



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107709552 B

(45) 授权公告日 2022.05.13

(21) 申请号 201680033667.9

(22) 申请日 2016.06.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107709552 A

(43) 申请公布日 2018.02.16

(30) 优先权数据  
62/173,701 2015.06.10 US  
62/337,044 2016.05.16 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.12.08(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/036991 2016.06.10(87) PCT国际申请的公布数据  
WO2016/201304 EN 2016.12.15(73) 专利权人 南克维斯特公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·李

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256  
专利代理师 陈文平 黄海波

(56) 对比文件

EP 2161339 A1, 2010.03.10

CN 104561069 A, 2015.04.29

CN 103483452 A, 2014.01.01

WO 2014145252 A3, 2014.12.11

Laurent Boissel等.Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibodydependent cellular cytotoxicity.《OncoImmunology》.2013,第2卷(第10期),第e26527-1- e26527-8页.

Liat Binyamin等.Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy.《Journal of Immunology》.2008,第180卷(第9期),第6392-6401页.

Strausberg,R.L.等.FCGR3A protein [Homo sapiens].《GenBank》.2005,FEATURES和ORIGIN部分. (续)

审查员 张娟

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书30页

序列表24页 附图2页

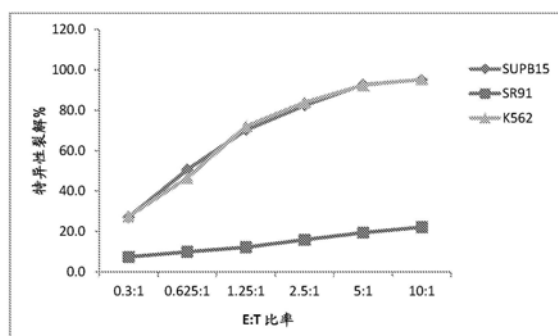
(54) 发明名称

用于治疗癌症的修饰的NK-92细胞

(57) 摘要

CN 107709552 B

本文提供了表达至少一种CAR和至少一种Fc受体的NK-92细胞。本文还提供了治疗患有或疑似患有可用NK-92细胞治疗的疾病(例如癌症)的患者的方法,其包括对所述患者施用NK-92-Fc-CAR。



[转续页]

[接上页]

**(56) 对比文件**

Hermanson DL等.Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity.《Front. Immunol.》

.2015,第6卷第1-6页.

王蔚等.NKG2D在NK细胞杀伤血液肿瘤细胞中的作用.《中国实验血液学杂志》.2012,第20卷(第2期),第296-299页.

1. 有效量的包含修饰的NK-92细胞的NK-92细胞系用于制备在有需要的患者中治疗B细胞恶性肿瘤的药物的用途,其中所述修饰的NK-92细胞是被修饰以各自表达至少一种Fc受体和至少一种嵌合抗原受体(CAR),使得所述至少一种Fc受体和所述至少一种CAR在所述修饰的NK-92细胞的细胞表面上展示,其中所述CAR包含如SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列,其中所述Fc受体是CD16多肽,并且其中所述Fc受体包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列,以及其中所述B细胞恶性肿瘤是白血病。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述CAR靶向CD19的肿瘤相关抗原。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述修饰的NK-92细胞被进一步修饰以表达一种细胞因子。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述细胞因子是白细胞介素-2或其变体。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述细胞因子靶向内质网。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述Fc受体和所述CAR在不同的载体上编码。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述修饰的NK-92细胞经历少于10次群体倍增。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述修饰的NK-92细胞通过选自静脉内、腹膜内和皮下的途径施用于所述患者。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述白血病选自慢性B细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中将 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{11}$ 修饰的NK-92细胞/所述患者身体表面积平方米施用于所述患者。

11. 根据权利要求1所述的用途,其还包括向所述患者施用有效量的至少一种单克隆抗体。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述单克隆抗体是裸单克隆抗体、缀合单克隆抗体或双特异性单克隆抗体。

13. 根据权利要求11所述的用途,其中所述单克隆抗体选自阿仑单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、替伊莫单抗、本妥昔单抗、吉妥珠单抗、阿曲坦单抗、blinatumomab、avelumab、daratumumab和埃罗妥珠单抗。

14. 根据权利要求11所述的用途,其中所述单克隆抗体和所述修饰的NK-92细胞被同时地施用于所述患者。

15. 根据权利要求1所述的用途,其还包括施用干细胞移植疗法于所述患者。

## 用于治疗癌症的修饰的NK-92细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月10日提交的美国临时申请No.62/173,701和2016年5月16日提交的美国临时申请No.62/337,044的优先权的权益,其各自通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 自然杀伤(NK)细胞是构成先天免疫系统的主要组分的细胞毒性淋巴细胞。通常代表约10-15%的循环淋巴细胞的NK细胞非抗原特异性地且在没有在先免疫敏化的情况下结合并杀灭靶细胞,包括病毒感染细胞和许多恶性细胞。Herberman等,Science 214:24 (1981)。靶细胞的杀灭是通过诱导细胞裂解而发生。用于此目的的NK细胞被从来自受试者的血液的外周血淋巴细胞(“PBL”)级分中分离,在细胞培养中扩增以获得足够数量的细胞,然后重新输注到受试者中。已经显示NK细胞在离体疗法和体内治疗二者中在一定程度上有效。然而,不是所有NK细胞都是细胞裂解性的,并且该疗法对于被治疗的患者是特异性的,这使该疗法复杂化。

[0004] 对于癌症,区分肿瘤细胞与源自相同组织的正常细胞的表型变化通常与特定基因产物的表达中的一个或多个变化有关,包括正常细胞表面组分的损失或其他组分的获得(即,在相应的正常非癌组织中不可检测的抗原)。在瘤细胞或肿瘤细胞中但不在正常细胞中表达的抗原、或者在瘤细胞中以明显高于在正常细胞中所发现水平的水平表达的抗原已被称为“肿瘤特异性抗原”或“肿瘤相关抗原”。这样的肿瘤特异性抗原可以作为肿瘤表型的标志物。肿瘤特异性抗原可以被分为三个主要的组:癌症/睾丸特异性抗原(例如,MAGE,BAGE,GAGE,PRAME和NY-ESO-1),黑素细胞分化抗原(例如,酪氨酸酶,Melan-A/MART,gp100,TRP-1和TRP-2)和突变或异常表达抗原(例如,MUM-1,CDK4, $\beta$ -连环蛋白,gp100-in4,p15和N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V)。

[0005] 肿瘤特异性抗原已被用作癌症免疫疗法的靶点。一种这样的疗法利用在免疫细胞(包括T细胞和NK细胞)表面上表达的嵌合抗原受体(CAR)以增加对癌细胞的细胞毒性。CAR包含连接至少一个细胞内信号结构域的单链可变片段(scFv)。scFv识别并结合靶细胞(例如癌细胞)上的抗原并触发效应细胞激活。

[0006] 此外,采用单克隆抗体(mAb)的抗癌治疗已经显著改善癌症患者的临床结果,特别是当与化疗联合时。然而,尽管恶性细胞呈现抗原并且存在免疫细胞,已知癌细胞逃逸免疫介导的排斥。癌细胞逃逸免疫根除的一个机制是通过阻止检测。例如,肿瘤逃逸机制包括受损或减少的抗原呈现(例如,肿瘤抗原的突变或下调),其降低单靶点疗法(如CAR表达免疫细胞和mAb)的功效。就此而言,改进的治疗剂和治疗癌细胞的方法仍然是需要的。

### 发明内容

[0007] 本文提供了被工程化以表达多个转基因的基因修饰的NK-92细胞或细胞系。例如,NK-92细胞被修饰以同时表达至少一种Fc受体和至少一种嵌合抗原受体(CAR),使得所述至少一种Fc受体和所述至少一种CAR在所述NK-92细胞的细胞表面上展示。

[0008] 因此,本公开提供了NK-92细胞系,其中所述NK-92细胞系的细胞被修饰以表达至少一种Fc受体和至少一种嵌合抗原受体(CAR),使得所述Fc受体和CAR在NK-92细胞的细胞表面上展示。

[0009] 上文的一般性描述和下文的详细描述是示例性和解释性的,并且旨在提供对本公开的进一步解释。其他目的、优点和新颖特征对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

## 附图说明

[0010] 在结合附图考虑时,参考下列公开内容,本发明的目的、特征和优点将更容易理解。

[0011] 图1A、1B和1C是显示体外细胞毒性试验的图。图1A显示非电穿孔亲本NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。图1B显示表达CD19-CAR的亲本NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。图1C显示表达CD19-CAR的CD16(158V)-ERIL2NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。

## 具体实施方式

[0012] 本文提供NK-92细胞,其被修饰以表达至少一种Fc受体和至少一种嵌合抗原受体(CAR),使得所述至少一种Fc受体和所述至少一种CAR在所述NK-92细胞的细胞表面上展示。任选地,Fc受体包含Fc $\gamma$ RIII-A(CD16)。任选地,NK-92细胞被基因修饰以表达编码与SEQ ID NO:1(在第158位具有苯丙氨酸的Fc $\gamma$ RIII-A或CD16(F-158))具有至少90%序列同一性;或与SEQ ID NO:2(在第158位具有缬氨酸的CD16(F158V),更高亲和力形式)具有至少90%同一性的多肽的Fc受体。在典型的实施方式中,CD16多肽在第158位具有缬氨酸。任选地,NK-92细胞被基因修饰以表达编码与SEQ ID NO:8(CD19),SEQ ID NO:9(CD19),SEQ ID NO:10(CD33),SEQ ID NO:11(CD33),SEQ ID NO:12(CSPG-4)或SEQ ID NO:13(CSPG-4)具有至少90%序列同一性的多肽的CAR。任选地,CAR靶向肿瘤相关抗原,例如CD19、CD20、NKG2D配体、CS1、GD2、CD138、EpCAM、HER-2、EBNA3C、GPA7、CD244、CA-125、MUC-1、ETA、MAGE、CEA、CD52、CD30、MUC5AC、c-Met、EGFR、FAB、WT-1、PSMA、NY-ESO1和CD33。在一些实施方式中,细胞系的NK92细胞经历少于10次群体倍增。

[0013] 任选地,NK-92细胞还表达细胞因子,例如白细胞介素-2或其变体。在一些实施方式中,NK-92细胞被修饰以表达具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的序列的多肽。在进一步的实施方式中,细胞因子靶向内质网。任选地,细胞系的NK-92细胞在含有少于10U/ml的IL-2的培养基中培养。

[0014] 本公开提供了包含本文所述NK-92细胞中的任一种的组合物。任选地,本公开提供了上述实施方式的NK-92细胞中的任一种与至少一种抗体的组合物,抗体例如是阿仑单抗,利妥昔单抗,曲妥珠单抗,替伊莫单抗(ibritumomab),吉妥珠单抗(gemtuzumab),本妥昔单抗(brentuximab),阿曲坦单抗(adotranstuzumab),blinatumomab,daratumumab或埃罗妥珠单抗(elotuzumab)。在一些实施方式中,单克隆抗体是裸单克隆抗体、缀合单克隆抗体或双特异性单克隆抗体。

[0015] 本公开提供了在有需要的患者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的上述实施方式中任一者的细胞。在一些实施方式中,细胞通过选自静脉内、腹膜内和皮下的途径给予患者。在一些实施方式中,将约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 细胞/患者体表面积平

方米施用于患者。任选地,本公开的方法还提供向患者施用有效量的至少一种单克隆抗体,例如阿仑单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、替伊莫单抗、吉妥珠单抗、本妥昔单抗、阿曲坦单抗、blinatumab、daratumumab或埃罗妥珠单抗。在一些实施方式中,单克隆抗体是裸单克隆抗体、缀合单克隆抗体或双特异性单克隆抗体。在一些实施方式中,单克隆抗体通过选自静脉内、腹膜内和皮下的途径施用于患者。在一种实施方式中,单克隆抗体和细胞被同时地施用。在一些实施方式中,单克隆抗体和细胞在施用于患者之前混合在一起。在其他实施方式中,单克隆抗体和细胞被顺序施用。在其他实施方式中,受试者被施用单克隆抗体,并随后在单克隆抗体施用后例如24小时内、或者24至72小时内被施用修饰的NK-92细胞。

[0016] 在一种实施方式中,癌症是例如白血病(例如慢性B细胞白血病,急性淋巴细胞白血病(ALL),慢性淋巴细胞白血病(CLL)),淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤(NHL)),真性红细胞增多症,多发性骨髓瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,重链病,肉瘤或癌。

[0017] 本公开提供了用于上述治疗癌症的方法中任一种的试剂盒,其中所述试剂盒包括以下中的至少一者:(a)一定量的NK-92细胞,其被修饰以表达在细胞表面上的至少一种Fc受体和在所述细胞表面上的至少一种嵌合抗原受体(CAR),和(b)描述本公开的至少一种方法的说明。在一些实施方式中,试剂盒还包括至少一种单克隆抗体。

[0018] 在阅读本说明书之后,对于本领域技术人员来说,如何实现各种替代实施方式和替代应用将变得显而易见。然而,并非所有实施方式都在本文中描述。应理解,本文呈现的实施方式仅通过示例性的目的呈现,而非限制性的。就此而言,这种对各种替代实施方式的详细描述不应被解释为限制如本文所阐述的本公开的范围或广度。应理解,下文描述的方面不限于具体的组合物、制备该种组合物的方法、或其用途,因为这些当然可以变化。

[0019] 术语

[0020] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0021] 在本说明书和随后的权利要求书中,将提及应被定义为具有以下含义的多个术语:

[0022] 本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不意在限制本发明。如本文所使用的,单数形式“一个(a)”,“一种(an)”和“该(the)”也旨在包括复数形式,除非上下文另有明确指示。因此,例如,提到“自然杀伤细胞”包括多个自然杀伤细胞。

[0023] 所有数字标示,例如pH,温度,时间,浓度,量和分子量,包括范围,是近似值,其在适当的情况下以0.1或1.0的增量变化((+)或(-))。应理解,虽然并不总是明确说明,但是所有的数字标示之前可以有术语“约”。

[0024] 如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,特别是就提供书面描述而言,本文公开的所有范围还包括任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以被容易地认为是充分描述并使同一范围能够被分成至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以被容易地分成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员将同样理解的,所有措辞,例如“至多”、“至少”、“大于”、“小于”等,包括所记载的数字,并且是指可以随后如上所述被分成子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个细胞的组是指具有1、2或3个细胞的组。类似地,具有1-5个细胞的组是指具有

1、2、3、4或5个细胞的组,等等。

[0025] 还应理解,虽然并不总是明确说明,但是本文所述的试剂仅仅是示例性的,并且这些的等价物是本领域已知的。

[0026] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括其中事件或情况发生的情形以及其中事件或情况不发生的情形。

[0027] 术语“包含”旨在表示组合物和方法包括所记载的要素,但不排除其他要素。在用于限定组合物和方法时,“基本上由...组成”应当表示排除对组合具有任何实质重要性的其他要素。例如,基本上由如本文限定的要素组成的组合物不排除不实质性影响要求保护的主题的基本和新颖特性的其他要素。“由……组成”应当表示排除超过痕量的其他成分和实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个限定的实施方式在本公开的范围内。

[0028] 如本文所用,“同时的”或“同时地”是指在相同时间或在大致相同的时间施用至少两种药物(例如NK-92-Fc-CAR细胞和单克隆抗体)。

[0029] 如本文所用,术语“有效量”是指足以实现期望治疗效果的组合物的量,例如导致癌细胞或与癌症相关的一种或多种症状的改善的量。在治疗应用的背景下,施用于受试者的NK-92细胞或抗体的量将取决于癌症的类型和进展以及个体的特征,例如总体健康状况、年龄、性别、体重和药物耐受性。其也将取决于疾病的程度、严重度和类型。技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。NK-92细胞也可以与一种或多种另外的治疗性化合物(例如抗体)组合施用。

[0030] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸来源于基因组DNA,则表达可能包括mRNA在真核细胞中的剪接。基因的表达水平可以通过测量细胞或组织样品中mRNA或蛋白质的量而确定。在一个方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平与来自对照或参比样品的该基因的表达水平直接进行比较。在另一个方面,可以将来自一个样品的基因的表达水平与在施用NK-92细胞后来自相同样品的该基因的表达水平直接进行比较。

[0031] 如本文所用,“免疫疗法”是指使用NK-92细胞(修饰或未修饰的)、天然存在的或被修饰的NK细胞或T细胞(无论单独或组合),并且当接触靶细胞时所述使用能够诱导细胞毒性。

[0032] 如本文所用,“自然杀伤(NK)细胞”是在特异性抗原刺激不存在的情况下杀灭靶细胞、并且没有根据主要组织相容性复合物(MHC)类别的限制的免疫系统细胞。靶细胞可以是癌或肿瘤细胞。NK细胞的特征在于存在CD56和不存在CD3表面标志物。

[0033] 术语“内源性NK细胞”用于指源自供体(或患者)的NK细胞,区别于NK-92细胞系。内源性NK细胞通常是异质细胞群体,其中NK细胞已被富集。内源性NK细胞可以用于患者的自体或同种异体治疗。

[0034] “NK-92细胞”是指最初从患有非霍奇金淋巴瘤的患者获得的永生NK细胞系NK-92。术语“NK-92”旨在指原始NK-92细胞系以及已被修饰的NK-92细胞系(例如通过引入外源基因修饰)。NK-92细胞及其示例性和非限制性修饰在美国专利No.7,618,817;8,034,332;和8,313,943中描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0035] “修饰的NK-92细胞”是指还包含编码转基因(包括Fc受体、CAR、IL-2和/或自杀基因)的载体的NK-92细胞。在优选实施方式中,修饰的NK-92细胞表达至少一种转基因蛋白。

[0036] 如本文所用,“未照射的NK-92细胞”是尚未被照射的NK-92细胞。照射使细胞不能生长和增殖。预期NK-92细胞将在患者治疗之前在治疗设施处或一些其他地点被照射,因为保持了最佳活性,照射和输注之间的时间不应超过4小时。或者,NK-92细胞可以通过另外的机制灭活。

[0037] 如本文所用,NK-92细胞的“灭活”使得它们不能生长。灭活也可能与NK-92细胞的死亡有关。预期NK-92细胞在其已经有效地清除与治疗应用中的病理学相关的细胞的离体样品之后,或者在它们已经在哺乳动物体内驻留足以有效地杀灭体内驻留的许多或所有靶细胞的时间段之后被灭活。作为非限制性实例,可以通过施用NK-92细胞对其敏感的灭活剂诱导灭活。

[0038] 如本文所用,术语“细胞毒性的”和“细胞裂解性的”当用于描述效应细胞例如NK细胞的活性时,旨在是同义的。通常,细胞毒性活性涉及通过各种生物、生物化学或生物物理机制中的任一种杀灭靶细胞。细胞裂解更具体地涉及其中效应物裂解靶细胞的质膜、从而破坏其物理完整性的活性。这导致杀灭靶细胞。不希望受到理论的束缚,据信NK细胞的细胞毒性作用是由于细胞理解。

[0039] 关于细胞/细胞群体的术语“杀灭”旨在包括将导致该细胞/细胞群体死亡的任何类型的操作。

[0040] 术语“Fc受体”是指在某些细胞(例如自然杀伤细胞)的表面上发现的蛋白质,其通过结合到称为Fc区的抗体部分而对免疫细胞的保护功能作出贡献。抗体的Fc区与细胞的Fc受体(FcR)的结合通过抗体介导的吞噬作用或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)刺激细胞的吞噬或细胞毒性活性。FcR基于其识别的抗体类型进行分类。例如,Fc- $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)结合IgG类抗体。Fc $\gamma$ RIII-A(也称为CD16)是结合IgG抗体并激活ADCC的低亲和力Fc受体。Fc $\gamma$ RIII-A通常在NK细胞上发现。NK-92细胞不表达Fc $\gamma$ RIII-A。编码CD16的天然形式的代表性多核苷酸序列显示在SEQ ID NO:5中。

[0041] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指与细胞内信号传导结构域融合的细胞外抗原结合结构域。CAR可以在T细胞或NK细胞中表达以增加细胞毒性。通常,细胞外抗原结合结构域是对感兴趣的细胞上发现的抗原具有特异性的scFv。基于scFv结构域的特异性,表达CAR的NK-92细胞靶向在细胞表面上表达某些抗原的细胞。scFv结构域可被工程化以识别任何抗原,包括肿瘤特异性抗原。

[0042] 如本文所用,术语“肿瘤特异性抗原”是指存在于癌或肿瘤细胞上、但在源自与癌细胞相同的组织或谱系的正常细胞上不可检测的抗原。如本文所用,肿瘤特异性抗原也指肿瘤相关抗原,即与源自与癌细胞相同的组织或谱系的正常细胞相比、在癌细胞上以更高水平表达的抗原。

[0043] 术语“多核苷酸”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,不管是脱氧核糖核苷酸或是核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则可以在多核苷酸组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修



饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后可以进一步修饰多核苷酸,例如通过与标记组分缀合。该术语还指双链和单链分子二者。除非另有规定或要求,多核苷酸包括双链形式和已知或预期构成双链形式的两条互补单链形式中的任一条。

[0044] 多核苷酸由四种核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T);和当多核苷酸是RNA时替代胸腺嘧啶的尿嘧啶(U)。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表示。

[0045] 如本文所用,“同一性百分比”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列同一性。同一性百分比可以通过比较可以为比较目的而比对的每个序列中的位置而测定。当比较序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是相同的。如本文所用,短语“同源”或“变体”核苷酸序列或者“同源”或“变体”氨基酸序列是指特征为至少规定百分比的核苷酸水平或氨基酸水平的同一性的序列。同源核苷酸序列包括编码本文所述的核苷酸序列的天然存在的等位基因变体和突变的那些序列。同源核苷酸序列包括编码除人以外的哺乳动物物种的蛋白质的核苷酸序列。同源氨基酸序列包括含有保守氨基酸取代和其多肽具有相同结合和/或活性的那些氨基酸序列。在一些实施方式中,同源核苷酸或氨基酸序列与比较序列相比具有至少60%或更大、例如至少70%、或至少80%、或至少85%或更大的同一性。在一些实施方式中,同源核苷酸或氨基酸序列与比较序列相比具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方式中,同源氨基酸序列具有不超过15个,不超过10个,不超过5个或不超过3个保守氨基酸取代。同一性百分比可以通过例如使用默认设置的Gap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,UNIX第8版,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison Wis.)测定,其使用Smith和Waterman算法(Adv.Appl.Math.,1981,2,482-489)。

[0046] 术语“表达”是指基因产物的产生。当涉及表达时,术语“瞬时(transient)”是表示多核苷酸不被引入到细胞的基因组中。

[0047] 术语“细胞因子”或“细胞因子”是指影响免疫系统细胞的一般类别的生物分子。实例性细胞因子包括但不限于干扰素和白细胞介素(IL),特别是IL-2,IL-12,IL-15,IL-18和IL-21。在优选的实施方式中,细胞因子是IL-2。

[0048] 如本文所用,术语“载体”是指包含完整复制子的非染色体核酸,使得载体当例如通过转化方法被放置在受纳细胞内时可以复制。载体可以在一种细胞类型(如细菌)中复制,但是在另外的细胞(如哺乳动物细胞)中具有有限的复制能力。载体可以是病毒的或非病毒的。用于递送核酸的示例性非病毒载体包括裸DNA;与阳离子脂质复合的DNA,单独或与阳离子聚合物组合;阴离子和阳离子脂质体;DNA-蛋白复合物和包含与阳离子聚合物(如异质聚赖氨酸、限定长度的寡肽和聚乙烯亚胺)缩合的DNA的颗粒,在一些情况下被包含在脂质体中;以及使用包含病毒和聚赖氨酸-DNA的三元复合物。

[0049] 如本文所用,术语“靶向的(targeted)”旨在包括但不限于将蛋白质或多肽引导到细胞中或其外部的适当目的地。靶向通常通过信号肽或靶向肽(其是多肽链中的氨基酸残基段)而实现。这些信号肽可以位于多肽序列内的任何位置,但通常位于N端。多肽也可以被工程化为在C端具有信号肽。信号肽可以引导多肽到胞外部分、质膜、高尔基体、内体、内质网和其它细胞区室的位置。例如,在其C端具有特定氨基酸序列的多肽(例如KDEL)被保留在ER腔中或者被运输回ER腔。

[0050] 术语“自杀基因”是允许细胞的阴性选择的基因。自杀基因用作安全系统,允许通过引入选择剂使表达该基因的细胞被杀灭。这在重组基因造成致使不受控制的细胞生长的突变的情况下是期望的。已经鉴定了许多自杀基因系统,包括单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶基因、水痘带状疱疹病毒胸苷激酶基因、硝基还原酶基因、大肠杆菌gpt基因和大肠杆菌Deo基因(还参见,例如,Yazawa K,Fisher W E,Brunicardi F C:Current progress in suicide gene therapy for cancer.World J.Surg.2002年7月;26(7):783-9)。在一个实施方式中,自杀基因是可诱导性半胱天冬酶9(iCas9)(Di Stasi,(2011)“Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy”,N Engl J Med 365:1673-1683。还参见Morgan,“Live and Let Die:A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic”Molecular Therapy(2012);20:11-13)。TK基因可以是野生型或突变TK基因(例如,tk30,tk75,sr39tk)。使用更昔洛韦可以杀灭表达TK蛋白的细胞。

[0051] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用,并且是指无论是体外还是原位可适用于本文所述的方法的任何动物或其细胞。在优选实施方式中,患者、受试者或个体是哺乳动物。在特别优选的实施方式中,患者、受试者或个体是人。

[0052] 术语“治疗”或“治疗”涵盖治疗受试者(例如人)的本文所述的疾病或紊乱,并且包括:(i)抑制疾病或紊乱,即阻止其发展;(ii)减轻疾病或紊乱,即导致紊乱消退;(iii)减缓紊乱进展;和/或(iv)抑制、减轻或减缓疾病或紊乱的一种或多种症状的进展。术语向受试者“施用”或“施用”单克隆抗体或自然杀伤细胞包括引入或递送抗体或细胞以执行预期功能的任何途径。施用可以通过适合于递送细胞或单克隆抗体的任何途径进行。因此,递送途径可以包括静脉内、肌内、腹膜内或皮下递送。在一些实施方式中,单克隆抗体和/或NK-92细胞被直接施用于肿瘤,例如通过注射到肿瘤中。施用包括自我施用和通过另外的人施用。

[0053] 如本文所用,有效剂量或量是指产生期望效果(例如治疗或预防疾病)的试剂或含有所述试剂的组合物的剂量。纳米颗粒的确切剂量和制剂将取决于治疗目的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术确定(参见,例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Remington(2005);和Pickar,Dosage Calculations(第9版)(1999))。例如,对于给定的参数,治疗有效量将显示至少5%,10%,15%,20%,25%,40%,50%,60%,75%,80%,90%或至少100%的增加或减少。治疗效果也可以表示为“倍数”增加或减少。例如,与标准对照相比,治疗有效量可以具有至少1.2倍,1.5倍,2倍,5倍或更多的效力。治疗有效剂量或量可以改善疾病的一种或多种症状。当为此施用的效果是治疗处于发展疾病的风险的人时,治疗有效剂量或量可以预防或延迟疾病或疾病的一种或多种症状的发作。

[0054] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白或其片段。抗体可以具有任何类型(例如,IgG,IgA,IgM,IgE或IgD)。优选地,抗体是IgG。抗体可以是非人的(例如来自小鼠、山羊或任何其它动物)、全人的、人源化的或嵌合的。抗体可以是多克隆的或单克隆的。任选地,抗体是单克隆的。

[0055] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从在培养物中生长且能够无限增殖的细胞的单个克隆产生的纯的靶特异性抗体。可以使用的单克隆抗体包括附着并阻断癌细胞上的抗原的裸抗体。在一个实施方式中,裸单克隆抗体是阿伦单抗,其结合到淋巴细胞中的CD52抗

原。还包括在可以使用的单克隆抗体中的是缀合单克隆抗体,例如加标签的、标记的或加载的抗体。具体地,抗体可以被加标签或加载药物或毒素,或被放射性标记。这样的抗体的实例包括但不限于靶向CD20抗原的替伊莫单抗,靶向CD30抗原的本妥昔单抗和靶向HER2蛋白的曲妥珠单抗。可以使用的其它单克隆抗体是双特异性单克隆抗体,例如靶向淋巴瘤细胞中的CD19和T细胞中的CD3的blinatumomab。

[0056] 如本文所用,术语“抗体片段”是指识别表位的任何抗体部分。抗体片段可以被糖基化。作为非限制性实例,抗体片段可以是Fab片段,Fab'片段,F(ab')<sub>2</sub>片段,Fv片段,rIgG片段,功能性抗体片段,前述的单链重组形式等。F(ab')<sub>2</sub>,Fab,Fab'和Fv是可以从IgG和IgM的可变区产生的抗原结合片段。它们在大小、价位和Fc含量方面不同。片段可以通过任何方法产生,包括通过细胞或细胞系或者多个细胞或细胞系表达组分(例如,重链和轻链部分)。优选地,抗体片段识别表位并含有足够的Fc区部分,使得其能够结合Fc受体。

[0057] 如本文所用,术语“癌症”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌症(cancer)、瘤(neoplasm)或恶性肿瘤。包括白血病、癌(carcinoma)和肉瘤。示例性的癌症包括脑癌,乳腺癌,宫颈癌,结肠癌,头颈癌,肝癌,肾癌,肺癌,非小细胞肺癌,黑素瘤,间皮瘤,卵巢癌,肉瘤,胃癌,子宫癌和成神经管细胞瘤。另外的实例包括霍奇金病,非霍奇金淋巴瘤,多发性骨髓瘤,神经母细胞瘤,卵巢癌,横纹肌肉瘤,原发性血小板增多症,原发性巨球蛋白血症,原发性脑瘤,癌症,恶性胰腺胰岛瘤,恶性类癌,膀胱癌,恶化前皮肤病变,睾丸癌,淋巴瘤,甲状腺癌,神经母细胞瘤,食管癌,泌尿生殖道癌,恶性高钙血症,子宫内膜癌,肾上腺皮质癌,内分泌和外分泌胰腺的瘤,和前列腺癌。

[0058] 标题或副标题可以出于读者的方便而在说明书中使用,其并非旨在影响本公开的范围。另外,在本说明书中使用的一些术语在下文中更具体地定义。

[0059] NK-92细胞

[0060] NK-92细胞系是被发现在白细胞介素2(IL-2)的存在下增殖的独特细胞系。Gong等,Leukemia 8:652-658(1994)。这些细胞对各种癌症具有高细胞裂解活性。NK-92细胞系是具有广谱抗肿瘤细胞毒性的同质癌性NK细胞群体,在扩增后具有可预测的产量。I期临床试验已证实其安全性谱。NK-92在患有非霍奇金淋巴瘤的受试者的血液中发现,然后离体永生化。NK-92细胞衍生自NK细胞,但缺少由正常NK细胞展示的主要抑制性受体,同时保留大部分的激活受体。然而,NK-92细胞不攻击正常细胞,也不在人中引起不可接受的免疫排斥应答。NK-92细胞系的表征在W01998/49268和美国专利申请公布No.2002-0068044中公开。

[0061] 发现NK-92细胞系展示CD56<sup>明亮</sup>,CD2,CD7,CD11a,CD28,CD45和CD54表面标志物。此外,它不展示CD1,CD3,CD4,CD5,CD8,CD10,CD14,CD16,CD19,CD20,CD23和CD34标志物。NK-92细胞在培养物中的生长取决于重组白细胞介素2(rIL-2)的存在,剂量低至1IU/mL足以维持增殖。IL-7和IL-12不支持长期生长,所测试的其他细胞因子(包括IL-1 $\alpha$ ,IL-6,肿瘤坏死因子 $\alpha$ ,干扰素 $\alpha$ 和干扰素 $\gamma$ )也不支持。NK-92即使在1:1的低效应物:靶(E:T)比率下也具有高细胞毒性。Gong等,同上。NK-92细胞被保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC),名称为CRL-2407。

[0062] 迄今为止,关于内源性NK细胞的研究已经表明,IL-2(1000IU/mL)在运输过程中对于NK细胞激活至关重要,但是细胞不需要被保持在37℃和5%二氧化碳下。Koepsell等,Transfusion 53:398-403(2013)。

[0063] 修饰的NK-92细胞是已知的,并且包括但不限于在例如美国专利No.7,618,817,8,034,332和8,313,943和美国专利申请公布No.2013/0040386(其全部内容通过引用并入本文)中描述的那些,例如野生型NK-92,NK-92-CD16,NK-92-CD16- $\gamma$ ,NK-92-CD16- $\zeta$ ,NK-92-CD16(F157V),NK-92mi和NK-92ci。

[0064] 尽管NK-92细胞保留了与NK细胞相关的几乎所有激活受体和细胞裂解途径,但它们在细胞表面上不表达CD16。CD16是Fc受体,其识别并结合抗体的Fc部分以激活NK细胞,用于发挥抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。由于不存在CD16受体,NK-92细胞不能通过ADCC机制裂解靶细胞,因此不可以增强内源性或外源性抗体(即利妥昔单抗和赫赛汀)的抗肿瘤作用。

[0065] 关于内源性NK细胞的研究已经表明,IL-2(1000IU/mL)在运输过程中对于NK细胞激活至关重要,但是细胞不需要被保持在37°C和5%二氧化碳下。Koepsell等,Transfusion 53:398-403(2013)。然而,内源性NK细胞与NK-92细胞显著不同,很大程度上是因为它们的不同起源:NK-92是癌症衍生细胞系,而内源性NK细胞是从供体(或患者)采集并加工用于输注到患者体内。内源性NK细胞制备物是异质细胞群体,而NK-92细胞是均质克隆细胞系。NK-92细胞容易在培养物中增殖,同时保持细胞毒性,而内源性NK细胞不这样。另外,NK细胞的内源性异质群体不以高密度聚集。此外,内源性NK细胞表达Fc受体,包括不被NK-92细胞表达的CD-16受体。

[0066] Fc受体

[0067] Fc受体结合抗体的Fc部分。多种Fc受体是已知的,并且根据它们的优选配体、亲和力、表达和在结合抗体后的效果而不同。

[0068] 表1.说明性的Fc受体

[0069]

受体名称	主要抗体配体	对配体的亲和力	细胞分布	结合抗体后的效果
<b>Fc<math>\gamma</math>RI (CD64)</b>	IgG1 和 IgG3	高 (Kd ~ $10^{-9}$ M)	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞	吞噬作用 细胞激活 呼吸爆发激活

[0070]

			树突状细胞	诱导杀灭微生物
<b>FcγRIIA (CD32)</b>	IgG	低 (Kd > 10 <sup>-7</sup> M)	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞 血小板 朗格汉斯细胞	吞噬作用 脱粒 (嗜酸性粒细胞)
<b>FcγRIIB1 (CD32)</b>	IgG	低 (Kd > 10 <sup>-7</sup> M)	B 细胞 肥大细胞	无吞噬作用 抑制细胞活性
<b>FcγRIIB2 (CD32)</b>	IgG	低 (Kd > 10 <sup>-7</sup> M)	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞	吞噬作用 抑制细胞活性
<b>FcγRIIA (CD16a)</b>	IgG	低 (Kd > 10 <sup>-6</sup> M)	NK 细胞 巨噬细胞 (某些组织)	诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 诱导巨噬细胞释放细胞因子
<b>FcγRIIB (CD16b)</b>	IgG	低 (Kd > 10 <sup>-6</sup> M)	嗜酸性粒细胞 巨噬细胞 嗜中性粒细胞 肥大细胞 滤泡树突状细胞	诱导杀灭微生物
<b>FcεRI</b>	IgE	高 (Kd ~ 10 <sup>-10</sup> M)	肥大细胞 嗜酸性粒细胞 嗜碱性粒细胞 朗格汉斯细胞 单核细胞	脱粒 吞噬作用
<b>FcεRII (CD23)</b>	IgE	低 (Kd > 10 <sup>-7</sup> M)	B 细胞 嗜酸性粒细胞 朗格汉斯细胞	可能的粘附分子 IgE 转运穿过人肠上皮 增强过敏敏化作用的正反馈机制 (B 细胞)
<b>FcαRI</b>	IgA	低 (Kd > 10 <sup>-7</sup> M)	单核细胞	吞噬作用

[0071]	(CD89)		$10^{-6}$ M)	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞	诱导杀灭微生物
	Fc $\alpha$ / $\mu$ R	IgA 和 IgM	对于 IgM 高, 对于 IgA 中等	B 细胞 系膜细胞 巨噬细胞	胞吞作用 诱导杀灭微生物
	FcRn	IgG		单核细胞 巨噬细胞 树突状细胞 上皮细胞 内皮细胞 肝细胞	IgG 从母亲经过胎盘 转移到胎儿 IgG 在母乳中从母亲 转移到婴儿 保护 IgG 免于降解

[0072] 在一些实施方式中, NK-92 细胞被修饰以在细胞表面上表达 Fc 受体蛋白。

[0073] 在一些实施方式中, Fc 受体是 CD16。为了本公开的目的, CD16 的特定氨基酸残基参考 SEQ ID NO:2 或相对于 SEQ ID NO:2 在一个位置处不同的 SEQ ID NO:1 命名。因此, 当 CD16 多肽和 SEQ ID NO:2 最大程度地比对时, CD16 多肽的“第 158 位”氨基酸残基是对应于 SEQ ID NO:2 (或 SEQ ID NO:1) 的第 158 位氨基酸残基的氨基酸残基。在一些实施方式中, NK-92 细胞被修饰以表达在蛋白质的成熟形式的第 158 位具有苯丙氨酸的人 CD16, 例如 SEQ ID NO:1。在典型的实施方式中, NK-92 细胞被修饰以表达在蛋白质的成熟形式的第 158 位具有缬氨酸的人 CD16 的高亲和力形式, 例如 SEQ ID NO:2。成熟蛋白质的第 158 位对应于包含天然信号肽的 CD16 序列的第 176 位。在一些实施方式中, CD16 多肽由编码 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的前体 (即具有天然信号肽) 多肽序列的多核苷酸编码。

[0074] 在一些实施方式中, 编码 CD16 多肽的多核苷酸与编码全长 (包括信号肽) 天然存在的 CD16 的多核苷酸序列具有至少约 70% 的多核苷酸序列同一性, 所述全长天然存在的 CD16 在全长 CD16 的第 176 位 (其对应于成熟 CD16 蛋白的第 158 位) 具有苯丙氨酸。在一些实施方式中, 编码 CD16 多肽的多核苷酸与编码全长 (包括信号肽) 天然存在的 CD16 的多核苷酸序列具有至少约 70% 的多核苷酸序列同一性, 所述全长天然存在的 CD16 在第 176 位 (其对应于成熟 CD16 蛋白的第 158 位) 具有缬氨酸。在一些实施方式中, 编码 CD16 的多核苷酸与 SEQ ID NO:5 具有至少 70% 同一性, 并且包含编码在编码全长 (包含信号肽) CD16 多肽的第 176 位的多核苷酸位置处的缬氨酸的密码子。在一些实施方式中, 编码 CD16 的多核苷酸与 SEQ ID NO:5 具有至少 90% 同一性, 并且包含编码全长 CD16 的第 176 位的缬氨酸的密码子。在一些实施方式中, 编码 CD16 的多核苷酸包含 SEQ ID NO:5, 但具有编码全长 CD16 的第 176 位的缬氨酸的密码子。

[0075] 在一些实施方式中, CD16 多核苷酸编码与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有至少 70%, 80%, 90% 或 95% 同一性的多肽。在一些实施方式中, 多核苷酸编码与 SEQ ID NO:2 具有至少 70% 同一性或至少 80% 同一性、并且 (如参考 SEQ ID NO:2 确定的) 包含第 158 位的缬氨酸的多肽。在一些实施方式中, 多核苷酸编码与 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 同一性、 (并且如参考 SEQ ID NO:2 确定的) 包含第 158 位的缬氨酸的多肽。在一些实施方式中, 多核苷酸编

码与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性、并且(如参考SEQ ID NO:2确定的)包含第2位的缬氨酸的多肽。在一些实施方式中,多核苷酸编码SEQ ID NO:2。在一些实施方式中,CD16多核苷酸编码具有或不具有信号序列、或全长CD16的任何其它片段、或包含与另外的蛋白质的氨基酸序列融合的CD16的至少部分序列的嵌合受体的CD16的细胞外结构域。在其他实施方式中,可以将表位标签肽(如FLAG,myc,多组氨酸或V5)加入到成熟多肽的氨基末端结构域中,以通过使用抗表位标签肽单克隆或多克隆抗体帮助细胞表面检测。

[0076] 在一些实施方式中,尽管具有多于700至800个多核苷酸的CD16变体在本公开的范围,但同源CD16多核苷酸的长度可以为约150至约700,约750,或约800个多核苷酸。

[0077] 同源多核苷酸序列包含编码多肽序列的那些,所述多肽序列编码CD16的变体。同源多核苷酸序列还包括与SEQ ID NO:5相关的天然存在的等位基因变异。用编码具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示氨基酸序列、其天然存在的变体、或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%同一性、或至少80%、90%或95%同一性的序列的多肽的任何多核苷酸转染NK-92细胞是在本公开的范围。在一些实施方式中,同源多核苷酸序列编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中的保守氨基酸取代。在一些实施方式中,使用与天然多核苷酸序列不同、但编码相同多肽的简并同源CD16多核苷酸序列转染NK-92细胞。

[0078] 在其他实例中,使用具有改变CD16氨基酸序列的多态性的cDNA序列(例如在CD16基因中显示遗传多态性的个体中的等位基因变化)修饰NK-92细胞。在其他实例中,使用来自其他物种的具有不同于SEQ ID NO:5序列的多核苷酸序列的CD16基因修饰NK-92细胞。

[0079] 在实例中,使用本领域已知的方法制备变体多肽,例如寡核苷酸介导的(定点)诱变,丙氨酸扫描和PCR诱变。可以在克隆的DNA上进行定点诱变(Carter,1986;Zoller和Smith,1987),盒式诱变,限制性选择诱变(Wells等,1985)或其他已知技术以产生CD16变体(Ausubel,2002;Sambrook和Russell,2001)。

[0080] 在一些实施方式中,使编码CD16的多核苷酸突变以改变编码CD16的氨基酸序列而不改变CD16的功能。例如,可以在SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中在“非必需”氨基酸残基处进行导致氨基酸取代的多核苷酸取代。

[0081] SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中的保守取代(借此一种类别的氨基酸被同一类别的另外的氨基酸取代)落入所公开的CD16变体的范围内,只要该取代不实质上改变多肽活性。保守取代是本领域技术人员熟知的。影响(1)多肽骨架的结构(例如 $\beta$ -折叠或 $\alpha$ -螺旋构象)、(2)电荷、(3)疏水性、或(4)靶点侧链体积的非保守取代可以改变CD16多肽功能或免疫学身份。非保守取代需要将这些类别中的一个的成员交换为另外的类别。取代可以被引入到保守取代位点或更优选被引入到非保守位点。

[0082] 在一些实施方式中,CD16多肽变体的长度为至少200个氨基酸,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%氨基酸序列同一性,或至少80%,或至少90%同一性。在一些实施方式中,CD16多肽变体的长度为至少225个氨基酸,并且与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%氨基酸序列同一性,或至少80%,或至少90%同一性。在一些实施方式中,如参考SEQ ID NO:2确定的,CD16多肽变体在第158位具有缬氨酸。

[0083] 在一些实施方式中,编码CD16多肽的核酸可以编码CD16融合蛋白。CD16融合多肽包括与非CD16多肽融合的CD16的任何部分或整个CD16。使用重组方法方便地产生融合多肽。例如,编码CD16多肽的多核苷酸(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)与非CD16编码多核

苷酸(例如编码异源蛋白质的信号肽的多核苷酸序列)框内(in-frame)融合。在一些实施方式中,可以产生融合多肽,其中异源多肽序列与CD16的C端融合或被内部地设置在CD16中。通常,可以替换至多约30%的CD16细胞质结构域。这样的修饰可以增强表达或增强细胞毒性(例如ADCC响应性)。在其它实例中,嵌合蛋白(例如来自其它淋巴细胞激活受体(包括但不限于Ig-a,Ig-B,CD3-e,CD3-d,DAP-12和DAP-10)的结构域)替代CD16细胞质结构域的部分。

[0084] 融合基因可以通过常规技术合成,包括使用锚引物的自动化DNA合成仪和PCR扩增,所述锚引物形成两个连续基因片段之间的互补突出端,其随后可以被退火并重新扩增以产生嵌合基因序列(Ausubel,2002)。许多载体是可商购的,其促进将CD16框内亚克隆到融合部分。

[0085] 嵌合抗原受体

[0086] 如本文所述,NK-92细胞被进一步工程化以在细胞表面上表达嵌合抗原受体(CAR)。任选地,CAR对于肿瘤特异性抗原具有特异性。作为非限制性实例,肿瘤特异性抗原在US2013/0189268;W01999024566A1;US7098008;和W02000020460A1中描述,其各自全部内容通过引用并入本文。肿瘤特异性抗原包括但不限于NKG2D,CS1,GD2,CD138,EpCAM,EBNA3C,GPA7,CD244,CA-125,ETA,MAGE,CAGE,BAGE,HAGE,LAGE,PAGE,NY-SEO-1,GAGE,CEA,CD52,CD30,MUC5AC,c-Met,EGFR,FAB,WT-1,PSMA,NY-ES01,AFP,CEA,CTAG1B,CD19和CD33。另外的非限制性肿瘤相关抗原和与之相关的恶性肿瘤可见于表1中。

[0087] 表1:肿瘤特异性抗原和相关恶性肿瘤



[0088]

靶抗原	相关恶性肿瘤
$\alpha$ -叶酸受体	卵巢癌
CAIX	肾细胞癌
CD19	B 细胞恶性肿瘤
	慢性淋巴细胞白血病 (CLL)
	B 细胞 CLL (B-CLL)
	急性淋巴细胞白血病 (ALL) ; 造血干细胞移植后 ALL (HSCT)
	淋巴瘤; 难治性滤泡性淋巴瘤; B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL)
	白血病
	HSCT 后 B 细胞恶性肿瘤
	脐带血移植 (UCBT) 后 B 系淋巴样恶性肿瘤
CD19/CD20	淋巴细胞白血病
CD20	淋巴瘤
	B 细胞恶性肿瘤
	B 细胞淋巴瘤
	套细胞淋巴瘤
	惰性 B-NHL
	白血病
CD22	B 细胞恶性肿瘤
CD30	淋巴瘤; 霍奇金淋巴瘤
CD33	AML
CD44v7/8	宫颈癌
CD138	多发性骨髓瘤
CD244	神经母细胞瘤

[0089]

CEA	乳腺癌
	结直肠癌
CS1	多发性骨髓瘤
EBNA3C	EBV 阳性 T 细胞
EGP-2	多种恶性肿瘤
EGP-40	结直肠癌
EpCAM	乳腺癌
Erb-B2	结直肠癌
	乳腺癌和其他
	前列腺癌
Erb-B 2,3,4	乳腺癌和其他
FBP	卵巢癌
胎儿乙酰胆碱受体	横纹肌肉瘤
GD2	神经母细胞瘤
GD3	黑素瘤
GPA7	黑素瘤
Her2	乳腺癌
	卵巢癌
	上皮源性肿瘤
Her2/新	成神经管细胞瘤
	肺恶性肿瘤
	晚期骨肉瘤
	胶质母细胞瘤
IL-13R-a2	神经胶质瘤
	胶质母细胞瘤
	成神经管细胞瘤
KDR	肿瘤新血管系统
k-轻链	B 细胞恶性肿瘤
	B-NHL, CLL
LeY	癌
	上皮衍生肿瘤
L1 细胞粘附分子	神经母细胞瘤
MAGE-A1	黑素瘤
间皮素	各种肿瘤
MUC1	乳腺癌; 卵巢癌
NKG2D 配体	各种肿瘤
癌胚抗原 (h5T4)	各种肿瘤
PSCA	前列腺癌
PSMA	前列腺/肿瘤脉管系统
mAb IgE 靶向的 TAA	各种肿瘤
TAG-72	腺癌
VEGF-R2	肿瘤新血管系统

[0090] 在一些实施方式中, CAR靶向CD19, CD33或CSPG-4。CD19、CD33和CSPG-4CAR的代表性多核苷酸和多肽序列提供于SEQ ID NO:8 (CD19CAR多核苷酸)、SEQ ID NO:9 (CD19CAR多肽)、SEQ ID NO:10 (CD33CAR多核苷酸)、SEQ ID NO:11 (CD33CAR多肽)、SEQ ID NO:12 (CSPG-4CAR多核苷酸)和SEQ ID NO:13 (CSPG-4CAR多肽)中。在一些实施方式中, CD19CAR多核苷酸编码与SEQ ID NO:9具有至少70%, 80%, 90%或95%同一性的多肽。任选地,

CD19CAR多肽与SEQ ID NO:9具有至少90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%同一性。在一些实施方式中,CD33CAR多核苷酸编码与SEQ ID NO:11具有至少70%,80%,90%或95%同一性的多肽。任选地,CD33CAR多肽与SEQ ID NO:11具有至少90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%同一性。在一些实施方式中,CSPG-4CAR多核苷酸编码与SEQ ID NO:13具有至少70%,80%,90%或95%同一性的多肽。任选地,CSPG-4CAR多肽与SEQ ID NO:13具有至少90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%的同一性。在一些实施方式中,可以将表位标签肽(如FLAG, myc,多组氨酸或V5)加入到多肽的氨基末端结构域中,以通过使用抗表位标签肽单克隆或多克隆抗体帮助细胞表面检测。

[0091] 在实例中,使用本领域已知的方法制备变体多肽,例如寡核苷酸介导的(定点)诱变,丙氨酸扫描和PCR诱变。可以在克隆的DNA上进行定点诱变(Carter,1986;Zoller和Smith,1987),盒式诱变,限制性选择诱变(Wells等,1985)或其他已知技术以产生CD16变体(Ausubel,2002;Sambrook和Russell,2001)。

[0092] 在一些实施方式中,使编码CAR的多核苷酸突变以改变编码CAR的氨基酸序列而不改变CAR的功能。例如,可以在SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中在“非必需”氨基酸残基处进行导致氨基酸取代的多核苷酸取代。

[0093] SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13中的保守取代(借此一种类别的氨基酸被同一类别的另外的氨基酸取代)落入所公开的变体的范围内,只要该取代不实质上改变多肽活性。保守取代是本领域技术人员熟知的。影响(1)多肽骨架的结构(例如 $\beta$ -折叠或 $\alpha$ -螺旋构象)、(2)电荷、(3)疏水性、或(4)靶点侧链体积的非保守取代可以改变多肽功能或免疫学身份。非保守取代需要将这些类别中的一个的成员交换为另外的类别。取代可以被引入到保守取代位点或更优选被引入到非保守位点。

[0094] 任选地,CAR靶向与特定癌症类型相关的抗原。任选地,癌症选自白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞白血病,急性髓细胞白血病(包括成髓细胞性,早幼粒细胞性,骨髓单核细胞性,单核细胞性和红白血病)) and 慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞白血病),真性红细胞增多症,淋巴瘤(例如霍奇金病和非霍奇金病),多发性骨髓瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,重链病,实体肿瘤,其包括但不限于肉瘤和癌,如纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,成骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤文氏瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎性癌,维尔姆斯瘤,宫颈癌,睾丸肿瘤,肺癌,肺小细胞癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞瘤,成神经管细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听觉神经瘤,少突神经胶质瘤,脑膜瘤(menangioma),黑素瘤,神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0095] CAR可以如例如在专利公布No. WO2014039523;US20140242701;US20140274909;US20130280285;和WO2014099671中描述的工程化,其各自全部内容通过引用并入本文中。任选地,CAR是CD19CAR,CD33CAR或CSPG-4CAR。

[0096] 另外的修饰-细胞因子

[0097] NK-92细胞的细胞毒性取决于细胞因子(例如白细胞介素-2(IL-2))的存在。使用外源性添加的、在商业规模培养中保持和扩增NK-92细胞所需要的IL-2的成本是显著的。向

人受试者以足以持续激活NK92细胞的量施用IL-2将引起不良副作用。

[0098] 在一些实施方式中,表达FcR的NK-92细胞被进一步修饰以表达至少一种细胞因子和自杀基因。在具体实施方式中,至少一种细胞因子是IL-2,IL-12,IL-15,IL-18,IL-21或其变体。在优选的实施方式中,细胞因子是IL-2 (SEQ ID NO:6)。在某些实施方式中,IL-2是靶向内质网的变体,并且自杀基因是iCas9。

[0099] 在一个实施方式中,IL-2与将IL-2引导至内质网的信号序列一起表达。在一些实施方式中,编码IL-2的多核苷酸编码具有SEQ ID NO:7的序列的多肽。不受理论束缚,但是将IL-2引导到内质网允许IL-2以足以进行自分泌激活的水平表达,但不细胞外地释放IL-2。参见Konstantinidis等,“Targeting IL-2 to the endoplasmic reticulum confines autocrine growth stimulation to NK-92 cells” *Exp Hematol*. 2005年2月;33 (2):159-64。可以例如通过自杀基因的存在防止持续激活表达FcR的NK-92细胞。

[0100] 另外的修饰-自杀基因

[0101] 术语“自杀基因”是允许细胞的阴性选择的基因。使用自杀基因作为安全系统,允许通过引入选择剂使表达该基因的细胞被杀灭。这在重组基因造成致使不受控制的细胞生长的突变的情况下是期望的。已经鉴定了许多自杀基因系统,包括单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶基因、水痘带状疱疹病毒胸苷激酶基因,硝基还原酶基因,大肠杆菌gpt基因和大肠杆菌Deo基因(还参见,例如,Yazawa K, Fisher W E, Brunicardi F C: Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J. Surg.* 2002年7月;26 (7):783-9)。如本文所用,自杀基因在NK-92细胞中是有活性的。通常,自杀基因编码对细胞没有不良影响、但在特定化合物存在的情况下将杀灭细胞的蛋白质。因此,自杀基因通常是系统的部分。

[0102] 在一个实施方式中,自杀基因是胸苷激酶(TK)基因。TK基因可以是野生型或突变TK基因(例如,tk30,tk75,sr39tk)。使用更昔洛韦可以杀灭表达TK蛋白的细胞。

[0103] 在另一个实施方式中,自杀基因是在5-氟胞嘧啶存在的条件下对细胞具有毒性的胞嘧啶脱氨酶。Garcia-Sanchez等,“Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1million-fold when they contaminate hematopoietic cells:a potential purging method for autologous transplantation” *Blood* 1998年7月15日;92 (2):672-82。

[0104] 在另一个实施方式中,自杀基因是在异环磷酰胺或环磷酰胺存在的条件下具有毒性的细胞色素P450。参见,例如,Touati等,“A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response” *Curr Gene Ther.* 2014;14 (3):236-46。

[0105] 在另一个实施方式中,自杀基因是iCas9。Di Stasi, (2011) “Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy”, *N Engl J Med* 365:1673-1683。还参见,Morgan, “Live and Let Die:A New Suicide Gene Therapy Moves to the Clinic” *Molecular Therapy* (2012);20:11-13。在小分子AP1903存在的情况下,iCas9蛋白诱导细胞凋亡。AP1903是生物学惰性的分子,其已经在临床研究中表现出被良好耐受,并且已经在过继性细胞疗法的情况下使用。

[0106] 在一个实施方式中,修饰的NK-92细胞在施用于患者之前被照射。NK-92细胞的照

射例如在美国专利No.8,034,332中描述,其全部内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,尚未被工程化以表达自杀基因的修饰的NK-92细胞被照射。

[0107] 转基因表达

[0108] 可以通过本领域技术人员已知的任何机制将转基因(例如CD19CAR和CD16)工程化到表达载体中。转基因可以被工程化到相同表达载体或不同表达载体中。在优选的实施方式中,转基因被工程化到相同载体中。

[0109] 在一些实施方式中,载体允许将转基因引入细胞的基因组中。在一些实施方式中,载体具有阳性选择标记。阳性选择标记包括允许细胞在杀灭不表达该基因的细胞的条件下生长的任何基因。非限制性实例包括抗生素抗性,例如遗传霉素(来自Tn5的Neo基因)。

[0110] 可以使用任何数量的载体表达Fc受体和/或CAR。在一些实施方式中,载体是质粒。在一种实施方式中,载体是病毒载体。病毒载体包括但不限于逆转录病毒载体,腺病毒载体,腺相关病毒载体,单纯疱疹病毒载体,痘病毒载体和其他。

[0111] 可以使用本领域已知的任何转染方法将转基因引入NK-92细胞,包括作为非限制性实例的感染、电穿孔、脂质转染、核转染或“基因枪”。

[0112] 抗体

[0113] 任选地,抗体可用于靶向表达癌症相关标志物的一个或多个癌细胞。许多抗体已被批准用于单独治疗癌症。

[0114] 表2.FDA批准的治疗性单克隆抗体的实例

[0115]

抗体	商标名	公司	靶标	适应症(目标疾病)
阿伦单抗	Campath®	Genzyme	CD52	慢性淋巴细胞白血病
本妥昔单抗 (Brentuximab vedotin)	Adcetris®		CD30	间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)和霍奇金淋巴瘤
西妥昔单抗	Erbix®	Bristol-Myers Squibb/Eli Lilly/Merck KGaA	表皮生长因子受体	结直肠癌,头颈癌

[0116]

抗体	商标名	公司	靶标	适应症 (目标疾病)
吉妥珠单抗	Mylotarg®	Wyeth	CD33	急性髓性白血病 (使用卡奇霉素)
替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)	Zevalin®	Spectrum Pharmaceuticals, Inc.	CD20	非霍奇金淋巴瘤 (使用钇-90 或钇-111)
伊匹单抗 (MDX-101)	Yervoy®		阻断 CTLA-4	黑色素瘤
奥法木单抗	Arzerra®		CD20	慢性淋巴细胞白血病
帕利珠单抗	Synagis®	MedImmune	RSV F 蛋白的表位	呼吸道合胞病毒
帕尼单抗	Vectibix®	Amgen	表皮生长因子受体	结直肠癌
利妥昔单抗	Rituxan®, Mabthera®	Biogen Idec/Genentech	CD20	非霍奇金淋巴瘤
托西莫单抗	Bexxar®	GlaxoSmithKline	CD20	非霍奇金淋巴瘤
曲妥珠单抗	Herceptin®	Genentech	ErbB2	乳腺癌
Blinatumomab			双特异性 CD19-引导 CD3 T-细胞衔接体	费城染色体阴性复发或难治 B 细胞前体急性淋巴细胞白血病 (ALL)
Avelumamab			抗-PD-L1	非小细胞肺癌, 转移性 Merkel 细胞癌; 胃癌, 乳腺癌, 卵巢癌, 膀胱癌, 黑色素瘤, 间皮瘤, 包括转移性或局部晚期实体肿瘤
Daratumumab			CD38	多发性骨髓瘤
埃罗妥珠单抗			SLAMF7-引导 (也称为 CD 319) 免疫刺激性抗体	多发性骨髓瘤

[0117] 抗体可以通过多种机制治疗癌症。当免疫细胞 (如NK细胞) 通过Fc受体 (如CD16) 与结合靶细胞的抗体结合时, 发生抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC)。

[0118] 因此, 在一些实施方式中, 表达CD16和/或CAR的NK-92细胞与有效量的针对特定癌症相关蛋白的至少一种单克隆抗体 (例如, 阿仑单抗、贝伐单抗、替伊莫单抗、奥法木单抗、利妥昔单抗和曲妥珠单抗) 一起施用至患者。在一些实施方式中, 单克隆抗体是裸单克隆抗体、缀合单克隆抗体或双特异性单克隆抗体。在一个实施方式中, 可以使用结合癌细胞并且还结合存在于NK-92细胞表面上的细胞表面蛋白的双特异性抗体。

[0119] 癌症特异性抗体结合在癌细胞表面上表达的特定蛋白质抗原。NK-92细胞可以被

修饰,使得抗体与NK-92细胞表面相联。在一个优选的实施方式中,抗体对癌症具有特异性。以这种方式,NK-92细胞可以特异性靶向癌症。中和抗体也可以被分离。例如,分泌性糖蛋白YKL-40在多种类型的晚期人类癌症中升高。预期针对YKL-40的抗体可用于抑制肿瘤生长、血管生成和/或转移。Faibish等,(2011) Mol.Cancer Ther.10 (5):742-751。

[0120] 抗体可以结合NK-92细胞的施用而施用。可以在施用NK-92细胞之前、同时和/或之后施用对待治疗的癌症具有特异性的抗体。

[0121] 癌症抗体可以从商业上可获得的来源购买,或者可以通过本领域已知的任何方法生产。例如,抗体可以通过从先前的一位或多位患者获得B细胞、骨髓或其他样品而产生,所述患者被癌症感染和恢复,或者在取样时正在恢复。从这些样品鉴定、筛选和生长抗体(例如单克隆抗体)的方法是已知的。例如,噬菌体展示文库可以通过从感兴趣的样品或细胞分离RNA,从分离的RNA制备cDNA,富集cDNA用于重链和/或轻链cDNA,并且使用噬菌体展示载体创建文库而制备。文库可以如例如Maruyama等所述制备和筛选,其全部内容通过引用并入本文。抗体可以通过重组方法或任何其他方法制备。人单克隆抗体的分离、筛选、表征和产生还在Beerli等,PNAS (2008) 105 (38):14336-14341中描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0122] 治疗

[0123] 还提供了用如本文所述的修饰的NK-92细胞治疗患者的方法。在一个实施方式中,患者患有癌症,并且由NK-92细胞表达的CAR对在该癌症的表面上表达的抗原具有特异性。除了对该癌症的表面上表达的抗原具有特异性的CAR之外,NK-92还表达Fc受体(即NK-92-Fc-CAR)。例如,NK-92细胞可以在其细胞表面上表达CD16和MAGE(即,NK-92-CD16-MAGE)。任选地,用修饰的NK92细胞以及抗体治疗患者。

[0124] 可以按照绝对数量的细胞向个体施用NK-92细胞,例如,所述个体可以被施用从约1000个细胞/注射到至多约100亿个细胞/注射,例如约、至少约、或最多约 $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ (等等)个NK-92细胞/注射,或任意两个数字之间的任何范围,包括端点。

[0125] 在其它实施方式中,所述个体可以被施用从约1000个细胞/注射/ $m^2$ 到至多约100亿个细胞/注射/ $m^2$ ,例如约、至少约、或最多约 $1 \times 10^8/m^2$ ,  $1 \times 10^7/m^2$ ,  $5 \times 10^7/m^2$ ,  $1 \times 10^6/m^2$ ,  $5 \times 10^6/m^2$ ,  $1 \times 10^5/m^2$ ,  $5 \times 10^5/m^2$ ,  $1 \times 10^4/m^2$ ,  $5 \times 10^4/m^2$ ,  $1 \times 10^3/m^2$ ,  $5 \times 10^3/m^2$ (等等)个NK-92细胞/注射,或任意两个数字之间的任何范围,包括端点。

[0126] 在其它实施方式中,可以按照相对数量的细胞向这样的个体施用NK-92细胞,例如,所述个体可以被施用从约1000个细胞到至多约100亿个细胞/千克个体,例如约、至少约、或最多约 $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ (等等)个NK-92细胞/千克个体,或任意两个数字之间的任何范围,包括端点。

[0127] 在其他实施方式中,可以基于体表面积的 $m^2$ 计算总剂量,包括约 $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7/m^2$ ,或任意两个数字之间的任何范围,包括端点。平均人为约1.6至约 $1.8m^2$ 。在优选实施方式中,向患者施用约10亿至约30亿个NK-92细胞。在其他实施方式中,可以基于体表面积的 $m^2$ 计算每剂注射的NK-92细胞的量,包括 $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7/m^2$ 。平均人为约1.6至约 $1.8m^2$ 。

[0128] NK-92细胞和任选地其它抗癌剂可以被施用于癌症患者一次,或者可以被施用于

癌症患者多次,例如治疗过程中每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时一次,或每1、2、3、4、5、6或7天一次,或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多周一次,或任意两个数字之间之间的任何范围,包括端点。

[0129] 在一些实施方式中,NK-92细胞以包含NK-92细胞和培养基(例如人血清或其等价物)的组合物施用。在一些实施方式中,培养基包含人血清白蛋白。在一些实施方式中,培养基包含人血浆。在一些实施方式中,培养基包含约1%至约15%的人血清或人血清等价物。在一些实施方式中,培养基包含约1%至约10%的人血清或人血清等价物。在一些实施方式中,培养基包含约1%至约5%的人血清或人血清等价物。在优选的实施方式中,培养基包含约2.5%人血清或人血清等价物。在一些实施方式中,血清是人AB血清。在一些实施方式中,使用可接受用于人类治疗剂的血清替代品,而非人血清。这样的血清替代品可以是本领域已知的或未来开发的。尽管可以使用超过15%的人血清浓度,但是预期大于约5%的浓度将是成本过高的。在一些实施方式中,NK-92细胞以包含NK-92细胞和支持细胞活力的等渗液体溶液的组合物施用。在一些实施方式中,NK-92细胞以已经从冷冻保存的样品重构的组合物施用。

[0130] 药学上可接受的组合物可以包含各种载体和赋形剂。可以使用各种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常没有不期望的物质。合适的载体和赋形剂及其制剂在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,David B.Troy编,Lippicott Williams&Wilkins(2005)中描述。药学上可接受的载体是指在生物学上或其它方面不是不期望的材料,即,材料被施用于受试者而不引起不期望的生物效应,或者不以有害的方式与含有其的药物组合物的其它组分相互作用。如果被施用于受试者,载体被任选地选择以最小化活性成分的降解和最小化受试者的不利副作用。如本文所用,术语药学上可接受的与生理学上可接受的和药理学上可接受的同义地使用。取决于施用途径,药物组合物通常将包含在储存中用于缓冲和保存的试剂,并且可以包含用于适当的递送的缓冲剂和载体。

[0131] 用于体内或体外的这些组合物可以通过常规公知灭菌技术灭菌。组合物可以含有接近生理条件所需的可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂,毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。细胞在这些制剂和/或其他药剂中的浓度可以变化,并将根据所选特定给药模式和受试者需要,主要基于流体体积、粘度、体重等而选择。

[0132] 在一个实施方式中,将NK-92细胞与用于正在被治疗的癌症的一种或多种其他治疗联合施用于患者。不受理论束缚,据信用NK-92细胞和用于癌症的另外的疗法共治疗患者将允许NK-92细胞和替代疗法给予内源性免疫系统清除迄今为止已经使这样的内源性机能不堪重负的癌症的机会。在一些实施方式中,用于正在被治疗的癌症的两种或更多种其他治疗包括例如抗体疗法,放疗,化疗,干细胞移植疗法或激素疗法。

[0133] 在一个实施方式中,将抗体与NK-92细胞联合施用于患者。在一个实施方式中,将NK-92细胞与抗体一起施用于患者,例如在同一制剂中;同时地分开施用于患者,例如在分开的制剂中;或者可以分开地施用,例如按照不同给药方案或在一天内的不同时间。当被分开施用时,抗体可以以任何合适的途径施用,例如静脉内或口服施用。

[0134] 不受理论束缚,预期表达Fc受体和CAR的组合物NK-92细胞以及当与单克隆抗体一起施用时将更容易预期逃逸突变体,并且还避免选择逃逸突变体。此外,患者自身的效应细



胞可能与靶向癌细胞的单克隆抗体一起参与ADCC,以靶向癌细胞。这种双重系统(Fc受体和CAR二者)也可以对癌细胞比对非癌细胞(肿瘤外、靶点上)更具选择性。很少的肿瘤相关抗原专门在癌细胞上表达,但非癌细胞过表达两种肿瘤相关/特异性抗原是罕见的。例如,淋巴细胞通常表达CD19和CD20二者,经常是一个上调,同时另一个下调,反之亦然。NK-92-CD16-CD19联合替伊莫单抗(ibrutinomab tiuxetan)或利妥昔单抗可以有效治疗某些淋巴瘤。

#### [0135] 试剂盒

[0136] 还公开了用于使用包括一定量的被修饰以表达细胞表面上的至少一种Fc受体和所述细胞表面上的至少一种嵌合抗原受体(CAR)的NK-92细胞、和治疗癌症的使用说明的组合物治疗癌症的试剂盒。在一些实施方式中,本公开的试剂盒还可以包括至少一种单克隆抗体。

[0137] 试剂盒的组分可以包含在一个或不同容器中,例如一个或多个小瓶。抗体可以是液体或固体形式(例如冻干后)以增加保质期。如果是液体形式,组分可以包含添加剂,例如稳定剂和/或防腐剂,如脯氨酸、甘氨酸或蔗糖或者增加保质期的其他添加剂。

[0138] 在某些实施方式中,试剂盒可以含有另外的化合物,例如要在施用修饰的NK-92细胞或NK-92细胞和抗体之前、同时或之后施用的治疗活性化合物或药物。这样的化合物的实例包括维生素,矿物质,氟氢可的松,布洛芬,利多卡因,奎尼丁,化疗剂等

[0139] 在各种实施方式中,试剂盒的使用说明将包括在癌症治疗中使用试剂盒组分的指示。所述说明可以还含有关于如何制备(例如在冻干蛋白的情况下稀释或重构)抗体和NK-92细胞(例如融化和/或培养)的信息。所述说明可以还包括关于施用的剂量和频次的指导。

[0140] 本文公开了材料、组合物和组分,其可以用于所公开的方法和组合物、可以与所公开的方法和组合物联合使用、可以用于制备所公开的方法和组合物,或者是所公开的方法和组合物的产品。这些和其他材料在本文中公开,并且应理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,尽管可能没有明确地公开这些化合物的各个不同个体和集体组合和排列的具体述及,但是每个在本文中均被具体地预期和描述。例如,如果公开和讨论了方法,并且可以对包括该方法的大量分子进行大量修改,则该方法的各个和每个组合和排列以及可能的修改都被具体地预期,除非有具体相反指示。同样地,这些的任何子集或组合也被具体地预期和公开。这个概念适用于本公开的所有方面,包括但不限于使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在可以实施的各种附加步骤,应理解这些附加步骤中的每一个可以与所公开的方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合一起实施,并且每个这样的组合或组合的子集被具体地预期且应被认为被本文公开。

#### [0141] 实施例

[0142] 以下实施例仅用于说明目的,而不应被解释为限制。存在本领域技术人员可以使用的各种替代技术和程序,其类似地允许人们成功地实施以下实施例。

#### [0143] 实施例1:在用NK-92-Fc-CAR治疗后延长的存活

[0144] 来自T系急性淋巴细胞白血病(ALL)患者、急性髓性白血病(AML)患者和前B-ALL患者的CD19阳性白血病细胞通过S.C.接种在NSG小鼠中过继地生长和扩增。使用从小鼠中的白血病结节回收的白血病细胞(第一代)。各组的NSG小鼠被I.P.接种0.2mL PBS中来自第一代的 $5 \times 10^6$ 个白血病细胞。所有人类白血病在NSG小鼠中侵袭性地生长。24小时后,使用(a)

利妥昔单抗, (b) NK-92-CD16-CD19细胞或 (c) 利妥昔单抗与NK-92-CD16-CD19细胞。每周给予小鼠治疗, 持续四个月。预期与仅用利妥昔单抗治疗相比, 用NK-92-CD16-CD19细胞或利妥昔单抗与NK-92-CD16-CD19细胞的组合治疗显著延长小鼠寿命并增加小鼠存活。

[0145] 实施例2. NK-92细胞能够表达Fc受体和CAR

[0146] 为了分析表达Fc受体和CAR的NK-92细胞, 进行用编码针对细胞系K562 (NK-92敏感, CD19阴性)、SUP-B15 (NK-92抗性, CD19阳性) 和SR-91 (NK-92抗性, CD19阴性) 的CD19-CAR的mRNA电穿孔NK-92细胞的体外细胞毒性试验。结果如图1A、1B和1C所示。图1A显示非电穿孔亲本NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。图1B显示表达CD19-CAR的亲本NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。图1C显示表达CD19-CAR的CD16 (158V) -ERIL2NK-92细胞对靶细胞系的杀灭。NK抗性、CD19阳性的SUP-B15细胞对表达CD19-CAR的NK-92细胞和CD16 (158V) -ERIL2NK-92细胞变得敏感, 而NK-抗性、CD19阴性的SR-91细胞保持抗性。K562的杀灭不受CD19-CAR的表达影响。

[0147] 实施例3. 嵌合抗原受体 (CAR) 的mRNA电穿孔至人NK细胞系中导致高转染效率和靶特异性细胞毒性

[0148] 提供了基于第一代CAR构建体的三种不同CAR (CD19、CD33和CSPG-4) 的mRNA转染、表达和细胞毒性的数据。用于mRNA转染的靶细胞系是aNK (亲本NK-92细胞) 和haNK (高亲和力FcR表达NK-92)。由GeneArt (密码子优化) 定制scFv序列, 并用MaxCyte GT转染mRNA以产生taNK (靶激活NK细胞)。使用相应抗体通过免疫荧光测定表达, 并使用标准流式细胞法试验测量细胞毒性。

[0149] 在优化关于电脉冲的电压和时间的转染方案之后, 确定了可以用所有三种mRNA CAR构建体有效地转染aNK和haNK二者。在转染后, 转染的NK细胞的生存力始终大于80%, 并且相应CAR的表达在6小时为55-60%, 在24小时为80-95%, 并且在48小时大于80%。测定针对aNK抗性细胞系的特异性细胞毒性 (用于CD19的SUP-B15, 用于CD33的SR-91和用于CSPG-4的SK-MEL)。在转染后, 针对aNK抗性细胞系的细胞毒性在24小时始终大于80%。

[0150] aNK和haNK二者可以用各种CAR构建体的mRNA可靠且一致地转染, 使转染的NK细胞的高生存力、CAR的优异表达以及靶细胞特异性细胞毒性维持至少48小时。这项技术可以容易地放大到CAR表达NK细胞系的临床级生产。haNK可以被有效转染 (以变成t-haNK) 的事实打开了恶性肿瘤的双重受体非交叉反应性靶向 (即, CD19CAR与CD20抗体) 的可能性。

[0151] 应理解, 本文描述的实施例和实施方式仅用于说明目的, 并且根据其的各种修改或改变将被建议给本领域技术人员, 并且将被包括在本申请的精神和范围内和随附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、序列登录号、专利和专利申请出于所有目的而通过引用整体并入本文。

[0152] 说明性序列

[0153] SEQ ID NO:1低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc区受体III-A氨基酸序列 (成熟形式)。第158位的苯丙氨酸标有下划线。

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu  
Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp  
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp  
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu  
Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His  
[0154] Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly  
Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile  
Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys  
Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile  
Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
[0155] SEQ ID NO:2高亲和力变体F158V免疫球蛋白  $\gamma$  Fc区受体III-A氨基酸序列(成熟  
形式)。第158位的缬氨酸标有下划线。

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu  
Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp  
Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp  
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu  
Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His  
[0156] Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly  
Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile  
Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys  
Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile  
Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
[0157] SEQ ID NO:3低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc区受体III-A氨基酸序列(前体形式)。前体  
形式的第176位对应于成熟形式的第158位。第176位的Phe标有下划线。

[0158]

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu  
Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser  
Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn  
Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly  
Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly  
Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys  
Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe  
Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly  
Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met  
Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr  
Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

[0159] SEQ ID NO:4高亲和力变体免疫球蛋白  $\gamma$  Fc区受体III-A氨基酸序列(前体形式)。  
前体形式的第176位对应于成熟形式的第158位。第176位的Val标有下划线。

[0160]

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu  
Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser  
Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn  
Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly  
Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly  
Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys  
Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe  
Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly  
Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met  
Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr  
Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

[0161] SEQ ID NO:5编码低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc区受体III-A(前体)的多核苷酸(编码  
第158位的苯丙氨酸)。

- [0162] atgtggcagc tgctctccc aactgctctg ctacttctag tticagctgg catgcggact gaagatctcc caaaggctgt  
gggtttcctg gaggctcaat ggtacagggt gctcgagaag gacagtgtga ctctgaagtg ccaggaggcc tactccctg  
aggacaattc cacacagtgg ttccacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca  
gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccgggtg cagctagaag tccatatcgg  
ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca  
ctgctctgca taaggtcaca tattacaga atggcaaagg caggaagtat ttcatcata attctgactt ctacattcca  
aaagccacac tcaaagacag cggctctac ttctgcaggg ggcttttgg gagtaaaat gtgtcttcag agactgtgaa  
catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca tcattcttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg  
tgatgggtact ccttttga gtggacacag gactatatt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg  
aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aatga
- [0163] SEQ ID NO:6野生型IL-2  
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro  
Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile  
Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr  
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
- [0164] Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser  
Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp  
Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr  
Leu Thr
- [0165] SEQ ID NO:7IL-2-ER  
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro  
Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile  
Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr  
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
- [0166] Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser  
Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp  
Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr  
Leu Thr Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu
- [0167] SEQ ID NO:8CD19-CAR DNA序列

[0168]

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GCGGATCCT GTTCCTCGTG  
GGAGCCGCCA CAGGCGCCCA TTCTGCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC  
CCAGACCACC AGCAGCCTGA GCGCCAGCCT GGGCGACAGA GTGACCATCA  
GCTGCCGGGC CAGCCAGGAC ATCAGCAAGT ACCTGAACTG GTATCAGCAG  
AAACCCGACG GCACCGTGAA GCTGCTGATC TACCACACCA GCCGGCTGCA  
CAGCGGCGTG CCCAGCAGAT TTTCTGGCAG CGGCAGCGGC ACCGACTACA  
GCCTGACCAT CTCCAACCTG GAACAGGAAG ATATCGCTAC CTACTTCTGT  
CAGCAAGGCA ACACCCTGCC CTACACCTTC GGCGGAGGCA CCAAGCTGGA  
ACTGAAGAGA GGCGGCGGAG GCTCTGGTGG AGGCGGATCT GGGGGCGGAG  
GAAGTGCGG GGGAGGATCT GAAGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGCCCTGGC  
CTGGTGGCCC CTAGCCAGAG CCTGTCCGTG ACCTGTACCG TGTCCGGCGT  
GTCCCTGCCC GACTACGGCG TGTCCTGGAT CCGGCAGCCC CCCAGAAAGG  
GCCTGGAATG GCTGGGCGTG ATCTGGGGCA GCGAGACAAC CTACTACAAC  
AGCGCCCTGA AGTCCCGGCT GACCATCATC AAGGACAACA GCAAGAGCCA  
GGTGTTCTTG AAGATGAACA GCCTGCAGAC CGACGACACC GCCATCTACT  
ACTGCGCCAA GCACTACTAC TACGGCGGCA GCTACGCCAT GGACTACTGG  
GGCCAGGGCA CCACCGTGAC CGTGTCCAGC GCCCTGTCCA ACAGCATCAT  
GTACTTCAGC CACTTCGTGC CCGTGTTTCT GCCCGCCAAG CCCACCACCA  
CCCCTGCCCC TAGACCTCCC ACCCCAGCCC CAACAATCGC CAGCCAGCCT  
CTGTCCCTGC GGCCGAAGC TAGCAGACCT GCTGCCGGCG GAGCCGTGCA  
CACCAGAGGC CTGGACCCCA AGCTGTGCTA CCTGCTGGAC GGCATCCTGT  
TCATCTATGG CGTGATCCTG ACCGCCCTGT TCCTGAGAGT GAAGTTCAGC  
AGAAGCGCCG ACGCCCCTGC CTACCAGCAG GGCCAGAACC AGCTGTACAA  
CGAGCTGAAC CTGGGCAGAC GGAAGAGTA CGACGTGCTG GACAAGCGGA  
GAGGCAGGGA CCCCAGATG GGCGGCAAGC CCAGACGGAA GAACCCCCAG  
GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG  
CGAGATCGGC ATGAAGGGCG AGCGGCGGAG GGGCAAGGGC CACGATGGAC  
TGTACCAGGG CCTGAGCACC GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTGCAC  
ATGCAGGCCC TGCCCCCAG ATGACAGCCA GGGCATTCT CCCTCGAGCG  
GCCGC

[0169] SEQ ID NO:9CD19-CAR氨基酸序列

[0170]

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQT TSSLASLGD RVTISCRASQ  
DISKYLNWYQ QKPDGTVKLL IYHTSRLHSG VPSRFSGSGS GTDYSLTISN

[0171]

LEQEDIATYF CQQGNTLPYT FGGGTKLELK RGGGSGGGG SGGGSGGGG  
SEVQLQQSGP GLVAPSQSLV VTCTVSGVSL PDYGVSWIRQ PPRKLEWLG  
VIWGSETTY NSALKSRLTI IKDNSKSQVF LKMNSLQTD TAIYYCAKHY  
YYGGSYAMDY WGQGTTVTVS SALSNSIMYF SHFVPVFLPA KPTTTPAPRP  
PTPAPTASQ PLSLRPEASR PAAGGAVHTR GLDPKLCYLL DGILFIYGVI  
LTALFLRVKF SRSADAPAYQ QGQNQLYNEL NLGRREEYDV LDKRRGRDPE  
MGGKPRRKNP QEGLYNELQK DKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLS  
TATKDTYDAL HMQUALPPR

[0172]

SEQ ID NO:10CD33-CAR DNA序列

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGGATCCT GTTCCTCGTG  
GGAGCCGCCA CAGGCGCCCA TTCTGCCCAG CCCGCCGACA TCCAGATGAC  
CCAGAGCCCT AGCAGCCTGA GCGCCAGCGT GGGCGACAGA GTGACCATCA  
CCTGTCGGGC CAGCGAGAGC GTGGACAACT ACGGCATCAG CTTCATGAAC  
TGTTCCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACGCCGC  
CAGCAATCAG GGCAGCGGCG TGCCAGCAG ATTCAGCGGC TCTGGCAGCG  
GCACCGACTT CACCCTGACC ATCAGCAGCC TGCAGCCCGA CGACTTCGCC  
ACCTACTACT GCCAGCAGAG CAAAGAGGTG CCCTGGACCT TCGGCCAGGG  
CACCAAGGTG GAAATCAAGG GCGGAGGCGG CAGCGGAGGT GGAGGAAGTG  
GCGGCGGAGG ATCTCAGGTG CAGCTGGTGC AGTCTGGCGC CGAAGTGAAG  
AAACCCGGCA GCAGCGTGAA GGTGTCCTGC AAGGCCAGCG GCTACACCTT  
CACCGACTAC AACATGCACT GGGTCCGCCA GGCCCCAGGC CAGGGACTGG  
AATGGATCGG CTACATCTAC CCCTACAACG GCGGCACCGG CTACAACCAG  
AAGTTCAAGA GCAAGGCCAC CATCACCGCC GACGAGAGCA CCAACACCGC  
CTACATGGAA CTGAGCAGCC TGCAGGAGCGA GGACACCGCC GTGTACTACT  
GCGCCAGAGG CAGACCCGCC ATGGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGGTG  
ACAGTGTTCA GCGCCCTGAG CAACAGCATC ATGTACTTCA GCCACTTCGT  
GCCCCGTGTTT CTGCCCCGCC AGCCACCAC CACCCCTGCC CCTAGACCTC  
CCACCCAGC CCAACAATC GCCAGCCAGC CTCTGTCCCT GCGGCCCGAA  
GCTAGCAGAC CTGCTGCCGG CGGAGCCGTG CACACCAGAG GCCTGGACCC  
CAAGCTGTGC TACCTGCTGG ACGGCATCCT GTTCATCTAC GCGTGATCC  
TGACCGCCCT GTTCCTGAGA GTGAAGTTCA GCAGAAGCGC CGACGCCCT

[0173]

GCCTACCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTGTAC AACGAGCTGA ACCTGGGCAG  
ACGGGAAGAG TACGACGTGC TGGACAAGCG GAGAGGCAGG GACCCCGAGA  
TGGGCGGCAA GCCCAGACGG AAGAACCCCC AGGAAGGCCT GTATAACGAA  
[0174] CTGCAGAAAG ACAAGATGGC CGAGGCCTAC AGCGAGATCG GCATGAAGGG  
CGAGCGGCGG AGGGGCAAGG GCCACGATGG ACTGTACCAG GGCCTGAGCA  
CCGCCACCAA GGACACCTAC GACGCCCTGC ACATGCAGGC CCTGCCCCC  
AGATGACAGC CAGGGCATT CTCCCTCGAG CGGCCGC

[0175] SEQ ID NO:11CD33-CAR氨基酸序列

MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIQMTQS PSSLSASVGD RVTITCRASE  
SVDNYGISFM NWFQQKPGKA PKLLIYAASN QSGSVPSRFS GSGSGTDFTL  
TISSLQPDDF ATYYCQQSKE VPWTFGQGTK VEIKGGGGSG GGGSGGGGSQ  
VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFTD YNMHWVRQAP GQGLEWIGYI  
YPYNGGTGYN QKFKSKATIT ADESTNTAYM ELSSLRSEDV AVYYCARGRP  
[0176] AMDYWGQGTIL VTVSSALSNS IMYFSHFVPV FLPKPTTTP APRPPTPAPT  
IASQPLSLRP EASRPAAGGA VHTRGLDPKL CYLLDGILFI YGVILTALFL  
RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPKMGKPR  
RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT  
YDALHMQALP PR

[0177] SEQ ID NO:12CSPG4-CAR DNA序列

CCCGGGAATT CGCCACCATG GACTGGATCT GGCGCATCCT CTCCTCGTC  
GGCGCTGCTA CCGGCGCTCA TTCGGCCCAG CCGGCCGATA TCGAGCTCAC  
CCAATCTCCA AAATTCATGT CCACATCAGT AGGAGACAGG GTCAGCGTCA  
CCTGCAAGGC CAGTCAGAAT GTGGATACTA ATGTAGCGTG GTATCAACAA  
AAACCAGGGC AATCTCCTGA ACCACTGCTT TTCTCGGCAT CCTACCGTTA  
CACTGGAGTC CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA  
[0178] CTCTCACCAT CAGCAATGTG CAGTCTGAAG ACTTGGCAGA GTATTTCTGT  
CAGCAATATA ACAGCTATCC TCTGACGTTT GGTGGCGGCA CCAAGCTGGA  
AATCAAACGG GCTGCCGAG AAGGTGGAGG CGGTTTCAGG GCGGAGGTT  
CCGGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT CGGCCATGGC CCAGGTGAAG  
CTGCAGCAGT CAGGAGGGGG CTTGGTGCAA CCTGGAGGAT CCATGAACT  
CTCCTGTGTT GTCTCTGGAT TCACTTTCAG TAATTACTGG ATGAACTGGG



- TCCGCCAGTC TCCAGAGAAG GGGCTTGAGT GGATTGCAGA AATTAGATTG  
AAATCCAATA ATTTTGGAAG ATATTATGCG GAGTCTGTGA AAGGGAGGTT  
CACCATCTCA AGAGATGATT CCAAAAGTAG TGCCTACCTG CAAATGATCA  
ACCTAAGAGC TGAAGATACT GGCATTTATT ACTGTACCAG TTATGGTAAC  
TACGTTGGGC ACTATTTTGA CCACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTCACCGT  
ATCGAGTGCC GCGGTTCTAG AGCTCTTGAG CAACTCCATC ATGTACTTCA  
GCCACTTCGT GCCGGTCTTC CTGCCAGCGA AGCCCACCAC GACGCCAGCG  
CCGCGACCAC CAACACCGGC GCCCACCATC GCGTCGCAGC CCCTGTC CCT  
GCGCCCAGAG GCGTGCCGGC CAGCGGCGGG GGGCGCAGTG CACACGAGGG  
[0179] GGCTGGACCT GCTGGATCCC AAACCTCTGCT ACCTGCTGGA TGGAATCCTC  
TTCATCTATG GTGTCATTCT CACTGCCTTG TTCCTGAGAG TGAAGTTCAG  
CAGGAGCGCA GACGCCCCCG CGTACCAGCA GGGCCAGAAC CAGCTCTATA  
ACGAGCTCAA TCTAGGACGA AGAGAGGAGT ACGATGTTTT GGACAAGAGA  
CGTGGCCGGG ACCCTGAGAT GGGGGGAAAG CCGCAGAGAA GGAAGAACCC  
TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG GCGGAGGCCT  
ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GGCAGCGGCC GGAGGGGCAA GGGGCACGAT  
GGCCTTTACC AGGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT  
TCACATGCAG GCCCTGCCCC CTCGCTAACA GCCAGGGCAT TTCTCCCTCG  
AGCGGCCGC
- [0180] SEQ ID NO:13CSPG4-CAR氨基酸序列  
MDWIWRILFL VGAATGAHSA QPADIELTQS PKFMSTSVGD RVSVTCKASQ  
NVDTNVAWYQ QKPGQSPEPL LFSASYRYTG VPDRFTGSGS GTDFTLTISN  
VQSEDLAEYF CQQYNSYPLT FGGGTKLEIK RAAAEAGGGGS GGGGSGGGGS  
GGGGSAMAQV KLQQSGGGLV QPGGSMKLSC VVSGFTFSNY WMNWVRQSPE  
KGLEWIAEIR LKSNNFGRYY AESVKGRFTI SRDDSKSSAY LQMINLRAED  
[0181] TGIYYCTSYG NYVGHYFDHW GQGTTVTVSS AAVLELLSNS IMYFSHFVPV  
FLPAKPTTTP APRPPTPAPT IASQPLSLRP EACRPAAGGA VHTRGLDLLD  
PKLCYLLDGI LFIYGVILTA LFLRVKFSRS ADAPAYQQGQ NQLYNELNLG  
RREEYDVLDK RRGDPPEMGG KPQRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM  
KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKDTYDALHM QALPPR

## 序列表

<110> 南克维斯特公司  
T • 李

<120> 用于治疗癌症的修饰的 NK-92 细胞

<130> 099083-1050738-2310US

<140> US 15/531,109  
<141> 2017-11-10

<150> PCT/US16/36991  
<151> 2016-06-10

<150> US 62/173,701  
<151> 2015-06-10

<150> US 62/337,044  
<151> 2016-05-16

[0001] <160> 13

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1  
<211> 236  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc 区受体 III-A 氨基酸序列（成熟形式）

<400> 1

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp  
1 5 10 15

Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala  
20 25 30

Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu

35	40	45
Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp		
50	55	60
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp		
65	70	75 80
Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro		
85	90	95
Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser		
100	105	110
Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys		
115	120	125
[0002]		
Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala		
130	135	140
Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe Gly Ser		
145	150	155 160
Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu		
165	170	175
Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser		
180	185	190
Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr		
195	200	205
Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp		

210

215

220

His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

225

230

235

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 合成的高亲和力变体 F158V 免疫球蛋白  $\gamma$  Fc 区受体 III-A 氨基酸序列 (成熟形式)

&lt;400&gt; 2

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp

1

5

10

15

[0003]

Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala

20

25

30

Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu

35

40

45

Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp

50

55

60

Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp

65

70

75

80

Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro

85

90

95

Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser

100

105

110

Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys  
115 120 125

Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala  
130 135 140

Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser  
145 150 155 160

Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu  
165 170 175

Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Val Ser  
180 185 190

[0004] Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr  
195 200 205

Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp Lys Asp  
210 215 220

His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
225 230 235

<210> 3

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc 区受体 III-A 氨基酸序列（前体形式）

<400> 3

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala

1	5	10	15
Gly Met Arg Thr	Glu Asp Leu Pro	Lys Ala Val Val	Phe Leu Glu Pro
20	25	30	
Gln Trp Tyr Arg	Val Leu Glu Lys	Asp Ser Val Thr	Leu Lys Cys Gln
35	40	45	
Gly Ala Tyr Ser	Pro Glu Asp Asn	Ser Thr Gln Trp	Phe His Asn Glu
50	55	60	
Ser Leu Ile Ser	Ser Gln Ala Ser	Ser Tyr Phe Ile	Asp Ala Ala Thr
65	70	75	80
Val Asp Asp Ser	Gly Glu Tyr Arg	Cys Gln Thr Asn	Leu Ser Thr Leu
85	90	95	
[0005]			
Ser Asp Pro Val	Gln Leu Glu Val	His Ile Gly Trp	Leu Leu Leu Gln
100	105	110	
Ala Pro Arg Trp	Val Phe Lys Glu	Glu Asp Pro Ile	His Leu Arg Cys
115	120	125	
His Ser Trp Lys	Asn Thr Ala Leu	His Lys Val Thr	Tyr Leu Gln Asn
130	135	140	
Gly Lys Gly Arg	Lys Tyr Phe His	His Asn Ser Asp	Phe Tyr Ile Pro
145	150	155	160
Lys Ala Thr Leu	Lys Asp Ser Gly	Ser Tyr Phe Cys	Arg Gly Leu Phe
165	170	175	
Gly Ser Lys Asn	Val Ser Ser Glu	Thr Val Asn Ile	Thr Ile Thr Gln

180

185

190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly  
210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp  
225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
245 250

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 254

[0006]

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 合成的高亲和力变异免疫球蛋白  $\gamma$  Fc 区受体 III-A 氨基酸序列（前体形式）

&lt;400&gt; 4

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
50 55 60

	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	Thr	
	65					70				75						80	
	Val	Asp	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu	
					85					90						95	
	Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	
				100					105							110	
	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys	
				115					120							125	
	His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	
				130					135							140	
[0007]	Gly	Lys	Gly	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Tyr	Ile	Pro	
	145					150					155					160	
	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Val	
					165					170						175	
	Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln	
				180						185						190	
	Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	
				195						200						205	
	Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	
				210						215						220	
	Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Trp	
	225					230							235			240	



Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
245 250

<210> 5

<211> 765

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码低亲和力免疫球蛋白  $\gamma$  Fc 区受体 III-A (前体) 的合成多核苷酸

<400> 5

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact 60

gaagatctcc caaaggctgt ggtgttctg gagcctcaat ggtacagggt gctcgagaag 120

gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180

tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240

[0008] gtcgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccggtg 300

cagctagaag tccatatcgg ctggtgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 360

gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420

tatttacaga atggcaaagg caggaagtat ttcatcata attctgactt ctacattcca 480

aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttttttg gagtaaaaat 540

gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca 600

tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact cctttttgca 660

gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg 720

aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aatga 765

<210> 6

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽 - 野生型 IL-2

<400> 6

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu  
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile  
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe  
50 55 60

[0009]

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys  
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile  
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala  
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe  
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150

<210> 7

<211> 160

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽 IL-2-ER

<400> 7

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu  
20 25 30

[0010] Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile  
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe  
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys  
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile  
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala  
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe  
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu  
145 150 155 160

<210> 8

<211> 1455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 CD19-CAR DNA 序列

<400> 8

[0011]

```

cccgggaatt cgccaccatg gactggatct ggcggatcct gttcctcgtg ggagccgcca      60
caggcgccca ttctgccag cccgccgaca tccagatgac ccagaccacc agcagcctga      120
gcgccagcct gggcgacaga gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt      180
acctgaactg gtatcagcag aaacccgacg gcaccgtgaa gctgctgac taccacacca      240
gccggctgca cagcggcgtg cccagcagat tttctggcag cggcagcggc accgactaca      300
gcctgaccat ctccaacctg gaacaggaag atatcgctac ctacttctgt cagcaaggca      360
acaccctgcc ctacaccttc ggcggaggca ccaagctgga actgaagaga ggcggcggag      420
gctctggtgg aggcgatct gggggcggag gaagtggcgg gggaggatct gaagtgcagc      480
tgcagcagag cggccctggc ctggtggccc ctagccagag cctgtccgtg acctgtaccg      540
tgtccggcgt gtccctgccc gactacggcg tgtcctggat ccggcagccc ccagaaaagg      600
gcctggaatg gctgggcgtg atctggggca gcgagacaac ctactacaac agcgcctga      660
agtcccggt gaccatcatc aaggacaaca gcaagagcca ggtgttctg aagatgaaca      720
gcctgcagac cgacgacacc gccatctact actgcgcca gcactactac tacggcgga      780

```

	gctacgccat ggactactgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtccagc gccctgtcca	840
	acagcatcat gtacttcagc cacttcgtgc ccgtgtttct gcccgccaag cccaccacca	900
	ccccgtcccc tagacctccc accccagccc caacaatcgc cagccagcct ctgtccctgc	960
	ggcccgaagc tagcagacct gctgccggcg gagccgtgca caccagaggc ctggacccca	1020
	agctgtgcta cctgctggac ggcatcctgt tcatttatgg cgtgatcctg accgccctgt	1080
	tcctgagagt gaagttcagc agaagcgccg acgcccctgc ctaccagcag ggccagaacc	1140
	agctgtacaa cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgacgtgctg gacaagcgga	1200
	gaggcaggga ccccagatg ggccggcaagc ccagacggaa gaacccccag gaaggcctgt	1260
	ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaaggcg	1320
	agcggcggag gggcaagggc cacgatggac tgtaccaggc cctgagcacc gccaccaagg	1380
	acacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atgacagcca gggcatttct	1440
[0012]	ccctcgagcg gccgc	1455

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的 CD19-CAR 氨基酸序列

&lt;400&gt; 9

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser  
 20 25 30

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala

35

40

45

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp  
50 55 60

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly  
65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu  
85 90 95

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln  
100 105 110

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
115 120 125

[0013]

Leu Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro  
145 150 155 160

Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser  
165 170 175

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro  
180 185 190

Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr  
195 200 205

Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn

210

215

220

Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp  
225 230 235 240

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr  
245 250 255

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
260 265 270

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu  
275 280 285

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
290 295 300

[0014]

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg  
305 310 315 320

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Pro Lys Leu  
325 330 335

Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr  
340 345 350

Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
355 360 365

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
370 375 380

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu

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

[0015]

<210>	10	
<211>	1437	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的 CD33-CAR DNA 序列	
<400>	10	
cccgggaatt cgccaccatg gactggatct ggcggatcct gttcctcgtg ggagccgcca		60
caggcgccca ttctgcccag cccgccgaca tccagatgac ccagagccct agcagcctga		120
gcgccagcgt gggcgacaga gtgaccatca cctgtcgggc cagcgagagc gtggacaact		180
acggcatcag ctatcatgaac tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga		240
tctacgccgc cagcaatcag ggcagcggcg tgcccagcag attcagcggc tctggcagcg		300
gcaccgactt caccctgacc atcagcagcc tgcagcccca cgacttcgcc acctactact		360



	gccagcagag caaagaggtg ccctggacct tcggccaggg caccaaggtg gaaatcaagg	420
	gcggaggcgg cagcggaggt ggaggaagtg gcggcggagg atctcaggtg cagctggtgc	480
	agtctggcgc cgaagtgaag aaacccggca gcagcgtgaa ggtgtcctgc aaggccagcg	540
	gctacacctt caccgactac aacatgcact ggggccgcca ggccccaggc cagggactgg	600
	aatggatcgg ctacatctac ccctacaacg gcggcaccgg ctacaaccag aagttcaaga	660
	gcaaggccac catcaccgcc gacgagagca ccaacaccgc ctacatggaa ctgagcagcc	720
	tgcgagcgga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggg cagacccgcc atggactact	780
	ggggccaggg aaccctggtg acagtgtcca gcgccctgag caacagcadc atgtacttca	840
	gccacttcgt gcccgtgttt ctgcccgcca agcccaccac caccctgcc cctagacctc	900
	ccccccagc cccaacaac gccagccagc ctctgtccct gcggcccgaa gctagcagac	960
	ctgtctccgg cggagccgtg cacaccagag gcctggacc caagctgtgc tacctgtgtg	1020
[0016]	acggcatcct gttcatctac ggcgtgatcc tgaccgcct gttcctgaga gtgaagtca	1080
	gcagaagcgc cgacgcccct gcctaccagc agggccagaa ccagctgtac aacgagctga	1140
	acctgggcag acgggaagag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggcagg gaccccgaga	1200
	tgggcggcaa gccagacgg aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag	1260
	acaagatggc cgaggcctac agcgagatcg gcatgaagg cgagcggcgg aggggcaagg	1320
	gccacgatgg actgtaccag ggccctagca ccgccacaa ggacacctac gacgccctgc	1380
	acatgcaggc cctgcccccc agatgacagc cagggcattt ctcctcgag cggccgc	1437
	<210> 11	
	<211> 462	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的 CD33-CAR 氨基酸序列	

&lt;400&gt; 11

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
20 25 30

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
35 40 45

Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln  
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn  
65 70 75 80

[0017]

Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
85 90 95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly  
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
145 150 155 160

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

175

Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
180 185 190

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly  
195 200 205

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser  
210 215 220

Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr  
225 230 235 240

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
245 250 255

[0018]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met  
260 265 270

Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr  
275 280 285

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln  
290 295 300

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala  
305 310 315 320

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly  
325 330 335

Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val

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

[0019]

<210>	12	
<211>	1509	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的 CSPG4-CAR DNA 序列	
<400>	12	
cccggaatt cgccaccatg gactggatct ggcgcacacct cttcctcgtc ggcgctgcta		60
ccggcgctca ttcgccccag ccggccgata tcgagctcac ccaatctcca aaattcatgt		120

	ccacatcagt aggagacagg gtcagcgtca cctgcaaggc cagtcagaat gtggatacta	180
	atgtagcgtg gtatcaacaa aaaccagggc aatctcctga accactgctt ttctcgcat	240
	cctaccgtta cactggagtc cctgatcgct tcacaggcag tggatctggg acagatttca	300
	ctctcacat cagcaatgtg cagtctgaag acttggcaga gtatttctgt cagcaatata	360
	acagctatcc tctgacgttc ggtggcggca ccaagctgga aatcaaacgg gctgccgcag	420
	aaggtggagg cggttcaggt ggcggagggt cggcggagg tggctctggc ggtggcggat	480
	cggccatggc ccaggtgaag ctgcagcagt caggaggggg cttggtgcaa cctggaggat	540
	ccatgaaact ctctgtgtt gtctctggat tcactttcag taattactgg atgaactggg	600
	tccgccagtc tccagagaag gggttgagt ggattgcaga aattagattg aaatccaata	660
	atthttgaag atattatgcg gagtctgtga aaggagggtt caccatctca agagatgatt	720
	ccaaaagtag tgcctacctg caaatgatca acctaagagc tgaagatact ggcatttatt	780
[0020]	actgtaccag ttatggtaac tacgttgggc actattttga ccactggggc caagggacca	840
	cggtcaccgt atcgagtgcc gcggttctag agctcttgag caactccatc atgtacttca	900
	gccacttcgt gccggtcttc ctgccagcga agcccaccac gacgccagcg ccgcgaccac	960
	caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc	1020
	cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggacct gctggatccc aaactctgct	1080
	acctgctgga tggaatcctc ttcatctatg gtgtcattct cactgccttg ttcctgagag	1140
	tgaagttcag caggagcgca gacgccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata	1200
	acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg	1260
	accctgagat ggggggaaag ccgcagagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg	1320
	aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagttagat tgggatgaaa ggcgagcgcc	1380
	ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct	1440

acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaaca gccagggcat ttctccctcg 1500

agcggccgc 1509

<210> 13

<211> 486

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 CSPG4-CAR 氨基酸序列

<400> 13

Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Ala His Ser Ala Gln Pro Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys  
20 25 30

[0021]

Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala  
35 40 45

Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60

Gln Ser Pro Glu Pro Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly  
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
85 90 95

Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln  
100 105 110

Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

115	120	125
Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Met Ala Gln Val		
145	150	155 160
Lys Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met		
165	170	175
Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met		
180	185	190
Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Glu		
195	200	205

[0022]

Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr Ala Glu Ser Val		
210	215	220
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Ala Tyr		
225	230	235 240
Leu Gln Met Ile Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys		
245	250	255
Thr Ser Tyr Gly Asn Tyr Val Gly His Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln		
260	265	270
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Val Leu Glu Leu Leu Ser		
275	280	285
Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala		

290	295	300	
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr			
305	310	315	320
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala			
	325	330	335
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Leu Leu Asp Pro Lys			
	340	345	350
Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu			
	355	360	365
Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro			
370	375	380	
[0023]			
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly			
385	390	395	400
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro			
	405	410	415
Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu			
	420	425	430
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile			
	435	440	445
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr			
450	455	460	
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met			



465	470	475	480
[0024]			
Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
485			

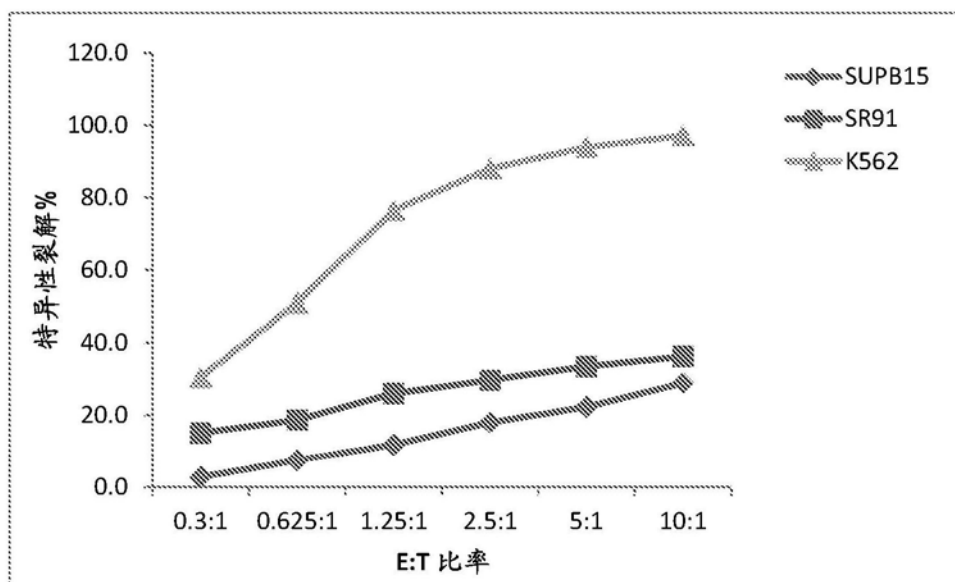


图1A

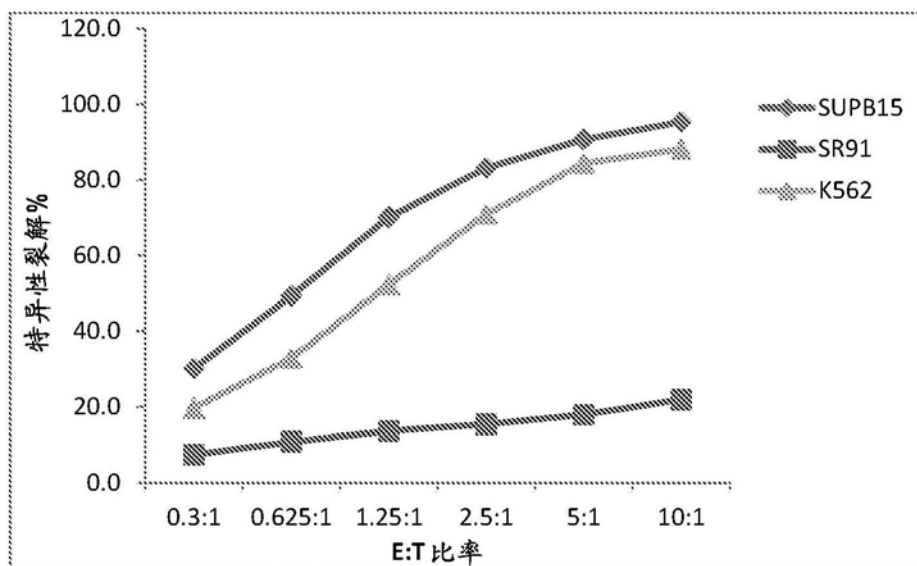


图1B

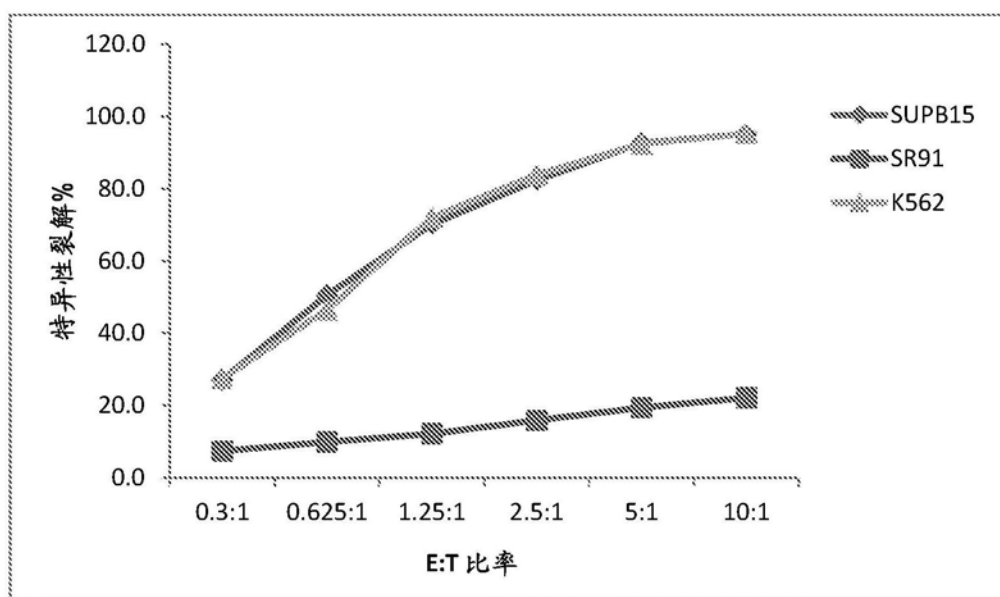


图1C