



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112166186 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 201980034713.0

(22) 申请日 2019.05.23

(30) 优先权数据

62/675,525 2018.05.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/033837 2019.05.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/226946 EN 2019.11.28

(71) 申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 达里奥·坎帕纳

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟海胜 宋琴芝

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书43页

序列表29页 附图8页

(54) 发明名称

用于T细胞恶性肿瘤的免疫治疗的嵌合抗原受体和CD2的基因编辑

(57) 摘要

本发明提供了包含嵌合抗原受体(CAR)例如抗CD2CAR的基因编辑的或基因沉默的免疫细胞。在一些实施方式中,这样的工程化免疫细胞缺乏CD2表达。另外,本文提供了在癌症疗法中使用此类细胞的方法。

1. 一种工程化免疫细胞,包括:
 - (i) 嵌合抗原受体 (CAR),所述嵌合抗原受体包含CD2靶向结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域;和
 - (ii) 对靶CD2核酸序列的基因改性以下调所述细胞中的内源性CD2表达。
2. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中,所述基因改性包括使用选自以下组成的组的体系进行基因组编辑:CRISPR/Cas、锌指核酸酶、TALEN和大范围核酸酶。
3. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中,所述基因改性包括使用选自以下组成的组的体系进行基因沉默:短发夹RNA、双链RNA、sdRNA、短抑制性RNA和微小RNA。
4. 根据权利要求2所述的工程化免疫细胞,其中,所述CRISPR/Cas体系包含对应于选自SEQ ID NO:44-47组成的组的核酸序列的引导RNA。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述CD2靶向结构域包含scFv,其包含具有与SEQ ID NO:18的至少90%的序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和具有与SEQ ID NO:19的至少90%的序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。
6. 根据权利要求1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述CD2靶向结构域包含scFv,其包含具有与SEQ ID NO:20的至少90%的序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和具有与SEQ ID NO:21的至少90%的序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述跨膜结构域包含CD8 α 的铰链-跨膜结构域。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述细胞内信号传导结构域包含选自以下组成的组中的一个或多个:4-1BB信号传导结构域,CD28信号传导结构域,OX40信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。
9. 根据权利要求1-8中任一项的工程化免疫细胞,其中,所述CAR是抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR,其包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%的序列同一性的氨基酸序列。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞诱导CD2⁺细胞的细胞毒性。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞以与相当的免疫细胞基本相等的速率增殖。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞是同种异体细胞。
13. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞是自体细胞。
14. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞是工程化T细胞。
15. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞是工程化 γ - δ T细胞。
16. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述工程化免疫细胞是工程化NK细胞。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的工程化免疫细胞,还包含阻断多肽,所述阻断多肽包含与细胞定位结构域的N末端连接的单链可变片段 (scFv),

其中,所述scFv结合细胞表面分子,其中,所述细胞定位结构域包含选自以下组成的组的氨基酸序列:内质网(ER)保留序列、高尔基保留序列和蛋白体定位序列,并且其中,所述阻断多肽保留在所述工程化细胞内并与所述工程化细胞内的内源性细胞表面分子结合。

18.根据权利要求17所述的工程化免疫细胞,其中,所述ER保留序列包含选自以下组成的组的氨基酸序列:KDEL (SEQ ID NO:24)、KKXX (SEQ ID NO:26)和KKMP (SEQ ID NO:27),其中,X是任何氨基酸;或所述高尔基保留序列选自以下组成的组:YGRL (SEQ ID NO:40)、YQRL (SEQ ID NO:41)、YKGL (SEQ ID NO:42)和YXXL (SEQ ID NO:43),其中,X是任何氨基酸。

19.根据权利要求17或18所述的工程化免疫细胞,其中,所述阻断多肽还包含连接在所述scFv和包含KKMP或KKTN的所述ER保留序列结构域或包含YGRL、YQRL、YKGL的所述高尔基保留序列结构域之间的跨膜结构域,其中,所述跨膜结构域是选自以下组成的组中的任何一个的跨膜结构域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B。

20.根据权利要求17-19中任一项所述的工程化免疫细胞,其中,所述跨膜结构域包含CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

21.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞或根据权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞的分离群体中的至少一种。

22.一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括对所述受试者给药有效治疗量的包含根据权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞的组合物,从而在有需要的受试者中治疗癌症。

23.根据权利要求22所述的方法,其中,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

24.根据权利要求22或23所述的方法,其中,所述癌症是T细胞恶性肿瘤或CD2相关癌症。

25.根据权利要求22-24中任一项所述的方法,其中,所述T细胞恶性肿瘤或所述CD2相关癌症选自以下组成的组:T细胞白血病T细胞淋巴瘤,T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL),早期T细胞祖细胞急性淋巴细胞白血病(ETP-ALL),T细胞幼淋巴细胞性白血病,T细胞大颗粒性淋巴细胞白血病,肠病相关性T细胞淋巴瘤,肝脾性T细胞淋巴瘤,皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),任何亚型CTCL,蕈样肉芽肿,Sézary综合征,原发性皮肤 γ - δ T细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(NHL)的T谱系亚群的恶性肿瘤,未做其他规定的外周T细胞淋巴瘤(PTCL)(PTCL-NOS)和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤,以及间变性大细胞淋巴瘤。

26.根据权利要求22-25中任一项所述的方法,其中,所述给药包括选自以下组成的组中的任何一个:静脉内输注、动脉内输注、腹膜内输注、直接注射到肿瘤中和/或外科手术后肿瘤床灌注、在肿瘤部位植入人工支架、或鞘内给药。

27.一种表达载体组合物,其包含表达载体,所述表达载体包含编码根据权利要求1-20中任一项所述的所述CAR的多核苷酸。

28.一种包含一个或多个表达载体的表达载体组合物,所述表达载体组合物包含与人CD2基因互补的引导RNA的多核苷酸和编码Cas蛋白的多核苷酸,其中,所述引导RNA的多核苷酸包含选自SEQ ID NO:44-47组成的组中的任何一个。

29.一种包含表达载体的表达载体组合物,所述表达载体包含编码根据权利要求17-20

中任一项所述的阻断多肽的多核苷酸。

30. 一种用于产生根据权利要求1-20中任一项所述的工程化免疫细胞的方法, 所述方法包括: 将根据权利要求27所述的表达载体组合物以及根据权利要求28所述的表达载体组合物引入免疫细胞。

31. 根据权利要求30所述的方法, 还包括将根据权利要求29所述的表达载体组合物引入所述免疫细胞。

32. 根据权利要求30或31所述的方法, 其中, 引入包括同时或顺序地将所述表达载体组合物引入所述免疫细胞。

用于T细胞恶性肿瘤的免疫治疗的嵌合抗原受体和CD2的基因 编辑

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年5月23日提交的美国临时申请号62/675,525的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表以ASCII格式以电子方式提交,并且在此以全文引用的方式并入。所述ASCII副本于2019年5月23日创建,被命名为“119419_5005_W0_SequenceListing_ST25.txt”,并且大小为44.0KB。

发明领域

[0005] 本文描述的本发明总体上涉及通过CD2基因改性而缺乏CD2表达的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)的临床有效群体。本发明还涉及此类CAR-T细胞在治疗T细胞恶性肿瘤中的用途。

背景技术

[0006] 基因工程化免疫细胞是癌症和自身免疫疾病的强有力的新疗法。用表达嵌合抗原受体(CAR)的T淋巴细胞进行的最近临床试验的结果已经令人信服地证明了此方法的效力。嵌合抗原受体(CAR)可以使免疫细胞重定向,以特异性识别并杀死肿瘤细胞。CAR是由经由跨膜结构域连接到信号传导分子的抗体单链可变区(scFv)构成的人工多分子蛋白质。当scFv接合其同源抗原时,会触发信号转导,导致肿瘤细胞被表达CAR的细胞毒性T淋巴细胞杀死(Eshhar Z、Waks T等人,《美国科学院院刊(PNAS USA)》,90(2):720-724,1993;Geiger TL等人,《免疫学杂志(J Immunol.)》,162(10):5931-5939,1999;Brentjens RJ等人,《自然医学(Nat Med.)》9(3):279-286,2003;Cooper LJ等人,《血液(Blood)》101(4):1637-1644,2003;Imai C等人,《白血病(Leukemia)》,18:676-684,2004)。用表达CAR的自体T淋巴细胞进行的临床试验在患有B细胞难治性白血病和淋巴瘤的患者中显示出正面反应(参见,例如,Ti11 BG等人,《血液》119(17):3940-3950,2012;Maude SL等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)》371(16):1507-1517,2014)。

[0007] 已经显示,对表面分子CD19具有特异性的CAR-T细胞在患有治疗难治性CD19阳性恶性肿瘤(如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤)的患者中诱导形态和分子缓解。其它恶性肿瘤可以受到针对不同抗原重定向的T细胞的攻击。因此,基因工程化细胞疗法在肿瘤学中的可能的应用是广泛的。

[0008] CAR-T细胞输注的最初临床经验也已经识别了可能会严重降低治疗效果并且阻碍发展的潜在的局限性。主要问题是从患有癌症的患者中收集的免疫细胞的、导致体内扩增和施加抗肿瘤作用的能力无法预测的可变适应性。这种可变性使最有效的细胞剂量的识别变得复杂,可能导致输注短寿命的且无效的细胞产品,并且最终可能阻止一致性“活性药物”的开发。使用来自健康供体的T淋巴细胞应提高有效性和一致性,但会带来移植物抗宿

主病 (GvHD) 的风险,所述GvHD是供体淋巴细胞输注的严重且潜在致命的后果。在这样的同种异体环境中,需要对注入的T细胞进行额外的改性以抑制其识别由不可缺少的细胞表达的组织抗原的能力。

[0009] 实用的基因编辑方法学的出现已经为可适用于癌症的细胞疗法的治疗性细胞工程学开辟了新的机遇。锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活因子样效应子核酸酶 (TALENs) 和成簇的规则间隔的短回文重复序列 (CRISPR) /CRISPR相关的 (Cas) 体系可用于删除编码导致T细胞缺乏同种异体反应性的TCR $\alpha\beta$ 链的基因,而其他基因可以靶向延迟排斥反应。使用TCR α 和CD52基因座的TALEN缺失连同抗CD19 CAR表达的报告表明,将CAR表达与基因编辑结合在临床环境中是可行的,但是这在技术上具有挑战性。

[0010] 总而言之,对于患有癌症和自身免疫性疾病的患者,迫切需要新的治疗选择。

发明内容

[0011] 一方面,本文提供了工程化免疫细胞,其包含CD2阻断多肽,靶CD2核酸序列的基因改性以及结合CD2的嵌合抗原受体 (CAR)。

[0012] 本发明描述了工程化免疫细胞,其包含:

[0013] (i) 嵌合抗原受体 (CAR),其包含CD2靶向结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域;和

[0014] (ii) 对靶CD2核酸序列的基因改性以下调所述细胞中的内源性CD2表达。

[0015] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞的基因改性包括使用选自由CRISPR/Cas、锌指核酸酶、TALEN和大范围核酸酶组成的组的体系进行基因组编辑。在一些情况下,CRISPR/Cas体系包含与选自由SEQ ID NO:44-47组成的组的核酸序列对应的引导RNA。

[0016] 在一些实施方式中,基因改性包括使用选自由短发夹RNA、双链RNA、sdRNA、短抑制RNA和微小RNA组成的组的体系进行基因沉默。

[0017] 在一些实施方式中,CD2靶向结构域包含scFv,其包含具有与SEQ ID NO:18的至少90%的序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和具有与SEQ ID NO:19的至少90%的序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。在一些实施方式中,CD2靶向结构域包含scFv,其包含具有与SEQ ID NO:20的至少90%的序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和具有与SEQ ID NO:21的至少90%的序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。

[0018] 在一些实施方式中,CAR的跨膜结构域包含CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

[0019] 在一些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含选自由以下组成的组的一个或多个:4-1BB信号传导结构域、CD28信号传导结构域、OX40信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0020] 在一些实施方式中,CAR是抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR,其包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%的序列同一性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞以与相当的免疫细胞基本相等的速率增殖。

[0022] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞以与相当的免疫细胞基本相等的速率增殖。在一些实施方式中,工程化免疫细胞是同种异体细胞。在某些实施方式中,工程化免疫细胞是自体细胞。在一些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞。在特定的实施方式中,工程化免疫细胞是工程化NK细胞。

[0023] 在一些实施方式中,本文所述的任何工程化免疫细胞还包含阻断多肽,所述阻断多肽包含连接至细胞定位结构域的N末端的单链可变片段(scFv),其中所述scFv结合至细胞表面分子,其中所述细胞定位结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:内质网(ER)保留序列、高尔基保留序列和蛋白体定位序列,并且其中,所述阻断多肽保留在所述工程化细胞内并结合所述工程化细胞内的内源性细胞表面分子。

[0024] 在一些实施方式中,阻断多肽的ER保留序列包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:KDEL (SEQ ID NO:24)、KKXX (SEQ ID NO:26) 和KKMP (SEQ ID NO:27),其中X是任何氨基酸;或所述高尔基保留序列选自由以下组成的组:YGRL (SEQ ID NO:40)、YQRL (SEQ ID NO:41)、YKGL (SEQ ID NO:42) 和YXXL (SEQ ID NO:43),其中X是任何氨基酸。

[0025] 在一些实施方式中,阻断多肽还包含连接在所述scFv和包含KKMP或KKTN的所述ER保留序列结构域或包含YGRL、YQRL、YKGL的所述高尔基保留序列结构域之间的跨膜结构域,其中所述跨膜结构域是选自由以下组成的组中的任何一个的跨膜结构域:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B。在一些实施方式中,跨膜结构域包含CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含至少一种本文所述的工程化免疫细胞中的至少一种。在一些实施方式中,药物组合物包含本文概述的任何一种工程化免疫细胞的分离群体。

[0027] 在另一方面,本发明提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的包含本文所述的任何一种工程化免疫细胞的组合物,从而在有此需要的受试者中治疗癌症。在一些实施方式中,该方法包括给药本文所述的工程化免疫细胞的群体的治疗组合物。

[0028] 在一些实施方式中,该组合物还包含药学上可接受的载体。换句话说,本文提供了一种药物组合物,其包含至少一种本文所述的工程化免疫细胞。在某些情况下,药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0029] 在一些实施方式中,所述癌症是T细胞恶性肿瘤或CD2相关癌症。在一些实施方式中,T细胞恶性肿瘤或CD2相关癌症选自由以下组成的组:T细胞白血病T细胞淋巴瘤,T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL),早期T细胞祖细胞急性淋巴细胞白血病(ETP-ALL),T细胞幼淋巴细胞性白血病,T细胞大颗粒性淋巴细胞白血病,肠病相关T细胞淋巴瘤,肝脾性T细胞淋巴瘤,皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),CTCL的任何亚型,蕈样肉芽肿,Sézary综合征,原发性皮肤 γ - δ T细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(NHL)的T谱系亚群的恶性肿瘤,外周T细胞淋巴瘤(PTCL),未做其他规定的PTCL(PTCL-NOS),血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤,以及间变性大细胞淋巴瘤。

[0030] 在一些实施方式中,给药是通过选自由以下组成的组中的任何一种来进行的:静脉内输注、动脉内输注、腹膜内输注、直接注射到肿瘤中和/或手术后灌注肿瘤床、在肿瘤部位植入人工支架、或鞘内给药。

[0031] 本文提供表达载体组合物,其包含表达载体,所述表达载体包含编码本文概述的任何一种CAR的多核苷酸。

[0032] 本文还提供了表达载体,其包含编码与人CD2基因互补的CRISPR引导RNA的多核苷酸,其中所述多核苷酸对应于选自由SEQ ID NO:44-47组成的组的核酸序列。

[0033] 在一些实施方式中,本文提供了表达载体组合物,其包含表达载体,该表达载体包含编码本文概述的任何一种阻断多肽的多核苷酸。

[0034] 一方面,本发明描述了一种产生实施方式中任一项的工程化免疫细胞的方法。此类方法包括:将包含编码CAR的多核苷酸的表达载体(或表达载体组合物)和包含编码一个或多个CRISPR向导RNA的一种或多种多核苷酸的表达载体(或表达载体组合物)引入免疫细胞。在一些实施方式中,该方法还包括引入包含编码阻断多肽的多核苷酸的表达载体(或表达载体组合物)。在一些实施方式中,引入包括伴随或顺序地将表达载体或表达载体组合物引入所述免疫细胞中。

[0035] 本发明提供了一种简单有效的阻断表面受体表达的方法。命名为蛋白表达阻断剂(PEBL)的特定构建体防止靶蛋白向细胞膜转运。PEBL构建体可以很容易地与基因改性构建体结合,并可以并入现有的大规模cGMP级方案中,用于离体细胞处理以优化免疫细胞的功能。

附图说明

[0036] 图1描绘了本文所述的示例性抗CD2嵌合抗原受体(CAR)构建体的示意图。

[0037] 图2说明抗CD2CAR在白血病细胞中的表达。抗CD2CAR包含基于抗CD2单克隆抗体9.6的抗CD2scFv。9.6的详细描述可以在例如Kamoun等人《实验医学杂志(J Exp Med)》,1981,153:207-212中找到。用包含CAR构建体和GFP或仅GFP(“模拟”)的载体转导细胞。流式细胞仪点图说明了抗CD2CAR表达。使用了抗山羊抗小鼠抗体APC(GAM-APC)。

[0038] 9.6和9-1抗CD2单克隆抗体的详细描述分别可以在例如Kamoun等人J《实验医学杂志(J Exp Med)》,1981,153:207-212和Bernard等人《白细胞分型II》,1986年编辑.Reinherz,E.L.,Haynes,B.F.,Nadler,L.M.,&Bernstein,I.D.(Springer,纽约),第53-66页中找到。

[0039] 图3显示在存在CD2+靶细胞的情况下抗CD2CAR的表达诱导了活化标志物的表达。条形图显示当存在表达9.6抗CD2 CAR的细胞时,CCRF-CEM细胞系的CD25+细胞和CD69+细胞数量增加。

[0040] 图4显示了9.6抗CD2CAR构建体在T细胞上的表达。用包含CAR构建体和GFP或仅GFP的载体(“模拟”)转导T细胞。流式细胞仪点图说明了抗CD2 CAR表达。使用了抗山羊抗小鼠抗体APC(GAM-APC)。

[0041] 图5显示了9.6抗CD2CAR表达T细胞对靶细胞(CD2+靶细胞)的细胞毒性活性。在共培养实验中显示了用抗CD2 scFv-41BB-CD3ζCAR mRNA或仅GFP mRNA电穿孔的CAR或模拟转导的T细胞的细胞毒性。将CAR T细胞和靶标以1:1的效应子与靶标比率(E:T)铺板。共培养几天后,确定了活靶细胞的数量。条形图显示9.6抗CD2 CAR T细胞对CD2+靶细胞产生了细胞毒性。CD107a代表刺激和NK细胞功能活性后CD8+T细胞脱粒的标记。条形图显示,与仅使用GFP相比,表达9.6抗CD2 CAR的CD107a+细胞百分比更高。

[0042] 图6提供了本文所述的抗CD2蛋白表达阻断剂(PEBL)构建体的示例性实施方式。9.6PEBL I构建体包括:CD8α信号肽;9.6抗CD2 scFv,其包含通过接头与VH结构域连接的VL结构域;和ER保留结构域。9.6PEBL II构建体包括:CD8α信号肽;9.6抗CD2 scFv,其包含通过接头与VH结构域连接的VL结构域;CD8α铰链跨膜结构域;和ER保留结构域。9-1PEBL I构

建体包括:CD8 α 信号肽;9-1抗CD2 scFv,其包含通过接头与VH结构域连接的VL结构域;和ER保留结构域。9-1PEBL II构建体包括:CD8 α 信号肽;9-1抗CD2 scFv,其包含通过接头与VH结构域连接的VL结构域;CD8 α 铰链跨膜结构域;和ER保留结构域。

[0043] 9.6抗CD2单克隆抗体和9-1抗CD2单克隆抗体的详细描述分别可以在例如Kamoun等人J Exp Med,1981,153:207-212以及Bernard等人在《白细胞分型II》1986年编辑.Reinherz,E.L.,Haynes,B.F.,Nadler,L.M.,&Bernstein,I.D. (Springer,纽约),第53-66页中找到。9.6scFv识别并结合静止和活化T细胞上的CD2。它还抑制(阻断)CD58与CD2的结合。9-1scFv识别并结合活化T细胞上的CD2。它不会阻止CD58与CD2结合。

[0044] 图7显示了用9.6抗CD2 PEBL I、9.6抗CD2 PEBL II、9-1抗CD2 PEBL I、9-1抗CD2 PEBL II或仅GFP(“模拟”)转导的白血病细胞中CD2的表面和细胞内表达的流式细胞仪直方图。9.6抗CD2 PEBL II构建体在白血病细胞中的表达下调了CD2的表达。

[0045] 图8显示了用9.6抗CD2 PEBL II构建体电穿孔的T细胞中CD2的表面表达的流式细胞仪点图。数据显示电穿孔的T细胞对CD2表达的下调(部分下调)。

[0046] 图9示出了工程化白血病细胞中CD2的表面和细胞内表达的流式细胞仪直方图,所述工程化白血病细胞已经进行了基于CRISPR/Cas9的CD2基因座的基因组编辑并表达了9.6抗CD2 PEBL II构建体。

[0047] 图10显示了白血病细胞中的CD2切割产物,该产物已经进行了基于CRISPR/Cas9的CD2基因座的基因组编辑。

[0048] 图11显示了如通过流式细胞仪确定的,CD2在转导的白血病细胞上的表达。用指定的慢病毒在MOI 1或5转导白血病细胞,并在转导后8天通过流式细胞仪分析CD2的表达。

具体实施方式

[0049] 以下是对本发明的示例实施方式的描述。

[0050] I. 简介

[0051] 本发明提供了一种方法,该方法允许快速有效地下调包括CAR-T细胞在内的T细胞中的表面分子。在本发明的一个实施方式中,提供了CD2 Δ CD2CAR-T细胞,其是不通过基因改性(例如,基因编辑或基因沉默)表达CD2的CD2特异性CAR-T细胞。在一些实施方式中,CD2 Δ CD2CAR-T细胞还表达本文概述的PEBL构建体,其阻断另一细胞表面分子或分泌的分子例如但不限于细胞因子的表达。通过基因改性进行的CD2阻断是持久的,并且不会影响其他表面分子的表达。CD2 Δ CD2CAR-T细胞以及包括CD2 CAR-T细胞在内的相当的T细胞都可以存活和增殖。

[0052] II. 定义

[0053] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们处于本领域的技术范围内。文献中对这样的技术进行了充分的解释。参见,例如,《分子生物学的当前方案》(Frederick M.AUSUBEL,2000,Wiley and son Inc,美国国会图书馆);《分子克隆:实验室手册》,第三版,(Sambrook等人,2001,Cold Spring Harbor,纽约:Cold Spring Harbor Laboratory Press);《寡核苷酸合成》(M.J.Gait编辑,1984);Mullis等人,美国专利号4,683,195;《核酸杂交》(B.D.Harries&S.J.Higgins编辑,1984);《转录和翻译》(B.D.Hames&S.J.Higgins编

辑,1984);《动物细胞培养》(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);《固定化的细胞和酶》(IRL Press,1986);B.Perbal,《分子克隆实用指南》(1984);系列;《酶学方法》系列(J.Abelson和M.Simon,主编,Academic Press,Inc,纽约),特别是第154和155卷(Wu等人编辑)和第185卷,“基因表达技术”(D.Goeddel编辑);《哺乳动物细胞的基因转移载体》(J.H.Miller和M.P.Calos编辑,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》(Mayer和Walker编辑,Academic Press,伦敦,1987);《实验免疫学手册》,第I至IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1986);以及《操纵小鼠胚胎》(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,纽约,1986)。

[0054] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如在本申请中使用的,除非本文另有明确规定,否则以下每个术语应具有以下阐述的含义。在整个申请中阐述了附加的定义。

[0055] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。例如,《生物医学和分子生物学简明词典》,Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC Press;《细胞和分子生物学词典》,第3版,1999年,学术出版社;和《牛津生物化学和分子生物学词典》,2000年修订,牛津大学出版社,提供了本公开中使用的许多术语的通用词典中的一项技能。

[0056] 应该理解的是,无论在何处用语言“包括”来描述方面,都还提供了以“由...组成”和/或“基本上由...组成”描述的类似方面。

[0057] “工程化免疫细胞”是指与天然存在的免疫细胞相比已经被基因改性的免疫细胞。

[0058] 如本文所用,术语“核酸”是指包括多个核苷酸单体(例如,核糖核苷酸单体或脱氧核糖核苷酸单体)的聚合物。“核酸”包含例如基因组DNA、cDNA、RNA和DNA-RNA杂交分子。核酸分子可以是天然存在的、重组的或合成的。另外,核酸分子可以是单链的、双链的或三链的。在一些实施方式中,核酸分子可以被改性。在双链聚合物的情况下,“核酸”可以指代分子的任一条或两条链。

[0059] 关于核酸的术语“核苷酸序列”是指通过共价连接,如磷连接(例如,磷酸二酯、烷基和芳基磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸三酯键)和/或非磷连接(例如,肽和/或氨基磺酸酯键)连接的连续核苷酸系列。在某些实施方式中,编码例如连接到定位结构域的靶结合分子的核苷酸序列是异源序列(例如,具有不同物种或细胞类型起源的基因)。

[0060] 术语“核苷酸”和“核苷酸单体”是指天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体,以及其非天然存在的衍生物和类似物。因此,核苷酸可以包含例如包括天然存在的碱基的核苷酸(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、肌苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷或脱氧胞苷)和包括本领域已知的经过改性的碱基的核苷酸。

[0061] 如本领域的技术人员应了解的,在一些方面,核酸进一步包括质粒序列。质粒序列可以包含例如,选自由以下组成的组的一种或多种序列:启动子序列、选择标记序列和基因座靶向序列。

[0062] 如本文所用,有时将编码与定位结构域连接的靶结合分子的基因称为“编码PEBL的基因”、“编码PEBL的多核苷酸”、“编码PEBL的核酸”等。

[0063] 在某些实施方式中,靶结合分子是抗体或其抗原结合片段。如本文所用,“抗体”意指完整抗体或抗体的抗原结合片段,其包含已经被改性或工程化的完整的抗体或抗原结合

片段,或者是人抗体。已经被改性或工程化的抗体的实例是嵌合抗体、人源化抗体、多互补位抗体(例如,双互补位抗体)和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗原结合片段的实例包含Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体(例如,scFv)、微抗体和双抗体。

[0064] “双抗体”是具有两个抗原结合位点的小抗体片段。所述片段包括连接到同一多肽链(V_H-V_L或V_L-V_H)中的轻链可变区(V_L)的重链可变区(V_H)。通过使用太短以至于不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头,结构域被迫使与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双抗体描述于例如专利文件EP 404,097;WO 93/11161;以及Holliger等人,(1993)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》90:6444-6448。

[0065] 在某些实施方式中,抗体是三抗体或四抗体。设计和产生三抗体和四抗体的方法是本领域已知的。参见例如,Todorovska等人,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》,248(1-2):47-66,2001。

[0066] “结构域抗体片段”是仅含有重链的可变区或轻链的可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在一些情况下,两个或更多个V_H区与肽接头共价连接以产生二价结构域抗体片段。二价结构域抗体片段的两个V_H区可以靶向相同或不同的抗原。

[0067] 在一些实施方式中,抗体是经过改性的或工程化的。经过改性的或工程化的抗体的实例包含嵌合抗体、多互补位抗体(例如,双互补位抗体)和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0068] 如本文所用,“多互补位抗体”意指包括至少两种单结构域抗体的抗体,其中至少一种单结构域抗体针对抗原上的第一抗原决定簇,并且至少一种其它单结构域抗体针对同一抗原上的第二抗原决定簇。因此,例如,“双互补位”抗体包括针对抗原上的第一抗原决定簇的至少一种单结构域抗体和针对同一抗原上的第二抗原决定簇的至少一种另外的单结构域抗体。

[0069] 如本文所用,“多特异性抗体”意指包括至少两种单结构域抗体的抗体,其中至少一种单结构域抗体针对第一抗原,并且至少一种其它单结构域抗体针对第二抗原(不同于第一抗原)。因此,例如,“双特异性”抗体是包括针对第一抗原的至少一种单结构域抗体和针对第二抗原(例如,不同于第一抗原)的至少一种另外的单结构域抗体的抗体。

[0070] 在一些实施方式中,本文所公开的抗体是单克隆抗体,例如,鼠单克隆抗体。产生单克隆抗体的方法是本领域已知的。参见例如,Pluckthun(1994),《单克隆抗体药理学》,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,纽约,第269-315页。

[0071] “Fab片段”包括一条轻链以及一条重链的CH1和可变区。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0072] “Fc”区含有两个重链片段,所述重链片段包括抗体的CH2结构域和CH3结构域。两个重链片段由两个或更多个二硫键并且通过CH3结构域的疏水相互作用保持在一起。

[0073] “Fab'片段”含有一条轻链和一条重链的一部分,使得可以在两个Fab'片段的二条重链之间形成链间二硫键,以形成F(ab')₂分子,所述一条重链的一部分含有V_H结构域和CH1结构域以及还含有位于CH1结构域与CH2结构域之间的区。

[0074] “F(ab')₂片段”含有二条轻链和二条重链,使得在二条重链之间形成链间二硫键,所述二条重链含有位于C_H1结构域与C_H2结构域之间的恒定区的一部分。因此,F(ab')₂片段由两个Fab'片段构成,所述两个Fab'片段由位于二条重链之间的二硫键保持在一起。

[0075] “Fv区”包括来自重链和轻链两者的可变区,但是缺乏恒定区。

[0076] 在特定实施方式中,靶结合分子是单链Fv抗体(“scFv抗体”)。scFv是指包括抗体的VH结构域和VL结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单多肽链中。通常,Fv多肽进一步包括位于VH结构域与VL结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使scFv能够形成用于抗原结合的所需的结构。对于scFv的综述,参见Pluckthun(1994),《单克隆抗体药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第113卷,Rosenburg和Moore编辑, Springer-Verlag,纽约,第269-315页。还参见PCT公开第W0 88/01649号以及美国专利第4,946,778号和第5,260,203号。

[0077] 术语“序列同一性”意指两个核苷酸或氨基酸序列在如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT最佳对准时共享至少例如70%的序列同一性、或至少80%的序列同一性、或至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少90%的序列同一性或更高。为了进行序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列(例如,亲本序列)。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机,指定子序列坐标(如有必要),并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于所指定的程序参数,计算一个或多个测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0078] 用于比较的序列的最佳对准可以通过以下来进行:例如,Smith&Waterman的局部同源算法,《应用数学进展(Adv. Appl. Math.)》2:482(1981);Needleman和Wunsch的同源对准算法,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》48:443(1970);Pearson&Lipman的相似性搜索法,《美国国家科学院院刊(Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA)》,85:2444(1988);这些算法的计算机化实施方式(威斯康星州麦迪逊科学大道575号基因学计算机组(Genetics Computer Group)的威斯康星基因学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或视觉检查(通常参见Ausubel等人,《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》)。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,所述BLAST算法描述于Altschul等人,《分子生物学杂志》,215:403(1990)。用于执行BLAST分析的软件可以通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得(通过NCBI国立卫生研究院(National Institutes of Health NCBI)的互联网服务器公开获得)。通常,可以使用默认程序参数来执行序列比较,但是也可以使用自定义参数。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用作为默认的字长(W)3、期望值(E)10和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff,《美国国家科学院院刊》89:10915(1989))。

[0079] 如本文所用,在PEBL基因的环境中“可操作地连接”是指在与编码一个或多个定位结构域的一个或多个基因相邻的框中(例如,没有接头)直接编码靶结合分子的基因。可替代地,可以通过如本文所描述的接头序列将编码靶结合分子的基因连接到编码一个或多个定位结构域的一个或多个基因。

[0080] 如本文所用,在蛋白的环境中“连接”是指将第一结构域(例如,靶结合分子)连接到第二结构域(例如,定位结构域)。接头可以是氨基酸序列。本领域已知的各种适合的接头可以用于将靶结合分子拴系到定位结构域。例如,可以根据本发明使用非天然存在的肽,如由不同长度的亲水残基组成的多肽或(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)多肽,其中n是包含例如3-12的整数。

[0081] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指

以根据临床上可接受的标准改进医疗病症的程度使医疗病症(例如,与T细胞恶性肿瘤有关的病症)产生反作用。

[0082] 如本文所用,“受试者”是指哺乳动物(例如,人、非人的灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠)。在某些实施方式中,所述受试者是人。“其有需要的受试者”是指患有或处于发展中的疾病或风险中的可通过诱导T细胞对恶性T细胞的细胞毒性发挥特异性作用而被治疗(例如,改善、改进、预防)的受试者(例如患者)。

[0083] 如本文所定义,“治疗有效量”是在当向受试者给药时足以在给药条件下在受试者中实现所期望的治疗效果(治疗与T细胞恶性肿瘤相关的病症)的量。待给药的药剂的有效量可以由本领域的普通临床医师使用本文提供的引导和本领域已知的其它方法来确定,并且取决于若干个因素,所述因素包含,例如,所选择的特定药剂、受试者的年龄、敏感性、对药物的耐受性和总体健康状况。

[0084] 如本文所用,“增强的治疗功效”是指以下中的一种或多种:宿主中减少的移植物抗宿主疾病(GvHD);减少或消除宿主的排斥;延长宿主的存活率;降低宿主对肿瘤的抑制作用;降低宿主的自我杀伤力;降低宿主的炎症级联反应;或者在宿主中持续进行了CAR介导的信号转导。

[0085] III. 蛋白质表达阻断剂

[0086] 本文所述的方法能够快速去除或灭活特定靶蛋白,例如细胞表面分子或分泌的分子。该方法部分地依赖于多肽构建体,该多肽构建体包含与待去除、中和或阻断的靶标(例如蛋白质)结合的靶结合分子。靶结合分子与结构域(例如定位结构域或细胞内保留结构域)连接,该结构域将多肽引导至特定的细胞区室,例如高尔基、内质网、蛋白酶体或细胞膜,这取决于应用。为了简单起见,有时将与定位结构域连接的靶结合分子称为“蛋白质表达阻断剂”或“PEBL”。在一些实施方式中,PEBL还包括信号肽结构域。在其他实施方式中,PEBL包含跨膜结构域或细胞定位结构域包括跨膜结构域。

[0087] 在一些实施方式中,PEBL结合选自细胞表面分子或分泌分子的靶分子。在一些情况下,靶分子是细胞因子,例如但不限于IL-6、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-27、IL-35、干扰素(IFN)- γ 、IFN- β 、IFN- α 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和转化生长因子(TGF)- β 。在某些情况下,靶分子是在免疫细胞例如T细胞上表达的CD蛋白(CD抗原)。在一些实施方式中,CD蛋白选自由以下组成的组:CD1b,CD1c,CD1d,CD3d,CD3e,CD4,CD7,CD8,CD11,CD13,CD16b,CD25,CD26,CD27,CD28,CD30,CD33,CD34,CD38,CD39,CD40,CD44,CD45,CD48,CD56,CD58,CD59,CD62L,CD66a,CD69,CD70,CD80,CD83,CD85,CD86,CD86,CD95,CD96,CD99,CD100,CD102,CD103,CD107a,CD107b,CD111,CD112,CD117,CD119,CD122,CD126,CD127,CD132,CD134,CD137,CD150,CD152,CD153,CD154,CD155,CD158,CD160,CD161,CD178,CD183,CD185,CD191,CD192,CD196,CD212,CD215,CD218,CD223,CD226,CD244,CD252,CD253,CD275,CD278,CD279,CD281,CD282,CD283,CD284,CD286,CD305,CD314,CD336,CD337,CD355和CD360。

[0088] PEBL的非限制性实例在图6中示出,并且示例性氨基酸和核酸序列在表1中提供。

[0089] 表1. PEBL、CAR及其组分的序列。

[0090]

名称	SEQ ID NO:	序列
9-1 PEBL I	SEQ ID NO: 1	MALPVTALLLPLALLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVS LSCRASQSISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRF SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGT KLELRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGTELVRPGSSV KLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDS ETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYC SRSPRDSSTNLADWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGSAEKDEL

[0091]

9-1 PEBL II	SEQ ID NO: 2	MALPVTALLLPLALLLHAARPIVMTQSPATLSVTPGDRVS LSCRASQISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRF SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGT KLELRGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGTELVRPGSSV KLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDS ETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYC SRSPRDSSTNLADWGQGTLLTVSSKPTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKKMP
9.6 PEBL I	SEQ ID NO: 3	MALPVTALLLPLALLLHAARNIMMTQSPSSLAVSAGEK VTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAVYYCHQ YLSSHTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQLQQPGA ELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWI GNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTS EDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGG GSGGGGSGGGGSAEKDEL
9.6 PEBL II	SEQ ID NO: 4	MALPVTALLLPLALLLHAARNIMMTQSPSSLAVSAGEK VTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAVYYCHQ YLSSHTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQLQQPGA ELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWI GNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTS EDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSTVTVSSKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYKYKSRRSFIEEKKMP
9.6 抗 CD2 CAR	SEQ ID NO: 5	MALPVTALLLPLALLLHAARNIMMTQSPSSLAVSAGEK VTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAVYYCHQ YLSSHTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQLQQPGA ELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWI GNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTS EDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSTVTVSSTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
9-1 PEBL I	SEQ ID NO: 6	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCGTGACCGCCC TGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGC CCAATCGTGATGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGT

[0092]

		GACACCTGGCGACCGGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGCCT CCCAGTCTATCAGCGATTACCTGCACTGGTATCAGCAGA AGTCCCACGAGTCTCCCCGGCTGCTGATCAAGTACGCT AGCCAGTCTATCAGCGGCATCCCTAGCCGGTTCTCCGG ATCTGGAAGCGGATCCGACTTTACCCTGAGCATCAACT CCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCCAG AATGGCCACTCCTTCCCCCTGACCTTTGGCGCCGGCAC AAAGCTGGAGCTGCGGAGAGGCGGGCGGCGGCTCTGGA GGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCAGGAACAGAGCTGGTGC GGCCCCGGCA GCTCCGTGAAGCTGTCCTGTAAGGCCTCTGGCTACACC TTCACAAGCTATTGGGTGAACTGGGTGAAGCAGAGGCC TGACCAGGGCCTGGAGTGGATCGGAAGGATCGACCCAT ACGATTCTGAGACACACTATAACCAGAAGTTTACAGAC AAGGCCATCAGCACCATCGATACATCTAGCAATACCGCC TATATGCAGCTGTCCACCCTGACATCTGATGCCAGCGCC GTGTACTATTGTTCTAGGAGCCCTCGCGACTCCTCTACA AATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGT GAGCTCCGGTGGTGGCGGCAGTGGTGGCGGTGGCTCA GGCGGTGGTGGCTCCGGTGGCGGTGGCTCTGCAGAAA AAGATGAGTTGTAACTCGAG
9-1 PEBL II	SEQ ID NO: 7	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCGTGACCGCCC TGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCG CCAATCGTGATGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGT GACACCTGGCGACCGGGTGTCTCTGAGCTGCAGAGCCT CCCAGTCTATCAGCGATTACCTGCACTGGTATCAGCAGA AGTCCCACGAGTCTCCCCGGCTGCTGATCAAGTACGCT AGCCAGTCTATCAGCGGCATCCCTAGCCGGTTCTCCGG ATCTGGAAGCGGATCCGACTTTACCCTGAGCATCAACT CCGTGGAGCCAGAGGATGTGGGCGTGTACTATTGCCAG AATGGCCACTCCTTCCCCCTGACCTTTGGCGCCGGCAC AAAGCTGGAGCTGCGGAGAGGCGGGCGGCGGCTCTGGA GGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCAGGAACAGAGCTGGTGC GGCCCCGGCA GCTCCGTGAAGCTGTCCTGTAAGGCCTCTGGCTACACC TTCACAAGCTATTGGGTGAACTGGGTGAAGCAGAGGCC TGACCAGGGCCTGGAGTGGATCGGAAGGATCGACCCAT ACGATTCTGAGACACACTATAACCAGAAGTTTACAGAC AAGGCCATCAGCACCATCGATACATCTAGCAATACCGCC TATATGCAGCTGTCCACCCTGACATCTGATGCCAGCGCC GTGTACTATTGTTCTAGGAGCCCTCGCGACTCCTCTACA AATCTGGCAGATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGT GAGCTCCAAGCCAACCACAACCCCTGCACCAAGGCCA

[0093]

		CCTACACCAGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCACTGTC CCTGAGGCCAGAGGCATGTAGGCCTGCAGCAGGAGGC GCCGTGCACACACGCGGCCTGGACTTTGCCTGCGATAT CTACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGC TGCTGCTGAGCCTGGTGATTACCCTGTATAAGTACAAGT CCAGACGCTCATTGAGGAAAAGAAAATGCCTTAA CTCGAG
9.6 PEBL I	SEQ ID NO: 8	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCC TGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCG CCAAACATCATGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGGC CGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAAGT CTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCT AAGCTGCTGATCTATTGGGCAAGCACCCGGGAGTCCGG AGTGCCAGACAGATTACCGGAAGCGGATCCGGAACA GACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGA CCTGGCCGTGTACTATTGCCACCAGTACCTGTCTAGCCA CACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGG GGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCG GCGGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGT GAGGCCCGGCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAGGCCA GCGGCTACACCTTCACAAGGTATTGGATCCACTGGGTG AAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAA CATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGA AGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGATAAGAG CTCCGGCACCGCCTATATGCAGCTGTCTAGCCTGACATC CGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCACAGAGGATC TGTAATATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCC GTGACAGTGTCTCTGGTGGTGGCGGCAAGTGGTGGCG GTGGCTCAGGCGGTGGTGGCTCCGGTGGCGGTGGCTCT GCAGAAAAAGATGAGTTGTAACCTCGAG
9.6 PEBL II	SEQ ID NO: 9	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCTGACCGCCC TGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCCG CCAAACATCATGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGGC CGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAAGT CTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCT AAGCTGCTGATCTATTGGGCAAGCACCCGGGAGTCCGG AGTGCCAGACAGATTACCGGAAGCGGATCCGGAACA GACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGA CCTGGCCGTGTACTATTGCCACCAGTACCTGTCTAGCCA CACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGG GGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCG

[0094]

		GCGGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGT GAGGCCCCGGCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAGGCCA GCGGCTACACCTTCACAAGGTATTGGATCCACTGGGTG AAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAA CATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGA AGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGATAAGAG CTCCGGCACCGCCTATATGCAGCTGTCTAGCCTGACATC CGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCACAGAGGATC TGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCC GTGACAGTGTCTCTAAGCCAACCACAACCCCTGCACC AAGGCCACCTACACCAGCACCTACCATCGCAAGCCAGC CACTGTCCCTGAGGCCAGAGGCATGTAGGCCTGCAGCA GGAGGCGCCGTGCACACACGCGGCCTGGACTTTGCCT GCGATATCTACATCTGGGCACCACTGGCAGGAACCTGT GGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATTACCCTGTATAAG TACAAGTCCAGACGCTCATTGAGGAAAAGAAAAT GCCTTAACCTCGAG
9.6 抗 CD2 CAR	SEQ ID NO: 10	GAATTCGGCTTCCACCATGGCTCTGCCCCGTGACCGCCC TGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCCCGC CCAAACATCATGATGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGGC CGTGTCTGCCGGAGAGAAGGTGACCATGACATGCAAGT CTAGCCAGTCCGTGCTGTACTCCTCTAACCAGAAGAATT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCT AAGCTGCTGATCTATTGGGCAAGCACCCGGGAGTCCGG AGTGCCAGACAGATTACCGGAAGCGGATCCGGAACA GACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGA CCTGGCCGTGTACTATTGCCACCAGTACCTGTCTAGCCA CACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGG GGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGCG GCGGCAGCCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGT GAGGCCCCGGCTCCTCTGTGAAGCTGTCTTGTAAGGCCA GCGGCTACACCTTCACAAGGTATTGGATCCACTGGGTG AAGCAGCGCCCTATCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAA CATCGACCCATCTGATAGCGAGACACACTACAATCAGA AGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGATAAGAG CTCCGGCACCGCCTATATGCAGCTGTCTAGCCTGACATC CGAGGACTCTGCCGTGTACTATTGTGCCACAGAGGATC TGTACTATGCCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCTCC GTGACAGTGTCTCTACCACTACACCTGCACCAAGGCC TCCACACCCGCTCCCACTATCGCTTCCCAGCCACTGTC CCTGAGGCCCCAGGCCTGCAGGCCAGCAGCTGGCGGA GCCGTGCATACTAGGGGGCTGGACTTCGCTTGCGACAT CTACATCTGGGCCCCACTGGCAGGGACATGCGGAGTCC

[0095]

		TGCTGCTGTCCCTGGTCATCACACTGTACTGCAAGCGG GGGCGCAAAAACTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCTTTC ATGAGACCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAAGATGGGT GCTCATGCCGGTTTCCCGAGGAGGAGGAAGGCGGCTG CGAGCTGAGGGTGAAGTTTCCCGCTCAGCAGATGCTC CTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAATGAG CTGAACCTGGGCAGACGCGAAGAGTATGATGTGCTGGA CAAAAGGCGGGGAAGAGACCCCGAAATGGGAGGGAA GCCAAGGCGGAAAAACCCCGAGGAGGGCCTGTACAAT GAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAGGCTTACAGTG AGATTGGGATGAAGGGAGAGAGACGGAGGGGAAAAG GGCACGATGGCCTGTACCAGGGGCTGAGCACAGCAAC CAAAGATACTTATGACGCACTGCACATGCAGGCACTGC CACCCAGATGACAGCCAGGGGATTCACCACTCAAAGG CCAGACCTGCAGACGCCAGATTATGAGACACACTCGA G
CD8 信号肽	SEQ ID NO: 11	MALPVTALLLPLALLHAARP
VL-VH 接头	SEQ ID NO: 12	GGGSGGGSGGGSGGGS
ER 保留结构域	SEQ ID NO: 13	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSAEKDEL
ER 保留结构域	SEQ ID NO: 14	LYKYKSRRSFIEEKMP
CD8 α 铰链和跨膜结构域	SEQ ID NO: 15	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLSLITLY
4-1BB 细胞内信号传导结构域	SEQ ID NO: 16	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL
CD3 ζ 细胞内信号传导结构域	SEQ ID NO: 17	RVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
抗 CD2 VH (9-1)	SEQ ID NO: 18	QVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVK QRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSNTA YMQSLSTLSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLTVTV SS
抗 CD2 VL (9-1)	SEQ ID NO: 19	IVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSISDYLHWYQQKSH ESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRR
抗 CD2 VH	SEQ ID NO: 20	QLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRP

[0096]	(9.6)		IQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSGTAYM QLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGTSVTVSS
	抗 CD2 VL (9.6)	SEQ ID NO: 21	NIMMTQSPSSLAWSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYL AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTFTGGGKLEIKR
	抗 CD2 scFv (9-1)	SEQ ID NO: 22	IVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSIDYLHWYQQKSH ESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRRGGGSGGGGSGGGG SQVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWV KQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFTDKAISTIDTSSN TAYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGTLV TVSS
	抗 CD2 scFv (9.6)	SEQ ID NO: 23	NIMMTQSPSSLAWSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYL AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTL TISSVQPEDLAVYYCHQYLSSTFTGGGKLEIKRGGGSGG GGGSGGGGSQLQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRY WIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLT VDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQ GTSVTVSS

[0097] 研究表明,活化的免疫细胞分泌细胞因子会触发细胞因子释放综合征和巨噬细胞活化综合征,对免疫细胞疗法产生严重的不良影响 (Lee等人,《血液 (Blood) 》,2014,124 (2):188-195)。

[0098] 在一些实施方式中,靶结合分子是与CD蛋白例如人CD蛋白特异性结合的分子。在某些情况下,靶结合分子是抗CD2抗体或结合CD2的抗原结合片段。

[0099] 通过与T细胞上表达的配体 (例如肽或抗原) 结合而能够激活或失活免疫应答的所有这些合适的结合分子被统称为“靶结合分子”。如本领域技术人员将理解的,靶结合分子不需要包含抗体或抗原结合片段 (例如,scFv);相反,靶结合分子与靶分子结合的部分可以衍生自例如受体-配体对中的受体或受体-配体对中的配体。

[0100] 本文所述的PEBL的靶结合分子可以源自与靶细胞表面分子结合的抗体。在一些情况下,PEBL的靶结合分子可以源自结合CD2的抗体。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9.6或其变体。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9.6的人源化变体。在其他实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9-1。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9-1的人源化变体。

[0101] 9.6和9-1的详细说明可以在例如Kamoun等人的文章中找到。J Exp Med,1981,153:207-212;以及Bernard等,在《白细胞分型II》,1986年编辑。Reinherz,E.L.,Haynes,B.F.,Nadler,L.M.,&Bernstein,I.D. (Springer,纽约),第53-66页中找到。

[0102] 人源化抗体是指能够与靶抗原 (例如人CD2) 结合的免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,其包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的构架 (FR) 区和基本上具有非人免疫球蛋白氨基酸序列的CDR。这样,人源化抗体9-1可以结合CD2,并包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的FR区和基本上具有鼠抗体9-1氨基酸序列的CDR。同样地,人源化抗体9.6可以结合CD2,并且其包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的FR区和基本上具有鼠类抗体9.6氨基酸序列的CDR。

[0103] 通常,人源化抗体包含至少一个且通常是两个可变结构域(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、Fv)的基本上全部,其中所有或基本上所有CDR区都对应于非人免疫球蛋白的那些区,并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些区。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。通常,抗体将包含轻链以及至少重链的可变结构域。该抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区域。

[0104] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何种类,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。通常,恒定结构域是补体固定恒定结构域,其中期望人源化抗体表现出细胞毒活性,并且类别通常是IgG1。在不需要这种细胞毒活性的情况下,恒定结构域可以是IgG2类的。人源化抗体可包含来自一种以上类型或同种型的序列,并且选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能在本领域普通技术人员范围内。

[0105] 人源化抗体的FR和CDR区不必精确地对应于亲本序列,例如,可以通过取代、插入或缺失至少一个残基来诱变输入CDR或共有FR,从而使该位点处的CDR或FR残基既不与共有抗体对应也不与输入抗体对应。但是,此类突变不会广泛存在。通常,至少75%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的残基,更通常为90%,最优选大于95%。

[0106] 通常,通过使用亲本和人源化序列的三维模型对亲本序列和各种概念性人源化产物进行分析的过程来产生人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可获得的并且为本领域技术人员所熟悉。可获得计算机程序,其说明并显示了所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。

[0107] 影响抗原结合(例如,细胞表面分子结合)的残基定义为以阳性或阴性意义上主要负责候选免疫球蛋白的抗原亲和力或抗原特异性的残基。在某些情况下,从共有序列和导入序列中选择和结合FR残基以获得所需的免疫球蛋白特征。这种期望的特征包括对靶抗原的亲和力的增加和更高的特异性,尽管可以想到在某些情况下可能需要相反的作用。通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合(尽管并非所有CDR残基都如此参与,因此不需要被替换为共有序列)。但是,FR残基也具有显著作用,并且可以至少三种方式发挥作用:它们可以非共价地直接结合抗原,它们可以与CDR残基相互作用,以及它们可以影响重链和轻链之间的接口。

[0108] 通常,有必要从相邻CDR的空间位置以及靶标抗原的尺寸和结构推断抗原的位置。通常,仅那些能够形成盐桥、氢键或疏水相互作用的人源化抗体残基可能参与非共价抗原结合,但是具有与抗原在空间上的间隔为3.2埃或更小的原子的残基也可以与抗原非共价相互作用。这样的残基通常是具有最大体积的侧链的相对较大的氨基酸,例如酪氨酸、精氨酸和赖氨酸。结合抗原的FR残基通常还将具有侧链,该侧链被定向成围绕CDR的溶剂定向面的包膜,其从CDR结构域向溶剂延伸约7埃,并且在CDR结构域的任一侧延伸约7埃,又如通过三维建模可视化的。

[0109] 与CDR相互作用的残基通常是影响CDR多肽主链构象或与CDR残基侧链形成非共价键的残基。影响构象的残基通常是那些将任何CDR骨架原子的空间位置改变超过约0.2埃的残基。CDR序列的骨干原子被残基置换,这些残基会打断或改性组织结构,例如β折叠、螺旋或环。可以对邻近序列的构象产生深远影响的残基包括脯氨酸和甘氨酸,两者均能够将弯曲引入骨架。可以取代骨架原子的其他残基是那些能够参与盐桥和氢键的残基。

[0110] 与CDR侧链相互作用的残基是可以合理预期与CDR侧链形成非共价键的残基,通常为盐桥键或氢键。这些残基通过其侧链的三维定位来识别。可以预期,在彼此相反的约2.5-3.2埃内的两个侧链之间会形成盐或离子桥,这些侧链带有相反的电荷,例如赖氨酸和谷氨酰胺对。可以预期在残基对的侧链之间形成氢键,所述残基对例如丝氨酸或苏糖基与天冬氨酸或谷氨酰胺基(或其他氢接受残基)。这样的配对在蛋白质化学领域中是众所周知的,并且在候选抗体的三维建模中对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0111] 由于不可能完全预先预测给定取代的确切影响,因此可能有必要进行取代并测定候选抗体的所需特性。然而,这些步骤本身是常规的并且完全在本领域普通技术范围内。

[0112] CDR和FR残基是根据标准序列定义确定的(Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州,(1987),和《结构定义(a structural definition)》(如Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J.Mol Biol.)》196:901-917(1987)。如果这两种方法导致对CDR的识别稍有不同,则优选结构定义,但是通过序列定义方法识别的残基被认为是重要的FR残基,用于确定哪些构架残基要导入共有序列。

[0113] 通常,使导入抗体人源化的第一步是获得将导入序列掺入其中的共有氨基酸序列。接下来,使用上述方法为这些序列生成模型。在某些实施方式中,共有人序列衍生自Kabat等人的序列编辑中最丰富的亚类。(Kabat,E.A.等人,《免疫学感兴趣的蛋白质序列》(美国国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达,1987))。尽管可以以不同顺序采取这些步骤,但是通常在去除了全部相应的人CDR后,通过将至少一个CDR从非人输入序列转移到共有人结构中来创建候选人源化抗体的结构。如序列变异性所定义(Kabat,E.A.等人,《免疫学感兴趣的蛋白质序列》(美国国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达,1987年))或由结构变异性定义(Chothia,C.&Lesk,A.M.,《分子生物学杂志》196:901-917(1987)),人源化抗体可在CDR内的位置上包含非人输入残基的人替代物。分别研究非人类输入残基和人类共有框架残基之间的差异,以确定它们对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响。希望通过建模,检查特定位置的氨基酸特性或通过评估特定氨基酸的取代或诱变效果通过实验确定这种可能影响的研究。

[0114] 在一些实施方式中,一些实施方式中,利用以下步骤制备包含输入的非人抗体和人抗体的氨基酸序列的人源化抗体:(a)获得输入抗体可变结构域和共有人可变结构域的至少一部分的氨基酸序列;(b)在输入和人可变结构域序列中标识互补决定区(CDR)氨基酸序列;(c)用输入的CDR氨基酸序列代替相应的人CDR氨基酸序列;(d)将输入抗体的构架区(FR)的氨基酸序列与共有抗体的相应FR进行比对;(e)在比对的FR序列中标识与相应的共有抗体残基不同源的输入抗体FR残基;(f)确定是否合理预期非同源输入氨基酸残基具有以下作用中的至少一种:(1.)非共价直接结合抗原,(2.)与CDR相互作用;或(3.)参与VL-VH接口;或(g)合理地预期具有这些作用中至少一种的任何非同源输入抗体氨基酸残基,用该残基代替共有抗体FR序列中的相应氨基酸残基。

[0115] 任选地,可以确定在步骤(e)中识别出的任何非同源残基是否暴露在结构域的表面上或埋在其中,并且如果该残基暴露在外但没有步骤(f)中识别的效果,则可以保留共有残基。

[0116] 产生人源化抗体的方法的其他描述可见于,例如,US6,054,297;US6,407,213;和

US6,719,971,其内容通过引用整体并入本文。

[0117] 在一些实施方式中,PEBL的靶结合分子包含抗CD2单链可变片段,其包含具有与SEQ ID NO:18的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VH结构域以及具有与SEQ ID NO:19的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VL结构域。在某些情况下,接头连接scFv的VH域和VL域。VH-VL接头可以是(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)接头,其中n的范围可以是1到6,例如1、2、3、4、5或6。在其他情况下,VH-VL接头可以是本领域技术人员已知的任何GS接头或其他柔性接头。在某些情况下,VH结构域在SEQ ID NO:18所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,VL结构域在SEQ ID NO:19所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代。

[0118] 在一些实施方式中,PEBL的靶结合分子包含抗CD2单链可变片段,其包含具有与SEQ ID NO:20的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VH结构域以及具有与SEQ ID NO:21的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VL结构域。在某些情况下,接头连接scFv的VH域和VL域。VH-VL接头可以是(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)接头,其中n的范围可以是1到6,例如1、2、3、4、5或6。在其他情况下,VH-VL接头可以是本领域技术人员已知的任何GS接头或其他柔性接头。

[0119] 在某些情况下,抗CD2 scFv包含一个或多个氨基酸取代,可与人免疫细胞中的CD2结合。在一些实施方式中,VH结构域在SEQ ID NO:18所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,并且VL结构域在SEQ ID NO:19所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,使得CD2的表达在人类免疫细胞中被阻断、减少或降低。在其他实施方式中,VH结构域在SEQ ID NO:20所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,并且VL结构域在SEQ ID NO:21所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,使得CD2的表达在人类免疫细胞中被阻断、减少或降低。

[0120] 在各种实施方式中,本文所述的PEBL的靶结合分子包含抗CD2scFv,其包含与SEQ ID NO:22的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性。在一些实施方式中,靶结合分子包含抗CD2 scFv,其包含与SEQ ID NO:23的至少90% (例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性。在一些实施方式中,抗CD2 scFv是SEQ ID NO:22的变体,并且具有与SEQ ID NO:22的抗CD2 scFv相同的结合活性。在其他实施方式中,抗CD2 scFv是SEQ ID NO:23的变体,并且具有与SEQ ID NO:23的抗CD2 scFv相同的结合活性。

[0121] 在一些实施方式中,PEBL的scFv包含可变重链序列,其具有与CD2抗体的可变重链序列的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性。在一些实施方式中,本发明的scFv包含可变轻链序列,其具有与抗CD2抗体的可变轻链序列的至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序

列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列的可变轻链序列、同一性、至少95%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。例如,抗CD2抗体可以是本领域技术人员公认的任何这样的抗体。在一些实施方式中,本发明的抗CD2抗体或抗CD2scFv是其人源化变体。

[0122] 在一些实施方式中,PEBL的抗CD2scFv结合静止的T细胞和活化的T细胞中的细胞内CD2。在其他实施方式中,抗CD2 scFv结合活化的T细胞中的细胞内CD2。在某些实施方式中,抗CD2scFv结合活化的T细胞而非静止T细胞中的细胞内CD2。在某些实施方式中,抗CD2scFv结合免疫细胞中的细胞内CD2。

[0123] 在一些实施方式中,抗CD2 scFv抑制或阻断CD58的CD2结合。在其他实施方式中,抗CD2 scFv不阻断或抑制CD58的CD2结合。

[0124] 细胞定位结构域包括保留信号传导结构域。在一些实施方式中,细胞定位结构域包含保留信号传导结构域和跨膜结构域。在一些情况下,细胞定位结构域包含内质网(ER)保留序列,高尔基保留序列或蛋白酶体定位序列。细胞定位结构域可包括防止或阻止蛋白质被细胞分泌的氨基酸序列。细胞定位结构域可以包括在细胞内区室中保留蛋白质的氨基酸序列。在一些情况下,细胞定位结构域可包括在细胞膜例如ER或高尔基的膜中保留蛋白质锚的氨基酸序列。例如,保留信号传导结构域可以包含KDEL序列(SEQ ID NO:24)、KKD/E序列(SEQ ID NO:25)、KKXX序列(SEQ ID NO:26)、KKMP序列(SEQ ID NO:27)、或YQRL序列(SEQ ID NO:28),其中X代表任何氨基酸序列。在一些实施方式中,如果保留信号传导结构域包含KKXX或KKMP,则细胞定位结构域进一步包含CD8 α 铰链和跨膜结构域,例如但不限于SEQ ID NO:15的序列。在一些情况下,CD8 α 铰链和跨膜结构域连接至SEQ ID NO:14的ER保留结构域的N-末端。

[0125] 在一些实施方式中,细胞定位结构域包含KDEL序列(SEQ ID NO:24)。在某些实施方式中,细胞定位结构域包含AEKDEL的序列(SEQ ID NO:29)。在各个实施方式中,细胞定位结构域包含GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSAEKDEL序列(SEQ ID NO:30)。在特定实施方式中,细胞定位结构域包含KKMP序列(SEQ ID NO:27)。在一些实施方式中,细胞定位结构域包含LYKYKSRRSFIEKKMP的序列(SEQ ID NO:31)和KKMP序列(SEQ ID NO:27)。

[0126] 某些实施方式中,细胞定位结构域包括与SEQ ID NO:30的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具有所需的功能。在一些实施方式中,细胞定位结构域包括与SEQ ID NO:31的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0127] 在一些实施方式中,ER保留序列包含选自KDEL, KKXX, KKMP和KKTN的氨基酸序列,其中X可以是任何氨基酸。在一些实施方式中,高尔基保留序列选自YQRL(SEQ ID NO:40)、YQRL(SEQ ID NO:41)、YKGL(SEQ ID NO:42)和YXXL(SEQ ID NO:43),其中X可以是任何氨基

酸。

[0128] 在一些实施方式中,通过将scFv序列连接至包含21个(TRIM21)靶向结构域序列的三重基序并共表达编码人TRIM21 E3泛素连接酶蛋白的序列来实现蛋白酶体定位。TRIM21以高亲和力与抗体的Fc结构域结合,并可以募集泛素-蛋白酶体复合物以降解与抗体结合的分子(例如,蛋白质和肽)。TRIM21靶向结构域序列编码选自人免疫球蛋白G(IgG)恒定区(Fc)基因的组(例如IgG1、IgG2或IgG4)的氨基酸序列,并用于形成包含scFv和Fc结构域的融合蛋白。在该实施方式中,外源表达的TRIM21蛋白结合与靶蛋白(例如,CD2)结合的scFv-Fc融合蛋白,并将复合物引导至蛋白酶体进行降解。

[0129] 人TRIM21 E3连接酶蛋白的氨基酸序列的细节可以在例如NCBI参考序列号NP_003132.2下的NCBI蛋白质数据库中找到。编码人TRIM21 E3连接酶蛋白的核酸序列的细节可以在例如NCBI参考序列号NM_003141.3下的NCBI蛋白质数据库中找到。

[0130] 跨膜结构域可以包括衍生自以下的跨膜结构域或铰链与跨膜结构域的组合:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、ICOS、VEGFR2、FAS或FGFR2B。在某些实施方式中,跨膜结构域衍生自CD8 α 。在某些实施方式中,跨膜结构域衍生自CD8 α 。衍生自CD8 α 的铰链和跨膜结构域与ER或高尔基保留信号结构域连接。

[0131] 在一些实施方式中,跨膜结构域或铰链和跨膜结构域包括与SEQ ID NO:15的至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0132] 在一些实施方式中,跨膜结构域通过接头连接到保留信号传导结构域。在一些实施方式中,scFv的VL结构域和VH结构域通过接头连接。跨膜结构域和保留信号结构域之间的接头与scFv的接头的序列相同。在一些情况下,跨膜结构域和保留信号传导结构域之间的接头具有与scFv的接头不同的序列。接头的非限制性实例包括(GS) n 、(GGS) n 、(GGGS) n (SEQ ID NO:32)、(GGSG) n (SEQ ID NO:33)、(GGSGG) n (SEQ ID NO:34)或(GGGGS) n (SEQ ID NO:35),其中 n 为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方式中,接头是(GGGGS) $_3$ (SEQ ID NO:36)或(GGGGS) $_4$ (SEQ ID NO:37)。接头长度的变化可以保留或增强活性,从而在活性研究中产生优越的功效。

[0133] 在特定实施方式中,接头包括,例如,GGGSGGGGS(SEQ ID NO:38)。在一些实施方式中,接头包括,例如,GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:39)。在各个实施方式中,长度为约5个到约100个氨基酸(含)的肽接头可以用于本发明。在某些实施方式中,长度为约20个到约40个氨基酸(含)的肽接头可以用于本发明。在一些实施方式中,长度为至少5个氨基酸、至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少20个氨基酸、至少25个氨基酸、至少30个氨基酸、至少35个氨基酸或至少40个氨基酸的肽接头可以用于本发明。如本领域的技术人员将了解的,此类接头序列以及此类接头序列的变体是本领域已知的。设计并入接头序列的构建体的方法以及评估功能性的方法对于本领域的技术人员而言是容易获得的。

[0134] 在特定的实施方式中,信号肽衍生自CD8 α 信号肽。在一些实施方式中,信号肽包含与SEQ ID NO:11的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一

性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性。信号肽可以位于靶结合分子的N-末端。

[0135] 如本领域技术人员将理解的,在某些实施方式中,本文公开的各种组分(例如,信号肽、scFv、细胞内信号传导结构域、跨膜结构域、接头、定位结构域及其组合)的任何序列可以具有与本文公开的特定对应序列的至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0136] 表1提供了本文所述的PEBL的示例性实施方式。

[0137] 在一些实施方式中,编码抗CD2 PEBL的核酸序列包含表1中列出的一个或多个核酸序列。在某些实施方式中,抗CD2 PEBL包含具有与SEQ ID NO:6或其密码子优化的变体的至少90%的序列同一性(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的核苷酸序列。在某些实施方式中,抗CD2 PEBL包含具有与SEQ ID NO:7或其密码子优化的变体的至少90%的序列同一性(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的核苷酸序列。在一些实施方式中,抗CD2 PEBL包含具有与SEQ ID NO:8或其密码子优化的变体的至少90%的序列同一性(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的核苷酸序列。在其他实施方式中,抗CD2 PEBL包含具有与SEQ ID NO:9或其密码子优化的变体的至少90%的序列同一性(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的核苷酸序列。例如,可以改性编码抗CD2PEBL的核酸序列,以在人细胞例如人免疫细胞中获得所需的表达或活性。

[0138] 产生针对任何靶蛋白的抗体和其抗体片段的方法在本领域是众所周知且常规的。此外,如本文所例示,可将针对各种靶标例如CD2的市售抗体用于产生PEBL分子,如本文所例示。如本文所例示的,本领域已知的抗体以及由此衍生的抗体片段(例如,scFv)可以用于本发明。

[0139] 如本领域的技术人员将了解的,嵌合抗原受体和/或PEBL分子可以被设计成结合到本文所公开的靶以及本文所公开的靶的变体。举例来说,可以将嵌合抗原受体和/或PEBL分子设计成与CD2或其天然存在的变体分子结合。此类天然存在的变体可以具有与分子的野生型形式相同的功能。在其它实施方式中,变体可以具有相对于分子的野生型形式而改变的功能(例如,赋予患病状态)。

[0140] 如本领域的技术人员将了解的,PEBL分子构建体的各个组分可以以不同的组合被取代(例如,以含有不同的接头、不同的定位序列、不同的scFv等),只要组合产生功能性PEBL。如本文所公开的,评估特定构建体的功能性的方法在本领域的技术人员的范围内。

[0141] IV. 嵌合抗原受体

[0142] 嵌合抗原受体(CAR)是由与单个融合分子中一个或多个信号传导结构域相关的靶向部分组成的合成受体。通常,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,该结构域包含通过柔性接头连接的单克隆抗体的轻链可变片段。第一代CAR的信号结构域已衍生自CD3zeta的细胞质区域或Fc受体 γ 链。第一代CAR已被证明能够成功地重定向T细

胞的细胞毒性,但是,它们无法在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。已单独添加(第二代)或组合添加(第三代)来自CD28,OX40(CD134)和4-1BB(CD137)等共刺激分子的信号传导结构域,以提高生存率并提高CAR改性T细胞的增殖。

[0143] 除了单链CAR之外,在一些实施方式中,本文所述的CAR是多链CAR。多链CAR或多特异性CAR包含几个(例如,两个或更多个)细胞外抗原(配体)结合结构域,以同时结合不同的靶标,从而增强免疫细胞的活化和功能。在一些情况下,细胞外抗原结合结构域串联放置在相同的跨膜多肽上,并且任选地可以被接头分开。在其他情况下,可以将不同的细胞外抗原结合结构域放置在组成多链CAR的不同的跨膜多肽上。与单链CAR相似,多链CAR的信号转导结构域可以是Fc受体或T细胞受体和共受体(它们共同作用以在抗原受体参与后启动信号转导)的细胞质序列,以及这些序列和具有相同功能的合成序列的任何派生或变体。

[0144] 信号转导域包含两类不同的细胞质信号序列,它们启动抗原依赖性的一级激活,以及以抗原非依赖性的方式起作用以提供次级或共刺激信号。初级细胞质信号转导序列可包含信号转导基序,称为免疫受体基于酪氨酸的激活基序(ITAM)。在本发明中使用的ITAM的非限制性实例可包括作为非限制性实例的那些衍生自TCRzeta、FcRgamma、FcRbeta、FcRepsilon、CD3gamma、CD3delta、CD3epsilon、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。信号转导域也可以包括共刺激信号分子。在W02014/4011988中描述了双特异性或多特异性CAR的另外的描述,其内容通过引用整体并入本文。

[0145] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种工程化免疫细胞,其包括含有编码嵌合抗原受体(例如,CAR)的核苷酸序列的核酸,以及含有编码与结合CD2的定位结构域连接的靶结合分子的核苷酸序列的核酸(例如,PEBL)。在一些实施方式中,本发明涉及工程化的免疫细胞(例如CAR-T细胞),其包含与CD2结合的嵌合抗原受体(例如CAR)和与定位结构域连接的靶结合分子(例如PEBL))结合CD2。CAR-T细胞的CD2 CAR结合另一个细胞的细胞表面上的CD2,而CAR-T细胞的CD2 PEBL结合位于CAR-T细胞胞内区室的CD2。这样,CD2 PEBL可以防止其他CD2结合CAR破坏CAR-T细胞。

[0146] 在本发明的某些方面,嵌合抗原受体(CAR)结合在细胞表面表达的CD分子,例如CD2。在其他实施方式中,CAR结合CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD28、CD30、CD38、CD45、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD57、CD99、CD127或CD137。

[0147] CAR的CD2结合结构域可以是抗CD2抗体或结合CD2的抗原结合片段。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9.6。在其他实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9-1。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9.6或其变体。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9.6的人源化变体。在其他实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9-1。在一些实施方式中,结合CD2的抗体是抗CD2单克隆抗体9-1的人源化变体。

[0148] 在一些实施方式中,CD2结合结构域是抗CD2 scFv。在一些实施方式中,本发明的scFv包含可变重链序列,其具有与抗CD2抗体的可变重链序列的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在一些实施方式中,本发明的scFv包含可变轻链序列,其具有与抗CD2抗体的可变轻链序列的至少90%序列

同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列的可变轻链序列、同一性、至少95%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。例如,抗CD2抗体可以是本领域技术人员公认的任何这样的抗体。

[0149] 在一些实施方式中,抗CD2单链可变片段可包含具有与SEQ ID NO:18的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VH结构域和具有与SEQ ID NO:19的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VL结构域。在某些情况下,接头连接scFv的VH域和VL域。VH-VL接头可以是(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)接头,其中n的范围可以是1到6,例如1、2、3、4、5或6。VH-VL接头可以是(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)接头,其中n的范围可以是1到6,例如1、2、3、4、5或6。在其他情况下,VH-VL接头可以是本领域技术人员已知的任何GS接头或其他柔性接头。

[0150] 在某些情况下,VH结构域在SEQ ID NO:18所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代。在某些情况下,VL结构域在SEQ ID NO:19所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代。

[0151] 在一些实施方式中,抗CD2 scFv包含具有与SEQ ID NO:20的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VH结构域和具有与SEQ ID NO:21的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的VL结构域。在某些情况下,接头连接scFv的VH域和VL域。VH-VL接头可以是(GGGGS)_n(SEQ ID NO:35)接头,其中n的范围可以是1到6,例如1、2、3、4、5或6。在其他情况下,VH-VL接头可以是本领域技术人员已知的任何GS接头或其他柔性接头。

[0152] 在某些情况下,抗CD2 scFv包含一个或多个氨基酸取代,可与人免疫细胞中的CD2结合。在一些实施方式中,VH结构域在SEQ ID NO:18所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,并且VL结构域在SEQ ID NO:19所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,使得CD2的表达在人类免疫细胞中被阻断、减少或降低。在其他实施方式中,VH结构域在SEQ ID NO:20所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,并且VL结构域在SEQ ID NO:21所示的序列中包含至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸取代,使得CD2的表达在人类免疫细胞中被阻断、减少或降低。

[0153] 在各种实施方式中,抗CD2 scFv包含与SEQ ID NO:22的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性。在各种其他实施方式中,抗CD2 scFv包含与SEQ ID NO:23的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性。在一些实施方式中,抗CD2 scFv是SEQ ID NO:22的变体,并且具有与SEQ ID NO:22的抗CD2 scFv相同的结合活性。在其他实施方式中,抗CD2 scFv是SEQ ID NO:23的变体,并且具有与SEQ ID NO:23的抗CD2 scFv相同的结合活性。

[0154] PEBL的CD2结合结构域可以结合与CAR的抗CD2结合结构域相同的CD2表位。在其他情况下,PEBL的抗CD2结合结构域可以结合与CAR的CD2结合结构域不同的CD2表位。PEBL的

CD2结合结构域和CAR的CD2结合结构域的氨基酸序列可以基本相同。或者,PEBL的CD2结合结构域和CAR的CD2结合结构域的氨基酸序列可以不同。在一些实施方式中,PEBL的CD2结合结构域的序列具有与CAR的CD2结合结构域的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性。

[0155] CAR的示例性实施方式在图1中示出,并且示例性氨基酸和核酸序列在表1中提供。

[0156] 在一些实施方式中,编码抗CD2CAR的核酸序列包含表1中列出的一个或多个核酸序列。在某些实施方式中,抗CD2CAR包含具有与SEQ ID NO:10或其密码子优化的变体的至少90%的序列同一性(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性)的核苷酸序列。例如,可以改性编码抗CD2CAR的核酸序列,以在人细胞例如人免疫细胞中获得所需的表达或活性。

[0157] 如本领域技术人员将理解的,在某些实施方式中,本文公开的各种组分(例如,信号肽、scFv、细胞内信号传导结构域、跨膜结构域、接头及其组合)的任何序列可以具有与本文公开的特定对应序列的至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0158] 在一些实施方式中,4-1BB细胞内信号传导结构域可具有与SEQ ID NO:16的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0159] 在某些实施方式中,4-1BB细胞内信号传导结构域可以被来自共刺激分子的另一个细胞内信号传导结构域替代,所述共同刺激分子诸如CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2。在一些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域可具有与CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的细胞内信号传导结构域的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。任选地,4-1BB细胞内信号传导结构域还可以包括来自共刺激分子例如CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的另一个细胞内信号传导结构域(或其一部分)。在一些实施方式中,另外的细胞内信号传导结构域可以具有与CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1或CD2的细胞内信号传导结构域的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。

[0160] 在一些实施方式中,CD3zeta(CD3ζ)细胞内信号传导结构域可以具有与SEQ ID NO:17的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0161] 在一些情况下,细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序

(ITAM)或其一部分,只要它具有所需的功能即可。CAR的细胞内信号传导结构域可以包括具有与ITAM的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性。在某些实施方式中,细胞内信号传导结构域可以具有与Fc ϵ RI γ 、CD4、CD7、CD8、CD28、OX40或H2-Kb的至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0162] 在一些实施方式中,CD8 α (CD8 α) 铰链和跨膜结构域可以具有与SEQ ID NO:11的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或100%的序列同一性,只要其具备所需的功能。

[0163] 适用于本发明的铰链和跨膜序列是本领域已知的,并且提供在例如出版物W02016/126213中,其通过引用整体并入本文。

[0164] 在一些实施方式中,抗CD2CAR的铰链和跨膜结构域可以包括来自CD8 α 、IgG、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS、FGFR2B或其他跨膜蛋白的信号传导结构域(例如跨膜结构域)。跨膜结构域也可以是非天然存在的疏水蛋白区段。

[0165] 在一些实施方式中,CD8 α (CD8 α) 信号肽可具有与SEQ ID NO:11的至少90%的序列同一性、至少91%的序列同一性、至少92%的序列同一性、至少93%的序列同一性、至少94%的序列同一性、至少95%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或100%序列同一性,只要其具有所需的功能。

[0166] V. 工程化免疫细胞

[0167] 本文提供了工程化的免疫细胞,其包含靶CD2核酸序列的基因改性和结合CD2的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方式中,工程化细胞还包含阻断多肽。这种经过改造的免疫细胞缺乏内源性CD2表达,并表达结合CD2的CAR。

[0168] 在一些实施方式中,靶CD2核酸序列的基因改性导致CD2表达失活。在一些情况下,基因改性包括使用选自CRISPR/Cas、锌指核酸酶、TALEN和大范围核酸酶组成的组的体系进行基因编辑。在一些情况下,基因改性可包括使用选自短发夹RNA、,双链RNA、sdRNA、短抑制RNA和微小RNA组成的组的体系的基因沉默(例如瞬时基因沉默)。在一些实施方式中,内源CD2表达在工程化免疫细胞中被阻断。例如,通过基因改性来阻止或阻止细胞表面上的CD2蛋白表达。在一些情况下,细胞中(例如,在细胞的细胞内环境中)CD2蛋白表达被基因改性所阻断或阻止。在一些实施方式中,在工程化免疫细胞中CD2蛋白的内源表达被阻断或阻止。

[0169] 内源性CD2表达的阻断可能持续至少6个月。内源性CD2表达的阻断可能持续至少12个月。在一些实施方式中,工程化免疫细胞以与相当的免疫细胞基本相等的速率增殖。

[0170] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种表达CD2CAR并被基因改性以缺乏内源

性CD2表面表达的工程化免疫细胞。在某些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞,工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是外周血单核细胞(PBMC)衍生的T细胞。

[0171] 在一些实施方式中,本发明描述了表达结合细胞表面或分泌的分子(例如本文概述的那些)的PEBL的工程化免疫细胞。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞还包含靶CD2核酸序列的基因改性。在一些情况下,靶向CD2的基因改性是基于CRISPR的基因改性。在一些实施方式中,CD2的基于CRISPR的基因改性利用一种或多种SEQ ID NOS:44-47的引导RNA序列。在一些情况下,靶向CD2的基因改性是基于TALEN或ZFN的基因改性。在某些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程 $\gamma\delta$ T细胞、PBMC衍生的T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突状细胞。

[0172] 在一些实施方式中,本发明涉及表达结合CD2的CAR的工程化免疫细胞,包括本文概述的那些。在一些实施方式中,工程化细胞表达包含CAR,其包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,工程化细胞表达包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CAR。在某些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程 $\gamma\delta$ T细胞、PBMC衍生的T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突状细胞。

[0173] 在一些实施方式中,本发明涉及表达结合CD2的CAR和结合CD2的PEBL的工程化免疫细胞,包括本文概述的那些。在一些实施方式中,除了包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的同一性的氨基酸序列的CAR以外,工程化免疫细胞还表达PEBL,其包含具有与SEQ ID NO:1-4中的任何一个的至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,除了包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CAR之外,工程化免疫细胞还表达PEBL,其包含选自由SEQ ID NO:1-4的任何一个组成的组的氨基酸序列。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞还包含靶CD2核酸序列(例如内源CD2基因座)的基因改性。在一些情况下,靶向CD2的基因改性是基于CRISPR的基因改性。在一些实施方式中,CD2的基于CRISPR的基因改性利用一种或多种SEQ ID NOS:44-47的引导RNA序列。

[0174] 在一些情况下,工程化免疫细胞表达与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%同一性的PEBL和与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%同一性的CAR。在一些情况下,工程化免疫细胞表达与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%同一性的PEBL和与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%同一性的CAR。在一些情况下,工程化免疫细胞表达与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%同一性的PEBL和与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%同一性的CAR。在一些情况下,工程化免疫细胞表达与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%同一性的PEBL和与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%同一性的CAR。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞表达SEQ ID NO:1的PEBL和SEQ ID NO:5的CAR。。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞表达SEQ ID NO:1的PEBL和SEQ ID NO:5的CAR。在一些实施方式中,改造的免疫细胞表达SEQ ID NO:2的PEBL和SEQ ID NO:5的CAR。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞表达SEQ ID NO:3的PEBL和SEQ ID NO:5的CAR。在一些实施方式中,工程化免疫细胞表达SEQ ID NO:4的PEBL和SEQ ID NO:5的CAR。在一些实施方式中,这种工

程化免疫细胞还包含靶CD2核酸序列的基因改性。在一些情况下,靶向CD2的基因改性是基于CRISPR的基因改性。在一些实施方式中,CD2的基于CRISPR的基因改性利用一种或多种SEQ ID NOS:44-47的引导RNA序列。在某些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程 $\gamma\delta$ T细胞、PBMC衍生的T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突状细胞。

[0175] 本文所概述的PEBL防止将靶蛋白转运到细胞膜。例如,针对上述靶分子的PEBL保留在ER中。因此,靶标在细胞表面上的表达被抑制。在某些情况下,PEBLs在工程化免疫细胞中不引起免疫表型改变。而且,PEBL不影响工程化免疫细胞的增殖。在一些实施方式中,PEBL与CAR,例如抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR共表达。

[0176] 在某些实施方式中,提供了工程化免疫细胞,其包含:核酸,其包含编码与定位结构域连接的靶结合分子(例如,PEBL)的核苷酸序列,其中所述靶结合分子是结合靶分子的抗体,并且所述定位结构域包含保留信号传导结构域,所述保留信号传导结构域包含选自内质网(ER)序列、高尔基保留序列和蛋白体定位序列组成的组的氨基酸序列。在某些情况下,PEBL还包括衍生自CD8 α 、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS或FGFR2B。

[0177] 在一些情况下,工程化细胞包含核酸,该核酸包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列。在某些情况下,CAR包含4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域,以及结合CD2的抗体。在某些实施方式中,在靶结合分子的上下文中结合CD2的抗体包括:表1中列出的VH序列和VL序列。

[0178] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞包含靶CD2核酸序列的基因改性。在一些情况下,靶向CD2的基因改性是基于CRISPR的基因改性。在一些实施方式中,CD2的基于CRISPR的基因改性利用对应于SEQ ID NOS:44-47的核酸序列的一个或多个引导RNA序列。

[0179] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤(NK)细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞、工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。在一些情况下,工程化免疫细胞是同种异体细胞。在其它情况下,工程化免疫细胞是自体细胞。

[0180] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞缺乏CD2表面表达至少6个月。在其他实施方式中,工程化免疫细胞缺乏CD2表面表达至少12个月。在特定的实施方式中,工程化免疫细胞缺乏CD2表面表达至少20个月。在一些实施方式中,工程化免疫细胞缺乏CD2表面表达至少24个月。

[0181] 在某些实施方式中,工程化免疫细胞以与可比较免疫细胞相比基本上相等的速率增殖。在一些实施方式中,工程化的免疫细胞带有CD2基因的基因改性并表达CAR(例如,CD2 Δ CD2CAR-T细胞),并且其增殖类似于表达相应CAR(例如,CD2CAR-T细胞)的免疫细胞。

[0182] 在一些实施方式中,本发明的工程化免疫细胞具有增强的治疗功效。此类工程化的免疫细胞可用于治疗受试者的癌症。在某些实施方式中,所述癌症是CD2相关的癌症或T细胞恶性肿瘤,例如T细胞白血病或T细胞淋巴瘤,例如T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL),T细胞幼淋巴细胞性白血病,T细胞大颗粒性淋巴细胞白血病,与肠病相关的T细胞淋巴瘤,肝脾性T细胞淋巴瘤,皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)及其亚型,蕈样肉芽肿,Sézary综合征,原发性皮肤 $\gamma\delta$ T细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤(NHL)的T谱系亚群的恶性肿瘤,包括但不限于未做其他规定的外周T细胞淋巴瘤(PTCL)(PTCL-NOS),以及间变

性大细胞淋巴瘤。在某些实施方式中，T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴细胞白血病 (ETP-ALL)。

[0183] 在一些实施方式中，与表达所述CD2基因的免疫细胞相比，携带CD2基因的基因改性，表达CAR并表达PEBL的本发明的工程化免疫细胞（例如，CD2 Δ _PEBL_CD2CAR-T细胞）具有与表达相应的CAR（例如CD2CAR-T细胞）的免疫细胞相比增强的或增加的治疗效果。在一些实施方式中，表达CAR和抗CD2 PEBL的工程化免疫细胞具有与表达相应CAR的免疫细胞相当的治疗效果。

[0184] 在另一个实施方式中，本发明涉及用于产生本发明的工程化免疫细胞的方法，所述方法包括将以下引入到免疫细胞：包括编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的核酸；和包括用于CD2的基因改性的一个或多个核苷酸序列的核酸。在一些实施方式中，用于CD2基因改性的核苷酸序列包括编码Cas蛋白或其变体的序列。在一些实施方式中，用于CD2的基因改性的核苷酸序列包含对应于选自SEQ ID NOS:44-47的任何一个的引导RNA。在一些实施方式中，该方法还包括引入包含编码与定位结构域连接的靶结合分子（例如，PEBL分子）的核苷酸序列的核酸，从而产生工程化的免疫细胞。

[0185] 在某些实施方式中，工程化免疫细胞是工程化T细胞、工程化自然杀伤 (NK) 细胞、工程化NK/T细胞、工程化单核细胞，工程化巨噬细胞或工程化树突细胞。在一些实施方式中，工程化T细胞是任何类型的T细胞。在某些实施方式中，工程化T细胞是gamma-delta (γ δ) T细胞。在某些实施方式中，工程化T细胞是由PBMC衍生的T细胞产生的。

[0186] 在某些实施方式中，包括核苷酸序列的核酸离体引入到免疫细胞。在其它实施方式中，包括核苷酸序列的核酸体内引入到免疫细胞。

[0187] 包括待引入的核苷酸序列的核酸可以是单个双顺反子构建体，所述单个双顺反子构建体含有本文所描述的嵌合抗原受体和连接到定位结构域的靶结合分子（例如，scFv）。如本文所述，单个双顺反子构建体可以通过在编码本文所述的嵌合抗原受体的2个cDNA（例如，CAR）和靶结合分子（例如，scFv）之间插入内部核糖体进入位点 (IRES) 或2A肽编码区位点来制备。用于使多于一个靶缺失的三顺反子递送体系的设计应当也是可行的。可替代地，可以执行对单独构建体（例如，CAR和PEBL）进行的单独转导（同时或顺序地）。

[0188] 引入外源核酸的方法在本文进行了例示，并且是本领域众所周知的。可以使用本领域已知的允许试剂/化学物质和分子（蛋白质和核酸）在细胞或亚细胞室内递送的任何手段，包括脂质体递送手段，聚合物载体，化学载体，脂质复合物，多聚体，树状聚合物，纳米颗粒，乳液，天然内吞作用或吞噬酶途径作为非限制性实例，以及物理方法如电穿孔。在一些实施方式中，多核苷酸以mRNA形式转染，其例如通过电穿孔直接引入细胞。在一些实施方式中，包含一种或多种本文描述的多核苷酸的病毒载体是标准转染手段的替代。病毒转导的方法是本领域众所周知的。在一些实施方式中，包括但不限于逆转录病毒或慢病毒载体的病毒载体用于稳定整合到工程化细胞的基因组中。

[0189] 在一些实施方式中，顺序引入编码CAR的核苷酸序列、编码PEBL的核苷酸序列和用于CD2的基因改性的核苷酸序列。在其他实施方式中，同时引入编码CAR的核苷酸序列、编码PEBL的核苷酸序列和用于CD2的基因改性的核苷酸序列。在某些情况下，编码CAR的核苷酸序列和编码PEBL的核苷酸序列是可操作地连接的，并且因此可以被引入单个表达载体或质粒上。

[0190] 在一些实施方式中,在一种或多种细胞因子的存在下培养免疫细胞,所述细胞因子包括但不限于IL-2、IL-7、IL-15及其任何组合。在某些情况下,在能够增强或诱导T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞增殖的试剂的存在下培养免疫细胞。在某些情况下,在结合TCR/CD3复合物分子的试剂和/或结合CD28的试剂存在下培养免疫细胞。在某些实施方式中,培养工程化免疫细胞的方法包括在存在选自以下组成的组的分子的情况下进行培养:CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40和HVEM。在某些实施方式中,培养方法包括在存在与CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM结合的试剂的情况下进行培养。用于培养本文描述的工程化免疫细胞的其他方法可以在例如US20190136186、US20190062706和US20170037369中找到。

[0191] 在一些实施方式中,获得外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,从人类受试者收获外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,从健康人受试者收获外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,从患有癌症的人类受试者收获外周血单核细胞(PBMC),包括本文所述的任何。在一些实施方式中,根据制造商的建议,用(a) CD3微珠或(b) CD4和CD8微珠进行T细胞的阳性选择。在某些情况下,细胞以每80 μ l MACS缓冲液 1×10^7 个细胞重悬,其中包括无菌过滤的PBS+0.5%BSA+2mM EDTA,并且以每80 μ l细胞悬液20 μ l微珠标记。将细胞在4 $^{\circ}$ C孵育15分钟,然后用MACS缓冲液洗涤。使标记的细胞通过LS柱(Miltenyi Biotec),然后将与LS柱结合的阳性选择的T细胞洗脱到收集管中。洗涤分离的T细胞,并以每ml 1×10^6 个细胞的密度重悬于补充有3%人AB血清(Sigma)的TexMACS培养基中。在一些实施方式中,每 1×10^6 个T细胞用10 μ l T细胞TransAct(Miltenyi Biotec)激活T细胞,并用(a) 120IU/ml重组人IL-2或(b) 12.5ng/ml重组人IL-7和12.5ng/ml重组人IL-15进行培养。

[0192] 在一些实施方式中,在选择和激活后的一天(第1天),使用静态转导在MOI为1-10(例如,MOI 1、MOI 2、MOI 3、MOI 4、MOI 5、MOI 6、MOI 7、MOI 8、MOI 9和MOI 10)的情况下用慢病毒转导T细胞。在某些情况下,监测T细胞培养物并将其维持在每ml培养基 $0.5-2 \times 10^6$ 个T细胞的细胞密度。可以每3-4天将新鲜的IL-2或IL-7和IL-15细胞因子添加到培养物中。在某些实施方式中,在转导后十天(第11天),收获扩增的T细胞。在某些情况下,使用功能分析和通过流式细胞仪进行表型分析来分析扩增的T细胞。

[0193] 在一些实施方式中,慢病毒包含一种或多种用于CD2基因编辑或基因沉默的构建体。在某些实施方式中,慢病毒包含一种或多种本文所述的CAR的构建体。在某些实施方式中,慢病毒包含一种或多种本文所述的PEBL的构建体。在某些实施方式中,CD2 Δ CD2-CAR细胞是通过两次或更多次连续慢病毒转导产生的。在某些实施方式中,在第一天(第1天)用编码CD2基因编辑构建体的慢病毒载体(例如,CD2-CRISPR sgRNA构建体)转导T细胞,然后第一次转导后三天(第4天)用编码CD2-CAR构建体的慢病毒载体进行第二次转导。可以在第一次转导后约5至10天或更长时间收获所得的转导的CD2 Δ CD2-CAR细胞。

[0194] 在各个方面,还提供了用于产生本文所描述的工程化免疫细胞的试剂盒。本试剂盒可用于产生例如同种或自体效应T细胞。

[0195] 因此,本文提供的试剂盒包含核酸,该核酸包含编码PEBL的核苷酸序列。在某些实施方式中,试剂盒包含含有编码PEBL的核苷酸序列的核酸和含有编码CAR的核苷酸序列的核酸。可以根据本文所描述的实施方式中的任何实施方式设计试剂盒。

[0196] 在某些实施方式中,编码CAR的核苷酸序列和/或编码PEBL的核苷酸序列进一步包括允许,例如,克隆和/或表达的序列(例如,质粒或载体序列)。例如,核苷酸序列可以作为质粒的一部分提供,以便于克隆到其他质粒和/或表达载体中,例如用于转染到细胞(例如免疫细胞)中。在某些实施方式中,编码CAR的核苷酸序列和编码PEBL的核苷酸序列提供在单个质粒或载体上。在某些实施方式中,核苷酸序列提供在分开的质粒或表达载体上。在一些实施方式中,选择表达载体用于病毒表达。

[0197] 通常,试剂盒被隔区化以便于使用,并且可以包含一个或多个装有试剂的容器。在某些实施方式中,试剂盒组分中的所有试剂盒组分一起包装。可替代地,试剂盒的一个或多个单独组分可以提供在与其它试剂盒组分分开的包装中。试剂盒也可以包含使用试剂盒组件的说明。

[0198] VI. 基因组编辑

[0199] 本文提供了一种工程化免疫细胞,其包含靶CD2核酸序列的基因改性。如上所述,可以根据多种其他已知方法实现免疫分子在效应子T细胞上表达的下调,包括例如使用大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas和锌指核酸酶的基因编辑方法。因此,在某些实施方式中,工程化免疫细胞进一步包括经过改性的基因,其中改性使靶基因或蛋白质无功能。举例来说,本发明的工程化免疫细胞还包含防止或减少CD2蛋白的表达的改性的(例如非功能性)CD2基因(使用例如大范围核酸酶、TALEN、CRISPR/Cas9或锌指核酸酶改性),和/或以其他方式(例如,在结构上)使CD2蛋白不能被CAR识别或干扰。使用此类方法改性基因表达的方法是本领域容易获得和众所周知的。

[0200] 在一些实施方式中,使用稀切核酸内切酶使工程化免疫细胞中的CD2基因失活,所述内切酶特异性地催化在一个靶基因(即,CD2)中的切割,从而使所述靶基因失活。由稀有核酸内切酶引起的核酸链断裂通常通过同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的独特机制修复。但是,NHEJ是一个不完善的修复过程,通常会导致切割位点的DNA序列发生变化。机制包括通过直接再连接(Critchlow和Jackson 1998)或通过所谓的微同源介导的末端连接(Ma, Kim等人2003)重新连接两个DNA末端的残基。通过非同源末端连接(NHEJ)进行的修复通常会导致小的插入或缺失,并可用于创建特定的基因敲除。所述改性可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。可以通过本领域公知的方法标识和/或选择发生裂解诱导的诱变事件,即与NHEJ事件连续的诱变事件的细胞。

[0201] 在特定的实施方式中,用于基因组编辑这种免疫细胞的方法包括以下步骤中的至少一个:(1)提供优选来自细胞培养物或外周血样品的免疫细胞,(b)将稀有的免疫细胞引入所述免疫细胞切割核酸内切酶,能够通过DNA切割,优选通过双链断裂分别使免疫细胞中的CD2基因选择性失活;(c)扩大所得的免疫细胞。在一些实施方式中,该方法还包括分选所得免疫细胞群以获得具有灭活的CD2基因的基本上纯净的免疫细胞群。

[0202] 在一些实施方式中,使用对CD2特异的锌指核酸酶(ZFN)使工程化免疫细胞中的CD2基因失活。ZFN包含锌指蛋白,该锌指蛋白已被工程化以结合选择基因中的靶位点和切割结构域或切割半结构域。在一些情况下,ZFN包含与人CD2基因中的靶位点特异性结合的DNA结合结构域。

[0203] 锌指结合结构域可以被工程化以结合选择的序列。参见,例如,Beerli等人(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141;Pabo等人(2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340;Isalan

等人(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal 等人(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo 等人(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416。与天然存在的锌指蛋白相比,工程改造的锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程方法包括但不限于合理设计和各种选择。合理的设计包括,例如,使用包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单个锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体的锌指的一个或多个氨基酸序列相关联或四联序列。参见,例如,共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,其通过引用整体并入本文。示例性的选择方法,包括噬菌体展示和双杂交体系,公开在美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759;和6,242,568中;以及WO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;WO 01/88197和GB 2,338,237中。另外,例如在共同拥有的WO 02/077227中描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。ZFN和用于设计和构建融合蛋白(和编码其的多核苷酸)的方法是本领域技术人员已知的,并在US20050064474和US20060188987中进行了详细描述。ZFN的其他描述可以在例如US20140030240中找到。

[0204] 使用CRISPR/Cas技术使免疫细胞中的靶基因失活的方法描述于例如美国专利公开号US2016/0272999,US2017/0204372和US2017/0119820中。用于灭活内源基因的锌指核酸酶体系详细描述在美国专利号8,735,153的说明书中,该公开通过引用并入本文。Gaj 等人, *Trends in biotechnology*, 2013, 31:397-405, 国际专利公开号WO2018/073393和美国专利公开号US2016中描述了基于转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)的基因组编辑体系/0120906。

[0205] CRISPR/Cas体系是用于诱导靶向基因改变(基因组改性)的体系。由Cas9蛋白进行的靶识别需要引导RNA(gRNA)内的“种子”序列和含有gRNA结合区的原型间隔相邻基序(PAM)序列上游的保守多核苷酸。CRISPR/Cas体系从而可以被工程化,以通过重新设计细胞系、原代细胞和工程化细胞中的gRNA来基本上切割任何DNA序列。CRISPR/Cas体系可以通过将单个Cas9蛋白与两个或更多个gRNA共表达来同时靶向多个基因组基因座,从而使此体系独特地适合于靶基因的多次基因编辑或协同活化。用于抑制基因表达的CRISPR/Cas体系的实例描述于美国公开第2014/0068797号和美国专利第8,697,359号和第8,771,945号。所述体系诱导永久性基因破坏,所述永久性基因破坏利用RNA引导的Cas9核酸内切酶来引入DNA双链断裂,所述DNA双链断裂触发易于出错的修复途径,从而引起移码突变。在一些情况下,也可以使用其它核酸内切酶,所述其它核酸内切酶包含但不限于Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、T7、Fok1、本领域已知的其它核酸酶、其同源物或其经过改性的版本。

[0206] CRISPR/Cas基因破坏发生在当将对靶基因具有特异性的gRNA序列和Cas核酸内切酶引入到细胞并且形成使Cas核酸内切酶能够在靶基因处引入双链断裂的复合物时。在一些情况下,CRISPR体系包括一种或多种表达载体,所述一种或多种表达载体包括编码Cas核酸内切酶的核酸序列和对靶基因具有特异性的引导核酸序列。引导核酸序列对基因具有特异性,并且靶向用于Cas核酸内切酶诱导的双链断裂的基因。引导核酸序列的序列可以处于基因的基因座内。在一些实施方式中,引导核酸序列在长度上为至少10个、11个、12个、13

个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、45个、50个或更多个核苷酸。引导核酸序列包含RNA序列、DNA序列、其组合(RNA-DNA组合序列)或具有合成核苷酸的序列,如肽核酸(PNA)或锁核酸(LNA)。引导核酸序列可以是单分子或双分子。在一个实施方式中,引导核酸序列包括单个导向RNA。在一些实施方式中,核酸序列可以是选自SEQ ID NO: 44-47的一种或多种。

[0207] 在一些实施方式中,可以通过CRISPR/Cas体系改性本发明的工程化免疫细胞以灭活人CD2基因。人CD2基因的基因组结构和序列的细节可以在例如NCBI Gene数据库中的Gene ID:914下找到。

[0208] 用于敲除特异性靶基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体可例如从以下获得:奥杰公司(Origene)(马里兰州罗克维尔)、金斯瑞生物科技有限公司(GenScript)(佐治亚州亚特兰大)、应用生物材料公司(Applied Biological Materials)(ABM;不列颠哥伦比亚省列治文)、BioCat公司(德国海德堡)或其它。例如,用于经由CRISPR敲除CD2的市售试剂盒或试剂盒组件包括,例如,可从目录号sc-402105,sc-419537,sc419537等获得的那些,其各自可从Santa Cruz Biotechnology获得。

[0209] 在一些实施方式中,任何基因组编辑体系可用于将本文概述的任何核酸引入免疫细胞,例如T细胞(包括但不限于 γ - δ T细胞)和NK细胞的基因组中。

[0210] CD2的基因沉默可以根据本领域技术人员公认的任何方法进行。在某些情况下,使用靶向CD2 RNA分子的短发夹RNA。用于CD2靶向RNAi的可商购的试剂包括,例如,可从Santa Cruz Biotechnology以目录号sc-29970获得的那些。

[0211] VII. 治疗的方法

[0212] 一方面,本发明涉及工程化免疫细胞的用途,所述工程化免疫细胞包含含有编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸和含有编码连接至用于治疗癌症的定位结构域的单链可变片段(scFv)的核苷酸序列的核酸,包括将治疗量的工程化免疫细胞给药于需要其的受试者。在一些实施方式中,癌症是T细胞恶性肿瘤。在某些实施方式中,T细胞恶性肿瘤是早期T细胞祖细胞急性淋巴细胞白血病(ETP-ALL)。在某些实施方式中,所述工程化免疫细胞通过以下方式给药到受试者:静脉内输注、动脉内输注、腹膜内输注、直接注射到肿瘤中和/或外科手术后肿瘤床灌注、在人工支架中在肿瘤部位植入或鞘内给药。

[0213] 在其他方面,本发明涉及工程化的免疫细胞的用途,所述工程化的免疫细胞包含含有编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列的核酸和含有编码连接至用于治疗自身免疫疾病的定位结构域的靶结合分子的核苷酸序列的核酸(例如,scFv),其包括将治疗量的工程改造的免疫细胞给药于需要其的受试者。

[0214] 在其他方面,本发明还涉及工程化的免疫细胞的用途,所述工程化的免疫细胞包含核酸,所述核酸包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列,所述核酸包含编码连接至用于治疗传染病的定位结构域的CD2(例如抗CD2scFv)的针对所述抗原的靶结合分子的核苷酸序列,包括将治疗量的所述工程化免疫细胞给药于需要其的受试者。

[0215] 在一些方面,工程化免疫细胞通过输注给药到受试者。输注免疫细胞(例如,同种异体免疫细胞或自体免疫细胞)的方法是本领域已知的。为了改善疾病的症状,向受体给药充足数量的细胞。通常,在单次设置中输注 10^7 到 10^{10} 个细胞的剂量,例如, 10^9 个细胞的剂

量。输注以单次 10^9 个细胞剂量或被分成若干个 10^9 个细胞剂量的形式给药。输注频率可以是每3天到30天或甚至更长的间隔(如果需要或指示)。输注的量通常是每位受试者至少1次输注,并且优选地,在耐受的情况下至少3次输注或者直到疾病症状已改善。细胞可以以50-250ml/hr的速率静脉内注入。其它合适的给药方式包含动脉内输注、直接注射到肿瘤中和/或外科手术后肿瘤床灌注、在肿瘤部位植入人工支架、鞘内给药和眼内给药。使本发明适应此种递送方式的方法对于本领域的技术人员是容易获得的。

[0216] 在一些方面,提供了基本上纯净的工程化免疫细胞群,其包含本文所述的任何工程化免疫细胞,其中至少90%,例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的工程化免疫细胞缺乏CD2表达。在某些情况下,基本纯净的群体包括至少80%,例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多缺少CD2表达的工程化免疫细胞。

[0217] 在其他方面,还提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症或自身免疫疾病的方法,其包括向该受试者给药治疗量的具有本文所述的任何实施方式的工程化免疫细胞,从而治疗有需要的受试者癌症或自身免疫疾病。在一些方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗癌症或自身免疫疾病的方法,其包括向所述受试者给药治疗量的具有本文所述的任何实施方式的基本上纯的工程化免疫细胞群,从而治疗有需要的受试者的癌症或自身免疫性疾病。

[0218] 在某些实施方式中,如本文所述,所述方法包括给药治疗量的工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含具有编码针对结合至定位结构域的CD2的靶结合分子的核苷酸序列的核酸的核酸。在一些情况下,第二核酸包括编码CAR的核苷酸序列。在一些实施方式中,CAR包含4-1BB和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域,以及与细胞因子例如CD2结合的抗体。

[0219] 在一些实施方式中,改造的免疫细胞对于需要治疗的受试者是自体的。在其它实施方式中,工程化免疫细胞对需要治疗的受试者是同种异体的。

[0220] 在某些实施方式中,工程化免疫细胞通过以下方式给药到受试者体内:静脉内输注、动脉内输注、直接注射入肿瘤和/或手术后灌注肿瘤床、在肿瘤部位植入人工支架中、鞘内给药以及眼内给药。

[0221] 在某些实施方式中,工程化免疫细胞通过输注给药到受试者。输注免疫细胞(例如,同种异体免疫细胞或自体免疫细胞)的方法是本领域已知的。为了改善疾病的症状,向受体给药充足数量的细胞。通常,在单次设置中输注 10^7 到 10^{10} 个细胞的剂量,例如, 10^9 个细胞的剂量。输注以单次 10^9 个细胞剂量或被分成若干个 10^9 个细胞剂量的形式给药。输注频率可以是每天、每2天到30天一次或甚至更长的间隔(如果需要或指示)。输注的量通常是每位受试者至少1次输注,并且优选地,在耐受的情况下至少3次输注或者直到疾病症状已改善。细胞可以以50-250ml/hr的速率静脉内注入。其它合适的给药方式包含动脉内输注、腹膜内输注、直接注射到肿瘤中和/或外科手术后灌注肿瘤床、在肿瘤部位植入人工支架、鞘内给药。使本发明适应此种递送方式的方法对于本领域的技术人员是容易获得的。

[0222] 在某些实施方式中,根据本发明的治疗癌症的方法与至少一种其它已知的癌症疗法(例如,化学疗法)相结合。在一些实施方式中,根据本发明的治疗癌症的方法在治疗上与抑制阴性检查点调节剂的药剂组合,例如针对PD-1、CTLA4、LAG3、TIM3、TIGIT或另一种免疫检查点分子的抗体。由于通常存在于淋巴瘤中的免疫抑制环境,这种组合在治疗T细胞淋巴

瘤时可能特别有效。

[0223] 在其他方面,还提供了具有本文所述的任何实施方式的工程化免疫细胞用于治疗癌症的用途,包括将治疗量的工程化免疫细胞给药于需要其的受试者。

[0224] 在某些实施方式中,所述工程化免疫细胞通过以下方式给药到受试者:静脉内输注、动脉内输注、腹膜内输注、直接注射到肿瘤中和/或外科手术后灌注肿瘤床、在肿瘤部位植入人工支架或鞘内给药。

[0225] 在一些实施方式中,在给药(例如输注)本文概述的工程化免疫细胞之前,用非清髓性化学疗法治疗受试者。在一些实施方式中,非清髓性化疗是环磷酰胺60mg/kg/d,持续2天(在输注工程化免疫细胞之前的第27天和26天),氟达拉滨25mg/m²/d,持续5天(第27天至23天输注工程化免疫细胞)。给受试者给药一种或多种淋巴清除(例如免疫抑制调理)剂。预处理剂的非限制性实例包括环磷酰胺,氟达拉滨及其任何组合。在例如US9,855,298中找到在CAR-T细胞疗法之前调理患者的详细方法,其内容通过引用整体并入本文。

[0226] 其他的预处理方法在Gassner等人的《癌症免疫疗法》2011,60,75-85,Muranski等人,Nat.Clin.Pract.Oncol.,2006,3,668-681,Dudley等人,J.Clin.Oncol.2008,26,5233-5239,and Dudley等人,J.Clin.Oncol.2005,23,2346-2357中有描述,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0227] 在一些实施方式中,在接受非清髓性化疗和输注工程化的免疫细胞之后,受试者接受静脉内给药细胞因子,例如IL-2,IL-7,IL-15或其任意组合。在一些实施方式中,在接受非清髓性化疗之后,患者接受与IL-2,IL-7,IL-15或其任何组合组合的工程化免疫细胞群。在一些情况下,IL-2,IL-7,IL-15或其任何组合在细胞群体后给药。在某些情况下,IL-2,IL-7,IL-15或其任何组合与细胞群同时给药。IL-2包括IL-2(aldesleukin),其生物类似物或其变体。

[0228] 在一些实施方式中,IL-2包括高剂量IL-2方案,例如但不限于在给药本文所述的治疗有效群体的工程化免疫细胞后的第二天开始静脉内给药,其中IL-2被给药剂量为0.037mg/kg或0.044mg/kg IU/kg(患者体重),每八小时使用15分钟推注静脉滴注,直到耐受为止,最多14剂。休息9天后,可以重复进行另外14剂的给药计划,总共最多28剂。

[0229] 在其它实施方式中,IL-2的剂量的大约 18×10^6 IU/m²的经6小时静脉内给药,随后12小时的剂量 18×10^6 IU/m²,随后24小时的剂量 18×10^6 IU/m²,以及随后72小时的剂量 18×10^6 IU/m²。这种治疗方案可以每28天重复一次,最多四个周期。在一些实施方式中,IL-2方案在第1天包含18,000,000IU/m²,在第2天包含9,000,000IU/m²,在第3和第4天包含4,500,000IU/m²。在另一个实施方式中,IL-2方案包括每1、2、4、6、7、14或21天以0.10mg/天至50mg/天的剂量给药聚乙二醇化IL-2。

[0230] 在一些实施方式中,工程改造的免疫细胞或工程改造的免疫细胞群作为联合治疗的一部分给药,例如与另一种治疗干预措施(例如抗体或工程改造的细胞或受体)同时或以任何顺序依次进行或药剂,例如细胞毒性或治疗剂。在一些实施方式中,将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同或与另一种治疗干预一起以任何顺序同时或顺序地共同给药。在一些实施方式中,将细胞与时间足够接近的另一种疗法共同给药,以使细胞群增强一种或多种其他治疗剂的作用,反之亦然。在一些实施方式中,在一种或多种其他治疗剂之前给药细胞。在一些实施方式中,在一种或多种另外的治疗剂之后给药细胞。在一些实施方式中,一

种或多种另外的试剂包括细胞因子,例如IL-2,以增强持久性。在一些实施方式中,该方法包括给药化学治疗剂。在一些实施方式中,治疗剂抑制阴性检查点调节剂,例如但不限于针对PD-1,CTLA4,LAG3,TIM3,TIGIT或另一免疫检查点分子的抗体。

[0231] 在给药本文所述的工程化免疫细胞后,在一些实施方式中,例如通过许多已知方法中的任何一种来测量工程化细胞群的生物学活性。评估的参数包括在体内例如通过成像或在体外(例如通过ELISA或流式细胞术)工程改造的或天然的T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合。在某些实施方式中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用本领域已知的任何合适方法来测量,例如描述于例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)中的细胞毒性测定法,和Herman等人,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方式中,通过测定一种或多种细胞因子例如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。在某些方面,通过评估临床结果例如降低癌症负担或负担来测量生物学活性。

[0232] VIII. 本发明的示例性实施方式

[0233] 一方面,本发明提供了编码抗CD2-4-1BB-CD3 ζ 嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸,其包含抗CD2单链可变片段(scFv)结构域,CD8 α 铰链跨膜结构域,4-1BB细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0234] 在任何实施方式的多核苷酸中,所述CAR的抗CD2 scFv结构域包含具有与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方式的多核苷酸中,所述CAR的CD8 α 铰链跨膜结构域包含具有与SEQ ID NO:15的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方式的多核苷酸中,所述CAR的所述4-1BB细胞内信号传导结构域包含具有与SEQ ID NO:16的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方式的多核苷酸中,所述CAR的CD3 ζ 信号传导结构域包含具有与SEQ ID NO:17的至少90%的序列同一性的氨基酸序列。在任何实施方式的多核苷酸中,CAR包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在某些情况下,CAR具有与SEQ ID NO:10中的任何一个的至少80%(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的核酸序列。

[0235] 本文提供了分离的病毒载体,其包含编码本文描述的CAR的任何一种多核苷酸。在本发明的一些方面,将包含编码本文概述的CAR的多核苷酸中的任一种的分离的病毒载体引入免疫细胞。

[0236] 本文还提供了工程改造的免疫细胞,其包含本文所述的抗CD2-4-1BB-CD3 ζ 嵌合抗原受体。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程同种异体细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程自体细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程化T细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程化NK细胞。

[0237] 本文提供了分离的病毒载体,其包含编码CD2阻断多肽的多核苷酸,所述CD2阻断多肽包含与连接至细胞定位结构域的N末端的CD2结合的单链可变片段(scFv),其中细胞定

位结构域包含选自内质网 (ER) 保留序列, 高尔基保留序列和蛋白体定位序列组成的组, 其中所述CD2阻断多肽结合细胞内的内源性CD2。

[0238] 在实施方式中任一项的分离的病毒载体中, 所述scFv包含: (i) 具有与SEQ ID NO: 18的至少90% (例如90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的可变重链 (VH) 序列, 和具有与SEQ ID NO: 19的至少90% (例如90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的可变轻链 (VL) 序列, 或 (ii) 具有与SEQ ID NO: 20至少90% (例如90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的可变重链 (VH) 序列, 和具有与SEQ ID NO: 21的至少90% (例如90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的可变轻链 (VL) 序列。

[0239] 在任何一个实施方式的分离的病毒载体中, 所述ER保留序列包含选自KDEL, KKXX, KKMP和KKTN的氨基酸序列, 其中X可以是任何氨基酸。或所述高尔基保留序列选自YGRL (SEQ ID NO: 40), YQRL (SEQ ID NO: 41), YKGL (SEQ ID NO: 42) 和YXXL (SEQ ID NO: 43), 其中X可以是任何氨基酸。在实施方式中任一项的分离的病毒载体中, 所述CD2阻断多肽还包含连接在所述scFv和所述ER保留序列结构域之间的跨膜结构域, 所述ER保留序列结构域包含KKMP或KKTN, 或所述Golgi保留序列结构域包含YGRL, YQRL, YKGL。跨膜结构域是选自CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS, 和FGFR2B。在实施方式中任一项的分离的病毒载体中, 所述跨膜结构域包含CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

[0240] 在实施方式中任一项的分离的病毒载体中, 所述CD2阻断多肽包含具有与选自SEQ ID NOS: 1-4的任何一种序列至少90% (例如, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中, CD2阻断多肽包含具有与SEQ ID NOS: 6-9中的任何一个至少80% (例如80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%) 的序列同一性的氨基酸序列。

[0241] 在本发明的一些方面, 将包含编码本文概述的任何CD2阻断多肽的多核苷酸的分离的病毒载体引入免疫细胞。

[0242] 本文还提供了一种工程化免疫细胞, 其包含本文所述的CD2阻断多肽。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程同种异体细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程自体细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程化T细胞。任何实施方式的工程化免疫细胞是工程化NK细胞。

[0243] 一方面, 本文提供了包含多肽的工程化免疫细胞, 所述多肽包含与细胞定位结构域连接的靶结合分子, 其中所述靶结合分子是结合CD2蛋白 (例如人CD2蛋白) 的抗体, 细胞定位结构域包含选自由内质网 (ER) 保留序列、高尔基保留序列和蛋白体定位序列组成的组的氨基酸序列, 并且与定位结构域连接的靶结合分子不由工程化细胞分泌。

[0244] 在一些实施方式中, 结合CD2蛋白 (例如人CD2蛋白) 的抗体是抗CD2单链可变片段 (scFv)。在一些实施方式中, scFv包含与SEQ ID NO: 18具有至少90%序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和与SEQ ID NO: 19具有至少90%序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。在一些实施方式中, scFv包含SEQ ID NO: 18所示的可变重链 (V_H) 序列和SEQ ID NO: 19所示的可变轻链

(V_L) 序列。

[0245] 在一些实施方式中, scFv 包含与 SEQ ID NO:20 具有至少 90% 序列同一性的可变重链 (V_H) 序列和与 SEQ ID NO:21 具有至少 90% 序列同一性的可变轻链 (V_L) 序列。在某些实施方式中, scFv 包含 SEQ ID NO:20 所示的可变重链 (V_H) 序列和 SEQ ID NO:21 所示的可变轻链 (V_L) 序列。

[0246] 在一些实施方式中, 细胞定位结构域包含选自 KDEL, KKXX, KKMP 或 KKTN 的氨基酸序列, 其中 X 可以是任何氨基酸。在某些实施方式中, 多肽还包含连接在靶结合分子和细胞定位结构域之间的跨膜结构域。在某些情况下, 跨膜结构域衍生自 CD8 α 、CD8 β 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS 或 FGFR2B。

[0247] 在某些实施方式中, 跨膜结构域包含衍生自 CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

[0248] 在各种实施方式中, 工程化免疫细胞的多肽包含具有与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的至少 90% (例如, 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 的序列同一性的氨基酸序列。该多肽可以包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

[0249] 在某些实施方式中, 工程化免疫细胞的多肽包含具有与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的至少 90% (例如, 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 的序列同一性的氨基酸序列。该多肽可以包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

[0250] 在一些实施方式中, 工程化免疫细胞还包含嵌合抗原受体 (CAR)。在某些情况下, CAR 是抗 CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR。抗 CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR 可包含与 SEQ ID NO:5 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。抗 CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR 可以结合 CD2 (例如人 CD2)。在某些情况下, 这种抗 CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR 可以被称为“CD2 CAR”。

[0251] 在一些实施方式中, 工程化免疫细胞诱导 CD2⁺ 细胞的细胞毒性。

[0252] 在一些实施方式中, 内源 CD2 表达在工程化免疫细胞中被阻断。内源性 CD2 表达的阻断可以持续至少 6 个月。内源性 CD2 表达的阻断可以持续至少 12 个月。

[0253] 在一些实施方式中, 工程化免疫细胞以与相当的免疫细胞基本相等的速率增殖。在某些实施方式中, 工程化免疫细胞是工程同种异体细胞或工程自体细胞。在其他实施方式中, 工程化免疫细胞是工程化 T 细胞, 例如 γ - δ T 细胞。

[0254] 在另一方面, 本文提供了在有需要的受试者中治疗癌症或自身免疫疾病的方法, 其包括向受试者给药治疗量的包含本文所述的工程化免疫细胞中的任一种的组合物, 从而治疗需要的受试者的癌症或自身免疫疾病。在某些情况下, 该组合物还包含药学上可接受的载体。该癌症可以是 T 细胞恶性肿瘤或 CD2 相关的癌症。在一个实施方式中, T 细胞恶性肿瘤是早期 T 细胞祖细胞急性淋巴细胞白血病 (ETP-ALL) 或另一种 T 细胞白血病。在另一个实施方式中, T 细胞恶性肿瘤是淋巴瘤, 包括但不限于皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL), 蕈样真菌病, Sezary 综合症或外周 T 细胞淋巴瘤 (PTCL)。

[0255] 在某些实施方式中, 给药是通过静脉内输注, 动脉内输注, 腹膜内输注, 在手术后直接注射入肿瘤和/或灌注肿瘤床, 在肿瘤部位植入人工支架或鞘内给药。

[0256] 在另一方面, 本文提供了编码包含连接至细胞定位结构域的靶结合分子的多肽的多核苷酸。在某些情况下, 靶结合分子是结合 CD2 蛋白 (例如人 CD2 蛋白) 的抗体, 细胞定位结构域包含选自内质网 (ER) 保留序列, 高尔基的氨基酸序列。保留序列和蛋白体定位序列以

及与定位结构域连接的靶结合分子不被工程化细胞分泌。

[0257] 在特定的实施方式中,结合CD2蛋白(例如人CD2蛋白)的抗体是抗CD2单链可变片段(scFv)。在某些实施方式中,scFv包含具有与SEQ ID NO:18的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的可变重链(V_H)序列和具有与SEQ ID NO:19的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的可变轻链(V_L)序列。在一些实施方式中,scFv包含SEQ ID NO:18所示的可变重链(V_H)序列和SEQ ID NO:19所示的可变轻链(V_L)序列。

[0258] 在其他实施方式中,scFv包含具有与SEQ ID NO:20至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的可变重链(V_H)序列,以及具有与SEQ ID NO:21的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的可变轻链(V_L)序列。在某些实施方式中,scFv包含SEQ ID NO:20所示的可变重链(V_H)序列和SEQ ID NO:21所示的可变轻链(V_L)序列。

[0259] 在一些实施方式中,细胞定位结构域包含选自KDEL, KKXX, KKMP或KKTN的氨基酸序列,其中X可以是任何氨基酸。在某些实施方式中,多肽还包含连接在靶结合分子和细胞定位结构域之间的跨膜结构域。在某些情况下,跨膜结构域衍生自CD8 α , CD8 β , 4-1BB, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , CD32, CD64, VEGFR2, FAS或FGFR2B。

[0260] 在某些实施方式中,跨膜结构域包含衍生自CD8 α 的铰链-跨膜结构域。

[0261] 在某些实施方式中,工程化免疫细胞的多肽包含具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。该多肽可以包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0262] 在各种实施方式中,工程化免疫细胞的多肽包含具有与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。该多肽可以包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0263] 在某些实施方式中,本文所述的PEBL包含具有与SEQ ID NO:6-9中的任何一个的至少80%(例如80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%)的序列同一性的核酸序列。

[0264] 在一些实施方式中,本文提供了包含本文所述的多核苷酸中的任一种的表达载体。在某些情况下,表达载体还包括编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列。该CAR可以是抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR。在一些实施方式中,抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR包含具有与SEQ ID NO:5的至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0265] 在一些实施方式中,表达载体包含具有与SEQ ID NO:10的任何一个的至少80%(例如80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%)的序列同一性的核酸序列。在某些情况下,表达载体包含SEQ ID NO:10的核酸序列。在一些实施方式中,表达载体包含具有与SEQ ID NO:6-9中的任何一个的至少80%(例如80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%)的序列同一性的核酸序列。在某些情况下,表达载体包含SEQ ID NOS:6-9中任一项的核酸序列。

[0266] 在一些实施方式中,本文提供的宿主细胞包含本文描述的任何一种表达载体。

[0267] 在另一方面,本文提供了用于产生工程化的免疫细胞的方法,该方法包括:将本文公开的多核苷酸或表达载体中的任何一个引入免疫细胞。在一些实施方式中,内源CD2表达在工程化免疫细胞中被阻断。在一些实施方式中,工程化免疫细胞是工程同种异体细胞或工程自体细胞。在其他实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞,例如 γ - δ T细胞。

[0268] 一方面,本文提供了分离的抗CD2-4-1BB-CD3 ζ 嵌合抗原受体(CAR)分子,其包含抗CD2单链可变片段(scFv)结构域,CD8 α 铰链跨膜结构域,4-1BB细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。抗CD2单链可变片段(scFv)结构域可包含具有与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的至少90%(例如90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。CD8 α 铰链跨膜结构域可包括具有与SEQ ID NO:15的至少90%序列同一性的氨基酸序列。4-1BB细胞内信号传导结构域可以包含具有与SEQ ID NO:16的至少90%(例如90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。CD3 ζ 信号传导结构域可以包含具有与SEQ ID NO:17的至少90%(例如90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的CAR分子包含具有与SEQ ID NO:5至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在另一方面,本文提供了编码本文所述的任何分离的CAR分子的分离的核酸分子。抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR可以结合CD2(例如人CD2)。

[0269] 在另一方面,本文提供了工程改造的免疫细胞,其包含包含抗CD2-4-1BB-CD3 ζ 嵌合抗原受体(CAR)的多肽,所述抗CD2-4-1BB-CD3 ζ 嵌合抗原受体(CAR)包含抗CD2单链可变片段(scFv)结构域,CD8 α 铰链跨膜结构域,4-1BB细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。抗CD2-4-1BB-CD3 ζ CAR可以结合CD2(例如人CD2)。

[0270] 在一些实施方式中,抗CD2单链可变片段(scFv)结构域包含具有与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD8 α 铰链跨膜结构域包括具有与SEQ ID NO:15的至少90%(例如,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,4-1BB细胞内信号传导结构域包含具有与SEQ ID NO:16的至少90%(例如,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方式中,CD3 ζ 信号传导结构域包含具有与SEQ ID NO:17的至少90%的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的CAR分子包含具有与SEQ ID NO:5至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的CAR分子包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的CAR分子包含SEQ ID NO:10的核酸序列。

[0271] 在一些实施方式中,工程化免疫细胞是工程同种异体细胞或工程自体细胞。在其他实施方式中,工程化免疫细胞是工程化T细胞,例如 γ - δ T细胞。

[0272] 为了所有目的,诸如WO 2016/126213和PCT/US2017/063048的说明书,权利要求书和附图的内容通过引用整体并入本文。

[0273] 实例

[0274] 实例1:阻断T细胞中CD2表达以进行有效的嵌合抗原受体治疗

[0275] 该实施方式说明了用新方法 with 第二代CAR结合阻断CD2表达,从而产生有效的抗CD2 CAR-T细胞。这种实用的策略为癌症患者提供了新的治疗选择。

[0276] 图1提供了示例性的抗CD2嵌合抗原受体(CAR)。抗CD2单克隆抗体9.6的scFv连接至CD8 α 信号肽,CD8 α 铰链跨膜结构域以及先前在实验室中开发的抗CD19-4-1BB-CD3 CAR4-1BB和CD3 ζ 的胞内结构域。将抗CD2单克隆抗体9.6或9-1的scFv连接至CD8 α 信号肽,以及编码定位结构域和任选地CD8 α 铰链跨膜结构域的序列。将它们亚克隆到鼠干细胞病毒(MSCV)载体中。在某些情况下,MSCV是包含萤火虫荧光素酶基因的MSCV内部核糖体进入位点(IRES)-绿色荧光蛋白(GFP)逆转录病毒载体。

[0277] 将9.6抗CD2CAR逆转录病毒载体构建体转导至白血病细胞(白血病细胞系)中。根据本领域技术人员已知的标准方案进行逆转录病毒上清液的制备和转导。表达结果示于图2。

[0278] 具有CD2基因的CCRF-CEM细胞也用9.6抗CD2CAR逆转录病毒载体构建体转导。将所得细胞维持在补充有10%FBS和1%Pen-Strep的RPMI-1640培养基中。评估了9.6抗CD2的活性。图3显示在存在CD2靶细胞的情况下,抗CD2CAR诱导了CD2和CD69(激活标记)的表达。

[0279] 为了确定抗CD2 CAR在外周血T淋巴细胞中的作用,通过逆转录病毒转导或电穿孔将抗CD2 CAR引入原代T细胞。图4显示了CAR表达。

[0280] 图5显示了当CD2+靶细胞(MOLT-4)与用抗CD2CAR转导或仅用含有GFP的载体转导的白血病细胞共培养时,抗CD2CAR的功能。在某些情况下,将细胞以1:1E:T共培养。结果表明,9.6抗CD2 CAR-T细胞对CD2+靶细胞具有细胞毒性。

[0281] 图6显示了抗CD2 PEBL构建体的示例性实施方式。逆转录病毒将9.6个PEBL和9-1个PEBLs转导入白血病细胞。图7的直方图显示CD2表达的下调。

[0282] 图8显示9.6PEBL II下调人外周血T细胞中的CD2表达。

[0283] 白血病细胞经过CRISPR/Cas9基因组编辑以失活内源CD2表达。另外,用抗CD2 PEBL转导了基因编辑的白血病细胞。图9的直方图显示了白血病细胞中CD2的下调。图10显示了基因编辑的白血病细胞中的切割产物。

[0284] 实例2:白血病细胞中CD2的基因改性

[0285] 这个例子说明了使用基于CRISPR的平台在白血病细胞中内源性CD2表达的下调。

[0286] 这些gRNA序列与WT SpCas9一起使用以引入DSB进行基因组编辑。这些sgRNA序列在Sanjana等人,Nat Methods,2014年8月,11(8):783-4中进行了描述和验证。

[0287] 表2. 示例性的引导RNA靶序列。

[0288]	SEQ ID NO:	gRNA名称	gRNA靶序列
	SEQ ID NO:44	CD2 CRISPR引导RNA 1	CAAAGAGATTACGAATGCCT
	SEQ ID NO:45	CD2 CRISPR引导RNA 2	CTTGATAGATATCCTGATCAT
	SEQ ID NO:46	CD2 CRISPR引导RNA 4	CACGCACCTGGACAGCTGAC
	SEQ ID NO:47	CD2 CRISPR引导RNA 5	GGTTGTGTTGATACAAGTCC

[0289] 慢病毒构建体

[0290] 通过Genscript将所有四个CD2 CRISPR sgRNA构建体克隆到pLentiCRISPR v2慢病毒载体中。

[0291] 细胞培养

[0292] 将293T细胞(ATCC CRL-3216)保持在DMEM(Gibco)中,其中含有10%FBS(Hyclone),100U/mL青霉素和100ug/mL链霉素(Gibco)。将白血病细胞-E6细胞保存在RPMI1640(Gibco),10%FBS(Hyclone),100U/mL青霉素,100ug/mL链霉素(Gibco)和1x GlutaMAX(Gibco)中。

[0293] 病毒生产

[0294] 293T细胞用慢病毒转移载体和Virapower包装质粒混合物(Invitrogen)以1:4的DNA:Lipofectamine 2000(Invitrogen)比例共转染。转染后6小时,将新鲜的DMEM(Gibco)和10%FBS(Hyclone)替换为转染培养基。3天后,收集病毒上清液,通过0.45μm过滤器,然后使用Lenti-X浓缩器(Clontech)浓缩100倍。将浓缩的病毒原种保存在-140℃下直至使用。

[0295] 293T细胞的病毒滴定

[0296] 在5μg/mL聚丙烯(Sigma)存在下,用不同体积的慢病毒转导293T细胞。过夜培养15小时后,除去转导培养基,并在新鲜培养基中于37℃用10U/mL DNase I(New England Biolabs)处理细胞1小时。然后将培养基替换为新鲜的含10%FBS的DMEM,以进行进一步培养。在转导后≥72h收集转导的细胞用于分析。使用RT-qPCR确定病毒滴度。

[0297] 使用以下公式从基因组DNA的RT-qPCR数据计算出整合单位(IU)滴度:[IU/ml=(每个样品中293T细胞的数量×每个基因组中前病毒基因拷贝的数量)÷以毫升为单位的病毒体积]。使用在前病毒基因拷贝数和病毒量的线性范围内的样品计算IU滴度。

[0298] 白血病细胞转导

[0299] 用慢病毒载体以MOI 1或5转导白血病细胞。在转导后≥72h收集转导的细胞用于分析。

[0300] 流式细胞仪

[0301] 用染色缓冲液(1xPBS pH7.4,0.2%BSA,0.02%叠氮化钠)进行抗体染色和洗涤。将细胞与抗体在冰上孵育20分钟,并洗涤3次。以下抗体用于染色:抗人CD2-PE(克隆RPA-2.10,eBioscience 12-0029-42),抗人CD3 eFluor780(克隆OKT3,eBioscience 47-0037-42)。DAPI以2μg/mL的浓度用于活/死鉴别。在Invitrogen Attune NxT流式细胞仪上收集染色的细胞,并用FlowJo v10软件进行分析。

[0302] 实时定量PCR(RT-qPCR)

[0303] 使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen)和RNase A(Qiagen)从细胞中提取基因组DNA。所有套件均根据制造商的建议使用。使用iTaq Universal SYBR Green Supermix(Bio-Rad)在CFX96 Touch™实时PCR检测体系(Bio-Rad)上进行RT-qPCR。

[0304] 使用的引物是:RPPH1-F:5'-AGCTTGGAACAGACTCACGG-3'(SEQ ID NO:48);和RPPH1-R:5'-AATGGGCGGAGGAGAGTAGT-3'(SEQ ID NO:49);WPRES-F:5'-CCTTTCCGGGACTTTTCGCTTT-3'(SEQ ID NO:50);WPRES-R:5'-GCAGAATCCAGGTGGCAACA-3'(SEQ ID NO:51);VSVG-F:5'-AGGGAAGTGTGGGATGACTG-3'(SEQ ID NO:52);和VSVG-R:5'-GAACACCTGAGCCTTTGAGC-3'(SEQ ID NO:53)。所有测定引物的引物效率在90%至110%之间。

[0305] 使用等式将所有基因的折叠变化标准化为管家基因:[折叠变化= $2^{-(Ct^{(\text{靶基因})}-Ct^{(\text{管家基因})})}$]。将靶基因的拷贝数标准化为RNaseP的基因组拷贝数。

[0306] 图11显示了如通过流式细胞术确定的,CD2在转导的白血病细胞上的表达。用指定

的慢病毒在MOI 1或5转导白血病细胞,并在转导后8天通过流式细胞仪分析CD2的表达。

[0307] 在MOI 1上携带CD2 sgRNA1的慢病毒转导的12.2%白血病细胞表现出CD2敲低。在MOI 5用慢病毒转导的26.9%白血病细胞表现出CD2敲低。

[0308] 用MOI 1携带CD2 sgRNA2的慢病毒转导的26.5%白血病细胞表现出CD2敲低。在MOI 5用慢病毒转导的53.2%白血病细胞显示CD2敲低。

[0309] 在MOI 1上携带CD2 sgRNA4的慢病毒转导的14.1%白血病细胞显示CD2敲低。在MOI 5用慢病毒转导的35.8%白血病细胞表现出CD2敲低。

[0310] 在MOI 1处携带CD2 sgRNA5的慢病毒转导的44.8%白血病细胞表现出CD2敲低。在MOI 5用慢病毒转导的71.7%白血病细胞表现出CD2敲低。

[0311] 数据显示经过基于CRISPR/Cas9的基因改性的白血病细胞中CD2表达(例如细胞表面表达)的有效减少或减少。

[0312] 本文引用的所有专利、公开的申请和参考文献的教导均通过引用整体并入本文。

[0313] 虽然通过参考这些示例实施方式具体地示出和描述了本发明,但本领域的技术人员应当理解的是,在不脱离由所附权利要求涵盖的本发明的范围的情况下,可以在其中做出形式和细节方面的各种改变。

序列表

<110> 新加坡国立大学
 <120> 用于T细胞恶性肿瘤的免疫治疗的嵌合抗原受体和CD2的基因编辑
 <130> 119419-5005-W0
 <140> Filed Herewith
 <141> 2019-05-23
 <150> 62/675,525
 <151> 2018-05-23
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 1

[0001] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 85 90 95
 Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His
 100 105 110
 Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

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

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
165 170 175

Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
195 200 205

Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met
210 215 220

Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
225 230 235 240

[0002]

Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu
275 280 285

Leu

<210> 2
<211> 348
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 2

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His
100 105 110

Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg
115 120 125

[0003]

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

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

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
165 170 175

Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
195 200 205

Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met
210 215 220

Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
225 230 235 240

Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Lys Tyr Lys
325 330 335

Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
340 345

[0004]

<210> 3
<211> 291
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
50 55 60

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

	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
					85					90					95		
	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	
				100					105					110			
	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Leu	Ser	Ser	His	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	
			115					120					125				
	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		130					135					140					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	
	145					150					155					160	
	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
					165					170					175		
	Thr	Arg	Tyr	Trp	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Ile	Gln	Gly	Leu	
				180					185					190			
[0005]	Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	
			195					200					205				
	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Gly	
		210					215					220					
	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
	225					230					235					240	
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Glu	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	
					245					250					255		
	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				260					265					270			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Glu	Lys	
			275					280					285				
	Asp	Glu	Leu														
			290														
	<210>	4															
	<211>	350															

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 4

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30

Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln
 35 40 45

Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
 50 55 60

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

[0006] Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

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

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

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 165 170 175

Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu
 180 185 190

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 195 200 205

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

[0007]

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Lys
325 330 335

Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met Pro
340 345 350

<210> 5

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

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

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

[0008]

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
165 170 175

Thr Arg Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
195 200 205

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	
			275					280					285				
	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	
	290						295					300					
	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	
	305					310					315					320	
	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	
				325						330					335		
	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	
				340					345					350			
	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	
			355					360					365				
	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	
	370						375					380					
[0009]	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
	385					390					395					400	
	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	
				405						410					415		
	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	
				420					425					430			
	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	
			435					440				445					
	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	
	450						455					460					
	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	
	465					470					475					480	
	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg									
					485												
	<210>	6															
	<211>	892															

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 6
gaattcggt tccaccatgg ctctgcccgt gaccgcctg ctgctgcctc tggtcttctgt 60
gctgcacgct gcccgcccaa tcgtgatgac ccagagccca gccaccctgt ccgtgacacc 120
tggcgaccgg gtgtctctga gctgcagagc ctcccagtct atcagcgatt acctgcaactg 180
gtatcagcag aagtcccacg agtctccccg gctgctgac aagtacgcta gccagtctat 240
cagcggcatc cctagccggt tctccggatc tggaagcgga tccgacttta ccctgagcat 300
caactccgtg gagccagagg atgtgggcgt gtactattgc cagaatggcc actccttccc 360
cctgaccttt ggccgcccga caaagctgga gctgcggaga ggccggcggt gctctggagg 420
aggaggaagc ggaggaggag gctcccagg gtgagctgag cagccaggaa cagagctggt 480
gcggccccgc agctccgtga agctgtcctg taaggcctct ggctacacct tcacaagcta 540
ttgggtgaac tgggtgaagc agaggcctga ccagggcctg gaggatcg gaaggatcga 600
cccatacgt tctgagacac actataacca gaagtttaca gacaaggcca tcagcaccat 660
[0010] cgatacatct agcaataccg cctatatgca gctgtccacc ctgacatctg atgccagcgc 720
cgtgtactat tgttctagga gccctcgca ctctctaca aatctggcag attggggaca 780
gggcaccctg gtgacagtga gctccggtg tgggcgagt ggtggcggtg gctcaggcgg 840
tggtggctcc ggtggcggtg gctctgcaga aaaagatgag ttgtaactcg ag 892

<210> 7
<211> 1069
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 7
gaattcggt tccaccatgg ctctgcccgt gaccgcctg ctgctgcctc tggtcttctgt 60
gctgcacgct gcccgcccaa tcgtgatgac ccagagccca gccaccctgt ccgtgacacc 120
tggcgaccgg gtgtctctga gctgcagagc ctcccagtct atcagcgatt acctgcaactg 180
gtatcagcag aagtcccacg agtctccccg gctgctgac aagtacgcta gccagtctat 240
cagcggcatc cctagccggt tctccggatc tggaagcgga tccgacttta ccctgagcat 300
caactccgtg gagccagagg atgtgggcgt gtactattgc cagaatggcc actccttccc 360

	cctgaccttt ggcgccggca caaagctgga gctgcggaga ggcgccggcg gctctggagg	420
	aggaggaagc ggaggaggag gctcccaggt gcagctgcag cagccaggaa cagagctggt	480
	gcgcccccgc agctccgtga agctgtcctg taaggcctct ggctacacct tcacaagcta	540
	ttgggtgaac tgggtgaagc agaggcctga ccagggcctg gagtggatcg gaaggatcga	600
	cccatacgat tctgagacac actataacca gaagtttaca gacaaggcca tcagcaccat	660
	cgatacatct agcaataccg cctatatgca gctgtccacc ctgacatctg atgccagcgc	720
	cgtgtactat tgttctagga gccctcgca ctcctctaca aatctggcag attggggaca	780
	gggcaccctg gtgacagtga gctccaagcc aaccacaacc cctgcaccaa ggccacctac	840
	accagcacct accatcgcaa gccagccact gtccctgagg ccagaggcat gtaggcctgc	900
	agcaggaggc gccgtgcaca cacgcggcct ggactttgcc tgcgatatct acatctgggc	960
	accactggca ggaacctgtg gcgtgctgt gctgagcctg gtgattaccc tgtataagta	1020
	caagtccaga cgctcattca ttgaggaaaa gaaaatgcct taactcgag	1069
[0011]	<210> 8	
	<211> 898	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 8	
	gaattcggt tccacatgg ctctgccgt gaccgcctg ctgtgcctc tggctctgct	60
	gctgcacgt gcccgccaa acatcatgat gaccagtc cccagctccc tggccgtgtc	120
	tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgctgt actcctctaa	180
	ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccggc cagagcccta agctgtgat	240
	ctattgggca agcaccggg agtccggagt gccagacaga ttcaccggaa gcgatccgg	300
	aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg	360
	ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg	420
	aggaggagga tccggaggag gaggtctgtg cggcggcggc agccagctgc agcagccagg	480
	agcagagctg gtgaggcccc gtcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggtacac	540
	cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgcct atccagggcc tggagtggat	600
	cggcaacatc gacctctg atagcgagac aactacaat cagaagtta aggacaaggc	660
	cacctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc	720

	cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg	780
	gggccagggc acctccgtga cagtgtcctc tgggtggggc ggcagtgggtg gcgggtggctc	840
	aggcgggtgt ggctccgggtg gcgggtggctc tgcagaaaaa gatgagttgt aactcgag	898
	<210> 9	
	<211> 1075	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 9	
	gaattcggct tccaccatgg ctctgcccgt gaccgccctg ctgctgcctc tggctctgct	60
	gctgcacgct gcccgcccaa acatcatgat gaccagtc cccagctccc tggccgtgtc	120
	tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgctgt actcctctaa	180
	ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccggc cagagcccta agctgctgat	240
	ctattgggca agcaccggg agtccggagt gccagacaga ttcaccggaa gcggatccgg	300
	aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg	360
[0012]	ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg	420
	aggaggagga tccggaggag gaggctctgg cggcggcggc agccagctgc agcagccagg	480
	agcagagctg gtgaggcccg gctcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggctacac	540
	cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgcct atccagggcc tggagtggat	600
	cggcaacatc gacctatctg atagcgagac aactacaat cagaagttaa aggacaaggc	660
	cacctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc	720
	cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg	780
	gggccagggc acctccgtga cagtgtcctc taagccaacc acaaccctg caccaaggcc	840
	acctacacca gcacctacca tcgcaagcca gccactgtcc ctgaggccag aggcatgtag	900
	gcctgcagca ggaggcgccg tgcacacacg cggcctggac tttgcctgcg atatctacat	960
	ctgggcacca ctggcaggaa cctgtggcgt gctgctgctg agcctgggtga ttaccctgta	1020
	taagtacaag tccagacgct cattcattga ggaaaagaaa atgcctaac tcgag	1075
	<210> 10	
	<211> 1549	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 10

gaattcggct tccacatgg ctctgcccgt gaccgccctg ctgctgcctc tggctctgct	60
gctgcacgct gccgccecaa acatcatgat gaccagtc cccagctccc tggccgtgtc	120
tgccggagag aaggtgacca tgacatgcaa gtctagccag tccgtgctgt actcctctaa	180
ccagaagaat tacctggcct ggtatcagca gaagcccggc cagagcccta agctgctgat	240
ctattgggca agcaccggg agtccggagt gccagacaga ttcaccggaa gcggatccgg	300
aacagacttc accctgacaa tcagctccgt gcagcctgag gacctggccg tgtactattg	360
ccaccagtac ctgtctagcc acaccttcgg cggcggcaca aagctggaga tcaagagggg	420
aggaggagga tccggaggag gaggtctctgg cggcggcggc agccagctgc agcagccagg	480
agcagagctg gtgaggcccc gctcctctgt gaagctgtct tgtaaggcca gcggctacac	540
cttcacaagg tattggatcc actgggtgaa gcagcgccct atccagggcc tggagtggat	600
cggcaacatc gacctatctg atagcgagac aactacaat cagaagttaa aggacaaggc	660
cacctgaca gtggataaga gctccggcac cgcctatatg cagctgtcta gcctgacatc	720
[0013] cgaggactct gccgtgtact attgtgccac agaggatctg tactatgcca tggagtactg	780
gggccagggc acctccgtga cagtgtcctc taccactaca cctgcaccaa ggctccac	840
acccgctccc actatcgctt ccagccact gtccctgagg cccgaggcct gcaggccagc	900
agctggcgga gccgtgcata ctagggggt ggacttcgct tgcgacatct acatctgggc	960
cccactggca gggacatgcg gagtctgct gctgtccctg gtcacacac tgtactgcaa	1020
gcggggggcg aaaaaactgc tgtatatctt taagcagcct ttcagagac cagtgcagac	1080
aaccagagag gaagatgggt gctcatgccg gtttcccgag gaggaggaag gcggctgcga	1140
gctgagggtg aagttttccc gctcagcaga tgctcctgcc taccagcagg gccagaacca	1200
gctgtataat gagctgaacc tgggcagacg cgaagagtat gatgtgctgg acaaaaggcg	1260
gggaagagac ccgaaatgg gagggagcc aaggcgaaa aacccccagg agggcctgta	1320
caatgagctg cagaaggaca aaatggcaga ggcttacagt gagattggga tgaagggaga	1380
gagacggagg ggaaaagggc acgatggcct gtaccagggg ctgagcacag caaccaaaga	1440
tacttatgac gcactgcaca tgcaggcact gccaccaga tgacagccag gggatttcac	1500
cactcaaagg ccagacctgc agaccccag attatgagac acactcgag	1549

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 11

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 12

[0014] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu Leu
20 25

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 14

Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met
1 5 10 15

Pro

<210> 15

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

[0015]

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

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Ile
50 55 60

Thr Leu Tyr
65

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

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> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 17

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

[0016]

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Ile Ser Thr Ile Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Ala Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Ser Pro Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Ala Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp
1 5 10 15

Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
35 40 45

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg
100 105

<210> 20
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 20

Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val
1 5 10 15

Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Ile
20 25 30

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Ile Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn
35 40 45

[0018] Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
50 55 60

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr Met Gln
65 70 75 80

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
85 90 95

Glu Asp Leu Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 21

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

[0019]

Arg

<210> 22
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 22

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

	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	
	65					70					75					80	
	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Gly	His	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr	
					85					90					95		
	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				100					105						110		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	
			115					120					125				
	Pro	Gly	Thr	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	
		130					135					140					
	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Val	Asn	Trp	Val	Lys	
	145					150					155					160	
	Gln	Arg	Pro	Asp	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	
					165					170					175		
[0020]	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Ser	
				180					185					190			
	Thr	Ile	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Thr	Leu	
			195					200					205				
	Thr	Ser	Asp	Ala	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Asp	
		210					215					220					
	Ser	Ser	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
	225					230					235					240	
	Ser	Ser															
	<210>	23															
	<211>	244															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	合成多肽															
	<400>	23															

	Asn	Ile	Met	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser	
				20					25					30			
	Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
			35					40					45				
	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
		50					55					60					
	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
	65					70					75					80	
	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	
					85					90					95		
	Tyr	Leu	Ser	Ser	His	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
				100						105				110			
[0021]	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
			115					120					125				
	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	
		130					135					140					
	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Trp	Ile	
	145					150					155					160	
	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Ile	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	
					165					170				175			
	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	
				180					185					190			
	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	
			195					200					205				
	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	
		210					215					220					
	Glu	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	
	225					230					235					240	

Thr Val Ser Ser

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 24

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 25

[0022]

Lys Lys Asp Glu
1

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> misc_特征
<222> (3)..(4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 26

Lys Lys Xaa Xaa
1

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 27

Lys Lys Met Pro
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 28

Tyr Gln Arg Leu
1

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0023] <220>
<223> 合成多肽

<400> 29

Ala Glu Lys Asp Glu Leu
1 5

<210> 30
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Ala Glu Lys Asp Glu Leu
20 25

<210> 31
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 31

Leu Tyr Lys Tyr Lys Ser Arg Arg Ser Phe Ile Glu Glu Lys Lys Met
1 5 10 15

Pro

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

[0024] <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(4)
<223> 其中n为1-10

<400> 32

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(4)
<223> 其中n为1-10

<400> 33

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 34
<211> 5

	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成多肽
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(5)
	<223> 其中n为1-10
	<400> 34
	Gly Gly Ser Gly Gly 1 5
	<210> 35
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成多肽
[0025]	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(5)
	<223> 其中n为1-10
	<400> 35
	Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
	<210> 36
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成多肽
	<400> 36
	Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
	<210> 37
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>

	<223> 合成多肽
	<400> 37
	Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
	<210> 38
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成多肽
	<400> 38
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10
	<210> 39
	<211> 20
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
[0026]	<223> 合成多肽
	<400> 39
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 1 5 10 15
	Gly Gly Gly Ser 20
	<210> 40
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成多肽
	<400> 40
	Tyr Gly Arg Leu 1
	<210> 41
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> 人工序列

	<220>	
	<223>	合成多肽
	<400>	41
	Tyr Gln Arg Leu	
	1	
	<210>	42
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成多肽
	<400>	42
	Tyr Lys Gly Leu	
	1	
	<210>	43
	<211>	4
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0027]	<220>	
	<223>	合成多肽
	<220>	
	<221>	misc_特征
	<222>	(2)..(3)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	43
	Tyr Xaa Xaa Leu	
	1	
	<210>	44
	<211>	20
	<212>	DNA
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成多核苷酸
	<400>	44
	caaagagatt acgaatgcct	
	<210>	45
	<211>	20

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 45	
	cttgtagata tcctgatcat	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 46	
	cacgcacctg gacagctgac	20
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0028]	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 47	
	ggttgtgttg atacaagtcc	20
	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 48	
	agcttggaac agactcacgg	20
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 49	
	aatgggcgga ggagagtagt	20

	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 50	
	cctttccggg actttcgctt t	21
	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 51	
	gcagaatcca ggtggcaaca	20
[0029]	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 52	
	agggaactgt gggatgactg	20
	<210> 53	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 53	
	gaacacctga gcctttgagc	20

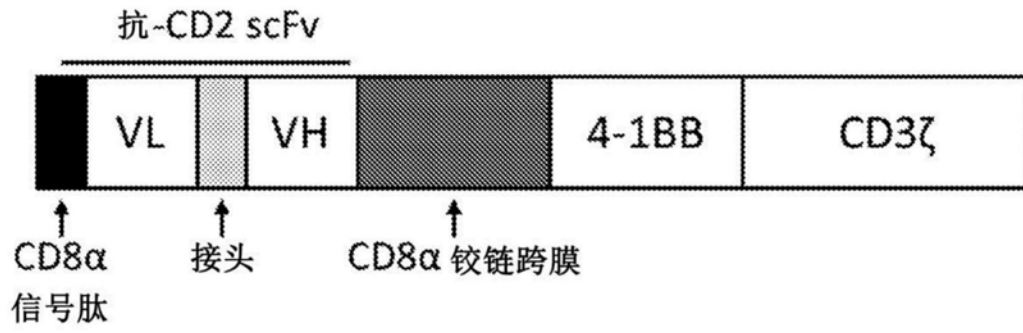


图1

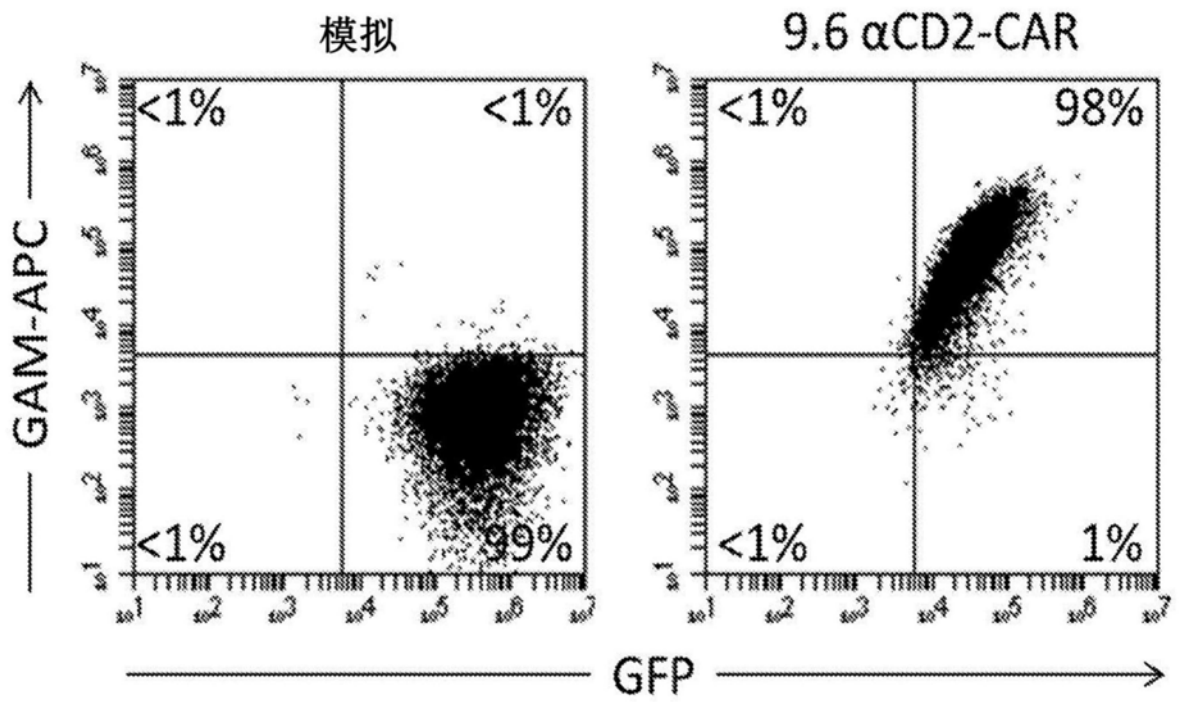


图2

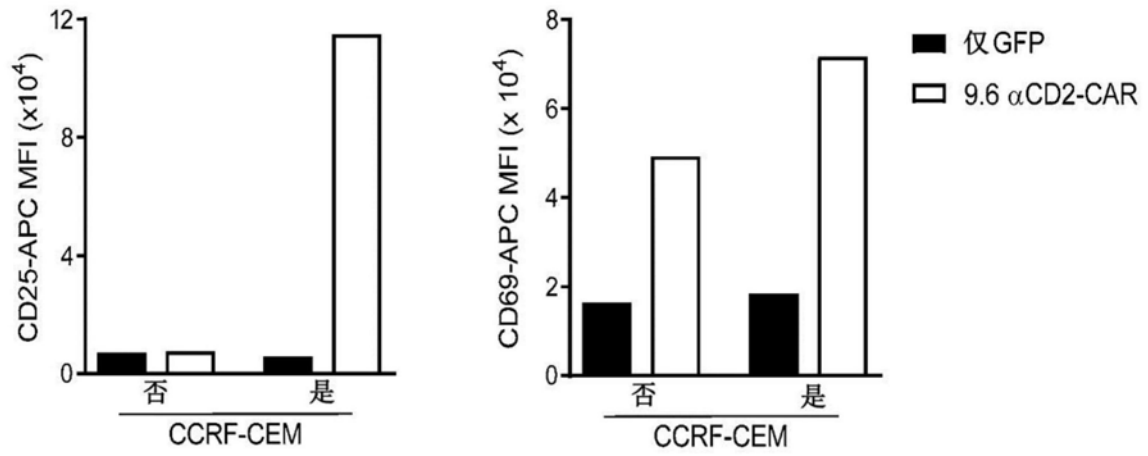


图3

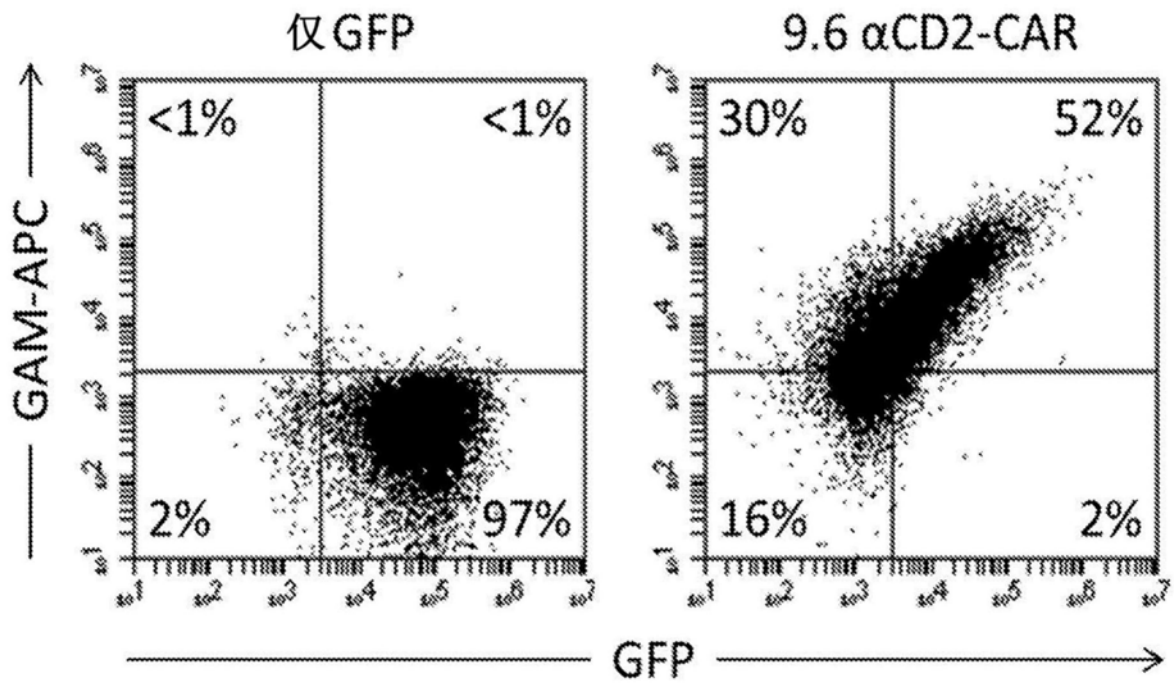


图4

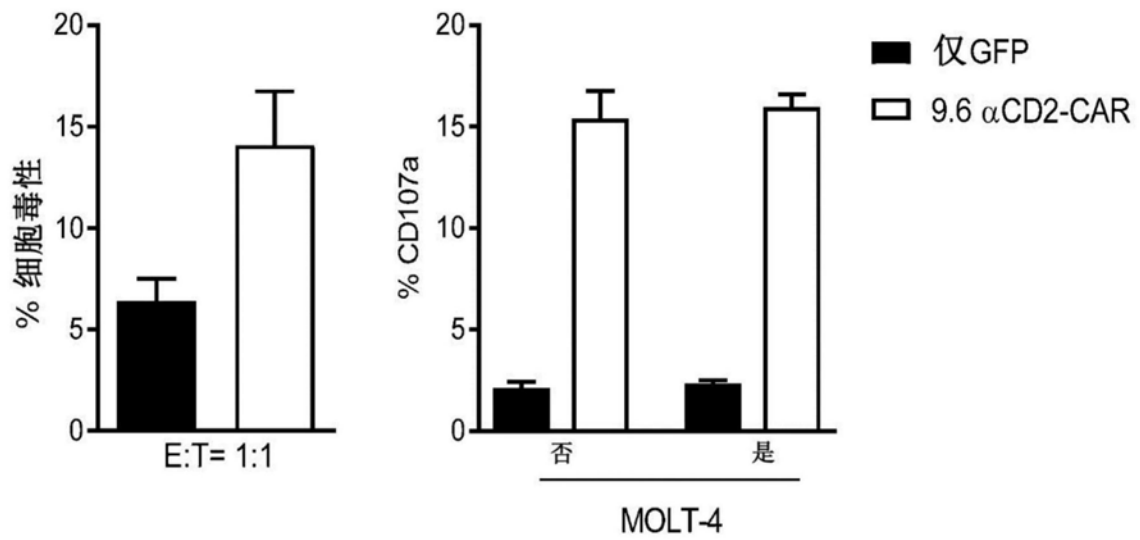


图5

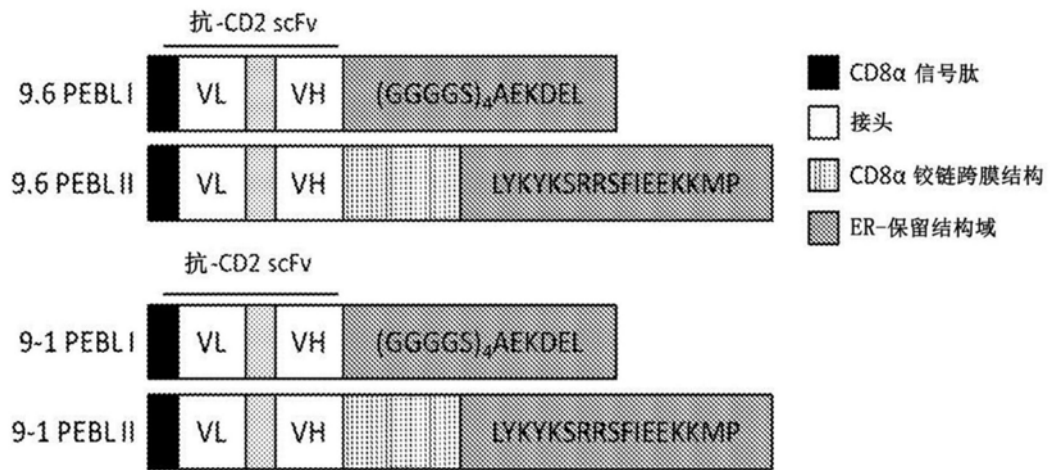


图6

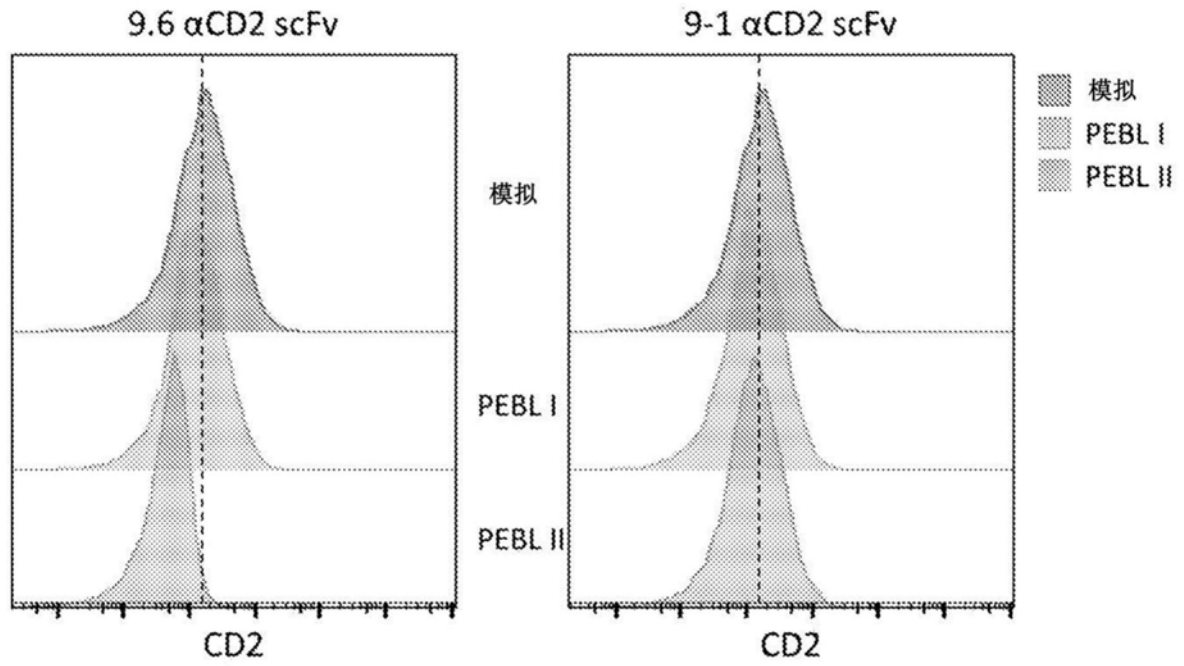


图7

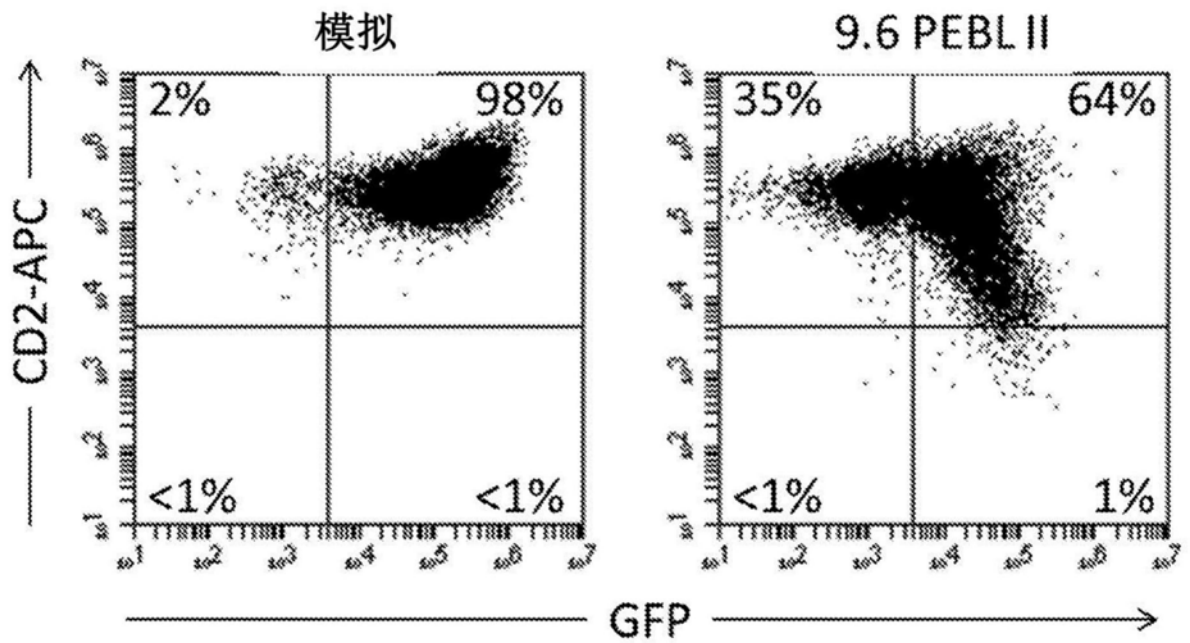


图8

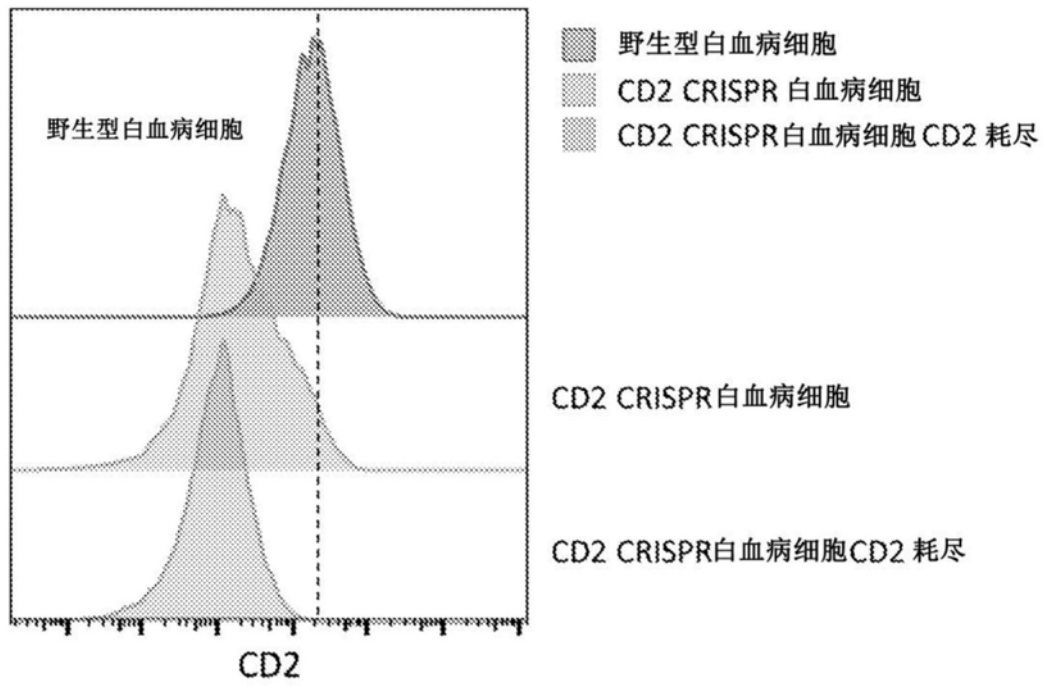


图9

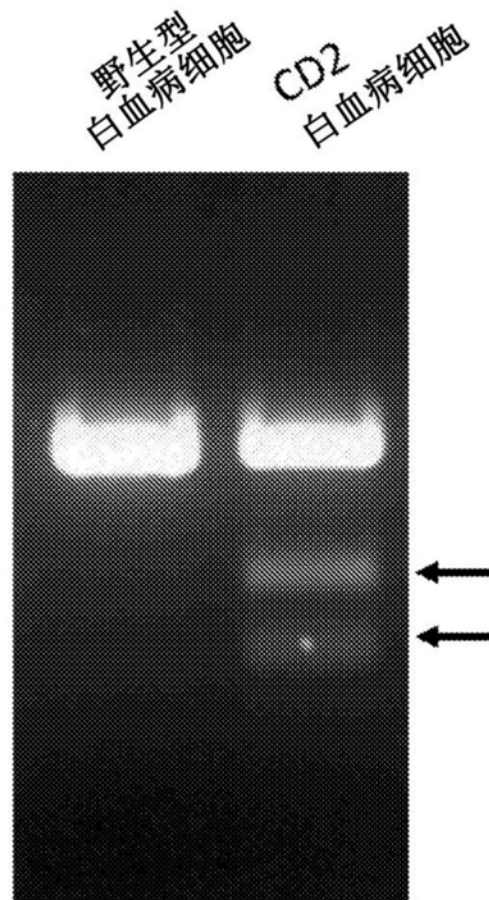


图10

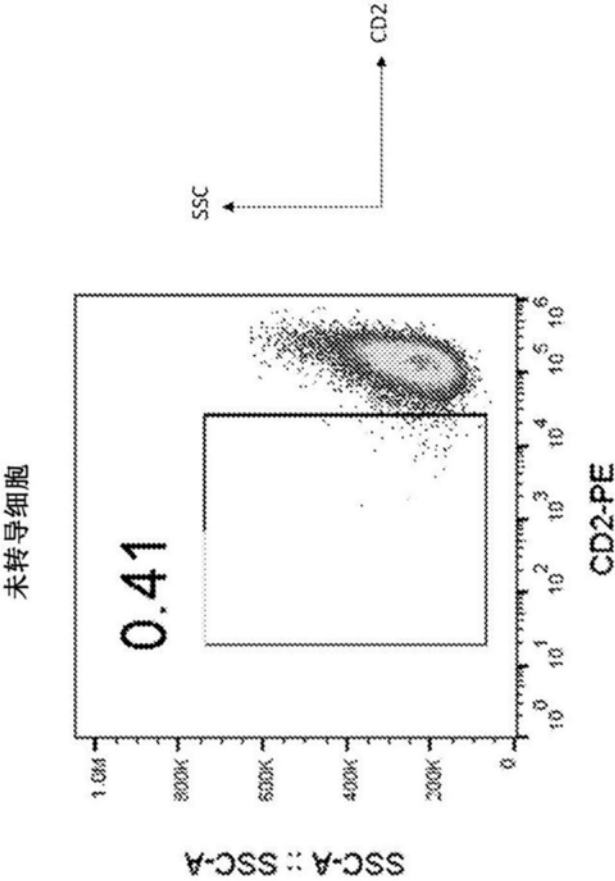


图11A

MOI 1

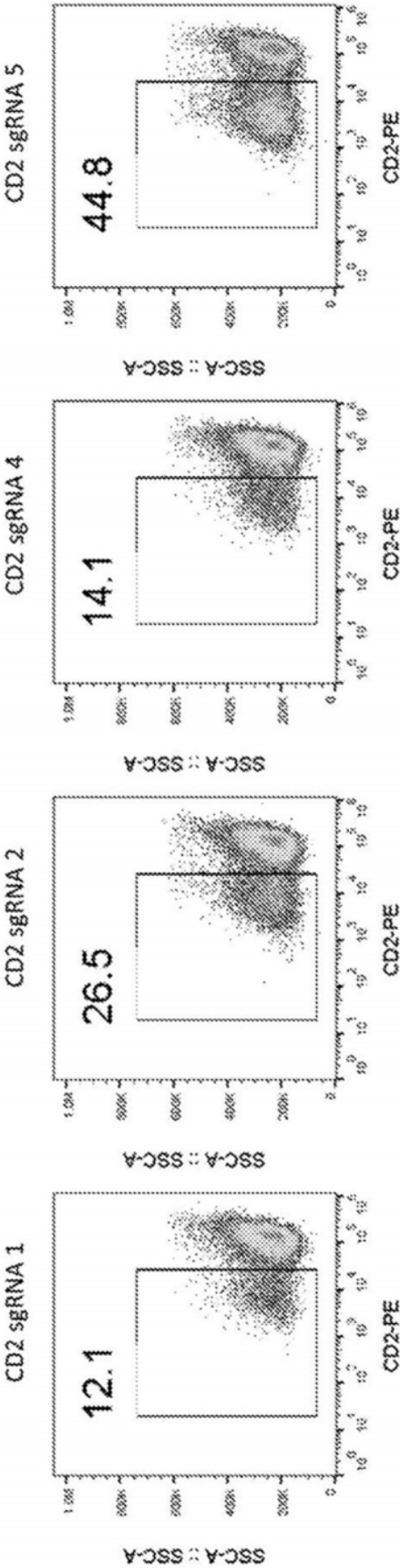


图11B

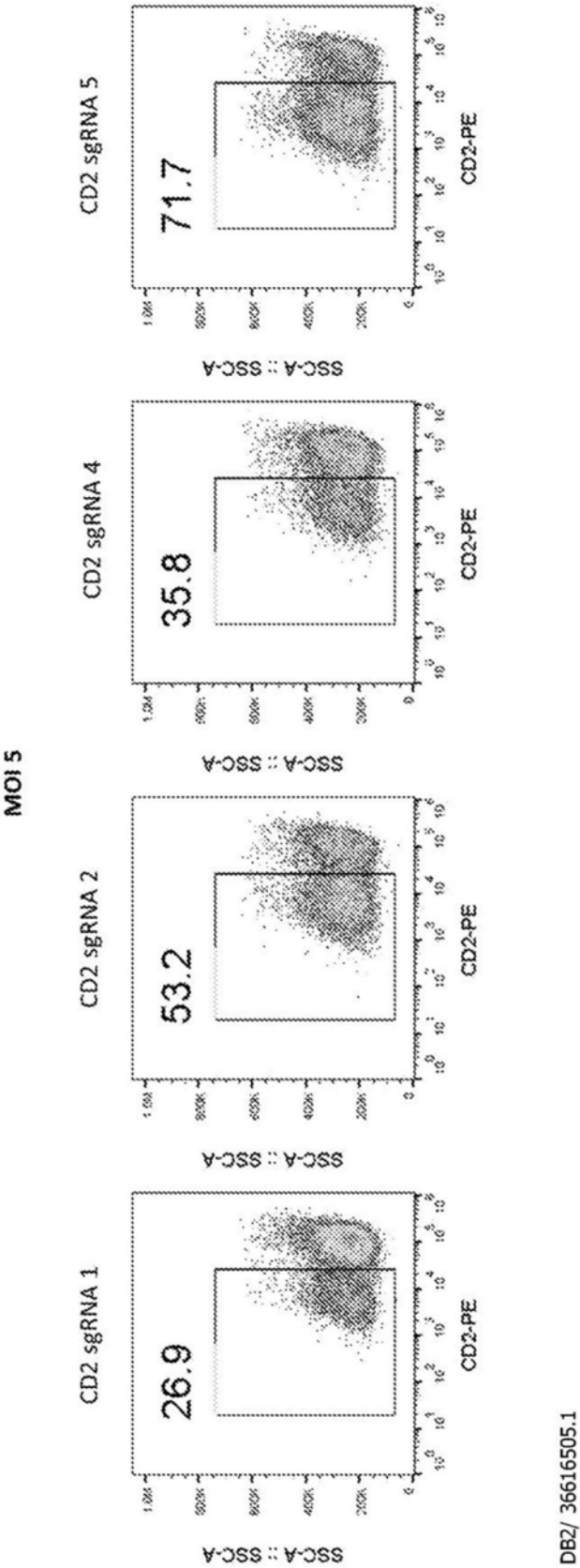


图11C