虑因素是IdeS不切割小鼠IgG;所以,因此,使用NSG小鼠,它是一种高度免疫缺陷

的小鼠模型,与添加的异种抗体(如IdeS作用的兔或人,以及潜在的移植免疫效应细胞)相容。

[0345] 体内细胞持久性

[0346] 将表达IdeS的CAR T细胞与不含IdeS的CAR T细胞的体内持久性进行比较。NSG小鼠腹膜内(IP)注射表达IdeS的CAR T细胞或不含IdeS的CAR T细胞。然后给小鼠注射靶向CAR T细胞的人抗体,比如抗-CD3、抗-MHC I类抗体或靶向CAR的抗体。使用兔或人源抗体,因为IdeS完全切割兔IgG和人IgG的所有同种型(Johansson等,PLoS ONE (2008);3:1-6;Yang等,Nephrology Dialysis Transplantation (2010);25:2479-2486;Wang等,Experimental Neurology (2017);291:134-140)。预计表达IdeS的细胞会切割铰链下方的抗体,从而释放Fc片段。如前所示(Rafiq等,Nature Biotechnology (2018);36:847-858),通过免疫印迹或ELISA在不同时间点分析从小鼠采集的腹水和外周血,以评估IgG的裂解(如图3和4)。CAR T细胞的存在通过收集腹水来测定,并通过流式细胞术使用抗-CD19 CAR和抗-HA标签进行分析,这些标签存在于IdeS构建体上。为了研究Fab片段是否仍然与细胞表面结合(作为防止功能性IgG进一步结合的屏障),使用抗-Fab特异性抗体通过流式细胞术分析残余结合。还评估了残留可用的CAR T细胞表面靶标(即CD3或MHC I)的存在。用细胞和抗体的静脉内(IV)输注进行类似的实验。

[0347] 体内功效

[0348] 以CD19⁺Raji细胞系作为肿瘤模型,测定Raji细胞的特异性裂解。对Raji细胞进行修饰以表达萤火虫荧光素酶,这允许基于荧光素酶的杀伤试验以及肿瘤的体内生物发光成像(Koneru等,Oncoimmunology (2015);4:e994446)。NSG小鼠以IP输注Raji细胞,然后是表达IdeS的CAR-T细胞或不含IdeS的CAR T细胞,并注射不与Raji细胞结合的靶向CAR T细胞的抗体(例如,抗-CD3或抗小鼠抗体)以靶向CAR。使用生物发光成像评估肿瘤生长和疾病进展。CAR T细胞的持久性也在该系统中使用流式细胞术或通过携带替代发光探针的CAR T细胞的成像进行评估。经工程改造以表达Gaussia萤光素酶的CAR T细胞可与萤火虫萤光素酶正交使用(Santos等,Nature Medicine (2009);15:338-344)。携带发光探针的CAR T细胞允许跟踪和监测CAR T细胞随时间的持续性,同时还可以跟踪肿瘤。用细胞和抗体的IV输注进行类似的实验。

[0349] 实施例3

[0350] 人T细胞用不含IdeS CAR的19BBz(左起泳道:#1-2)或IdeS-tm 19BBz CAR(跨膜形式)(左起泳道:#3-5)和IdeS-sec 19BBz CAR(分泌形式)(左起泳道:#6-8)转导。在NSG小鼠中腹腔注射 2×10^6 CAR T细胞,24小时后,人多克隆IgG也被腹腔注射。IgG的切割通过使用PBS腹腔注射灌洗,使用磁性蛋白G珠纯化样品,并使用抗-人Fc-特异性HRP二抗通过蛋白质印迹分析来评估。如图12所示,在55kDa附近观察到未切割的重链(泳道#9),而在25kDa附近存在切割的Fc片段(箭头)。

[0351] 本公开的主题的实施方式

[0352] 从前面的描述中,将显而易见的是,可以对本公开的主题进行变型和修改以将其应用于各种用途和条件。这样的实施方式也在所附权利要求的范围内。

[0353] 本文所述变量定义中的元素列表包括将变量定义为列出的元素的任何单个元素或组合(或子组合)。本文所述实施方式包括将该实施方式作为任何单一实施方式或与任何

其它实施方式或其部分相结合。

[0354] 本说明书中提到的所有专利和出版物都以相同的程度并入本文以供参考,就如同每个独立的专利和出版物都被具体地和单独地指出以并入而供参考一样。

序列表

<110> 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

D • A • 谢恩伯格

L • 佩拉罗

<120> 用于改善免疫疗法的细胞及其用途

<130> 072734.1109

<150> US 62/881,467

<151> 2019-08-01

<160> 45

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: IdeS氨基酸序列

<400> 1

```

Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Val Val Leu Ala Ala Val
1           5           10           15
Thr Leu Phe Ala Leu Ser Val Asp Arg Gly Val Ile Ala Asp Ser Phe
          20           25           30
Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
          35           40           45
Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Lys Phe Thr Gln
          50           55           60
Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65           70           75           80
Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
          85           90           95
Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Glu
          100          105          110
Lys Ile Glu Ala Tyr Leu Lys Lys His Pro Asp Lys Gln Lys Ile Met
          115          120          125
Phe Gly Asp Gln Glu Leu Leu Asp Val Arg Lys Val Ile Asn Thr Lys
          130          135          140
Gly Asp Gln Thr Asn Ser Glu Leu Phe Asn Tyr Phe Arg Asp Lys Ala
145          150          155          160
Phe Pro Gly Leu Ser Ala Arg Arg Ile Gly Val Met Pro Asp Leu Val

```

	165		170		175
Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Tyr Lys Thr Gln					
	180		185		190
Thr Thr Asp Val Asn Arg Thr Tyr Gln Glu Lys Asp Arg Arg Gly Gly					
	195		200		205
Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr					
	210		215		220
Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu					
225		230		235	240
Ile Lys Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr					
	245		250		255
Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp					
	260		265		270
Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp					
	275		280		285
Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser					
	290		295		300
Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile					
305		310		315	320
Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser					
	325		330		335
Trp Asn Gln Thr Asn					
	340				

<210> 2

<211> 936

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO: 1的氨基酸30-341的示例性核酸序列

<400> 2

gactctttta gtccaatca agaaatccga tatagcgagg tgactcctta ccatgtaact 60
tctgtgtgga ccaagggagt taccccacca gccaaagtta cgcagggtga ggacgtatatt 120
cacgcaccgt acgtagctaa ccagggttgg tacgacatca ctaagacctt caatgggaaa 180
gacgatcttt tgtgtggtgc cgcaacggcg ggcaacatgc tgcactggtg gttcgaccaa 240
aacaaggaga agatcgaagc gtacttgaag aaacaccag acaaacagaa aatcatgttt 300
ggagaccagg agctcctgga tgtgagaaaag gtaatcaaca ctaaagggtga ccaaacaac 360
agtgaacttt ttaactatatt tcgggacaag gcgtttccag gattgagtgc cagaagaatc 420
ggcgtaaatgc ctgacctcgt gcttgacatg ttcatcaatg gatactatct caatgtatat 480
aagacccaaa ccacagatgt taatcgaact tatcaggaga aggatagaag gggaggaata 540

tttgatgccg tttttactcg aggagaccag tctaagctct tgaccagcag gcacgacttc 600
aaagagaaga atcttaaaga aatatctgat ctcataaaga aggaactgac ggaaggcaaa 660
gcgctgggac tttcccatac gtatgccaat gtaagaatca atcatgtcat aaacctttgg 720
ggtgctgatt tcgattctaa tggaaatctt aaggctatat atgttactga ttccgactcc 780
aacgcgtcta ttggcatgaa aaaatacttc gtcgggggtga actcagcagg aaaggtcgca 840
atatctgcta aggaaattaa ggaagacaac atagggggcgc aagtgtgagg tctcttcacc 900
ctttccaccg gccaaagactc ctggaatcaa acaaat 936

<210> 3

<211> 71

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: CD8多肽

<400> 3

Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile
1				5				10					15		
Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala
				20				25					30		
Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr
				35				40					45		
Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu
				50				55					60		
Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn									
65								70							

<210> 4

<211> 213

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成:编码SEQ ID NO: 3的氨基酸的示例性核酸序列

<400> 4

ccaactacta ctcccgacc gagaccgcc actcctgctc ccacgattgc ctcccaacct 60
cttagcttga gaccggaagc atgtcggcct gcggccggtg gcgcagtaca tactcgcggc 120
ctggactttg cgtgcgacat atacatttgg gcacccttg cgggcacttg cggagttttg 180
ctgctgtctc tcgtgataac tctctattgt aac 213

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 人IL-2 信号肽

<400> 5

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 鼠IL-2 信号肽

<400> 6

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu

1 5 10 15

Leu Val Asn Ser

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 人kappa信号序列

<400> 7

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 鼠kappa信号序列

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (21)

<223> 人CD8信号肽

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (18)

<223> 截短的CD8信号肽

<400> 10

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (16)

<223> 人白蛋白信号序列

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 人催乳素信号序列

<400> 12

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser

20 25 30

<210> 13

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 编码SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的CD8信号序列核酸序列

<400> 13

atggcccttc cggtagcggc gcttctcctc cctttggcgc ttcttctgca cgct 54

<210> 14

<211> 269

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (269)

<223> 鼠科CD19多肽

<400> 14

Arg Pro Gln Lys Ser Leu Leu Val Glu Val Glu Glu Gly Gly Asn Val

1 5 10 15

Val Leu Pro Cys Leu Pro Asp Ser Ser Pro Val Ser Ser Glu Lys Leu

20	25	30
Ala Trp Tyr Arg Gly Asn Gln Ser Thr Pro Phe Leu Glu Leu Ser Pro		
35	40	45
Gly Ser Pro Gly Leu Gly Leu His Val Gly Ser Leu Gly Ile Leu Leu		
50	55	60
Val Ile Val Asn Val Ser Asp His Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln		
65	70	75
Lys Arg Pro Pro Phe Lys Asp Ile Trp Gln Pro Ala Trp Thr Val Asn		
85	90	95
Val Glu Asp Ser Gly Glu Met Phe Arg Trp Asn Ala Ser Asp Val Arg		
100	105	110
Asp Leu Asp Cys Asp Leu Arg Asn Arg Ser Ser Gly Ser His Arg Ser		
115	120	125
Thr Ser Gly Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp His Pro Lys Val		
130	135	140
Trp Gly Thr Lys Pro Val Cys Ala Pro Arg Gly Ser Ser Leu Asn Gln		
145	150	155
Ser Leu Ile Asn Gln Asp Leu Thr Val Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp		
165	170	175
Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Val Pro Val Ala Lys Gly Ser Ile Ser		
180	185	190
Trp Thr His Val His Pro Arg Arg Pro Asn Val Ser Leu Leu Ser Leu		
195	200	205
Ser Leu Gly Gly Glu His Pro Val Arg Glu Met Trp Val Trp Gly Ser		
210	215	220
Leu Leu Leu Leu Pro Gln Ala Thr Ala Leu Asp Glu Gly Thr Tyr Tyr		
225	230	235
Cys Leu Arg Gly Asn Leu Thr Ile Glu Arg His Val Lys Val Ile Ala		
245	250	255
Arg Ser Ala Val Trp Leu Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly		
260	265	

<210> 15

<211> 272

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (272)

<223> 人CD19多肽

<400> 15

Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Val
1				5					10					15	
Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Asp	Gly	Pro	Thr	Gln	Gln	Leu	Thr
			20					25					30		
Trp	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Gly
			35				40					45			
Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Ile	His	Met	Arg	Pro	Leu	Ala	Ile	Trp	Leu	Phe
			50				55					60			
Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Gln	Met	Gly	Gly	Phe	Tyr	Leu	Cys	Gln	Pro
65					70				75					80	
Gly	Pro	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala	Trp	Gln	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Asn	Val
				85				90					95		
Glu	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Phe	Arg	Trp	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly
			100					105					110		
Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser	Ser	Glu	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro
			115				120					125			
Ser	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Pro	Lys	Leu	Tyr	Val	Trp	Ala	Lys	Asp	Arg
			130				135					140			
Pro	Glu	Ile	Trp	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Cys	Leu	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser
145					150				155					160	
Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Thr	Met	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr
				165					170					175	
Leu	Trp	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Gly	Pro
			180					185					190		
Leu	Ser	Trp	Thr	His	Val	His	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser
			195				200					205			
Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro	Ala	Arg	Asp	Met	Trp	Val	Met	Glu
			210				215				220				
Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Ala	Gly	Lys	Tyr
225					230					235				240	
Tyr	Cys	His	Arg	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	Ser	Phe	His	Leu	Glu	Ile	Thr
				245					250					255	
Ala	Arg	Pro	Val	Leu	Trp	His	Trp	Leu	Leu	Arg	Thr	Gly	Gly	Trp	Lys
			260					265					270		

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: CAR的VH细胞外抗原结合结构域

<400> 16

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: CAR的VL细胞外抗原结合结构域

<400> 17

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100	105
<210> 18	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成: 接头	
<400> 18	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	
<210> 19	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成: VH CDR1	
<400> 19	
Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
1 5	
<210> 20	
<211> 6	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成: VH CDR2	
<400> 20	
Tyr Pro Gly Asp Gly Asp	
1 5	
<210> 21	
<211> 13	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成: VH CDR3	
<400> 21	
Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr	
1 5 10	
<210> 22	
<211> 11	

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: VL CDR1

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: VL CDR2

<400> 23

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: VL CDR3

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: scFv

<400> 25

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50	55	60
Lys Gly Gln Ala Thr	Leu Thr Ala Asp Lys Ser	Ser Ser Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Gln Leu Ser Gly	Leu Thr Ser Glu Asp Ser	Ala Val Tyr Phe Cys
85	90	95
Ala Arg Lys Thr Ile	Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr	Phe Asp Tyr Trp
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Thr	Val Thr Val Ser Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Gly
115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Asp Ile Glu	Leu Thr Gln Ser
130	135	140
Pro Lys Phe Met Ser	Thr Ser Val Gly Asp Arg	Val Ser Val Thr Cys
145	150	155
Lys Ala Ser Gln Asn	Val Gly Thr Asn Val Ala	Trp Tyr Gln Gln Lys
165	170	175
Pro Gly Gln Ser Pro	Lys Pro Leu Ile Tyr Ser	Ala Thr Tyr Arg Asn
180	185	190
Ser Gly Val Pro Asp	Arg Phe Thr Gly Ser Gly	Ser Gly Thr Asp Phe
195	200	205
Thr Leu Thr Ile Thr	Asn Val Gln Ser Lys Asp	Leu Ala Asp Tyr Phe
210	215	220
Cys Gln Gln Tyr Asn	Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser	Gly Gly Gly Thr Lys
225	230	235
Leu Glu Ile Lys Arg		
245		

<210> 26

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO：25的氨基酸序列的核苷酸序列

<400> 26

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatactg gagatgggtga tactaactac 180
aatggaaagt tcaagggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420

ctcaccagtc ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
 aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctgggtatc aacagaaacc aggacaatct 540
 cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtccctga tcgcttcaca 600
 ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
 gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
 ctggagatca aacgg 735

<210> 27

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: CD8多肽

<400> 27

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	1	5	10	15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Val	Ser	Pro	Leu	Asp	Arg	Thr	20	25	30	
Trp	Asn	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Glu	Leu	Lys	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	35	40	45	
Asn	Pro	Thr	Ser	Gly	Cys	Ser	Trp	Leu	Phe	Gln	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	50	55	60	
Ala	Ser	Pro	Thr	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Pro	Lys	Ala	65	70	75	80
Ala	Glu	Gly	Leu	Asp	Thr	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Lys	Arg	Leu	Gly	Asp	85	90	95	
Thr	Phe	Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Asp	Phe	Arg	Arg	Glu	Asn	Glu	Gly	Tyr	100	105	110	
Tyr	Phe	Cys	Ser	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	115	120	125	
Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	130	135	140	
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	145	150	155	160
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	165	170	175	
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	180	185	190	
Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	195	200	205	

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
 210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 225 230 235

<210> 28

<211> 213

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO：27的氨基酸137-207的示例性核苷酸序列

<400> 28

cccaccacga cgccagcgcc gcgaccacca accccggcgc ccacgatcgc gtcgcagccc 60
 ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cagaggggg 120
 ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccctgg ccgggacttg tggggtcctt 180
 ctccgtgtcac tggttatcac cctttactgc aac 213

<210> 29

<211> 247

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_feature

<223> CD8多肽

<400> 29

Met Ala Ser Pro Leu Thr Arg Phe Leu Ser Leu Asn Leu Leu Leu Met
 1 5 10 15
 Gly Glu Ser Ile Ile Leu Gly Ser Gly Glu Ala Lys Pro Gln Ala Pro
 20 25 30
 Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala Glu Leu Gly Gln Lys
 35 40 45
 Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val Ser Gln Gly Cys Ser
 50 55 60
 Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro Gln Pro Thr Phe Val
 65 70 75 80
 Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr Trp Asp Glu Lys Leu
 85 90 95
 Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Val Arg Asp Thr Asn Asn Lys Tyr
 100 105 110
 Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe
 115 120 125

Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro
 130 135 140
 Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr
 145 150 155 160
 Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu
 165 170 175
 Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Ala
 180 185 190
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Pro
 195 200 205
 Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys
 210 215 220
 Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro
 225 230 235 240
 Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
 245

<210> 30

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> CD28多肽

<400> 30

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 25 30
 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 35 40 45
 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60
 Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95
 Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

115	120	125
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
130	135	140
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
145	150	155
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
165	170	175
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
180	185	190
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
195	200	205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
210	215	220
<210> 31		
<211> 164		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> CD3- ζ 多肽		
<400> 31		
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
1	5	10
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		
20	25	30
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		
35	40	45
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
50	55	60
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
65	70	75
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
85	90	95
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
100	105	110
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
115	120	125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		
130	135	140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 32

<211> 188

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc_feature

<223> CD3- ζ 多肽

<400> 32

Met Lys Trp Lys Val Ser Val Leu Ala Cys Ile Leu His Val Arg Phe
 1 5 10 15

Pro Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala
 35 40 45

Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn
 50 55 60

Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met
 85 90 95

Gly Gly Lys Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala
 100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys
 115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Asp Ser
 130 135 140

His Phe Gln Ala Val Gln Phe Gly Asn Arg Arg Glu Arg Glu Gly Ser
 145 150 155 160

Glu Leu Thr Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ala Arg Pro Lys Ala Cys Arg
 165 170 175

His Lys Lys Pro Leu Ser Leu Pro Ala Ala Val Ser
 180 185

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: CD3- ζ 多肽

<400> 33

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 50 55

<210> 34

<211> 174

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 示例性核酸序列

<400> 34

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctg 174

<210> 35

<211> 255

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> 4-1BB多肽

<400> 35

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 35 40 45
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 50 55 60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly
85				90				95							
Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu
100				105				110							
Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln
115				120				125							
Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys
130				135				140							
Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro
145				150				155				160			
Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala
165				170				175							
Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu
180				185				190							
Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu
195				200				205							
Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
210				215				220							
Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
225				230				235				240			
Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	
245				250				255							

<210> 36

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO：35的氨基酸214-255的示例性核酸序列

<400> 36

aaacggggca gaaagaagct cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126

<210> 37

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (277)

<223> 具有氨基酸序列的人OX40

<400> 37

Met	Cys	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ala	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Val
			20					25					30		
Gly	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asn	Asp	Arg	Cys	Cys	His	Glu	Cys	Arg	Pro
		35					40					45			
Gly	Asn	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Cys
	50					55					60				
Arg	Pro	Cys	Gly	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Asp	Val	Val	Ser	Ser	Lys	Pro
65					70				75					80	
Cys	Lys	Pro	Cys	Thr	Trp	Cys	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Lys
			85					90					95		
Gln	Leu	Cys	Thr	Ala	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Arg	Cys	Arg	Ala	Gly
			100					105					110		
Thr	Gln	Pro	Leu	Asp	Ser	Tyr	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Cys	Ala	Pro	Cys
			115				120					125			
Pro	Pro	Gly	His	Phe	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Gln	Ala	Cys	Lys	Pro	Trp
		130				135					140				
Thr	Asn	Cys	Thr	Leu	Ala	Gly	Lys	His	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Asn
145				150					155					160	
Ser	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Glu	Asp	Arg	Asp	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro
			165					170					175		
Gln	Glu	Thr	Gln	Gly	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr	Val	Gln	Pro	Thr
		180					185					190			
Glu	Ala	Trp	Pro	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Thr	Arg	Pro	Val	Glu
	195					200					205				
Val	Pro	Gly	Gly	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val
	210					215				220					
Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu
225				230				235						240	
Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His	Lys	Pro	Pro	Gly	Gly
			245					250						255	
Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln	Ala	Asp	Ala	His	Ser
			260				265					270			
Thr	Leu	Ala	Lys	Ile											
			275												

<210> 38

<211> 199

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> 人IC0S

<400> 38

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1 5 10 15
Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
 35 40 45
Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
 50 55 60
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65 70 75 80
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95
Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
 100 105 110
Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125
His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
 130 135 140
Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
 165 170 175
Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
 180 185 190
Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
 195

<210> 39

<211> 473

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 19BBz

<400> 39

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Gln	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Gln	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Asp	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser
	130					135				140					
Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys
145				150					155					160	
Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
			165					170					175		
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Asn
			180					185					190		
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
	195						200					205			
Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe
	210					215				220					
Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225				230					235					240	
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
			245					250				255			
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
		260					265					270			
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
	275					280				285					
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr
	290					295				300					

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn Lys
 305 310 315 320
 Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
 325 330 335
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 355 360 365
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 370 375 380
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 385 390 395 400
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 405 410 415
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 420 425 430
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 450 455 460
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470

<210> 40

<211> 1419

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO：39的氨基酸序列的示例性核酸序列

<400> 40

gaggtgaagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatectg gagatggtga tactaactac 180
 aatggaaaagt tcaaggggtca agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcggcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaaagacc 300
 attagttcgg tagtagattt ctactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgag 420
 ctcacccagt ctccaaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag cgtcacctgc 480
 aaggccagtc agaattgtggg tactaatgta gcctggtatc aacagaaacc aggacaatct 540
 cctaaaccac tgatttactc ggcaacctac cggaacagtg gagtcctga tcgcttcaca 600

ggcagtgat ctgggacaga ttctactctc accatcacta acgtgcagtc taaagacttg 660
 gcagactatt tctgtcaaca atataacagg tatccgtaca cgtccggagg ggggaccaag 720
 ctggagatca aacgggcggc cgcacccacc acgacgccag cgccgcgacc accaaccctcg 780
 gcgccccacga tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcggtgccg gccagcggcg 840
 gggggcgag tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 900
 ctggccggga cttgtgggt cttctctctg tctactgtta tcacccttta ctgcaacaaa 960
 cggggcagaa agaagctcct gtatatattc aaacaacat ttatgagacc agtacaact 1020
 actcaagagg aagatggctg tagctgccga tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa 1080
 ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcagg ccagaaccag 1140
 ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtac atgttttgga caagagacgt 1200
 ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggctgtac 1260
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagt agattgggat gaaaggcgag 1320
 cgccggagg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 1380
 acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgc 1419

<210> 41

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：编码SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的示例性核酸序列

<400> 41

atggctctcc cagtactgc cctactgctt cccctagcgc ttctcctgca tgca 54

<210> 42

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：包含CD8信号肽的19BBz

<400> 42

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5				10					15		
His	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro
				20				25					30		
Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser
				35				40					45		
Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu
				50				55					60		
Trp	Ile	Gly	Gln	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly
65				70				75					80		

Lys	Phe	Lys	Gly	Gln	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	
				85					90					95		
Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	
				100					105					110		
Phe	Cys	Ala	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Asp	Phe	Tyr	Phe	Asp	
				115					120					125		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
				130					135					140		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	
				145					150					155		
Gln	Ser	Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Val	
				165					170					175		
Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	
				180					185					190		
Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Thr	Tyr	
				195					200					205		
Arg	Asn	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
				210					215					220		
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	
				225					230					235		
Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	
				245					250					255		
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	
				260					265					270		
Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	
				275					280					285		
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	
				290					295					300		
Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	
				305					310					315		
Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	
				325					330					335		
Asn	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	
				340					345					350		
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	
				355					360					365		
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	
				370					375					380		
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	

385	390	395	400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
	420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
	435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
	450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
465	470	475	480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	

<210> 43

<211> 1473

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 编码SEQ ID NO: 42的氨基酸序列的示例性核酸序列

<400> 43

atggctctcc cagtgcactgc cctactgctt cccctagcgc ttctcctgca tgcagaggtg 60
aagctgcagc agtctggggc tgagctgggt aggctgggt cctcagtga gatttctgc 120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga 180
cagggctctg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300
ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360
tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
ggtggaggtg gatcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat tgagctcacc 480
cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc 540
agtcagaatg tgggtactaa tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa 600
ccactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtcc ctgatcgctt cacaggcagt 660
ggatctggga cagatttcac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga cttggcagac 720
tatttctgtc aacaatataa caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag 780
atcaaacggg cgccgcacc caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac cccggcgccc 840
acgatcgctg cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc 900
gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatattt acatctgggc gcccttgccc 960
gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcaa caaacggggc 1020
agaaagaagc tcctgtatat attcaaaca ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140

gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccttgaga tgggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgc 1473

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: P2A肽

<400> 44

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 45

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 编码SEQ ID NO: 44所示的氨基酸序列的示例性核苷酸序列

<400> 45

gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc tggacct 57

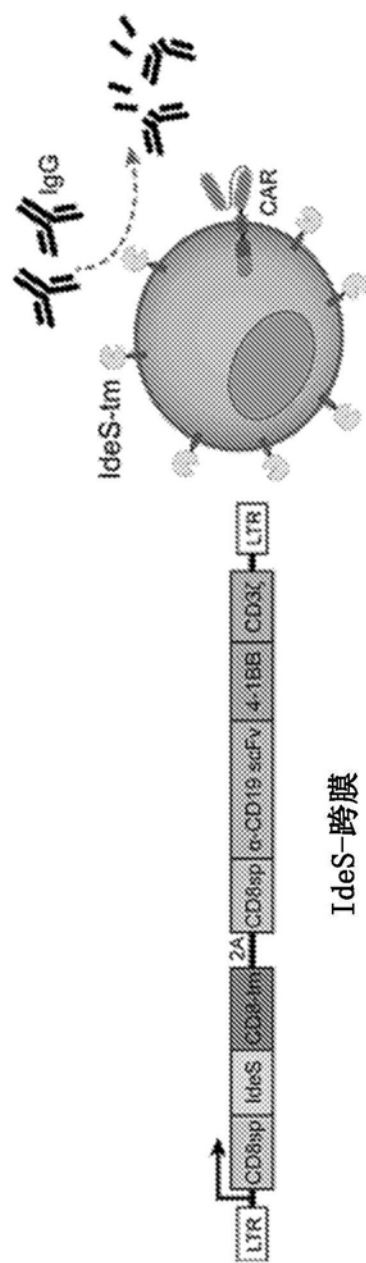


图1A

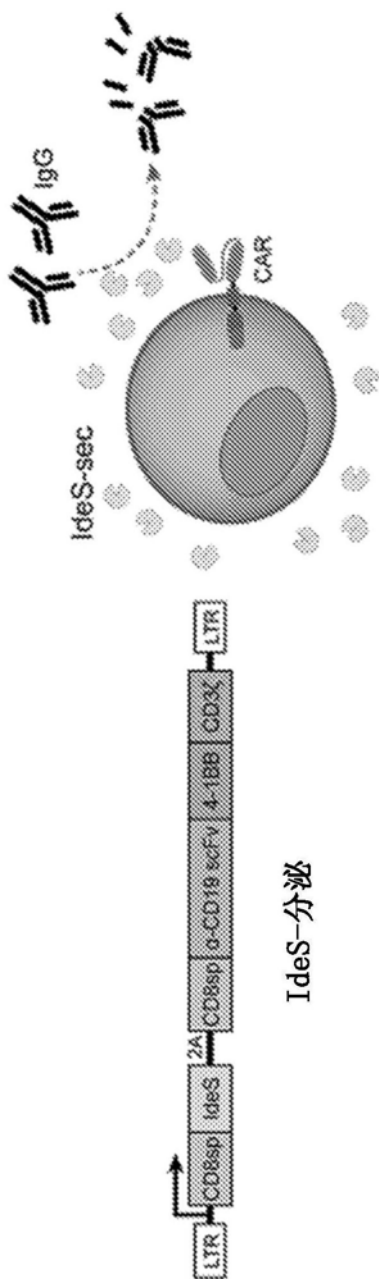


图1B

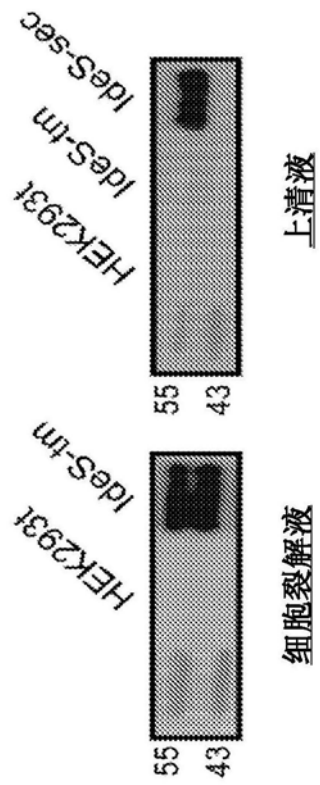


图2

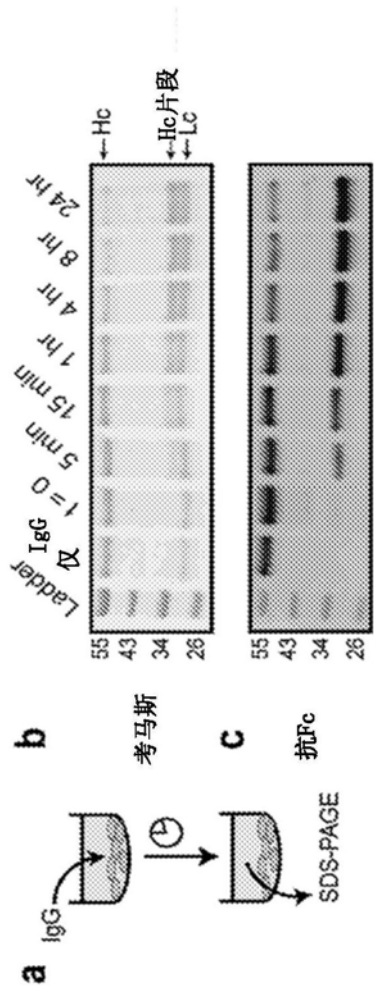


图3

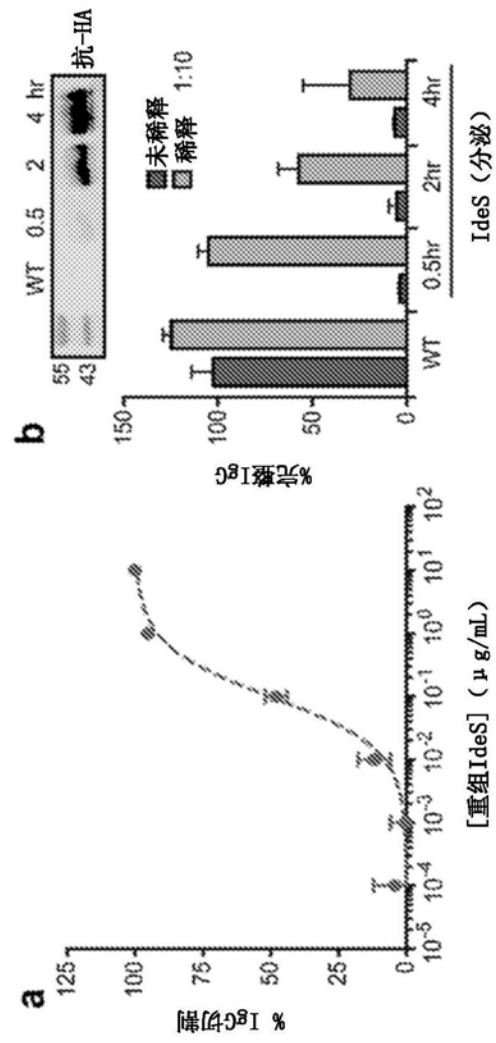


图4

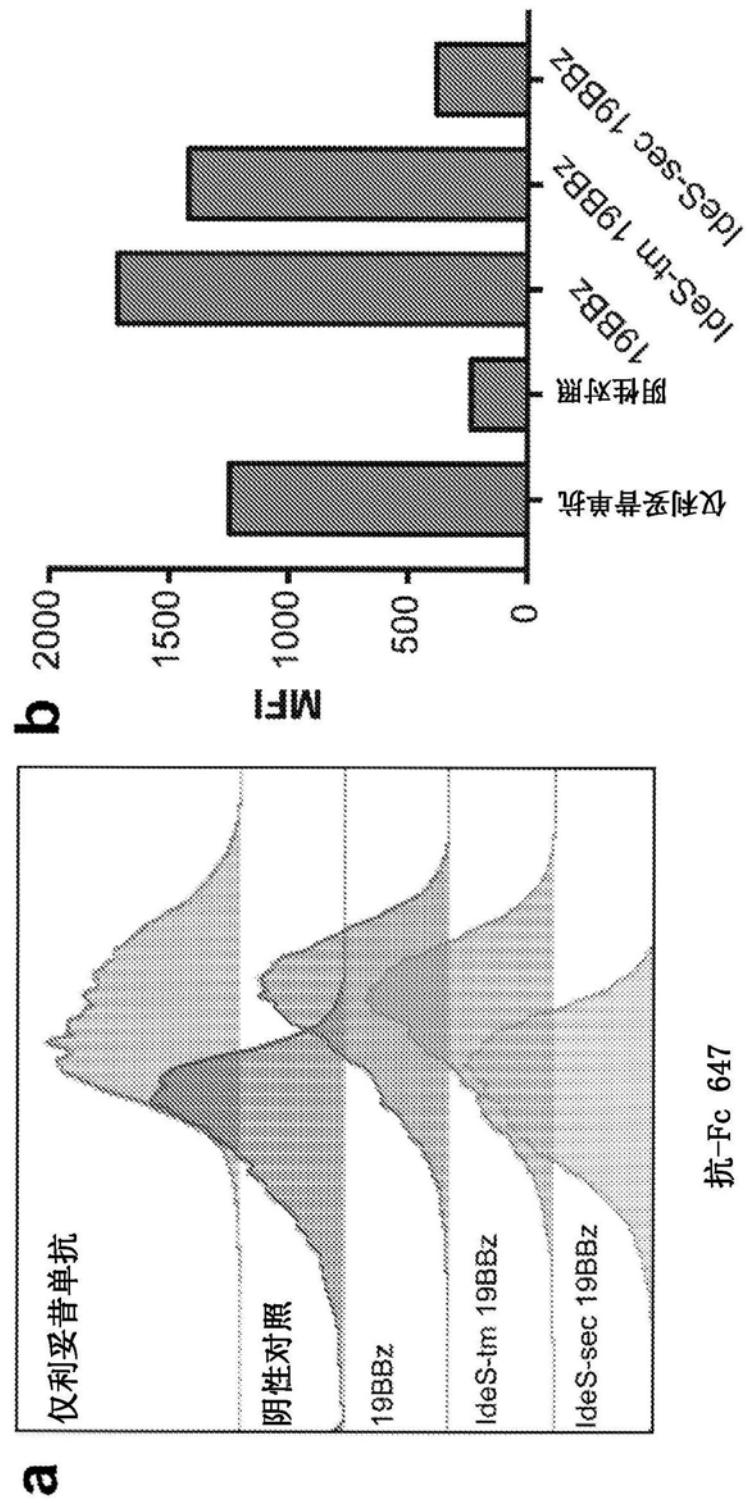


图5

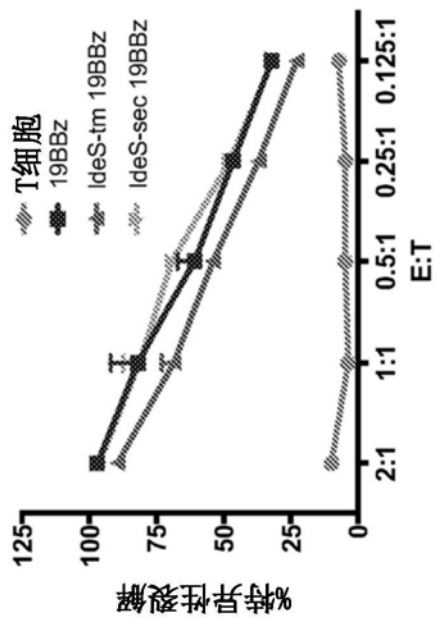


图6

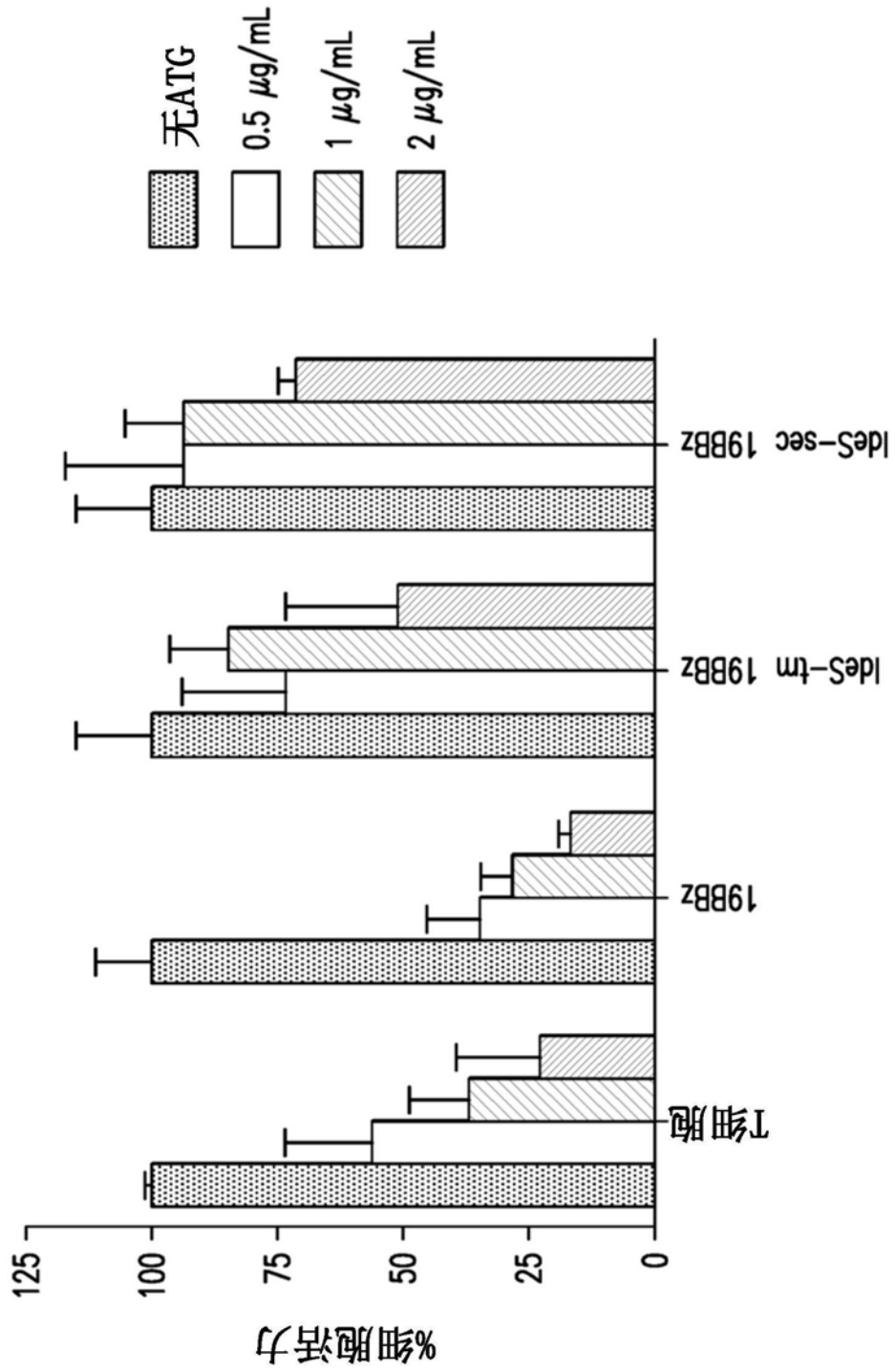


图7

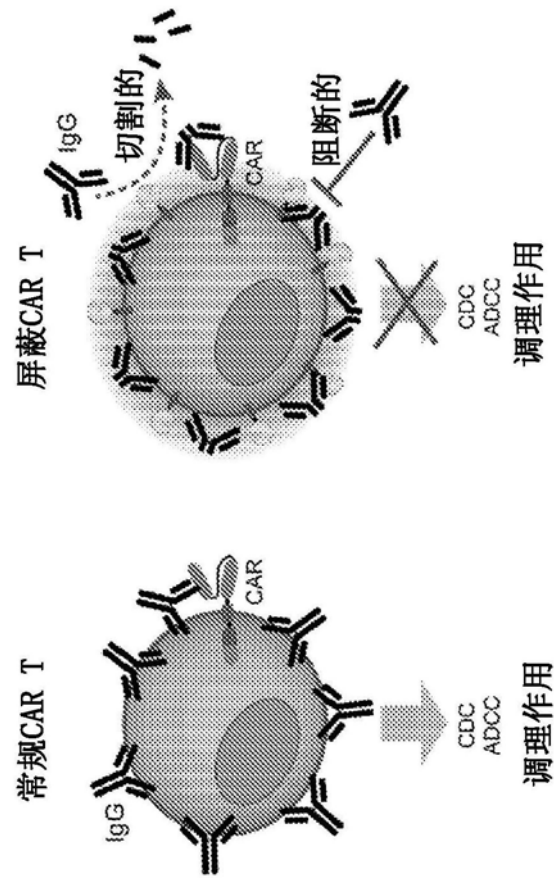


图8

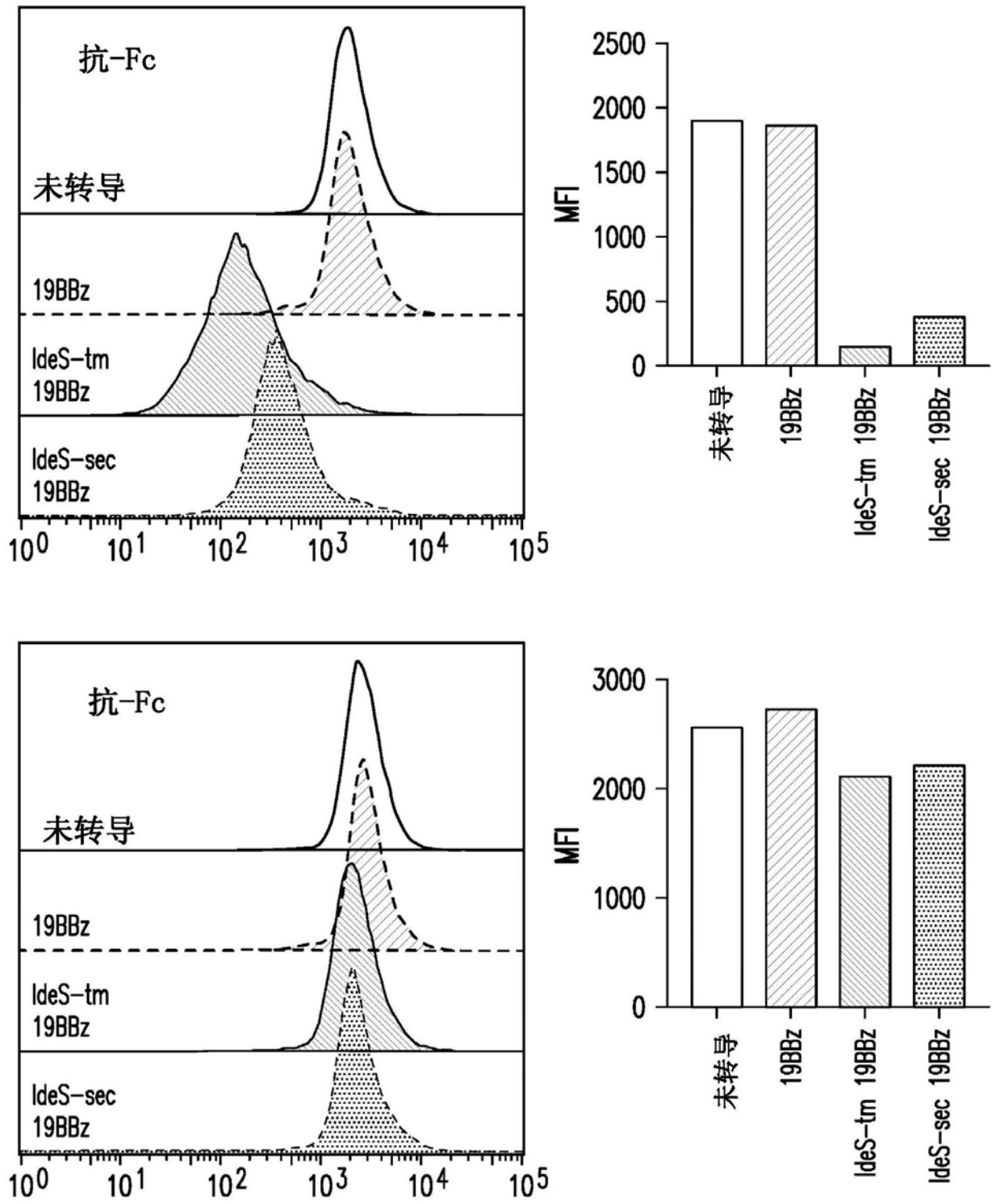


图9

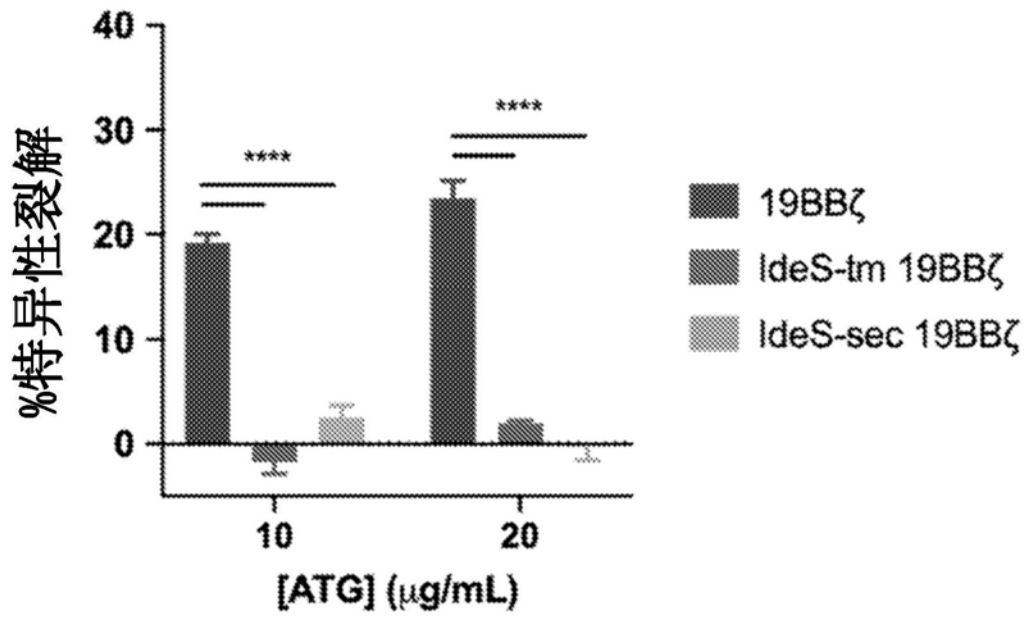


图10

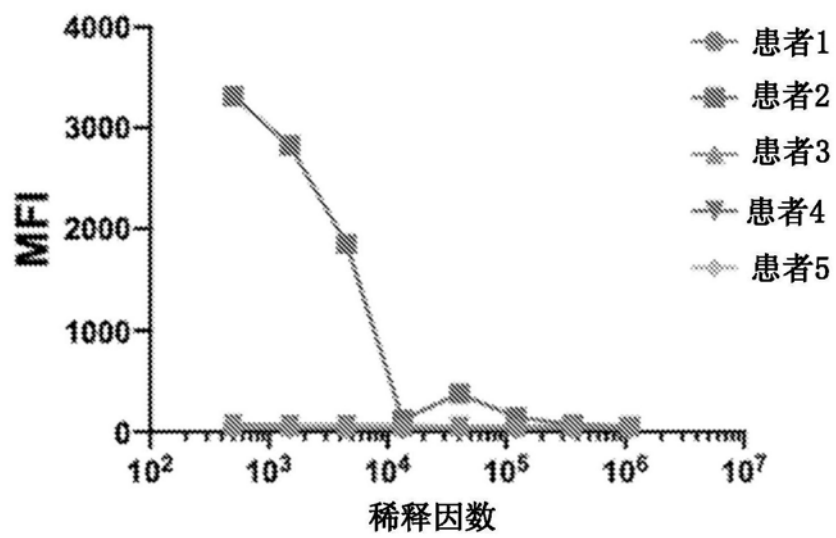


图11A

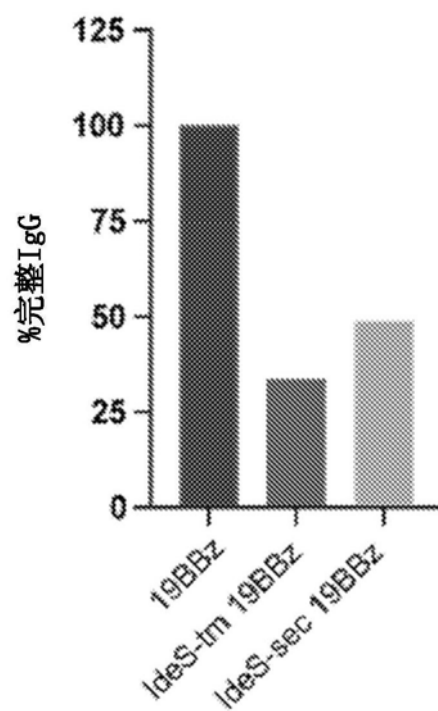


图11B

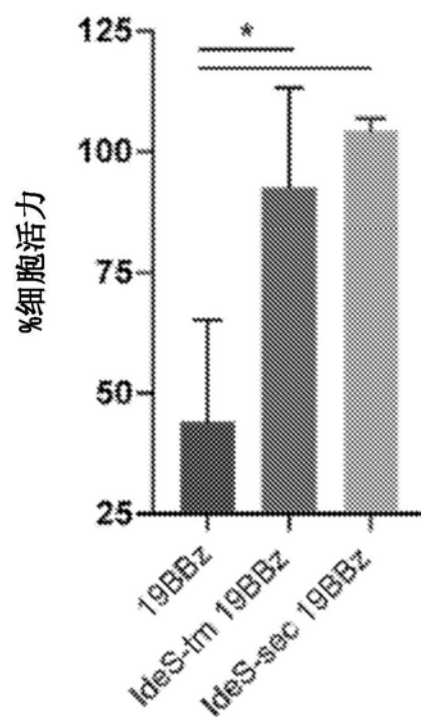


图11C

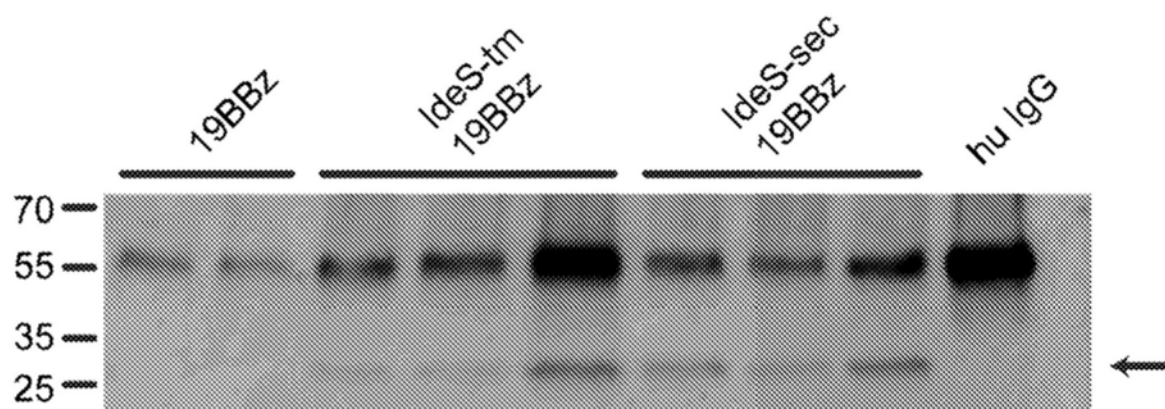


图12