



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116745320 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 12

(21) 申请号 202180088499.4

(22) 申请日 2021.11.04

(30) 优先权数据

63/109,611 2020.11.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/058102 2021.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/098903 EN 2022.05.12

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 R·迈茨纳 C·L·麦考尔

C·芒特 M·芒赫-迪赛罗斯

D·B·米克罗斯 M·弗兰克

Y·莱库纳姆 A·A·艾莉莎黛

B·索德 D·M·库尔茨

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书7页 说明书36页

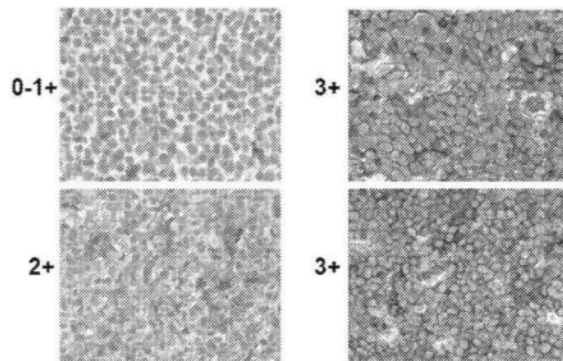
序列表12页 附图13页

## (54) 发明名称

诊断或治疗健康状况或优化CAR-T细胞疗法的治疗功效的方法

## (57) 摘要

本公开文本总体上尤其涉及用于诊断和/或治疗与CD58表达水平降低或丧失或者CD58活性的分子改变相关的各种健康状况如增殖性障碍(例如,癌症)的方法、试剂盒和系统。



1. 一种用于诊断和/或治疗个体的健康状况的试剂盒,所述试剂盒包含(i)用于评估来自所述个体的生物样品中CD58的表达水平或者编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的试剂,和(ii)其使用说明书。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述试剂盒被进一步配置用于确定所述个体对CAR-T细胞疗法的反应性,其中所述确定包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有降低的反应性。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述试剂盒被进一步配置用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体,其中所述鉴定包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者

如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比未降低也未丧失,或者没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的任一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述试剂盒被进一步配置用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效,其中所述优化包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,鉴定所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的试剂盒,其中所述个体患有或疑似患有与CD58表达水平与所述CD58的参考表达水平相比降低或丧失相关,或者与所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变相关的健康状况。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的试剂盒,其中所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的试剂盒,其中所述健康状况是癌症,任选地非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴

瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT (黏膜相关淋巴组织) 淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病或骨髓瘤。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的试剂盒, 其中所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变 (SNP)、单核苷酸变异 (SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的试剂盒, 其中所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与所述CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的试剂盒, 其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒, 其中所述氨基酸取代是Lys到Glu取代 (K60E)。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的试剂盒, 其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒, 其中所述氨基酸取代是Cys到Arg取代 (C187R)。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的试剂盒, 其中所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变包括CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力降低。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的试剂盒, 其中所述评估编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的存在包括使用选自以下的基于核酸的分析测定: 癌症个体化深度测序分析 (CAPP-seq)、核酸测序、循环肿瘤核酸评估、下一代测序 (NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增 (LAMP)、滚环扩增 (RCA)、聚合酶链反应 (PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR (qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交 (FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的试剂盒, 其中所述评估编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的存在包括使用选自以下的基于蛋白质的分析测定: 免疫组织化学 (IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的试剂盒, 所述试剂盒被进一步配置用于治疗所述健康状况。

18. 根据权利要求2至17中任一项所述的试剂盒, 其中将所述CAR-T细胞疗法作为单一疗法或与一种或多种另外的疗法组合施用于个体。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒, 其中所述CAR-T细胞疗法和/或至少一种另外的疗法包括包含CD2信号传导结构域的CAR构建体。

20. 根据权利要求2至19中任一项所述的试剂盒, 其中所述CAR-T细胞疗法靶向与野生型细胞中的密度相比以低密度表达的抗原。

21. 一种用于诊断和/或治疗健康状况的基于遗传的系统, 所述系统包括:

a) 逻辑处理器;

b) 可由所述逻辑处理器执行的存储程序代码, 所述存储程序代码在由所述处理器执行

时提供用于执行以下中的一项或多项的操作：

- i) 确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性；
- ii) 将个体鉴定为对用CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性；
- iii) 优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效；以及
- iv) 计算CAR-T细胞疗法的治疗有效量或向个体施用治疗有效量的CAR-T细胞疗法。

22. 根据权利要求21所述的系统，所述系统进一步包括通信地耦合到所述逻辑处理器的报告引擎，其中由所述报告引擎产生的报告取决于来自执行所述程序代码的结果，其中所述程序代码将所述逻辑处理器配置为接收与从个体获得的生物中CD58的表达水平或者编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的有关的预选的数据输入集，以便至少部分地基于所述预选的数据输入集将相对性能得分分配至所述个体对所述CAR-T细胞疗法的反应性，并且任选地：

- a) 确定所述个体对所述CAR-T细胞疗法的反应性；
- b) 将所述个体鉴定为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性；
- c) 优化所述CAR-T细胞疗法在所述个体中的治疗功效；和/或
- d) 计算所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量或向所述个体施用治疗有效量的所述CAR-T细胞疗法。

23. 根据权利要求21至22中任一项所述的系统，所述系统进一步包括生成报告，所述报告含有与被鉴定为对所述CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体相关和/或与被鉴定为对健康状况的治疗有效的CAR-T细胞疗法相关的信息。

24. 根据权利要求23所述的系统，其中简档报告的特征在于具有选自以下的编码：“.doc”；“.pdf”；“.xml”；“.html”；“.jpg”；“.aspx”；“.php”及其任何组合。

25. 一种含有机可执行指令的非暂时性计算机可读介质，所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作：

- 接收包含预选的数据输入集的简档；  
至少部分地基于所述简档，将相对性能得分分配至所鉴定的CAR-T细胞疗法；以及  
基于所分配的性能得分，输出所述CAR-T细胞疗法的报告。

26. 一种含有机可执行指令的非暂时性计算机可读介质，所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作：

- 接收包含预选的数据输入集的简档；  
至少部分地基于所述简档，将相对无反应性得分分配至所鉴定的个体；以及  
基于所分配的无反应性得分，输出所述个体的报告。

27. 一种由根据权利要求23至26中任一项所述的系统或介质生成的报告。

28. 一种用于确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性的方法，所述方法包括：

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失，或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在，其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触，并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用；以及

b) 如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失，或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种，则将所述个体鉴定为对用所述

CAR-T细胞疗法治疗具有降低的反应性。

29. 一种用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体的方法,所述方法包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者

如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比未降低也未丧失,或者没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的任一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。

30. 一种用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效的方法,所述方法包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,鉴定所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量。

31. 一种用于向个体施用CAR-T细胞疗法的方法,所述方法包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;

b) 基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,施用治疗有效量的所述CAR-T细胞疗法。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的方法,所述个体患有或疑似患有与CD58表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失相关,或者与CD58活性的一种或多种分子改变相关的健康状况。

33. 根据权利要求32所述的方法,所述方法进一步包括治疗所述健康状况。

34. 根据权利要求28至33中任一项所述的方法,其中所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。

35. 根据权利要求28至33中任一项所述的方法,其中所述健康状况是癌症,任选地非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病或骨髓瘤。

36. 根据权利要求28至35中任一项所述的方法,其中所述CD58活性的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。

37. 根据权利要求28至36中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。

38. 根据权利要求28至37中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述氨基酸取代是Lys到Glu取代(K60E)。

40. 根据权利要求28至39中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述氨基酸取代是Cys到Arg取代(C187R)。

42. 根据权利要求28至41中任一项所述的方法,其中所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变包括CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力降低。

43. 根据权利要求28至42中任一项所述的方法,其中所述检测所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用包括选自以下的基于核酸的分析测定:核酸测序、循环肿瘤核酸评估、下一代测序(NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、聚合酶链反应(PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR(qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交(FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。

44. 根据权利要求28至43中任一项所述的方法,其中所述检测所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用包括选自以下的基于蛋白质的分析测定:免疫组织化学(IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。

45. 根据权利要求28至44中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向所述个体施用所述CAR-T细胞疗法,其中将所述CAR-T细胞疗法作为单一疗法或与一种或多种另外的疗法组合施用于所述个体。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述CAR-T细胞疗法和/或至少一种另外的疗法包括包含CD2信号传导结构域的CAR构建体。

47. 根据权利要求28至46中任一项所述的方法,其中所述CAR-T细胞疗法靶向与野生型细胞中的密度相比以低密度表达的抗原。

48. 一种治疗患有健康状况的个体的方法,所述健康状况的特征在于以下中的至少一种:CD58的表达降低或丧失,或者编码CD58的基因的一种或多种分子改变,所述方法包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;

b) 如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为可能对用包

含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗有反应,以及

c) 向步骤(b)中被鉴定为可能对用包含CD2的CAR构建体的治疗有反应的个体施用所述用包含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗。

49. 一种治疗个体的健康状况的方法,所述方法包括:

a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及

b) 基于在步骤(a)中检测到CD58的表达水平降低或丧失,或者所述编码CD58的基因的一种或多种分子改变,向所述个体施用用包含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗。

50. 根据权利要求48或49所述的方法,其中所述包含CD2信号传导结构域的CAR构建体进一步包含抗CD19 scFv结构域。

51. 根据权利要求48-50中任一项所述的方法,其中所述包含CD2信号传导结构域的CAR构建体包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

52. 根据权利要求48-51中任一项所述的方法,其中所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。

53. 根据权利要求48-51中任一项所述的方法,其中所述健康状况是癌症。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述癌症选自:非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病和骨髓瘤。

55. 根据权利要求48-54中任一项所述的方法,其中所述CD58活性的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。

56. 根据权利要求48-55中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。

57. 根据权利要求48-56中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述氨基酸取代是Lys到Glu取代(K60E)。

59. 根据权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述氨基酸取代是Cys到Arg取代(C187R)。

61. 根据权利要求48-60中任一项所述的方法,其中所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变包括CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力降低。

62. 根据权利要求48-61中任一项所述的方法,其中所述检测所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用包括选自以下的基于核酸的分析测定:核酸测序、循

环肿瘤核酸评估、下一代测序(NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、聚合酶链反应(PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR(qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交(FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。

63. 根据权利要求48-61中任一项所述的方法,其中所述检测所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用包括选自以下的基于蛋白质的分析测定:免疫组织化学(IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。

## 诊断或治疗健康状况或优化CAR-T细胞疗法的治疗功效的方法

关于联邦政府资助的研究和开发的声明

[0001] 本发明是在由美国国立卫生研究院授予的合同CA241076和CA049605下在美国政府支持下完成的。美国政府享有本发明的一定权利。

相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年11月4日提交的美国临时专利申请序列号63/109,611的优先权,将所述临时专利申请的公开内容通过引用以其整体(包括任何附图)并入本文。

序列表的并入

[0003] 本申请包含序列表,将其通过引用以其整体特此并入。所附的名称为“Sequence Listing\_078430-525001WO\_SequenceListing\_ST25.txt”的序列表文本文件创建于2021年10月25日,并且为5KB。

### 技术领域

[0004] 本公开文本总体上尤其涉及用于诊断和/或治疗与CD58表达水平降低或丧失或者CD58活性的分子改变相关的健康状况如增殖性障碍(例如,癌症)的方法、试剂盒和系统。

### 背景技术

[0005] 基因修饰的免疫细胞的过继转移已经成为各种恶性肿瘤的有效疗法。例如,过继T细胞疗法的当前模式包括经修饰以表达癌症抗原特异性受体(如嵌合抗原受体(CAR)和高亲和力T细胞受体(TCR))的细胞。在过继T细胞疗法中,可以将经修饰的T细胞通过体外或离体暴露于同源抗原而激活,将其扩增,然后施用于个体,所述T细胞在所述个体中增殖并展现出细胞溶解活性和/或发送信号以启动针对癌症的免疫应答。

[0006] 使用嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞(CART)疗法(其依赖于将T细胞重定向到癌细胞(如B细胞恶性肿瘤)上合适的细胞表面分子)的最新进展在利用免疫系统的力量治疗B细胞恶性肿瘤和其他癌症方面显示出有希望的结果。例如,使用对B细胞恶性肿瘤上的CD19分子具有特异性的CAR-T细胞进行的最新临床试验在患有晚期癌症的患者子集中显示疾病明显消退。单剂量的CD19 CAR-T细胞导致大约50%的患有大B细胞淋巴瘤(LBCL)的患者完全缓解。这一成功导致FDA批准了两种CD19-CAR T细胞治疗剂,即阿基仑赛(axicabtagene ciloleucel, YESCARTA®)和替沙仑赛(tisagenlecleucel, KYMRIA®),其他治疗剂在用于治疗LBCL和B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)的药物治疗的临床开发中。特别地,在大多数LBCL患者中,完全反应是持续的。

[0007] 然而,除了CAR-T细胞识别和破坏所靶向细胞的能力外,成功的治疗性T细胞疗法还需要具有增殖的能力,随时间推移持续存在并进一步监测白血病细胞逃逸细胞。据报道,T细胞的可变表型状态(无论其呈无反应、抑制或耗竭状态)对CAR-T细胞的功效具有不同影响。为了有效,CAR-T细胞需要持续存在并维持响应于CAR的抗原而增殖的能力。

[0008] 此外,存在对确定疾病进展的原因以及治疗对现有CAR-T疗法产生耐药性的患者

的迫切需要。特别地,据报道,CD19丧失似乎是针对B-ALL的CAR-T细胞疗法后复发的最常见原因,导致一个系列中多于90%的复发,并且还发生在多达30%的LBCL病例中。随着治疗后活检成为确定驱动治疗耐药性的患者特有因素的标准,仅在最近才观察到这种耐药性。

[0009] 因此,需要新的组合物和策略来产生用于过继T细胞疗法的改进的治疗性细胞。本发明公开的方面和实施方案解决了这些需求并提供了其他相关的优点。

## 发明内容

[0010] 本文尤其提供了用于诊断和/或治疗与CD58活性的一种或多种分子改变相关的各种健康状况如增殖性障碍(例如癌症)的方法、试剂盒和系统。特别地,本公开文本的一些实施方案涉及用于确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性的方法。其他实施方案涉及用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体的方法。在一些实施方案中,还提供了用于优化CAR-T细胞疗法在有需要的个体中的治疗功效的方法。本公开文本的另外的实施方案涉及用于向有需要的个体施用CAR-T细胞疗法的方法。还提供了用于预防和/或治疗有需要的个体的健康状况的试剂盒和系统。

[0011] 在一方面,本文提供了用于诊断和/或治疗个体的健康状况的试剂盒,所述试剂盒包括(i)用于评估生物样品中CD58的表达水平或编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的试剂,和(ii)其使用说明书。

[0012] 所公开的试剂盒的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒被进一步配置用于确定所述个体对CAR-T细胞疗法的反应性,其中所述确定包括:(a)检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b)如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有降低的反应性。

[0013] 在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒被进一步配置用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体,其中所述鉴定包括:(a)检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b)如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比未降低也未丧失,或者没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的任一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。

[0014] 在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒被进一步配置用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效,其中所述优化包括:(a)检测在从所述个体获得的生物样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接

触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b)基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,鉴定所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量。

[0015] 在一些实施方案中,所述个体患有或疑似患有与CD58表达水平与所述CD58的参考表达水平相比降低或丧失相关,或与所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变相关的健康状况。在一些实施方案中,所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。在一些实施方案中,所述健康状况是癌症,任性地非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病或骨髓瘤。

[0016] 在一些实施方案中,所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失(InDel)突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与所述CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Lys到Glu取代(K60E)。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Cys到Arg取代(C187R)。在一些实施方案中,所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变包括CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力降低。

[0017] 在一些实施方案中,所述评估包括使用选自以下的基于核酸的分析测定:癌症个体化深度测序分析(CAPP-seq)、核酸测序、循环肿瘤核酸评估、下一代测序(NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、聚合酶链反应(PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR(qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交(FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。在一些实施方案中,所述评估包括使用选自以下的基于蛋白质的分析测定:免疫组织化学(IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。

[0018] 在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒被进一步配置用于治疗健康状况。在一些实施方案中,将所述CAR-T细胞疗法作为单一疗法或与一种或多种另外的疗法组合施用于个体。在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法和/或至少一种另外的疗法包括包含CD2信号传导结构域的CAR构建体。在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法靶向与野生型细胞中的密度相比以低密度表达的抗原。

[0019] 在另一方面,本文提供了用于诊断和治疗健康状况的基于遗传的系统,所述系统包括:a)逻辑处理器;和b)可由所述逻辑处理器执行的存储程序代码,所述存储程序代码在由所述处理器执行时提供用于执行根据本公开文本的方法的操作。在一些实施方案中,所

述系统包括 (a) 逻辑处理器; 和 (b) 可由所述逻辑处理器执行的存储程序代码, 所述存储程序代码在由所述处理器执行时提供用于执行以下中的一项或多项的操作: (i) 确定个体对 CAR-T 细胞疗法的反应性; (ii) 将个体鉴定为对用 CAR-T 细胞疗法治疗具有增加的无反应性; (iii) 优化 CAR-T 细胞疗法在个体中的治疗功效; 以及 (iv) 计算 CAR-T 细胞疗法的治疗有效量或向个体施用治疗有效量的 CAR-T 细胞疗法。

[0020] 在一些实施方案中, 本文公开的系统进一步包括通信地耦合到所述逻辑处理器的报告引擎, 其中由所述报告引擎产生的报告取决于来自执行所述程序代码的结果, 其中所述程序代码将所述逻辑处理器配置为接收来自基因扫描器的与从个体获得的生物中 CD58 的表达水平或者编码 CD58 的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在有关的预选的数据输入集, 以便至少部分地基于所述预选的数据输入集将相对性能得分分配至所述个体对所述 CAR-T 细胞疗法的反应性, 并且任选地: (a) 确定所述个体对所述 CAR-T 细胞疗法的反应性; (b) 将所述个体鉴定为对用所述 CAR-T 细胞疗法治疗具有增加的无反应性; (c) 优化所述 CAR-T 细胞疗法在所述个体中的治疗功效; 和/或 (d) 计算所述 CAR-T 细胞疗法的治疗有效量或向所述个体施用治疗有效量的所述 CAR-T 细胞疗法。

[0021] 在一些实施方案中, 本公开文本的系统进一步包括生成报告, 所述报告含有与被鉴定为对所述 CAR-T 细胞疗法具有增加的无反应性的个体相关和/或与被鉴定为对健康状况的治疗有效的 CAR-T 细胞疗法相关的信息。在一些实施方案中, 简档报告的特征在于具有选自以下的编码: “.doc”; “.pdf”; “.xml”; “.html”; “.jpg”; “.aspx”; “.php” 及其任何组合。

[0022] 在又另一方面, 本文提供了一种含有机器可执行指令的非暂时性计算机可读介质, 所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作: 接收包括预选的数据输入集的报告; 至少部分地基于所述报告, 将相对性能得分分配至所鉴定的 CAR-T 细胞疗法; 以及根据所分配的性能得分输出所述 CAR-T 细胞疗法的报告。在一些实施方案中, 本文提供了一种含有机器可执行指令的非暂时性计算机可读介质, 所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作: 接收包括预选的数据输入集的报告; 至少部分地基于所述报告, 将相对无反应性得分分配至所鉴定的个体; 以及根据所分配的无反应性得分输出所述个体的报告。因此, 由本公开文本的系统生成的 CAR-T 细胞疗法报告和个体报告也在本公开文本的范围内。

[0023] 在一方面, 本文提供了用于确定个体对 CAR-T 细胞疗法的反应性的方法, 所述方法包括: (a) 检测在从所述个体获得的生物样品中 CD58 的表达水平与 CD58 的参考表达水平相比是否降低或丧失, 或者 CD58 活性的一种或多种分子改变是否存在, 其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触, 并且检测所述检测试剂与所述样品中编码 CD58 的基因或其产物之间的相互作用; 以及 (b) 如果在所述样品中 CD58 的表达水平与 CD58 的参考表达水平相比降低或丧失, 或者检测到 CD58 活性的一种或多种分子改变中的至少一种, 则将所述个体鉴定为对用所述 CAR-T 细胞疗法治疗具有降低的反应性。

[0024] 在另一方面, 本文提供了用于鉴定对 CAR-T 细胞疗法具有增加的无反应性的个体的方法, 所述方法包括: (a) 检测在从所述个体获得的生物样品中 CD58 的表达水平与 CD58 的参考表达水平相比是否降低或丧失, 或者 CD58 活性的一种或多种分子改变是否存在, 其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触, 并且检测所述检测试剂与所述样品中编码

CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b)如果在所述样品中CD58的表达水平降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者如果在所述样品中CD58的表达水平没有降低或丧失,或者没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的任一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。

[0025] 在另一方面,本文提供了用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效的方法,所述方法包括:(a)检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;(b)基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,鉴定所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量。

[0026] 在又另一方面,本文提供了用于向个体施用CAR-T细胞疗法的方法,所述方法包括:(a)检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;(b)基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,施用治疗有效量的所述CAR-T细胞疗法。

[0027] 所公开的方法的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述个体患有或疑似患有与CD58表达水平降低或丧失相关,或者与CD58活性的一种或多种分子改变相关的健康状况。在一些实施方案中,本公开文本的方法进一步包括治疗所述健康状况。在一些实施方案中,所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。在一些实施方案中,所述健康状况是癌症,任选地非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病或骨髓瘤。

[0028] 在一些实施方案中,所述CD58活性的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Lys到Glu取代(K60E)。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Cys到Arg取代(C187R)。在一些实施方案中,所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变包括CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力降低。

[0029] 在一些实施方案中,所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作

用的检测包括使用选自以下的基于核酸的分析测定：癌症个体化深度测序分析 (CAPP-seq)、核酸测序、循环肿瘤核酸评估、下一代测序 (NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增 (LAMP)、滚环扩增 (RCA)、聚合酶链反应 (PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR (qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交 (FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。

[0030] 在一些实施方案中,所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用的检测包括使用选自以下的基于蛋白质的分析测定：免疫组织化学 (IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。

[0031] 在一些实施方案中,本文所述的方法进一步包括向所述个体施用所述CAR-T细胞疗法,其中将所述CAR-T细胞疗法作为单一疗法或与一种或多种另外的疗法组合施用于个体。在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法和/或至少一种另外的疗法包括包含CD2共刺激结构域的CAR构建体。在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法靶向与野生型细胞中的密度相比以低密度表达的抗原。

[0032] 前述发明内容仅是说明性的,并不旨在以任何方式进行限制。除了本文描述的说明性实施方案和特征之外,根据附图、具体实施方式和权利要求,本公开文本的其他方面、实施方案、目的和特征将变得完全清楚。

## 附图说明

[0033] 图1A-图1E以图形方式总结了为了证实接受阿基仑赛的LBCL患者的持久缓解不需要CD58的改变而进行的实验的结果。通过免疫组织化学 (IHC) 确定具有CD58的突变或丧失CD58表达的患者具有较差的结局。CR:完全反应;PR:部分反应;SD:稳定反应;PD:疾病进展。

[0034] 图2A-图2J以图形方式总结了为了说明在体外和异种移植模型中CD58表达的丧失会降低CAR-T细胞的功效而进行的实验的结果。

[0035] 图3A-图3J以图形方式总结了为了说明CD58-CD2相互作用导致CAR-T细胞活性增强而进行的实验的结果。

[0036] 图4A-图4J以图形方式总结了为了说明可以将CAR-T细胞工程化以克服B细胞恶性肿瘤中的CD58丧失而进行的实验的结果。

[0037] 图5A-图5B以图形方式总结了为了说明通过免疫组织化学 (IHC) 确定丧失CD58的表达 (图5A) 或具有CD58的突变 (图5B) 的患者在CAR-T细胞疗法后具有较差的结局而进行的实验的结果。

[0038] 图6A-图6B以图形方式总结了为了说明在与敲除和未敲除CD58的DIPG细胞系一起孵育时,通过GD2-4-1BB $\zeta$ CAR减少细胞因子产生而进行的实验的结果。

[0039] 图7A-图7C以图形方式总结了为了评价CD19-CD28 $\zeta$ 或CD19-4-1BB $\zeta$ 针对CD58野生型或CD58敲除系的体外CAR功效,以及针对CD58敲除异种移植物和野生型异种移植物的体内CAR功效而进行的实验的结果。

[0040] 图8A-图8B以图形方式总结了为了说明参与肌动蛋白细胞骨架重组的蛋白质并且诸如VASP和WAS在CD2刺激的细胞中升高而进行的实验的结果。

## 具体实施方式

[0041] 本公开文本总体上尤其涉及用于诊断和/或治疗与CD58活性的一种或多种分子改变相关的各种健康状况如增殖性障碍(例如癌症)的方法、试剂盒和系统。特别地,本公开文本的一些实施方案涉及用于确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性的方法。本公开文本的一些实施方案涉及用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体的方法。本公开文本的其他实施方案涉及用于优化CAR-T细胞疗法在有需要的个体中的治疗功效的方法。本公开文本的另外的实施方案涉及用于向有需要的个体施用CAR-T细胞疗法的方法。还提供了用于预防和/或治疗有需要的个体的健康状况的试剂盒和系统。

[0042] 如上文所讨论的,使用CAR修饰的自体T细胞(CART)疗法(其依赖于将T细胞重定向到癌细胞(如B细胞恶性肿瘤)上合适的细胞表面分子)的最新进展在利用免疫系统的力量治疗B细胞恶性肿瘤和其他癌症方面显示出有希望的结果。特别地,CD19CAR-T细胞已经彻底改变了B细胞恶性肿瘤(包括大B细胞淋巴瘤(LBCL))的治疗。例如,单剂量的CD19 CAR-T细胞导致大约50%的患有LBCL的患者完全缓解。这一成功导致FDA批准了两种药剂(阿基仑赛和替沙仑赛),其他药物在临床开发中。特别地,在大多数LBCL患者中,完全反应是持续的。

[0043] 二期试验已经显示CD19 CAR在大B细胞淋巴瘤(LBCL)中的持久完全反应(CR)率高达40%,这是相对于先前的护理标准的显著改善。基于这些结果和阿基仑赛(YESTARTA®)(一种CD19-CAR-T细胞疗法,现已成为两个化学治疗线失败后用于LBCL的护理标准)的真实世界研究。正在进行的临床试验将确定CD19 CAR T疗法是否将成为难治性或早期复发性LBCL的新标准(NCT03391466、NCT03575351和NCT03570892)。

[0044] 然而,存在迫切的治疗需要以确定疾病进展的原因,并治疗对现有CAR-T疗法产生耐药性的患者。特别地,CD19丧失似乎是针对B细胞急性淋巴母细胞白血病(B-ALL)的CAR-T细胞疗法后复发的最常见原因,导致一个系列中多于90%的复发,并且还发生在多达30%的LBCL病例中。随着治疗后活检成为确定驱动治疗耐药性的患者特有因素的标准,仅在最近才观察到这种耐药性。对CAR耐药性机制的透彻理解将有助于确定哪些患者最有可能受益于CAR-T细胞,并且以便产生能够将益处扩展到更大数量的患者的新型构建体。不受任何特定理论的束缚,因为LBCL中对CD19 CAR的完全反应的高百分比是持久的,所以预期CR率的增加将转化为治愈更多患者的疾病。

[0045] 对CAR-T细胞功效的机制了解得很少。通常认为,将共刺激结构域整合到第二代构建体中已经导致用CD19 CAR观察到的临床成功。然而,最近的研究表明,第二代CAR在临床前模型中的一些感知到的益处实际上可能是由CAR架构的其他要素驱动的。如下文更详细地描述的,本文呈现的实验结果表明,即使它们含有高功能的共刺激结构域,当通过CD2经由CD58(其在肿瘤细胞上的天然配体)剥夺T细胞另外的共刺激时,FDA批准的CD19-CAR-T细胞治疗剂阿基仑赛和替沙仑赛两者都最终失效。然而,本文所述的实验数据还表明,CD58突变或丧失的有害作用可能是依赖于肿瘤细胞表达的靶抗原密度的情境。

[0046] CD2是天然TCR的重要共刺激结构域,并且先前已显示CD2与CD58的相互作用在TCR连接后以及在体外通过第一代CAR支持细胞因子产生。如下文更详细地描述的,进行了本文所述的几个实验以探索CD2连接在CAR-T细胞的背景下的作用,并且发现与天然TCR非常相似,CD58的CD2连接导致近端TCR分子的磷酸化增强,但是也改变了对T细胞活性重要的细胞

骨架和粘附分子。本文呈现的数据与最近发表的关于通过CD2激活的细胞毒性T淋巴细胞的磷酸肽组(phosphopeptidome)的研究一致,其中确定是CD2驱动细胞骨架重排,从而导致肿瘤细胞裂解。此外,CARD11-BCL10-MALT1(CBM)信号小体(signalosome)的磷酸化提供了一种潜在的机制来解释对表达CD58的靶细胞的持续抗肿瘤活性。

[0047] 大量的研究集中在通过将另外的共刺激和细胞因子信号整合到CAR构建体中来生成更多功能CAR。但是,这项工作在很大程度上是通过临床前建模指导的,所述临床前建模可能无法捕获患者耐药性的真正机制。随着将CAR运用于患有另外的适应证(包括实体瘤)的更多患者,可能必须进行深入的相关工作,从而可以使研究人员理解CAR失败的机制。在具有CD58畸变的患者中以及在敲除CD58的临床前模型中观察到CD19CAR的有限活性后,进行了另外的实验以产生能够通过整合CD2信号传导来克服这种新型耐药性机制的CAR-T细胞。发现与传统CAR呈反式提供CD2共刺激的CAR-T细胞成功地在体内克服了CD58丧失。本文呈现的实验结果还表明,共刺激可以以反式最好地提供给CAR构建体,如在天然TCR环境中所发生的,并且先前已经针对具有可替代共刺激结构域的CAR加以报道。

[0048] CD58突变和表达变化在其他癌症(包括霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤以及甚至结肠癌)中很常见。因此,此轴线可能是对于其他疾病的CAR-T细胞结局的重要决定因素,并且还可以预测对其他免疫疗法模式(包括检查点抑制剂、双特异性抗体和转基因TCR)的反应。此外,CD2连接对于自然杀伤(NK)细胞功能也很重要,这表明CD58突变可能会限制CAR-NK细胞的功效,最近已经证明CAR-NK细胞是用于治疗B细胞恶性肿瘤的有希望的模式。肿瘤细胞上也可能存在另外的共受体,所述共受体也可以调节CAR功能,并且像CD58一样,将成为预测对CAR-T细胞疗法的反应的重要因素。

### 定义

[0049] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术术语、符号和其他科学术语或用辞都旨在具有本公开文本所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。本文描述或提及的许多技术和程序是本领域技术人员很好理解的并且通常由本领域技术人员使用常规方法加以采用。

[0050] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”包括复数指示物。例如,术语“细胞”包括一个或多个细胞,包含其混合物。本文中使用“A和/或B”来包括所有的以下替代形式:“A”、“B”、“A或B”以及“A和B”。

[0051] 某些范围在本文中通过前面带有术语“约”的数值呈现。本文中术语“约”是为了对其后的精确数字以及接近或近似所述术语后的数字的数字提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现它的上下文中提供具体列举的数字的基本等效形式的数字。如果根据上下文原本不清楚近似程度,则“约”意指在提供的值的正负10%以内,或四舍五入到最接近的有效数字,在所有情况下包括所提供的值。在一些实施方案中,术语“约”表示指定值±最高10%、最高±5%或最高±1%。

[0052] 如本文所用,术语“施用(administration)”和“施用(administering)”是指通过如下施用途径递送生物活性组合物或制品:包括但不限于口服、静脉内、动脉内、肌内、腹膜内、皮下、肌内和外用施用或其组合。所述术语包括但不限于由医学专业人员进行的施用

和自我施用。

[0053] “癌症”是指具有致癌细胞的几种典型特征(如不受控制的增殖、永生性、转移潜能、快速的生长和增殖速率,以及某些特征性的形态特征)的细胞的存在。癌细胞可以聚集成团块,如肿瘤,或者可以单独存在于个体体内。肿瘤可以是实体瘤、软组织瘤或转移性病变。如本文所用,术语“癌症”还包括其他类型的非肿瘤癌症。非限制性例子包括血癌或血液癌症,例如白血病。癌症可包括恶化前癌症以及恶性癌症。

[0054] 术语“细胞”、“细胞培养物”和“细胞系”不仅指代特定的主题细胞、细胞培养物或细胞系,而且指代这样的细胞、细胞培养物或细胞系的后代或潜在后代,而不考虑培养中的转移或传代次数。应当理解的是,并非所有后代都与亲代细胞完全相同。这是因为某些修饰可能由于突变(例如,故意或无意的突变)或环境影响(例如,甲基化或其他表观遗传修饰)而在后代中发生,使得后代实际上可能与亲本细胞不同,但是仍被包括在如本文所用的术语的范围内,只要后代保留与原始细胞、细胞培养物或细胞系的功能相同的功能即可。

[0055] 如本文所用的术语“工程化”或“重组”核酸分子、多肽或细胞是指已经通过人类干预改变的核酸分子、多肽或细胞。

[0056] 如本文所用并且除非另外指明,否则药剂的“治疗有效量”或“治疗有效数量”是足以在疾病(例如癌症)的治疗或管理中提供治疗益处,或足以延迟或最小化与疾病相关的一种或多种症状的量或数量。化合物的治疗有效量或数量意指单独或与其他治疗剂组合的治疗剂在疾病的治疗或管理中提供治疗益处的量或数量。术语“治疗有效量”可涵盖改善疾病的整体治疗、减少或避免疾病的症状或病因、或增强另一治疗剂的治疗功效的量或数量。“有效量”的例子是足以促成治疗、预防或减轻疾病的一种或多种症状的量,其也可以称为“治疗有效量”。症状的“减轻”意指一种或多种症状的严重程度或频率的降低或者一种或多种症状的消除。组合物的确切量(包括“治疗有效量”)将取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,2010);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(2016);Pickar,Dosage Calculations(2012);以及Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,2012,Gennaro编辑,Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0057] 如本文所用,“受试者”或“个体”包括动物,如人(例如,人类受试者)和非人动物。在一些实施方案中,“受试者”或“个体”是在医生的护理下的患者。因此,所述受试者可以是患有、有风险患上或疑似患有目的疾病(例如,癌症)和/或疾病的一种或多种症状的人类患者或个体。所述受试者也可以是在诊断时或之后被诊断为具有目的病症的风险的个体。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(例如啮齿动物(例如小鼠)、非人灵长类动物和其他哺乳动物(例如像,绵羊、狗、牛))、鸡以及非哺乳动物(如两栖动物、爬行动物等)。

[0058] 在提供值范围的情况下,应理解的是除非上下文另外明确规定,否则在该范围的上限值与下限值之间的每个中间值(至下限值的单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何其他所陈述的或中间值都被涵盖在本公开文本内。这些更小范围的上限值和下限值可以独立地被包括在更小范围内,并且也被涵盖在本公开文本内,服从于在所陈述的范围内任何确切排除的限值。当陈述的范围包括一个或两个界限时,排除那些包括的界限中的一个或两个的范围也包括在本公开文本中。

[0059] 应理解的是,本文描述的本公开文本的方面和实施方案包括“包含(comprising)”方面和实施方案、“由方面和实施方案组成(consisting)”以及“基本上由方面和实施方案组成(consisting essentially of)”。如本文所用,“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的要素或方法步骤。如本文所用,“由……组成”排除在要求保护的组合物或方法中未指定的任何要素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由……组成”并不排除不会实质性地影响要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征的材料或步骤。术语“包含”在本文中的任何叙述,特别是在组合物的组分的描述中或在方法的步骤的描述中,被理解为涵盖基本上由所列举组分或步骤组成以及由所列举组分或步骤组成的那些组合物和方法。

[0060] 呈现标题(例如,(a)、(b)、(i)等)只是为了便于阅读说明书和权利要求。说明书或权利要求中的标题的使用不要求步骤或要素按字母或数字顺序或它们呈现的顺序进行。

[0061] 应了解,为清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本公开文本的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本公开文本的各种特征也可以分开地或以任何合适的子组合提供。属于本公开文本的实施方案的所有组合确切地涵盖在本公开文本中并且在本文中公开如同每个和每一种组合均单独地和明确地公开一样。另外,各种实施方案及其要素的所有子组合也确切地被本公开文本所涵盖并且在本文中公开,如同每一个这样的子组合都单独且明确地在本文中公开一样。

#### CD58

[0062] CD58,也称为淋巴细胞功能相关抗原3(LFA-3),首先在20世纪80年代从人(智人(*Homo sapiens*))中被鉴定为粘附分子。它是一种高度糖基化的蛋白质,其细胞外区域含有单个V集和C2集Ig超家族(IgSF)结构域。CD58在人造血谱系和非造血谱系(包括树突细胞、巨噬细胞、内皮细胞和红细胞)的表面上以跨膜和糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定形式表达。CD58也从几种其他哺乳动物(包括猪(欧亚野猪(*Sus scrofa*)) and 绵羊(绵羊(*Ovis aries*)))中鉴定出。在人体中进行的几项先前研究表明,CD58参与T细胞的细胞因子产生、T细胞对IL-12的反应性、从单核细胞诱导TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 以及B细胞的IgE产生。通过抗CD58单克隆抗体和CD58-Ig融合蛋白阻断CD58可以减少炎症反应,并减少细胞毒性T淋巴细胞和NK细胞对靶细胞的识别和细胞溶解。这些发现表明,CD58在先天免疫和适应性免疫两者中都起着重要作用,在效应子和靶细胞水平上具有特别的调节作用。

[0063] CD58和CD2作为一对相互粘附分子而为人所知,其参与多个细胞类型(如CD8+T细胞和NK细胞)的免疫调节。特别地,CD2通路可以直接介导非CD3依赖性T细胞激活,并在多种免疫细胞类型(如CD8+T细胞和NK细胞)中具有共刺激作用,因此这对粘附分子参与人和其他几种哺乳动物中CD8+T细胞和NK细胞介导的细胞免疫的免疫调节。在大多数情况下,CD58通过与其受体CD2(其也被称为淋巴细胞功能相关抗原2(LFA-2))的相互作用发挥其功能。CD2也是免疫球蛋白超家族的成员,其在几乎所有成熟的外周T细胞、胸腺细胞、NK细胞和胸腺B细胞的表面上表达。可能发现CD58与CD2的相互作用对于激活细胞免疫(如CD8+细胞毒性T淋巴细胞和NK细胞介导的细胞毒性反应)至关重要。

[0064] 在人中,CD58具有大小范围为从55,000至75,000da(取决于选择性剪接和糖链添加)的多个异形体。CD58由两个细胞外结构域和一个跨膜结构域组成,并在几乎所有细胞中

表达,尤其是在抗原呈递细胞,特别是巨噬细胞和造血细胞(包括B细胞)的表面上表达。细胞因子刺激使CD58表达增加。当与其配体CD2(LFA-2)结合时,它介导细胞粘附并参与信号转导。由CD58/CD2轴调节的细胞相互作用参与非抗原依赖性粘附通路和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性。CD58具有两种异形体。一种异形体通过糖基磷脂酰肌醇尾锚定在细胞膜上,而另一种异形体具有跨膜疏水区段和由12个氨基酸构成的胞质区段。此外,只有两个细胞外结构域的第一结构域与T淋巴细胞表面上的CD2结合,将T淋巴细胞和抗原呈递细胞紧密地放置在一起,使得T淋巴细胞产生免疫应答。CD58异形体1(也称为长异形体)的氨基酸序列示于下文中。

[0065] 人CD58异形体1(SEQ ID N0:1):

```
MVAGSDAGRA LGVLSVVCLL HCFGFISCF S QQIYGVVYGN VTFHVPSNVP
LKEVLWKKQK DKVAELENSE FRAFSSFKNR VYLDTVSGSL TIYNLTSSDE
DEYEMESPNI TDTMKFFLYV LESLPSPTLT CALTNGSIEV QCMIPHYNS
HRGLIMYSWD CPMEQCKRNS TSIYFKMEND LPQKIQCUTL S NPLFNTTSSI
ILTTCIPSSG HSRHRYALIP IPLAVITTCI VLYMNGILLKC DRKPDRTNSN
```

[0066] 人CD58异形体2(也称为短异形体;SEQ ID N0:2)的氨基酸序列与以上SEQ ID N0:1相似,但氨基酸残基236-237是VL(而不是GI)并且氨基酸残基238-250缺失。此CD58异形体2是转录变体的翻译产物,所述转录变体与变体1(其编码异形体1)相比在3'编码区中包括引起移码的替代区段。与异形体1相比,所得蛋白质(异形体2)具有不同的C末端。与转录变体1相比,此转录变体(2)还含有独特的3'UTR。

[0067] 人CD58异形体2(SEQ ID N0:2):

```
MVAGSDAGRA LGVLSVVCLL HCFGFISCF S QQIYGVVYGN VTFHVPSNVP
LKEVLWKKQK DKVAELENSE FRAFSSFKNR VYLDTVSGSL TIYNLTSSDE
DEYEMESPNI TDTMKFFLYV LESLPSPTLT CALTNGSIEV QCMIPHYNS
HRGLIMYSWD CPMEQCKRNS TSIYFKMEND LPQKIQCUTL S NPLFNTTSSI
ILTTCIPSSG HSRHRYALIP IPLAVITTCI VLYMNVL
```

[0068] 已知CD58通过与CD2(LFA-2)结合参与细胞毒性活性表达或抗原呈递反应。特别地,CD58与例如T细胞上的CD2的结合在加强T细胞与专职性抗原呈递细胞(APC)之间的粘附方面非常重要。当T细胞漫游淋巴结在APC表面处寻求可与T细胞受体反应的肽:MHC复合物时,这种粘附是T细胞激活之前在T细胞与APC之间的短暂初始接触的一部分。

[0069] 在一些淋巴瘤中观察到CD58突变与免疫逃逸相关,并且正在进行研究以分析其参与如何直接影响经典霍奇金淋巴瘤。CD58基因的多态性与多发性硬化的风险增加相关。例如,含有与多发性硬化的高风险相关的单核苷酸多态性rs1335532的基因组区域具有增强子特性,并且可以显著增强淋巴母细胞中的CD58启动子活性。保护性(C)rs1335532等位基因为ASCL2转录因子(Wnt信号传导通路的靶标)创建了功能性结合位点。此外,CD58在调节结肠肿瘤起始细胞中发挥作用。因此,表达CD58的细胞已经在肿瘤发生方面引起人们的兴趣。

[0070] 虽然CD58在B-ALL中高度表达,并在该疾病中通过流式细胞术充当微小残留病的重要标记物,但是它在LBCL中经常发生突变、下调、缺失或沉默。此外,先前已经将CD58丧失与复发性LBCL的免疫逃逸相关。

[0071] 下文更详细地描述了LBCL上的CD58表达在确定对CD19 CAR-T细胞疗法的反应中的作用。特别地,已经设计并进行了实验,以证明具有CD58表达丧失或具有CD58突变的患者

无法实现对阿基仑赛的持续反应。此外,使用体外系统和鼠异种移植物,通过生成CAR构建体且最终生成能够克服LBCL中的CD58丧失的CAR-T细胞来研究CD58连接的功能重要性。通过剖析LBCL中的耐药性机制,本文所述的实验结果展示了能够将持久缓解扩展到更多患者的新型治疗剂的产生。

[0072] CD58,也称为淋巴细胞功能相关抗原3 (LFA-3),当它与其配体CD2结合时,介导细胞粘附并参与信号转导。由CD58/CD2抗原调节的细胞相互作用参与非抗原依赖性粘附通路和细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 活性。CD58具有两种异形体。一种异形体通过糖基磷脂酰肌醇尾锚定在细胞膜上,而另一种异形体具有跨膜疏水区段和由12个氨基酸构成的胞质区段。

#### 本公开文本的方法。

[0073] 如本文更详细描述,本公开文本的一些实施方案提供了用于确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性的各种方法,所述方法包括:(a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b) 如果在所述样品中CD58的表达水平降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有降低的反应性。

[0074] 在另一方面,本文提供了用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体的方法,所述方法包括:(a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及(b) 如果在所述样品中CD58的表达水平降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者如果在所述样品中没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的任一种,则将所述个体选择为对用所述CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。

[0075] 在另一方面,本文提供了用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效的方法,所述方法包括:(a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;(b) 基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,鉴定所述CAR-T细胞疗法的治疗有效量。

[0076] 在又另一方面,本文提供了用于向个体施用CAR-T细胞疗法的方法,所述方法包括:(a) 检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者CD58活性的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;(b) 基于检测到的所述检测试剂与所述编码CD58的基因或其产物之间的相互作用,施用治疗有效量的所述CAR-T细胞疗法。

[0077] 一方面提供了一种治疗患有健康状况的个体的方法,所述健康状况的特征在于以下中的至少一种:CD58的表达降低或丧失,或者编码CD58的基因的一种或多种分子改变,所

述方法包括:检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者所述编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;如果在所述样品中所述CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比降低或丧失,或者检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为可能对用包含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗有反应,以及向步骤(b)中被鉴定为可能对用包含CD2的CAR构建体的治疗有反应的个体施用所述用包含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗。

[0078] 在又另一方面,提供了一种治疗个体的健康状况的方法,所述方法包括:检测在从所述个体获得的生物样品中CD58的表达水平与CD58的参考表达水平相比是否降低或丧失,或者编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变是否存在,其中所述检测包括使所述生物样品与检测试剂接触,并且检测所述检测试剂与所述样品中编码CD58的基因或其产物之间的相互作用;以及基于在步骤(a)中检测到CD58的表达水平降低或丧失,或者所述编码CD58的基因的一种或多种分子改变,向所述个体施用用包含CD2信号传导结构域的CAR构建体的治疗。

[0079] 在一些实施方案中,CD58的参考表达水平可以包括来自患者组/群体的样品中CD58的中位表达水平。在一些实施方案中,正在测试患者组/群体对CAR-T细胞疗法的反应性。在一些实施方案中,参考表达水平可以是先前在先前时间从个体获得的样品中的水平。在一些实施方案中,所述参考表达水平可以是来自如下患者的样品中的水平,所述患者接受了用CAR-T疗法的先前治疗但是发生健康状况的复发(例如LBCL复发)。在一些实施方案中,所述参考表达水平可以是来自如下患者的样品中的水平,所述患者接受了用CAR-T疗法的先前治疗并且没有发生健康状况(例如LBCL)的复发。在一些实施方案中,所述参考表达水平可以是来自健康个体的样品中的水平。在一些实施方案中,CD58表达水平小于参考表达水平(例如来自如上所述的组的样品中的参考表达水平)的个体可以被鉴定为可能对用不包含如本文所述的反式CAR构建体(如包含与跨膜结构域和CD2细胞内结构域融合的抗CD19单链可变片段(scFv)FMC63的反式CAR构建体)的CAR-T疗法的治疗反应性较低的受试者/患者。例如,此类受试者/患者展现出相对于参考CD58表达水平(如上述中位水平)低约90%、80%、70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%的CD58表达水平,或者CD58的表达完全丧失,或者可以被鉴定为可能对用如本文所述的反式CAR构建体(如包含与跨膜结构域和CD2细胞内结构域融合的抗CD19单链可变片段(scFv)FMC63的反式CAR构建体)治疗有反应的受试者/患者。

[0080] 如本文所用,短语“一种或多种分子改变”是指如与相应的野生型基因或蛋白质相比,个体的或多个细胞中的基因序列或蛋白质序列的任何变异。一种或多种分子改变可以包括但不限于遗传突变、基因扩增、剪接变体、缺失、插入/缺失(In/Del)、基因重排、单核苷酸变异(SNV)、插入和RNA/蛋白质表达异常。例如,在一些实施方案中,CD58活性的分子改变可以包括RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与CD58的参考表达水平相比降低或

CD58的突变形式的表达。在一些实施方案中,所述分子改变中的至少一种包括在对应于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述分子改变中的至少一种包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述分子改变中的至少一种包括在对应于SEQ ID NO:2的K60的位置处的氨基酸取代。

[0081] 所公开的方法的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述方法包括向患有、疑似患有或可能有高风险患上与CD58表达水平降低或丧失或者CD58活性的一种或多种分子改变相关的一种或多种健康状况(如增殖性疾病(例如癌症))的个体施用治疗有效量的CAR-T细胞疗法。在一些实施方案中,所述个体是处在医生护理下的患者。示例性增殖性疾病可以包括但不限于血管生成性疾病、转移性疾病、致瘤性疾病、赘生性疾病和癌症。在一些实施方案中,所述增殖性疾病是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是儿科癌症。在一些实施方案中,所述癌症是胰腺癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、间皮瘤、乳腺癌、尿道上皮癌、肝癌、头颈癌、肉瘤、宫颈癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、胆管癌、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和成胶质母细胞瘤。

[0082] 在一些实施方案中,所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。示例性癌症包括但不限于大B细胞淋巴瘤(LBCL)、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞早幼粒细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴细胞增殖性病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良和骨髓发育不良综合征、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤和华氏巨球蛋白血症。在一个实施方案中,所述癌症是ALL。在另一个实施方案中,所述癌症是CLL。在一个实施方案中,所述癌症与CD19表达相关。

[0083] 在一些实施方案中,所述癌症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤(例如各种形式的霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病和骨髓瘤。

[0084] 在一些实施方案中,所述CD58活性的一种或多种分子改变选自RNA/蛋白质表达增加、RNA/蛋白质表达减少、表达丧失、RNA/蛋白质表达异常、单核苷酸点突变(SNP)、单核苷酸变异(SNV)、基因扩增、基因重排、基因融合、缺失、移码缺失、插入、插入缺失突变、表观遗传改变、氨基酸取代及其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括CD58表达的丧失、CD58的表达与CD58的参考表达水平相比降低或CD58的突变形式的表达。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:2的K60的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代

是Lys到Glu取代(K60E)。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的C187的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:1的C187的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一种或多种分子改变包括在对应于SEQ ID NO:2的C187的位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述氨基酸取代是Cys到Arg取代(C187R)。

[0085] 原则上,关于适用于本文所述方法的生物样品的类型没有特别的限制。在一些实施方案中,所述生物样品包括痰、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、组织、全血、血清、血浆、口腔刮片(buccal scrape)、唾液、脑脊液、尿液、粪便、循环肿瘤细胞、循环核酸、骨髓或其任何组合。在一些实施方案中,所述生物样品包括细胞或组织。例如,所述生物样品可以是组织样品,如活检物、核心活检物、针抽吸物或细针抽吸物。在一些实施方案中,所述生物样品可以是体液样品,如血液样品、尿液样品或唾液样品。在一些实施方案中,所述生物样品可以是皮肤样品。在一些实施方案中,所述生物样品可以是颊拭子。在一些实施方案中,所述生物样品包括全血和血液成分。在一些实施方案中,所述血液成分包括血浆。在一些实施方案中,所述生物样品可以是血浆样品或血清样品。在一些实施方案中,所述组织是肿瘤组织或癌症组织。在一些实施方案中,所述生物样品包括肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述生物样品源自实体瘤、软组织肿瘤、非实体瘤、转移性病变、循环肿瘤细胞(CTC)群体。所述生物样品可以包括完整的组织样品。所述生物样品可以是肿瘤细胞系或源自异种移植模型或患者源性异种移植物(PDX)。在一些实施方案中,第一和第二肿瘤样品源自不同的受试者。

[0086] 检测试剂与编码CD58的基因或其产物之间的相互作用可以使用一种或多种基于核酸的分析测定、基于蛋白质的分析测定或其组合来检测。适用于本公开文本的方法和系统的检测试剂的非限制性例子包括双链核酸、单链核酸(例如引物、探针)、非荧光和荧光核酸特异性染料、酶和抗体。

[0087] 在一些实施方案中,编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的评估,或者检测试剂与编码CD58的基因或其产物之间的相互作用的检测包括选自以下的基于核酸的分析测定:癌症个体化深度测序分析(CAPP-seq)、核酸测序、循环肿瘤核酸评估、下一代测序(NGS)、基于核酸扩增的测定、环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、聚合酶链反应(PCR)、实时PCR、定量逆转录PCR(qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、HPLC、质谱基因分型、核酸杂交测定、比较基因组杂交、荧光原位杂交(FISH)、限制性消化、毛细管电泳及其任何组合。

[0088] 在一些实施方案中,编码CD58的基因的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的评估包括癌症个体化深度测序分析(CAPP-seq)(参见例如,实施例1)。CAPP-seq是用于分析和/或定量癌症中循环肿瘤DNA(ctDNA)的基于下一代测序的方法。此方法可用于已知具有复发性突变的任何癌症类型。CAPP-Seq可以检测10,000个分子的健康DNA中的一个分子的突变DNA。在此技术中使用ctDNA不应与循环肿瘤细胞(CTC)混淆。

[0089] 在一些实施方案中,使用电泳迁移率测定来获取在从个体获得的生物样品中存在的CD58活性的一种或多种分子改变的知识。例如,可以通过扩增对应于CD58基因中的一个或多个改变的核酸区域并将扩增的核酸的电泳迁移率与野生型CD58基因中相应区域的电泳迁移率进行比较来检测编码突变的核酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,用于获取生物样品中存在的CD58活性的一种或多种分子改变

的知识的分析测定涉及核酸杂交测定,所述核酸杂交测定包括使源自生物样品的核酸与核酸探针接触,所述核酸探针包含(1)与编码所述一种或多种突变的核酸序列互补的核酸序列,并且进一步包含(2)可检测标记。

[0091] 在一些实施方案中,用于获取生物样品中存在的CD58活性的一种或多种分子改变的知识的分析测定涉及聚合酶链反应(PCR)或基于核酸扩增的测定。许多本领域已知的基于PCR的分析测定适用于本文公开的方法,包括但不限于实时PCR、定量逆转录PCR(qRT-PCR)、PCR-RFLP测定、环介导等温扩增(LAMP)、和滚环扩增(RCA)。

[0092] 在一些实施方案中,用于获取生物样品中存在的CD58活性的一种或多种分子改变的知识的分析测定涉及确定包含所述一种或多种分子改变的核酸序列和/或氨基酸序列。在一些实施方案中,对来自癌症患者的包含一种或多种分子改变的核酸序列进行测序。在一些实施方案中,通过下一代测序程序确定所述序列。如本文所用,“下一代测序”是指寡核苷酸测序技术,其由于平行地执行和读出数千到数百万的测序反应而具有以高于常规测序方法(例如,Sanger测序)的可能速度的速度对寡核苷酸进行测序的能力。下一代测序方法/平台的非限制性例子包括大规模平行签名测序(Lynx Therapeutics);固相可逆染料终止子测序(Solexa/Illumina);DNA纳米球测序(Complete Genomics);SOLiD技术(Applied Biosystems);454焦磷酸测序(454Life Sciences/Roche Diagnostics);离子半导体测序(ION Torrent);以及可从Pacific Biosciences、Intelligen Bio-systems、Oxford Nanopore Technologies和Helicos Biosciences获得的技术。

[0093] 因此,在一些实施方案中,本文公开的方法中使用的NGS程序可以包括焦磷酸测序、合成法测序、连接法测序或其任何组合。在一些实施方案中,通过选自Illumina、Ion Torrent、Qiagen、Invitrogen、Applied Biosystem、Helicos、Oxford Nanopore、Pacific Biosciences和Complete Genomics的NGS平台进行NGS程序。

[0094] 在一些实施方案中,可以使用FISH分析来鉴定导致如本文所述的一种或多种分子改变(如突变基因或突变基因产物(即,CD58多肽))的染色体突变。例如,为了进行FISH,可以将用第一可检测标记标记的至少第一探针设计成靶向突变多肽的突变基因,并且可以将用第二可检测标记标记的至少第二探针设计成靶向相应的野生型基因或野生型多肽,使得观察所述探针的本领域普通技术人员可以确定相关基因或基因产物存在于样品中。通常,FISH测定是使用放置在载玻片上的福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片进行的。例如,使来自生物样品的DNA变性成单链形式,随后允许其与合适的DNA探针杂交,所述DNA探针可以使用本领域普通技术人员已知的方法和技术来设计和制备。杂交后,任何未结合的探针都可以通过一系列洗涤去除,并且将细胞核用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚,一种发出蓝色荧光的DNA特异性染色剂)反染色。使用配备有适当的激发和发射滤光片的荧光显微镜来观察一个或多个探针的杂交,从而允许可视化荧光信号。本领域中已知的FISH方法的其他变型也适用于评价根据本文公开的方法选择的个体。

[0095] 在一些实施方案中,编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的评估,和/或检测试剂与编码CD58的基因或其产物之间的相互作用的检测包括选自以下的基于蛋白质的分析测定:免疫组织化学(IHC)、蛋白质微阵列、蛋白质印迹、质谱、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光染色、多重检测测定及其任何组合。在一些实施方案中,基于蛋白质的测定包括使用与野生型CD58或突变的CD58多肽中的一种

或多种选择性地结合的一种或多种抗体。可用于基于蛋白质的分析测定的示例性CD58单克隆抗体和多克隆抗体包括可以由Abcam(目录号ab196648、ab275392、ab281201和ab91058)、LSBio(目录号LS-C819068-50)和Thermo Fischer Scientific(目录号MA5800、MA5-29120和MA5-29121)商购获得的那些。在一些实施方案中,编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的评估包括免疫组织化学(IHC)(参见例如,实施例1)。

[0096] 在一些实施方案中,编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变降低了CD58蛋白产物与其配体CD2的结合亲和力。

[0097] 术语“结合亲和力”在本文中用作两个分子(例如,多肽与其配体)之间非共价相互作用的强度的量度。术语“结合亲和力”用于描述单价相互作用(内在活性)。两个分子之间的结合亲和力可以通过确定解离常数( $K_D$ )来定量。继而,可以通过使用例如表面等离子体共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 $K_D$ 。对应于单价复合物的缔合和解离的速率常数分别被称为缔合速率常数 $k_a$ (或 $k_{on}$ )和解离速率常数 $k_d$ (或 $k_{off}$ )。 $K_D$ 通过等式 $K_D = k_d/k_a$ 与 $k_a$ 和 $k_d$ 相关联。解离常数的值可以通过熟知的方法直接确定,并且即使对于复杂混合物也可以通过诸如Caceci等人(1984,Byte9:340-362)中所述的那些方法来计算。例如, $K_D$ 可以使用双滤膜硝酸纤维素滤膜结合测定来建立,如Wong和Lohman(1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5428-5432)中所披露的。用于评价本公开文本的抗体或多肽对靶抗原的结合能力的其他标准测定是本领域已知的,包括例如ELISA、蛋白质印迹、RIA和流式细胞术分析以及本文别处例示的其他测定。多肽与其配体的结合动力学和结合亲和力也可以通过本领域已知的标准测定(如表面等离子体共振(SPR))来评估,例如通过使用Biacore™系统或KinExA来评估。

[0098] 在一些实施方案中,本公开文本的方法进一步包括用CAR-T细胞疗法治疗健康状况。在一些实施方案中,将所述CAR-T细胞疗法作为单一疗法或与一种或多种另外的疗法组合施用于个体。在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法和/或至少一种另外的疗法包括包含CD2共刺激结构域的CAR构建体。在一些实施方案中,包括CD2共刺激结构域的CAR构建体包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0099] 在一些实施方案中,所述CAR-T细胞疗法靶向在靶细胞上以低密度(例如,每个细胞少于约6,000个靶抗原分子)表达的抗原。在一些实施方案中,所述抗原以每个细胞少于约5,000个靶抗原分子、少于约4,000个靶抗原分子、少于约3,000个靶抗原分子、少于约2,000个靶抗原分子、少于约1,000个靶抗原分子或少于约500个靶抗原分子的密度表达。在一些实施方案中,所述抗原以每个细胞少于约2,000个靶抗原分子,例如像少于约1,800个靶抗原分子、少于约1,600个靶抗原分子、少于约1,400个靶抗原分子、少于约1,200个靶抗原分子、少于约1,000个靶抗原分子、少于约800个靶抗原分子、少于约600个靶抗原分子、少于约400个靶抗原分子、少于约200个靶抗原分子、或少于约100个靶抗原分子的密度表达。在一些实施方案中,所述抗原以每个细胞少于约1,000个靶抗原分子,例如像少于约900个靶抗原分子、少于约800个靶抗原分子、少于约700个靶抗原分子、少于约600个靶抗原分子、少于约500个靶抗原分子、少于约400个靶抗原分子、少于约300个靶抗原分子、少于约200个靶抗原分子、或少于约100个靶抗原分子的密度表达。在一些实施方案中,所述抗原以范围为每个细胞从约5,000至约100个靶抗原分子,例如像每个细胞从约5,000至约1,000个靶抗原分子、从约4,000至约2,000个靶抗原分子、从约3,000至约2,000个靶抗原分子、从约4,000

至约3,000个靶抗原分子、从约3,000至约1,000个靶抗原分子、从约2,000至约1,000个靶抗原分子、从约1,000至约500个靶抗原分子、从约500至约100个靶抗原分子的密度表达。

[0100] 本文所述的任一种CAR-T细胞疗法(例如,工程化CAR-T细胞)的施用可用于在相关健康状况(如增殖性疾病(例如,癌症)、自身免疫性疾病和微生物感染(例如,病毒感染))的治疗中治疗患者。在一些实施方案中,可以将如本文所述的一种或多种工程化CAR-T细胞掺入治疗剂中,用于治疗患有、疑似患有或可能有高风险患上一种或多种健康状况(如增殖性疾病(例如癌症)、自身免疫性疾病和慢性感染)的个体的方法中。在一些实施方案中,所述个体是处在医生护理下的患者。

[0101] 在一些实施方案中,所述方法包括计算CAR-T细胞疗法的治疗有效量或向有需要的个体施用治疗有效量的CAR-T细胞疗法。术语工程化CAR-T细胞的“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”通常是指相对于不存在工程化细胞群体或药物组合物的状况,工程化CAR-T细胞的群体或药物组合物足以完成所述目的(例如,实现施用其的效果、治疗疾病、减少信号传导通路或减轻疾病或健康状况的一种或多种症状)的量或数量。“有效量”的例子是足以促成治疗、预防或减轻疾病的一种或多种症状的量,其也可以称为“治疗有效量”。症状的“减轻”意指一种或多种症状的严重程度或频率的降低或者一种或多种症状的消除。T细胞群体或组合物的确切量(包括“治疗有效量”)将取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如,Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第1-3卷,1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); 以及 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第20版, 2003, Gennaro编辑, Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0102] 示例性增殖性疾病可以包括但不限于血管生成性疾病、转移性疾病、致瘤性疾病、赘生性疾病和癌症。在一些实施方案中,所述增殖性疾病是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是儿科癌症。在一些实施方案中,所述癌症是胰腺癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、间皮瘤、乳腺癌、尿道上皮癌、肝癌、头颈癌、肉瘤、宫颈癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、胆管癌、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和成胶质母细胞瘤。

[0103] 在一些实施方案中,所述健康状况是选自实体瘤癌症、非实体瘤癌症和血液恶性肿瘤的增殖性障碍。示例性癌症包括但不限于大B细胞淋巴瘤(LBCL)、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞早幼粒细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴细胞增殖性病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良和骨髓发育不良综合征、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤和华氏巨球蛋白血症。在一个实施方案中,所述癌症是ALL。在另一个实施方案中,所述癌症是CLL。在一个实施方案中,所述癌症与CD19表达相关。

[0104] 在一些实施方案中,所述癌症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤(LBCL)、原发性渗出性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、MALT(黏膜相关淋巴组织)淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性淋巴细

胞白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤(例如各种形式的霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病和骨髓瘤。

[0105] 在一些实施方案中,所述癌症是多药耐药性癌症或复发性癌症。考虑此处公开的组合物和方法适用于非转移性癌症和转移性癌症两者。因此,在一些实施方案中,所述癌症是非转移性癌症。在一些其他实施方案中,所述癌症是转移性癌症。在一些实施方案中,施用于个体的组合物抑制所述个体的癌症的转移。在一些实施方案中,所施用的CAR-T细胞疗法抑制所述个体的肿瘤生长。

[0106] 例如,在一些实施方案中,施用于个体的CAR-T细胞疗法可以减少所述个体中的转移性结节。在一些实施方案中,所施用的CAR-T细胞疗法抑制所述个体的肿瘤生长。

[0107] 在一些实施方案中,所施用的CAR-T细胞抑制个体中靶癌细胞的增殖,和/或抑制癌症的肿瘤生长。例如,如果靶细胞的增殖减少,如果靶细胞的病理性或致病行为减少,如果靶细胞被破坏或杀伤等,则所述靶细胞可能被抑制。抑制包括所测量的病理性或致病行为减少至少约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施方案中,所述方法包括向个体施用有效数量的本文所述的CAR-T细胞,其中与未施用所述CAR-T细胞疗法的受试者中的靶细胞的增殖和/或靶癌症的肿瘤生长相比,所施用的CAR-T细胞抑制所述个体中的靶细胞的增殖和/或抑制靶癌症的肿瘤生长。

[0108] 本文所述的CAR-T细胞疗法(例如工程化CAR-T细胞)的施用可用于刺激免疫应答。在一些实施方案中,在用化学疗法诱导癌症缓解后,或在自体或同种异体造血干细胞移植后,将如本文所述的一种或多种工程化CAR-T细胞施用于个体。在一些实施方案中,将本文所述的组合物施用于如下个体,所述个体需要相对于未施用本文公开的治疗组合物之一的受试者中干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )和/或白介素-2(IL-2)的产生增加所治疗的受试者中这些分子的产生。

[0109] 可以基于预期目标(例如癌症消退)来确定本文所述的CAR-T细胞疗法(例如工程化CAR-T细胞)的有效量。例如,在治疗现有癌症的情况下,待施用的本文公开的组合物可以大于施用所述组合物用于预防癌症的情况下的量。本领域普通技术人员将能够根据本公开文本来确定待施用的组合物和施用频率。根据治疗的数量和剂量两者,待施用的量还取决于待治疗的个体、个体的状态和所需的保护。组合物的精确量还取决于执业医师的判断,并且是每名受试者特有的。根据执业医师的判断,施用频率范围可能为从1-2天至2-6小时、至6-10小时、至1-2周或更长时间。

[0110] 待施用的组合物量的确定将由本领域技术人员进行,并且将部分取决于癌症的范围和严重程度,以及工程化CAR-T细胞的施用是用于治疗现有癌症还是预防癌症。例如,在目标是预防的情况下,可以采用施用之间更长的间隔和更低的组合物的量。例如,每剂施用的组合物的量可以是在活动性疾病的治疗中施用的剂量的50%,并且可以以每周间隔施用。根据本公开文本,本领域普通技术人员将能够确定组合物的有效量和施用频率。此确定将部分取决于存在的特定临床情况(例如,癌症的类型、癌症的严重程度)。

[0111] 在一些实施方案中,可能希望向待治疗的个体(例如,患者)提供本文公开的组合物连续供应。在一些实施方案中,目的区域(如肿瘤)的连续灌注可能是合适的。灌注的时

间段将由临床医生针对特定的受试者和情况进行选择,但是时间范围可以为从约1-2小时至2-6小时、至约6-10小时、至约10-24小时、至约1-2天、至约1-2周或更长时间。通常,经由连续灌注的组合物的剂量将等效于通过单次注射或多次注射给予的剂量,针对施用所述剂量的时间段加以调整。

[0112] 在一些实施方案中,施用是通过静脉内输注进行。本文所述的工程化CAR-T细胞的有效量可以基于预期目标(例如肿瘤消退)来确定。例如,在治疗现有癌症的情况下,待施用的细胞的数量可以大于施用本文公开的工程化CAR-T细胞用于预防癌症的情况下的量。本领域普通技术人员将能够根据本公开文本来确定待施用的细胞的数量和施用频率。根据治疗的数量和剂量两者,待施用的量还取决于待治疗的个体、个体的状态和所需的保护。治疗组合物的精确量还取决于执业医师的判断,并且是每名个体特有的。根据执业医师的判断,施用频率范围可能为从1-2天至2-6小时、至6-10小时、至1-2周或更长时间。通常,经由连续灌注的治疗组合物的剂量将等效于通过单次注射或多次注射给予的剂量,并针对施用所述剂量的时间段加以调整。

#### 另外的疗法

[0113] 如上文所讨论的,可以将如本文所述的任一种CAR-T细胞疗法例如作为单药疗法(例如单一疗法)施用于有需要的个体。另外地或可替代地,在本公开文本的一些实施方案中,本文所述的一种或多种CAR-T细胞疗法可以与一种或多种另外的疗法(例如至少一种、两种、三种、四种或五种另外的疗法)组合施用于个体。有待与本文所述的CAR-T细胞疗法组合施用的合适疗法包括但不限于化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法、靶向疗法和手术。其他合适的疗法包括治疗剂,如化疗剂、抗癌剂和抗癌疗法。

[0114] 由于CD2/CD58通路参与与免疫应答、肿瘤发生和其他疾病状态相关的细胞过程,如本文所述的任一种CAR-T细胞疗法例如可以与一种或多种靶向此通路的治疗剂一起施用于有需要的个体。例如,调节CD2活性的分子可以是免疫抑制剂和/或抗炎剂和/或抗癌剂,其具有针对以下的活性:(1)自身免疫性障碍如多发性硬化;(2)具有炎症组分或T细胞介导的组分的各种炎性疾病或障碍,如各种形式的关节炎;同种异体移植排斥;哮喘;肠道炎性疾病,包括克罗恩病;各种皮肤病症,如银屑病等;以及(3)各种癌症和肿瘤。

[0115] 与一种或多种另外的疗法“组合”施用包括同时(并行)施用和以任何顺序连续施用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法和手术。本文所用的术语化学疗法包括抗癌剂。各类抗癌剂可以以合适的方式用于本文公开的方法。抗癌剂的非限制性例子包括:烷基化剂、抗代谢物、萘环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、鬼臼毒素、抗体(例如,单克隆或多克隆)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(Gleevec®或Glivec®))、激素治疗、可溶性受体和其他抗肿瘤药。

[0116] 拓扑异构酶抑制剂也是可用于本文的另一类抗癌剂。拓扑异构酶可能是维持DNA拓扑结构的必需酶。I型或II型拓扑异构酶的抑制通过扰乱适当的DNA超螺旋而干扰DNA的转录和复制两者。一些I型拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱如伊立替康和拓扑替康。II型抑制剂的例子包括安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷和替尼泊苷。这些是表鬼臼毒素的半合成衍生物,表鬼臼毒素是在美洲鬼臼(盾叶鬼臼(Podophyllum peltatum))根中天然存在的生物碱。

[0117] 抗肿瘤药包括免疫抑制剂放线菌素D、多柔比星、表柔比星、博来霉素、氮芥、环磷

酰胺、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺。抗肿瘤化合物通常通过化学修饰细胞的DNA来起作用。

[0118] 烷基化剂可以在细胞中存在的条件下使许多亲核官能团烷基化。顺铂和卡铂以及奥沙利铂是烷基化剂。它们通过与生物重要分子中的氨基、羧基、巯基和磷酸基团形成共价键而损害细胞功能。

[0119] 长春花生物碱与微管蛋白上的特定位点结合,从而抑制微管蛋白组装成微管(细胞周期的M期)。长春花生物碱包括:长春新碱、长春碱、长春瑞滨和长春地辛。

[0120] 抗代谢物类似于嘌呤(硫唑嘌呤、巯基嘌呤)或嘧啶,并在细胞周期的“S”期间阻止这些物质被整合到DNA中,从而停止正常发育和分裂。抗代谢物也影响RNA合成。

[0121] 植物生物碱和萜类化合物源自植物并通过阻止微管功能而阻断细胞分裂。由于微管对于细胞分裂是至关重要的,没有它们,细胞分裂在一些情况下不能发生。主要的例子是长春花生物碱和紫杉烷。

[0122] 鬼臼毒素是源自植物的化合物,据报道它有助于消化,以及可用于产生其他两种细胞抑制药物即依托泊苷和替尼泊苷。它们阻止细胞进入G1期(DNA复制的开始)和DNA复制(S期)。

[0123] 紫杉烷类包括紫杉醇和多西他赛。紫杉醇是一种天然产物,最初称为泰素(Taxol),首先来源于太平洋紫杉树的树皮。多西他赛是紫杉醇的半合成类似物。紫杉烷增强微管的稳定性,防止染色体在后期分离。

[0124] 在一些实施方案中,所述抗癌剂可以选自瑞米凯德(remicade)、多西他赛、塞来昔布、美法仑、地塞米松(Decadron®)、类固醇、吉西他滨、顺铂、替莫唑胺、依托泊苷、环磷酰胺、特莫达(temodar)、卡铂、丙卡巴肼、格立得(gliadel)、他莫昔芬、拓扑替康、甲氨蝶呤、吉非替尼(Iressa®)、泰素、泰索帝、氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、伊立替康、希罗达(xeloda)、CPT-11、干扰素 $\alpha$ 、聚乙二醇化干扰素 $\alpha$ (例如,PEG INTRON-A)、卡培他滨、顺铂、噻替派、氟达拉滨、卡铂、脂质体道诺霉素、阿糖胞苷、多西他醇(doxetaxol)、紫杉醇、长春碱、IL-2、GM-CSF、达卡巴嗪、长春瑞滨、唑来膦酸、棕榈酸酯、比亚辛(biaxin)、白消安、泼尼松、硼替佐米(Velcade®)、二膦酸盐、三氧化二砷、长春新碱、多柔比星(Doxil®)、紫杉醇、更昔洛韦、阿霉素、雌莫司汀磷酸钠(Emcyt®)、舒林酸、依托泊苷及其任何组合。

[0125] 在其他实施方案中,所述抗癌剂可以选自硼替佐米、环磷酰胺、地塞米松、多柔比星、干扰素- $\alpha$ 、来那度胺、美法仑、聚乙二醇化干扰素- $\alpha$ 、泼尼松、沙利度胺或长春新碱。

[0126] 在一些实施方案中,本文所述的治疗方法进一步包括免疫疗法。在一些实施方案中,所述免疫疗法包括施用一种或多种检查点抑制剂。因此,本文所述的治疗方法的一些实施方案包括进一步施用抑制一种或多种免疫检查点分子的化合物。免疫检查点分子的非限制性例子包括CTLA4、PD-1、PD-L1、A2AR、B7-H3、B7-H4、TIM3及其中任一种的组合。在一些实施方案中,抑制一种或多种免疫检查点分子的所述化合物包括拮抗性抗体。适用于本文公开的组合物和方法的拮抗性抗体的例子包括但不限于伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、德瓦鲁单抗、阿特殊单抗、替西木单抗和阿维单抗。

[0127] 在一些方面,一种或多种抗癌疗法是辐射疗法。在一些实施方案中,放射疗法可以包括施用放射以杀伤癌细胞。辐射与细胞中的分子如DNA相互作用以诱导细胞死亡。辐射也可损伤细胞膜和核膜以及其他细胞器。根据辐射类型,DNA损伤的机制可能随着相对生物有效性而变化。例如,重粒子(即质子、中子)直接损伤DNA并具有更大的相对生物有效性。电磁

辐射导致间接电离,其通过主要由细胞水的电离产生的短寿命羟基自由基起作用。辐射的临床应用由外射束辐射(来自外源)和近距离放射治疗(使用植入或插入患者体内的辐射源)组成。外射束辐射由X射线和/或 $\gamma$ 射线组成,而近距离放射治疗使用衰变并发射 $\alpha$ 粒子或 $\beta$ 粒子以及 $\gamma$ 射线的放射性核。本文还考虑的辐射包括例如将放射性同位素定向递送到癌细胞。本文还考虑了其他形式的DNA损伤因子,例如微波和UV辐照。

[0128] 辐射可以单剂量或按剂量分割方案以一系列小剂量给予。本文考虑的辐射量的范围为约1至约100Gy,包括例如约5至约80Gy、约10至约50Gy或约10Gy。总剂量可以以分割方案施用。例如,所述方案可以包括2Gy的分割单个剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,并且取决于所述同位素的半衰期和发射的辐射的强度和类型。当辐射包括使用放射性同位素时,所述同位素可以缀合至靶向剂,例如治疗性抗体,其将放射性核苷酸携带到靶组织(例如,肿瘤组织)。

[0129] 本文所述的手术包括切除,其中癌组织的全部或部分被物理去除、切除和/或破坏。肿瘤切除是指至少部分肿瘤的物理去除。除肿瘤切除外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微镜控制手术(Mohs手术)。本文还考虑去除癌前组织或正常组织。

[0130] 因此,在一些实施方案中,本公开文本的方法包括将本文所述的CAR-T细胞疗法作为单药疗法(例如,单一疗法)单独施用于受试者。在一些实施方案中,将本公开文本的CAR-T细胞疗法作为与第二疗法组合的第一疗法施用于个体。在一些实施方案中,所述第二疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法和手术。在一些实施方案中,所述第一疗法与所述第二疗法伴随施用。在一些实施方案中,所述第一疗法与所述第二疗法同时施用。在一些实施方案中,所述第一疗法与所述第二疗法依序施用。在一些实施方案中,在所述第二疗法之前施用所述第一疗法。在一些实施方案中,在所述第二疗法之后施用所述第一疗法。在一些实施方案中,在所述第二疗法之前和/或之后施用所述第一疗法。在一些实施方案中,所述第一疗法与所述第二疗法轮流施用。在一些实施方案中,所述第一疗法与所述第二疗法以单一配制品一起施用。

#### 向个体施用CAR T细胞

[0131] 在一些实施方案中,本公开文本的方法涉及向有需要的个体施用有效量或数量的在此所述的工程化CAR-T细胞。此施用步骤可以使用本领域中的任何植入递送方法来完成。例如,可以将工程化CAR-T细胞直接输注于个体的血流中或以其他方式施用于个体。

[0132] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括通过导致引入的细胞至少部分定位于期望部位从而产生一种或多种期望的作用的方法或途径将工程化CAR-T细胞施用(所述术语可与术语“引入”、“植入”和“移植”互换使用)于个体中。可以通过任何适当的途径施用工程化CAR-T细胞或其分化的后代,所述适当的途径导致递送至个体的期望位置,所施用的细胞或细胞组分的至少一部分在此位置保持存活。在施用于个体后细胞的活力时间段可以短至数小时,例如二十四小时,至数天,至长至数年,或甚至个体的寿命,例如长期移植。

[0133] 当预防性提供时,可以在待治疗的疾病或健康状况的任何症状出现之前将本文所述的工程化CAR-T细胞施用于个体。因此,在一些实施方案中,工程化CAR-T细胞群的预防性施用预防疾病或健康状况的症状的发生。

[0134] 当在一些实施方案中治疗性提供时,在疾病或健康状况的症状或适应证发作时(或之后),例如在疾病或健康状况发作时,提供工程化CAR-T细胞。

[0135] 对于在本文所述的各种实施方案中的使用,如本文所述的工程化CAR-T细胞的有效量可以是至少 $10^2$ 个细胞、至少 $5 \times 10^2$ 个细胞、至少 $10^3$ 个细胞、至少 $5 \times 10^3$ 个细胞、至少 $10^4$ 个细胞、至少 $5 \times 10^4$ 个细胞、至少 $10^5$ 个细胞、至少 $2 \times 10^5$ 个细胞、至少 $3 \times 10^5$ 个细胞、至少 $4 \times 10^5$ 个细胞、至少 $5 \times 10^5$ 个细胞、至少 $6 \times 10^5$ 个细胞、至少 $7 \times 10^5$ 个细胞、至少 $8 \times 10^5$ 个细胞、至少 $9 \times 10^5$ 个细胞、至少 $1 \times 10^6$ 个细胞、至少 $2 \times 10^6$ 个细胞、至少 $3 \times 10^6$ 个细胞、至少 $4 \times 10^6$ 个细胞、至少 $5 \times 10^6$ 个细胞、至少 $6 \times 10^6$ 个细胞、至少 $7 \times 10^6$ 个细胞、至少 $8 \times 10^6$ 个细胞、至少 $9 \times 10^6$ 个细胞、或其倍数。

[0136] 在一些实施方案中,工程化CAR-T细胞对于需要治疗的个体是非自体的。在一些实施方案中,过继细胞疗法是同种异体过继细胞疗法。例如,在一些实施方案中,工程化CAR-T细胞对于需要治疗的个体是同种异体的。在同种异体过继细胞疗法中,工程化CAR-T细胞并非源自接受所述过继细胞疗法的个体。同种异体细胞疗法通常是指如下疗法,其中提供T细胞的个体(供体)与接受细胞疗法的个体是不同的个体(同一物种的)。例如,施用于个体的工程化CAR-T细胞群体源自一个或多个无关供体,或者来自一个或多个不同的同胞。因此,工程化CAR-T细胞可以源自一个或多个供体,或者可以从自体来源获得。在一些实施方案中,将工程化CAR-T细胞在施用于有需要的个体之前在培养中扩增。

[0137] 在一些实施方案中,通过方法或途径将细胞组合物(例如,包括多个本文所述的工程化CAR-T细胞的组合物)递送至个体体内导致所述细胞组合物至少部分定位于期望部位。可以通过导致个体中的有效治疗的任何适当途径施用包括工程化CAR-T细胞的组合物,例如,施用导致递送至个体中的期望位置,在所述期望位置处所递送组合物的至少一部分(例如至少 $1 \times 10^4$ 个细胞)被递送至期望部位保持一段时间。施用方式包括注射、输注、滴注。注射包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在一些实施方案中,所述途径是静脉内的。对于细胞的递送,通过注射或输注进行递送通常被认为是标准的施用方式。

[0138] 在一些实施方案中,将所述工程化CAR-T细胞全身施用,例如经由输注或注射施用。例如,不将工程化CAR-T细胞群体直接施用于靶部位、组织或器官,使得其进入个体的循环系统,从而经历代谢和其他类似的生物过程。

[0139] 包含本文提供的任何组合物的治疗用于预防或治疗疾病或健康状况的功效可以由熟练的临床医生确定。然而,本领域技术人员将理解,如果疾病的任一种或全部体征或症状或标记物得到改进或改善,则认为预防或治疗是有效的。还可以通过个体恶化的失败来测量功效,如通过住院或对医疗干预的需要减少所评估(例如,疾病进展停止或至少减缓)。测量这些指示物的方法是本领域技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性例子包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗并且包括:(1)抑制疾病,例如停止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病,例如,导致症状消退;以及(3)预防症状发展或降低症状发展的可能性。

[0140] 功效程度的测量是基于针对所治疗的疾病和所经历的症状而选择的参数。通常,选择已知或公认为与疾病的程度或严重程度相关的参数,如医学界公认或使用的参数。例如,在实体癌症的治疗中,合适的参数可以包括转移的数量和/或大小的减少、无进展存活期的月数、总存活期、疾病的分期或分级、疾病进展的速率、诊断生物标记物的减少(例如但

不限于循环肿瘤DNA或RNA的减少、循环无细胞肿瘤DNA或RNA的减少等)及其组合。应理解,有效剂量和功效程度通常将相对于单个受试者和/或受试者的组或群体来确定。本公开文本的治疗方法将症状和/或疾病严重程度和/或疾病生物标记物减少至少约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0141] 如上文所讨论的,药物组合物的治疗有效量可以是药物组合物当被施用于个体(如患有、疑似患有或有风险患上疾病或健康状况的个体)时足以促进特定有益效果的量。在一些实施方案中,有效量包括足以预防疾病或健康状况的症状或延迟其发展、改变疾病或健康状况的症状的进程(例如但不限于,减缓疾病的症状的进展)或者逆转疾病或健康状况的症状的量。应当理解,对于任何给定的病例,本领域普通技术人员使用常规实验可以确定适当的有效量。

### 试剂盒

[0142] 本文还提供了用于实施本文所述的一种或多种方法的试剂盒,包括用于诊断和/或治疗个体的健康状况的方法。通常,本公开文本的试剂盒可以包括(i)用于评估生物样品中编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的试剂,和(ii)使用试剂盒的说明书。例如,本公开文本的一些实施方案提供了用于确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性的试剂盒。本公开文本的一些实施方案提供了用于鉴定对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体的试剂盒。本公开文本的一些实施方案提供了用于优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效的试剂盒。本公开文本的一些实施方案提供了用于向个体施用CAR-T细胞疗法的试剂盒。

[0143] 在一些实施方案中,所述试剂盒包括用于检测检测试剂与来自个体的生物样品中的编码CD58的基因或其产物之间的相互作用的检测试剂。

[0144] 在一些实施方案中,使用说明书提供了,如果在样品中检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体鉴定为对用CAR-T细胞疗法治疗具有降低的反应性。在一些实施方案中,使用说明书提供了(i)如果在样品中检测到CD58活性的一种或多种分子改变中的至少一种,则将所述个体选择为对用CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;或者(ii)在样品中没有检测到CD58活性的一种或多种分子改变,则将所述个体选择为对用CAR-T细胞疗法治疗不具有增加的无反应性。在一些实施方案中,使用说明书包括用于基于检测到的检测试剂与编码CD58的基因或其产物之间的相互作用来鉴定CAR-T细胞疗法的治疗有效量的说明书。在一些实施方案中,使用说明书包括用于基于检测到的检测试剂与编码CD58的基因或其产物之间的相互作用来施用治疗有效量的CAR-T细胞疗法的说明书。

[0145] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含以下中的一种或多种:提取缓冲液/试剂和方案、扩增缓冲液/试剂和方案、杂交缓冲液/试剂和方案、以及标记缓冲液/试剂和方案。

[0146] 例如,任何上述试剂盒还可以包含一种或多种另外的试剂,其中此类另外的试剂可以选自:稀释缓冲液、重构溶液、洗涤缓冲液、对照试剂、对照表达载体、阴性对照T细胞群体、阳性对照T细胞群体、用于离体产生T细胞群体的试剂。

[0147] 在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒进一步包括用于将CAR-T细胞疗法施用

于有需要的个体的一个或多个注射器(包括预填充注射器)和/或导管(包括预填充注射器)。在一些实施方案中,试剂盒可以具有一种或多种另外的治疗剂,所述一种或多种另外的治疗剂可以与其他试剂盒组分同时或依序施用以用于所需目的,例如用于抑制靶癌细胞或用于治疗有需要的个体的健康状况。

[0148] 在一些实施方案中,试剂盒的组分可以在单独容器中。在一些其他实施方案中,试剂盒的组分可以在单个容器中合并。

[0149] 在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包含用于使用所述试剂盒的组分来实践所述方法的说明书。用于实践所述方法的说明书通常记录在合适的记录介质上。例如,所述说明书可以印刷在基材上,如纸或塑料等。所述说明书可以作为包装插页存在于试剂盒中、试剂盒的容器或其组分的标签中(例如,与包装或分包装相关联)等。所述说明书可以作为存在于合适的计算机可读存储介质(例如,CD-ROM、软盘、闪存驱动器等)上的电子存储数据文件而存在。在一些情形下,实际说明书不存在于所述试剂盒中,而是可以提供用于从远程源(例如,经由互联网)获得所述说明书的手段。此实施方案的例子是包括网址的试剂盒,在所述网址中可以查看说明书和/或可以从其下载说明书。与说明书一样,可以将这种用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

#### 基于遗传的系统

[0150] 如本文所述的用于诊断和治疗健康状况的方法可以使用各种硬件组件来实现。在此小节中,描述了此类组件的例子。然而,应理解,通常本文所讨论的各种步骤和技术可以使用各种不同的装置和系统组件来执行,但这些装置和系统组件并非都被明确阐述。

[0151] 在另一方面,本公开文本的一些实施方案涉及用于诊断和/或治疗健康状况的系统,所述系统包括:a)逻辑处理器;和b)可由所述逻辑处理器执行的存储程序代码,所述存储程序代码在由所述处理器执行时提供用于执行根据本公开文本的诊断和/或治疗健康状况的方法的操作。在一些实施方案中,所述系统包括(a)逻辑处理器;和(b)可由所述逻辑处理器执行的存储程序代码,所述存储程序代码在由所述处理器执行时提供用于执行以下中的一项或多项的操作:(i)确定个体对CAR-T细胞疗法的反应性;(ii)将个体鉴定为对用CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;(iii)优化CAR-T细胞疗法在个体中的治疗功效;以及(iv)计算CAR-T细胞疗法的治疗有效量或向个体施用治疗有效量的CAR-T细胞疗法。

[0152] 本公开文本的系统的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,本文公开的系统进一步包括通信地耦合到所述逻辑处理器的报告引擎,其中由所述报告引擎产生的报告取决于来自执行所述程序代码的结果,其中所述程序代码将所述逻辑处理器配置为接收与从个体获得的生物中编码CD58的基因或其产物的一种或多种分子改变的存在和/或不存在的有关的预选的数据输入集,以便至少部分地基于所述预选的数据输入集将相对得分分配至所述个体对CAR-T细胞疗法的反应性,并且任选地:(a)确定所述个体对CAR-T细胞疗法的反应性;(b)将所述个体鉴定为对用CAR-T细胞疗法治疗具有增加的无反应性;和/或(c)优化CAR-T细胞疗法在所述个体中的治疗功效。

[0153] 在一些实施方案中,本公开文本的系统进一步包括生成报告,所述报告含有与被鉴定为对CAR-T细胞疗法具有增加的无反应性的个体相关和/或与被鉴定为对健康状况的治疗有效的CAR-T细胞疗法相关的信息。在一些实施方案中,简档报告的特征在于具有选自以下的编码:“.doc”;“.pdf”;“.xml”;“.html”;“.jpg”;“.aspx”;“.php”及其任何组合。

[0154] 在又另一方面,本文提供了一种含有机器可执行指令的非暂时性计算机可读介质,所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作:接收包括预选的数据输入集的报告;至少部分地基于所述报告,将相对性能得分分配至所鉴定的CAR-T细胞疗法;以及根据所分配的性能得分输出所述CAR-T细胞疗法的报告。在一些实施方案中,本文提供了一种含有机器可执行指令的非暂时性计算机可读介质,所述机器可执行指令在被执行时使处理器执行包括以下项的操作:接收包括预选的数据输入集的报告;至少部分地基于所述报告,将相对无反应性得分分配至所鉴定的个体;以及根据所分配的无反应性得分输出所述个体的报告。因此,由本公开文本的系统生成的CAR-T细胞疗法报告和个体报告也在本公开文本的范围内。

[0155] 除非明确地或清楚地从实施方案或方面的上下文中排除,否则本文所述的各方面和实施方案中的每一个能够一起使用。

[0156] 将本公开文本中提到的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文,并入程度如同确切且单独地指示每个单独出版物或专利申请都通过引用并入一般。

[0157] 不承认本文引用的任何参考文献构成现有技术。参考文献的讨论内容陈述了其作者所主张的观点,并且本申请人保留对所引用文件的准确性和针对性提出质疑的权利。应清楚地理解的是,尽管在本文中提及许多信息源,包括科学期刊文章、专利文件和教科书;但此提及并不构成承认任何这些文件构成本领域公知常识的一部分。

[0158] 本文给出的一般方法的讨论仅旨在用于说明目的。在审阅本公开文本后,其他替代方法和替代方案对于本领域技术人员而言将是清楚的,并且将被包括在本申请的精神和范围内。

[0159] 在以下实施例中进一步详细公开了另外的实施方案,所述实施例仅以说明方式提供,而并非旨在以任何方式限制本公开文本或权利要求的范围。

#### 实施例

[0160] 除非另外说明,否则本发明的实践将采用本领域技术人员熟知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学的常规技术。这样的技术充分解释于文献中,如Sambrook,J.和Russell,D.W. (2012).Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第4版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory以及Sambrook,J.和Russell,D.W. (2001).Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第3版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory (在本文中统称为“Sambrook”);Ausubel,F.M. (1987).Current Protocols in Molecular Biology.New York,NY:Wiley (包括至2014年的增刊);Bollag,D.M.等人(1996).Protein Methods.New York,NY:Wiley-Liss;Huang,L.等人(2005).Nonviral Vectors for Gene Therapy.San Diego:Academic Press;Kaplitt,M.G.等人(1995).Viral Vectors:Gene Therapy and Neuroscience Applications.San Diego,CA:Academic Press;Lefkovits,I. (1997).The Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques.San Diego,CA:Academic Press;Doyle,A.等人(1998).Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology.New York,NY:Wiley;Mullis,K.B.,Ferré,F.和Gibbs,R. (1994).PCR:The Polymerase Chain Reaction.Boston:Birkhauser Publisher;Greenfield,E.A. (2014).Antibodies:A Laboratory Manual (第2版).New York,NY:Cold

Spring Harbor Laboratory Press;Beaucage,S.L.等人(2000).Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.New York,NY:Wiley(包括至2014年的增刊);和Makrides,S.C.(2003).Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells.Amsterdam,NL:Elsevier Sciences B.V.,将所述文献的披露内容通过引用并入本文。

[0161] 下文所述的实验结果表明,肿瘤的CD58突变或表达丧失的LBCL患者不太可能从CD19 CAR-T细胞疗法中得到持久的益处。特别地,CD58突变和蛋白质损失先前已经描述于LBCL中,并且与免疫逃逸和患者结局较差两者相关。在下文所述的一些实验中,通过IHC将肿瘤微阵列染色,然后对循环肿瘤DNA进行深度测序分析以确定CD58状态。两种方法都不能检测CD58改变的所有情况,CD58改变在某些患者中也可能是异质性的。对来自肿瘤样品的CD58的基因组DNA和RNA的直接测序可以提供另外的数据以与患者结局相关,这些另外的数据在这些研究中测试的患者系列中是不可得的。在这些研究中具有CD58改变的患者也更有可能是更年轻,并且患有具有高低密度脂蛋白(LDH)的巨块病(bulky disease)。正在计划针对大型前瞻性系列的另外的实验,以梳理并分解这些另外的风险因素的竞争性贡献。此外,CD58与反应相关的实验性发现是来自在单一机构治疗的患者的回顾性发现。尽管本文所述的实验结果提供了来自异种移植模型的关于CD58表达对CAR功能的重要性的令人信服的证据,但是此结果可以受益于经历CD19 CAR疗法的LBCL患者的更大的前瞻性试验。

#### 实施例1

##### 接受用阿基仑赛治疗的LBCL患者的持久缓解可能需要CD58

[0162] 此实施例描述了为了说明接受FDA批准的药物阿基仑赛(YESCARTA®)治疗的LBCL患者的持久缓解需要CD58表达而进行的研究的结果。

[0163] 在这些研究中,用商购获得的阿基仑赛治疗七十(70)名LBCL患者。这些研究中的反应率与来自其他研究团队的数据以及来自导致所述药物批准的最初临床试验的数据保持显著一致。为了研究CD58患者状态是否会影响患者结局,进行了实验以评价对于来自接受阿基仑赛的患者(N=36,包括31名仅疗法前、2名仅疗法后/进展、3名疗法前和疗法后/进展)的任何可用肿瘤样品,档案肿瘤组织上的CD58表达。构建由CAR前和CAR后肿瘤组织组成的肿瘤微阵列,随后通过免疫组织化学(IHC)技术针对CD58表达进行染色(参见例如,图1A)。观察到展现出CD58蛋白表达丧失的患者(n=7)几乎都在CAR输注的3.5个月内复发(参见例如,图5A)。唯一的例外是在淋巴细胞清除和CAR输注之前接受桥接放射疗法的低疾病负担(例如,一个单一疾病部位)的患者。在此研究中还观察到响应于阿基仑赛出现CD58丧失的情况,有一名患者仅在其疗法后活检时显示CD58表达丧失(参见例如,图1B)。

[0164] 由于先前也已经在患有LBCL的患者中描述了CD58突变,因此通过在循环肿瘤DNA(ctDNA)中使用癌症个体化深度测序分析(CAPP-seq),对可获得治疗前和治疗后血浆的来自同一系列的患者的CD58突变状态进行评估。在34名患者中,鉴定了五名具有CD58改变的患者(两名单核苷酸变体,K60E和C187R;两名移码缺失;和一名融合),所有这些患者最终均未能实现持久缓解。鉴定的突变之一(C187R)仅在疾病进展时才出现。先前预测鉴定的两个单核苷酸变体会影响蛋白质折叠和功能。根据已公开的CD58与CD2(其在T细胞上的配体)相互作用的晶体结构,认为K60E突变特异性地消除它们借以相互作用的盐桥(参见例如,图1C)。

[0165] 进行了另外的研究以评价有和没有CD58畸变(例如,通过IHC确定的蛋白质表达丧

失或通过CAPP-seq发现的一种或多种突变)的患者在CAR后的无进展存活(PFS)率(参见例如,表1)。在这些研究中,观察到与没有CD58畸变的患者相比,具有这样的畸变的患者具有显著更短的PFS(CD58畸变的中位PFS为3个月,与之相比,完整CD58为未达到, $p < 0.0001$ 。参见例如图1D)。当仅评价具有可用IHC数据(非CD58表达者的中位PFS为3个月,与之相比,CD58表达者为11.7个月, $p = 0.0049$ 。参见例如图5A)或CAPP-seq数据(CD58突变的中位PFS为3个月,与之相比,野生型CD58为未达到, $p = 0.0027$ 。参见例如图5B)的那些患者时,这种差异得以维持。此外,观察到具有CD58改变的患者也显著不太可能实现完全反应(25%相比于82%, $p = 0.0005$ ),并且更有可能实现部分反应(58%相比于10%, $p = 0.0015$ ) (参见例如,图1E)。因此,得出的结论是,野生型CD58表达的改变与用阿基仑赛(YESCARTA®)治疗的患有LBCL的患者的持久反应高度相关。

表1:按CD58状态的患者特征和结局。(CR:完全反应;PR:部分反应;SD:稳定反应;PD:疾病进展;IPI:国际预后指数;WNL:在正常范围内;DLBCL:弥漫大B细胞淋巴瘤;TFL:转化的滤泡性淋巴瘤;以及PBMCL:原发性纵膈B细胞淋巴瘤)。

	CD58 WNL (n = 39)	CD58畸变 (n = 12)
<b>亚型</b>		
DLBCL	(n=27) 69%	(n=7) 58%
TFL	(n=11) 28%	(n=3) 25%
PBMCL	(n=1) 3%	(n=2) 17%
<b>年龄</b>		
中值, 范围	61 (30-76)	51 (21-66)
> 65	(n=15) 38%	(n=1) 8%
男性%	(n=25) 64%	(n=6) 50%
III/IV期%	(n=29) 75%	(n=11) 92%
升高的LDH %	(n=15) 38%	(n=9) 75%
IPI>> 3%	(n=16) 41%	(n=7) 58%
巨块病%	(n=4) 10%	(n=5) 42%
双打击%*	(n=7) 20%	(n=3) 27%
<b>治疗线</b>		
中值 (范围)	3 (2-7)	3(2-6)
3种或更多种	(n=21) 54%	(n=7) 58%
自体, 是%	(n=11) 28%	(n=1) 8%
<b>最佳反应</b>		
CR	(n=32) 82%	(n=3) 25%
	<b>CD58 WNL (n = 39)</b>	<b>CD58畸变 (n = 12)</b>
PR	(n=4) 10%	(n=7) 58%
SD	(n=1) 3%	(n=1) 8%
PD	(n=2) 5%	(n=1) 8%

## 实施例2

在体外和异种移植模型中CD58丧失会降低CAR-T细胞的功效

[0166] 此实施例描述了为了说明在体外和异种移植模型中CD58表达的丧失会降低CAR-T

细胞的功效而进行的研究的结果。

[0167] 为了探索CD58表达对CAR-T细胞功效的作用,使用CRISPR-Cas9方法从充分描述的Na1m6细胞系中敲除CD58表达(图2A)。在这些研究中,观察到相比于野生型肿瘤细胞,阿基仑赛(CD19-CD28 $\zeta$ )、替沙仑赛(CD19-4-1BB $\zeta$ )中包含的CD19 CAR以及基于m971的CD22 CAR(CD22-4-1BB $\zeta$ )两者都响应于CD58敲除肿瘤细胞产生显著减少的IL-2和IFN- $\gamma$ (参见例如,图2C)。应注意m971是一种膜近端结合抗CD22 scFv。在与敲除和未敲除CD58的DIPG细胞系一起孵育时,也观察到GD2-4-1BB $\zeta$ CAR对细胞因子产生的相同降低(参见例如,图7A)。

[0168] 随后,为了评估细胞毒性,进行了几天内测量肿瘤死亡的Incucyte测定。当CD19密度足够时,如在野生型Na1m6系上,观察到CD19-CD28 $\zeta$ CAR或CD19-4-1BB $\zeta$ CAR针对CD58野生型或CD58敲除系的杀伤没有差异(参见例如,图7A)。然而,当针对具有降低的CD19表达的细胞系测试CAR-T细胞时,出现显著差异,其中CD19 CAR T细胞针对CD58敲除细胞系相比于野生型细胞系表现出降低的细胞毒性(参见例如,图2C-图2D)。由于Na1m6细胞系上的CD22密度较低,在天然抗原密度范围内观察到CD22-4-1BB $\zeta$ CAR针对CD58敲除细胞相比于野生型细胞的杀伤的差异(参见例如,图2E)。

[0169] 为了进一步探索CD19抗原密度和CD58表达对CAR功能的相互作用,通过敲除、过表达、FACS分选和单细胞克隆产生表达不同水平的CD19和CD58两者的Na1m6克隆(参见例如,图7B)。观察到CAR-T细胞响应于肿瘤的细胞因子产生依赖于肿瘤细胞上的靶抗原密度(例如,CD19)和CD58密度两者(图2F-图2G)。只有当两者都足够高时,就像它们在Na1m6野生型系上一样,才能实现最大的细胞因子产生。

[0170] 进行了另外的研究以在体内评价针对CD58敲除异种移植物和野生型异种移植物的CAR功效。在这些研究中,虽然CD19-CD28 $\zeta$ 和CD19-4-1BB $\zeta$ CAR两者在携带CD58敲除Na1m6的小鼠中都显示出初始功效,但是它们无法清除疾病,导致最终的肿瘤生长(参见例如,图2H-图2I),这反映了人类患者的经历,其中大多数患者在最终进展之前实现部分反应(PR)。使用CD22-4-1BB $\zeta$ CAR时观察到类似的趋势(参见例如,图7C)。虽然两种CD19 CAR都在携带CD58野生型异种移植物的鼠中导致长期治愈,但是都不能治愈具有CD58敲除肿瘤的小鼠(参见例如,图2J)。

### 实施例3

#### CD58-CD2相互作用导致CAR-T细胞活性增强

[0171] 此实施例描述了为了证实CD58与CD2的相互作用导致CAR-T细胞活性增强而进行的实验的结果。

[0172] 如上所述,CD58的天然配体是CD2,由大多数T细胞高度表达的共刺激分子。为了测试CD2表达和信号传导的重要性,产生表达CD19 CAR的T细胞系(Jurkat),其中敲除CD2(CD2KO,图3A-图3B)。观察到与CD2 WT CAR细胞相比,CD2KO CAR细胞响应于抗原接触产生显著更少的IL-2(图3C)。为了测试CD2的细胞内信号传导结构域对CAR功效的贡献,将仅表达CD2的细胞外结构域(CD2-ECD)的CD2变体在这些细胞中重新表达(图3A-图3B),并且发现此CD2变体没有拯救CAR功能(参见例如,图3C)。因此,有效的CAR-T细胞功能可能需要经由CD2细胞内结构域的信号传导。

[0173] 进行另外的研究以探索CD2连接对CAR-T细胞下游信号传导的贡献。在这些研究中发现,当连接CAR和CD2两者时,将CD19 CAR-T细胞与独特型抗体、CD58蛋白或独特型+CD58

交联显著增强CD19-CD28 $\zeta$ 和CD19-4-1BB $\zeta$ CAR-T细胞两者的IL-2产生(图3D)。此外,在五秒钟刺激后,观察到用独特型抗体和CD58两者激活的CAR-T细胞中CD3 $\zeta$ -CAR和下游ERK两者的显著更高的磷酸化(图3E)。此观察结果与显示CD2增强通过近端T细胞受体机制的信号传导的先前发现一致。

[0174] 为了更全面地探索CD2信号传导在CAR-T细胞中的作用,获取来自上述实验的蛋白质裂解物,并且使用质谱测量映射到3372种蛋白质的15,993种磷酸肽。发现磷蛋白组的主要成分分析显示生物学重复聚集在一起,这证明了供体之间的可重复性。在这些研究中,主要成分1(PC1)捕获了58%的方差,基于用抗独特型处理分离样品,并且表明最大的差异是由于通过CAR刺激所致。主要成分2(PC2)占方差的17%,并且基于用可溶性CD58处理分离样品(图3F)。

[0175] 如图3G所示,差异性丰度的肽的无监督聚类表明,在两种独特型处理的条件下,大多数肽(聚类1、2、4和8)升高,因此可以归因于经由CAR的信号传导。聚类7中的磷酸肽仅在用CD58处理的条件下升高,这表明CD2信号传导导致这些变化。值得注意的是,聚类7含有几种SH3结构域肽,包括SH3KBP1和DBNL,它们被描述为肌动蛋白细胞骨架的调节剂,并且已知在T细胞极化中发挥作用。聚类3含有在用独特型和CD58两者刺激的条件最丰富的磷酸肽,并且包括TCR信号传导通路的许多核心组分,如LCK、CD3 $\epsilon$ 和CD247(CD3 $\zeta$ )。这些结果表明,CD2共刺激与CAR信号传导协同作用以增加经由共同TCR通路的激活。此外,聚类3包括CD2及其信号转导衔接蛋白CD2AP,这表明经由CAR的信号传导增强了CD2通路的激活。单独的CD2共刺激导致157种磷酸肽的不同丰度,而CD2共刺激加上CAR激活导致236种差异性丰度的肽(图3H),这进一步支持了经由这两种通路的信号传导的作用不同的观点。

[0176] 在存在CAR信号传导的情况下由CD2刺激调节的磷酸肽的生物信息学分析揭示了基因本体(GO)术语(包括“细胞-细胞粘附”和“免疫突触”)的显著富集(图3I)。这些结果与CD2可能对于朝向靶细胞的细胞骨架极化至关重要的先前报道一致。为了进一步检查CD2在增强TCR信号传导中的作用,进行了另外的研究以检查与反应组TCR信号传导基因集中的基因相对应的磷酸肽。发现CD58的CD2连接导致TCR通路信号传导增强,且磷酸化的LCK、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 和GRAP2增加。此外,参与肌动蛋白细胞骨架重组的蛋白质如血管舒张剂刺激磷蛋白(VASP)和威-奥综合征(WAS)蛋白在CD2刺激的细胞中升高(图3J和图8)。值得注意的是,与CARD11-BCL10-MALT1(CBM)信号小体复合物的关键组分MALT1和CARD11相对应的磷酸肽也随着CD2连接而增加。CBM信号小体可能是T细胞表面信号传导与NF- $\kappa$ B激活(其可能是T细胞增殖、存活和效应子功能所需的)之间的重要分子联系。

#### 实施例4

##### 可以将CAR-T细胞工程化以克服B细胞恶性肿瘤中的CD58丧失

[0177] 此实施例描述了为了说明可以将CAR-T细胞工程化以克服B细胞恶性肿瘤中的CD58丧失而进行的实验的结果。

[0178] 由于CD58连接引起的CD2信号传导增强了CAR-T细胞的功能,因此通过将CD2共刺激结构域整合到CAR分子中而产生了第二代和第三代CAR-T细胞。参见,图4A中的CD22-CD2 $\zeta$ 和CD22-4-1BB-CD2 $\zeta$ 。选择CD22-4-1BB $\zeta$ CAR用于这些实验,因为发现CD58敲除的作用在体外更明显,有利于更充分地测试多种构建体。将这些CAR构建体(CD22-CD2 $\zeta$ 和CD22-4-1BB-CD2 $\zeta$ )相对于CD22-4-1BB $\zeta$ CAR进行比较,其中发现它们能够杀伤CD58敲除的Na1m6细胞,而4-

1BB $\zeta$ CAR不能(图4B)。此外,它们响应于与CD58野生型和CD58敲除Na1m6系两者的共培养产生了另外的IL-2(图4C)。然而,在体内,尽管含有CD2的CAR最初增强了CD58敲除异种移植物的肿瘤控制(图4D),但是肿瘤最终在所有小鼠中生长,消除了存活方面的任何益处(图4E)。

[0179] 在天然T细胞中,CD2信号传导与T细胞受体呈反式发生。为了更好地模拟CD2与TCR的关系,生成了反式CAR构建体,其中将抗CD19单链可变片段(scFv)FMC63与跨膜结构域和CD2细胞内结构域融合(图4F)。在这些实验中,两种构建体可以使用两种病毒载体在一种细胞中表达或在单个双顺反子载体中表达。在使用双顺反子载体的一些实验中,在两个CAR的序列之间插入连接序列。以下是在这些实验中使用的示例性连接序列:

[0180] RKRREFATNFSLLKQAGDVEENPGPLE(SEQ ID NO:11)。

[0181] 上述连接序列的编码序列如下:

[0182] CGCAAGAGAAGAGAATTCgcaacaaacttctctctgctgaaacaagccggagatgtcgaagagaatcctggaccgCTCGAG(SEQ ID NO:12)。

[0183] 其中:RKRR(SEQ ID NO:13)对应于在第一CAR序列下游添加的弗林蛋白酶切割序列。

[0184] EF对应于EcoRI切割位点;

[0185] ATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:14)对应于来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)的自我蛋白酶解的(auproteolytic)肽序列。

[0186] LE对应于XhoI切割位点。

[0187] 在细胞毒性测定中,反式表达CD22-4-1BB $\zeta$ 和CD19-CD2受体两者的T细胞能够杀伤CD58敲除肿瘤细胞,而第二代和第三代CAR不能(图4G)。针对细胞因子产生观察到相同的趋势,其中反式构型针对CD58敲除系产生最多的IL-2(图4H)。特别地,表达CD22-4-1BB $\zeta$ CAR和CD19 scFv跨膜结构域而不表达细胞内CD2信号传导结构域的对照T细胞无法恢复杀伤CD58敲除细胞或生成针对CD58敲除细胞的细胞因子的能力,这表明CD2信号传导对于CAR/肿瘤细胞相互作用可能是必需的(图4G-图4H)。实际上,在体内,与对照构建体相比,反式表达CD22-4-1BB $\zeta$ 和CD19-CD2受体的T细胞有效地控制了CD58敲除肿瘤的生长(图4I),导致显著改善的存活(图4J)。因此,得出结论,以反式方法整合CD2信号传导的针对淋巴瘤的下一代CAR在克服CD58丧失方面是有效的,CD58丧失是通过本文所述的研究揭示的常见但新颖的CAR耐药性机制。

[0188] 虽然已经公开了本公开文本的特定替代方案,但应理解的是,各种修改和组合是可能的并且被考虑在所附权利要求的真实精神和范围内。因此,不旨在限制于本文呈现的确切摘要和公开文本。

#### 参考文献

1 Majzner,R.G.&Mackall,C.L.Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey.Nat Med 25,1341-1355,doi:10.1038/s41591-019-0564-6(2019)。

2 Neelapu,S.S.et al.Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma.N Engl J Med 377,2531-2544,doi:10.1056/NEJMoa1707447(2017)。

3 Schuster,S.J.et al.Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma.N Engl J Med 380,45-56,doi:10.1056/NEJMoa1804980(2019) .

4 Locke,F.L.et al.Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1):a single-arm, multicentre,phase 1-2 trial.Lancet Oncol 20,31-42,doi:10.1016/S1470-2045(18)30864-7(2019) .

5 Nastoupil,L.J.et al.Standard-of-Care Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma:Results From the US Lymphoma CAR T Consortium.J Clin Oncol,JCO1902104,doi:10.1200/JCO.19.02104(2020) .

6 Brudno,J.N.&Kochenderfer,J.N.Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma.Nat Rev Clin Oncol 15,31-46,doi:10.1038/nrclinonc.2017.128(2018) .

7 June,C.H.&Sadelain,M.Chimeric Antigen Receptor Therapy.N Engl J Med 379,64-73,doi:10.1056/NEJMra1706169(2018) .

8 Abramson,J.S.et al.Pivotal Safety and Efficacy Results from Transcend NHL 001,a Multicenter Phase 1Study of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Relapsed/Refractory (R/R) Large B Cell Lymphomas.Blood 134,241-241,doi:10.1182/blood-2019-127508(2019) .

9 Chow,V.A.,Shadman,M.&Gopal,A.K.Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma.Blood 132,777-781,doi:10.1182/blood-2018-04-839217(2018) .

10 Brudno,J.N.et al.Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma.Nat Med 26,270-280,doi:10.1038/s41591-019-0737-3(2020) .

11 Shah,N.N.&Fry,T.J.Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy.Nat Rev Clin Oncol 16,372-385,doi:10.1038/s41571-019-0184-6(2019) .

12 Majzner,R.G.&Mackall,C.L.Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy.Cancer Discov 8,1219-1226,doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0442(2018) .

13 Shalabi,H.et al.Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma.Haematologica,doi:10.3324/haematol.2017.183459(2018) .

14 Fry,T.J.et al.CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy.Nat Med 24,20-28,doi:10.1038/nm.4441(2018) .

15 Neelapu,S.S.et al.CD19-Loss with Preservation of Other B Cell Lineage Features in Patients with Large B Cell Lymphoma Who Relapsed Post-Axi-Cel.Blood 134,203-203,doi:10.1182/blood-2019-126218(2019) .

16 Fraietta,J.A.et al.Determinants of response and resistance to CD19

chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 24,563-571,doi:10.1038/s41591-018-0010-1(2018).

17 Finney,O.C.et al.CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest* 129,2123-2132,doi:10.1172/JCI125423(2019).

18 Maude,S.L.et al.Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 378,439-448,doi:10.1056/NEJMoal709866(2018).

19 Majzner,R.G.et al.Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov* 10,702-723,doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0945(2020).

20 Gardner,R.A.et al.Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* 129,3322-3331,doi:10.1182/blood-2017-02-769208(2017).

21 Lee,D.W.et al.T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385,517-528,doi:10.1016/S0140-6736(14)61403-3(2015).

22 Turtle,C.J.et al.CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 126,2123-2138,doi:10.1172/JCI85309(2016).

23 Veltroni,M.et al.Expression of CD58 in normal,regenerating and leukemic bone marrow B cells:implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 88,1245-1252(2003).

24 Chen,J.S.et al.Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97,2115-2120,doi:10.1182/blood.v97.7.2115(2001).

25 Jacob,M.C.et al.Quantification of cellular adhesion molecules on malignant B cells from non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 13,1428-1433,doi:10.1038/sj.leu.2401517(1999).

26 Cao,Y.et al.Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget* 7,83294-83307,doi:10.18632/oncotarget.13065(2016).

27 Challa-Malladi,M.et al.Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 20,728-740,doi:10.1016/j.ccr.2011.11.006(2011).

28 Newman,A.M.et al.An ultrasensitive method for quantitating

circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20,548-554,doi:10.1038/nm.3519(2014) .

29 Adzhubei,I.A.et al.A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7,248-249,doi:10.1038/nmeth0410-248(2010) .

30 Wang,J.H.et al.Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97,791-803,doi:10.1016/s0092-8674(00)80790-4(1999) .

31 Barrett,D.M.et al.Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia:a strategy for preclinical modeling. *Blood* 118,e112-117,doi:10.1182/blood-2011-04-346528(2011) .

32 Haso,W.et al.Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 121,1165-1174,doi:10.1182/blood-2012-06-438002(2013) .

33 Mount,C.W.et al.Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T cells in H3-K27M(+)diffuse midline gliomas. *Nat Med* 24,572-579,doi:10.1038/s41591-018-0006-x(2018) .

34 Shaw,S.et al.Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 323,262-264,doi:10.1038/323262a0(1986) .

35 Selvaraj,P.et al.The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326,400-403,doi:10.1038/326400a0(1987) .

36 Demetriou,P.et al.CD2 expression acts as a quantitative checkpoint for immunological synapse structure and T-cell activation. *bioRxiv*,589440,doi:10.1101/589440(2019) .

37 Tibaldi,E.V.&Reinherz,E.L.CD2BP3,CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment,but elicit divergent functional activities. *Int Immunol* 15,313-329,doi:10.1093/intimm/dxg032(2003) .

38 Le Bras,S.et al.Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* 279,15550-15560,doi:10.1074/jbc.M312659200(2004) .

39 Dustin,M.L.et al.A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94,667-677,doi:10.1016/s0092-8674(00)81608-6(1998) .

40 Zurli,V.et al.Phosphoproteomics of CD2 signaling reveals AMPK-dependent regulation of lytic granule polarization in cytotoxic T cells. *Sci Signal* 13,doi:10.1126/scisignal.aaz1965(2020) .

41 Jassal,B.et al.The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 48,D498-D503,doi:10.1093/nar/gkz1031(2020) .

42 Thome,M.,Charton,J.E.,Pelzer,C.&Hailfinger,S.Antigen receptor

signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003004, doi:10.1101/cshperspect.a003004 (2010).

43 Crump, M. et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* 130, 1800-1808, doi:10.1182/blood-2017-03-769620 (2017).

44 Neelapu, S.S. et al. A Comparison of Two-Year Outcomes in ZUMA-1 (Axicabtagene Ciloleucel) and SCHOLAR-1 in Patients with Refractory Large B Cell Lymphoma. *Blood* 134, 4095-4095, doi:10.1182/blood-2019-125792 (2019).

45 Bierer, B.E., Peterson, A., Gorga, J.C., Herrmann, S.H. & Burakoff, S.J. Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J Exp Med* 168, 1145-1156, doi:10.1084/jem.168.3.1145 (1988).

46 Hahn, W.C., Rosenstein, Y., Calvo, V., Burakoff, S.J. & Bierer, B.E. A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7179-7183, doi:10.1073/pnas.89.15.7179 (1992).

47 Cheadle, E.J. et al. Ligation of the CD2 co-stimulatory receptor enhances IL-2 production from first-generation chimeric antigen receptor T cells. *Gene Ther* 19, 1114-1120, doi:10.1038/gt.2011.192 (2012).

48 Kanner, S.B., Damle, N.K., Blake, J., Aruffo, A. & Ledbetter, J.A. CD2/LFA-3 ligation induces phospholipase-C gamma 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling. *J Immunol* 148, 2023-2029 (1992).

49 Espagnolle, N. et al. CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase C gamma 1/calcium pathway at the immunological synapse. *Int Immunol* 19, 239-248, doi:10.1093/intimm/dxl141 (2007).

50 Hubert, P., Debre, P., Bousmell, L. & Bismuth, G. Tyrosine phosphorylation and association with phospholipase C gamma-1 of the GAP-associated 62-kD protein after CD2 stimulation of Jurkat T cell. *J Exp Med* 178, 1587-1596, doi:10.1084/jem.178.5.1587 (1993).

51 Yang, H. & Reinherz, E.L. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem* 276, 18775-18785, doi:10.1074/jbc.M009852200 (2001).

52 Li, J., Smolyar, A., Sunder-Plassmann, R. & Reinherz, E.L. Ligand-induced conformational change within the CD2 ectodomain accompanies receptor clustering: implication for molecular lattice formation. *J Mol Biol* 263, 209-226, doi:10.1006/jmbi.1996.0570 (1996).

53 Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Vardhana, S., Dustin, M.L. & Vale, R.D. The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells. *J Cell Biol* 185, 521-534, doi:10.1083/jcb.200809136 (2009).

54 Zhao, Z. et al. Structural Design of Engineered Costimulation

Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* 28,415-428,doi:10.1016/j.ccell.2015.09.004(2015) .

55 Schneider,M.et al.Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 54,638-645,doi:10.1002/gcc.22276 (2015) .

56 Abdul Razak,F.R.,Diepstra,A.,Visser,L.&van den Berg,A.CD58 mutations are common in Hodgkin lymphoma cell lines and loss of CD58 expression in tumor cells occurs in Hodgkin lymphoma patients who relapse. *Genes Immun* 17,363-366,doi:10.1038/gene.2016.30(2016) .

57 Sembries,S.,Pahl,H.,Stilgenbauer,S.,**Döhner**,H.&Schriever,F.Reduced Expression of Adhesion Molecules and Cell Signaling Receptors by Chronic Lymphocytic Leukemia Cells With 11q Deletion. *Blood* 93,624-631,doi:10.1182/blood.V93.2.624(1999) .

58 Barker,H.F.,Hamilton,M.S.,Ball,J.,Drew,M.&Franklin,I.M.Expression of adhesion molecules LFA-3 and N-CAM on normal and malignant human plasma cells. *Br J Haematol* 81,331-335,doi:10.1111/j.1365-2141.1992.tb08236.x(1992) .

59 Koretz,K.,Schlag,P.&Moller,P.Sporadic loss of leucocyte-function-associated antigen-3 (LFA-3) in colorectal carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 419,389-394,doi:10.1007/BF01605072(1991) .

60 Siliciano,R.F.,Pratt,J.C.,Schmidt,R.E.,Ritz,J.&Reinherz,E.L.Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 317,428-430,doi:10.1038/317428a0(1985) .

61 Liu,L.L.et al.Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep* 15,1088-1099,doi:10.1016/j.celrep.2016.04.005(2016) .

62 Liu,E.et al.Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 382,545-553,doi:10.1056/NEJMoa1910607 (2020) .

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 小利兰·斯坦福大学董事会

&lt;120&gt; 诊断或治疗健康状况或优化CAR-T细胞疗法的治疗功效的方法

&lt;130&gt; 078430-525001W0

&lt;140&gt; Herewith

&lt;141&gt; Herewith

&lt;150&gt; US 63/109,611

&lt;151&gt; 2020-11-04

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 250

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; Human CD58 isoform 1

&lt;400&gt; 1

```

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

```

Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys  
 165 170 175  
 Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro  
 180 185 190  
 Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser  
 195 200 205  
 Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala  
 210 215 220  
 Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys  
 225 230 235 240  
 Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn  
 245 250  
 <210> 2  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Human CD58 isoform 2  
 <400> 2  
 Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val  
 1 5 10 15  
 Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln  
 20 25 30  
 Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn  
 35 40 45  
 Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala  
 50 55 60  
 Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr  
 85 90 95  
 Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp  
 100 105 110  
 Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr  
 115 120 125  
 Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile  
 130 135 140  
 Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp



Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 165 170 175  
 Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly  
 180 185 190  
 Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly  
 195 200 205  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 210 215 220  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 225 230 235 240  
 Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 245 250 255  
 Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
 260 265 270  
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys  
 275 280 285  
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala  
 290 295 300  
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys  
 325 330 335  
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr  
 340 345 350  
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly  
 355 360 365  
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala  
 370 375 380  
 Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu  
 405 410 415  
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 420 425 430  
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 435 440 445  
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

450                                      455                                      460  
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 465                                      470                                      475                                      480  
 Leu Pro Pro Arg  
 <210> 4  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CD19\_scFv-28tm-CD2  
 <400> 4  
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser  
                                     20                                      25                                      30  
 Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser  
                                     35                                      40                                      45  
 Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
                                     50                                      55                                      60  
 Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr  
                                     85                                      90                                      95  
 Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln  
                                     100                                      105                                      110  
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                                     115                                      120                                      125  
 Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser  
                                     130                                      135                                      140  
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
                                     165                                      170                                      175  
 Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
                                     180                                      185                                      190  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser

195	200	205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln		
210	215	220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr		
225	230	235
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
	245	250
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu		
	260	265
Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr		
	275	280
Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro		
	290	295
Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu		
	305	310
Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
	315	320
	325	330
Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr		
	335	340
Arg Ala His Arg Val Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln		
	345	350
	355	360
Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro		
	365	370
	375	380
Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro		
	385	390
	395	400
Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro		
	405	410
	415	
Ser Gly Thr Gln Val His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro		
	420	425
	430	
Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser		
	435	440
	445	
Pro Ser Ser Asn		
450		
<210> 5		
<211> 258		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Synthetic construct		

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> m971 scFv plus leader of SEQ ID NO: 3

<400> 5

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

Ile Lys

<210> 6

<211> 72

<212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Hinge/TM and restriction enzyme site of SEQ ID NO: 3  
 <400> 6  
 Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro  
                   20                   25                   30  
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
                   35                   40                   45  
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
                   50                   55                   60  
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 65                   70

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> costimulatory domain of SEQ ID NO: 3

<400> 7

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
                   20                   25                   30  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
                   35                   40

<210> 8

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> CD19 scFv plus leader of SEQ ID NO: 4

<400> 8

```

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

```

<210> 9  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Hinge/TM and restriction enzyme site of SEQ ID NO: 4  
 <400> 9  
 Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro  
                   20                   25                   30  
 Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val  
                   35                   40                   45  
 Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe  
                   50                   55                   60  
 Ile Ile Phe Trp Val  
 65  
 <210> 10  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic construct  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> costimulatory domain of SEQ ID NO: 4  
 <400> 10  
 Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Ala His Arg Val Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln  
                   20                   25                   30  
 Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro  
                   35                   40                   45  
 Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro  
                   50                   55                   60  
 Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> furin cleavage sequence

<400> 13

Arg Lys Arg Arg

1

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> auproteolytic peptide sequence P2A

<400> 14

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

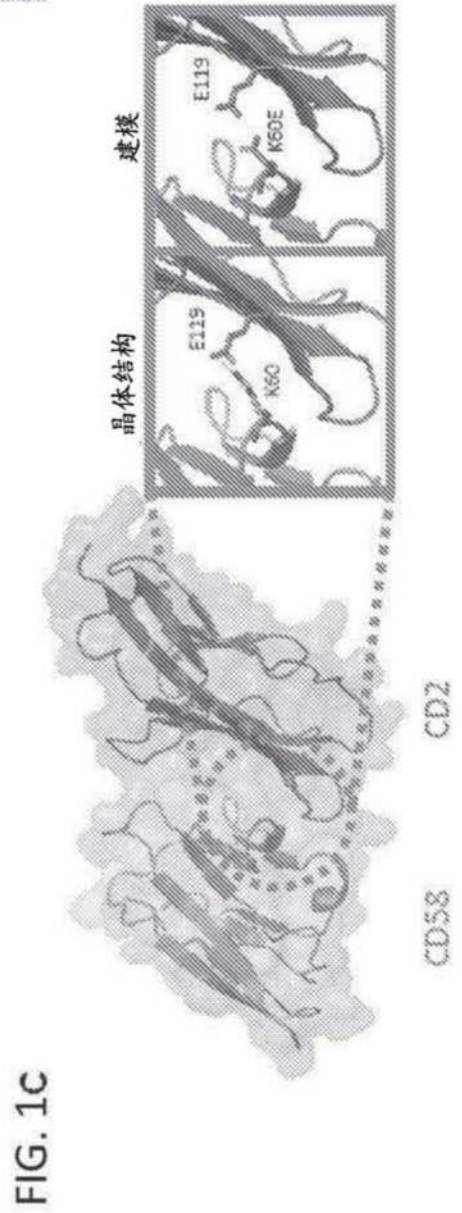
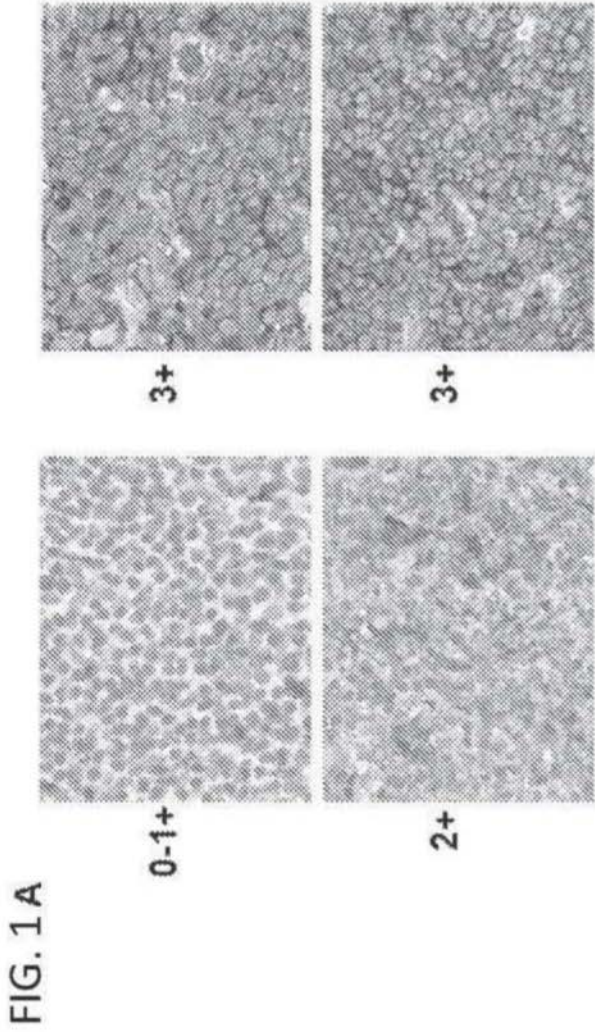
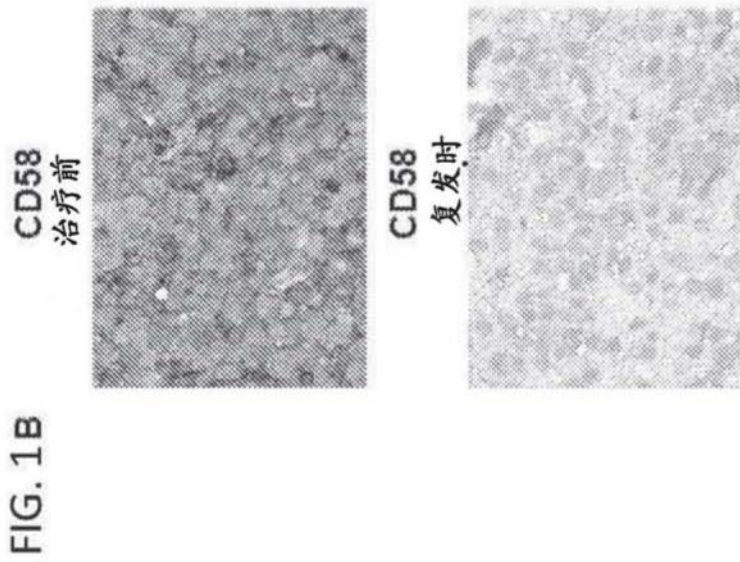
1

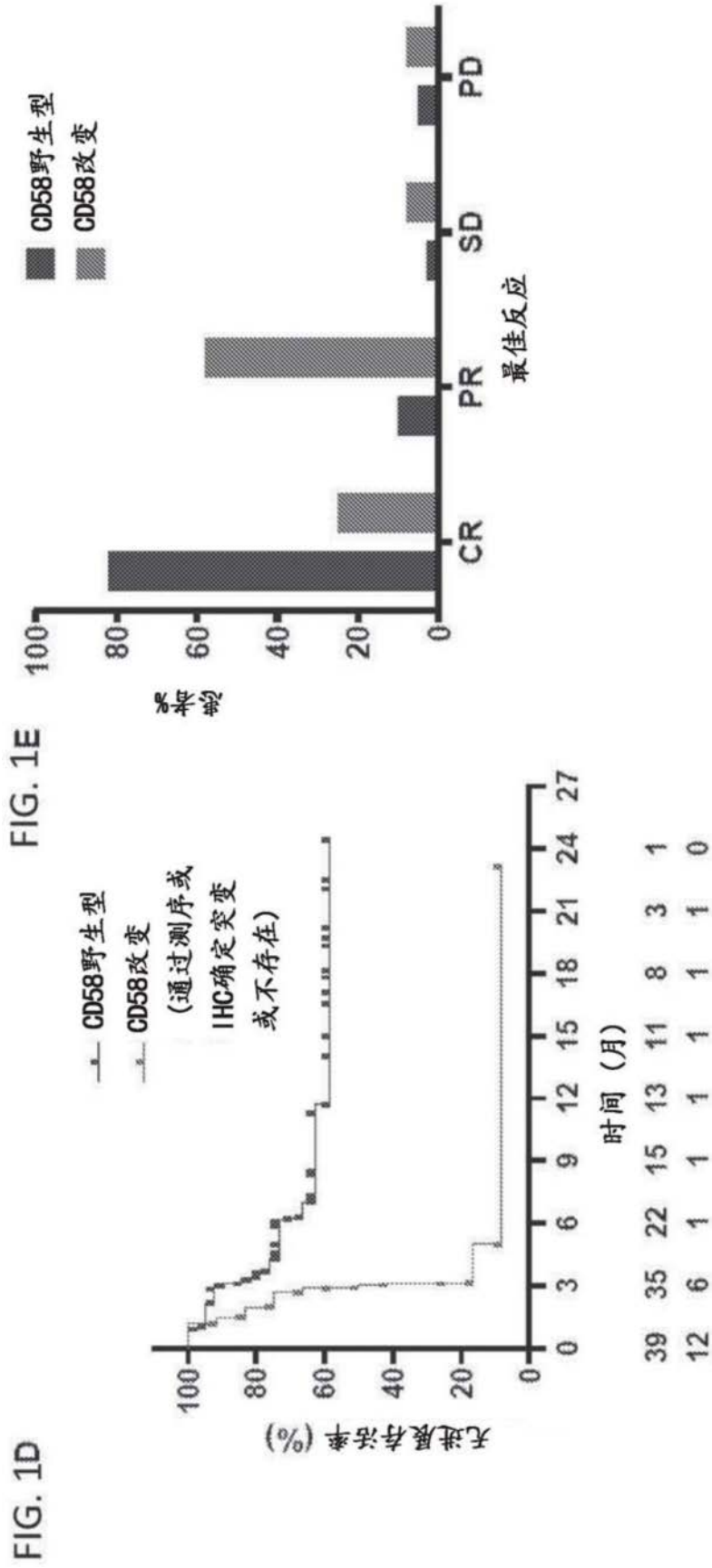
5

10

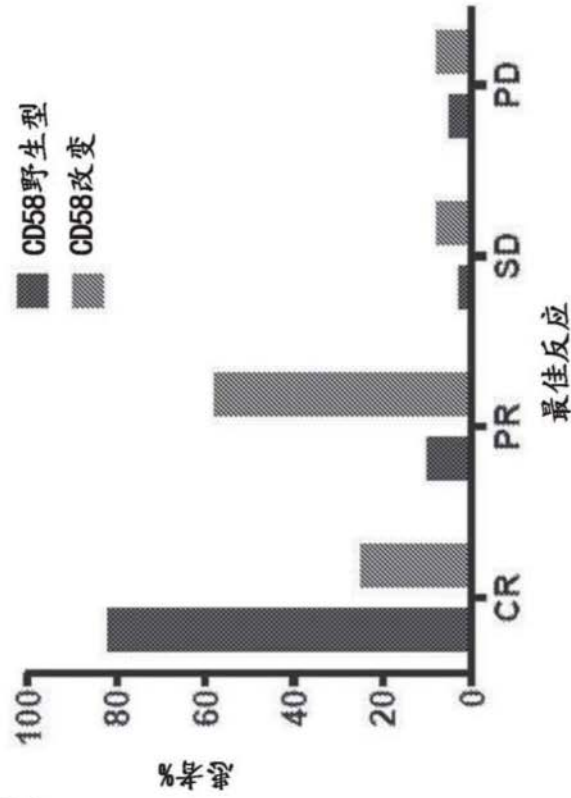
15

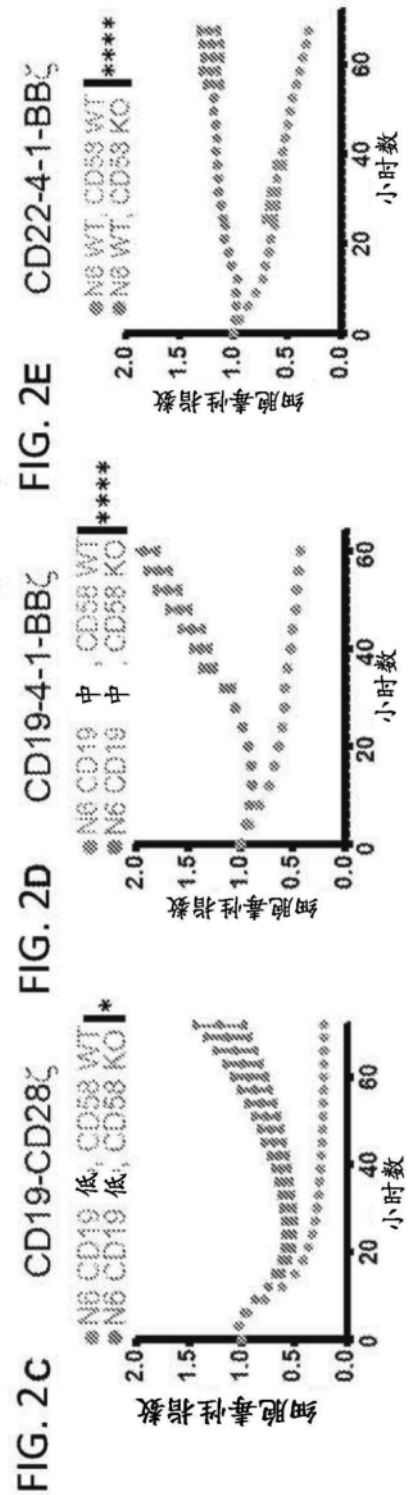
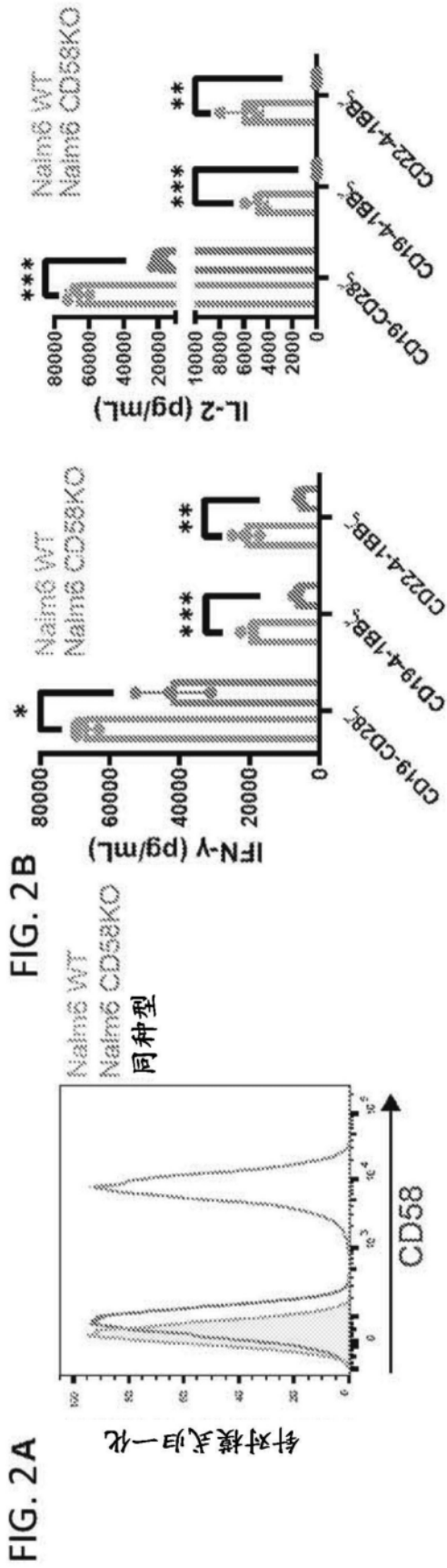
Pro Gly Pro

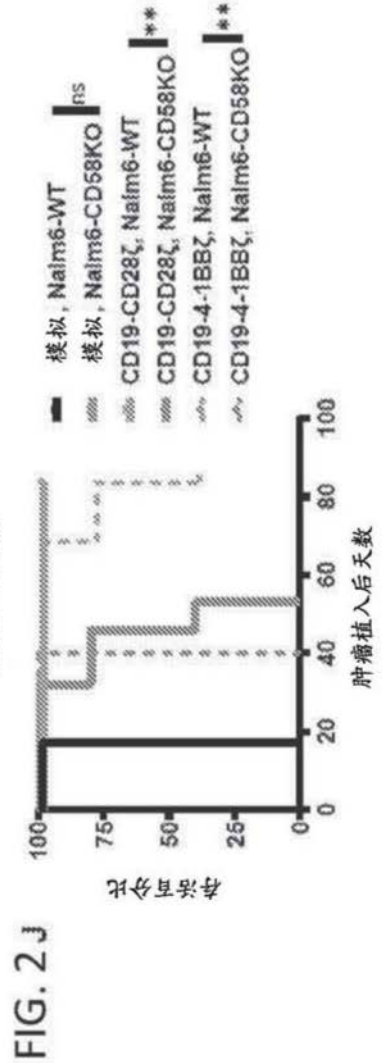
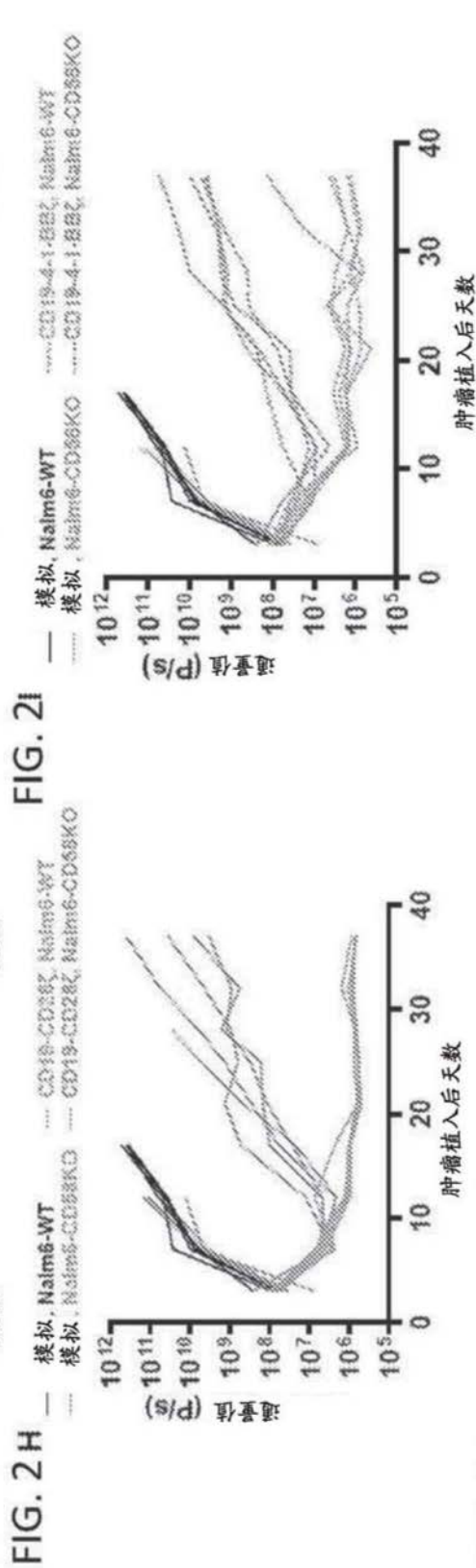
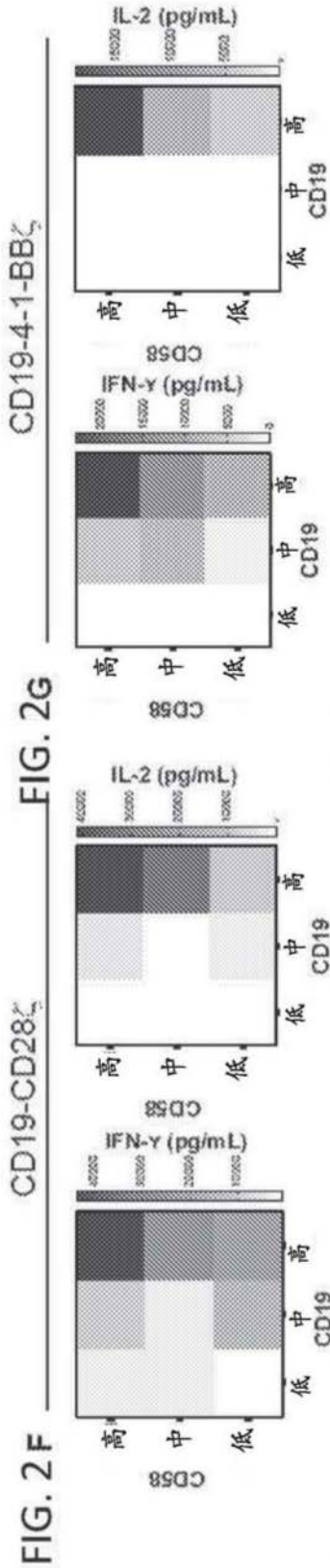


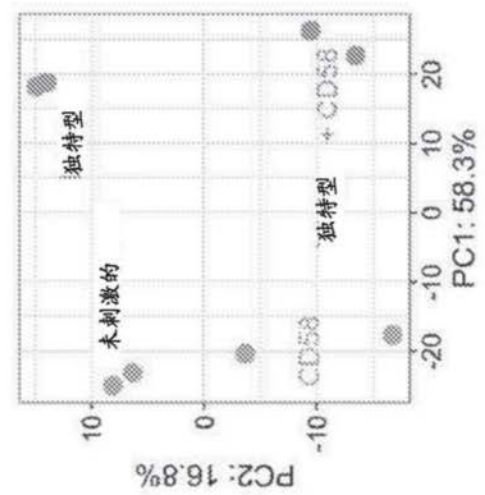
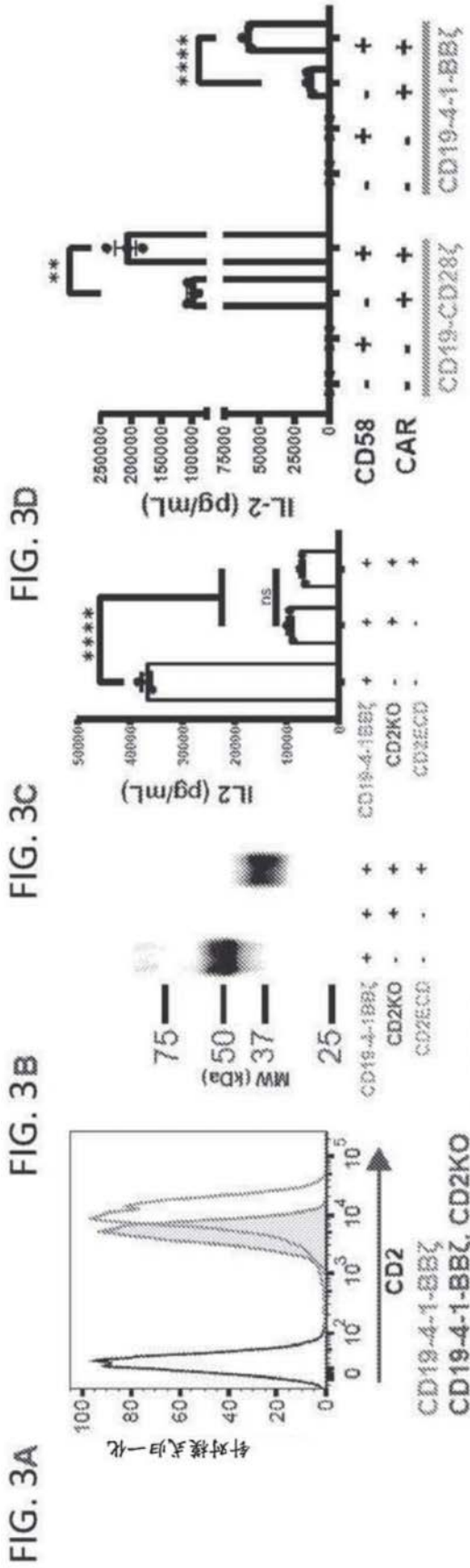


**FIG. 1E**









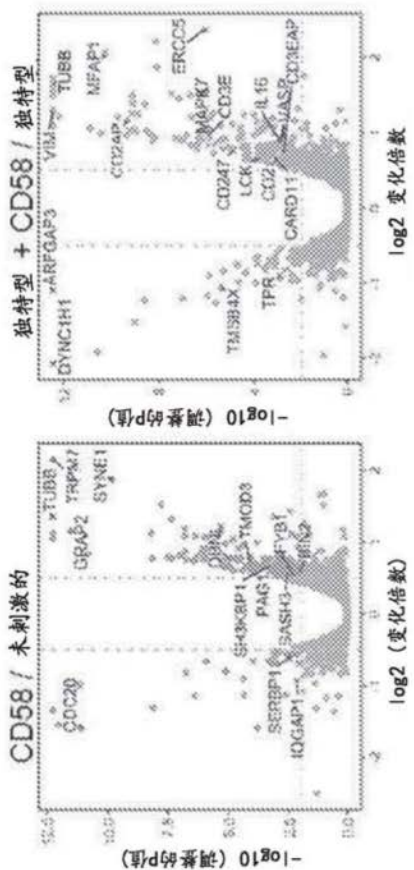


FIG. 3H

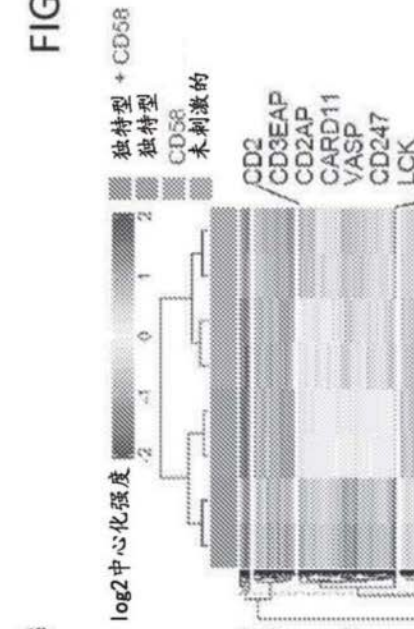


FIG. 3G

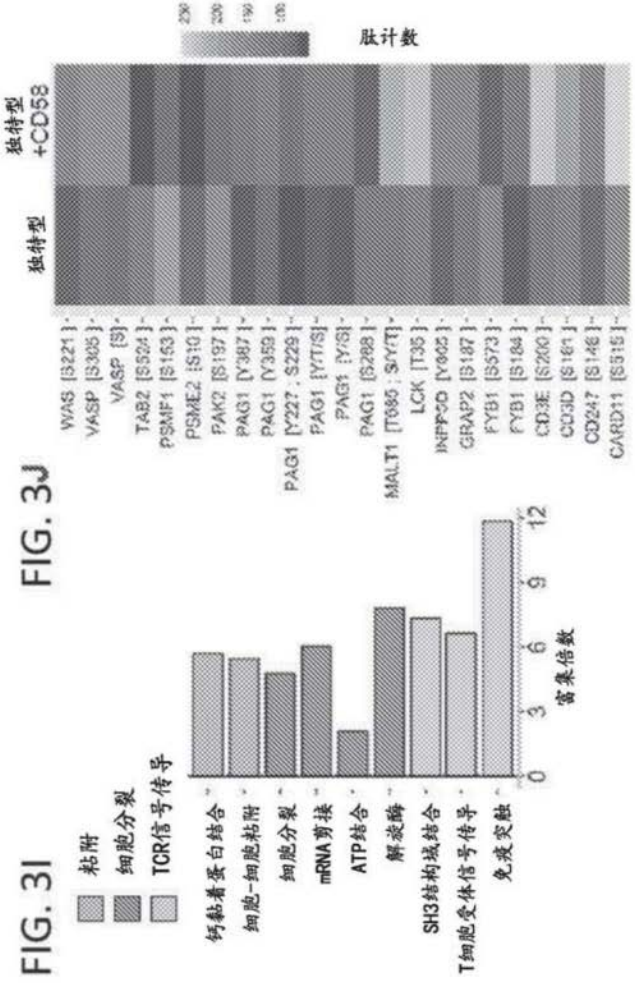


FIG. 3J

FIG. 3I

FIG. 4 A

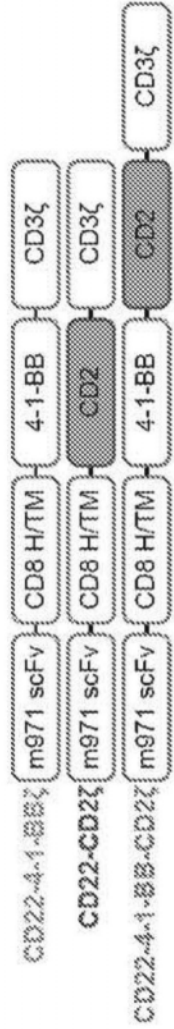


FIG. 4 B

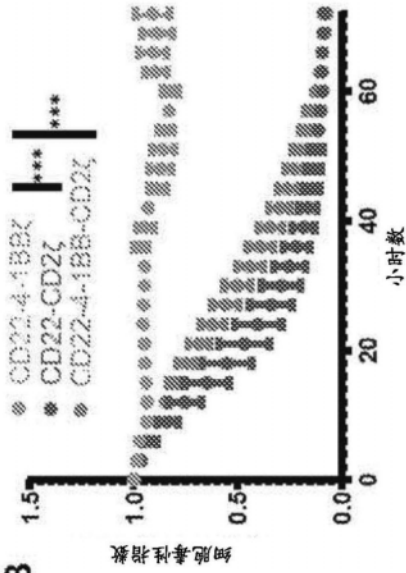


FIG. 4 C

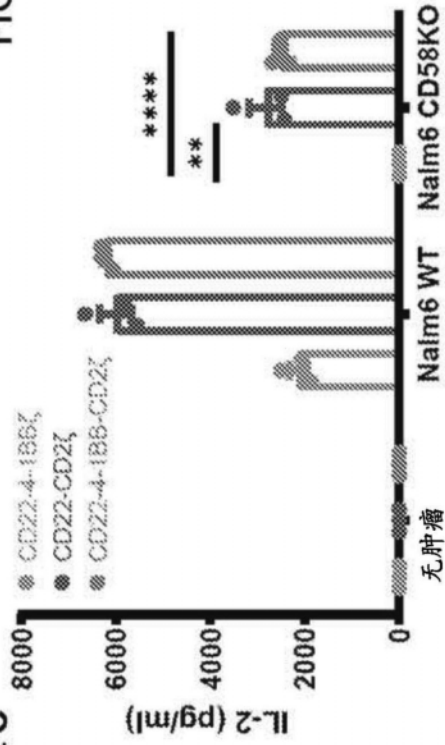
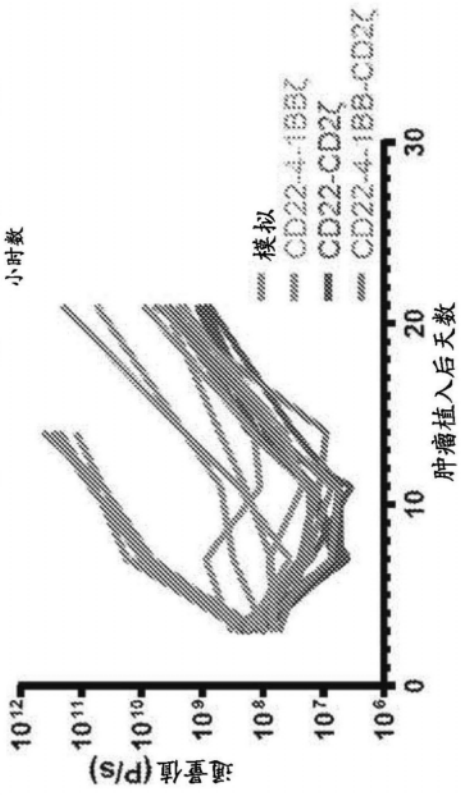


FIG. 4 D



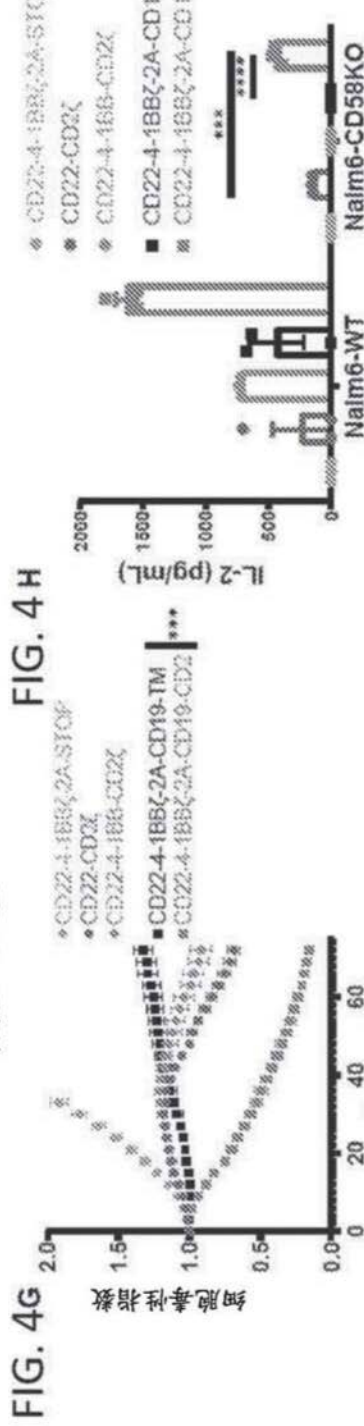
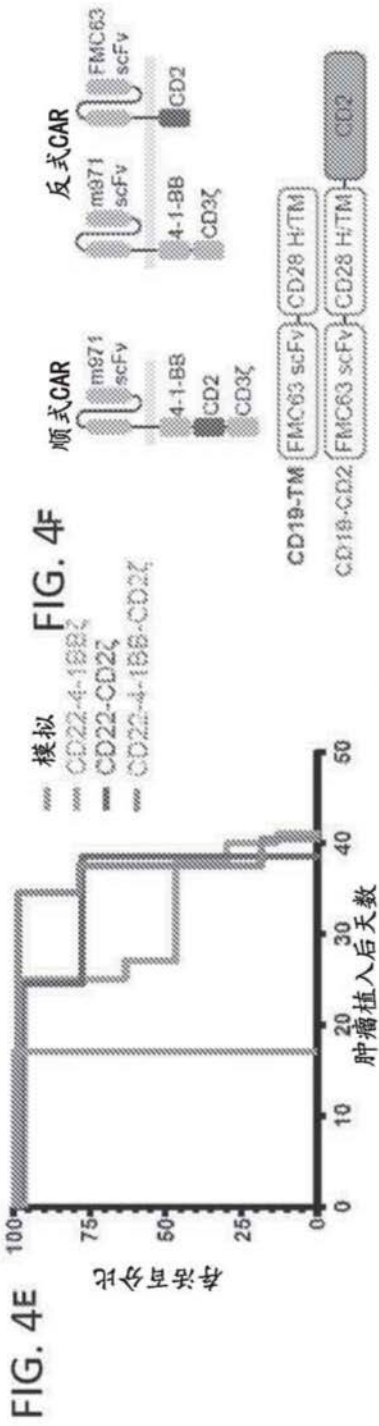


FIG. 5A

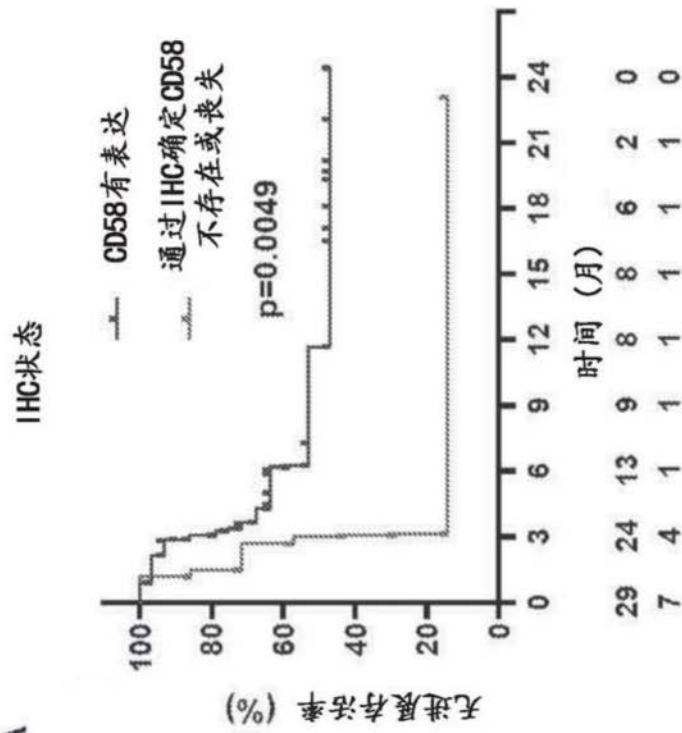
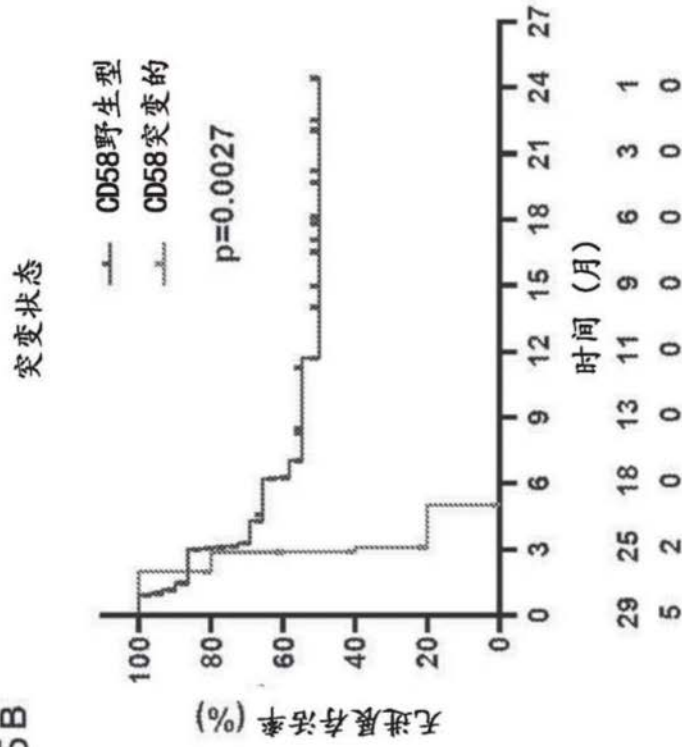


FIG. 5B



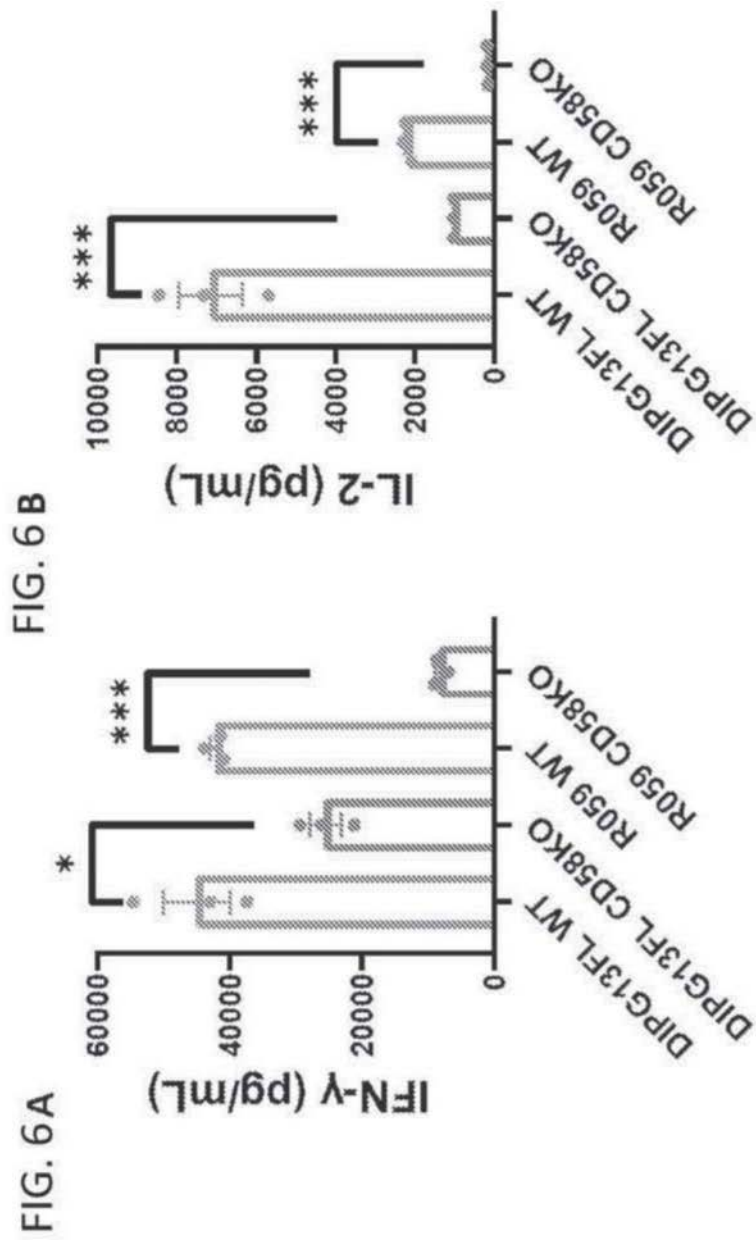


FIG. 7A

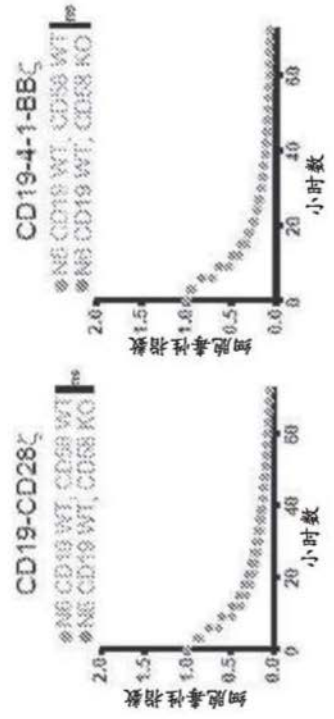


FIG. 7c

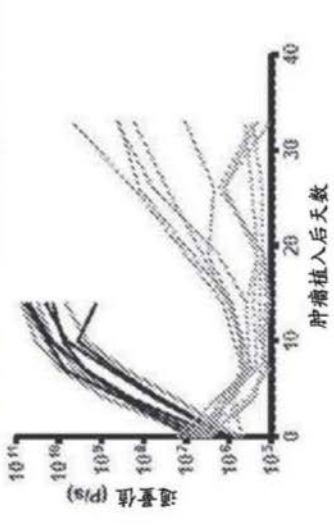
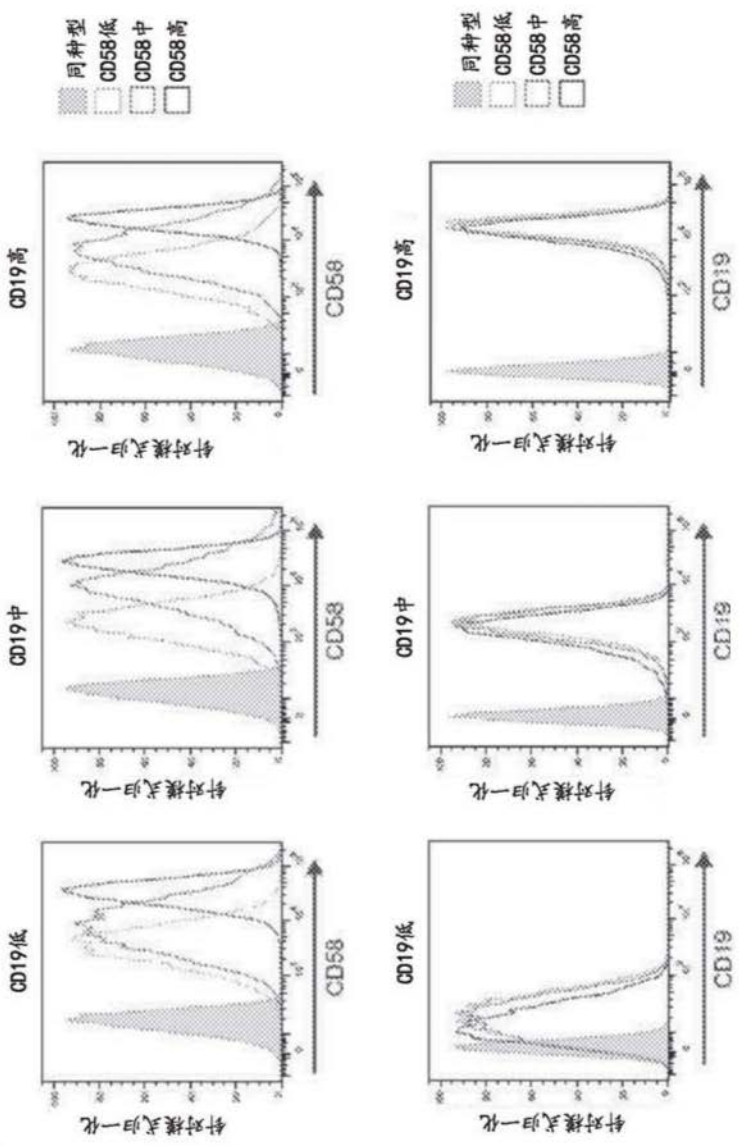


FIG. 7B



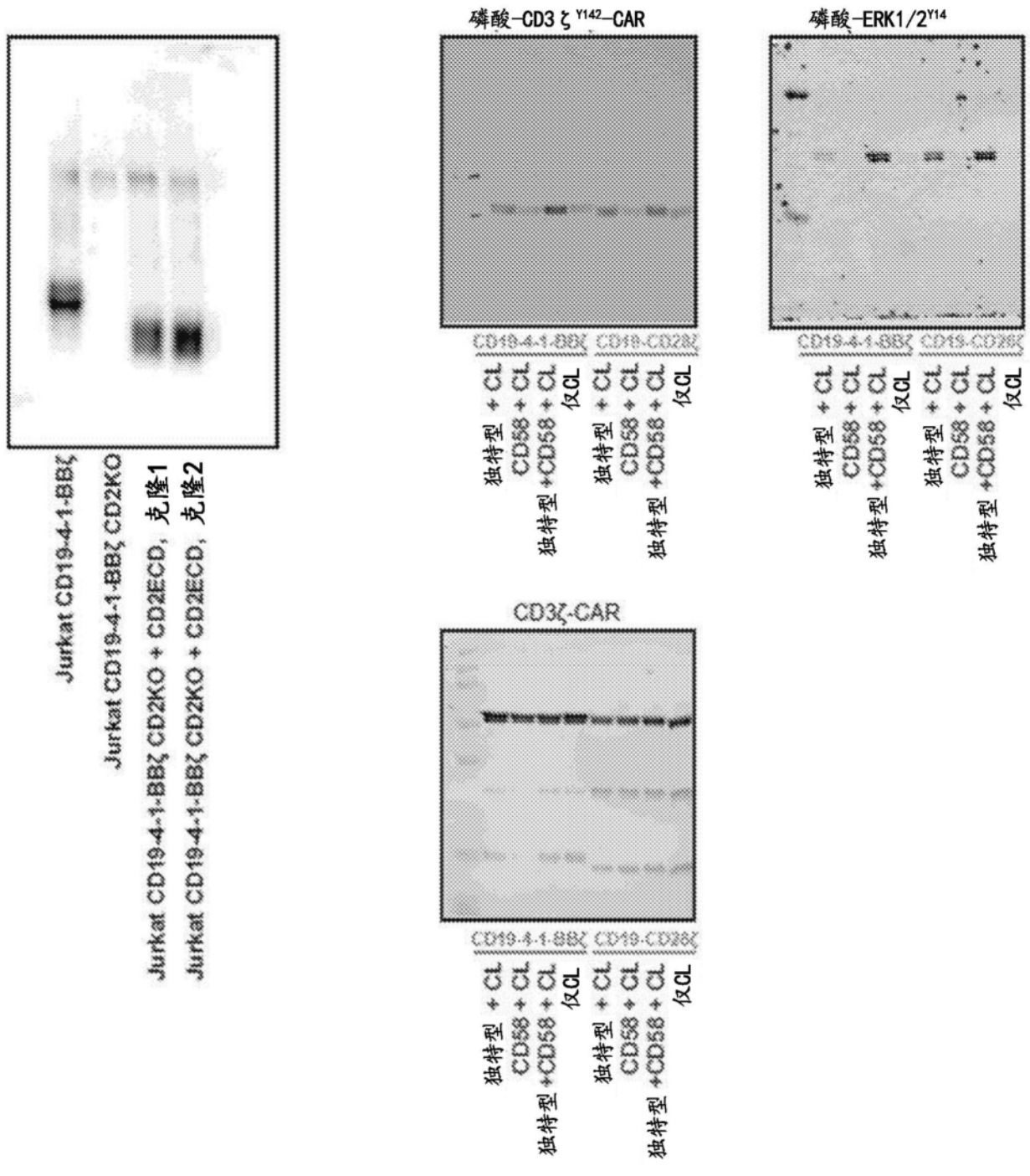


FIG. 8A

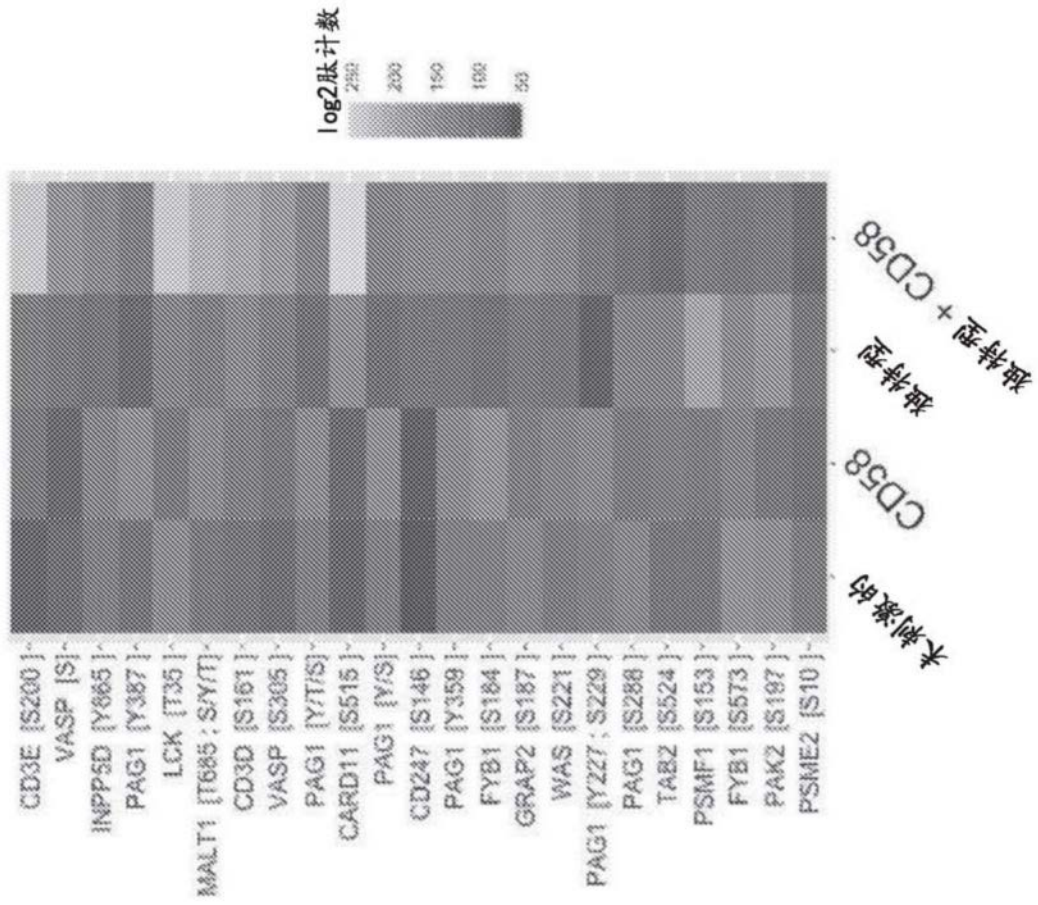


FIG. 8B