



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119013306 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202380034192.5

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2023.04.20

专利代理师 陈文平 袁泉

(30) 优先权数据

63/333,064 2022.04.20 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/395 (2006.01)

2024.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066018 2023.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/205739 EN 2023.10.26

(71) 申请人 森迪生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·S·加里松 M·E·鸿

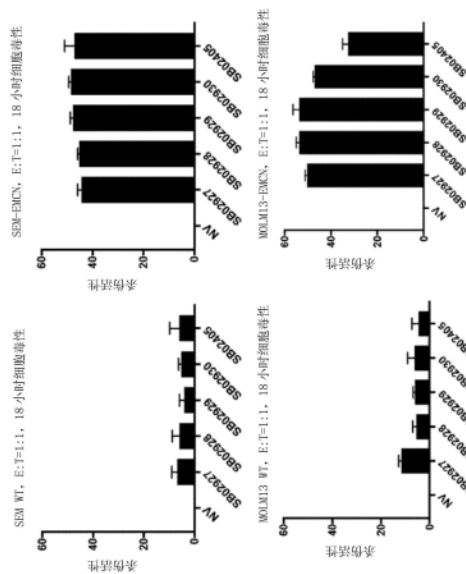
权利要求书3页 说明书62页 附图3页

(54) 发明名称

抗原结合结构域及其使用方法

(57) 摘要

本文提供了对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的抗体及其抗原结合片段。本文还提供了针对 EMCN 特异性抗体或其抗原结合结构域的细胞、核酸、载体、组合物和方法。



1. 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,

其中所述VH包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH互补区1 (CDRH1)、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH互补区2 (CDRH2) 和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3 (CDRH3);

其中所述VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区1 (CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2 (CDRL2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3 (CDRL3); 并且

其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

2. 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VH包含具有选自自由SEQ ID NO:2-5组成的组的氨基酸序列的VH互补区1 (CDRH1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH互补区2 (CDRH2) 和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3 (CDRH3),

其中所述VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区1 (CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2 (CDRL2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3 (CDRL3), 并且

任选地其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有选自自由SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19组成的组的氨基酸序列, 或者其中所述VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段, 任选地其中所述抗原结合片段包括F(ab) 片段、F(ab') 片段或单链可变片段 (scFv), 任选地其中所述抗原结合片段包括单链可变片段 (scFv)。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开, 任选地其中所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH, 其中VH是重链可变结构域, L是所述肽接头, 并且VL是轻链可变结构域, 任选地其中所述肽接头包含选自自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:21-37。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述scFv包含选自自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID No:65、67、69和70。

7. 一种嵌合蛋白, 所述嵌合蛋白包含如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、以及异源性分子或部分;

任选地其中所述嵌合蛋白是抗体-药物缀合物, 并且其中所述异源性分子或部分包含治疗剂;

任选地其中所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体 (CAR), 并且其中所述异源性分子或部分包含选自自由以下各项组成的组的多肽: 跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合, 任选地其中所述CAR包含跨膜结构域;

任选地其中所述CAR包含一个或多个胞内信号传导结构域, 任选地其中所述CAR是包含刺激免疫反应的一个或多个胞内信号传导结构域的活化性CAR; 任选地其中所述CAR是包含

抑制免疫反应的一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR, 任选地其中所述胞内抑制性结构域包括酶抑制性结构域;

任选地其中所述胞内抑制性结构域包括胞内抑制性共信号传导结构域;

任选地其中所述CAR包含所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间的间隔区;

任选地其中所述间隔区具有选自SEQ ID NO: 41-52组成的组的氨基酸序列。

8. 一种工程化核酸, 所述工程化核酸编码如权利要求1至6中任一项所述的抗体或抗原结合片段或者如权利要求7所述的嵌合蛋白。

9. 一种表达载体, 所述表达载体包含如权利要求8所述的工程化核酸。

10. 一种组合物, 所述组合物包含如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求7所述的嵌合蛋白、如权利要求8所述的工程化核酸或者如权利要求9所述的表达载体以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

11. 一种制备工程化细胞的方法, 所述方法包括用如权利要求8所述的工程化核酸或如权利要求9所述的表达载体来转导分离的细胞。

12. 一种分离的细胞, 所述分离的细胞包含如权利要求1至6中任一项所述的抗原结合片段、如权利要求7所述的嵌合蛋白、如权利要求8所述的工程化核酸、如权利要求9所述的表达载体或如权利要求10所述的组合物。

13. 一种工程化细胞群, 所述工程化细胞群表达如权利要求8所述的工程化核酸、如权利要求9所述的表达载体、如权利要求1至6中任一项所述的抗原结合片段或如权利要求7所述的嵌合蛋白。

14. 如权利要求12或权利要求13所述的细胞或细胞群, 其中所述嵌合蛋白是重组表达的;

任选地其中所述嵌合蛋白从载体或所述细胞的基因组的选定基因座表达;

任选地其中所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体;

任选地其中, 其中所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每一种是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体;

任选地其中所述细胞或细胞群选自由以下各项组成的组: T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)和iPSC源性细胞, 任选地其中所述细胞是自体的, 任选地其中所述细胞是同种异体的。

15. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含有效量的如权利要求12所述的分离的细胞或如权利要求13所述的工程化细胞群, 以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂, 或者它们的组合; 或者有效量的经遗传修饰的细胞, 所述经遗传修饰的细胞表达如权利要求1至6中任一项所述的抗原结合片段或如权利要求7所述的嵌合蛋白以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂, 或者它们的组合, 任选地其中所述药物组合物用于治疗 and/或预防肿瘤。

16. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如权利要求10所述的组合物,或如权利要求12所述的分离的细胞,或如权利要求15所述的药物组合物。

17. 一种在受试者中抑制针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如权利要求10所述的组合物,或如权利要求12所述的分离的细胞施用于患有肿瘤的受试者,任选地其中所述分离的细胞或细胞群表达嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包括如权利要求7所述的嵌合蛋白。

18. 一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如权利要求10所述的组合物,或如权利要求12所述的分离的细胞,或如权利要求10所述的组合物。

19. 一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如权利要求7所述的嵌合蛋白;如权利要求12所述的分离的细胞或如权利要求13所述的细胞群;如权利要求12所述的工程化核酸;如权利要求13所述的表达载体;如权利要求10所述的组合物;任选地其中所述试剂盒还包括使用所述细胞来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面使用说明;

任选地其中所述试剂盒还包括使用所述核酸来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤的一种或多种抗原特异性细胞的书面使用说明;

任选地其中所述试剂盒还包括使用所述载体来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤的一种或多种抗原特异性细胞的书面使用说明;

任选地其中所述试剂盒还包括使用所述组合物来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面使用说明;或者任选地其中所述试剂盒还包括使用所述嵌合蛋白来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤的一种或多种抗原特异性细胞的书面使用说明。

## 抗原结合结构域及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月20日提交的美国临时申请第63/333,064号的权益,该临时申请据此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包括序列表,所述序列表已经由EFS-Web提交并且据此以引用的方式整体并入。所述ASCII副本创建于20XX年XX月XX日,命名为XXXXXUS\_sequencelisting.txt,大小为X,XXX,XXX字节。

### 背景技术

[0005] 基于嵌合抗原受体(CAR)的过继性细胞疗法被用于重定向免疫反应性细胞(诸如T细胞)的特异性和功能,已经在淋巴恶性肿瘤患者中显示出功效(Pule等人,《自然医学(Nat. Med.)》(14):1264-1270(2008);Maude等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)》(371):1507-17(2014);Brentjens等人,《科学转化医学(Sci Transl Med.)》(5):177ra38(2013))。CAR T细胞已经显示出在表达CD19的恶性肿瘤患者中诱导完全缓解,这些患者的化学疗法已经导致耐药性和肿瘤进展。CD19CAR疗法的成功为治疗其他血液恶性肿瘤(诸如急性髓系白血病(AML))带来了希望。急性骨髓性白血病是成人中最常见的急性白血病。AML是骨髓系血细胞癌,其特征在于积聚于骨髓和血液中的异常细胞的快速生长,以及干扰正常血细胞。有时,AML可以扩散到大脑、皮肤或牙龈。针对AML的标准化学疗法治疗在过去40年中没有发生实质性变化(Pulte等人,2008),总体存活期仍然很短。

[0006] 开发针对AML的CAR疗法的一个挑战是缺乏合适的靶标。鉴定适当的CAR靶标的的能力对于有效靶向和治疗肿瘤而不损害表达相同的靶抗原的正常细胞是重要的。因此,仍然需要靶向AML细胞而不靶向正常细胞或组织的基于CAR-T细胞的AML疗法。

### 发明内容

[0007] 本文提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白(EMCN)的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:

[0008] 可变重链(VH)区,所述可变重链区含有具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH互补区1(CDRH1)、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH互补区2(CDRH2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3(CDRH3);以及

[0009] 可变轻链(VL)区,所述可变轻链区含有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区L(CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2(CDRL2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3(CDRL3),其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0010] 本文还提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白(EMCN)的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:可变重链(VH)区,所述可变重链区含有具有选自自由SEQ ID NO:2-5组成的组的氨基酸序列的VH互补区1(CDRH1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH互补区2(CDRH2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3(CDRH3);

以及可变轻链 (VL) 区,所述可变轻链区含有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区L (CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2 (CDRL2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3 (CDRL3),其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0011] 本文还提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:可变重链 (VH) 区,所述可变重链区含有具有选自由SEQ ID NO:2-4组成的组的氨基酸序列的VH互补区1 (CDRH1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH互补区2 (CDRH2) 和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3 (CDRH3); 以及可变轻链 (VL) 区,所述可变轻链区含有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区L (CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2 (CDRL2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3 (CDRL3)。

[0012] 在一些方面,CDRH1如SEQ ID NO:2中所示。

[0013] 在一些方面,VH区具有选自由SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列。

[0014] 在一些方面,VH区具有如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0015] 在一些方面,VH区具有选自由SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19组成的组的氨基酸序列。

[0016] 在一些方面,VH区具有如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

[0017] 在一些方面,VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0018] 本文还提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中所述VH包含:包含在选自由SEQ ID NO:12-19组成的组的VH区氨基酸序列内的重链互补决定区1 (CDR-H1)、重链互补决定区2 (CDR-H2) 和重链互补决定区3 (CDR-H3),并且所述VL包含:包含在SEQ ID NO:20的VL区氨基酸序列内的轻链互补决定区1 (CDR-L1)、轻链互补决定区2 (CDR-L2) 和轻链互补决定区3 (CDR-L3)。

[0019] 本文还提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含可变重链 (VH) 区和可变轻链 (VL) 区,其中所述VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0020] 本文还提供了一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含可变重链 (VH) 区和可变轻链 (VL) 区,其中所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

[0021] 在一些方面,VH具有选自由SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列。在一些方面,VH区具有如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0022] 在一些方面,VH具有选自由SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19组成的组的氨基酸序列。在一些方面,VH区具有如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

[0023] 在一些方面,VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0024] 在一些方面,抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。在一些方面,所述抗原结合

片段包括F(ab)片段、F(ab')片段或单链可变片段(scFv)。在一些方面,所述抗原结合片段包括单链可变片段(scFv)。

[0025] 在一些方面,所述scFv的VH和VL由肽接头分开。在一些方面,所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变域,L是肽接头,并且VL是轻链可变域。在一些方面,肽接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:21-37。

[0026] 在一些方面,所述scFv包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID No:68、70、72和74。

[0027] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含如本文所提供的抗体或其抗原结合片段、以及异源性分子或部分。

[0028] 在一些方面,嵌合蛋白为抗体-药物共轭物,并且异源分子或部分包含治疗剂。

[0029] 在一些方面,所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且所述异源性分子或部分包含选自由以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。在一些方面,所述CAR包含跨膜域。在一些方面,所述CAR包括一个或多个细胞内信号传导域。

[0030] 在一些方面,所述CAR是包括刺激免疫反应的一个或多个细胞内信号传导域的活化性CAR。

[0031] 在一些方面,所述CAR是包括一个或多个抑制免疫反应的细胞内抑制域的抑制性CAR。在一些方面,所述细胞内抑制域包括酶促抑制域。在一些方面,所述细胞内抑制域包含细胞内抑制性共信号传导域。

[0032] 在一些方面,所述CAR包括在抗原结合结构域与跨膜域之间的间隔区。在一些方面,所述间隔区具有选自由SEQ ID NO:41-52组成的组的氨基酸序列。

[0033] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含如本文所提供的抗体或其抗原结合片段或者如本文所提供的嵌合蛋白以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂,或者它们的组合。

[0034] 本文还提供了一种工程化核酸,所述工程化核酸编码如本文所提供的抗体或抗原结合片段或者如本文所提供的嵌合蛋白。

[0035] 本文还提供了一种表达载体,所述表达载体包含编码本文提供的抗体或抗原结合片段中的任一种的工程化核酸。

[0036] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含如本文所提供的工程化核酸或如本文所提供的表达载体以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂,或者它们的组合。

[0037] 本文还提供了一种制备工程化细胞的方法,所述方法包括用如本文所提供的工程化核酸或如本文所提供的表达载体来转导分离的细胞。

[0038] 本文还提供了一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如本文所提供的工程化核酸、如本文所提供的表达载体或如本文所提供的组合物。

[0039] 本文还提供了一种工程化细胞群,所述工程化细胞群表达如本文所提供的工程化核酸或如本文所提供的表达载体。

[0040] 本文还提供了一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如本文所提供的抗原结合片段或如本文所提供的嵌合蛋白。

[0041] 本文还提供了一种工程化细胞群,所述工程化细胞群表达如本文所提供的抗原结

合片段或如本文所提供的嵌合蛋白。

[0042] 在一些方面,所述嵌合蛋白由细胞或细胞群重组表达。在一些方面,所述嵌合蛋白从载体或所述细胞的基因组的选定基因座表达。

[0043] 在一些方面,所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。在一些方面,所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每种是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体。

[0044] 在一些方面,所述细胞或细胞群选自由以下各项组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T (NKT) 细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞 (ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞 (MSC)、诱导性多能干细胞 (iPSC) 和 iPSC 源性细胞。

[0045] 在一些方面,所述细胞是自体的。在一些方面,所述细胞是同种异体的。

[0046] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的如本文提供的细胞或工程化细胞群以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0047] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的表达如本文所提供的抗原结合片段或如本文所提供的嵌合蛋白的经遗传修饰的细胞以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂,或者它们的组合。

[0048] 在一些方面,所述药物组合物用于治疗 and/或预防肿瘤。

[0049] 本文还提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如本文提供的组合物或如本文提供的细胞中的任一种。

[0050] 本文还提供了一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如本文提供的组合物或如本文提供的细胞中的任一种施用于患有肿瘤的受试者。

[0051] 在一些方面,所述方法包括将如本文所提供的细胞或细胞群施用于受试者,其中所述细胞或细胞群表达包含如本文所提供的活化性CAR的嵌合蛋白。

[0052] 本文还提供了一种在受试者中抑制针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如本文提供的组合物或如本文提供的细胞中的任一种施用于患有肿瘤的受试者。在一些方面,所述方法包括将如本文所提供的细胞或细胞群施用于受试者,其中所述细胞或细胞群表达包含如本文所提供的抑制剂的嵌合蛋白。

[0053] 本文还提供了一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如本文提供的组合物或如本文提供的细胞中的任一种。

[0054] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如本文所提供的嵌合蛋白。

[0055] 在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述嵌合蛋白来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0056] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含如本文提供的细胞或细胞群。在一些方面,所述试剂盒还包含使用所述细胞来治疗 and/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0057] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如本文所提供的工程化核酸。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述核酸来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0058] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如本文所提供的载体。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述载体来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0059] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如本文所提供的组合物。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述组合物来治疗 and/或预防受试者的肿瘤的书面说明书。

### 附图说明

[0060] 本专利或申请文件含有至少一张彩制附图。含有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将在请求并支付必要的费用后由专利局提供。

[0061] 参考以下描述和附图将更好地理解本公开的这些和其他特征、方面和优点。

[0062] 图1显示了表达本公开的人源化抗EMCN CAR的T细胞对表达EMCN的靶细胞的杀伤活性。

[0063] 图2显示了用各种抗EMCN CAR转导的NK细胞的CAR表达。

[0064] 图3显示了用各种抗EMCN CAR转导的NK细胞对表达EMCN的靶细胞的杀伤活性。

### 具体实施方式

[0065] 除非另有说明,否则本公开的实践将利用本领域技术范围内的分子生物学、化学、生物化学、病毒学和免疫学的常规方法。在文献中充分地解释了此类技术。参见例如《丙型肝炎病毒:基因组和分子生物学(Hepatitis C Viruses:Genomes and Molecular Biology)》(S.L.Tan编辑,Taylor和Francis,2006);《基础病毒学(Fundamental Virology)》,第3版,第I和II卷(B.N.Fields和D.M.Knipe编辑);《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》,第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,Blackwell Scientific Publications);A.L.Lehninger,《生物化学(Biochemistry)》(Worth Publishers,Inc.,现行版);Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(第3版,2001);《酶学方法(Methods In Enzymology)》(S.Colowick和N.Kaplan编辑,Academic Press,Inc.)。

[0066] 定义

[0067] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语、标记和其他科学术语都旨在具有本领域技术人员通常所理解的含义。在一些情况下,本文出于清楚性和/或快速参考的目的而定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文包含此类定义未必应当被理解为表示与本领域通常所理解的有差异。本文描述或引用的技术和程序通常是本领域的技术人员充分理解以及使用常规方法而普遍采用的,例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》第4版(2012)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY中描述的广泛使用的分子克隆方法。适当时,除非另外指明,否则涉及使用市售试剂盒和试剂的程序通常根据制造商限定的方案和条件来进行。

[0068] 如本文所用,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包含复数指代物。除非另外明确指明,否则术语“包含(include)”、“诸如(such as)”等旨在传达包含但不限于。

[0069] 如本文所用,除非另外明确指明,否则术语“包括”还明确包含“由叙述的要素组成”和“基本上由叙述的要素组成”的实施方案。

[0070] 术语“约”表示并涵盖指定值和在该值上下的范围。在某些实施方案中,术语“约”表示指定值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。在某些实施方案中,在适用的情况下,术语“约”表示指定值 $\pm$ 该值的一个标准偏差。

[0071] 如本文所用,术语“刺激细胞介导的免疫反应”或“刺激免疫反应”是指产生由一种或多种细胞类型或细胞群引起的免疫反应的信号。免疫刺激性活性可以包含促炎性活性。在各种实施方案中,免疫反应发生在免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)活化之后,或者伴随地通过受体(包含但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS)及其对应的配体(包含B7-1、B7-2、OX-40L和4-1BBL)介导。此类多肽可以存在于肿瘤微环境中并且可以活化对肿瘤细胞的免疫反应。在多个实施方案中,促进、刺激或者激动促炎性多肽和/或它们的配体可以增强免疫反应性细胞的免疫反应。不受特定理论的束缚,接收多个刺激性信号(例如,共刺激)对于建立强效而长期的细胞介导的免疫反应(诸如T细胞介导的免疫反应)是重要的,就T细胞介导的免疫反应而言,在不存在共刺激性信号的情况下,T细胞可以受到抑制并且对抗原无反应(也称为“T细胞无反应性”)。虽然各种共刺激信号,尤其是相互组合的影响,可以有所不同,并且仍然只得到部分理解,但是共刺激通常引起基因表达增加,从而产生长期、增殖性和凋亡耐受性细胞,诸如T细胞或NK细胞,这些细胞对抗原产生强烈反应,例如在考虑表达同源抗原的靶细胞的完全和/或持续根除方面。

[0072] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或可替代地“CAR”是指包括至少细胞外抗原结合结构域、跨膜域和包括功能性信号传导域的胞质信号传导域(本文也被称为“细胞内信号传导域”)的重组多肽构建体。

[0073] 如本文所用,术语“活化性CAR”或“aCAR”是指能够在活化性的表达CAR的细胞中诱导信号转导或蛋白质表达的变化的CAR构建体/构造物,所述构建体/构造物在结合至同源aCAR配体时引发、活化、刺激或增加免疫反应。

[0074] 如本文所用,术语“抑制性CAR”或“iCAR”是指能够在抑制性CAR表达细胞中诱导信号转导或蛋白质表达变化的CAR构建体/结构,其在与同源iCAR配体结合时防止、减弱、抑制、减少、降低、抑制或阻止免疫反应,例如降低接收或已经接收一种或多种刺激信号(包含共刺激信号)的免疫反应性细胞的活化。

[0075] 如本文所用,术语“胞内信号传导结构域”是指通过在细胞内传递信息而发挥作用以经由确定的信号传导途径来调节细胞活性的蛋白质的功能部分,所述调节细胞活性通过产生第二信使或通过对此类信使产生反应而充当效应子来进行。

[0076] 如本文所用,术语“胞外抗原结合结构域”或“抗原结合结构域”(ABD)是指特异性识别或结合至给定抗原或表位的多肽序列或多肽复合物,诸如提供EMCN特异性结合的本文所述的嵌合蛋白的多肽序列或多肽复合物部分。ABD(或抗体、抗原结合片段和/或包含它们的嵌合蛋白)被称为“识别”ABD特异性结合的表位(或更一般而言,抗原),并且表位被称为是ABD的“识别特异性”或“结合特异性”。ABD据说以特定亲和力结合到其特异性抗原或表

位。如本文所述，“亲和力”是指一个分子与另一个分子之间的非共价分子间力的相互作用的强度。亲和力，即相互作用的强度，可以表示为解离平衡常数(KD)，其中KD值较小指分子间的相互作用越强。抗体构建体的KD值通过本领域熟知的方法来测量，所述方法包括但不限于生物层干涉测量法(例如，Octet/FORTEBIO®)、表面等离子共振(SPR)技术(例如，Biacore®)和细胞结合测定法(例如，流式细胞术)。如通过亲和力评估的特异性结合可以指在ABD与其同源抗原或表位之间具有亲和力的结合分子，其中KD<sup>值低于</sup> $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M。特异性结合还可以包含对感兴趣的生物分子(例如多肽)的识别和结合，同时不特异性地识别并结合样本(例如生物样本)中的其他分子，所述样本天然地包含本公开的多肽。在某些实施方案中，特异性结合是指ABD、抗体或抗原结合片段与表位或抗原或抗原决定簇之间的结合，其结合方式可以被相同或相似的表位、抗原或抗原决定簇的第二制剂取代或竞争。

[0077] ABD可以是抗体。如本文使用的术语“抗体”是指来源于与抗原特异性地结合的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆的或单克隆的、多链或单链、或者完整的免疫球蛋白，并且可以来源于天然来源或重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0078] ABD可以是抗体的抗原结合片段。如本文所用的，术语“抗原结合片段”是指完整抗体或其重组变体的至少一部分，其足以赋予抗原结合片段对靶(如抗原或表位)的识别和特异性结合。抗原结合片段的实例包含，但不限于，Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、线性抗体、单域抗体如sdAb(VL或VH)、骆驼VHH域，以及由抗原结合片段形成的多特异性抗体，如包括在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段，以及抗体的分离的CDR或其他表位结合片段。抗原结合片段还可以被并入到单域抗体、巨抗体、微抗体、纳米抗体、内抗体、双体、三体、四体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如Hollinger和Hudson,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》23:1126-1 136,2005)。抗原结合片段还可以被移植到基于诸如III型纤维连接蛋白(Fn3)等多肽的支架中(参见美国专利第6,703,199号,所述专利描述了纤维连接蛋白多肽微抗体)。

[0079] 结合分子(如本文所述的嵌合蛋白)中ABD的数量定义了结合分子的“化合价”。具有单一ABD的结合分子是“一价的”。具有多个ABD的结合分子被称为“多价的”。具有两个ABD的多价结合分子是“二价的”。具有三个ABD的多价结合分子是“三价的”。具有四个ABD的多价结合分子是“四价的”。在各种多价实施方案中，所有多个ABD具有相同的识别特异性，并且可以被称为“单特异性多价”结合分子。在其他多价实施方案中，多个ABD中的至少两个具有不同的识别特异性。此类结合分子是多价的和“多特异性的”。在其中ABD共同具有两种识别特异性的多价实施方案中，结合分子是“双特异性的”。在其中ABD共同具有三种识别特异性的多价实施方案中，结合分子是“三特异性的”。在其中ABD共同具有对于存在于相同抗原上的不同表位的多种识别特异性的多价实施方案中，结合分子是“多互补位的(multiparatopic)”。

其中ABD共同识别相同抗原上的两个表位的多价实施方案是“双互补位的(biparatopic)”。

[0080] 在各种多价实施方案中，结合分子的多价改善了结合分子对特定靶标的亲合力。如本文所述，“亲合力”是指两个或更多个分子(例如针对特定靶标的多价结合分子)之间的相互作用的总强度，其中亲合力是由多个ABD的亲和力提供的累积相互作用强度。亲合力可

以通过与用于确定亲和力的方法相同的方法来测量,如上文所述。在某些实施方案中,结合分子针对特定靶标的亲和力使得相互作用是特异性结合相互作用,其中两个分子之间的亲和力具有小于 $10^{-6}\text{M}$ 、 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$ 或 $10^{-10}\text{M}$ 的KD值。在某些实施方案中,结合分子针对特定靶标的亲和力具有的KD值使得相互作用是特异性结合相互作用,其中单独的ABD的一种或多种亲和力不具有符合它们各自的抗原或表位对他们自身的特异性结合的KD值。在某些实施方案中,亲和力是由多个ABD针对共有特定靶标或复合物上的单独的抗原(诸如单个细胞上存在的单独的抗原)的亲和力提供的累积相互作用强度。在某些实施方案中,亲和力是由多个ABD针对共有单个抗原上的单独的表位的亲和力提供的累积相互作用强度。

[0081] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是指包括至少一个包括轻链的可变区的抗原结合片段和至少一个包括重链的可变区的抗原结合片段的融合蛋白,其中轻链和重链可变区经由短的柔性多肽接头连续连接,能够表达为单链多肽,并且其中scFv保留了其来源的完整抗体的特异性。除非说明,否则如本文所用,scFv可以具有按任何顺序的VL和VH可变区,例如,就多肽的N末端和C末端而言,scFv可以包括VL-接头-VH或者可以包括VH-接头-VL。

[0082] 如本文所用,“可变区”是指源自重组事件的可变序列,例如在B细胞中免疫球蛋白基因或T细胞中T细胞受体(TCR)基因的V、J和/或D区段重组之后。在免疫球蛋白基因中,可变区通常由它们来源的抗体链定义,例如,VH是指抗体重链的可变区,并且VL是指抗体轻链的可变区。选择的VH和选择的VL可以缔合在一起以形成抗原结合结构域,所述抗原结合结构域赋予抗原特异性和结合亲和力。

[0083] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区VH和VL内赋予抗原特异性和结合亲和力的序列。例如,通常,每个重链可变区中有三个CDR(例如,HCDR1、HCDR2和HCDR3),每个轻链可变区中有三个CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。可以使用多种熟知的方案中的任一种来确定给定CDR的精确氨基酸序列边界,这些方案包含Kabat等人(1991)，“具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”第5版美国国立卫生研究院公共卫生服务中心(Public Health Service,National Institutes of Health)、Bethesda,MD(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)中所描述的方案或其组合。根据Kabat编号方案,在一些实施方案中,重链可变域(VH)中的CDR氨基酸残基被编号为31至35(HCDR1)、50至65(HCDR2)和95至102(HCDR3);而轻链可变域(VL)中的CDR氨基酸残基被编号为24至34(LCDR1)、50至56(LCDR2)和89至97(LCDR3)。根据Chothia编号方案,在一些实施方案中,VH中的CDR氨基酸被编号为26至32(HCDR1)、52至56(HCDR2)和95至102(HCDR3);而VL中的CDR氨基酸残基被编号为26至32(LCDR1)、50至52(LCDR2)和91至96(LCDR3)。在组合Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施方案中,CDR对应于作为Kabat CDR、Chothia CDR或其二者的一部分的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,CDR对应于VH(例如,哺乳动物VH,例如,人VH)中的氨基酸残基26至35(HCDR1)、50至65(HCDR2)和95至102(HCDR3);VL(例如,哺乳动物VL,例如,人VL)中的氨基酸残基24至34(LCDR1)、50至56(LCDR2)和89至97(LCDR3)。在多个实施方案中,CDR是哺乳动物序列,包含但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人序列。在优选的实施方案中,CDR是人类序列。在各种实施方案中,CDR是天然存在的序列。

[0084] 如本文所用的术语“构架区”或“FR”是指抗体可变区VH和VL内通常保守的序列,其

充当散布的CDR的支架,通常呈FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4排列(从N末端到C末端)。在各种实施方案中,FR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠序列、大鼠序列、仓鼠序列、兔序列、骆驼序列、猴序列、山羊序列和人类序列。在具体实施方案中,FR是人类序列。在各种实施方案中,FR是天然存在的序列。在各种实施方案中,FR是合成序列,包括但不限于合理设计的序列。

[0085] 如本文所用,术语“抗体重链”是指以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较大者,并且其通常决定抗体所属的类别。

[0086] 如本文所用,术语“抗体轻链”是指以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小者。Kappa ( $\kappa$ ) 和lambda ( $\lambda$ ) 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0087] 如本文所用,术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,例如,诸如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。所述术语还应当被视为意指通过合成编码抗体的DNA分子(并且所述DNA分子表达抗体蛋白)或规定抗体的氨基酸序列而产生的抗体,其中所述DNA或氨基酸序列使用本领域可利用且熟知的重组DNA或氨基酸序列技术来获得。

[0088] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”是指激起免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫胜任细胞的激活或两者。本领域技术人员应当理解,任何巨分子,包括几乎所有的蛋白质或肽,都可以用作抗原。

[0089] 如本文所用,术语“抗肿瘤作用”或“抗肿瘤活性”是指可以通过各种手段体现的生物学作用,包括但不限于例如肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数量的减少、转移数量的减少、预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活率的降低或与癌症症状相关的各种生理学症状的改善。“抗肿瘤作用”也可以通过本公开的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来证明,例如在预防性疗法或治疗中。

[0090] 如本文所用,术语“自体的”是指来自同一受试者的任何材料,所述材料随后将被重新引入到所述受试者中。

[0091] 如本文所用,术语“同种异体的”是指来自与引入所述材料的受试者相同物种的不同动物的任何材料。当在一个或多个基因座处的基因不不同时,两个或更多个受试者被认为是彼此同种异体的。在一些实施方案中,来自相同物种的个体的同种异体材料可以在遗传上足够不同,例如在特定的基因如MHC等位基因上足够不同,以在抗原性上相互作用。在一些实施方案中,来自相同物种的个体的同种异体材料可能在遗传上足够相似,例如在特定基因如MHC等位基因上足够相似,从而不会发生抗原性相互作用。

[0092] 本公开的分离的核酸分子包括编码本公开的多肽的任何核酸分子或其片段。此类核酸分子无需与内源核酸序列100%同源或相同,但典型地将表现出基本同一性。与内源序列具有“基本同一性”或“基本同源性”的核酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。如本文所用,“杂交”是指在各种严格条件下配对以在互补多核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间形成双链分子。例如,严格盐浓度可以低于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠、低于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠、或低于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可以在不存在有机溶剂(例如,甲酰胺)的情况下获得,而高严格性杂交可以在存在至少约35%甲酰胺或至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格温度条件通常将包含至少约30°C、至少约37°C或至少约42°C的温度。不同的其他参数,诸如杂交时间、洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度以及运载体DNA的包括或排除,是本领域的技术人员熟知的。

不同水平的严格性可以通过根据需要组合这些不同的条件来实现。

[0093] “基本上同一”或“基本上同源”意指多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如本文所述的氨基酸序列中的任一种)或核酸序列(例如本文所述的核酸序列中的任一种)至少约50%同源或相同。优选地,这种序列在氨基酸水平或核酸上与用于比较的序列至少约60%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%同源或同一。序列同一性通常使用序列分析软件(例如威斯康辛大学生物技术中心(1710University Avenue, Madison, Wis. 53705) Genetics Computer Group的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)进行测量。此类软件通过对各种取代、缺失和/或其他修饰指定同源性程度来匹配相同或类似的序列。保守取代通常包含以下各组内的取代: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;以及苯丙氨酸、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,其中概率评分在 $e^{-3}$ 和 $e^{-100}$ 之间表明密切相关的序列。

[0094] 如本文所用,术语“编码”是指用于在生物学过程中充当用于合成其他聚合物和大分子的模板且具有确定的核苷酸序列(例如rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列的多核苷酸,诸如基因、cDNA或mRNA中具体核苷酸序列的固有性质,以及由此产生的生物学性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则所述基因、cDNA或RNA编码所述蛋白质。核苷酸序列与mRNA序列同一且通常提供在序列列表中的编码链和用作用于基因或cDNA的转录的模板的非编码链两者可以被称为编码蛋白质或者所述基因或cDNA的其他产物。除非另外规定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此是简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度是编码蛋白质的核苷酸序列可以在某种形式中含有内含子。

[0095] 如本文所用,术语“配体”是指结合至受体的分子。特别地,配体结合另一个细胞上的受体,允许细胞-细胞识别和/或相互作用。

[0096] 术语“有效量”和“治疗有效量”在本文可互换使用,并且是指如本文所述的对实现特定生物学结果有效的化合物、制剂、材料或组合物的量。在一些实施方案中,“有效量”或“治疗有效量”是足以停滞、改善或抑制目标疾病或病症(例如髓样病症)继续增殖、生长或转移的量。

[0097] 如本文所用,术语“免疫应答细胞”是指在免疫应答(例如免疫效应子应答)中发挥功能的细胞或祖细胞或其子代。免疫效应细胞的实例包含但不限于 $\alpha/\beta$ T细胞、 $\gamma/\delta$ T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和髓源性吞噬细胞。

[0098] 如本文所用,术语“免疫效应反应”或“免疫效应功能”是指例如增强或促进靶细胞的免疫攻击的免疫反应性细胞的功能或反应。例如,免疫效应功能或反应可以指T细胞或NK细胞的促进杀伤靶细胞或者抑制其生长或增殖的性质。在T细胞的情况下,初级刺激和共刺激是免疫效应功能或反应的实例。

[0099] 如本文所用,术语“柔性多肽接头”或“接头”是指由单独或组合使用的诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基的氨基酸组成,用于将可变重链和可变轻链区域连接在一起的肽接头。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包括氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$ 或(Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$ ,其中 $n$ 是等于或大于1的正整数。例如, $n=1$ 、 $n=2$ 、 $n=3$ 、 $n=4$ 、 $n=5$ 、 $n=6$ 、 $n=7$ 、 $n=8$ 、 $n=9$ 或 $n=10$ 。在一些实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于

Gly4Ser或(Gly4Ser)<sub>3</sub>。在其他实施方案中,接头包括多个(Gly2Ser)、(GlySer)或(Gly3Ser)的重复单元。在一些实施方案中,柔性多肽接头包括Whitlow接头(例如,GSTSGSGKPGSGEGSTKG[SEQ ID NO:36])。在本公开的范围内还包含例如WO2012/138475中所述的接头。

[0100] 如本文所用,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指由一种或多种疗法(例如,本公开的一种或多种治疗剂诸如CAR)的施用引起的增殖性疾病(例如,癌症)的进展、严重性和/或持续时间的减少或改善,或者增殖性病征的一种或多种症状(优选地,一种或多种可辨别的症状)的改善。在一些实施方案中,减少或改善是指增殖性病征的至少一种可测量的物理参数的改善,所述增殖性病征例如肿瘤的生长,其不一定被患者察觉。在其他实施方案中,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指以物理方式(通过例如稳定可辨别的症状)、以生理方式(通过例如稳定物理参数)或两者抑制增殖性病征的进展。在一些实施方案中,减少或改善包含肿瘤大小或癌细胞计数的减少或稳定。

[0101] 如本文所用,术语“受试者”旨在包含这样的活生物体(例如,哺乳动物、人),其中可以在所述活生物体中引发免疫反应。

[0102] 本公开的其他方面在以下部分中有所描述并且在要求保护的本发明的范围内。

[0103] 其他解释惯例

[0104] 本文叙述的范围应当理解为对所述范围内的所有值(包含所述终点在内)的简化。例如,1至50的范围应被理解为包括来自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的任何数字、数字的组合或子范围。

[0105] 除非另外指明,否则提到具有一个或多个立体中心的化合物意指其每一种立体异构体和立体异构体的所有组合。

[0106] 内皮粘蛋白特异性抗原结合结构域

[0107] 本公开提供了结合至内皮粘蛋白(EMCN)的抗原结合结构域(例如,单链可变片段)、包含结合至EMCN的抗原结合结构域的嵌合蛋白以及编码此类抗原结合结构域和嵌合蛋白的核酸。不希望受理论的束缚,EMCN是唾液酸糖蛋白,它干扰粘着斑复合物的组装并且抑制细胞与胞外基质之间的相互作用。EMCN特异性抗原结合结构域结合至人EMCN(例如,Uniprot Q9ULC0,该序列以引用的方式并入本文用于所有目的)或其表位片段。EMCN可以在造血干细胞和祖细胞(HSPC)上表达。EMCN可以在通常被认为是健康的细胞(诸如健康的HSPC)上表达。EMCN特异性抗体此前已有所描述,所述抗体包括CBFYE-0213、V.7.C7.1、L4B1、L5F12、L10B5、L3F12、L6H3、L6H10(在本文中也称为Ab1)、L9H8和L10F12,如J.Path., 2002年5月,160(5):1669-1681中所述,该文献以引用的方式并入本文用于所有目的。

[0108] 本公开提供了一种EMCN特异性抗原结合结构域,所述结构域包含表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者。

[0109] 表1. EMCN特异性抗原结合结构域

[0110]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
RYDMH	1	Kabat 注释的 CDR 的 CDR-H1
GFTFSRY	2	Chothia 注释的 CDR 的 CDR-H1 形式 1
GFTLSRY	3	Chothia 注释的 CDR 的 CDR-H1 形式 2
GFSFSRY	4	Chothia 注释的 CDR 的 CDR-H1 形式 3
GFSLRY	5	Chothia 注释的 CDR 的 CDR-H1 形式 4
VIWGNGNTHYHSALKS	6	Kabat 注释的 CDR 的 CDR-H2
WGNGN	7	Chothia 注释的 CDR 的 CDR-H2
RIKD	8	CDR-H3 (Kabat 和 Chothia 注释的 CDR)
KSSQSLVASDENTYLN	9	CDR-L1 (Kabat 和 Chothia 注释的 CDR)
QVSKLDS	10	CDR-L2 (Kabat 和 Chothia 注释的 CDR)
LQGIHLPWT	11	CDR-L3 (Kabat 和 Chothia 注释的 CDR)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKGLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	12	VH 3-23 形式 1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTLSRYDMHWVRQAPGKGLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	13	VH 3-23 形式 2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSRYDMHWVRQAPGKGLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	14	VH 3-23 形式 3
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLRYDMHWVRQAPGKGLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	15	VH 3-23 形式 4
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	16	VH 3-33 形式 1
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAAS GFTLSRYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	17	VH 3-33 形式 2

[0111]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAAS GFSFSRYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	18	VH 3-33 形式 3
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAAS GFSLRYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLRIKDWGQGMVTVSS	19	VH 3-33 形式 4
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVASDENTYLNWFQQRPGQSPRRLLYQVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIK	20	VL 2-30

[0112] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在选自由SEQ ID NO:12-20组成的组的VH区氨基酸序列内。在一些实施方案中,VH区具有选自由SEQ ID NO:12-15组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH区具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH区具有选自由SEQ ID NO:16-19组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH区具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中VH包含具有选自由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。在一些实施方案中,具有上述VH序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:20的所述VL区氨基酸序列内。在一些实施方案中,具有上述VH序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-L3)。

[0113] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:20的所述VL区氨基酸序列内。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在选自由SEQ ID NO:12-20组成的组的VH区氨基酸序列内。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有WGNGN SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有WGNGN SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有具有SEQ ID NO:5的氨基酸序

列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有WGNGN SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。

[0114] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0115] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有可变重链(VH)区和可变轻链(VL)区,所述可变重链区含有具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH互补区1(CDRH1)、具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH互补区2(CDRH2)和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3(CDRH3);所述可变轻链区含有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区L(CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2(CDRL2)和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3(CDRL3),并且所述抗原结合结构域是人源化的。

[0116] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH区。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VH区。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL区。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0119] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,以及(2) VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,以及(2) VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0120] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以及(2) VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,以及(2) VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0121] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,以及(2) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列;以及(2) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0122] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1) VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,以及(2) VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含与SEQ ID

N0:20的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列;以及(2)VH区,所述VH区包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID N0:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0123] EMCN特异性抗原结合结构域可以具有本文所述的形式中的任一者,诸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、线性抗体、单结构域抗体(诸如sdAb(VL或VH))、骆驼科动物VHH和多特异性形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有F(ab)形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有F(ab')形式。

[0124] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有单链可变片段(scFv)形式,包含具有本文所述的肽接头(例如,参见表2)中的任一者的scFv形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中L是肽接头。

[0125] 在一些实施方案中,scFV具有选自SEQ ID N0:68、70、72和74的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域是人源化的。

[0127] 本公开还提供了一种EMCN特异性抗原结合结构域,所述EMCN特异性抗原结合结构域与具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的参考抗体或其抗原结合片段竞争,其中:(1)VH包含具有选自由SEQ ID N0:2-5组成的组的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID N0:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID N0:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID N0:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID N0:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID N0:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0128] 本公开还提供了一种EMCN特异性抗原结合结构域,所述EMCN特异性抗原结合结构域与具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的参考抗体或其抗原结合片段竞争,其中:(1)VH包含具有选自由SEQ ID N0:2-5组成的组的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID N0:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID N0:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID N0:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID N0:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID N0:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0129] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有选自由SEQ ID N0:2-5组成的组的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID N0:7的氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2)和具有SEQ ID N0:8的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3),并且(2)VL包含具有SEQ ID N0:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1)、具有SEQ ID N0:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和具有SEQ ID N0:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)VH包含具有选自由SEQ ID N0:2-5组成的组的氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1)、具有SEQ ID N0:7的氨基酸序

列的重链互补决定区2 (CDR-H2) 和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链互补决定区3 (CDR-H3), 并且(2)VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3)。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有VH,所述VL包含选自由SEQ ID NO:12-19组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有VL,所述VL包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0130] 本公开还提供了嵌合蛋白和编码此类嵌合蛋白的核酸,所述嵌合蛋白包含具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域。嵌合蛋白可以包含如上文所述的EMCN特异性抗原结合结构域中的任一者。

[0131] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0132] 本公开的某些方面涉及嵌合受体,所述嵌合受体具有本文所述的EMCN特异性抗原结合结构域中的任一者并且能够特异性结合至EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位。在一些实施方案中,嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR)。一般来说,CAR是嵌合蛋白,包括抗原结合结构域以及与抗原结合结构域异源的多肽分子(诸如与抗原结合结构域可以来源的抗体异源的肽)。与抗原结合结构域异源的多肽分子可以包括但不限于跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头或它们的组合。

[0133] 在一些实施方案中,CAR是将所关注的特异性(例如,EMCN)接枝到或赋予免疫效应细胞的工程化受体。在某些实施方案中,CAR可以用于将抗体的特异性接枝到免疫反应性细胞(诸如T细胞)。在一些实施方案中,本公开的CAR包括与跨膜域融合、与一个或多个胞内信号传导域融合的细胞外抗原结合结构域(例如scFv)。

[0134] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体是活化性嵌合抗原受体 (aCAR,并且除非另外规定,否则通常也称为CAR)。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体与其同源配体的结合足以诱导免疫反应性细胞的活化。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体与其同源配体的结合足以诱导免疫反应性细胞刺激。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化导致靶细胞的杀伤。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化导致通过免疫反应性细胞的细胞因子或趋化因子表达和/或分泌。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的刺激导致通过免疫反应性细胞的细胞因子或趋化因子表达和/或分泌。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的刺激诱导免疫反应性细胞的分化。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的刺激诱导免疫反应性细胞的增殖。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化和/或刺激可以是上述反应的组合。

[0135] 本公开的CAR可以是第一代、第二代或第三代CAR。“第一代”CAR包括通常源自T细胞受体链的单个胞内信号传导域。“第一代”CAR通常具有来自CD3- $\zeta$  (CD3 $\zeta$ ) 链的胞内信号传导域,其是来自内源TCR的信号的主要递质。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别并且使CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞通过它们的单个融合分子中的CD3- $\zeta$ 链信号传导结构域活化,而与HLA介导的抗原呈递无关。“第二代”CAR将来自多种共刺激分子之一(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的第二胞内信号传导域添加至CAR的胞质尾部,以便向T细胞提供另外的信号。“第二代”CAR提供共刺激(例如,CD28或4-1BB)和活化(CD3- $\zeta$ )。临床前研究已经表明“第

二代”CAR可以改善免疫反应性细胞(诸如T细胞)的抗肿瘤活性。“第三代”CAR具有多个胞内共刺激信号传导结构域(例如,CD28和4-1BB)和胞内活化信号传导结构域(CD3- $\zeta$ )。

[0136] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体是嵌合抑制性受体(iCAR)。在一些实施方案中,所述一个或多个嵌合抑制性受体结合在非肿瘤细胞上表达的抗原,所述非肿瘤细胞来源于选自以下组成的组的组织:脑、神经元组织、内分泌、骨、骨髓、免疫系统、内皮组织、肌肉、肺、肝脏、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、男性生殖器官、女性生殖器官、脂肪、软组织和皮肤。

[0137] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体(例如,EMCN特异性嵌合抑制性受体)可以例如与在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)上表达的一种或多种活化性嵌合受体(例如,活化性嵌合TCR或CAR)一起用作非逻辑门,该非逻辑门控制、调节或者抑制一种或多种活化性嵌合受体的一种或多种活性。例如,如果健康细胞表达被肿瘤靶向性嵌合受体识别的抗原和被嵌合抑制性受体识别的抗原二者,则表达肿瘤抗原的免疫反应性细胞可以结合至健康细胞。在这种情况下,抑制性嵌合抗原还将结合健康细胞上的同源配体,并且嵌合抑制性受体的抑制功能将通过肿瘤靶向性嵌合受体来降低、减少、预防或抑制免疫反应性细胞的活化(“非逻辑门控”)。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体可以抑制本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一种或多种活性。在一些实施方案中,免疫反应性细胞可以包含一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体以及一种或多种靶向在肿瘤上未表达或通常被认为表达的抗原(例如,EMCN)的嵌合抑制性受体。同一免疫反应性细胞中的肿瘤靶向性嵌合受体和嵌合抑制性受体的组合可以用于降低中靶非肿瘤毒性。

[0138] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞外抗原结合结构域以约 $2 \times 10^{-7}$ M或更小、约 $1 \times 10^{-7}$ M或更小、约 $9 \times 10^{-8}$ M或更小、约 $1 \times 10^{-8}$ M或更小、约 $9 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $5 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $4 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $3 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $2 \times 10^{-9}$ M或更小或者约 $1 \times 10^{-9}$ M或更小的解离常数( $K_d$ )结合至一种或多种抗原(例如,EMCN)。在一些实施方案中, $K_d$ 的范围是从约 $2 \times 10^{-7}$ M至约 $1 \times 10^{-9}$ M。

[0139] 本公开的CAR的胞外抗原结合结构域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、生物测定法(例如,生长抑制)、生物层干涉测量法(例如,Octet/FORTEBIO®)、表面等离子体共振(SPR)技术(例如,Biacore®)或蛋白质印迹测定法来测定。这些测定法各自通常通过采用对相关复合物具有特异性的标记试剂(例如,抗体或scFv)来检测所特别关注的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以经放射性被标记并且用于RIA测定中。可以通过诸如使用 $\gamma$ 计数器或闪烁计数器等手段或通过自动放射摄影术来检测放射性同位素。在某些实施方案中,CAR的细胞外抗原结合结构域经过荧光标志物标记。荧光标记物的非限制性实例包含绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite和mKalama1)、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)。在某些实施方案中,CAR的细胞外抗原结合结构域用对细胞外抗原结合结构域具有特异性的二抗来标记,并且其中所述二抗是被标记的(例如,放射性标记或用荧光标记物来标记)。

[0140] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含结合至EMCN(例如,EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位)的胞外抗原结合结构域、跨膜结构域以及一种或多种胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域包括scFv。在一些实施方案中,所述细胞外

抗原结合结构域包括可能交联的Fab片段。在某些实施方案中,所述细胞外结合域是F(ab)<sub>2</sub>片段。

[0141] 胞外抗原结合结构域

[0142] 本公开的CAR的胞外抗原结合结构域特异性结合至EMCN(例如,EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位)。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域结合至在造血干细胞上表达的EMCN。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域结合至在通常被认为是健康的细胞(诸如健康的HSCP)上表达的EMCN。在一些实施方案中,EMCN是人EMCN。

[0143] 本公开的抗原结合结构域可以包含结合至抗原的任何结构域,所述结构域包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、双特异性抗体、缀合抗体、人抗体、人源化抗体以及它们的功能片段,所述功能片段包括但不限于单结构域抗体(sdAb)(诸如,骆驼科动物源性纳米抗体的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH)),以及本领域已知的充当抗原结合结构域的替代性支架(诸如重组纤连蛋白结构域、T细胞受体(TCR)、具有增强的亲和力的重组TCR或者它们的片段,例如,单链TCR),等等。在一些情况下,抗原结合结构域来源于最终使用CAR的同一物种是有利的。

[0144] 在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域包括抗体。在某些实施方案中,抗体是人类抗体。在某些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述细胞外抗原结合结构域包括抗体的抗原结合片段。

[0145] 在一些实施方案中,所述细胞外抗原结合结构域包括F(ab)片段。在某些实施方案中,所述细胞外抗原结合结构域包括F(ab')片段。

[0146] 在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域包括scFv。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域包括两个单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,两个scFv中的每一个结合至同一抗原上的不同表位。在一些实施方案中,所述细胞外抗原结合结构域包括第一scFv和第二scFv。在一些实施方案中,第一scFv和第二scFv结合同一抗原上的不同表位。在某些实施方案中,scFv是哺乳动物scFv。在某些实施方案中,scFv是嵌合scFv。在某些实施方案中,所述scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

[0147] 在某些实施方案中,所述VH和所述VL由肽接头隔开。在某些实施方案中,肽接头包含表2中所示的氨基酸序列中的任一者。在某些实施方案中,scFv包括结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变域,L是肽接头,并且VL是轻链可变域。在一些实施方案中,一个或多个scFv各自包括结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变域,L是肽接头,并且VL是轻链可变域。当有两个或更多个scFv连接在一起时,每个scFv可以通过肽连接连接至下一个scFv。在一些实施方案中,一个或多个scFv各自由肽接头分开。

[0148] 表2. 肽接头

	接头	氨基酸序列	SEQ ID NO:	
[0149]	(G <sub>2</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头	GGG	21	
	(G <sub>2</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头	GGSGGS	22	
	(G <sub>2</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头	GGSGGSGGS	23	
	(G <sub>2</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头	GGSGGSGGSGGS	24	
	(G <sub>2</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头	GGSGGSGGSGGSGGS	25	
	(G <sub>3</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头	GGGS	26	
	(G <sub>3</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头	GGGSGGGS	27	
	(G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头	GGGSGGGS GGGS	28	
	(G <sub>3</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头	GGGSGGGS GGGS GGGS	29	
	(G <sub>3</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头	GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS	30	
	(G <sub>4</sub> S) <sub>1</sub> 接头	GGGS	31	
[0150]		(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> 接头	GGGSGGGS	32
		(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> 接头	GGGSGGGS GGGS	33
		(G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub> 接头	GGGSGGGS GGGS GGGS	34
		(G <sub>4</sub> S) <sub>5</sub> 接头	GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS	35
		Whitlow 接头	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	36
		scFv 接头 2	EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	37

[0151] 在一些实施方案中,免疫效应细胞包含第一嵌合受体和第二嵌合受体。第一嵌合受体的抗原结合结构域和第二嵌合受体的抗原结合结构域可以是本文所述的或本领域已知的适当的抗原结合结构域。例如,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域可以是一个或多个抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,第一嵌合受体和/或第二嵌合受体的抗原结合结构域包括两个单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,两个scFv中的每一个结合至同一抗原上的不同表位。在一些实施方案中,第一嵌合受体的抗原结合结构域可以对EMCN具有特异性,并且嵌合受体可以对第二不同抗原(诸如癌症抗原(例如,在骨髓细胞(诸如AML细胞)上表达的抗原))具有特异性。

[0152] 在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包含单结构域抗体(sdAb)。在某些实施方案中,sdAb是人源化sdAb。在某些实施方案中,sdAb是嵌合sdAb。

[0153] 在一些实施方案中,本公开的CAR可以包括两个或更多个抗原结合结构域、三个或更多个抗原结合结构域、四个或更多个抗原结合结构域、五个或更多个抗原结合结构域、六个或更多个抗原结合结构域、七个或更多个抗原结合结构域、八个或更多个抗原结合结构域、九个或更多个抗原结合结构域、或者十个或更多个抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述两个或更多个抗原结合结构域各自结合相同抗原。在一些实施方案中,所述两个或更多个抗原结合结构域各自结合相同抗原的不同表位。在一些实施方案中,所述两个或更多个抗原结合结构域各自结合不同抗原。

[0154] 在一些实施方案中,CAR包括两个抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述两个抗原结合结构域经由柔性接头彼此连接。在一些实施方案中,所述两个抗原结合结构域各自可以独立地选自抗体、抗体的抗原结合片段、scFv、sdAb、重组纤维连接蛋白域、T细胞受体(TCR)、具有增高的亲和力的重组TCR和单链TCR。在一些实施方案中,包括两个抗原结合结构域的结构域是双特异性CAR或串联CAR(tanCAR)。

[0155] 在某些实施方案中,所述双特异性CAR或tanCAR包括有包括双特异性抗体或抗体

片段(例如,scFv)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,在双特异性抗体分子的每个抗体或抗体片段(例如scFv)内,VH可以在VL的上游或下游。在一些实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VH(VH<sub>1</sub>)布置在一起,其VH在其VL(VL<sub>1</sub>)上游,并且下游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VL(VL<sub>2</sub>)布置在一起,其VL在其VH(VH<sub>2</sub>)上游,以使得整个双特异性抗体分子具有布置方式VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>。在其他实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VL(VL<sub>1</sub>)布置在一起,其VL在其VH(VH<sub>1</sub>)上游,并且下游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VH(VH<sub>2</sub>)布置在一起,其VH在其VL(VL<sub>2</sub>)上游,以使得整个双特异性抗体分子具有布置方式VL<sub>1</sub>-VH<sub>1</sub>-VH<sub>2</sub>-VL<sub>2</sub>。在一些实施方案中,如果构建体被布置为VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>,则接头被设置在两个抗体或抗体片段(例如,scFv)之间,例如,在VL<sub>1</sub>和VL<sub>2</sub>之间,或者如果构建体被布置为VL<sub>1</sub>-VH<sub>1</sub>-VH<sub>2</sub>-VL<sub>2</sub>,则接头被设置在VH<sub>1</sub>和VH<sub>2</sub>之间。接头可以是如本文所述的接头,例如,(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n为1、2、3、4、5或6。一般来说,在两个scFv之间的接头的长度应足以避免在所述两个scFv的域之间的错配。在一些实施方案中,接头被布置在第一scFv的VL与VH之间。在一些实施方案中,接头被布置在第二scFv的VL与VH之间。在具有多个接头的构建体中,所述接头中的任何两个或更多个可以相同或不同。因此,在一些实施方案中,双特异性CAR或tanCAR包含VL、VH,并且可以进一步包含具有如本文所述的布置方式的一个或多个接头。

[0156] 在一些实施方案中,嵌合受体包含二价CAR。在一些实施方案中,二价CAR是EMCN二价CAR。在一些实施方案中,二价EMCN CAR包含表1中所示的抗EMCN序列中的一者或多者。在一些实施方案中,二价EMCN CAR的ABD各自包含同一ABD。

[0157] 在一些实施方案中,嵌合受体包含双顺反子嵌合抗原受体。在一些实施方案中,双顺反子嵌合抗原受体包含EMCN CAR。在一些实施方案中,双顺反子EMCN CAR包含表1中所示的抗EMCN序列中的一者或多者。

[0158] 跨膜域

[0159] 在一些实施方案中,本公开的CAR的跨膜结构域(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)包含疏水性 $\alpha$ 螺旋,该 $\alpha$ 螺旋跨越细胞膜的至少一部分。已经证明了不同的跨膜域可以产生不同的受体稳定性。在抗原识别后,受体聚集并且将信号传输至细胞。在一些实施方案中,本公开的CAR的跨膜域可以包括CD8多肽、CD28多肽、CD3- $\zeta$ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽、LIR-1(LILRB1)多肽的跨膜域,或者可以是合成肽或其任何组合。

[0160] 在一些实施方案中,跨膜域来源于CD8多肽。可以使用任何合适的CD8多肽。示例性的CD8多肽包括但不限于NCBI参考编号NP\_001139345和AAA92533.1。在一些实施方案中,所述跨膜结构域来源于CD28多肽。可以使用任何合适的CD28多肽。示例性的CD28多肽包括但不限于NCBI参考编号NP\_006130.1和NP\_031668.3。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于CD3- $\zeta$ 多肽。可以使用任何合适的CD3- $\zeta$ 多肽。示例性的CD3- $\zeta$ 多肽包括但不限于NCBI参考编号NP\_932170.1和NP\_001106862.1。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于CD4多肽。可以使用任何合适的CD4多肽。示例性的CD4多肽包括但不限于NCBI参考编号NP\_000607.1和NP\_038516.1。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于4-1BB多肽。可以使用任何合适的4-1BB多肽。示例性的4-1BB多肽包括但不限于NCBI参考编号NP\_001552.2和NP\_001070977.1。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于OX40多肽。可以使用任何合适的OX40多肽。示例性的OX40

多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_003318.1和NP\_035789.1。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于ICOS多肽。可以使用任何合适的ICOS多肽。示例性的ICOS多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_036224和NP\_059508。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于CTLA-4多肽。可以使用任何合适的CTLA-4多肽。示例性的CTLA-4多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_005205.2和NP\_033973.2。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于PD-1多肽。可以使用任何合适的PD-1多肽。示例性的PD-1多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_005009和NP\_032824。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于LAG-3多肽。可以使用任何合适的LAG-3多肽。示例性的LAG-3多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_002277.4和NP\_032505.1。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于2B4多肽。可以使用任何合适的2B4多肽。示例性的2B4多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_057466.1和NP\_061199.2。在一些实施方案中,所述跨膜域来源于BTLA多肽。可以使用任何合适的BTLA多肽。示例性的BTLA多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_861445.4和NP\_001032808.2。可以使用任何合适的LIR-1 (LILRB1) 多肽。示例性的LIR-1 (LILRB1) 多肽包含但不限于NCBI参考编号NP\_001075106.2和NP\_001075107.2。

[0161] 在一些实施方案中,所述跨膜域包含包括与NCBI参考编号NP\_001139345、AAA92533.1、NP\_006130.1、NP\_031668.3、NP\_932170.1、NP\_001106862.1、NP\_000607.1、NP\_038516.1、NP\_001552.2、NP\_001070977.1、NP\_003318.1、NP\_035789.1、NP\_036224、NP\_059508、NP\_005205.2、NP\_033973.2、NP\_005009、NP\_032824、NP\_002277.4、NP\_032505.1、NP\_057466.1、NP\_061199.2、NP\_861445.4或NP\_001032808.2的序列或其片段至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同源的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,同源性可以使用标准软件如BLAST或FASTA来确定。在一些实施方案中,多肽可以包括一个保守氨基酸取代、多达两个保守氨基酸取代或多达三个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,多肽可以具有作为NCBI参考编号NP\_001139345、AAA92533.1、NP\_006130.1、NP\_031668.3、NP\_932170.1、NP\_001106862.1、NP\_000607.1、NP\_038516.1、NP\_001552.2、NP\_001070977.1、NP\_003318.1、NP\_035789.1、NP\_036224、NP\_059508、NP\_005205.2、NP\_033973.2、NP\_005009、NP\_032824、NP\_002277.4、NP\_032505.1、NP\_057466.1、NP\_061199.2、NP\_861445.4或NP\_001032808.2的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少110、至少120、至少130、至少140、至少150、至少160、至少170、至少180、至少190、至少200、至少210、至少220、至少230或至少240个氨基酸。

[0162] 可以衍生出跨膜结构域的合适的多肽的其他实例包括但不限于T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链的跨膜区、CD27、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R $\beta$ 、IL2R  $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D和NG2C。

[0163] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO:

38)。在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR (SEQ ID NO: 39)。在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 40)。

[0164] 间隔区

[0165] 在一些实施方案中,本公开的CAR (例如,本文所述的EMCN特异性CAR) 可以另外包含间隔区,该间隔区将胞外抗原结合结构域连接至跨膜结构域。间隔区的柔性可能足以允许所述抗原结合结构域定向在不同的方向上以促进抗原识别。在一些实施方案中,间隔区可以是来自人蛋白质的铰链。例如,铰链可以是人Ig (免疫球蛋白) 铰链,包括但不限于IgG4铰链、IgG2铰链、CD8a铰链或IgD铰链。在一些实施方案中,间隔区可以包括IgG4铰链、IgG2铰链、IgD铰链、CD28铰链、KIR2DS2铰链、LNGFR铰链或PDGFR-β细胞外接头。在一些实施方案中,间隔区定位于抗原结合结构域和跨膜域之间。在一些实施方案中,间隔区可以包含表3中列出的氨基酸序列中的任一者,或者与表3中列出的氨基酸序列中的任一者至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本公开的间隔区中的任一者的核酸可以包含表4中列出的核酸序列中的任一者,或者与表4中列出的核酸序列中的任一者至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的核酸序列。

[0166] 表3. 间隔氨基酸序列

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KP	41	CD28 铰链
ESKYGPPCSPC	42	IgG4 最小铰链
ESKYGPPAPSAP	43	IgG4 最小铰链, 无二硫键
ESKYGPPCPPC	44	IgG4 S228P 最小铰链, 增强的二硫键形成
EPKSCDKTHTCP	45	IgG1 最小铰链
AAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCNHRN	46	延伸的 CD8a 铰链
ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCL DSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAV CRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQN TVCEECPDGTYSDEADAEC	47	LNGFR 铰链
ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV	48	截短的 LNGFR 铰链(TNFR-Cys1)
AVGQDTQEIVVPHSLPFKV	49	PDGFR-β 细胞外接头
TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD	50	示例性间隔
ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	51	示例性间隔
FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACD	52	示例性间隔

[0167] 表4. 间隔核酸序列

[0168]

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GCAGCAGCTATCGAGGTGATGTATCCTCCGCCCTACC TGGATAATGAAAAGAGTAATGGGACTATCATTATGT AAAAGGGAAGCATCTTTGTCCTTCTCCCTTTTCCCCG GTCCGTCTAAACCT	53	CD28 铰链
GAAAGCAAGTACGGTCCACCTTGCCCTAGCTGTCCG	54	IgG4 最小铰链
GAATCCAAGTACGGCCCCCAGCGCCTAGTGCCCCA	55	IgG4 最小铰链, 无二硫键
GAATCTAAATATGGCCCGCCATGCCCGCCTTGCCCCA	56	IgG4 S228P 最小铰链, 增强的二硫键形成
GAACCGAAGTCTTGTGATAAAAACCTCATACGTGCCCG	57	IgG1 最小铰链
GCTGCTGCTTTCGTACCCGTGTTCCCTCCCTGCTAAGCC TACGACTACCCCGCACCAGACCACCCACGCCAGC ACCCACGATTGCTAGCCAGCCCCTTAGTTTGCGACCA GAAGCTTGTGGCCTGCTGCTGGTGGCGCGGTACATA CCCGCGCCTTGATTTTGTGCTTGGGATATATATATCTGG GCGCCTGTGGCCGGAACATGCGGGGTCTCTCCTTT CTCTGGTTATTACTCTACTGTAATCACAGGAAT	58	延伸的 CD8a 铰链
GCCTGCCCGACCGGGCTCTACACTCATAGCGGGGAAT GTTGTAAGGCATGTAACCTGGGTGAGGGCGTCGCACA GCCCTGCGGAGCTAACCAACAGTGTGCGAACCCCTG CCTCGATAGTGTGACGTTCTCTGATGTTGTATCAGCTA CAGAGCCTTGCAAACCATGTACTGAGTGCCTGGACT TCAGTCAATGAGCGCTCCATGTGTGGAGGCAGATGAT GCGGTCTGTGATGTGCTTACGGATACTACCAAGACG AGACAACAGGGCGGTGCGAGGCCTGTAGAGTTTGTG AGGCGGGCTCCGGGCTGGTGTTCATGTCAAGACAA GCAAAATACGGTCTGTGAAGAGTGCCCTGATGGCACC TACTCAGACGAAGCAGATGCAGAATGC	59	LNGFR 铰链
GCCTGCCCTACAGGACTCTACACGCATAGCGGTGAGT GTTGTAAAGCATGCAACCTCGGGGAAGGTGTAGCCC AGCCATGCGGGGCTAACCAACCGTTTGC	60	截短的 LNGFR 铰链(TNFR-Cys1)
GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTG CCACACTCCTTGCCCTTAAGGTG	61	PDGFR-β 细胞外接头

[0171] 在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:41中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:42中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:43中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:44中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:45中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:46中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:47中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:48中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:49中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:50中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:51中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔区包括SEQ ID NO:52中所示的序列。

[0172] 在一些实施方案中,本公开的CAR可以更包含短寡肽或多肽接头,其长度在2个氨基酸残基和10个氨基酸残基之间,并且可以在CAR的跨膜域和胞质区之间形成键联。合适的接头的非限制性实例是甘氨酸-丝氨酸双联体。在一些实施方案中,所述接头包括GGCKJSGGCKJS(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列。

[0173] 在一些方面,跨膜结构域还包含相同蛋白质的胞外结构域的至少一部分。

[0174] 细胞内信号传导域

[0175] 在一些实施方案中,本公开的CAR(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)包含一个或多个胞质结构域或胞质结构区。CAR的胞质域或胞质区可以包含细胞内信号传导域。

[0176] 可以用于本公开的CAR的合适的细胞内信号传导域的实例包括但不限于T细胞受体(TCR)的胞质序列和在抗原受体接合后协同作用以调节信号转导的协同受体,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同的功能能力的任何重组序列。

[0177] 不希望受理论的束缚,据信单独通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,因此通常还需要次级和/或共刺激信号才能完全活化。因此,T细胞活化可以由两种不同类别的胞质信号传导序列介导,即通过TCR(初级细胞内信号传导域)来启动抗原依赖性初级活化的那些序列,以及以非抗原依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号(次级胞质域,例如,共刺激域)的那些序列。此外,T细胞信号传导和功能(例如,活化性信号传导级联)可以通过细胞内抑制性共信号传导域由T细胞中存在的抑制性受体来负向调控。

[0178] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域可以包含抑制性胞内信号传导结构域。可以使用的抑制性胞内结构域的实例包括PD-1、CTLA4、TIGIT、BTLA和LIR-1(LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,抑制性胞内信号传导结构域包含一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域。在一些实施方案中,一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域通过肽接头(例如,参见表2)或间隔物或铰链序列(例如,参见表3)连接至其他结构域(例如,跨膜结构域)。在一些实施方案中,当存在两个或更多个胞内抑制性共信号传导结构域时,两个或更多个胞内抑制性共信号传导结构域可以通过肽接头(例如,参见表2)或间隔物或铰链序列(例如,参见表3)来连接。在一些实施方案中,胞内抑制性共信号传导结构域是抑制性结构域。在一些实施方案中,嵌合蛋白的一个或多个细胞内抑制性共信号传导域包括一种或多种含ITIM的蛋白质或其片段。ITIM是在很多抑制性免疫受体的胞质尾区中存在的保守氨基酸序列。含ITIM的蛋白质的实例包括PD-1、TIGIT、BTLA和LIR-1(LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、LAIR1、SIRP $\alpha$ 、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域包含一种或多种非ITIM支架蛋白或其片段。在一些实施方案中,一种或多种非ITIM支架蛋白或其片段选自GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP、LAG3、HAVR、GITR和PD-L1。抑制性胞内信号传导结构域可以另外包含酶抑制性结构域。在一些实施方案中,酶抑制性结构域包含酶促催化结构域。在一些实施方案中,酶促催化结构域来源于选自由以下各项组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。信号传导的酶促调节的实例在Pavel Otáhal等人(《生物化学与生物物理学学报(Biochim Biophys Acta.)》2011年2月;1813(2):367-76)、Kosugi A.等人(《SHP-1酪氨酸磷酸酶参与TCR介导的脂筏信号传导通路(Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts)》,《免疫(Immunity)》,2001年6月;14(6):669-80)以及Stanford等人(《酪氨酸磷酸酶对TCR信号传导的调节:从免疫稳态到自体免疫(Regulation of TCR signaling by tyrosine phosphatases:from immune homeostasis to autoimmunity)》,《免疫(Immunity)》,2012年9月;137(1):1-19)中有更详细的描述,这些文献各自出于所有目的以引用的方式并入本文中。

[0179] 在一些实施方案中,本公开的CAR的细胞内信号传导域可以包括初级信号传导域,

其以刺激性方式或抑制性方式调控TCR复合物的初级活化。以刺激性方式发挥作用的初级细胞内信号传导域可以含有信号传导基序,所述基序称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。可以用于本公开的CAR的合适的含ITAM的初级胞内信号传导结构域的实例包括但不限于CD3- $\zeta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为“ICOS”)、Fc $\epsilon$ RI、DAP10、DAP12和CD66d的那些。

[0180] 在一些实施方案中,本公开的CAR(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)包含胞内信号传导结构域,例如CD3- $\zeta$ 多肽的初级信号传导结构域。本公开的CD3- $\zeta$ 多肽可以具有与NCBI参考编号NP\_932170或NP\_001106864.2的序列或其片段至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3- $\zeta$ 多肽可以包括一个保守氨基酸取代、多达两个保守氨基酸取代或多达三个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,多肽可以具有作为NCBI参考编号NP\_932170或NP\_001106864.2中至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少110、至少120、至少130、至少140、至少150、或至少160、至少170、或至少180个氨基酸长度的连续部分的氨基酸序列。

[0181] 在其他实施方案中,初级信号传导域包括修饰的ITAM域,例如与天然ITAM域相比具有改变(例如增加或降低)的活性的突变的ITAM域。在一个实施方案中,初级信号传导域包括含有修饰的ITAM的初级细胞内信号传导域,例如含有优化的和/或截短的ITAM的初级细胞内信号传导域。在一个实施方案中,初级信号传导域包括一、二、三、四或更多个ITAM基序。

[0182] 在一些实施方案中,本公开的CAR的细胞内信号传导域本身可以包括CD3- $\zeta$ 信号传导域或者它可以与可用于本公开的CAR的情况下的任何其他期望的细胞内信号传导域组合。例如,CAR的细胞内信号传导域可以包括CD3- $\zeta$ 链部分和共刺激信号传导域。共刺激信号传导域可能是指包括共刺激分子的细胞内域的CAR的一部分。本公开的共刺激分子是可以是淋巴细胞对抗原的有效反应所需的除了抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。合适的共刺激分子的实例包含但不限于CD97、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD8、OX40、4-1BB、CD28、ZAP40、CD30、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、MyD88、2B4、CD40、PD-1、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、以及与CD83特异性结合的配体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化性NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、CDS、ICAM-1、(CD11a/CD18)、BAFFR、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、IL2R $\beta$ 、IL2R  $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a等等。

[0183] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞质部分内的细胞内信号传导序列可以以随机或指定顺序彼此连接。在一些实施方案中,例如长度在2个氨基酸与10个氨基酸之间(例如2个氨基酸、3个氨基酸、4个氨基酸、5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸或10个氨基酸)的短寡肽或多肽接头可以在细胞内信号传导序列之间形成键联。在一

个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可以用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸或甘氨酸,可以用作合适的接头。

[0184] 在一些实施方案中,细胞内信号传导域包括两个或更多个共刺激信号传导域,例如,两个共刺激信号传导域、三个共刺激信号传导域、四个共刺激信号传导域、五个共刺激信号传导域、六个共刺激信号传导域、七个共刺激信号传导域、八个共刺激信号传导域、九个共刺激信号传导域、十个共刺激信号传导域或更多个共刺激信号传导域。在一个实施方案中,细胞内信号传导域包括两个共刺激信号传导域。在一些实施方案中,两个或更多个共刺激信号传导结构域通过本公开的接头(例如,表2中描述的接头中的任一者)分开。在一个实施方案中,接头是甘氨酸残基。在另一实施方案中,所述接头是丙氨酸残基。

[0185] 在一些实施方案中,本公开的细胞表达CAR,所述CAR包含结合EMCN的抗原结合结构域、本公开的跨膜结构域、初级信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域。

[0186] 在一些实施方案中,本公开的细胞表达iCAR,所述iCAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)、本公开的跨膜结构域以及一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的细胞表达CAR,所述CAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)、本公开的跨膜结构域、初级信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的细胞表达CAR,所述CAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)、本公开的跨膜结构域、定位于抗原结合结构域和跨膜结构域之间的铰链、初级信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域。

[0187] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于与一个或多个胞内信号传导结构域中的一个相同的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是抑制性CAR并且包含跨膜结构域和至少一个胞内抑制性共信号传导结构域,每个胞内抑制性共信号传导结构域均来源于选自以下的蛋白质:PD-1、CTLA4、TIGIT、BTLA和LIR1 (LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0188] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于第一蛋白质,并且一个或多个胞内信号传导结构域来源于与第一蛋白质不同的第二蛋白质。

[0189] 自然杀伤细胞受体(NKR)CAR

[0190] 在一些实施方案中,本公开的CAR(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)包含自然杀伤细胞受体(NKR)的一种或多种组分,从而形成NKR-CAR。NKR组分可以是来自任何合适的自然杀伤细胞受体的跨膜域、铰链域或胞质域,所述自然杀伤细胞受体包含但不限于杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),诸如KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1和KIRSDPI;自然细胞毒性受体(NCR),诸如NKp30、NKp44、NKp46;免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族,诸如CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME和CD2F-10;Fc受体(FcR),诸如CD16和CD64;以及Ly49受体,诸如LY49A和LY49C。在一些实施方案中,NKR-CAR可以与衔接分子或胞内信号传导结构域(诸如DAP12)相互作用。包括NKR组分的CAR

的示例性构型和序列在2014年9月18日公布的国际专利公布W02014/145252中有所描述。

[0191] 其他嵌合受体靶标

[0192] 本公开的某些方面涉及嵌合受体和编码此类嵌合受体的核酸,所述嵌合受体结合至除了EMCN之外的所关注的抗原。本公开的某些方面涉及嵌合受体和细胞(诸如免疫反应性细胞)所述细胞已经被遗传修饰为表达此类嵌合受体中的一种或多种,所述嵌合受体结合至除了EMCN之外的所关注的抗原,以及使用此类受体和细胞来治疗和/或预防骨髓恶性肿瘤(诸如AML)和其他需要抗原特异性免疫反应的病理的方法。恶性细胞已经发展出一系列机制来保护自己免于免疫识别和消除。本公开在肿瘤微环境内提供免疫原性以用于治疗此类恶性细胞。

[0193] 在一些实施方案中,第一嵌合受体包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域),并且第二嵌合受体包含结合第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))的另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,细胞可以表达对EMCN具有特异性的第一嵌合受体(例如,包含具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域的CAR)和对第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))具有特异性的第二嵌合受体。在一些实施方案中,细胞可以表达对EMCN具有特异性的第一嵌合抑制性受体(例如,包含具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域的抑制性CAR)和对第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))具有特异性的第二嵌合受体。例如,细胞(例如,免疫反应性细胞)可以被工程化为共表达或能够共表达iCAR和aCAR,所述iCAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域),所述aCAR靶向肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原)。结合至除了EMCN之外的抗原的合适的抗体包括任何抗体,天然的或合成的抗体、全长抗体或其片段、单克隆抗体或多克隆抗体,所述抗体足够强且特异地结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。AML相关抗原的实例包括FLT3、CD33、CD123、CLEC12A、CXCR4和EphA3。在一些实施方案中,商购获得的抗体可以用于结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。本领域的技术人员使用常规测序技术可容易地获得商购获得的抗体的CDR。此外,本领域的技术人员能够基于此类商购获得的抗体的CDR来构建编码scFv和嵌合受体(例如,CAR和TCR)的核酸。

[0194] T细胞受体(TCR)

[0195] 本公开的某些方面涉及特异性结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))的嵌合受体,并且第二抗原的嵌合受体是工程化T细胞受体(TCR)。本公开的TCR是二硫键连接的异源二聚体蛋白质,该蛋白质含有两条可变链,这两条可变链表达为具有不变CD3链分子的复合物的一部分。TCR在T细胞的表面上发现,并且负责识别呈与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽形式的抗原。在某些实施方案中,本公开的TCR包括由TRA编码的 $\alpha$ 链和由TRB编码的 $\beta$ 链。在某些实施方案中,TCR包括 $\gamma$ 链和 $\delta$ 链(分别由TRG和TRD编码)。

[0196] TCR的每条链由两个细胞外域构成:可变(V)区和恒定(C)区。恒定区在细胞膜近端,之后是跨膜区和短胞质尾部。可变区结合到肽/MHC复合物。每个可变区具有三个互补决定区(CDR)。

[0197] 在某些实施方案中,TCR可以与三个二聚体信号传导模块CD3 $\delta$ / $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$  / $\epsilon$ 和CD247  $\zeta$ / $\zeta$ 或CD247 $\zeta$ / $\eta$ 形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC (肽/MHC) 接合时,表达TCR复合物的T细胞被活化。

[0198] 在一些实施方案中,本公开的TCR是重组TCR。在某些实施方案中,所述TCR是非天然存在的TCR。在某些实施方案中,所述TCR与天然存在的TCR相差至少一个氨基酸残基。在一些实施方案中,所述TCR与天然存在的TCR相差至少2个氨基酸残基、至少3个氨基酸残基、至少4个氨基酸残基、至少5个氨基酸残基、至少6个氨基酸残基、至少7个氨基酸残基、至少8个氨基酸残基、至少9个氨基酸残基、至少10个氨基酸残基、至少11个氨基酸残基、至少12个氨基酸残基、至少13个氨基酸残基、至少14个氨基酸残基、至少15个氨基酸残基、至少20个氨基酸残基、至少25个氨基酸残基、至少30个氨基酸残基、至少40个氨基酸残基、至少50个氨基酸残基、至少60个氨基酸残基、至少70个氨基酸残基、至少80个氨基酸残基、至少90个氨基酸残基、至少100个氨基酸残基或更多个氨基酸残基。在某些实施方案中,所述TCR相对于天然存在的TCR被至少一个氨基酸残基修饰。在某些实施方案中,所述TCR相对于天然存在的TCR被至少2个氨基酸残基、至少3个氨基酸残基、至少4个氨基酸残基、至少5个氨基酸残基、至少6个氨基酸残基、至少7个氨基酸残基、至少8个氨基酸残基、至少9个氨基酸残基、至少10个氨基酸残基、至少11个氨基酸残基、至少12个氨基酸残基、至少13个氨基酸残基、至少14个氨基酸残基、至少15个氨基酸残基、至少20个氨基酸残基、至少25个氨基酸残基、至少30个氨基酸残基、至少40个氨基酸残基、至少50个氨基酸残基、至少60个氨基酸残基、至少70个氨基酸残基、至少80个氨基酸残基、至少90个氨基酸残基、至少100个氨基酸残基或更多个氨基酸残基修饰。

[0199] 嵌合TCR

[0200] 在一些实施方案中,本公开的TCR包含一个或多个抗原结合结构域,所述抗原结合结构域可以接枝到TCR链(例如TCR $\alpha$ 链或TCR $\beta$ 链)的一个或多个恒定结构域,以产生嵌合TCR,所述嵌合TCR特异性结合至所关注的第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。不希望受理论的束缚,据信嵌合TCR可以在抗原结合时通过TCR复合物进行信号传导。例如,抗体或抗体片段(例如,scFv)可以被接枝到恒定结构域,例如,TCR链(诸如TCR $\alpha$ 链和/或TCR $\beta$ 链)的胞外恒定结构域、跨膜结构域和胞质结构域的至少一部分。又如,抗体或抗体片段的CDR可以被接枝到TCR $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链,以产生嵌合TCR,所述嵌合TCR特异性结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。此类嵌合TCR可以通过本领域已知的方法产生(例如,Willemsen RA等人,Gene Therapy 2000;7:1369-1377;Zhang T等人,Cancer Gene Ther 2004 11:487-496;和Aggen等人,Gene Ther.2012年4月;19(4):365-74)。

[0201] 免疫反应性细胞

[0202] 本公开的某些方面涉及一种细胞,诸如免疫反应性细胞,所述细胞已经被基因工程化为包含一种或多种本公开的嵌合受体或一种或多种编码此类嵌合受体的核酸,并且涉及使用此类细胞来治疗骨髓恶性肿瘤(例如,AML)的方法。

[0203] 在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是初级细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是细胞系。在一些实施方案中,哺乳动物细胞骨髓细胞、血细胞、皮肤细胞、骨细胞、肌肉细胞、神经元细胞、脂肪细胞、肝细胞或心脏细胞。在一些实施方案中,细胞是干细胞。示例性的干细胞包含但不限于胚胎干细胞(ESC)、诱

导型多能干细胞 (iPSC)、成人干细胞和组织特异性干细胞,如造血干细胞(血液干细胞)、间质干细胞(MSC)、神经干细胞、上皮干细胞或皮肤干细胞。在一些实施方案中,所述细胞是由本公开的干细胞衍生或分化的细胞。在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞。本公开的免疫细胞可以由本公开的干细胞(例如由ESC或iPSC)分离或分化。示例性的免疫细胞包含但不限于T细胞(例如,辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自体杀伤T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞、髓样细胞、巨噬细胞和单核细胞。在一些实施方案中,所述细胞是神经元细胞。本公开的神经元细胞可以由本公开的干细胞(例如由ESC或iPSC)分离或分化。示例性的神经元细胞包含但不限于神经祖细胞、神经元(例如感觉神经元、运动神经元、胆碱能神经元、GABA能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元或血清素能神经元)、星形细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞。

[0204] 在一些实施方案中,所述细胞是免疫应答细胞。本公开的免疫应答细胞可以由本公开的干细胞(例如由ESC或iPSC)分离或分化。本公开的示例性免疫应答细胞包含但不限于淋巴样谱系细胞。淋巴样谱系(包括B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞)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等。淋巴样谱系的免疫应答细胞的实例包含但不限于T细胞、自然杀伤(NK)细胞、胚胎干细胞、多能干细胞和诱导型多能干细胞(例如,可以从中衍生或分化淋巴样细胞的那些干细胞)。T细胞可以是在胸腺中成熟并且主要负责细胞介导的免疫力的淋巴细胞。T细胞涉及适应性免疫系统。在一些实施方案中,本公开的T细胞可以是任何类型的T细胞,包含但不限于T辅助细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包含中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞))和两种类型的效应性记忆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)、自然杀伤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T细胞)是T淋巴细胞的子集,所述T淋巴细胞能够诱导受感染的体细胞或肿瘤细胞的死亡。患者自身的T细胞可以通过引入一种或多种嵌合受体(如嵌合TCR或CAR)进行遗传修饰以靶向特定抗原。

[0205] 自然杀伤(NK)细胞可以是作为细胞介导的免疫力的一部分并且在先天免疫反应期间起作用的淋巴细胞。NK细胞不需要先前激活以便对靶细胞执行其细胞毒性作用。

[0206] 在一些实施方案中,本公开的免疫应答细胞是T细胞。本公开的T细胞可以是自体的、同种异体的或者体外源自工程化祖细胞或干细胞。

[0207] 在一些实施方案中,本公开的免疫应答细胞是缺乏TCR- $\alpha\beta$ 的通用T细胞。在本领域中,开发了通用T细胞的方法描述于例如Valton等人,《分子疗法(Molecular Therapy)》(2015);23 9,1507-1518,以及Torikai等人,《血液(Blood)》2012 119:5697-5705中。

[0208] 在一些实施方案中,本公开的免疫应答细胞是包括一个或多个本公开的嵌合受体的分离的免疫应答细胞。在一些实施方案中,所述免疫应答细胞包括一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、或者十个或更多个本公开的嵌合受体。

[0209] 在一些实施方案中,免疫应答细胞是T细胞。在一些实施方案中,免疫反应性细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0210] 在一些实施方案中,免疫反应性细胞表达或能够表达免疫受体。免疫受体通常能够在表达免疫受体的细胞中诱导信号转导或蛋白质表达的变化,从而在结合至同源配体时调节免疫反应(例如,调节、活化、启动、刺激、增加、预防、减弱、抑制、降低、减少、阻碍或压

制免疫反应)。例如,当CD3链存在于TCR/CAR簇中以响应于配体结合时,产生基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)介导的信号转导级联。具体而言,在某些实施方案中,当内源性TCR、外源性TCR、嵌合TCR或CAR(特别是活化性CAR)结合它们各自的抗原时,形成免疫突触,所述形成包括在所结合的受体(例如,CD4或CD8、CD3  $\gamma$  / $\delta$ / $\epsilon$ / $\zeta$ 等)附近聚集许多分子。这种膜结合信号传导分子的聚集允许CD3链中包括的ITAM基序磷酸化,继而可以启动T细胞激活途径并最终激活转录因子(如NF- $\kappa$ B和AP-1)。这些转录因子能够诱导T细胞的全基因表达,以增加IL-2的产生,从而促进主调节性T细胞蛋白的增殖和表达,从而启动T细胞介导的免疫反应,诸如细胞因子产生和/或T细胞介导的杀伤。

[0211] 表达多个嵌合受体的细胞

[0212] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如免疫反应性细胞)包括两个或更多个本公开的嵌合受体。在一些实施方案中,所述细胞包括两个或更多个嵌合受体,其中所述两个或更多个嵌合受体之一是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,所述细胞包括三个或更多个嵌合受体,其中所述三个或更多个嵌合受体中的至少一个是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,所述细胞包括四个或更多个嵌合受体,其中所述四个或更多个嵌合受体中的至少一个是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,所述细胞包括五个或更多个嵌合受体,其中所述五个或更多个嵌合受体中的至少一个是嵌合抑制性受体。

[0213] 在一些实施方案中,两种或更多种嵌合受体中的每种包含不同的抗原结合结构域,例如,结合至相同的抗原或不同的抗原的抗原结合结构域。在一些实施方案中,两种或更多种嵌合受体结合的每种抗原在相同的细胞(诸如骨髓细胞类型(例如,相同的AML细胞类型))上表达。在一些实施方案中,两个或更多个嵌合受体结合的每个抗原都是AML相关抗原(例如,FLT3、CD33、CD123、CLEC12A、CXCR4、EphA3等)。

[0214] 在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)表达两种或更多种不同的嵌合受体的实施方案中,不同的嵌合受体中的每种的抗原结合结构域可以被设计为使得抗原结合结构域不彼此相互作用。例如,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)表达第一嵌合受体(例如,EMCN特异性嵌合受体)和第二嵌合受体,该细胞可以包含第一嵌合受体,该第一嵌合受体包含不与第二嵌合受体的抗原结合结构域形成缔合的抗原结合结构域。例如,第一嵌合受体的抗原结合结构域可以包含抗体片段,诸如scFv,而第二嵌合受体的抗原结合结构域可以包含VHH。

[0215] 不希望受理论的束缚,据信在具有多个各自包括抗原结合结构域的嵌合膜包埋受体的细胞中,每个受体的抗原结合结构域之间的相互作用可能是不期望的,这是因为此类相互作用可能抑制所述抗原结合结构域中的一个或多个抗原结合结构域结合其同源抗原的能力。因此,在本公开的细胞(例如,免疫应答细胞)表达两种或更多种嵌合受体的实施方案中,所述嵌合受体包括使此类抑制性相互作用最小化的抗原结合结构域。在一个实施方案中,一种嵌合受体的抗原结合结构域包括scFv,并且第二嵌合受体的抗原结合结构域包括单个VH结构域,例如骆驼科动物、鲨鱼或七鳃鳗单个VH结构域,或者来源于人或小鼠序列的单个VH结构域。

[0216] 在一些实施方案中,当存在于细胞的表面上时,第一嵌合受体的抗原结合结构域与其同源抗原的结合(例如,EMCN特异性嵌合受体与EMCN的结合)不会因第二嵌合受体的存在而实质上减少。在一些实施方案中,在存在第二嵌合受体的情况下第一嵌合受体的抗原

结合结构域与其同源抗原的结合是在不存在第二嵌合受体的情况下第一嵌合受体的抗原结合结构域与其同源抗原的结合的85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,当存在于细胞的表面上时,第一嵌合受体和第二嵌合受体的抗原结合结构域彼此缔合程度低于两者都是scFv抗原结合结构域的情况。在一些实施方案中,第一嵌合受体和第二嵌合受体的抗原结合结构域彼此缔合的程度比二者均为scFv抗原结合结构域时的程度少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

#### [0217] 嵌合抑制性受体

[0218] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)包含一种或多种本公开的嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,一种或多种嵌合抑制性受体中的每种包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域结合通常在正常细胞(例如,通常被认为是健康的细胞)而非肿瘤细胞(诸如AML细胞)上表达的抗原。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)。

[0219] 在一些实施方案中,所述一个或多个嵌合抑制性受体结合在非肿瘤细胞上表达的抗原,所述非肿瘤细胞来源于选自由以下组成的组的组织:脑、神经元组织、内分泌、骨、骨髓、免疫系统、内皮组织、肌肉、肺、肝脏、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、男性生殖器官、女性生殖器官、脂肪、软组织和皮肤。

[0220] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体(例如,EMCN特异性嵌合抑制性受体)可以例如与在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)上表达的一种或多种活化性嵌合受体(例如,活化性嵌合TCR或CAR)一起用作非逻辑门,该非逻辑门控制、调节或者抑制一种或多种活化性嵌合受体的一种或多种活性。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体可以抑制本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一种或多种活性。

[0221] 在一些实施方案中,本公开的细胞包含一种或多种本公开的嵌合抑制性受体,并且还包含结合至一种或多种肿瘤相关抗原的肿瘤靶向性嵌合受体。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括AML相关抗原。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括CD33。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括FLT3。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括CD33和FLT3。

#### [0222] 共刺激配体

[0223] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)可以另外包含一种或多种重组或外源性共刺激配体。例如,细胞可以用一种或多种共刺激配体来进一步转导,以使得细胞共表达或被诱导共表达一种或多种本公开的嵌合受体(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)和一种或多种共刺激配体。不希望受理论的束缚,据信一种或多种嵌合受体与一个或多个共刺激配体之间的相互作用可以提供对于细胞的完全激活重要的非抗原特异性信号。合适的共刺激配体的实例包含但不限于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。TNF是参与全身性炎症的细胞因子并且刺激急性期反应。其主要作用是调节免疫细胞。TNF超家族的成员共有许多共同特征。大多数TNF超家族成员被合成为含有短胞质区段和相对较长胞外区的II型跨膜蛋白(细胞外C末端)。合适的TNF超家族成员的实例包括但不限于神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L)/CD 154、CD137L/4-1BBL、TNF- $\alpha$ 、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子 $\beta$ (TNF $\beta$ )/

淋巴毒素 $\alpha$  (LTa)、淋巴毒素 $\beta$  (LTP)、CD257/B细胞激活因子 (B AFF)/Blys/THANK/Ta11-1、糖皮质激素诱导型TNF受体配体 (GITRL) 和TNF相关凋亡诱导配体 (TRAIL)、LIGHT (TNFSF 14)。免疫球蛋白 (Ig) 超家族是参与细胞的识别、结合或粘附过程的一大组细胞表面可溶性蛋白质。这些蛋白质与免疫球蛋白共有结构特征并且具有免疫球蛋白域 (折叠)。合适的免疫球蛋白超家族配体的实例包含但不限于CD80和CD86 (两者都是CD28的配体), PD-L1/ (B7-H1), 其是PD-1的配体。在某些实施方案中, 一种或多种共刺激配体选自4-1BBL、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、PD-L1以及它们的组合。

#### [0224] 趋化因子受体

[0225] 在一些实施方案中, 本公开的细胞 (例如, 免疫反应性细胞) 包含一种或多种嵌合受体 (例如, 本文所述的EMCN特异性CAR) 并且可以进一步包含一种或多种趋化因子受体。例如, 趋化因子受体CCR2b或CXCR2在细胞 (诸如T细胞) 中的转基因表达增强向分泌CCL2或分泌CXCL1的实体瘤的运输 (Craddock等人, *J Immunother.* 2010年10月; 33 (8) : 780-8和Kershaw等人*Hum Gene Ther.* 2002年11月1日; 13 (16) : 1971-80)。不希望受理论的束缚, 据信本公开的在表达嵌合受体的细胞上表达的趋化因子受体可以识别由肿瘤分泌的趋化因子并改善细胞对肿瘤的靶向, 其可以促进细胞向肿瘤浸润并增强细胞的抗肿瘤功效。本公开的趋化因子受体可以包含天然存在的趋化因子受体、重组趋化因子受体或它们的趋化因子结合片段。可以在本公开的细胞上表达的合适的趋化因子受体的实例包含但不限于CXC趋化因子受体, 如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6或CXCR7; CC趋化因子受体, 如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10或CCR11; CX3C趋化因子受体, 如CX3CR1; XC趋化因子受体, 如XCR1; 以及其趋化因子结合片段。在一些实施方案中, 基于肿瘤分泌的趋化因子来选择要在细胞上表达的趋化因子受体。

#### [0226] 嵌合受体调节

[0227] 本公开的一些实施方案涉及调节本公开的表达嵌合受体的细胞的一种或多种嵌合受体活性 (例如, 本文所述的EMCN特异性CAR)。存在若干种可以调节嵌合受体活性的方法。在一些实施方案中, 可能需要可调节的嵌合受体, 其中可以控制一种或多种嵌合受体活性, 以优化嵌合受体疗法的安全性和/或功效。例如, 使用与二聚结构域融合的胱天蛋白酶诱导细胞凋亡 (参见例如, Di等人, 《新英格兰医学杂志 (*N Engl. J. Med.*)》2011年11月3日; 365 (18) : 1673-1683) 可以用作嵌合受体疗法中的安全开关。在一些实施方案中, 本公开的表达嵌合受体的细胞还可以表达在施用如利米西德 (rimiducid) (IUPAC名称: [(1R)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-1-[3-[2-[2-[2-[3-[(1R)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)丁酰基]哌啶-2-羰基]氧基丙基]苯氧基]乙酰基]氨基]乙基氨基]-2-氧代乙氧基]苯基]丙基](2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)丁酰基]哌啶-2-甲酸酯) 等二聚药物后诱导胱天蛋白酶-9激活并导致细胞凋亡的诱导型胱天蛋白酶-9 (iCaspase-9)。在一些实施方案中, iCaspase-9含有包括化学二聚诱导子 (CID) 的结合结构域, 其在CID的存在下介导二聚, 这导致表达嵌合受体的细胞的诱导性和选择性耗竭。

[0228] 可替代地, 在一些实施方案中, 本公开的嵌合受体可以通过利用灭活或以其他方式抑制嵌合受体活性的小分子或抗体来调控。例如, 抗体可以通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 来耗竭表达嵌合受体的细胞。在一些实施方案中, 本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达被能够通过ADCC或补体诱导的细胞死亡来诱导细胞死亡的分

子识别的抗原。例如,本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达能够通过抗体或抗体片段靶向的受体。可以通过抗体或抗体片段靶向的合适的受体的实例包含但不限于EpCAM、VEGFR、整合素(例如, $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I3/4\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v$ )、TNF受体超家族成员(例如,TRAIL-R1和TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7和EGFR,以及其截短形式。

[0229] 在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞还可以表达缺乏信号传导能力但保留被能够诱导ADCC的分子识别的表位的截短表皮生长因子受体(EGFR)(例如,W02011/056894)。

[0230] 在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞进一步包含高度表达的紧密标志物/自杀基因,其将来自CD32抗原和CD20抗原两者的靶表位在表达嵌合受体的细胞中组合,由此结合抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗),从而导致通过ADCC选择性耗竭所述表达嵌合受体的细胞。用于耗竭本公开的表达嵌合受体的细胞的其他方法可以包含但不限于施用单克隆抗CD52抗体,所述单克隆抗CD52抗体选择性地结合并靶向表达嵌合受体的细胞以通过诱导ADCC进行破坏。在一些实施方案中,可以使用如抗特异性抗体等嵌合受体配体选择性地靶向所述表达嵌合受体的细胞。在一些实施方案中,所述抗特异性抗体可以引起效应细胞活性,如ADCC或ADC活性。在一些实施方案中,所述嵌合受体配体可以进一步偶联至诱导细胞杀伤的药剂如毒素。在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达由本公开的细胞耗竭剂识别的靶蛋白。在一些实施方案中,所述靶蛋白是CD20并且所述细胞耗竭剂是抗CD20抗体。在此类实施方案中,一旦需要减少或消除表达嵌合受体的细胞,就施用细胞耗竭剂。在一些实施方案中,细胞耗竭剂是抗CD52抗体。

[0231] 在一些实施方案中,受调控的嵌合受体包括一组多肽,其中本公开的嵌合受体的组分被分配在单独的多肽或成员上。例如,该组多肽可以包含二聚化开关,在存在二聚化分子时,可以使多肽彼此偶联以形成功能性嵌合受体。

[0232] 编码EMCN特异性蛋白质的核酸构建体

[0233] 本公开的某些方面涉及编码一种或多种本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)的核酸(例如,分离的核酸)。在一些实施方案中,所述核酸是RNA构建体,诸如信使RNA(mRNA)转录物或修饰的RNA。在一些实施方案中,核酸是DNA构建体。

[0234] 在一些实施方案中,本公开的核酸编码包含一个或多个抗原结合结构域(其中每个结构域结合至靶抗原(例如,EMCN))、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含抗原结合结构域、跨膜结构域、初级信号传导结构域(例如,CD3- $\zeta$ 结构域)和一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述核酸进一步包含编码间隔区的核苷酸序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域通过间隔区连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,间隔区包括选自表3中所列的任何核酸序列的核酸序列。在一些实施方案中,核酸还包含编码前导序列的核苷酸序列。

[0235] 本公开的核酸可以使用本领域已知的任何合适的重组方法获得,包括但不限于通

过筛选来自表达感兴趣的基因的细胞的文库、通过从已知包括所述基因的载体获得感兴趣的基因、或通过使用标准技术直接从含有所述基因的细胞和组织分离感兴趣的基因。可替代地,感兴趣的基因可以合成产生。

[0236] 在一些实施方案中,本公开的核酸包含在载体内。在一些实施方案中,本公开的核酸经由转位子、CRISPR/Cas9系统、TALEN或锌指核酸酶在细胞中表达。

[0237] 在一些实施方案中,编码本公开的嵌合受体的核酸的表达可以通过将所述核酸可操作地连接至启动子并且将构建体并入到表达载体中来实现。合适的载体可以在真核细胞中复制并整合。典型的克隆载体含有可用于调节所期望的核酸的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0238] 在一些实施方案中,本公开的表达构建体还可以使用标准基因递送方案(例如,US5399346、US5580859和US5589466)用于核酸免疫和基因疗法。在一些实施方案中,本公开的载体是基因疗法载体。

[0239] 本公开的核酸可以被克隆到许多类型的载体中。例如,所述核酸可以被克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌体质粒、噬菌体衍生物、动物病毒或粘粒。在一些实施方案中,所述载体可以是表达载体、复制载体、探针产生载体或测序载体。

[0240] 在一些实施方案中,所述质粒载体包含转位子/转位酶系统,以将本公开的核酸并入到宿主细胞基因组中。使用转位子和转位酶质粒系统在免疫细胞中表达蛋白质的方法通常描述于Chicaybam L,《人类基因疗法》2019年4月;30(4):511-522.doi:10.1089/hum.2018.218;和PtáčkováP,《细胞疗法(Cytotherapy)》.2018年4月;20(4):507-520.doi:10.1016/j.jcyt.2017.10.001,所述文献各自据此通过引用以其整体并入。在一些实施方案中,所述转位子系统是睡美人转位子/转位酶或piggyBac转位子/转位酶。

[0241] 在一些实施方案中,本公开的表达载体可以以病毒载体的形式提供至细胞。合适的病毒载体系统是本领域熟知的。例如,病毒载体可以来源于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。在一些实施方案中,本公开的载体是慢病毒载体。慢病毒载体适用于长期基因转移,因为此类载体允许转基因的长期稳定整合以及在子细胞中繁殖。慢病毒载体也优于源自肿瘤逆转录病毒(例如,鼠类白血病病毒)的载体,因为慢病毒载体可以转导非增殖细胞。在一些实施方案中,本公开的载体是腺病毒载体(A5/35)。在一些实施方案中,本公开的载体含有在至少一种生物体中具功能性的复制起点、启动子序列、适宜的限制性内切核酸酶位点和一个或多个选择性标志物(例如,W001/96584;W001/29058;和US6326193)。已经开发了许多基于病毒的系统以用于使基因转移到哺乳动物细胞中。可以使用本领域中已知的技术将所选的基因插入到载体中并包封在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并在体内或离体递送至哺乳动物细胞。许多逆转录病毒系统是本领域中已知的。

[0242] 在一些实施方案中,本公开的载体包含另外的启动子元件,如调控转录起始的速率的增强子。增强子通常位于起始位点上游30bp至110bp的区域中,尽管已经证明许多启动子还含有在起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔可以是柔性的,使得启动子功能在元件相对于彼此逆转或移动时得以保留。例如,在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以增加至50bp,然后活性开始下降。取决于启动子,单独的元件可以协同或独立地发挥功能以激活转录。示例性的启动子可以包括但不限于SFFV基因启动子、EFS基因

启动子、CMV IE基因启动子、EF1a启动子、泛素C启动子和磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0243] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫应答细胞)中表达本公开的核酸的启动子是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动负责将氨酰基tRNA酶促递送至核糖体的延长因子-1复合物的 $\alpha$ 亚基的表达。EF1a启动子已经广泛用于哺乳动物表达质粒中,并且已经被证明在驱动来自克隆到慢病毒载体中的核酸的嵌合受体表达方面是有效的。

[0244] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫应答细胞)中表达本公开的核酸的启动子是组成型启动子。例如,合适的组成型启动子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子。CMV启动子是能够驱动可操作地连接至启动子的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子。其他合适的组成型启动子包括但不限于泛素C(UbiC)启动子、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、Epstein-Barr病毒立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延长因子1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。

[0245] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫应答细胞)中表达本公开的核酸的启动子是诱导型启动子。诱导型启动子的使用可以在所述启动子可操作地连接至核酸时提供能够诱导或抑制本公开的核酸的表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0246] 在一些实施方案中,本公开的载体可以进一步包含促进分泌的信号序列、多腺苷酸化信号和转录终止子、允许附加型复制的元件和/或允许选择的元件。

[0247] 在一些实施方案中,本公开的载体可以进一步包含选择性标记基因和/或报告基因,以促进从已经用载体转导的细胞群中鉴定和选择表达嵌合受体的细胞。在一些实施方案中,选择性标志物可以由从载体分离并用于共转染程序的核酸编码。选择性标志物或报告基因可以侧接有适当的调节序列以允许在宿主细胞中表达。选择性标志物的实例包括但不限于抗生素抗性基因,如neo等等。

[0248] 在一些实施方案中,报告基因可以用于鉴定转导的细胞和用于评估调节序列的功能性。如本文所公开的,报告基因是这样的基因,其在受体生物体或组织中不存在或不由受体生物体或组织表达并且编码其表达导致容易检测的性质(诸如酶促活性)的多肽。可以在核酸已经被引入到受体细胞中之后在合适的时间测定报告基因的表达。报告基因的实例包括但不限于编码荧光素酶的基因、编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的基因、编码氯霉素乙酰基转移酶的基因、编码分泌的碱性磷酸酶的基因和编码绿色荧光蛋白的基因。合适的表达系统在本领域中是熟知的并且可以使用已知技术制备或在商业上获得。在一些实施方案中,具有显示最高水平的报告基因表达的最小5'侧接区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区可以连接至报告基因并且用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0249] 在一些实施方案中,包含编码本公开的EMCN特异性蛋白(例如,嵌合受体)的核酸序列的载体还包含编码增加嵌合受体活性的多肽的第二核酸。

[0250] 在表达EMCN特异性蛋白质的细胞包含两种或更多种异源性蛋白质(例如,两种或更多种嵌合受体)的实施方案中,单个核酸可以编码在单个调节控制元件(例如,启动子)下或者在核酸中包含的每个编码蛋白质的核苷酸序列的单独调节控制元件下的两种或更多种蛋白质。在表达EMCN特异性蛋白质的细胞包含两种或更多种异源性蛋白质的一些实施方

案中,每种异源蛋白质可以由单独的核酸编码。在一些实施方案中,每个单独的核酸包含其自身的控制元件(例如,启动子)。在一些实施方案中,单个核酸编码两个或更多个嵌合受体,并且编码嵌合受体的核苷酸序列在相同阅读框中并且被表达为单个多肽链。在此类实施方案中,所述两个或更多个嵌合受体可以由一个或多个诸如自动切割位点的肽切割位点或细胞内蛋白酶的底物隔开。合适的肽切割位点可以包含但不限于T2A肽切割位点、P2A肽切割位点、E2A肽切割位点和F2A肽切割位点。在一些实施方案中,所述两种或更多种嵌合受体包括T2A肽切割位点。在一些实施方案中,所述两种或更多种嵌合受体包括E2A肽切割位点。在一些实施方案中,所述两种或更多种嵌合受体包括T2A和E2A肽切割位点。

[0251] 将基因引入到细胞中并表达基因的方法在本领域中是熟知的。例如,在一些实施方案中,可以通过物理手段、化学手段或生物学手段将表达载体转移到宿主细胞中。用于将核酸引入到宿主细胞中的物理手段的实例包括但不限于磷酸钙沉淀、脂质转染、颗粒轰击、显微注射和电穿孔。用于将核酸引入到宿主细胞中的化学手段的实例包括但不限于胶体分散系统、巨分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、微团、混合微团和脂质体。用于将核酸引入到宿主细胞中的生物学手段的实例包括但不限于使用DNA和RNA载体。

[0252] 在一些实施方案中,脂质体可以用作非病毒递送系统以在体外、离体或体内将本公开的核酸或载体引入到宿主细胞中。在一些实施方案中,所述核酸可以与脂质缔合,例如通过包封在脂质体内部的水溶液中、散布在脂质体的脂质双层内、经由与脂质体和核酸两者缔合的连接分子连接至脂质体、包裹在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、以悬浮液形式包含在脂质中、包含微团或与微团复合、或者以其他方式与脂质缔合。如本文所公开的,脂质缔合的核酸或载体组合物不限于溶液中的任何特定结构。在一些实施方案中,此类组合物可以存在于双层结构中、呈微团形式或具有“塌陷”结构。此类组合物还可以散布在溶液中,形成尺寸或形状不均匀的聚集体。如本文所公开的,脂质是可能天然存在的或合成的脂肪物质。在一些实施方案中,脂质可以包含天然存在于细胞质中的脂肪滴或含有长链脂族烃及其衍生物,如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类别。合适的脂质可以获自商业来源,并且包含但不限于二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)、胆固醇和二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可以储存在约-20°C下。使用氯仿作为溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。如本文所使用的,“脂质体”可以涵盖通过产生包封的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质媒介物。在一些实施方案中,脂质体可以被表征为具有含有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。在一些实施方案中,多层脂质体可以具有通过水性介质隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮于过量水溶液中时可以自发地形成多层脂质体。在一些实施方案中,脂质组分可以在形成封闭结构之前经历自我重排并且可以将水和溶解的溶质截留在脂质双层之间。在一些实施方案中,所述脂质可以呈递微胞结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。

[0253] 在一些实施方案中,将本公开的核酸或载体引入到哺乳动物宿主细胞(诸如本公开的免疫应答细胞)中。在一些实施方案中,可以通过本领域已知的任何合适的测定来证实本公开的核酸或载体存在于宿主细胞中,所述测定包括但不限于Southern印迹测定、Northern印迹测定、RT-PCR、PCR、ELISA测定和蛋白质印迹测定。

[0254] 在一些实施方案中,将本公开的核酸或载体稳定地转导到本公开的免疫应答细胞中。在一些实施方案中,表现出核酸或载体的稳定表达的细胞在转导之后表达编码的嵌合受体至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少7周、至少8周、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少12个月。

[0255] 在本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)在细胞中瞬时表达的实施方案中,本公开的编码EMCN特异性蛋白质的核酸或载体被转染到本公开的免疫反应性细胞中。在一些实施方案中,免疫反应性细胞在转染之后表达EMCN特异性蛋白质约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天或约15天。

[0256] 在一些实施方案中,核酸构建体编码双顺反子编码的嵌合抗原受体。在一些实施方案中,编码的双顺反子嵌合抗原受体包含EMCN CAR(诸如EMCN抑制性CAR)和对第二抗原具有特异性的CAR(诸如,肿瘤靶向性嵌合受体)。

[0257] 在一些实施方案中,核酸构建体编码二价嵌合抗原受体。在一些实施方案中,编码的二价嵌合抗原受体包含EMCN抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。

[0258] 药物组合物和施用

[0259] 本公开的某些方面涉及包含一种或多种本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类一种或多种EMCN特异性蛋白质的本公开的免疫反应性细胞的组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,包含EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类EMCN特异性蛋白质的经遗传修饰的免疫反应性细胞的组合物可以全身或直接提供给受试者以用于治疗增殖性疾病,诸如骨髓疾病。在某些实施方案中,组合物被直接注射到所关注的器官(例如,受障碍影响的器官)中。或者,组合物可以间接提供给所关注的器官,例如,通过施用于循环系统(例如,肿瘤脉管系统)。可以在组合物的施用之前、期间或之后提供扩增剂和分化剂,以增加T细胞、NK细胞或CTL细胞的体外或体内产生。

[0260] 包含本公开的经遗传修饰的细胞的组合物可以在任何生理上可接受的媒介物中施用,例如血管内施用,虽然它们也可以被引入骨或其他方便的位置,其中经遗传修饰的细胞可以找到再生和分化的适当部位(例如,胸腺)。在一些实施方案中,可以施用至少 $1 \times 10^5$ 个细胞,最终达到 $1 \times 10^{10}$ 或更多个细胞。包括本公开的经遗传修饰的细胞的组合物可以包括纯化的细胞群。用于确定细胞群体中经遗传修饰的细胞的百分比的方法在本领域中是熟知的,并且包含但不限于荧光活化细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,细胞群体中经遗传修饰的细胞的纯度可以是细胞群体中约50%、约55%、约60%或约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或更多的细胞。剂量可以由本领域的技术人员容易地调整(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。细胞可以通过注射、导管等等来引入。在一些实施方案中,还可以包括因子,例如,IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、 $\gamma$ -干扰素和促红细胞生成素。

[0261] 在某些实施方案中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包括经遗传修饰的细胞(诸如免疫反应性细胞或其祖细胞)和药学上可接受的载剂。施用可以是自体的或异源的。例如,免疫反应性细胞或祖细胞可以从一个受试者获得,并且施用于同一受试者或不同的、相容的受试者。在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞或它们的子代可以来源于外周血细胞(例如,体内、离体或体外来源)并且可以通过局部注射施用,包含导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用本公开的治疗组合物(例如,含有本公

开的经遗传修饰的细胞的药物组合物)时,所述治疗组合物通常被配制成单位剂量注射用形式(溶液、悬浮液、乳液)。

#### [0262] 制剂

[0263] 本公开的某些方面涉及包含本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类蛋白质的经遗传修饰的细胞(例如,本公开的免疫反应性细胞)的组合物的制剂。在一些实施方案中,包含经遗传修饰的细胞的本公开的组合物可以作为无菌液体制备剂提供,所述制备剂包括但不限于等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体和粘性组合物,它们可以被缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物可以更便于施用,尤其是通过注射施用。在一些实施方案中,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制以提供更长的与特定组织的接触期。液体或粘性组合物可以包括载剂,所述载剂可以是含有例如水、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)以及其合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0264] 在一些实施方案中,无菌注射用溶液可以根据需要通过将溶于足量的适当溶剂中的本公开的经遗传修饰的细胞掺入各种量的任何其他组分来制备。此类组合物可以与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等等)掺和。在一些实施方案中,组合物也可以是冻干的。根据施用途径和所需的制剂,组合物可以含有辅助物质,诸如润湿剂、分散剂、pH缓冲剂和抗微生物剂。

[0265] 在一些实施方案中,本公开的组合物可更包含可以增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂。此类添加剂的实例包含但不限于抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。在一些实施方案中,微生物污染可以通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂中的任一种来防止,包含但不限于对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等等。本公开的注射用药物调配物的延长吸收可以通过使用合适的延迟吸收剂(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0266] 在一些实施方案中,本公开的组合物可以是等渗的,即具有与血液和泪液相同的渗透压。在一些实施方案中,所期望的等渗性可以使用例如氯化钠、右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或者其他无机或有机溶质来实现。

[0267] 在一些实施方案中,选择具有化学惰性并且不影响本公开的经遗传修饰的细胞的活力或功效的本公开的调配物的组分。

[0268] 关于本公开的经遗传修饰的细胞的治疗使用的一个考虑因素是实现最佳功效所需的细胞的数量。在一些实施方案中,待施用的细胞的数量将因接受治疗的受试者而异。在某些实施方案中,施用于有需要的受试者的经遗传修饰的细胞的数量可以在 $1 \times 10^4$ 个细胞至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞的范围内。在一些实施方案中,被认为是有效剂量的细胞的精确数量可以基于每个受试者各自的因素,这些因素包含他们的体格、年龄、性别、体重和特定受试者的状况。基于本公开和本领域的知识,本领域的技术人员可以容易地确定剂量。

#### [0269] 异源性部分和修饰

[0270] 在另外的系列实施方案中,本文的EMCN特异性嵌合蛋白(例如,包含具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的抗原结合结构域的EMCN特异性嵌合蛋白)包含另外的部分和/或修饰。

#### [0271] 药物缀合物

[0272] 在多个实施方案中,包含如本文所述的EMCN特异性抗原结合结构域的蛋白质被缀

合至治疗剂(即药物)以形成抗体-药物缀合物。治疗剂包括但不限于化学治疗剂、显像剂(例如,放射性同位素)、免疫调节剂(例如,细胞因子、趋化因子或检查点抑制剂)和毒素(例如,细胞毒性剂)。在某些实施方案中,治疗剂通过接头肽附接至抗原结合结构域,如本文所更详细讨论。

[0273] 可以适用于将药物缀合至本文公开的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者)的制备抗体-药物缀合物(ADC)的方法在例如,美国专利8,624,003(锅法)、美国专利8,163,888(一步法)、美国专利5,208,020(两步法)、美国专利8,337,856、美国专利5,773,001、美国专利7,829,531、美国专利5,208,020、美国专利7,745,394、WO 2017/136623、WO 2017/015502、WO 2017/015496、WO 2017/015495、WO 2004/010957、WO 2005/077090、WO 2005/082023、WO 2006/065533、WO 2007/030642、WO 2007/103288、WO 2013/173337、WO 2015/057699、WO 2015/095755、WO 2015/123679、WO 2015/157286、WO 2017/165851、WO 2009/073445、WO 2010/068759、WO 2010/138719、WO 2012/171020、WO 2014/008375、WO 2014/093394、WO 2014/093640、WO 2014/160360、WO 2015/054659、WO 2015/195925、WO 2017/160754, Storz (MABS. 2015年11月-12月; 7(6):989-1009), Lambert等人(《治疗进展(Adv Ther)》, 2017 34:1015)、Diamantis等人(《英国癌症杂志(British Journal of Cancer)》, 2016, 114, 362-367)、Carrico等人(《自然-化学生物学(Nat Chem Biol)》, 2007. 3:321-2)、We等人(《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》, 2009. 106:3000-5)、Rabuka等人(《当前化学生物学观点(Curr Opin Chem Biol.)》, 2011 14:790-6)、Hudak等人(《应用化学(Angew Chem Int Ed Engl.)》, 2012:4161-5)、Rabuka等人(《自然规程(Nat Protoc.)》, 2012 7:1052-67)、Agarwal等人(《美国国家科学院院刊》, 2013, 110:46-51)、Agarwal等人(《生物共轭化学(Bioconjugate Chem.)》, 2013, 24:846-851)、Barfield等人(《药物设计、开发及疗法(Drug Dev. and D.)》, 2014, 14:34-41)、Drake等人(《生物共轭化学》, 2014, 25:1331-41)、Liang等人(《美国化学会志(J Am Chem Soc.)》, 2014, 136:10850-3)、Drake等人(《当前化学生物学观点》, 2015, 28:174-80), 和York等人(《BMC生物技术(BMC Biotechnology)》, 2016, 16(1):23), 这些文献各自的全部教导内容据此以引用的方式整体并入。

[0274] 其他结合部分

[0275] 在多个实施方案中, EMCN特异性蛋白包含具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者的抗原结合结构域以及一个或多个另外的结合部分。在某些实施方案中, 结合部分是抗体片段或抗体形式, 包含但不限于全长抗体、Fab片段、Fv、scFv、串联scFv、双价抗体、sc双价抗体、DART、tandAb、微抗体、骆驼科VHH以及本领域的技术人员已知的其他抗体片段或形式。示例性抗体和抗体片段形式在Brinkmann等人(MABS, 2017, 第9卷, 第2期, 182-212)中有所详细描述, 该文献的全部教导内容以引用的方式并入本文。

[0276] 在特定实施方案中, 一个或多个另外的结合部分附接至EMCN特异性抗原结合结构域的一个或多个肽的C-末端, 所述结构域诸如VH和/或VL、Fab重链和/或轻链片段或者scFv。在特定实施方案中, 一个或多个另外的结合部分附接至EMCN特异性抗原结合结构域的一个或多个肽的N-末端, 所述结构域诸如VH和/或VL、Fab重链和/或轻链片段或者scFv。

[0277] 在某些实施方案中, 一个或多个另外的结合部分对与EMCN不同的抗原或表位具有特异性。在某些实施方案中, 一个或多个另外的结合部分对EMCN具有特异性。

[0278] 在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分使用体外方法附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者),所述体外方法包括但不限于反应化学(例如,点击化学)和亲和标记系统。在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分通过Fc介导的结合(例如,蛋白A/G)附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者)。在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分使用重组DNA技术附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者),诸如编码融合产物的核苷酸序列在同一表达载体(例如,质粒)上的本文所述的抗原结合结构域与另外的结合部分之间。

[0279] 官能团/反应性基团

[0280] 在多个实施方案中,本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表1中列出的氨基酸序列中的一者或多者)具有包含官能团或化学反应性基团的修饰,所述官能团或化学反应性基团可以用于下游过程,诸如连接至另外的部分(例如,药物缀合物和另外的结合部分)和下游纯化过程。

[0281] 在某些实施方案中,修饰是化学反应性基团,所述化学反应性基团包括但不限于反应性硫醇(例如,基于马来酰亚胺的反应性基团)、反应性胺(例如,基于N-羧基琥珀酰亚胺的反应性基团)、“点击化学”基团(例如,反应性炔烃基团)和携带甲酰甘氨酸(FGly)的醛。在某些实施方案中,修饰是官能团,所述官能团包括但不限于亲和肽序列(例如,HA、HIS、FLAG、GST、MBP和Strep系统等)。在某些实施方案中,官能团或化学反应性基团具有可切割的肽序列。在特定实施方案中,可切割的肽通过包括但不限于以下的手段来切割:光分解、化学切割、蛋白酶切割、还原条件和pH条件。在特定实施方案中,蛋白酶切割通过细胞内蛋白酶来进行。在特定实施方案中,蛋白酶切割通过细胞外或膜相关蛋白酶来进行。采用蛋白酶切割的ADC疗法在Choi等人(《治疗诊断学(Theranostics)》,2012;2(2):156-178.)中有所更详细描述,所述文献的全部教导内容据此以引用的方式并入。

[0282] 治疗方法

[0283] 本公开的某些方面涉及使用本公开的EMCN特异性蛋白(例如,嵌合受体)和表达此类蛋白质的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)来治疗有需要的受试者的方法。在一些实施方案中,本公开的方法可用于治疗受试者的癌症,诸如骨髓疾病。在一些实施方案中,骨髓疾病是骨髓增生异常综合征、骨髓增生性赘生物、慢性髓单核细胞白血病、急性骨髓性白血病(AML)、急性髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、慢性髓细胞性白血病或真性红细胞增多症。在一些实施方案中,骨髓疾病是AML。本公开的其他方面涉及本公开的EMCN特异性嵌合受体和表达此类嵌合受体的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)在用于治疗受试者(诸如免疫受损的人受试者)的病原体感染或其他感染性疾病的方法中的使用。在一些实施方案中,本公开的方法可以包含以有效实现所期望的效果的量施用本公开的经遗传修饰的细胞,所述效果包含但不限于缓和现有病症、预防病症、治疗现有病症、管理现有病症或者预防病症的复发或反复。在一些实施方案中,有效量可以在本公开的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一次或一系列施用中提供。在一些实施方案中,有效量可以通过推注或通过连续灌注提供。

[0284] 如本文所公开的,“有效量”或“治疗有效量”是足以在治疗后实现有益或所期望的临床结果的量。有效量可以以一个或多个剂量施用至受试者。就治疗来说,有效量是足以缓

解、改善、稳定、逆转或减缓疾病的进展或以其他方式减轻疾病的病理学后果的量。有效量通常由医师逐例确定并且在本领域技术人员的能力范围内。在确定实现有效量的适当剂量时通常考虑若干因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、正在治疗的病症、病症的严重程度以及所施用的免疫反应性细胞的形式和有效浓度。

[0285] 对于使用抗原特异性细胞(例如,免疫反应性细胞,诸如T细胞)的过继性免疫疗法,通常输注在约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞的范围内(例如,约 $1 \times 10^9$ 个细胞)的细胞剂量。在将细胞施用于受试者并随后分化时,诱导针对特定抗原具有特异性的免疫反应性细胞。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的诱导可以包含但不限于诸如通过缺失或无反应性来使抗原特异性细胞失活。失活对于诸如在自身免疫性疾病中建立或重建耐受性特别有用。经遗传修饰的细胞可以通过本领域已知的任何方法来施用,所述方法包括但不限于静脉内、皮下、结内、瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内以及直接施用至胸腺。

[0286] 在一些实施方案中,使用方法涵盖抑制免疫反应的方法。抑制免疫反应可以指预防、减弱或抑制细胞介导的免疫反应,例如,免疫调节细胞的表面上表达的嵌合受体诱导的免疫反应。在实施方案中,所述方法包括预防、减弱或抑制免疫调节细胞的表面上表达的活化性嵌合受体的活化。

[0287] 在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体用于预防、减弱、抑制或压制肿瘤靶向性嵌合受体(例如,活化性CAR)引发的免疫反应。例如,免疫调节细胞表达识别抗原靶标1(例如,非肿瘤抗原)的抑制性嵌合受体和识别不同的抗原靶标2(例如,肿瘤靶标)的肿瘤靶向性嵌合受体。在这个实例中,当免疫调节细胞接触靶细胞时,抑制性和肿瘤靶向性嵌合受体可以结合至或不结合至它们的同源抗原。在这个实例的情形中,当靶细胞是表达抗原靶标1和抗原靶标2二者的非肿瘤细胞时,抑制性嵌合受体和肿瘤靶向性受体二者都可以被活化。在这种情况下,抑制性嵌合受体的活化引起对肿瘤靶向性嵌合受体信号传导的预防、减弱或抑制,并且免疫调节细胞未被活化。类似地,在靶细胞是仅表达抗原靶标1的非肿瘤细胞的示例性例子中,只有抑制性嵌合受体可以被活化。相比之下,在靶细胞是仅表达抗原靶标2的肿瘤细胞的示例性例子中,抑制性嵌合受体不能被活化,而肿瘤靶向性嵌合受体可以被活化,从而引起使免疫调节细胞活化的信号转导。

[0288] 由肿瘤靶向性嵌合受体引发的免疫反应的抑制可以是肿瘤靶向性嵌合受体的活化的抑制或减少、肿瘤靶向性嵌合受体的信号转导的抑制或减少、或者免疫调节细胞的活化的抑制或减少。与肿瘤靶向性嵌合受体的活化、免疫调节细胞的信号转导或活化相比,与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节细胞相比,抑制性嵌合受体可以抑制肿瘤靶向性嵌合受体的活化、肿瘤靶向性嵌合受体的信号转导或肿瘤靶向性嵌合受体对免疫调节细胞的活化约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍。在一些实施方案中,抑制是指肿瘤靶向性嵌合受体在被活化之前或之后活性的降低或减小。

[0289] 免疫反应可以从活化的免疫调节细胞产生和分泌细胞因子或趋化因子。免疫反应可以是针对靶细胞的细胞介导的免疫反应。

[0290] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体能够压制活化的免疫调节细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体能够压制针对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应由免疫调节细胞的活化诱导。

**[0291] 治疗性处理**

**[0292]** 在一些实施方案中,本公开的方法增加有需要的受试者的免疫反应。在一些实施方案中,本公开的方法包含用于治疗 and/或预防受试者的骨髓疾病的方法。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,适用于疗法的人类受试者可以包含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”的受试者是携带可在临床上测量的肿瘤的受试者。可在临床上测量的肿瘤是可以根据肿瘤质量来检测的肿瘤(例如,根据白血病细胞的百分比、通过触诊、CAT扫描、超声检查、乳房X光检查或X射线检查来测量;自身阳性生物化学或组织病理学标志物不足以鉴定此群体)。在一些实施方案中,本公开的药物组合物被施用于这些受试者以引发抗肿瘤反应,目的是缓解受试者的病症。在一些实施方案中,肿瘤块的减小是由于施用药物组合物而发生,但任何临床改善都将构成益处。在一些实施方案中,临床改善包含降低肿瘤的风险或进展率或减轻其病理学后果。在一些实施方案中,第二组合合适的人类受试者是“佐剂组”受试者。这些受试者是具有骨髓疾病病史但是对另一种疗法模式有反应的个体。先前疗法可以包含但不限于手术切除、放射疗法和/或传统化学疗法。因此,这些个体不存在临床上可测量的肿瘤。然而,他们疑似在原始肿瘤部位附近或因转移而处于疾病进展的风险中。在一些实施方案中,该组可以进一步细分为高风险个体和低风险个体。可以根据初始治疗之前或之后观察到的特征来进行细分。这些特征在临床领域中是已知的,并且针对每种不同的骨髓疾病被适当地定义。高风险亚组的典型特征是肿瘤入侵邻近组织或显示出累及淋巴结。

**[0293]** 在如本文所述的增加免疫反应的任何和所有方面,特征或功能方面的任何增加或降低或改变是相较于没有与如本文所述的免疫反应性细胞接触的细胞。

**[0294]** 增加免疫反应可以是增强免疫反应或诱导免疫反应。例如,增加免疫反应涵盖开始或引发免疫反应,或者增强或放大进行中的或现有的免疫反应。在一些实施方案中,所述治疗诱导了免疫反应。在一些实施方案中,诱导的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,诱导的免疫反应是先天免疫反应。在一些实施方案中,所述治疗增强了免疫反应。在一些实施方案中,增强的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,增强的免疫反应是先天免疫反应。在一些实施方案中,所述治疗增加了免疫反应。在一些实施方案中,增加的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,增加的免疫反应是先天免疫反应。

**[0295]** 在一些实施方案中,另一组受试者是具有骨髓疾病遗传倾向但是尚未证实骨髓疾病的临床体征的那些。例如,对于与AML相关的遗传突变测试呈阳性但是仍处于育龄期的女性,可以受益于在预防性处理中接受本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)中的一种或多种,以预防AML的发生,直到适合进行预防性手术。在一些实施方案中,受试者可以患有晚期疾病形式,在这种情况下,治疗目标可以包括缓和或逆转疾病进展以及/或者改善副作用。在一些实施方案中,受试者可以具有病症史,他们已经接受过治疗,在这种情况下,治疗目标通常可以包含减少或延迟复发的风险。

**[0296] 组合疗法**

**[0297]** 在一些实施方案中,表达一种或多种蛋白质(包含本公开的抗原结合结构域(例如,scFv),诸如本公开的嵌合受体)的本公开的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)可以与其他已知的药剂和疗法组合使用。在一些实施方案中,本公开的组合疗法包括本公开的经遗传修饰的细胞,该细胞可以与一种或多种另外的治疗剂组合施用。在一些实施方

案中,经遗传修饰的细胞和一种或多种另外的治疗剂可以同时、在同一或分开的组合中或者依次施用。对于依次施用,可以首先施用遗传修饰,然后可以施用一种或多种另外的药剂,或者可以颠倒施用顺序。在一些实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达一种或多种另外的治疗剂。

[0298] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以用于与手术、化学疗法、放射疗法、免疫抑制剂(例如,环孢菌素、硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫消融剂(例如,CAMPATH或抗CD3抗体)、细胞毒素、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素(cyclosporin)、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子、照射和肽疫苗组合的治疗方案。

[0299] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与淋巴细胞耗竭剂组合使用。在免疫疗法之前,合适的淋巴细胞耗竭剂降低或减少淋巴细胞,例如,B细胞淋巴细胞和/或T细胞淋巴细胞。合适的淋巴细胞耗竭剂的实例包含但不限于氟达拉滨、环磷酰胺、皮质类固醇、阿仑单抗、全身照射(TBI)以及它们的任何组合。

[0300] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与化学治疗剂组合使用。合适的化学治疗剂包含但不限于蒽环(例如,多柔比星(doxorubicin))、长春花生物碱(例如,长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨(vinorelbine))、烷基化剂(例如,环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(decarbazine)、美法仑(melphalan)、异环磷酰胺(ifosfamide)、替莫唑胺(temozolomide))、免疫细胞抗体(例如,阿仑单抗(alemtuzumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、托西莫单抗(tositumomab))、抗代谢物(例如,叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂,诸如氟达拉滨(fludarabine))、mTOR抑制剂、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A(aclacinomycin A)、胶霉毒素(gliotoxin)或硼替佐米(bortezomib))、免疫调节剂(诸如沙利度胺(thalidomide)或沙利度胺衍生物(例如,来那度胺(lenalidomide)))。

[0301] 适用于组合疗法的一般化学治疗剂的实例包含但不限于阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex®)、比卡鲁胺(bicalutamide)(Casodex®)、硫酸博来霉素(bleomycin sulfate)(Blenoxane®)、白消安(busulfan)(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(capecitabine)(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(carboplatin)(Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine)(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)(Leukeran®)、顺铂(cisplatin)(Piatinol®)、克拉屈滨(cladribine)(Leustatin®)、环磷酰胺(cyclophosphamide)(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC-Dome®)、放线菌素D(Actinomycin D, cosmegen)、盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride)(Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他赛(docetaxel)(Taxotere®)、盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride)

(Adriamycin<sup>®</sup>, Rubex<sup>®</sup>)、依托泊苷(etoposide)(Vepesid<sup>®</sup>)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)(Fludara<sup>®</sup>)、5-氟尿嘧啶(Adrucil<sup>®</sup>, Efudex<sup>®</sup>)、氟他胺(flutamide)(Eulexin<sup>®</sup>)、替扎他滨(tezacitibine)、吉西他滨(Gemcitabine)(二氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydraea<sup>®</sup>)、伊达比星(Idarubicin)(Idaniycin<sup>®</sup>)、异环磷酰胺(ifosfamide)(IFEX<sup>®</sup>)、伊立替康(irinotecan)(Camptosar<sup>®</sup>)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR<sup>®</sup>)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(melphalan)(Alkeran<sup>®</sup>)、6-巯基嘌呤(Purinethol<sup>®</sup>)、氨甲蝶呤(Folex<sup>®</sup>)、米托蒽醌(mitoxantrone)(Novantrone<sup>®</sup>)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(paclitaxel)(Taxol<sup>®</sup>)、菲尼克斯(phoenix)(钇90/MX-DTPA)、喷司他汀(pentostatin)、聚苯丙生(polifeprosan) 20与卡莫司汀(carmustine)植入膜剂(Gliadel<sup>®</sup>)、柠檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate)(Nolvadex<sup>®</sup>)、替尼泊苷(teniposide)(Vumon<sup>®</sup>)、6-硫鸟嘌呤、噻替哌(thiotepa)、替拉扎明(tirapazamine)(Tirazone<sup>®</sup>)、注射用盐酸托泊替康(topotecan hydrochloride)(Hycamptin<sup>®</sup>)、长春花碱(Velban<sup>®</sup>)、长春新碱(Oncovin<sup>®</sup>)和长春瑞滨(Navelbine<sup>®</sup>)。

[0302] 合适的烷基化剂的实例包含但不限于氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯、尿嘧啶芥(Aminouracil Mustard<sup>®</sup>、

Chlorethaminacil<sup>®</sup>、Demethylodopan<sup>®</sup>、Desmethylodopan<sup>®</sup>、Haemanthamine<sup>®</sup>、Nordopan<sup>®</sup>、Uracil nitrogen mustard<sup>®</sup>、Uracilmostaza<sup>®</sup>、Uramustin<sup>®</sup>、Uramustine<sup>®</sup>)、氯甲碱(chlormethine)(Mustargen<sup>®</sup>)、环磷酰胺(Cytoxan<sup>®</sup>、Neosar<sup>®</sup>、Clafen<sup>®</sup>、Endoxan<sup>®</sup>、Procytox<sup>®</sup>、Rev immune<sup>™</sup>)、异环磷酰胺(Mitoxana<sup>®</sup>)、美法仑(melphalan)(Alkeran<sup>®</sup>)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)(Leukeran<sup>®</sup>)、哌泊溴烷(pipobroman)(Amedel<sup>®</sup>、Vercyte<sup>®</sup>)、三亚乙基蜜胺(Hemel<sup>®</sup>、Hexalen<sup>®</sup>、Hexastat<sup>®</sup>)、三亚乙基硫代磷酰胺、替莫唑胺(Temodar<sup>®</sup>)、噻替哌(Thioplex<sup>®</sup>)、白消安(Busilvex<sup>®</sup>、Myleran<sup>®</sup>)、卡莫司汀(carmustine)(BiCNU<sup>®</sup>)、洛莫司汀(lomustine)(CeeNU<sup>®</sup>)、链脲菌素(streptozocin)(Zanosar<sup>®</sup>)和达卡巴嗪(DTIC-Dome<sup>®</sup>)。另外的示例性烷基化剂包含但不限于奥沙利铂(Oxaliplatin)(Eloxatin<sup>®</sup>)；替莫唑胺(Temodar<sup>®</sup>和Temodal<sup>®</sup>)；放线菌素D(也称为actinomycin-D, Cosmegen<sup>®</sup>)；美法仑(也称为L-PAM、L-溶肉瘤素和苯丙氨酸芥, Alkeran<sup>®</sup>)；阿草特氨(Altretamme)(也称为六甲蜜胺(HMM), Hexalen<sup>®</sup>)；卡莫司汀(BiCNU<sup>®</sup>)；苯达莫司汀(Bendamustine)(Treanda<sup>®</sup>)；白消安(Busulfex<sup>®</sup>和 Myleran<sup>®</sup>)；卡铂(Paraplatin<sup>®</sup>)；洛莫司汀(也称为CCNU, CeeNU<sup>®</sup>)；顺铂(也称为CDDP、Platinol<sup>®</sup>和 Platinol<sup>®</sup>-AQ)；苯丁酸氮芥(Leukeran<sup>®</sup>)；环磷酰胺(Cytoxan<sup>®</sup>和Neosar<sup>®</sup>)；达卡

巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺, DTIC-Dome<sup>®</sup>);阿草特氨(也称为六甲蜜胺(HMM), Hexalen<sup>®</sup>);异环磷酰胺( Ifex<sup>®</sup> );泼尼莫司汀(Prednumustine);甲基苄肼(Procarbazine)(Matulane<sup>®</sup>);双氯乙基甲胺(Mechlorethamine)(也称为氮芥、莫司汀和盐酸二氯甲基二乙胺, Mustargen<sup>®</sup>);链脲菌素(Zanosar<sup>®</sup>);噻替哌(也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA, Thioplex<sup>®</sup>);环磷酰胺(Endoxan<sup>®</sup>、Cytosan<sup>®</sup>、Neosar<sup>®</sup>、Procytox<sup>®</sup>、Revimmune<sup>®</sup>);和苯达莫司汀HCl(Treanda<sup>®</sup>)。

[0303] 合适的mTOR抑制剂的实例包含但不限于替西罗莫司(temsirolimus)、雷帕洛莫司(ridaforolimus)(地磷莫司(deferolimus))、AP23573、MK8669、依维莫司(everolimus)(Afimtor<sup>®</sup>或RAD001)、雷帕霉素(rapamycin)(AY22989, Sirolimus<sup>®</sup>)和XL765。

[0304] 合适的免疫调节剂的实例包含但不限于阿夫妥珠单抗(afutuzumab)、培非格司亭(pegfilgrastim)(Neulasta<sup>®</sup>)、来那度胺(CC-5013, Revlimid<sup>®</sup>)、沙利度胺(Thalomid<sup>®</sup>)、阿克替米(actimid)(CC4047)和IRX-2。

[0305] 合适的蒽环的实例包含但不限于多柔比星(Adriamycin<sup>®</sup>和Rubex<sup>®</sup>);博来霉素(bleomycin)(lenoxane<sup>®</sup>);柔红霉素(盐酸柔红霉素、道诺明(daunomyem)和盐酸红比霉素(rubidomycin hydrochloride), Cerubidine<sup>®</sup>);柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体, DaunoXome<sup>®</sup>);米托蒽醌(DHAD, Novantrone<sup>®</sup>);表柔比星(epirubicin)(Ellence<sup>™</sup>);伊达比星(Idamycin<sup>®</sup>、IdamycinPES<sup>®</sup>);丝裂霉素C(Mutamycin<sup>®</sup>);格尔德霉素(geldanamycin);除莠霉素(herbimycin);拉维霉素(ravidomycin);和脱乙酰基艾拉维多霉素(desacet lraividomycin)。

[0306] 合适的长春花生物碱的实例包含但不限于酒石酸长春瑞滨(Navelbine<sup>®</sup>)、长春新碱(Oncovin<sup>®</sup>)和长春地辛(Eldisine<sup>®</sup>);长春花碱(也称为硫酸长春花碱、长春花碱硫酸盐(vincal leukoblastine)和VLB, Alkaban-AQ<sup>®</sup>和Velban<sup>®</sup>);和长春瑞滨(Navelbme<sup>®</sup>)。

[0307] 合适的蛋白酶体抑制剂的实例包含但不限于硼替佐米(Velcade<sup>®</sup>);卡非佐米(carfilzomib);马里佐米(marizomib)(NPI-0052);柠檬酸伊沙佐米(ixazomib citrate)(MLN-9708);德兰佐米(delanzomib)(CEP-18770);和ONX-0912。

[0308] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与CD20抑制剂(例如,抗CD20抗体)或其片段组合施用。示例性抗CD20抗体包含但不限于利妥昔单抗(rituximab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、阿托珠单抗(obinutuzumab)、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、奥卡拉珠单抗(ocaratuzumab)和Prol31921。

[0309] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与溶瘤病毒组合施用。在一些实施方案中,溶瘤病毒能够在癌细胞中选择性地复制并且触发癌细胞的死亡或减缓癌细胞的生长。在一些情况下,溶瘤病毒对非癌细胞无影响或影响很小。合适的溶瘤病毒包含但不限

于溶瘤腺病毒、溶瘤单纯疱疹病毒、溶瘤逆转录病毒、溶瘤细小病毒、溶瘤牛痘病毒、溶瘤辛德毕斯病毒(oncolytic Sindbis virus)、溶瘤流感病毒、或溶瘤RNA病毒(例如溶瘤呼肠孤病毒、溶瘤新城疫病毒(Newcastle Disease Virus;NDV)、溶瘤麻疹病毒、或溶瘤水泡性口炎病毒(VSV))。在一些实施方案中,溶瘤病毒是重组溶瘤病毒。

[0310] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如,SHP-1抑制剂或SHP-2抑制剂)组合施用于受试者。在一个实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与激酶抑制剂组合使用。合适的激酶抑制剂的实例包含但不限于CDK4抑制剂、CDK4/6抑制剂、BTK抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、mTOR抑制剂、MNK抑制剂和间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂。

[0311] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与骨髓源性抑制细胞(MDSC)的调节剂组合施用于受试者。MDSC在很多实体瘤的外周和肿瘤部位积聚。这些细胞压制T细胞反应,从而阻碍表达嵌合受体的细胞疗法的功效。不受理论的束缚,据信MDSC调节剂的施用增强本公开的经遗传修饰的细胞的功效。合适的MDSC的调节剂的实例包含但不限于MCS110和BLZ945。

[0312] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与抑制或降低免疫抑制性浆细胞的活性的药剂组合施用于受试者。免疫抑制性浆细胞已经显示出会阻碍T细胞依赖性免疫原性化学疗法,诸如奥沙利铂(Shalapour等人,《自然(Nature)》2015,521:94-101)。在一个实施方案中,免疫抑制性浆细胞可以表达IgA、白介素(IL)-10和PD-L1中的一者或多者。

[0313] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15Ra)多肽或者IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合一起施用于受试者。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15Ra)多肽或者IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合。

[0314] 在一些实施方案中,向患有骨髓疾病(例如,AML)的受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与药剂(例如,细胞毒性剂或化疗剂)、生物疗法(例如,抗体,例如,单克隆抗体,或细胞疗法)或抑制剂(例如,激酶抑制剂)的组合。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与细胞毒性剂的组合,所述细胞毒性剂例如CPX-351(Celator Pharmaceuticals)、阿糖胞苷、柔红霉素、沃沙洛星(vosaroxin)(Sunesis Pharmaceuticals)、沙帕西他滨(sapacitabine)(Cyclacel Pharmaceuticals)、伊达比星或米托蒽醌。CPX-351是包含摩尔比为5:1的阿糖胞苷和柔红霉素的脂质体制剂。在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的表达嵌合受体的细胞与低甲基化剂的组合,所述低甲基化剂例如DNA甲基转移酶抑制剂,例如氮杂胞苷或地西他滨(decitabine)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与生物治疗剂的组合,所述生物治疗剂例如抗体或细胞治疗剂,例如225Ac-林妥珠单抗(lintuzumab)(Actimab-A;Actinium Pharmaceuticals)、IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)或吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg;Pfizer)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与FLT3抑制剂的组合,所述FLT3抑制剂例如索拉非尼(sorafenib)(Bayer)、米哌妥林(midostaurin)(Novartis)、奎扎替尼(quizartinib)(Daiichi Sankyo)、克莱拉尼(crenoianib)(Arog Pharmaceuticals)、PLX3397(Daiichi Sankyo)、AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)或

ASP2215 (Astelias)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 抑制剂的组合,所述异柠檬酸脱氢酶抑制剂例如AG-221 (Celgene/Agios) 或AG-120 (Agios/Celgene)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与细胞周期调节剂的组合,所述细胞周期调节剂例如Polo样激酶1 (Plk1) 的抑制剂,例如伏拉塞替 (volasertib) (Boehringer Ingelheim);或细胞周期蛋白依赖性激酶9 (Cdk9) 的抑制剂,例如阿伏西地 (alvocidib) (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与B细胞受体信号传导网络抑制剂的组合,所述B细胞受体信号传导网络抑制剂例如B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 抑制剂,例如维奈妥拉 (venetoclax) (Abbvie/Roche);或Button酪氨酸激酶 (Btk) 的抑制剂,例如依鲁替尼 (ibrutinib) (Pharmacyclics/Johnson&Johnson Janssen Pharmaceutical)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与M1氨基肽酶的抑制剂;组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 的抑制剂,例如普西司他 (pracinostat) (MEI Pharma);多激酶抑制剂,例如瑞格色替 (rigosertib) (Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio);或肽CXCR4反激动剂,例如BL-8040 (BioLineRx) 的组合。

[0315] 在一些实施方案中,可以向受试者施用增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性或适合性的药剂。例如,药剂可以抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子。在一些实施方案中,调节或调控T细胞功能的分子是抑制性分子。在一些实施方案中,抑制性分子 (诸如程序性死亡1 (PD-1)) 可以降低经遗传修饰的细胞产生免疫效应子反应的能力。合适的抑制性分子的实例包括但不限于PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM (例如,CEACAM-1、CEACAM-3 和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LIR-1 (LILRB1)、CD 160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGF $\beta$ 。调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的抑制,例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上抑制,可以优化本公开的经遗传修饰的细胞的性能。在一些实施方案中,药剂,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 或锌指核酸内切酶 (ZFN),可以用于抑制经遗传修饰的细胞中的抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以被进一步修饰为表达抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 或锌指核酸内切酶 (ZFN),可以用于抑制经遗传修饰的细胞中的抑制性分子的表达。

[0316] 在一个实施方案中,调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的药剂在本公开的经遗传修饰的细胞内被抑制。在此类实施方案中,抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子连接至编码本公开的嵌合受体的组分 (例如,所有组分) 的核酸。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子可操作地连接至启动子,例如HI或U6衍生的启动子,以使得抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子被表达,例如在经遗传修饰的细胞内表达。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子存在于包含编码嵌合受体的组分 (例如,所有组分) 的核酸分子的同一体 (例如,慢病毒载体) 上。在这种实施方案中,编码抑制调节或调控 (例如抑制) T细胞功能的分子的表达的

dsRNA分子的核酸分子定位于载体(例如,慢病毒载体)上编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸的5'-或3'-端。编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子可以在与编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸相同或不同的方向上转录。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子存在于除了包含编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸分子的载体之外的载体上。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子在经遗传修饰的细胞内瞬时表达。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子被稳定地整合进本公开的经遗传修饰的细胞的基因组中。

[0317] 在一个实施方案中,调节或调控(例如抑制)T细胞功能的药剂可以是结合至抑制性分子的抗体或抗体片段。例如,药剂可以是结合至PD-1、PD-L1、PD-L2或CTLA4的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,药剂是结合到TIM3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,药剂是结合到LAG3的抗体或抗体片段。

[0318] 在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是CEACAM抑制剂(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5抑制剂)。在一个实施方案中,CEACAM的抑制剂是抗CEACAM抗体分子。在一个实施方案中,增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性的药剂是miR-17-92。在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是CD40L。在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是GM-CSF。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达结合到本公开的抑制性分子的抗体或抗体片段。

[0319] 在一个实施方案中,增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性的药剂是细胞因子。细胞因子具有涉及免疫反应性细胞扩增、分化、存活和稳态的重要功能。可以施用于接受本公开的经遗传修饰的细胞的受试者的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、L-15、IL-18和IL-21或它们的组合。细胞因子可以每天施用一次或每天施用多次,例如每天施用两次、每天施用三次或每天施用四次。细胞因子可以施用持续超过一天,例如细胞因子施用持续2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周。例如,细胞因子每天施用一次,持续7天。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达一种或多种细胞因子,诸如IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、L-15、IL-18和IL-21。

[0320] 在一些实施方案中,细胞因子可以与经遗传修饰的细胞同时或同步施用,例如,在同一天施用。细胞因子可以在与经遗传修饰的细胞相同的药物组合物中制备,或者可以在单独的药物组合物中制备。或者,细胞因子可以在施用经遗传修饰的细胞之后不久施用,例如在施用经遗传修饰的细胞之后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天施用。在超过一天的施用方案中施用细胞因子的一些实施方案中,细胞因子施用方案的第一天可以与经遗传修饰的细胞的施用同一天,或者细胞因子施用方案的第一天可以是在施用经遗传修饰的细胞之后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在一个实施方案中,在第一天,经遗传修饰的细胞被施用于受试者,在第二天,细胞因子在接下来7天内的每天施用一次。在一些实施方案中,细胞因子在施用经遗传修饰的细胞之后施用持续一段时间,例如在施用经遗传修饰的细胞之后至少2周、3周、4周、6周、8周、10周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或1年或更长的时间。在一个实施方案中,细胞因子在评估受试者对经遗传修饰的细胞的反应之后施用。

[0321] 试剂盒

[0322] 本公开的某些方面涉及用于治疗 and/或预防癌症 (例如, AML) 或其他疾病 (例如, 免疫相关或自身免疫性疾病) 的试剂盒。在某些实施方案中, 试剂盒包含治疗性或预防性组合物, 所述组合物包含有效量的一种或多种蛋白质, 所述蛋白质包含本公开的抗原结合结构域 (例如, scFv) (诸如本公开的嵌合受体)、本公开的分离的核酸、本公开的载体和/或本公开的细胞 (例如, 免疫反应性细胞)。在一些实施方案中, 试剂盒包括无菌容器。在一些实施方案中, 此类容器可以是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋子、囊袋、泡罩包装或本领域中已知的其他合适的容器形式。容器可以由塑料、玻璃、层合纸、金属箔或适合容纳药物的其他材料制成。

[0323] 在一些实施方案中, 治疗性或预防性组合物与用于将治疗性或预防性组合物施用于患有癌症 (例如, AML) 或有发展成癌症的风险的受试者的说明一起提供。在一些实施方案中, 说明可以包括关于使用组合物来治疗和/或预防障碍的信息。在一些实施方案中, 说明书包含但不限于治疗或预防组合物的描述、剂量时间表、用于治疗或预防病症或其症状的施用时间表、预防措施、警告、适应症、反适应症、过度剂量信息、不良反应、动物药理学、临床研究 and/或参考文献。在一些实施方案中, 说明书可以直接印刷在容器 (当存在时) 上, 或者作为施加至容器的标签, 或者作为在容器中或与容器一起提供的单独纸张、小册子、卡片或文件夹。

[0324] 列举的实施方案

[0325] Embodiment 1: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,

[0326] a. 其中所述 VH 包含具有 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的 VH 互补区 1 (CDRH1)、具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 VH 互补区 2 (CDRH2) 和具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 VH 互补区 3 (CDRH3);

[0327] b. 其中所述 VL 包含具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 VL 互补区 1 (CDRL1)、具有 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的 VL 互补区 2 (CDRL2) 和具有 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 VL 互补区 3 (CDRL3); 并且

[0328] c. 其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0329] Embodiment 2: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,

[0330] a. 其中所述 VH 包含具有选自 SEQ ID NO: 2-5 组成的组的氨基酸序列的 VH 互补区 1 (CDRH1)、具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 VH 互补区 2 (CDRH2) 和具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 VH 互补区 3 (CDRH3);

[0331] b. 其中所述 VL 包含具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的 VL 互补区 1 (CDRL1)、具有 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列的 VL 互补区 2 (CDRL2) 和具有 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 VL 互补区 3 (CDRL3), 并且

[0332] c. 其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0333] Embodiment 3: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,

[0334] a. 其中所述 VH 包含具有选自 SEQ ID NO: 2-5 组成的组的氨基酸序列的 VH 互补区

1 (CDRH1)、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH互补区2 (CDRH2) 和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH互补区3 (CDRH3); 并且

[0335] b. 其中所述VL包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL互补区1 (CDRL1)、具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL互补区2 (CDRL2) 和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL互补区3 (CDRL3)。

[0336] Embodiment 4: 如实施方案2或实施方案3所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述CDRH1具有如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0337] Embodiment 5: 如实施方案1至4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。

[0338] Embodiment 6: 如实施方案5所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0339] Embodiment 7: 如实施方案1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

[0340] Embodiment 8: 如实施方案7所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

[0341] Embodiment 9: 如实施方案1至8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0342] Embodiment 10: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VH包含重链互补决定区1 (CDR-H1)、重链互补决定区2 (CDR-H2) 和重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3包含在具有选自由SEQ ID NO:12-19组成的组的氨基酸序列的VH内, 并且其中所述VL包含轻链互补决定区1 (CDR-L1)、轻链互补决定区2 (CDR-L2) 和轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3包含在具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VL内。

[0343] Embodiment 11: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含可变重链 (VH) 区和可变轻链 (VL) 区, 其中所述VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0344] Embodiment 12: 一种特异性结合至人内皮粘蛋白 (EMCN) 的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述分离的抗体或其抗原结合片段包含可变重链 (VH) 区和可变轻链 (VL) 区, 其中所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

[0345] Embodiment 13: 如实施方案10至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。

[0346] Embodiment 14: 如实施方案13所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH具有如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0347] Embodiment 15: 如实施方案10至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中

所述VH具有选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19。

[0348] Embodiment 16:如实施方案15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH具有如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。

[0349] Embodiment 17:如实施方案10和实施方案12至16中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VL具有如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0350] Embodiment 18:如实施方案1至17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。

[0351] Embodiment 19:如实施方案18所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段包括F(ab)片段、F(ab')片段或单链可变片段(scFv)。

[0352] Embodiment 20:如实施方案19所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段包括单链可变片段(scFv)。

[0353] Embodiment 21:如实施方案20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开。

[0354] Embodiment 22:如实施方案21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。

[0355] Embodiment 23:如实施方案21或实施方案22所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述肽接头包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:21-37。

[0356] Embodiment 24:如实施方案20至23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述scFv包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID No:65、67、69和70。

[0357] Embodiment 25:一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含如实施方案1至24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、以及异源性分子或部分。

[0358] Embodiment 26:如实施方案25所述的嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是抗体-药物缀合物,并且其中所述异源性分子或部分包含治疗剂。

[0359] Embodiment 27:如实施方案25所述的嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述异源性分子或部分包含选自由以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。

[0360] Embodiment 28:如实施方案27所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含跨膜结构域。

[0361] Embodiment 29:如实施方案27或实施方案28所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含一个或多个胞内信号传导结构域。

[0362] Embodiment 30:如实施方案27至29中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR是包含刺激免疫反应的一个或多个胞内信号传导结构域的活化性CAR。

[0363] Embodiment 31:如实施方案27至29中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR是包含抑制免疫反应的一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR。

[0364] Embodiment 32:如实施方案31所述的嵌合蛋白,其中所述胞内抑制性结构域包含酶抑制性结构域。

[0365] Embodiment 33:如实施方案31或实施方案32所述的嵌合蛋白,其中所述胞内抑制

性结构域包括胞内抑制性共信号传导结构域。

[0366] Embodiment 34:如实施方案27至33中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含在所述抗原结合结构域与所述跨膜结构域之间的间隔区。

[0367] Embodiment 35:如实施方案34所述的嵌合蛋白,其中所述间隔区具有选自由SEQ ID NO:41-52组成的组的氨基酸序列。

[0368] Embodiment 36:一种组合物,所述组合物包含如实施方案1至24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或者如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0369] Embodiment 37:一种工程化核酸,所述工程化核酸编码如实施方案1至24中任一项所述的抗体或抗原结合片段或者如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白。

[0370] Embodiment 38:一种表达载体,所述表达载体包含如实施方案37所述的工程化核酸。

[0371] Embodiment 39:一种组合物,所述组合物包含如实施方案37所述的工程化核酸或如实施方案38所述的表达载体以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0372] Embodiment 40:一种制备工程化细胞的方法,所述方法包括用如实施方案37所述的工程化核酸或如实施方案38所述的表达载体来转导分离的细胞。

[0373] Embodiment 41:一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如实施方案37所述的工程化核酸、如实施方案38所述的表达载体或如实施方案39所述的组合物。

[0374] Embodiment 42:一种工程化细胞群,所述工程化细胞群表达如实施方案37所述的工程化核酸或如实施方案38所述的表达载体。

[0375] Embodiment 43:一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如实施方案1至24中任一项所述的抗原结合片段或者如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白。

[0376] Embodiment 44:一种工程化细胞群,所述工程化细胞群表达如实施方案1至24中任一项所述的抗原结合片段或者如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白。

[0377] Embodiment 45:如实施方案41至44中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述嵌合蛋白是重组表达的。

[0378] Embodiment 46:如实施方案41至45中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述嵌合蛋白从载体或来自所述细胞的基因组的选定基因座表达。

[0379] Embodiment 47:如权利要求41至46中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。

[0380] Embodiment 48:如实施方案47所述的细胞或细胞群,其中所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每种是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体。

[0381] Embodiment 49:如实施方案41至48中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群选自由以下各项组成的组:T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)

和iPSC源性细胞。

[0382] Embodiment 50:如实施方案41至49中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞是自体的。

[0383] Embodiment 51:如实施方案41至49中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞是同种异体的。

[0384] Embodiment 52:一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的如实施方案41至51中任一项所述的细胞或工程化细胞群和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0385] Embodiment 53:一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的表达如实施方案1至24中任一项所述的抗原结合片段或者如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白的经遗传修饰的细胞以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0386] Embodiment 54:如实施方案52或实施方案53所述的药物组合物,用于治疗 and/或预防肿瘤。

[0387] Embodiment 55:一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如实施方案36或实施方案39所述的组合物、或者如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一者或者如实施方案52或实施方案53所述的药物组合物。

[0388] Embodiment 56:一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括向患有肿瘤的受试者施用治疗有效剂量的如实施方案36或实施方案39所述的组合物、或者如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一者或者如实施方案52或实施方案53所述的组合物。

[0389] Embodiment 57:如实施方案56所述的方法,所述方法包括将如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一种施用于所述受试者,其中所述分离的细胞或细胞群表达所述嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含如实施方案31所述的活化性CAR。

[0390] Embodiment 58:一种在受试者中抑制针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括向患有肿瘤的受试者施用治疗有效剂量的如实施方案36或实施方案39所述的组合物、或者如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一者或者如实施方案52或实施方案53所述的组合物。

[0391] Embodiment 59:如实施方案58所述的方法,所述方法包括将如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一种施用于所述受试者,其中所述分离的细胞或细胞群表达所述嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含如实施方案31所述的抑制性CAR。

[0392] Embodiment 60:一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如实施方案36或实施方案39所述的组合物、或者如实施方案41至51中任一项所述的细胞中的任一者或者如实施方案52或实施方案53所述的组合物。

[0393] Embodiment 61:一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含如实施方案25至35中任一项所述的嵌合蛋白。

[0394] Embodiment 62:如实施方案61所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述嵌合蛋白来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0395] Embodiment 63:一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含如实施方案41至51中任一项所述的细胞或细胞群。

[0396] Embodiment 64:如实施方案63所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述细胞来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0397] Embodiment 65:一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含如实施方案41所述的工程化核酸。

[0398] Embodiment 66:如实施方案65所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述核酸来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0399] Embodiment 67:一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包含如实施方案38所述的载体。

[0400] Embodiment 68:如实施方案67所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述载体来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0401] Embodiment 69:一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案36、实施方案39、实施方案52或实施方案53所述的组合物。

[0402] Embodiment 70:如实施方案69所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述组合物来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0403] 实施例

[0404] 以下是本公开的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于本文所提供的一般性描述,可以实践各种其他实施方案。

[0405] 以下是用于进行本公开要求保护的主题的特定实施方案的实施方案。这些实施例仅出于说明的目的提供,并且不旨在以任何方式限制本公开的范围。已经努力确保所用的数字的准确性(例如,数量,温度等),但是当然应允许一些实验误差和偏差。

[0406] 实施例1:人源化抗EMCN抗原结合结构域的构建

[0407] 为了产生人源化抗EMCN抗原结合结构域(例如,scFv),首先,将来自人种系抗体的VH和VL序列与分别地SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64的鼠源性抗EMCN VH和VL序列进行比对。鼠源性抗EMCN VH和VL序列显示于表5中。

[0408] 表5.鼠源性抗EMCN VH和VL序列

	氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0409]	QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRYDMHWVRQPPGQG LEWMGVIVGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTE DTAIYFCTLRIKDWGPGTMVTVSS	63	鼠抗 EMCN VH
	DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPG RSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYY CLQGIHLPWTFGGGKLELK	64	鼠抗 EMCN VL

[0410] 然后,将CDR周围的框架区(按照Kabat注释和编号方案指定)替换为人种系抗体序列。对于重链人序列,选择可变重链3-23和3-33作为框架区。对于轻链,选择可变κ链2-30作为框架区。VH 3-23、VH 3-33和VK 2-30的种系序列如表6所示。

[0411] 表6.VH 3-23、VH 3-33和VK 2-30的种系序列

	氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0412]	H	65	人种系 VH 3-23

	氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0413]	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDAFDVGQGMVTVSS	66	人种系 VH 3-33
	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDGNTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQGTHTWPTYFGQGTKLEIK	67	人种系 VK 3-30

[0414] 对于基于VH 3-33的人源化VH,添加了附加突变以将位置50和52回复突变为鼠抗EMCN中存在的残基。另外,对于基于2-23和2-33的人源化VH,CDR-H1被工程化为匹配Chothia注释和编号方案指定的CDR的位置3和4处的人种系序列。

[0415] 然后,使用与人源化VL区(“VL 2-30”)配对的两个人源化VH区(“VH 3-23”和“VH 3-33”)中的每一个对单链可变片段(scFv)进行工程化。对于每个VH/VL组合,构建了两个取向(从N-末端至C-末端),即VH-肽接头-VL和VL-肽接头-VH。对于所有scFv,均使用G4S3肽接头。序列提供于表7中。

[0416] 表7. 人源化抗EMCN抗体scFv序列

	氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAP GKGLEWVSVIWDGNGNTHYHSALKSRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTLRIDWVGQGMVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVASENTYLN WFQQRPGQSPRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIK	68	SB02927 scFv - EMCN VH3-23 V1 _ G4S3 _ EMCN VK2-30
[0417]	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTC ACCTTCAGCAGATACGATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGTGATCTGGGGCAAC GGCAACACACACTACCACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTTAC CATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCTGAGAATCAAGGATTGGGGCCAGGGCACCATGGT CACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGA AGTGGCGGAGGCGGTTCTGACGTGGTCATGACACAGAGCC CTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGACAGCCTGCCAGCATC AGCTGCAAGTCTAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGA ACACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGAGGCCCCGGACAGTCT CCTAGACGGCTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGATAGCGG CGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT TCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGG CGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGGACCT TTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAG	69	SB02927 scFv DNA
	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAP GKGLEWVAVIWDGNGNTHYHSALKSRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTLRIDWVGQGMVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVASENTYLN WFQQRPGQSPRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIK	70	SB02928 scFv - EMCN VH3-33 V1_G4S3_ EMCN VK2-30

[0418]

氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
CAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGCCGGAGTTGTGCAGCC TGGCAGAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCAGCAGATACGATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCT GGCAAAGGACTTGAATGGGTTGCCGTGATCTGGGGCAACG GCAACACACACTATCACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTTCCACC ATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCCGCGTGTACTACTG CACCCTGAGAATCAAGGATTGGGGCCAGGGCACCATGGTC ACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGCCGGAGGAA GTGGCGGAGGCGGTTCTGACGTGGTCATGACACAGAGCCC TCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCA GCTGCAAGTCTAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAA CACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTC CTAGACGGCTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGATAGCGGC GTGCCCGATAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTT CACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGC GTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGGACCTT GGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAG	71	SB02928 scFv DNA
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVSDENTYLNWFQQ RPGQSPRRLLIQVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGK GLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCTLR IKDWGQGMVTVSS	72	SB02929 scFv - EMCN VK2-30 G4S3_ EMCN VH3-23 V1_
GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGAC ACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGTCTAGCCAGT CTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTGAACTGGTTC CAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACC AGGTGTCCAAGCTGGATAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCT GGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCA GAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTCTGCA AGGCATCCATCTGCCTTGGACCTTGGCCAGGGCACAAAGC TGGAAATCAAGGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAG TGGCGGAGGCGGTTCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCG GAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGT GCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGATACGATATGCACTG GGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCC GTGATCTGGGGCAACGGCAACACACTACCACAGCGCCC TGAAGTCCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACCGCCGTGACTACTGCACCCTGAGAAATCAAGGATTGGGG CCAGGGCACCATGGTCACCGTTTCTTCT	73	SB02929 scFv DNA
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVSDENTYLNWFQQ RPGQSPRRLLIQVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPG KGLEWVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTLR IKDWGQGMVTVSS	74	SB02930 scFv - EMCN VK2-30 G4S3_ EMCN VH3- 33 V1
GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGAC ACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGTCTAGCCAGT CTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTGAACTGGTTC CAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACC AGGTGTCCAAGCTGGATAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCT GGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCA	75	SB02930 scFv DNA

	氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0419]	GAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTCTGCA AGGCATCCATCTGCCTTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGC TGGAAATCAAGGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAG TGGCGGAGGCGGTTCTCAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTG GCGGAGTTGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCTTGT GCCGCCAGCGGCTTACCTTACAGCAGATACGATATGCACTG GGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTTGCC GTGATCTGGGGCAACGGCAACACACTATCACAGCGCCC TGAAGTCCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCACCCTGAGAATCAAGGATTGGGG CCAGGGCACCATGGTCAACCGTTTCTTCT		

[0420] 活化性嵌合抗原受体 (aCAR) 被工程化为包含人源化抗EMCN抗原结合结构域。所产生的人源化抗EMCN aCAR的构造和序列如表8所示。每个aCAR包含CD8信号序列和位于scFV的N-末端的FLAG标签、CD28跨膜(TM) 结构域、CD28胞内结构域(ICD) 和CD3ζ活化结构域。

[0421] 表8. 包含人源化抗EMCN scFv的CAR-T

	氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0422]	ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTG CTTCTGCATGCTGCTAGACCTGCCGGCGGAAGCGACTACAA GGACGACGATGACAAAGGCGGCAGCGAGGTGCAGCTGGTT GAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTACAGCAGATACG ATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTGA ATGGGTGTCCGTGATCTGGGGCAACGGCAACACACTAC CACAGCGCCCTGAAGTCCCAGTTCACCATCTCCAGAGACAA CAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCACCCTGAGAATCA AGGATTGGGGCAGGGCACCATGGTCAACCGTTTCTTCTGGA GGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTT CTGACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTG ACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGTCTAGCC AGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTGAACTG GTTCCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCCTAGACGGCTGATCT ACCAGGTGTCCAAGCTGGATAGCGGCGTGCCCCGATAGATTT TCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTACCCCTGAAGATCAG CAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTCTG CAAGGCATCCATCTGCCTTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAA GCTGGAATCAAGGCCGCTGCTATCGAAGTGATGTACCCTC CTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATC CACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCCTTCTCCACTGTTCCC CGGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCG GCGTGCTGGCCTGTTATTCCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCAC TCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCAA CCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTC GCCGCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCG ATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAA CGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTG	76	SB02927 CAR DNA Seq- CD8ss-Flag - EMCN VH3-23 _ G4S3 _ EMCN VK2-30 - CD28TM- CD28ICD-CD3z

[0423]

氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGC CCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCT GCAAAAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGA ATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA CTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTATG ATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGA		
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDKGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKGLE WWSVIWGNNGNTHYHSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTLRKIDWQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDV VMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLVASDENTYLNWFQQR GQSPRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIKAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIHVKGKHLCPSPFLPSPKPFVWLVVVGGLVACYSLLVT VAFIFWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRRDPKEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR	77	SB02927 CAR AA Seq
ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTG CTTCTGCATGCTGCTAGACCTGCCGGCGGAAGCGACTACAA GGACGACGATGACAAAGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGGTT GAATCTGGTGGCGGAGTTGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGA GACTGTCTTGTGCCGCCAGCGCTTACCTTCAGCAGATAC GATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTG AATGGGTTGCCGTGATCTGGGGCAACGGCAACACACACTA TCACAGCGCCCTGAAGTCCCAGTTCACCATCTCCAGAGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCCTGTACTACTGCACCCTGAGAATC AAGGATTGGGGCCAGGGCACCATGGTCAACGTTTCTTCTGG AGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGT TCTGACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGT GACACTGGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGTCTAGC CAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTGAACTG GTTCCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCCTAGACGGCTGATCT ACCAGGTGKCAAGCTGGATAGCGGCGTGCCCGATAGATTT TCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTACCCTGAAGATCAG CAGAGTGGAAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTCTG CAAGGCATCCATCTGCCTTGGACCTTTGGCCAGGGCACAAA GCTGGAAATCAAGGCCGCTGCTATCGAAGTGATGTACCCTC CTCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATC CACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCCCTTCCACTGTTCCC CGGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCG GCGTGTGGCCTGTTATTCCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCA TCATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCAC TCCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCAA CCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTC GCCGCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCG ATGCTCCCCCCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAA CGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTG GACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGC CCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCT GCAAAAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGA ATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA CTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTATG ATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGA	78	SB02928 CAR DNA Seq - CD8ss-Flag- EMCN VH3- 33_G4S3_ EMCN VK2-30 - CD28TM-CD281CD-CD3z
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDKGGGQVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKGLE	79	SB02928 CAR AA Seq

[0424]

氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
WVAVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTLRKIDWQGMVTVSSGGGSGGGGSGGGSDV VMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLVSDENTYLNWFQQR GQSPRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIKAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR		
ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTG CTTCTGCATGCTGCTAGACCTGCCGGCGGAAGCGACTACAA GGACGACGATGACAAAGGCGGCAGCGACGTGGTCATGACA CAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGACAGCCTGC CAGCATCAGCTGCAAGTCTAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCG ACGAGAACACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGAGGCCCGG ACAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACCAGGTGTTCCAAGCTGG ATAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGC ACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGG ACGTGGGCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCT TGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAATCAAGGGAG GCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTT TGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCAGATACGATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGTGATCTGGGGCAAC GGCAACACACACTACCACAGCGCCCTGAAGTCCCGTTTAC CATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GCACCTGAGAATCAAGGATTGGGGCCAGGGCACCATGGT CACCGTTTCTTCTGCCGCTGCTATCGAAGTGATGTACCCTCC TCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCC ACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCCCTTCTCCACTGTTCCCC GGACTGACCAAGCCTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGG CGTCTGGCTGTTATTCCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCAT CATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCACT CCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCAAC CAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCG CCGCCTACCGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGAT GCTCCCCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACG AGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCC AGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC AAAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC	80	SB02929 CAR DNA Seq- CD8ss-Flag-EMCN VK2- 30_G4S3_EMCN VH3-23- CD28TM-CD28ICD-CD3z
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDKGGSDVVM TQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLVSDENTYLNWFQQRPG QS PRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDV GVVYCLQGIHLPWTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVSSGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYDMHWVRQAPG KGLEWVSVIWGNGNTHYHSALKSRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTLRKIDWQGMVTVSSAAAIEVMYPPPY LDNEKSNGTIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGVLAC YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYS	81	SB02929 CAR AA Seq
ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTG CTTCTGCATGCTGCTAGACCTGCCGGCGGAAGCGACTACAA	82	SB02930 CAR DNA Seq - CD8ss-Flag-EMCN VK2-

氨基酸/核酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0425] GGACGACGATGACAAAGGCGGCAGCGACGTGGTCATGACA CAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACTGGGACAGCCTGC CAGCATCAGCTGCAAGTCTAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCG ACGAGAACACCTACCTGAACTGGTTCAGCAGAGGCCCGG ACAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGG ATAGCGCGTGCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGC ACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAAGCCGAGG ACGTGGGCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCT TGGACCTTTGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGGGAG GCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTTT TCAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGAGTTGTGCAGC CTGGCAGAAGCCTGAGACTGTCTGTGCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCAGATACGATATGCACTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAATGGGTGCGCGTATCTGGGGCAAC GGCAACACACACTATCACAGCGCCCTGAAGTCCCAGTTTAC CATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCTGAGAGCCGAGGACACCCCGTGTACTACT GCACCTGAGAATCAAGGATTGGGGCCAGGGACCATGGT CACCGTTTCTTCTGCCGCTGCTATCGAAGTGATGTACCCTCC TCCTTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCC ACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGTCTTCTCCACTGTTCCCC GGACCTAGCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGG CGTGCTGGCCTGTTATTCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCAT CATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCAGACTGCTGCACT CCGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCCGGACCAAC CAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCG CCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAAGTTCAGCAGATCCGCCGAT GCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACG AGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAGATGGGCGGCAAGCCC AGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC AAAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAAT GAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGACT GTACCAGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGATACTATGAT GCCCTGCATGCAGGCCCTGCCTCCAAGA		30_G4S3_EMCN VH3-33- CD28TM-CD28ICD-CD3z
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDKGGSDVVM QSPLSLPVTLQGPASISCKSSQSLVASDENTYLNWFQQRPGQ PRRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVY YCLQGIHLPWTFQGQTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLV ESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSRYDMHWVRQAPGKGLEW VAVIWGNNGNTHYHSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAED TAVYYCTLRKDWGQGMVTVSSAAAEVMPYPPYLDNEKSN GTIIVKVKHLCPSPLFPGPSKPFVVLVVGVLACYSLLVTV AFIIWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKHDGLYQLSTATKDTYDALHMQALPPR	83	SB02930 CAR AA Seq

[0426] 实施例2:人源化抗EMCN抗原结合结构域在T细胞杀伤测定中维持结合功能

[0427] 进行CAR细胞杀伤测定,以评估人源化抗EMCN抗原结合结构域是否使CAR有效地靶向至表达EMCN的细胞。将人源化抗EMCN scFv的功能与具有亲本鼠抗EMCN抗原结合结构域的活化性CAR进行比较。

[0428] 将如实施例1所示的CAR构建体克隆至逆转录病毒载体中。另外,作为对照,还将包含亲本鼠抗EMCN(“SB02405”)的抗原结合结构域的等同aCAR克隆至逆转录病毒载体中。然后,产生逆转录病毒,并且将此前冷冻并从人供体PBMC分离的原代T细胞用逆转录病毒进行转导以表达CAR。在转导后第9天,将T细胞和表达内皮粘蛋白的靶细胞混合在一起,并进行

共培养(ET比:1:1,96孔板,总培养基体积200u1)。对于靶细胞,对已知表达CAR介导的杀伤的潜在目的癌症靶标(例如,FLT3(CD135)和CD33(SIGLEC3))的两种细胞系(SEM和Mo1m13)各自进行转导以稳定表达EMCN。作为对照,还使用未经转导的SEM细胞和未经转导的Mo1m13。在18小时的共温育后收集细胞,并通过流式细胞术(使用FlowJo软件进行分析)来评估T细胞对靶细胞的细胞毒性,该细胞毒性以杀伤百分比表示。杀伤测定的结果如图1所示。

[0429] 如图1所示,与包含亲本鼠抗EMCN抗原结合结构域的CAR相比,包含人源化抗EMCN抗原结合结构域中的每一个的aCAR诱导至少同样多或更多的表达EMCN的细胞系的杀伤。

[0430] 实施例3:在NK细胞杀伤测定中确认人源化抗EMCN抗原结合结构域功能

[0431] 人源化抗EMCN scFv的功能通过如实施例2所述的T细胞杀伤测定进行评估,并且在在本实施例中,该功能在表达具有人源化抗EMCN抗原结合结构域的活化性CAR的NK细胞的杀伤测定中得到证实。

[0432] 逆转录病毒使用如实施例2中所述的逆转录病毒载体中的每一种来产生。将原代供体来源的NK细胞用逆转录病毒进行转导以表达CAR。在转导后第3天,根据FLAG表位通过流式细胞术来评估CAR的表达。每个CAR的第3天表达如图2所示。如图2所示,包含人源化抗EMCN抗原结合结构域的CAR中的每一个的表达与包含亲本抗原结合结构域的CAR的表达相当。

[0433] 然后,评估CAR NK细胞对靶细胞的杀伤。在转导后七天,将CAR NK细胞和表达内皮粘蛋白的靶细胞(EMCN转导的SEM细胞,如实施例2中所述)混合在一起,并进行共培养(ET比:1:1,96孔板,总培养基体积200u1)。作为对照,还评估了NK细胞对未经转导的SEM细胞的杀伤。在18小时的共温育后收集细胞,并通过流式细胞术(使用FlowJo软件进行分析)来评估T细胞对靶细胞的细胞毒性,该细胞毒性以杀伤百分比表示。杀伤测定的结果如图3所示。

[0434] 如图3所示,与包含亲本鼠抗EMCN抗原结合结构域的CAR相比,表达人源化抗EMCN aCAR的NK细胞诱导至少同样多的表达EMCN的细胞系的杀伤。

[0435] 以引用的方式并入

[0436] 本申请中所引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件出于所有目的据此通过引用以其整体并入,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件被单独地指出为出于所有目的以引用的方式并入。

[0437] 等效物

[0438] 虽然已经说明并描述了各种特定实施方案,但是上文说明书不是限制性的。应当理解,可以在不背离本公开的精神和范围的情况下进行各种变化。在审阅本说明书后,许多变化对本领域技术人员将变得显而易见。

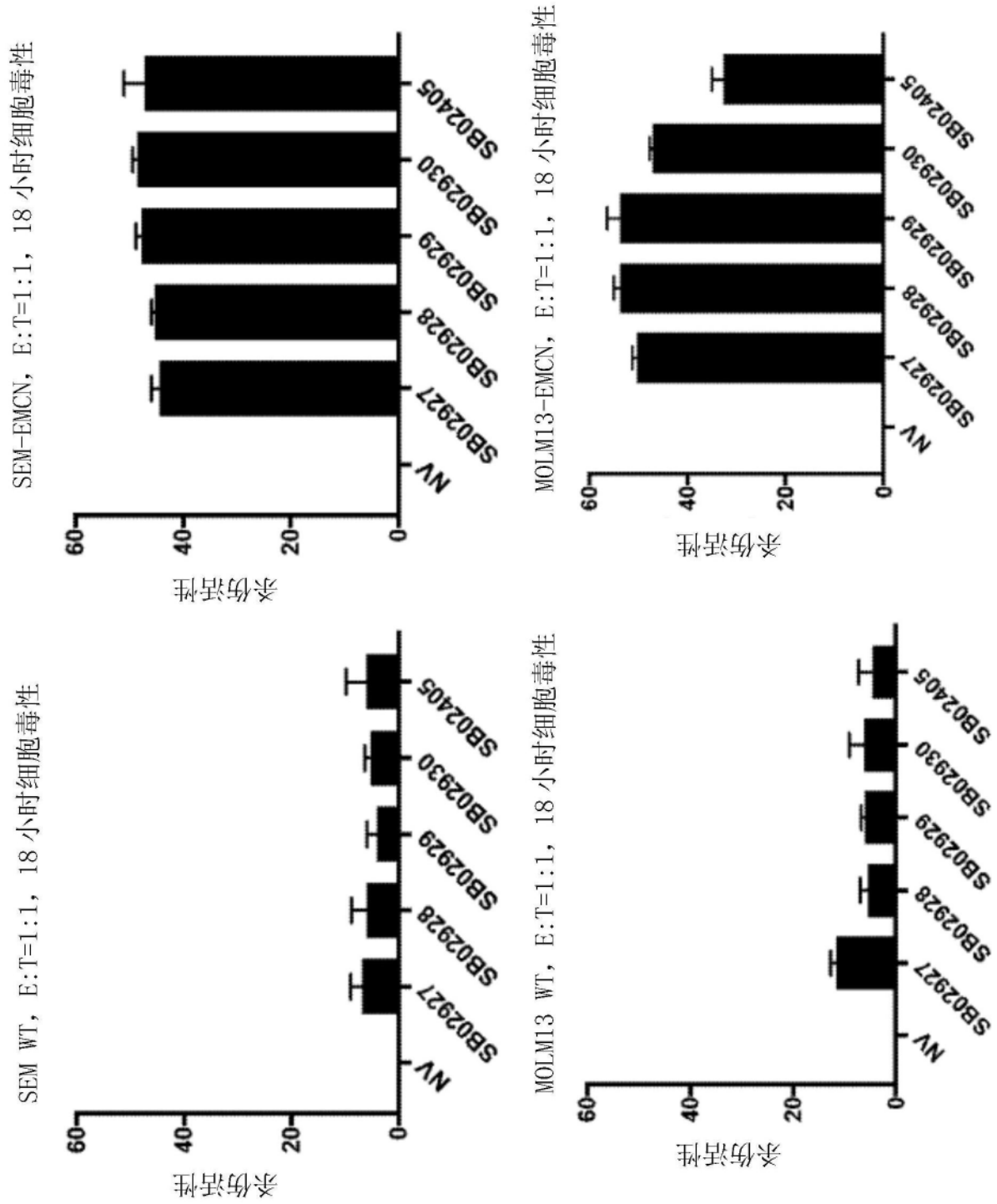


图1

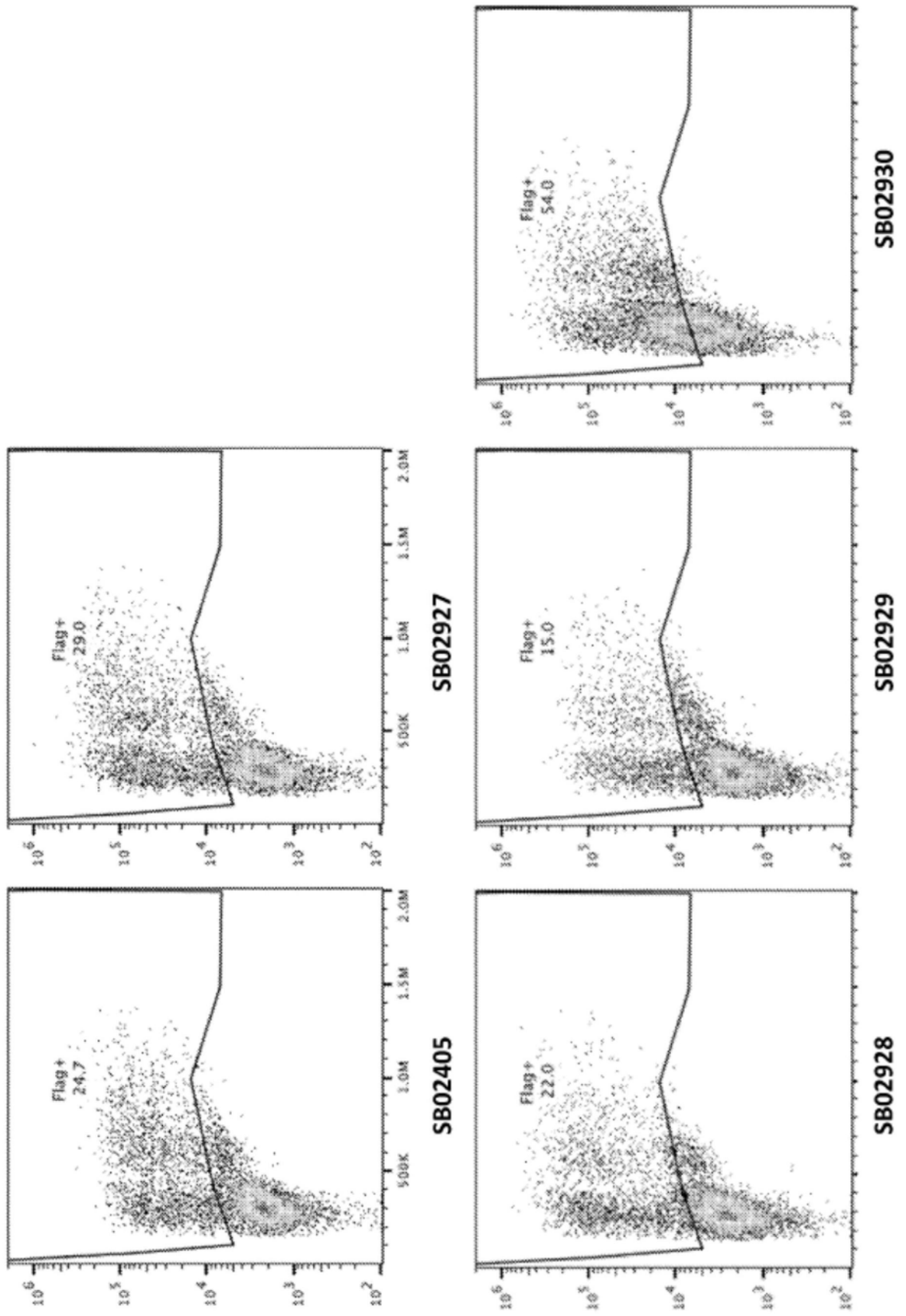
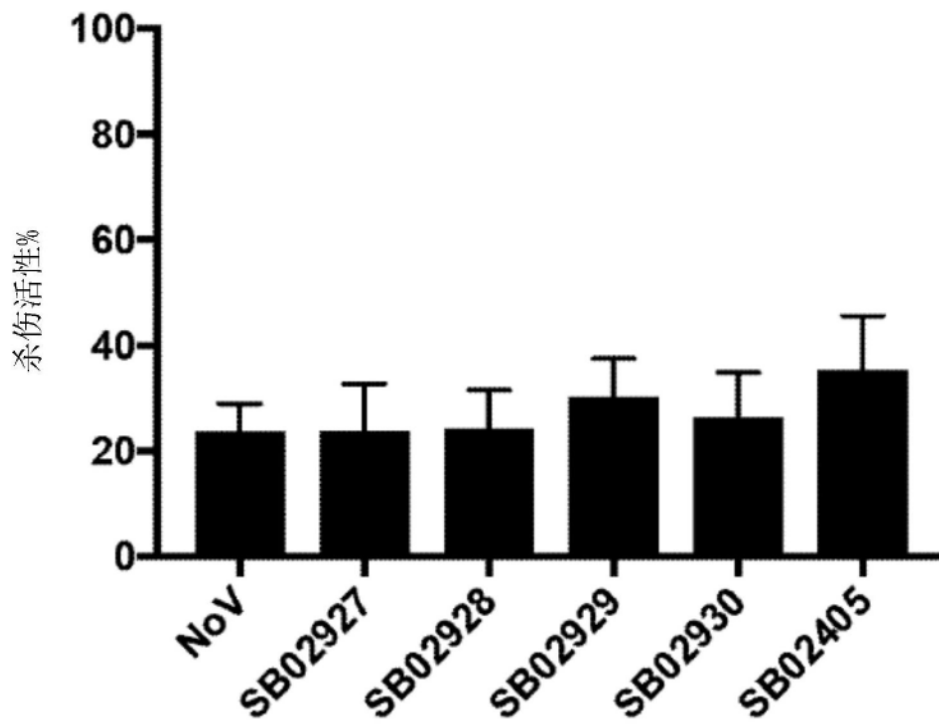


图2

SEM 杀伤测定, E:T=1:1, 18 小时



SEM-EMCN, E:T=1:1 比率, 18 小时细胞毒性

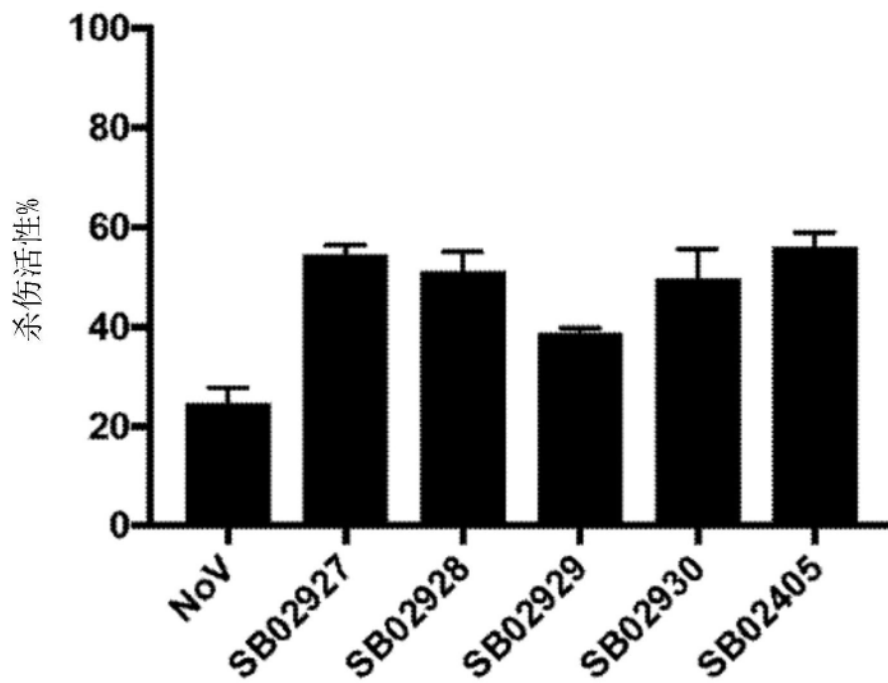


图3