



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112912493 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 201980050879.1

(22) 申请日 2019.05.31

(30) 优先权数据

62/678878 2018.05.31 US

62/799513 2019.01.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/035010 2019.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/232444 EN 2019.12.05

(71) 申请人 华盛顿大学

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 J·F·迪珀西奥 M·库珀

J·奥尼尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书7页 说明书91页 附图16页

(54) 发明名称

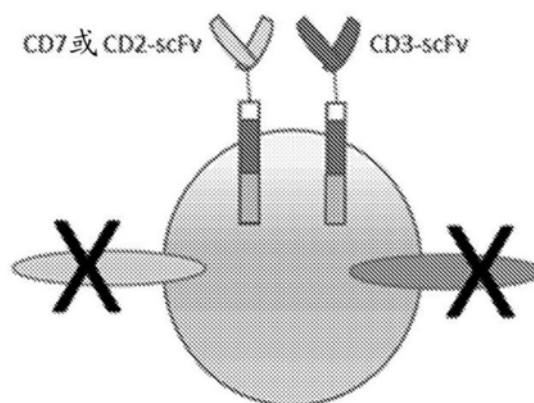
用于治疗癌症的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T)

(57) 摘要

本文公开了基因组编辑的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T), 其可以衍生自细胞毒性T细胞、病毒特异性细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta ($\gamma \delta$) T细胞, 并且包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体 (CAR), 其中所述 CAR-T 细胞缺乏所述一种或多种 CAR 所特异性结合的一种或多种抗原。具体地, 本公开涉及工程改造的携带单、双和串联嵌合抗原受体 (CAR) 的 T 细胞 (CAR-T) 以及用于治疗癌症的免疫治疗方法。

双 CAR-T

两个 CAR 由单个慢病毒构建体表达



1. 一种CAR-T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基和/或缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的至少一种或多种抗原。

2. 一种CAR-T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

3. 如权利要求1所述的CAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α 、TCR β 、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 。

4. 如权利要求1-2中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)特异性结合在恶性T细胞或骨髓瘤细胞上表达的一种或多种抗原。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)对选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)对选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)是选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

8. 如权利要求1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合选自以下的一种或多种抗原:BCMA、CS1、CD38、CD138、CD19、CD33、CD123、CD371、CD117、CD135、Tim-3、CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD79A、CD79B、APRIL、CD56和CD1a。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性T细胞上表达的至少一种抗原。

10. 如权利要求9所述的CAR-T细胞,其中在恶性T细胞上表达的所述抗原选自CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、TCRA和TCR β 。

11. 如权利要求1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性浆细胞上表达的至少一种抗原。

12. 如权利要求11所述的CAR-T细胞,其中在恶性浆细胞上表达的所述抗原选自BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19。

13. 如权利要求1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性B细胞上表达的至少一种抗原。

14. 如权利要求13所述的CAR-T细胞,其中在恶性B细胞上表达的所述抗原选自CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38和CD45。

15. 如权利要求14所述的CAR-T细胞,其中在恶性B细胞上表达的所述抗原选自CD19和CD20。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的CAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体

反应性或移植物抗宿主疾病。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

20. 一种如权利要求1-19中任一项所述的双或串联CAR-T细胞。

21. 如权利要求20所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD7、CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD5、TCR β xCD7、BCMAxCS1、BCMAxCD19、BCMAxCD38、CS1xCD19、CD19xCD38、APRILxCS1、APRILxBCMA、APRILxCD19、APRILxCD38、CS1xCD38、CD79AxBCMA、CD79AxCs1、CD79AxCD19、CD79AxCD38、CD79AxCD38、CD79A xAPRIL、CD79AxCD79B、CD79BxBCMA、CD79BxCs1、CD79BxCD19、CD79BxCD38、CD79B xAPRIL、CD79BxCD79A、CD138xBCMA、CD138xCs1、CD138xCD19、CD138xCD38、CD138 xAPRIL、CD138xCD79A、CD138xCD79B、CD138xBCMA和CD138xCs1。

22. 如权利要求21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD7、CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD5和TCR β xCD7。

23. 如权利要求21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:BCMAxCS1、BCMAxCD19、BCMAxCD38、CS1xCD19、CD19xCD38、APRILxCS1、APRILxBCMA、APRILxCD19、APRILxCD38、CS1xCD38、CD79AxBCMA、CD79AxCs1、CD79AxCD19、CD79AxCD38、CD79AxCD38、CD79A xAPRIL、CD79AxCD79B、CD79BxBCMA、CD79BxCs1、CD79BxCD19、CD79BxCD38、CD79B xAPRIL、CD79BxCD79A、CD138xBCMA、CD138xCs1、CD138xCD19、CD138xCD38、CD138 xAPRIL、CD138xCD79A、CD138xCD79B、CD138xBCMA和CD138xCs1。

24. 如权利要求21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD123xCD371、CD123xCLEC12A、CD123xCD117、CD123xFLT3、CD123xCD7、CD123xTim3、CD371xCLEC12A、CD371xCD117、CD371xFLT3、CD371xCD7、CD371xTim3、CLEC12AxCD117、CLEC12AxFLT3、CLEC12AxCD7、CLEC12AxTim3、CD117xFLT3、CD117xCD7、CD117xTim3、FLT3xCD7、FLT3xTim3和CD7xTim3。

25. 一种如权利要求21-24中任一项所述的双CAR-T细胞。

26. 一种如权利要求21-34中任一项所述的串联CAR-T细胞。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

28. 如权利要求1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

29. 如权利要求1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

30. 如权利要求1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

31. 一种双或串联嵌合抗原受体 (dCAR或tCAR), 其靶向两种或更多种浆细胞抗原。

32. 如权利要求31所述的CAR, 其中所述浆细胞抗原选自BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19。

33. 如权利要求32所述的CAR, 其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标: BCMA_xCS1、BCMA_xCD19、BCMA_xCD38、CS1_xCD19、CD19_xCD38、APRIL_xCS1、APRIL_xBCMA、APRIL_xCD19、APRIL_xCD38、CS1_xCD38、CD79A_xBCMA、CD79A_xCS1、CD79A_xCD19、CD79A_xCD38、CD79A_xCD38、CD79A_xAPRIL、CD79A_xCD79B、CD79B_xBCMA、CD79B_xCS1、CD79B_xCD19、CD79B_xCD38、CD79B_xAPRIL、CD79B_xCD79A、CD138_xBCMA、CD138_xCS1、CD138_xCD19、CD138_xCD38、CD138_xAPRIL、CD138_xCD79A、CD138_xCD79B、CD138_xBCMA和CD138_xCS1。

34. 如权利要求31-33中任一项所述的CAR, 其中所述CAR是dCAR。

35. 如权利要求31-33中任一项所述的CAR, 其中所述CAR是tCAR。

36. 一种双或串联嵌合抗原受体 (dCAR或tCAR), 其靶向两种或更多种白血病细胞抗原。

37. 如权利要求36所述的CAR, 其中所述浆细胞抗原选自CD123、CLEC12A、CD117、FLT3、CD7和Tim3。

38. 如权利要求37所述的CAR, 其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标: CD123_xCD371、CD123_xCLEC12A、CD123_xCD117、CD123_xFLT3、CD123_xCD7、CD123_xTim3、CD371_xCLEC12A、CD371_xCD117、CD371_xFLT3、CD371_xCD7、CD371_xTim3、CLEC12A_xCD117、CLEC12A_xFLT3、CLEC12A_xCD7、CLEC12A_xTim3、CD117_xFLT3、CD117_xCD7、CD117_xTim3、FLT3_xCD7、FLT3_xTim3和CD7_xTim3。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的CAR, 其中所述CAR是dCAR。

40. 如权利要求36-38中任一项所述的CAR, 其中所述CAR是tCAR。

41. 一种串联嵌合抗原受体 (tCAR), 其靶向两种或更多种T细胞抗原。

42. 如权利要求41所述的tCAR, 其中所述T细胞抗原选自CD5、CD7、CD2、CD4和CD3。

43. 如权利要求42所述的tCAR, 其靶向一对 (即两个) 抗原。

44. 如权利要求43所述的tCAR, 其中所述抗原对选自CD2_xCD3 ϵ 、CD2_xCD4、CD2_xCD5、CD2_xCD7、CD3 ϵ _xCD4、CD3 ϵ _xCD5、CD3 ϵ _xCD7、CD4_xCD5、CD4_xCD7、CD5_xCD7、TRAC_xCD2、TRAC_xCD3 ϵ 、TRAC_xCD4、TRAC_xCD5、TRAC_xCD7、TCR β _xCD2、TCR β _xCD4、TCR β _xCD7、CD2_xCD3 ϵ 、CD2_xCD4、CD2_xCD5、CD2_xCD7、CD3 ϵ _xCD4、CD3 ϵ _xCD5、CD4_xCD5、CD4_xCD7、CD5_xCD7、TRAC_xCD2、TRAC_xCD3 ϵ 、TRAC_xCD4、TRAC_xCD5、TRAC_xCD7、TCR β _xCD2、TCR β _xCD3 ϵ 、TCR β _xCD4、TCR β _xCD5和TCR β _xCD7。

45. 如权利要求43所述的tCAR, 其中所述抗原对选自CD2_xCD3 ϵ 、CD2_xCD4、CD2_xCD5、CD2_xCD7、CD3 ϵ _xCD4、CD3 ϵ _xCD5、CD3 ϵ _xCD7、CD4_xCD5、CD4_xCD7和CD5_xCD7。

46. 如权利要求35和40-45中任一项所述的tCAR, 其中所述CAR构建体是线性tCAR构建体。

47. 如权利要求46所述的tCAR, 其中所述线性tCAR构建体包含第一重 (V_H) 链可变片段和第一轻 (V_L) 链可变片段, 命名为V_H1和V_L1, 其通过 (GGGS)₂₋₆接头连接至第二轻 (V_L) 链可变片段和第一重 (V_H) 链可变片段, 命名为V_L2和V_H2。

48. 如权利要求46所述的tCAR, 其中所述线性tCAR构建体包含第一重 (V_H) 链可变片段和第一轻 (V_L) 链可变片段, 命名为V_H2和V_L2, 其通过 (GGGS)₂₋₆接头连接至第二轻 (V_L) 链可变片段和第一重 (V_H) 链可变片段, 命名为V_H1和V_L1。

49. 如权利要求46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为 V_L1 和 V_H1 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为 V_H2 和 V_L2 。

50. 如权利要求46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为 V_L2 和 V_H2 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为 V_H1 和 V_L1 。

51. 如权利要求46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含选自7-I至7-XXXIII的结构。

52. 如权利要求35和40-45中任一项所述的tCAR,其中所述CAR构建体是发夹tCAR构建体。

53. 如权利要求52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第二scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自所述第一scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 。

54. 如权利要求52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二重(V_H)链可变片段和衍生自第一scFv的第一重(V_H)链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 。

55. 如权利要求52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自第二scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 。

56. 如权利要求52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二轻(V_L)链可变片段和衍生自第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 ,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 。

57. 如权利要求52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含选自9-I至9-XXXIII的结构。

58. 如权利要求35和40-45中任一项所述的tCAR,其中所述CAR构建体是在所述接头中具有(Cys=Cys)双链键(DSB)的发夹DSB tCAR构建体。

59. 如权利要求58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 ,其通过(GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第二scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自所述第一scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 。

60. 如权利要求58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二重(V_H)链可变片段和衍生自第一scFv的第一重(V_H)链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 ,其通过(GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二轻(V_L)链可变片

段,命名为 V_L1 和 V_L2 。

61. 如权利要求58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自第二scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 ,其通过 $(GGGGS)_{0-1}-(GGGGC)_1-(GGGGS)_{1-2}-(GGGGP)_1-(GGGGS)_{2-3}-(GGGGC)_1-(GGGGS)_{0-1}$ 接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重(V_L)链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 。

62. 如权利要求58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二轻(V_L)链可变片段和衍生自第一scFv的第一轻(V_L)链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 ,其通过 $(GGGGS)_{0-1}-(GGGGC)_1-(GGGGS)_{1-2}-(GGGGP)_1-(GGGGS)_{2-3}-(GGGGC)_1-(GGGGS)_{0-1}$ 接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 。

63. 如权利要求58所述的tCAR,其中所述发夹DSB tCAR构建体包含选自11-I至11-XXXII的结构。

64. 如权利要求41-63中任一项所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个衍生自识别选自CD5、CD7、CD2、CD4和CD3的不同抗原的scFv。

65. 如权利要求64所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个是不同的并且对选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

66. 如权利要求64所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个是不同的并且对选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

67. 如权利要求64所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个是不同的并且是选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的序列。

68. 如权利要求35、39和41-67中任一项所述的tCAR,其包含选自CD28和4-1BB的至少一个共刺激结构域。

69. 如权利要求68所述的tCAR,其中所述共刺激结构域是CD28。

70. 如权利要求35和40-69中任一项所述的tCAR,其包含CD3 ζ 信号传导结构域。

71. 如权利要求41-63和68-70中任一项所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个衍生自识别CD2的scFv或识别CD3的scFv。

72. 如权利要求64所述的tCAR,其中所述tCAR构建体选自克隆5、克隆6、克隆7、克隆8、克隆13、克隆14、克隆15和克隆16。

73. 如权利要求64所述的tCAR,其中所述tCAR构建体对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

74. 一种串联嵌合抗原受体(CAR)T细胞(tCAR-T细胞),其包含靶向两种或更多种T细胞抗原的tCAR,如权利要求35和40-73中任一项所述。

75. 如权利要求74所述的tCAR-T细胞,其中所述细胞缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

76. 如权利要求74和75中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述tCAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基。

77. 如权利要求76所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α (TRAC)、TCR β 、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 。

78. 如权利要求77所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α (TRAC) 和CD3 ϵ 。

79. 如权利要求78所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基是TRAC。

80. 如权利要求35和40-79中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

81. 如权利要求35和40-80中任一项所述的tCAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

82. 如权利要求35和40-81中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

83. 如权利要求35和40-82中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

84. 一种具有靶向CD2和CD3的CAR的串联CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基并且缺乏CD2。

85. 如权利要求85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

86. 如权利要求85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

87. 如权利要求85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

88. 一种具有靶向CD2和CD7的CAR的串联CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基并且缺乏CD2和CD7。

89. 如权利要求88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

90. 如权利要求88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

91. 如权利要求88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

92. 一种CAR-T细胞,其包含靶向CD7的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏TRAC并且缺乏CD7,并且包含CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

93. 如权利要求92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

94. 如权利要求92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

95. 如权利要求92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

96. 一种治疗组合物,其包含如权利要求1-30和74-95中任一项所述的CAR-T细胞的群,或包含包括如权利要求31-73中任一项所述的CAR的CAR-T细胞群,以及至少一种治疗学上可接受的载剂和/或佐剂。

97. 一种治疗患者的癌症的方法,其包括向有需要的患者施用如权利要求1-30和74-95

中任一项所述的基因组编辑的CAR-T细胞、基因组编辑的CAR-T细胞群、双CAR-T细胞或串联CAR-T,或包含如权利要求31-73中任一项所述的CAR的CAR-T细胞群。

98.如权利要求97所述的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。

99.如权利要求98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是T细胞恶性肿瘤。

100.如权利要求99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是T细胞急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)。

101.如权利要求99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。

102.如权利要求99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是T细胞慢性淋巴细胞性白血病(T-CLL)。

103.如权利要求98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

104.如权利要求98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是急性髓性白血病(AML)。

用于治疗癌症的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T)

[0001] 本申请要求2019年1月31日提交的美国临时专利申请62/799,513和2018年5月31日提交的美国临时专利申请62/678,878的优先权,所述申请的公开内容据此以引用方式并入,如同整体写入本文一样。

[0002] 本文公开了基因组编辑的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 以及将其用于免疫治疗的方法。具体地,本公开涉及可以被基因修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞,以及使用所述T细胞治疗癌症的方法。

[0003] T细胞(一类淋巴细胞)在细胞介导的免疫中起核心作用。通过细胞表面上T细胞受体 (TCR) 的存在,将所述T细胞与其他淋巴细胞诸如B细胞和自然杀伤细胞 (NK细胞) 区分开来。T辅助细胞 (T_H),也称为 $CD4^+$ T或 $CD4$ T细胞,在其表面上表达 $CD4$ 糖蛋白。辅助T细胞在暴露于由MHC(主要组织相容性复合物) II类分子呈递的肽抗原时被激活。一旦被激活,这些细胞就迅速增殖并分泌调节免疫应答的细胞因子。细胞毒性T细胞 (T_C),也称为 $CD8^+$ T细胞或 $CD8$ T细胞,在细胞表面上表达 $CD8$ 糖蛋白。 $CD8^+$ T细胞在暴露于由MHC I类分子呈递的肽抗原时被激活。记忆T细胞(T细胞的一个亚群)长期持续存在并对其同源抗原做出反应,从而为免疫系统提供针对过去感染和/或肿瘤细胞的“记忆”。Gamma delta ($\gamma\delta$) T细胞是‘非常规’T细胞的原型并且代表外周血中相对小的T细胞亚群。它们是通过由 γ 和 δ 链组成的异二聚T细胞受体 (TCR) 的表达定义的。这将它们与 $CD4^+$ 辅助T细胞和 $CD8^+$ 细胞毒性T细胞区分开。病毒特异性细胞毒性T淋巴细胞是对病毒抗原具有反应性的T细胞,主要是EB病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 和巨细胞病毒 (CMV)。

[0004] 可以对本文所述的T细胞进行基因修饰,以表达嵌合抗原受体 (CAR),所述嵌合抗原受体是由抗原识别部分和T细胞激活结构域组成的融合蛋白。表达CAR的T细胞可以识别特定的蛋白质,即肿瘤细胞上的抗原。这些表达CAR的T细胞可以在输注到患者体内之前在实验室中扩增。

[0005] 临床试验已显示出抗 $CD19$ CAR输注后患有B细胞恶性肿瘤(包括弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 和B细胞前体急性淋巴细胞性白血病 (ALL)) 的患者的高应答率,产生两种FDA批准的疗法YescartaTM (axicabtagene ciiloleucel, Kite Pharma/Gilead) 和 KymriahTM (tisagenlecleucel, Novartis)。尽管取得了这些成功,但针对T细胞恶性肿瘤的CAR-T细胞疗法的发展已被证明是存在问题的,部分原因是恶性T细胞与效应T细胞之间的靶抗原共享表达。最普遍的挑战是:(1) 嵌合抗原受体的抗原靶标;(2) CAR设计,即单CAR、双CAR、串联CAR;以及(3) 肿瘤异质性,特别是肿瘤抗原的表面表达的差异。因此,仍然需要改进的基于嵌合抗原受体 (CAR) 的免疫疗法,其利用基因组编辑以及单、双和串联CAR的构建,以更加有效、安全且高效地靶向癌症,包括T细胞相关恶性肿瘤。

附图说明

[0006] 图1示出双CAR-T细胞 (dCAR-T细胞) 的示意图。

[0007] 图2示出串联CAR-T细胞 (tCAR-T细胞) 的示意图。

[0008] 图3示出双和串联CAR构建体的示意图。

[0009] 图4示出串联的靶向CAR构建体的示意图。

[0010] 图5示出没有机械耗尽CD3⁺或CD2⁺CAR-T细胞情况下的CAR-T产物纯度。如通过FACS分析所示,存在高纯度的CD3⁻和CD2⁻CAR-T细胞,而无需CD3⁺细胞的磁性耗尽。代表性FACS图示出CD3 (y轴) 和CD2 (x轴) 的FITC染色。示出克隆5 (顶部) 和6 (底部)。

[0011] 图6示出没有机械耗尽CD3⁺或CD2⁺CAR-T细胞情况下的CAR-T产物纯度。如通过FACS分析所示,存在高纯度的CD3⁻和CD2⁻CAR-T细胞,而无需CD3⁺细胞的磁性耗尽选择。代表性FACS图示出CD3 (y轴) 和CD2 (x轴) 的FITC染色。示出克隆7 (顶部) 和8 (底部)。

[0012] 图7示出没有机械耗尽CD3⁺或CD2⁺CAR-T细胞情况下的CAR-T产物纯度。如通过FACS分析所示,存在高纯度的CD3⁻和CD2⁻CAR-T细胞,而无需CD3⁺细胞的磁性耗尽选择。代表性FACS图示出CD3 (y轴) 和CD2 (x轴) 的FITC染色。示出克隆13 (顶部) 和14 (底部)。

[0013] 图8示出没有机械耗尽CD3⁺或CD2⁺CAR-T细胞情况下的CAR-T产物纯度。如通过FACS分析所示,存在高纯度的CD3⁻和CD2⁻CAR-T细胞,而无需CD3⁺细胞的磁性耗尽选择。代表性FACS图示出CD3 (y轴) 和CD2 (x轴) 的FITC染色。示出克隆15 (顶部) 和16 (底部)。

[0014] 图9A示出串联CD2-CD3 CAR-T克隆5 (顶部) 和6 (底部) 的肿瘤细胞杀伤;图例示出效应子与靶细胞的比率 (E:T比)。

[0015] 图9B示出串联CD2-CD3 CAR-T克隆7 (顶部) 和8 (底部) 的肿瘤细胞杀伤;图例示出效应子与靶细胞的比率 (E:T比)。

[0016] 图9C示出串联CD2-CD3 CAR-T克隆13 (顶部) 和14 (底部) 的肿瘤细胞杀伤;图例示出效应子与靶细胞的比率 (E:T比)。

[0017] 图9D示出串联CD2-CD3 CAR-T克隆15 (顶部) 和16 (底部) 的肿瘤细胞杀伤;图例示出效应子与靶细胞的比率 (E:T比)。

[0018] 图10A示出待转导到T细胞中的BCMA CAR构建体的示意图,其将靶向BCMA。

[0019] 图10B示出⁵¹Cr释放测定中BCMA-CAR-T细胞的肿瘤细胞杀伤。在多个效应子与靶标 (E:T) 比率下观察到BCMA-CAR-T细胞的有效杀伤。未转导的活化T细胞和CD19-CAR-T细胞用作阴性对照并且不引起MM.1S-CG细胞的杀伤。

[0020] 图10C示出BCMA CAR-T细胞的体内功效。与在第50天左右死亡的对照相比,用BCMA CAR-T治疗的所有七只小鼠都存活将近150天或更长。

[0021] 图10D示出以所揭示的光子通量测量的连续生物发光成像 (BLI), 显示出在接受BCMA CAR-T细胞治疗的小鼠中,在整个实验持续时间内从未增加的背景信号水平 (signal to background level) 的稳健降低。

[0022] 图11A示出待转导到T细胞中的CS1-CAR构建体的示意图,其将靶向CS1。

[0023] 图11B示出CS1-CAR-T细胞的体内功效。作为测试CS1-CAR-T细胞的特异性的方法,向小鼠中植入MM.1S-CG细胞和缺乏CS1的MM.1S-CG细胞 (使用CAS9/CRISPR技术;MM.1S-CG Δ CS1)。用CS1-CAR-T细胞治疗的所有小鼠 (n=10) 存活>90天,而CD19对照小鼠 (n=8) 的中值生存期为43天。

[0024] 图11C示出连续生物发光成像 (BLI), 显示出用CS1-CAR-T细胞治疗的小鼠的光子通量和骨髓肿瘤清除率降低了三个log (实验1至实验3)。

[0025] 图12A示出单 (CD19、CS1) 和串联 (BCMA-CS1) 构建体的示意图。

[0026] 图12B示出表达CD19 CAR的Jurkat细胞不结合BCMA或CS1蛋白的FACS分析 (每个图

的左下象限)。表达BCMA CAR蛋白的Jurkat细胞结合BCMA蛋白(每个图的左上象限)。表达CS1 CAR蛋白的Jurkat细胞结合CS1蛋白(每个图的右下象限)。表达串联BCMA-CS1 CAR蛋白的Jurkat细胞结合两种重组蛋白(每个图的右上象限),表明两种scFv均有表达。

[0027] 图12C示出使用标准的四小时铬释放(^{51}Cr)测定获得的单个和串联CAR-T细胞的体外功效。BCMA-CS1 tCAR-T细胞杀伤MM.1S-CG细胞,其功效与靶向单抗原的BCMA和CS1 CAR-T细胞相似。

[0028] 图13示出在T-ALL的异种模型中测试CD2*CD3 Δ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的功效。

具体实施方式

[0029] 以下公开内容将详细描述工程改造的细胞的实施方案、替代方案和用途,以及此类细胞在例如免疫疗法和过继性细胞转移中治疗疾病的用途。因此,本文提供了以下实施方案。

[0030] 实施方案1.一种CAR-T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基和/或缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的至少一种或多种抗原。

[0031] 实施方案2.一种CAR-T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

[0032] 实施方案3.如实施方案1所述的CAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α 、TCR β 、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 。

[0033] 实施方案4.如实施方案1-2中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)特异性结合在恶性T细胞或骨髓瘤细胞上表达的一种或多种抗原。

[0034] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)对选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

[0035] 实施方案6.如实施方案1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)对选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

[0036] 实施方案7.如实施方案1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体(CAR)是选自SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0037] 实施方案8.如实施方案1-4中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合选自以下的一种或多种抗原:BCMA、CS1、CD38、CD138、CD19、CD33、CD123、CD371、CD117、CD135、Tim-3、CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD79A、CD79B、APRIL、CD56和CD1a。

[0038] 实施方案9.如实施方案1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性T细胞上表达的至少一种抗原。

[0039] 实施方案10.如实施方案9所述的CAR-T细胞,其中在恶性T细胞上表达的所述抗原选自CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、TCRA和TCR β 。

[0040] 实施方案11.如实施方案1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性浆细胞上表达的至少一种抗原。

[0041] 实施方案12.如实施方案11所述的CAR-T细胞,其中在恶性浆细胞上表达的所述抗原选自BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19。

[0042] 实施方案13.如实施方案1-5中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述嵌合抗原受体特异性结合在恶性B细胞上表达的至少一种抗原。

[0043] 实施方案14.如实施方案13所述的CAR-T细胞,其中在恶性B细胞上表达的所述抗原选自CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38和CD45。

[0044] 实施方案15.如实施方案14所述的CAR-T细胞,其中在恶性B细胞上表达的所述抗原选自CD19和CD20。

[0045] 实施方案16.如实施方案1-15中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

[0046] 实施方案17.如实施方案1-16中任一项所述的CAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

[0047] 实施方案18.如实施方案1-17中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

[0048] 实施方案19.如实施方案1-18中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

[0049] 实施方案20.一种如实施方案1-19中任一项所述的双或串联CAR-T细胞。

[0050] 实施方案21.如实施方案20所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD7、CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD5、TCR β xCD7、BCMAxCS1、BCMAxCD19、BCMAxCD38、CS1xCD19、CD19xCD38、APRILxCS1、APRILxBCMA、APRILxCD19、APRILxCD38、CS1xCD38、CD79AxBCMA、CD79AxCs1、CD79AxCD19、CD79AxCD38、CD79AxCD38、CD79AxApril、CD79AxCD79B、CD79BxBCMA、CD79BxCs1、CD79BxCD19、CD79BxCD38、CD79BxApril、CD79BxCD79A、CD138xBCMA、CD138xCs1、CD138xCD19、CD138xCD38、CD138xApril、CD138xCD79A、CD138xCD79B、CD138xBCMA和CD138xCs1。

[0051] 实施方案22.如实施方案21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD7、CD2xCD3 ϵ 、CD2xCD4、CD2xCD5、CD2xCD7、CD3 ϵ xCD4、CD3 ϵ xCD5、CD3 ϵ xCD7、CD4xCD5、CD4xCD7、CD5xCD7、TRACxCD2、TRACxCD3 ϵ 、TRACxCD4、TRACxCD5、TRACxCD7、TCR β xCD2、TCR β xCD3 ϵ 、TCR β xCD4、TCR β xCD5和TCR β xCD7。

[0052] 实施方案23.如实施方案21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:BCMAxCS1、BCMAxCD19、BCMAxCD38、CS1xCD19、CD19xCD38、APRILxCS1、APRILxBCMA、APRILxCD19、APRILxCD38、CS1xCD38、CD79AxBCMA、CD79AxCs1、CD79AxCD19、

CD79A $\times$ CD38、CD79A $\times$ CD38、CD79A $\times$ APRIL、CD79A $\times$ CD79B、CD79B $\times$ BCMA、CD79B $\times$ CS1、CD79B $\times$ CD19、CD79B $\times$ CD38、CD79B $\times$ APRIL、CD79B $\times$ CD79A、CD138 $\times$ BCMA、CD138 $\times$ CS1、CD138 $\times$ CD19、CD138 $\times$ CD38、CD138 $\times$ APRIL、CD138 $\times$ CD79A、CD138 $\times$ CD79B、CD138 $\times$ BCMA和CD138 $\times$ CS1。

[0053] 实施方案24.如实施方案21所述的CAR-T细胞,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD123 $\times$ CD371、CD123 $\times$ CLEC12A、CD123 $\times$ CD117、CD123 $\times$ FLT3、CD123 $\times$ CD7、CD123 $\times$ Tim3、CD371 $\times$ CLEC12A、CD371 $\times$ CD117、CD371 $\times$ FLT3、CD371 $\times$ CD7、CD371 $\times$ Tim3、CLEC12A $\times$ CD117、CLEC12A $\times$ FLT3、CLEC12A $\times$ CD7、CLEC12A $\times$ Tim3、CD117 $\times$ FLT3、CD117 $\times$ CD7、CD117 $\times$ Tim3、FLT3 $\times$ CD7、FLT3 $\times$ Tim3和CD7 $\times$ Tim3。

[0054] 实施方案25.一种如实施方案21-24中任一项所述的双CAR-T细胞。

[0055] 实施方案26.一种如实施方案21-34中任一项所述的串联CAR-T细胞。

[0056] 实施方案27.如实施方案1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

[0057] 实施方案28.如实施方案1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

[0058] 实施方案29.如实施方案1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

[0059] 实施方案30.如实施方案1-26中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

[0060] 实施方案31.一种双或串联嵌合抗原受体(dCAR或tCAR),其靶向两种或更多种浆细胞抗原。

[0061] 实施方案32.如实施方案31所述的CAR,其中所述浆细胞抗原选自BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19。

[0062] 实施方案33.如实施方案32所述的CAR,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:BCMA $\times$ CS1、BCMA $\times$ CD19、BCMA $\times$ CD38、CS1 $\times$ CD19、CD19 $\times$ CD38、APRIL $\times$ CS1、APRIL $\times$ BCMA、APRIL $\times$ CD19、APRIL $\times$ CD38、CS1 $\times$ CD38、CD79A $\times$ BCMA、CD79A $\times$ CS1、CD79A $\times$ CD19、CD79A $\times$ CD38、CD79A $\times$ CD38、CD79A $\times$ APRIL、CD79A $\times$ CD79B、CD79B $\times$ BCMA、CD79B $\times$ CS1、CD79B $\times$ CD19、CD79B $\times$ CD38、CD79B $\times$ APRIL、CD79B $\times$ CD79A、CD138 $\times$ BCMA、CD138 $\times$ CS1、CD138 $\times$ CD19、CD138 $\times$ CD38、CD138 $\times$ APRIL、CD138 $\times$ CD79A、CD138 $\times$ CD79B、CD138 $\times$ BCMA和CD138 $\times$ CS1。

[0063] 实施方案34.如实施方案31-33中任一项所述的CAR,其中所述CAR是dCAR。

[0064] 实施方案35.如实施方案31-33中任一项所述的CAR,其中所述CAR是tCAR。

[0065] 实施方案36.一种双或串联嵌合抗原受体(dCAR或tCAR),其靶向两种或更多种白血病细胞抗原。

[0066] 实施方案37.如实施方案36所述的CAR,其中所述浆细胞抗原选自CD123、CLEC12A、CD117、FLT3、CD7和Tim3。

[0067] 实施方案38.如实施方案37所述的CAR,其中所述CAR特异性结合选自以下的两种不同靶标:CD123 $\times$ CD371、CD123 $\times$ CLEC12A、CD123 $\times$ CD117、CD123 $\times$ FLT3、CD123 $\times$ CD7、CD123 $\times$ Tim3、CD371 $\times$ CLEC12A、CD371 $\times$ CD117、CD371 $\times$ FLT3、CD371 $\times$ CD7、CD371 $\times$ Tim3、

CLEC12AxCD117、CLEC12A×FLT3、CLEC12A×CD7、CLEC12A×Tim3、CD117×FLT3、CD117×CD7、CD117×Tim3、FLT3×CD7、FLT3×Tim3和CD7×Tim3。

[0068] 实施方案39.如实施方案36-38中任一项所述的CAR,其中所述CAR是dCAR。

[0069] 实施方案40.如实施方案36-38中任一项所述的CAR,其中所述CAR是tCAR。

[0070] 实施方案41.一种串联嵌合抗原受体(tCAR),其靶向两种或更多种T细胞抗原。

[0071] 实施方案42.如实施方案41所述的tCAR,其中所述T细胞抗原选自CD5、CD7、CD2、CD4和CD3。

[0072] 实施方案43.如实施方案42所述的tCAR,其靶向一对(即两个)抗原。

[0073] 实施方案44.如实施方案43所述的tCAR,其中所述抗原对选自CD2×CD3 ϵ 、CD2×CD4、CD2×CD5、CD2×CD7、CD3 ϵ ×CD4、CD3 ϵ ×CD5、CD3 ϵ ×CD7、CD4×CD5、CD4×CD7、CD5×CD7、TRAC×CD2、TRAC×CD3 ϵ 、TRAC×CD4、TRAC×CD5、TRAC×CD7、TCR β ×CD2、TCR β ×CD4、TCR β ×CD7、CD2×CD3 ϵ 、CD2×CD4、CD2×CD5、CD2×CD7、CD3 ϵ ×CD4、CD3 ϵ ×CD5、CD4×CD5、CD4×CD7、CD5×CD7、TRAC×CD2、TRAC×CD3 ϵ 、TRAC×CD4、TRAC×CD5、TRAC×CD7、TCR β ×CD2、TCR β ×CD3 ϵ 、TCR β ×CD4、TCR β ×CD5和TCR β ×CD7。

[0074] 实施方案45.如实施方案43所述的tCAR,其中所述抗原对选自CD2×CD3 ϵ 、CD2×CD4、CD2×CD5、CD2×CD7、CD3 ϵ ×CD4、CD3 ϵ ×CD5、CD3 ϵ ×CD7、CD4×CD5、CD4×CD7和CD5×CD7。

[0075] 实施方案46.如实施方案35和40-45中任一项所述的tCAR,其中所述CAR构建体是线性tCAR构建体。

[0076] 实施方案47.如实施方案46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为V_H1和V_L1,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为V_L2和V_H2。

[0077] 实施方案48.如实施方案46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为V_H2和V_L2,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为V_H1和V_L1。

[0078] 实施方案49.如实施方案46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为V_L1和V_H1,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为V_H2和V_L2。

[0079] 实施方案50.如实施方案46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含第一轻(V_L)链可变片段和第一重(V_H)链可变片段,命名为V_L2和V_H2,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至第二重(V_H)链可变片段和第一轻(V_L)链可变片段,命名为V_H1和V_L1。

[0080] 实施方案51.如实施方案46所述的tCAR,其中所述线性tCAR构建体包含选自7-I至7-XXXII的结构。

[0081] 实施方案52.如实施方案35和40-45中任一项所述的tCAR,其中所述CAR构建体是发夹tCAR构建体。

[0082] 实施方案53.如实施方案52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一重(V_H)链可变片段和衍生自第二scFv的第二重(V_H)链可变片段,命名为V_H1和V_H2,其通过(GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第二scFv的第一轻(V_L)链可变片段和衍生自所述第一scFv的第二轻(V_L)链可变片段,命名为V_L2和V_L1。

[0083] 实施方案54.如实施方案52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第

二scFv的第二重 (V_H) 链可变片段和衍生自第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 ,其通过 (GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 。

[0084] 实施方案55.如实施方案52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段和衍生自第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 ,其通过 (GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重 (V_L) 链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 。

[0085] 实施方案56.如实施方案52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段和衍生自第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 ,其通过 (GGGGS)₂₋₆接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重 (V_H) 链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 。

[0086] 实施方案57.如实施方案52所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含选自9-I至9-XXXII的结构。

[0087] 实施方案58.如实施方案35和40-45中任一项所述的tCAR,其中所述CAR构建体是在所述接头中具有 (Cys=Cys) 双链键 (DSB) 的发夹DSB tCAR构建体。

[0088] 实施方案59.如实施方案58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段和衍生自第二scFv的第二重 (V_H) 链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 ,其通过 (GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第二scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段和衍生自所述第一scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 。

[0089] 实施方案60.如实施方案58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二重 (V_H) 链可变片段和衍生自第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 ,其通过 (GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 。

[0090] 实施方案61.如实施方案58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段和衍生自第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L1 和 V_L2 ,其通过 (GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重 (V_L) 链可变片段,命名为 V_H2 和 V_H1 。

[0091] 实施方案62.如实施方案58所述的tCAR,其中所述发夹tCAR构建体包含衍生自第二scFv的第二轻 (V_L) 链可变片段和衍生自第一scFv的第一轻 (V_L) 链可变片段,命名为 V_L2 和 V_L1 ,其通过 (GGGGS)₀₋₁-(GGGGC)₁-(GGGGS)₁₋₂-(GGGGP)₁-(GGGGS)₂₋₃-(GGGGC)₁-(GGGGS)₀₋₁接头连接至衍生自所述第一scFv的第一重 (V_H) 链可变片段和衍生自所述第二scFv的第二重 (V_H) 链可变片段,命名为 V_H1 和 V_H2 。

[0092] 实施方案63.如实施方案58所述的tCAR,其中所述发夹DSB tCAR构建体包含选自11-I至11-XXXII的结构。

[0093] 实施方案64.如实施方案41-63中任一项所述的tCAR,其中所述 V_H 和 V_L 链中的每一个衍生自识别选自CD5、CD7、CD2、CD4和CD3的不同抗原的scFv。

[0094] 实施方案65.如实施方案64所述的tCAR,其中所述V_H和V_L链中的每一个是不同的并且对选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

[0095] 实施方案66.如实施方案64所述的tCAR,其中所述V_H和V_L链中的每一个是不同的并且对选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。

[0096] 实施方案67.如实施方案64所述的tCAR,其中所述V_H和V_L链中的每一个是不同的并且是选自SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31的序列。

[0097] 实施方案68.如实施方案35、39和41-67中任一项所述的tCAR,其包含选自CD28和4-1BB的至少一个共刺激结构域。

[0098] 实施方案69.如实施方案68所述的tCAR,其中所述共刺激结构域是CD28。

[0099] 实施方案70.如实施方案35和40-69中任一项所述的tCAR,其包含CD3 ζ 信号传导结构域。

[0100] 实施方案71.如实施方案41-63和68-70中任一项所述的tCAR,其中所述V_H和V_L链中的每一个衍生自识别CD2的scFv或识别CD3的scFv。

[0101] 实施方案72.如实施方案64所述的tCAR,其中所述tCAR构建体选自克隆5、克隆6、克隆7、克隆8、克隆13、克隆14、克隆15和克隆16。

[0102] 实施方案73.如实施方案64所述的tCAR,其中所述tCAR构建体对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。

[0103] 实施方案74.一种串联嵌合抗原受体(CAR)T细胞(tCAR-T细胞),其包含靶向两种或更多种T细胞抗原的tCAR,如实施方案35和40-73中任一项所述。

[0104] 实施方案75.如实施方案74所述的tCAR-T细胞,其中所述细胞缺乏所述一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

[0105] 实施方案76.如实施方案74和75中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述tCAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基。

[0106] 实施方案77.如实施方案76所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α (TRAC)、TCR β 、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 。

[0107] 实施方案78.如实施方案77所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基选自TCR α (TRAC)和CD3 ϵ 。

[0108] 实施方案79.如实施方案78所述的tCAR-T细胞,其中所述T细胞受体复合物的所述亚基是TRAC。

[0109] 实施方案80.如实施方案35和40-79中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞还包含自杀基因。

[0110] 实施方案81.如实施方案35和40-80中任一项所述的tCAR-T细胞,其中内源性T细胞受体介导的信号传导在所述CAR-T细胞中被阻断。

[0111] 实施方案82.如实施方案35和40-81中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

[0112] 实施方案83.如实施方案35和40-82中任一项所述的tCAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞不引起自相残杀。

[0113] 实施方案84.一种具有靶向CD2和CD3的CAR的串联CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基并且缺乏CD2。

- [0114] 实施方案85.如实施方案85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。
- [0115] 实施方案86.如实施方案85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。
- [0116] 实施方案87.如实施方案85所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:41至SEQ ID NO:44的氨基酸序列。
- [0117] 实施方案88.一种具有靶向CD2和CD7的CAR的串联CAR-T细胞,其中所述CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基并且缺乏CD2和CD7。
- [0118] 实施方案89.如实施方案88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。
- [0119] 实施方案90.如实施方案88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。
- [0120] 实施方案91.如实施方案88所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:45至SEQ ID NO:46的氨基酸序列。
- [0121] 实施方案92.一种CAR-T细胞,其包含靶向CD7的嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR-T细胞缺乏TRAC并且缺乏CD7,并且包含CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。
- [0122] 实施方案93.如实施方案92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少95%的序列同一性。
- [0123] 实施方案94.如实施方案92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR对选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列表现出至少98%的序列同一性。
- [0124] 实施方案95.如实施方案92所述的CAR-T细胞,其中所述CAR是选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:39的氨基酸序列。
- [0125] 一种治疗组合物,其包含如实施方案1-30和74-95中任一项所述的CAR-T细胞的群,或包含包括如实施方案31-73中任一项所述的CAR的CAR-T细胞群,以及至少一种治疗学上可接受的载剂和/或佐剂。
- [0126] 实施方案96.一种治疗患者的癌症的方法,其包括向有需要的患者施用如实施方案1-30和74-95中任一项所述的基因组编辑的CAR-T细胞、基因组编辑的CAR-T细胞群、双CAR-T细胞或串联CAR-T,或包含如实施方案31-73中任一项所述的CAR的CAR-T细胞群。
- [0127] 实施方案97.如实施方案97所述的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。
- [0128] 实施方案98.如实施方案98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是T细胞恶性肿瘤。
- [0129] 实施方案99.如实施方案99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是T细胞急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)。
- [0130] 实施方案100.如实施方案99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。
- [0131] 实施方案101.如实施方案99所述的方法,其中所述T细胞恶性肿瘤是T细胞慢性淋巴细胞性白血病(T-CLL)。
- [0132] 实施方案102.如实施方案98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0133] 实施方案103.如实施方案98所述的方法,其中所述血液系统恶性肿瘤是急性髓性白血病(AML)。

[0134] 实施方案104.一种制备如以上或本文任何实施方案所述的CAR-T细胞的方法,其使用Cas9-CRISPR和选自本文公开的那些的gRNA实现。

[0135] 实施方案105.一种制备如以上或本文任何实施方案所述的CAR-T细胞的方法,其使用Cas9-CRISPR和选自表12和表15-47公开的那些的gRNA实现。

[0136] 实施方案106.一种制备如以上或本文任何实施方案所述的CAR-T细胞的方法,其使用Cas9-CRISPR和选自表12公开的那些和表15-47中用粗体显示的那些的gRNA实现。

[0137] 实施方案107.一种制备如以上或本文任何实施方案所述的CAR-T细胞的方法,其使用Cas9-CRISPR和选自表12公开的那些的gRNA实现。

[0138] M

[0139] 本文公开了一种基因组编辑的CAR-T细胞,其衍生自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、病毒特异性细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta($\gamma\delta$) T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中CAR-T细胞缺乏一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

[0140] 还提供了一种基因组编辑的CAR-T细胞,其衍生自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、病毒特异性细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta($\gamma\delta$) T细胞,其包含靶向一种或多种抗原的一种或多种嵌合抗原受体(CAR),其中CAR-T细胞缺乏T细胞受体复合物的亚基以及一种或多种CAR所特异性结合的一种或多种抗原。

[0141] 还提供了一种CAR-T细胞,其衍生自辅助T细胞、细胞毒性T细胞、病毒特异性细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta($\gamma\delta$) T细胞,其中T细胞受体复合物的缺乏亚基选自TCR α 、TCR β 、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ζ 。

[0142] 在某些实施方案中,嵌合抗原受体特异性结合在恶性T细胞上表达的至少一种抗原。

[0143] 在某些实施方案中,一种或多种抗原选自BCMA、CS1、CD38、CD138、CD19、CD33、CD123、CD371、CD117、CD135、Tim-3、CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD79A、CD79B、APRIL、CD56和CD1a。

[0144] 在某些实施方案中,CAR-T细胞还包含自杀基因治疗系统。

[0145] 在某些实施方案中,内源性T细胞受体介导的信号传导在CAR-T细胞中被阻断。

[0146] 在某些实施方案中,CAR-T细胞不诱发同种异体反应性或移植物抗宿主疾病。

[0147] 在某些实施方案中,CAR-T细胞不引起自相残杀。

[0148] 还提供了一种双或串联CAR-T细胞。

[0149] 还提供了一种药物组合物,其包含如本文公开的CAR-T细胞群,以及至少一种治疗学上可接受的载剂和/或佐剂。

[0150] 还提供了用于治疗血液系统恶性肿瘤的方法,其包括向有需要的患者施用基因组编辑的CAR-T细胞、基因组编辑的CAR-T细胞群,其中基因组编辑的CAR-T细胞群是如本文公开的单CAR-T细胞、双CAR-T细胞或串联CAR-T细胞,或包含如本文公开的所述细胞的药物组合物。

[0151] 在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是T细胞恶性肿瘤。

[0152] 在某些实施方案中,T细胞恶性肿瘤是T细胞急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)。

[0153] 在某些实施方案中,T细胞恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。

[0154] 在某些实施方案中,T细胞恶性肿瘤是T细胞慢性淋巴细胞性白血病(T-CLL)。

[0155] 在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0156] 在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是急性髓性白血病(AML)。

[0157] CAR-T细胞

[0158] 本公开提供了携带嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、包含所述细胞的药物组合物,以及用于治疗癌症,特别是血液系统恶性肿瘤的免疫治疗方法。

[0159] CAR-T细胞是表达嵌合抗原受体的T细胞。表达CAR分子的T细胞可以是辅助T细胞、细胞毒性T细胞、病毒特异性细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta($\gamma\delta$)T细胞。

[0160] 嵌合抗原受体(CAR)是包含以下的重组融合蛋白:1)细胞外配体结合结构域,即抗原识别结构域,2)跨膜结构域,以及3)信号转导结构域。

[0161] 细胞外配体结合结构域是能够结合配体的寡肽或多肽。优选地,细胞外配体结合结构域将能够与细胞表面分子相互作用,所述分子可以是抗原、受体、肽配体、靶标的蛋白质配体,或靶标的多肽。细胞外配体结合结构域可以约0.1pM至约10pM,至约0.1pM至约1pM,或更优选地至约0.1pM至约100nM之间的亲和常数或相互作用亲和力(K_D)与抗原特异性结合。用于确定亲和常数或相互作用亲和力(K_D)的方法是本领域众所周知的。在一些情况下,细胞外配体结合结构域经过选择,以识别在与特定疾病状态相关联的靶细胞上充当细胞表面标志物的配体。

[0162] 在一个实施方案中,细胞外配体结合结构域包括包含通过接头(例如,GGGGS₍₂₋₆₎)连接的轻(V_L)和重(V_H)可变片段的单链抗体片段(scFv),并且赋予针对T细胞抗原或对T细胞没有特异性的抗原的特异性。在一个实施方案中,CAR-T细胞的嵌合抗原受体可结合在恶性T细胞上表达或过表达的T细胞特异性抗原,CAR-T细胞缺乏所述恶性T细胞的所述抗原(例如,基因组编辑的CAR-T细胞)。

[0163] 在恶性T细胞上表达的CAR靶向的抗原的非限制性实例包括CD5、CD7、CD2、CD4和CD3。在一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞包含具有特异性结合CD5的细胞外配体结合结构域的嵌合抗原受体。

[0164] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞包含具有特异性结合CD7的细胞外配体结合结构域的嵌合抗原受体。换句话说,特异性结合CD7的CAR包含细胞外配体结合结构域,其包含对选自SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列表现出至少80%、90%、95%、97%或99%的同一性的多肽序列,并且通过包含序列(GGGGS)₃₋₄的柔性接头连接在一起。

[0165] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞包含具有特异性结合CD2的细胞外配体结合结构域的嵌合抗原受体。换句话说,特异性结合CD2的CAR包含细胞外配体结合结构域,其包含对选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13或SEQ ID:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列表现出至少80%、90%、95%、97%或99%的同一性的多肽序列,并且通过包含序列(GGGGS)₃₋₄的柔性接头连接在一起。

[0166] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞包含具有特异性结合CD4的细胞外配体结合结构域的嵌合抗原受体。

[0167] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞包含特异性结合CD3的嵌合抗原受体的

细胞外配体结合结构域。换句话说,特异性结合CD3的CAR包含细胞外配体结合结构域,其包含对选自SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17或SEQ ID:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列表现出至少80%、90%、95%、97%或99%的同一性的多肽序列,并且通过包含序列(GGGGS)₃₋₄的柔性接头连接在一起。

[0168] 在白血病细胞(例如,异常成髓细胞、红血细胞或血小板)的表面上表达的CAR靶向抗原的非限制性实例包括CD123(IL3RA)、CD371(CLL-1;CLEC12A)、CD117(c-kit)和CD135(FLT3)、CD7以及Tim3。可使用靶向这些抗原的细胞外配体结合结构域构建CAR,以用于治疗白血病,即急性髓性白血病(AML)。

[0169] 在多发性骨髓瘤细胞(例如,恶性浆细胞)的表面上表达的CAR靶向抗原的非限制性实例包括BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19。可使用靶向这些抗原的细胞外配体结合结构域构建CAR,以用于治疗多发性骨髓瘤。在另一个实施方案中,可使用靶向B细胞成熟抗原(BCMA)和跨膜激活剂-CAML相互作用因子(Transmembrane Activator and CAML Interactor,TACI)的配体(其有效共靶向BCMA和TACI)的APRIL蛋白质的一部分构建CAR,以用于治疗多发性骨髓瘤。信号肽指导分泌或跨膜蛋白运输至细胞膜和/或细胞表面,以使多肽正确定位。具体地,本公开的信号肽将附加多肽(即,CAR受体)引导至细胞膜,其中附加多肽的细胞外配体结合结构域展示在细胞表面上,附加多肽的跨膜结构域跨越细胞膜,并且附加多肽的信号转导结构域处于细胞的胞质部分中。在一个实施方案中,信号肽是来自人CD8 α 的信号肽(SEQ ID NO:1)。在一个实施方案中,信号肽是CD8 α 信号肽的功能片段。功能片段定义为CD8 α 信号肽的将附加多肽引导至细胞膜和/或细胞表面的至少10个氨基酸的片段。人CD8 α 信号肽的功能片段的实例包括氨基酸序列MALPVTALLPLALLLHAA、MALPVTALLLP、PVTALLPLALL和LLLPLALLLHAARP。

[0170] 通常,细胞外配体结合结构域通过跨膜结构域(T_m)与嵌合抗原受体(CAR)的信号转导结构域连接。跨膜结构域横穿细胞膜,将CAR锚定至T细胞表面,并将细胞外配体结合结构域与信号转导结构域连接,从而影响CAR在T细胞表面的表达。

[0171] 本公开的跨膜结构域的区别性特征是在免疫细胞的表面上表达以指导针对预限定的靶细胞的免疫细胞应答的能力。跨膜结构域可以来源于天然或合成来源。可替代地,本公开的跨膜结构域可衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。

[0172] 本公开的跨膜多肽的非限制性实例是T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。可替代地,跨膜结构域可以是合成的,并且主要包含疏水性氨基酸残基(例如,亮氨酸和缬氨酸)。在一个实施方案中,跨膜结构域衍生自T细胞表面糖蛋白CD8 α 链同种型1前体(NP_001139345.1)(SEQ ID NO:4),并且更优选地CD28(SEQ ID NO:3)。

[0173] 跨膜结构域还可以包含介于细胞外配体结合结构域与所述跨膜结构域之间的铰链区。术语“铰链区”通常是指用于将跨膜结构域与细胞外配体结合结构域连接的任何寡肽或多肽。具体地讲,铰链区用于为细胞外配体结合结构域提供更多灵活性和可接近性。铰链区可包含最多至300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸并且最优选地25至50个氨基酸。铰链区可来源于整个或部分诸如CD28、4-1BB(CD137)、OX-40(CD134)、CD3 ζ 、T细胞受体 α 或 β 链、CD45、CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、ICOS、CD154的天然存在的分子,或来源于整个或部分抗体恒定区。可替代地,铰链区可以是与天然存在的

铰链序列相对应的合成序列,或铰链区可以是完全合成的铰链序列。在一个实施方案中,铰链结构域包含人CD8 α (SEQ ID NO:2)、Fc γ RIII α 受体或IgG1的一部分,并且与其具有至少80%、90%、95%、97%或99%的序列同一性。

[0174] 本公开的嵌合抗原受体 (CAR) 包含CAR的信号转导结构域或细胞内信号传导结构域,其负责在细胞外配体结合结构域与靶标结合后进行细胞内信号传导,从而导致免疫细胞和免疫应答的激活。换句话说,信号转导结构域负责激活CAR在其中表达的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或包括细胞因子分泌的辅助T细胞活性。因此,术语“信号转导结构域”是指蛋白质的转导效应子功能信号并且指导细胞执行特化功能的部分。

[0175] 用于CAR中的信号转导结构域的实例可以是T细胞受体和共受体的配合作用来起始抗原受体接合之后的信号转导的细胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。信号转导结构域包括两类不同的细胞质信号传导序列,即起始抗原依赖性初级激活的那些以及以不依赖抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些。初级细胞质信号传导序列可以包含信号传导基序,所述信号传导基序被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。ITAM是存在于多种受体的胞质内尾中的良好限定的信号传导基序,其用作syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点。可以用于本公开的ITAM的非限制性实例可以包括衍生自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CDS、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个实施方案中,CAR的信号转导结构域可以包含具有与其具有至少80%、90%、95%、97%或99%序列同一性的氨基酸序列的CD3 ζ 信号传导结构域。

[0176] 另外,本公开的CAR-T细胞还可包含一种或多种自杀基因治疗系统。本领域已知的合适的自杀基因治疗系统包括但不限于几种单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSVtk)/更昔洛韦 (GCV) 或诱导型半胱天冬酶9蛋白。在一个实施方案中,自杀基因是嵌合CD34/胸苷激酶。

[0177] 本文公开的T细胞可缺乏嵌合抗原受体所特异性结合的抗原并且因此是具有自相残杀抗性的。在一些实施方案中,T细胞的抗原经过修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰抗原。例如,嵌合抗原受体所识别的抗原的表位可通过一种或多种氨基酸变化(例如,取代或缺失)进行修饰,或表位可从抗原中缺失。在其他实施方案中,抗原的表达在T细胞中降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。用于降低蛋白质表达的方法是本领域已知的,并且包括但不限于修饰或替换与编码该蛋白质的核酸序列可操作地连接的启动子。在其他实施方案中,对T细胞进行修饰,使得不表达抗原,例如通过使编码抗原的基因缺失或受破坏。在以上实施方案中的每一个中,T细胞可缺乏嵌合抗原受体所特异性地结合的一种或优选所有抗原。用于对T细胞进行基因修饰以使其缺乏抗原的方法是本领域众所周知的,并且上文提供了非限制性实例。在一个示例性实施方案中,CRISPR/cas9基因编辑可以用于对T细胞进行修饰以使其缺乏抗原,例如,如下文所述。可替代地,可使用TALEN编辑基因。

[0178] 在以上方法的变型中,可将编码一种或多种蛋白表达阻断剂 (PEBL) 的构建体转导到细胞中,作为编辑步骤或编辑步骤的一部分,或作为CAR转导的一部分。例如,可转导编码对CD3 ϵ 具有特异性的抗体衍生的单链可变片段的构建体,例如通过慢病毒载体。一旦表达,PEBL就与CD3 ϵ 在细胞内共定位,从而阻断表面CD3和TCR $\alpha\beta$ 表达。因此,表面CD3/TCR $\alpha\beta$ 表达的PEBL阻滞是制备同种异体CAR-T细胞的替代方法。此外,PEBL和CAR表达可以组合于单个

构建体中。这些方法中的任一种可使用本文公开的方法实现,并且可产生PEBL以用于阻滞本文公开的基因抑制的任何靶标。

[0179] 上文所述的方法可适于将CAR插入编码抗原、细胞表面蛋白或可分泌蛋白诸如细胞因子的基因的基因座中。以此方式,通过CAR的转染实现基因组的编辑。此后,可如本文所述将细胞激活,从而在某些实施方案中去除单独的基因组编辑步骤。理想地,应在细胞主动分裂的同时执行这一步骤。还预期此类方法导致工程改造细胞的稳健扩增。

[0180] 在某些情况下,可选择缺乏嵌合抗原受体所特异性结合的抗原的T细胞。某些T细胞将产生并展示出较少的给定表面蛋白,相反,如果将作为T-CAR靶标的抗原缺失或非功能化,可以选择缺乏该抗原的T细胞,并且对缺乏抗原的细胞群进行扩增以用于CAR的转导。这样的细胞也将具有自相残杀抗性。

[0181] 表1. 不同CAR组分的氨基酸序列。

[0182]

功能结构域	SEQ ID NO:	氨基酸序列
CD8α 信号肽	SEQ ID NO:1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
CD8α 铰链	SEQ ID NO:2	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACD
CD28 跨膜(T_m)结构域	SEQ ID NO:3	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
表面糖蛋白 CD8α 链同 种型 1 前体 (NP_001139345.1)	SEQ ID NO:4	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPL DRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWL FQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDT QRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFC SALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0183]

		NHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARY V
4-1BB 共刺激结构域	SEQ ID NO:5	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEEGGCEL
CD28 共刺激结构域	SEQ ID NO:6	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQ PYAPPRDFAAYRS
CD3 zeta (ζ)	SEQ ID NO:7	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
P2A 肽	SEQ ID NO:8	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
(GGGGS)₄ 接头	SEQ ID NO:9	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
hCD34	SEQ ID NO:10	MPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTAT PELPTQGTFNSVSTNVSYQETTTTPSTLGST SLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVIT SVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTP ETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKP YTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLE QNKTSSEAEFKKDRGEGLARVLCGEEQA DADAGAQCSSLQAQSEVRPQCLLLVLA NRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTE QDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGI TGYFLMNRRSWSPI
人单纯疱疹病毒-1 (HSV)-胸苷激酶(TK)	SEQ ID NO:11	MPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTAT PELPTQGTFNSVSTNVSYQETTTTPSTLGST SLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVIT SVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTP ETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKP YTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLE QNKTSSEAEFKKDRGEGLARVLCGEEQA DADAGAQCSSLQAQSEVRPQCLLLVLA NRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTE QDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGI TGYFLMNRRSWSPTEGGGGGGDLGGVK LPHLFGKRLVEARMASYPCHQHASAFDQ AARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRLE QKMPTLLRVYIDGPHGMGKTTTTQLLVA LGSRDDIVYVPEPMTYWQVLGASETIANI YTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTSAQITM GMPYAVTDAVLAPHVGGGEAGSSHAPPPA LTLLEDHRPIAVMLCYPAAARYLMGSMT QAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHI DRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYGLL ANTVRYLQGGGSWWEDWGQLSGTAVPP QGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPELLA

[0184]

		PNGDLYNVFAWALDVLAKRLRPMHVFIL DYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTP GSIPTICDLARTFAREMGEAN
--	--	--

[0185]

表2.scFv的可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 的氨基酸序列。

[0186]

ScFv 序列	SEQ ID NO:	氨基酸序列
CD2 重链可变区(35.1 ATCC®HB-222™)	SEQ ID NO:12	EVKLEESGAELVKPGASVKLSCRTSGFNI KDTIHWVKQRPEQGLKWIGRIDPANGNT KYDPKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGT AVTVSS
CD2 轻链可变区(35.1 ATCC®HB-222™)	SEQ ID NO:13	DIKNITQSPSSMYVSLGERVTITCKASQDI NSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGV PSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMEIYYC LQYDEFPYTFGGGTKLEMKR
CD2 重链可变区(OKT 11 ATCC®CRL-8027™)	SEQ ID NO:14	EVQLEESGAELVRPGTSVKLSCKASGYTF TSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSE THYNEKFKDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLT SDDSAVYYCSRRDAKYDGYALDYWGQG TSVTSS
CD2 轻链可变区(OKT 11 ATCC®CRL-8027™)	SEQ ID NO:15	DJVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKTL HSNGNTYLYWFLQRPQGSPQVLIYRMSN LASGVPNRFSGSGSETTFTLRISRVEADV GIYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIER
CD3 重链可变区(OKT 3)	SEQ ID NO:16	GSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG YTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPS RGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTLVSS
CD3 轻链可变区(OKT 3)	SEQ ID NO:17	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC QQWSSNPFTFGSGTKLEINR
CD3 重链可变区 (UCHT1)	SEQ ID NO:18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSF TGYTMNWVRQAPGKCLEWVALINPYKG VSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDV WGQGTLLTVSS
CD3 重链可变区 (UCHT1)	SEQ ID NO:19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESGV PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC QQGNTLPWTFGCGTKVEIK
CD7 重链可变区	SEQ ID NO:20	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTF SSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGFT YYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLR

[0187]

		SEDAMYYCARDEVRGYLDVWGAGTTV TVS
CD7 轻链可变区	SEQ ID NO:21	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGIS NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC QQYSKLPYTFGGGGTKLEIKR
FTL3 重链可变区 (EB10)	SEQ ID NO:22	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYT FTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGT TVTVSS
FTL3 轻链可变区 (EB10)	SEQ ID NO:23	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLL HSNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN RASGVDPDRFSGSGSDTDFTLQISRVEAED VGVYYCMQGTHPAISFGQGTRLEIK
FTL3 重链可变区 (NC7)	SEQ ID NO:24	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGT FSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT ANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQ GTTTVTVSS
FTL3 轻链可变区 (NC7)	SEQ ID NO:25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQ QSYSTPFTFGPGTKVDIK
FTL3 重链可变区 (D3-D4)	SEQ ID NO:26	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYT FTSYMHVWARQAPGQGLEWMGIINPSGG STSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCARVVAADVWGGGT LTVTVSS
FTL3 轻链可变区 (D3-D4)	SEQ ID NO:27	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLL HSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN RASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK
CS1 重链可变区	SEQ ID NO:28	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYS FTTYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDS ETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSE DSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQGTSTV TVSS
CS1 轻链可变区	SEQ ID NO:29	DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDV ITGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRTGV PD RFTGSGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQ QHSTPLTFGAGTKLELK
CD33 重链可变区	SEQ ID NO:30	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGY TFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGND DISYNQKFQGKATLTADKSSTAYMQLSS

		LTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGT VTVSSSG
[0188]	CD33 轻链可变区	SEQ ID NO:31 GSEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQS VFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPE DLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKR

[0189] 单CAR-T细胞 (mCAR-T)

[0190] 本公开涵盖的CAR-T细胞缺乏嵌合抗原受体所特异性结合的一种或多种抗原并且因此是具有自相残杀抗性的。在一些实施方案中，T细胞的一种或多种抗原经过修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合一种或多种经修饰抗原。例如，嵌合抗原受体识别的一种或多种抗原的表位可通过一种或多种氨基酸变化（例如，取代或缺失）进行修饰，或表位可从抗原中缺失。在其他实施方案中，一种或多种抗原的表达在T细胞中降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。用于降低蛋白质表达的方法是本领域已知的，并且包括但不限于修饰或替换与编码该蛋白质的核酸序列可操作地连接的启动子。在其他实施方案中，对T细胞进行修饰，使得不表达一种或多种抗原，例如通过使编码一种或多种抗原的基因缺失或受破坏。在以上实施方案中的每一个中，CAR-T细胞可缺乏嵌合抗原受体所特异性地结合的一种或优选所有抗原。对T细胞进行基因修饰以使其缺乏一种或多种抗原的方法是本领域众所周知的，并且本文提供了非限制性实例。在实施例1-6所述的实施方案中，使用CRISPR-Cas9系统修饰T细胞，以使其缺乏一种或多种抗原。

[0191] 本公开涵盖的CAR-T细胞可由于缺失T细胞受体 (TCR) -CD3复合物的一部分而进一步缺乏内源性T细胞受体 (TCR) 信号传导。在各种实施方案中，可期望消除或抑制本文公开的CAR-T细胞中的内源性TCR信号传导。例如，当使用同种异体T细胞产生CAR-T细胞时，减少或消除CAR-T细胞中的内源性TCR信号传导可预防或减少移植物抗宿主疾病 (GvHD)。用于消除或抑制内源性TCR信号传导的方法是本领域已知的，并且包括但不限于缺失TCR-CD3受体复合物的一部分，例如，TCR受体 α 链 (TRAC)、TCR受体 β 链 (TCRB)、TCR δ 、TCR γ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 和/或CD3 δ 。缺失TCR受体复合物的一部分可阻断TCR介导的信号传导，并且因此可允许安全地使用同种异体T细胞作为CAR-T细胞的来源，而不引起危及生命的GvHD。

[0192] 另外，本公开涵盖的CAR-T细胞还可包含一种或多种如本文所述的自杀基因。

[0193] 在一个实施方案中，本公开提供一种包含特异性结合CD5的嵌合抗原受体的T细胞，其中T细胞缺乏CD5，例如CD5 Δ CART5细胞。在非限制性实例中，CD5的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD5进行修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD5，(b) 对T细胞进行修饰，使得抗原的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD5不表达（例如，通过编码CD5的基因的缺失或破坏）。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因和/或修饰，使得内源性T细胞受体 (TCR) 介导的信号传导在T细胞中被阻断。在非限制性实例中，在CD5 Δ CART5细胞中表达与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合的经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列。

[0194] 在另一个实施方案中，本公开提供一种包含特异性结合CD7的嵌合抗原受体的T细胞，其中T细胞缺乏CD7，例如CD7 Δ CART7细胞。在非限制性实例中，CD7的缺乏由以下造成：

(a) 对T细胞表达的CD7进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7, (b) 对T细胞进行修饰,使得抗原的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD7不表达(例如,通过编码CD7的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因和/或修饰,使得内源性T细胞受体(TCR)介导的信号传导在T细胞中被阻断。在非限制性实例中,在CD7 Δ CART7细胞中表达与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合的经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列。

[0195] 在另一个实施方案中,本公开提供一种包含特异性结合CD2的嵌合抗原受体的T细胞,其中T细胞缺乏CD2,例如CD2 Δ CART2细胞。在非限制性实例中,CD2的缺乏由以下造成: (a) 对T细胞表达的CD2进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2, (b) 对T细胞进行修饰,使得抗原的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD2不表达(例如,通过编码CD2的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因和/或修饰,使得内源性T细胞受体(TCR)介导的信号传导在T细胞中被阻断。在非限制性实例中,在CD2 Δ CART2细胞中表达与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合的经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列。

[0196] 在另一个实施方案中,本公开提供一种包含特异性结合CD4的嵌合抗原受体的T细胞,其中T细胞缺乏CD4,例如CD4 Δ CART4细胞。在非限制性实例中,CD4的缺乏由以下造成: (a) 对T细胞表达的CD4进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD4, (b) 对T细胞进行修饰,使得抗原的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD4不表达(例如,通过编码CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因和/或修饰,使得内源性T细胞受体(TCR)介导的信号传导在T细胞中被阻断。在非限制性实例中,在CD4 Δ CART4细胞中表达与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合的经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列。

[0197] 在另一个实施方案中,本公开提供一种包含特异性结合CD3的嵌合抗原受体的T细胞,其中T细胞缺乏CD3 ϵ ,例如CD3 Δ CART3 ϵ 细胞。在非限制性实例中,CD3的缺乏由以下造成: (a) 对T细胞表达的CD3进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD3, (b) 对T细胞进行修饰,使得抗原的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD3不表达(例如,通过编码CD3 ϵ 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因和/或修饰,使得内源性T细胞受体(TCR)介导的信号传导在T细胞中被阻断。在非限制性实例中,在CD3 Δ CART3 ϵ 细胞中表达与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合的经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列。

[0198] 公开了可以在衍生自细胞毒性T细胞、记忆T细胞或gamma delta ($\gamma\delta$) T细胞的基因组编辑的CAR-T细胞的表面上表达的CAR氨基酸序列的实施方案。

[0199] 表3. 单嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列。

[0200]

<u>单 CAR 构建</u> <u>体</u>	<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>氨基酸序列</u>
CD7-CAR-4 -1BB_CD34	SEQ ID NO:32	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLG DRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSS LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQY SKLPYTFGGGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAM SWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISR DNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDEVRGYLDV WGAGTTVTVSPRASTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGSGATNFSL LKQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTALCLLSLLPSGF MSLDNNGTATPELPTQGTFSTNVSTNVSYQETTTSTL GSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYG NTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGN VSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIRE VKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEE QADADAGAQCSSLLLAQSEVRPQCCLLVLANRTEIS

[0201]

		SKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKT LIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRSWSPI
CD7-CAR-4 -1BB_CD34 _TK	SEQ ID NO:33	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLASLG DRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSS LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQY SKLPYTFGGGTTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAM SWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDsvKGRFTISR DNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCARDEVrgYLDV WGAGTTVTVSPRASTTTAPRPPTPAPTiasQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELrvKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLdkRRGRDPemGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGSGATNFSL LKQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTALCLLSLLPSGF MSLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPTSL GSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYG NTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGN VSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIRE VKLTQGICLEQNKTSsCAEFKKDRGEGLARVLCGEE QADADAGAQCvCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEIS SKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKT LIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRSWSPtGEGGGG GDLGGVKLPHLFGKRLVEARMASYPCHQHAsAFDQ AARSRGHSNRRTALRPRRQqEATEVRLEqKMPTLLR VYIDGPHGMGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTY WQVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTS AQITMGMPYAVTDAVLAPHVGGEGAGSSHAPPPALTL LLDRHPIAVMLCYPAARYLMGSMTpQAVLAFVALIPP TLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAML AAIRRVYGLLANTVRYLQGGGSWWEDWGQLSGTA VPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPELLAPNGD LYNVFAWALDVLAKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRD ALLQLTSGMVQTHVTTPGSIPTICDLARTFAREMGEA N
CD7-CAR- CD28_CD34	SEQ ID NO:34	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQTTSSLASLG DRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSS LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQY SKLPYTFGGGTTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAM SWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDsvKGRFTISR DNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCARDEVrgYLDV WGAGTTVTVSPRASTTTAPRPPTPAPTiasQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLdkRRGRDPemGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL

[0202]

		YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGSGATNFSLL KQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTALCLLSLLPSGFM SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPTSLG STSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNT NSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVS DLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREV KLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISS KLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTL IALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRSWSPI
CD7-CAR- CD28_CD34 _TK	SEQ ID NO:35	MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLG DRVITISCASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSS LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQY SKLPYTFGGGTKEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAM SWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDVSKGRFTISR DNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCARDEVGRGYLDV WGAGTTTVSPRSTTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNO LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGSGATNFSLL KQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTALCLLSLLPSGFM SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPTSLG STSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGNT NSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVS DLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREV KLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISS KLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTL IALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRSWSPTGEGGGGG DLGGVKLPHLFGKRLVEARMASYPCHQHASAFDQA ARSRGHSNRRTALRPRRQGEATEVRLEQKMPTLLRV YIDGPHGMGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYW QVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVMTSA QITMGMPYAVTDAVLAPHVGGGEAGSSHAPPPALTLL LDRHPIAVMLCYPARYLMGSMTQPQAVLAFVALIPT LPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAML AIRRVYGLLANTVRYLQGGGSWWEDWGQLSGTAVP PQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDLY NVFAWALDVLAKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRDAL LQLTSGMVQTHVTTGPSIPTICDLARTFAREMGEAN
CD79B-CA R-CD28_C D34	SEQ ID NO:36	MALPVTALLPLALLLHAARPGSDIQLTQSPSSLSAS VGDRVITICKASQSVDEYEGDSFLNWYQQKPGKAPK LLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGD

[0203]

		TNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSPRASTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDF WVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRRTDGSATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPRG WTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFNSVS TNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETT VKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVS TPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPI LSDIAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKD RGEGLARVLCGEEQADADAGAQCVCSSLLLAQSEVRP QCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTE QDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFLMN RRSWSPTGEGGGGGFKRDLGGVKLPHLFGKRLVEA RMASYPCHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQ QEATEVRLEQKMPTLLRVYIDGPHGMGKTTTTQLLV ALGSRDDIVYVPEPMTYWQVLGASETIANIYTTQHR LDQGEISAGDAAVVMTSAQITMGMPYAVTDAVLAP HVGGEAGSSHAPPPALTLDDRHPHIAVMLCYPAAARYL MGSMTTPQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHID RLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYGLLANTVRYLQ GGGSWWEDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIG DTLFTLFRAPPELLAPNGDLYNVFAWALDVLAKRLRP MHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTGPS IPTICDLARTFAREMGEAN
CD2-CAR- CD28_CD34	SEQ ID NO:37	MALPVTALLPLALLHAARPDIVMTQAAPSVPTP GESVSISCRSSKTLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQVL IYRMSNLASGVPNRFSGSGSETTFTLRISRVEAEDVGI YYCMQHLEYPYTFGGGKLEIERGGGGSGGGSGG GSGGGGSEVQLEESGAELVRPGTSVKLSCKASGYT FTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKF KDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSRDA KYDGYALDYWGQTSVTVSSPRASTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVL VVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRR TDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTAL LCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNV SYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETT VKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPET TLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPI LSDIAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGE GLARVLCGEEQADADAGAQCVCSSLLLAQSEVRPQCL

[0204]

		LLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDV ASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRS WSPI
CD2-CAR-4 -1BB_CD34	SEQ ID NO:38	MALPVTALLPLALLLHAARPDIVMTQAAPSVPTP GESVSISCRSSKTLLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQVL IYRMSNLASGVNRFSGSGSETTFTLRISRVEAEDVGI YYCMQHLEYPYTFGGGTKEIERGGGGSGGGSGG GGSGGGGSEVQLEESGAELVRPGTSVKLSCKASGYT FTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKF KDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSRDA KYDGYALDYWGQTSVTVSSPRASTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRR TDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTAL LCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNV SYQETTTPTSLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFT STSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPET TLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDI KAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGE GLARVLCGEEQADADAGAQCSSLQAQSEVRPQCL LLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDV ASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRS WSPI
CD3-CD28- CD34	SEQ ID NO:39	MALPVTALLPLALLLHAARPGSQVQLQQSGAELAR PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQGLEW IGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPG EKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYC QQWSSNPFTFGSGTKLEINRPRASTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRR DGSATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPRGWTAL CLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNV YQETTTPTSLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTS TSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETT LKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIK AEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEG LARVLCGEEQADADAGAQCSSLQAQSEVRPQCLL VLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVA SHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNRRSWS

[0205]

		PI
--	--	----

[0206] 以类似的方式,可构建其他单CAR-T细胞并在下表4中给出。

[0207] 表4. 单CAR和CAR-T。

[0208]

实例	CAR-T 细胞的抗原靶标	抗原缺失/抑制
M1	APRIL	-
M2	APRIL	APRIL
M3	APRIL	APRIL + TRAC
M4	APRIL	APRIL + CD3 ϵ
M5	APRIL	CD3 ϵ
M6	BCMA	-
M7	CD117	-
M8	CD117	CD117
M9	CD123	-
M10	CD123	CD123
M11	CD135	-
M12	CD135	CD135
M13	CD138	-
M14	CD19	-
M15	CD1a	-
M16	CD1a	CD3 ϵ
M17	CD1a	TRAC
M18	CD1a	CD1a + TRAC
M19	CD1a	CD1a + CD3 ϵ
M20	CD2	-
M21	CD2	CD2
M22	CD2	CD2 + TRAC
M23	CD2	CD2 + CD3 ϵ
M24	CD20	
M25	CD21	
M26	CD22	
M27	CD23	
M28	CD3	-
M29	CD3	CD3 ϵ
M30	CD3	CD3 ϵ + TRAC
M31	CD33	-
M32	CD33	CD33

实例	CAR-T 细胞的抗原靶标	抗原缺失/抑制
M33	CD371	-
M34	CD371	CD371
M35	CD38	-
M36	CD38	CD38
M37	CD4	-
M38	CD4	CD4
M39	CD4	CD4 + TRAC
M40	CD4	CD4 + CD3 ϵ
M41	CD5	-
M42	CD5	CD5
M43	CD5	CD5 + TRAC
M44	CD5	CD5 + CD3 ϵ
M45	CD56	-
M46	CD56	CD56
M47	CD56	CD56 + TRAC
M48	CD56	CD56 + CD3 ϵ
M49	CD56	CD3 ϵ
M50	CD56	TRAC
M51	CD7	-
M52	CD7	CD7
M53	CD7	CD7 + TRAC
M54	CD7	CD7 + CD3 ϵ
M55	CD79A	-
M56	CD79B	-
M57	CS1	-
M58	CS1	CS1
M59	Tim-3	-
M60	Tim-3	Tim-3
M61	Tim-3	Tim-3 + TRAC
M62	Tim-3	TRAC
M63	Tim-3	CD3 ϵ
M64	Tim-3	Tim-3 + CD3 ϵ

[0209] 双CAR-T细胞 (dCAR-T)

[0210] 可通过以下方式产生双CAR-T细胞 (dCAR-T): 将编码第一细胞外配体结合结构域的序列的蛋白质克隆到包含一个或多个共刺激结构域和信号转导结构域的慢病毒载体中, 并且将编码第二细胞外配体结合结构域的序列的第二蛋白质克隆到包含另外的一个或多个共刺激结构域和信号转导结构域的相同慢病毒载体中, 从而产生质粒, 从所述质粒中由

相同载体表达两种CAR构建体。

[0211] 在一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含双嵌合抗原受体(dCAR),即,编码由单一慢病毒构建体表达的两种CAR的序列的蛋白质,其特异性结合CD5和TCR受体 α 链(TRAC),其中T细胞缺乏CD5和TRAC(例如,CD5*TRAC-dCART Δ CD5 Δ TRAC细胞)。在非限制性实例中,CD5和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD5和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD5和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD5和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD5*TRAC-CART Δ CD5 Δ TRAC细胞中表达。

[0212] 在第二实施方案中,本公开提供一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD7和TCR受体 α 链(TRAC)的dCAR,其中T细胞缺乏CD7和TRAC,例如CD7*TRAC-dCART Δ CD7 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD7和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD5和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD7和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD7*TRAC-dCART Δ CD7 Δ TRAC细胞中表达。

[0213] 在第三实施方案中,本公开提供一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD2和TCR受体 α 链(TRAC)的dCAR,其中T细胞缺乏CD2和TRAC,例如CD2*TRAC-dCART Δ CD2 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD2和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD2和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD2*TRAC-dCART Δ CD2 Δ TRAC细胞中表达。

[0214] 在另一个实施方案中,本公开提供一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD4和TCR受体 α 链(TRAC)的dCAR,其中T细胞缺乏CD4和TRAC,例如CD4*TRAC-dCART Δ CD4 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD4和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD4和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD4和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD4和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD4和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失

或破坏。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD4*TRAC-dCART Δ CD4 Δ TRAC细胞中表达。

[0215] 在另一个实施方案中，本公开提供一种工程改造的T细胞，其包含特异性结合CD3和TCR受体α链 (TRAC) 的dCAR，其中T细胞缺乏CD3和TRAC，例如CD3*TRAC-dCART Δ CD3TRAC细胞。在非限制性实例中，CD3和TCR受体α链 (TRAC) 的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD3和TCR受体α链 (TRAC) 进行修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD3和TCR受体α链 (TRAC)，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD3和TCR受体α链 (TRAC) 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD3和TCR受体α链 (TRAC) 不表达 (例如，通过编码CD3和/或TCR受体α链 (TRAC) 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD3*TRAC-dCART Δ CD3 Δ TRAC细胞中表达。

[0216] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种工程改造的T细胞，其包含特异性结合CD2和CD3 epsilon (ε) 链的dCAR，其中T细胞缺乏CD2和CD3ε，例如CD2*CD3ε-dCART Δ CD2 Δ CD3ε细胞。在非限制性实例中，CD2和CD3 epsilon (ε) 链的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD2和CD3ε进行修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2和CD3ε，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD2和CD3ε的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD2和CD3ε不表达 (例如，通过编码CD2和/或CD3ε的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD2*CD3ε-dCART Δ CD2 Δ CD3ε细胞中表达。

[0217] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种工程改造的T细胞，其包含特异性结合CD4和CD3 epsilon (ε) 链的dCAR，其中T细胞缺乏CD2和CD3ε，例如CD4*CD3ε-dCART Δ CD4 Δ CD3ε细胞。在非限制性实例中，CD4和CD3ε链的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD4和CD3ε进行修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD4和CD3ε，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD4和CD3ε的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD4和CD3ε不表达 (例如，通过编码CD4和/或CD3ε的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD4*CD3ε-dCART Δ CD4 Δ CD3ε细胞中表达。

[0218] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种工程改造的T细胞，其包含特异性结合CD5和TCR beta (β) 链的dCAR，其中T细胞缺乏CD5和TCRβ，例如，CD5*TCRβ-dCART Δ CD5 Δ TCRβ细胞。在非限制性实例中，CD5和TCRβ链的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD5和TCRβ进行修饰，使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD5和TCRβ，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD5和TCRβ的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD5和TCRβ不表达 (例如，通过编码CD5和/或TCRβ的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨

膜结构域同框融合,在CD5*TCR β -dCART Δ CD5 Δ TCR β 细胞中表达。

[0219] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD7和TCR beta (β) 链的dCAR,其中T细胞缺乏CD5和TCR β ,例如,CD7*TCR β -dCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD7和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD7和TCR β 进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR β 不表达(例如,通过编码CD7和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,在CD7*TCR β -dCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞中表达。

[0220] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD2和TCR beta (β) 链的dCAR,其中T细胞缺乏CD2和TCR β ,例如,CD2*TCR β -dCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD2和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD2和TCR β 进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR β 不表达(例如,通过编码CD2和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*TCR β -dCART Δ CD2 Δ TCR β 细胞中表达。

[0221] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD4和TCR beta (β) 链的dCAR,其中T细胞缺乏CD2和TCR β ,例如,CD4*TCR β -dCART Δ CD4 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD4和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD4和TCR β 进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD4和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD4和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD4和TCR β 不表达(例如,通过编码CD4和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD4*TCR β -dCART Δ CD4 Δ TCR β 细胞中表达。

[0222] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD7和CD2的dCAR,其中T细胞缺乏CD7和CD2,例如,CD7*CD2-dCART Δ CD7 Δ CD2细胞。在非限制性实例中,CD7和CD2的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD7和CD2进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7和CD2, (b) 对T细胞进行修饰,使得CD7和CD2的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD7和CD2不表达(例如,通过编码CD7和/或CD2的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD7*CD2-dCART Δ CD7 Δ CD2细胞中表达。

[0223] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD7和CD5的dCAR,其中T细胞缺乏CD7和CD5,例如,CD7*CD5-dCART Δ CD7 Δ CD5细胞。在非限

制性实例中,CD7和CD5的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD7和CD5进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7和CD5,(b)对T细胞进行修饰,使得CD7和CD5的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD7和CD5不表达(例如,通过编码CD7和/或CD5的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD7*CD5-dCART Δ CD7 Δ CD5细胞中表达。

[0224] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD7和CD4的dCAR,其中T细胞缺乏CD7和CD4(例如,CD7*CD4-dCART Δ CD7 Δ CD4细胞)。在非限制性实例中,CD7和CD4的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD7和CD4进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD7和CD4,(b)对T细胞进行修饰,使得CD7和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD7和CD4不表达(例如,通过编码CD7和/或CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,在CD7*CD4-dCART Δ CD7 Δ CD4细胞中表达自杀基因,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因与人CD34cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD7*CD4-dCART Δ CD7 Δ CD4细胞中表达。

[0225] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD2和CD5的dCAR,其中T细胞缺乏CD2、CD5和TRAC,例如,CD2*CD5-dCART Δ CD2 Δ CD5 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD2和CD5的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和CD5进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2和CD5,(b)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD5的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD5不表达(例如,通过编码CD2和/或CD5的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*CD5-dCART Δ CD2 Δ CD5细胞中表达。

[0226] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD2和CD4的dCAR,其中T细胞缺乏CD2、CD4和TRAC,例如,CD2*CD4-dCART Δ CD2 Δ CD4 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD2和CD4的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和CD4进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD2和CD4,(b)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD4不表达(例如,通过编码CD2和/或CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*CD4-dCART Δ CD2 Δ CD4细胞中表达。

[0227] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种工程改造的T细胞,其包含特异性结合CD5和CD4的dCAR,其中T细胞缺乏CD5和CD4,,例如,CD5*CD4-dCART Δ CD5 Δ CD4细胞。在非限制性实例中,CD5和CD4的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD5和CD4进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD5和CD4,(b)对T细胞进行修饰,使得CD5和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞

进行修饰,使得CD5和CD4不表达(例如,通过编码CD5和/或CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合并且在CD5*CD4-dCART Δ CD5 Δ CD4细胞中表达。

[0228] 在一个实施方案中,双CAR-T细胞包含(i)第一嵌合抗原受体(CAR)多肽,其包含第一信号肽、第一细胞外配体结合结构域、第一铰链区、第一跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域,以及第一信号转导结构域;以及(ii)第二嵌合抗原受体多肽,其包含第二信号肽、第二细胞外配体结合结构域、第二铰链区、第二跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域以及第二信号转导结构域;其中第一细胞外配体结合结构域和第二细胞外配体结合结构域对不同的细胞表面分子具有亲和力;并且其中双CAR-T细胞具有一种或多种基因破坏,导致细胞表面分子在双CAR-T细胞中的表达降低。

[0229] 在第二实施方案中,第一信号肽是CD8 α 信号序列。

[0230] 在第三实施方案中,第一细胞外配体结合结构域是免疫球蛋白重链和轻链的可变区的融合蛋白,所述可变区命名为V_H1和V_L1并通过5个氨基酸的短接头肽(GGGGS)连接。在一些实施方案中,此接头肽重复3或4次。在一些实施方案中,第一抗原识别结构域可以选自V_H1-(GGGGS)₃₋₄-V_L1或V_L1-(GGGGS)₃₋₄-V_H1。

[0231] 在另一个实施方案中,第一铰链区包含CD8 α 。

[0232] 在另一个实施方案中,第一跨膜结构域是CD8或CD28。

[0233] 在一些实施方案中,第一共刺激结构域以任一顺序包含4-1BB、CD28,或两者的组合,即4-1BB-CD28或CD28-4-1BB。

[0234] 在一些实施方案中,第一信号传导结构域是CD3 ζ 或CD3 ζ 二肽,即CD3 ζ -CD3 ζ 。

[0235] 在一些实施方案中,第二信号肽是SEQ NO:1的CD8 α 信号序列。

[0236] 在一些实施方案中,第二细胞外配体结合结构域是免疫球蛋白重链和轻链的可变区的融合蛋白,所述可变区命名为V_H2和V_L2并通过5个氨基酸的短接头肽(GGGGS)连接。在一些实施方案中,此接头肽重复3或4次。在一些实施方案中,第二抗原识别结构域可以选自V_H2-(GGGGS)₃₋₄-V_L2或V_L2-(GGGGS)₃₋₄-V_H2。

[0237] 在另一个实施方案中,第二铰链区包含CD8 α 。

[0238] 在另一个实施方案中,第二跨膜结构域是CD8或CD28。

[0239] 在一些实施方案中,第二共刺激结构域以任一顺序包含4-1BB、CD28,或两者的组合,即4-1BB-CD28或CD28-4-1BB。

[0240] 在一些实施方案中,第二信号传导结构域是CD3 ζ 或CD3 ζ 二肽,即CD3 ζ -CD3 ζ 。

[0241] 在一些实施方案中,CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白V_H1-(GGGGS)₃₋₄-V_L1和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白V_H2-(GGGGS)₃₋₄-V_L2。

[0242] 在一些实施方案中,CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白V_L1-(GGGGS)₃₋₄-V_H1和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白V_L2-(GGGGS)₃₋₄-V_H2。

[0243] 在一些实施方案中,CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白V_H2-(GGGGS)₃₋₄-V_L2和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白V_H1-(GGGGS)₃₋₄-V_L1。

[0244] 在一些实施方案中,CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白V_L2-(GGGGS)₃₋₄-V_H2和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白V_L1-(GGGGS)₃₋₄-V_H1。

[0245] 在一些实施方案中, CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_H1-(GGGGS)_{3-4}-V_L1$ 和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_L2-(GGGGS)_{3-4}-V_H2$ 。

[0246] 在一些实施方案中, CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_L1-(GGGGS)_{3-4}-V_H1$ 和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_H2-(GGGGS)_{3-4}-V_L2$ 。

[0247] 在一些实施方案中, CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_H2-(GGGGS)_{3-4}-V_L2$ 和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_L1-(GGGGS)_{3-4}-V_H1$ 。

[0248] 在一些实施方案中, CAR多肽包含第一细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_L2-(GGGGS)_{3-4}-V_H2$ 和第二细胞外配体结合结构域融合蛋白 $V_H1-(GGGGS)_{3-4}-V_L1$ 。

[0249] 在一些实施方案中, CAR多肽包含至少一个高效切割位点, 其中高效切割位点选自P2A、T2A、E2A和F2A。

[0250] 在一些实施方案中, CAR多肽包含自杀基因。

[0251] 在一些实施方案中, CAR多肽包含突变细胞因子受体。

[0252] 在一些实施方案中, 双CAR-T细胞靶向选自CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD33、CD123 (IL3RA)、CD371 (CLL-1; CLEC12A)、CD117 (c-kit)、CD135 (FLT3)、BCMA、CS1、CD38、CD79A、CD79B、CD138和CD19、APRIL以及TACI的两种抗原。

[0253] 下文在表5中给出双CAR的另外实例。

[0254] 表5. 双CAR和dCAR-T

实例	dCAR-T 细胞中的 CAR 的抗原靶标	抗原缺失/抑制
[0255] D1	APRILxBCMA	-
D2	APRILxCD19	-
D3	APRILxCD38	-
D4	APRILxCD38	CD38

[0256]

D5	APRILxCS1	-
D6	APRILxCS1	CS1
D7	BCMAxCD19	-
D8	BCMAxCD38	-
D9	BCMAxCD38	CD38
D10	BCMAxCS1	-
D11	BCMAxCS1	CS1
D12	CD138xAPRIL	
D13	CD138xBCMA	
D14	CD138xCD19	
D15	CD138xCD38	
D16	CD138xCD38	CD38
D17	CD138xCD79A	
D18	CD138xCD79B	
D19	CD138xCS1	
D20	CD138xCS1	CS1
D21	CD19xCD38	-
D22	CD19xCD38	CD38
D23	CD2xCD3ε	-
D24	CD2xCD3ε	CD2
D25	CD2xCD3ε	CD3ε
D26	CD2xCD3ε	CD2 和 CD3ε
D27	CD2xCD4	-
D28	CD2xCD4	CD2
D29	CD2xCD4	CD4
D30	CD2xCD4	CD2 和 CD4
D31	CD2xCD4	CD2 和 TRAC
D32	CD2xCD4	CD4 和 TRAC
D33	CD2xCD4	CD2 和 CD4 以及 TRAC
D34	CD2xCD5	-
D35	CD2xCD5	CD2
D36	CD2xCD5	CD5
D37	CD2xCD5	CD2 和 CD5
D38	CD2xCD5	CD2 和 TRAC
D39	CD2xCD5	CD5 和 TRAC
D40	CD2xCD5	CD2 和 CD5 以及 TRAC
D41	CD2xCD7	-
D42	CD2xCD7	CD2
D43	CD2xCD7	CD7
D44	CD2xCD7	CD2 和 CD7
D45	CD2xCD7	CD2 和 TRAC
D46	CD2xCD7	CD7 和 TRAC
D47	CD2xCD7	CD2 和 CD7 以及 TRAC
D48	CD3εxCD4	-
D49	CD3εxCD4	CD3ε

[0257]

D50	CD3 ϵ xCD4	CD4
D51	CD3 ϵ xCD4	CD3 ϵ 和 CD4
D52	CD3 ϵ xCD5	-
D53	CD3 ϵ xCD5	CD3 ϵ
D54	CD3 ϵ xCD5	CD5
D55	CD3 ϵ xCD5	CD3 ϵ 和 CD5
D56	CD3 ϵ xCD7	-
D57	CD3 ϵ xCD7	CD3 ϵ
D58	CD3 ϵ xCD7	CD7
D59	CD3 ϵ xCD7	CD3 ϵ 和 CD7
D60	CD4xCD5	-
D61	CD4xCD5	CD4
D62	CD4xCD5	CD5
D63	CD4xCD5	CD4 和 CD5
D64	CD4xCD5	CD4 和 TRAC
D65	CD4xCD5	CD5 和 TRAC
D66	CD4xCD5	CD4 和 CD5 以及 TRAC
D67	CD4xCD7	-
D68	CD4xCD7	CD4
D69	CD4xCD7	CD7
D70	CD4xCD7	CD4 和 CD7
D71	CD4xCD7	CD4 和 TRAC
D72	CD4xCD7	CD7 和 TRAC
D73	CD4xCD7	CD4 和 CD7 以及 TRAC
D74	CD5xCD7	-
D75	CD5xCD7	CD5
D76	CD5xCD7	CD7
D77	CD5xCD7	CD5 和 CD7
D78	CD5xCD7	CD5 和 TRAC
D79	CD5xCD7	CD7 和 TRAC
D80	CD5xCD7	CD5 和 CD7 以及 TRAC
D81	CD79AxAPRIL	
D82	CD79AxBCMA	
D83	CD79AxCD19	
D84	CD79AxCD38	
D85	CD79AxCD38	CD38
D86	CD79AxCD79B	
D87	CD79AxCS1	
D88	CD79AxCS1	CS1
D89	CD79BxAPRIL	
D90	CD79BxBCMA	
D91	CD79BxCD19	
D92	CD79BxCD38	
D93	CD79BxCD38	CD38
D94	CD79BxCD79A	

[0258]

D95	CD79BxCS1	
D96	CD79BxCS1	CS1
D97	CS1xCD19	-
D98	CS1xCD19	CS1
D99	CS1xCD38	-
D100	CS1xCD38	CS1
D101	CS1xCD38	CD38
D102	CS1xCD38	CS1 和 CD38
D103	TCR β xCD2	-
D104	TCR β xCD2	TCR β
D105	TCR β xCD2	CD2
D106	TCR β xCD2	TCR β 和 CD2
D107	TCR β xCD3 ϵ	-
D108	TCR β xCD3 ϵ	TCR β
D109	TCR β xCD3 ϵ	CD3 ϵ
D110	TCR β xCD3 ϵ	TCR β 和 CD3 ϵ
D111	TCR β xCD4	-
D112	TCR β xCD4	TCR β
D113	TCR β xCD4	CD4
D114	TCR β xCD4	TCR β 和 CD4
D115	TCR β xCD5	-
D116	TCR β xCD5	TCR β
D117	TCR β xCD5	CD5
D118	TCR β xCD5	TCR β 和 CD5
D119	TCR β xCD7	-
D120	TCR β xCD7	TCR β
D121	TCR β xCD7	CD7
D122	TCR β xCD7	TCR β 和 CD7
D123	TRACxCD2	-
D124	TRACxCD2	TRAC
D125	TRACxCD2	CD2
D126	TRACxCD2	TRAC 和 CD2
D127	TRACxCD3 ϵ	-
D128	TRACxCD3 ϵ	TRAC
D129	TRACxCD3 ϵ	CD3 ϵ
D130	TRACxCD3 ϵ	TRAC 和 CD3 ϵ
D131	TRACxCD4	-
D132	TRACxCD4	TRAC
D133	TRACxCD4	CD4
D134	TRACxCD4	TRAC 和 CD4
D135	TRACxCD5	-
D136	TRACxCD5	TRAC
D137	TRACxCD5	CD5
D138	TRACxCD5	TRAC 和 CD5
D139	TRACxCD7	-

[0259]	D140	TRACxCD7	TRAC
	D141	TRACxCD7	CD7
	D142	TRACxCD7	TRAC 和 CD7

[0260] 串联CAR-T细胞 (tCAR-T)

[0261] 串联CAR-T细胞 (tCAR-T) 是具有单个嵌合抗原多肽的T细胞,所述多肽包含能够与两种不同的细胞表面分子相互作用的两个不同的细胞外配体结合结构域,其中细胞外配体结合结构域通过柔性接头连接在一起并共享一个或多个共刺激结构域,其中第一或第二细胞外配体结合结构域的结合将通过一个或多个共刺激结构域和信号转导结构域进行信号传导。

[0262] 在一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体 (tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD5并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR受体 α 链 (TRAC),其中T细胞缺乏CD5和TRAC,例如CD5*TRAC-tCART Δ CD5 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD5和TCR受体 α 链 (TRAC) 的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD5和TCR受体 α 链 (TRAC) 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD5和TCR受体 α 链 (TRAC), (b) 对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR受体 α 链 (TRAC) 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR受体 α 链 (TRAC) 不表达 (例如,通过编码CD5和/或TCR受体 α 链 (TRAC) 的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD5*TRAC-tCART Δ CD5 Δ TRAC细胞中表达。

[0263] 在第二实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体 (tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD7并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR受体 α 链 (TRAC),其中T细胞缺乏CD7和TRAC,例如CD7*TRAC-tCART Δ CD7 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD7和TCR受体 α 链 (TRAC) 的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD7和TCR受体 α 链 (TRAC) 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD7和TCR受体 α 链 (TRAC), (b) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链 (TRAC) 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR受体 α 链 (TRAC) 不表达 (例如,通过编码CD7和/或TCR受体 α 链 (TRAC) 的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶 (TK) 基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD7*TRAC-tCART Δ CD7 Δ TRAC细胞中表达。

[0264] 在第三实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体 (tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD2并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR受体 α 链 (TRAC),其中T细胞缺乏CD2和TRAC,例如CD2*TRAC-tCART Δ CD2 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD2和TCR受体 α 链 (TRAC) 的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD2和TCR受体 α 链 (TRAC) 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD2和TCR受体 α 链 (TRAC), (b) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR受体 α 链 (TRAC) 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或 (c) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR受体 α 链 (TRAC) 不表达 (例如,通过编码CD2和/或TCR受体 α 链 (TRAC) 的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案

中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,在CD2*TRAC-tCART Δ CD2 Δ TRAC细胞中表达。

[0265] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD4并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR受体 α 链(TRAC),其中T细胞缺乏CD4和TRAC,例如CD4*TRAC-tCART Δ CD4 Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD4和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD4和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD4和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD4和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD4和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD4和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD4*TRAC-tCART Δ CD4 Δ TRAC细胞中表达。

[0266] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD3 epsilon(ϵ)链并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR受体 α 链(TRAC),其中T细胞缺乏CD3 ϵ 和TRAC,例如CD3 ϵ *TRAC-tCART Δ CD3 ϵ Δ TRAC细胞。在非限制性实例中,CD3 ϵ 和TCR受体 α 链(TRAC)的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD3 ϵ 和TCR受体 α 链(TRAC)进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD3 ϵ 和TCR受体 α 链(TRAC), (b)对T细胞进行修饰,使得CD3 ϵ 和TCR受体 α 链(TRAC)的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD3 ϵ 和TCR受体 α 链(TRAC)不表达(例如,通过编码CD3 ϵ 和/或TCR受体 α 链(TRAC)的基因的缺失或破坏。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD3 ϵ *TRAC-tCART Δ CD3 ϵ Δ TRAC细胞中表达。

[0267] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD2并且第二细胞外配体结合结构域结合CD3 epsilon(ϵ)链,其中T细胞缺乏CD2和CD3 ϵ ,例如CD2*CD3 ϵ -tCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 细胞。在非限制性实例中,CD2和CD3 ϵ 的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和CD3 ϵ 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD2和CD3 ϵ , (b)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD3 ϵ 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD3 ϵ 不表达(例如,通过编码CD2和/或CD3 ϵ 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*CD3 ϵ -tCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 细胞中表达。

[0268] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD4并且第二细胞外配体结合结构域结合CD3 epsilon(ϵ)链,其中T细胞缺乏CD4和CD3 ϵ ,例如CD4*CD3 ϵ -tCART Δ CD4 Δ CD3 ϵ 细胞。在非限制性实例中,CD4和CD3 ϵ 的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD4和CD3 ϵ 进行修饰,使得tCAR不再特

异性结合经修饰的CD4和CD3 ϵ , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD4和CD3 ϵ 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD4和CD3 ϵ 不表达(例如,通过编码CD4和/或CD3 ϵ 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD4*CD3 ϵ -tCART Δ CD4 Δ CD3 ϵ 细胞中表达。

[0269] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD5并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR β 链,其中T细胞缺乏CD5和TCR β 链,例如CD5*TCR β -tCART Δ CD5 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD5和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD5和TCR β 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD5和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD5和TCR β 不表达(例如,通过编码CD5和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD5*TCR β -tCART Δ CD5 Δ TCR β 细胞中表达。

[0270] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD7并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR β 链,其中T细胞缺乏CD7和TCR β 链,例如CD7*TCR β -tCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD7和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD7和TCR β 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD7和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD7和TCR β 不表达(例如,通过编码CD7和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD7*TCR β -tCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞中表达。

[0271] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD2并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR β 链,其中T细胞缺乏CD2和TCR β 链,例如CD2*TCR β -tCART Δ CD7 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD2和TCR β 链的缺乏由以下造成:(a) 对T细胞表达的CD2和TCR β 进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD2和TCR β , (b) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c) 对T细胞进行修饰,使得CD2和TCR β 不表达(例如,通过编码CD2和/或TCR β 的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*TCR β -tCART Δ CD2 Δ TCR β 细胞中表达。

[0272] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD4并且第二细胞外配体结合结构域结合TCR β 链,其中T细胞缺乏CD4和TCR β 链,例如CD4*TCR β -tCART Δ CD4 Δ TCR β 细胞。在非限制性实例中,CD4和

TCR β 链的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD4和TCR β 进行修饰，使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD4和TCR β ，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD4和TCR β 的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD4和TCR β 不表达（例如，通过编码CD4和/或TCR β 的基因的缺失或破坏）。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合，并且在CD4*TCR β -tCART Δ CD4 Δ TCR β 细胞中表达。

[0273] 在另一个实施方案中，工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR)，其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD7并且第二细胞外配体结合结构域结合CD2，其中T细胞缺乏CD7和CD2，例如CD7*CD2-tCART Δ CD7 Δ CD2细胞。在非限制性实例中，CD7和CD2的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD7和CD2进行修饰，使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD7和CD2，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD2的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD2不表达（例如，通过编码CD7和/或CD2的基因的缺失或破坏）。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合，并且在CD7*CD2-tCART Δ CD7 Δ CD2细胞中表达。

[0274] 在另一个实施方案中，工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR)，其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD7并且第二细胞外配体结合结构域结合CD5，其中T细胞缺乏CD7和CD5，例如CD7*CD5-tCART Δ CD7 Δ CD5细胞。在非限制性实例中，CD7和CD5的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD7和CD5进行修饰，使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD7和CD5，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD5的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD5不表达（例如，通过编码CD7和/或CD5的基因的缺失或破坏）。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合，并且在CD7*CD5-tCART Δ CD7 Δ CD5细胞中表达。

[0275] 在另一个实施方案中，工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR)，其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD7并且第二细胞外配体结合结构域结合CD4，其中T细胞缺乏CD7和CD4，例如CD7*CD4-tCART Δ CD7 Δ CD4细胞。在非限制性实例中，CD7和CD4的缺乏由以下造成：(a) 对T细胞表达的CD7和CD4进行修饰，使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD7和CD4，(b) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多，或(c) 对T细胞进行修饰，使得CD7和CD4不表达（例如，通过编码CD7和/或CD4的基因的缺失或破坏）。在另外的实施方案中，T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中，经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合，并且在CD7*CD4-tCART Δ CD7 Δ CD4细胞中表达。

[0276] 在另一个实施方案中，工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR)，其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD2并且第二细胞外配体结合结构域结合CD5，其中T细

胞缺乏CD2和CD5,例如CD2*CD5-tCART Δ CD2 Δ CD5细胞。在非限制性实例中,CD2和CD5的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和CD5进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD2和CD5,(b)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD5的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD5不表达(例如,通过编码CD2和/或CD5的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*CD5-tCART Δ CD2 Δ CD5细胞中表达。

[0277] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD2并且第二细胞外配体结合结构域结合CD4,其中T细胞缺乏CD2和CD4,例如CD2*CD4-tCART Δ CD2 Δ CD4细胞。在非限制性实例中,CD2和CD4的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD2和CD4进行修饰,使得tCAR不再特异性结合经修饰的CD2和CD4,(b)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD2和CD4不表达(例如,通过编码CD2和/或CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD2*CD4-tCART Δ CD2 Δ CD4细胞中表达。

[0278] 在另一个实施方案中,工程改造的T细胞包含串联嵌合抗原受体(tCAR),其中一个细胞外配体结合结构域特异性结合CD5并且第二细胞外配体结合结构域结合CD4,其中T细胞缺乏CD5和CD4,例如CD5*CD4-tCART Δ CD5 Δ CD4细胞。在非限制性实例中,CD5和CD4的缺乏由以下造成:(a)对T细胞表达的CD5和CD4进行修饰,使得嵌合抗原受体不再特异性结合经修饰的CD5和CD4,(b)对T细胞进行修饰,使得CD5和CD4的表达在T细胞中减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多,或(c)对T细胞进行修饰,使得CD5和CD4不表达(例如,通过编码CD5和/或CD4的基因的缺失或破坏)。在另外的实施方案中,T细胞包含自杀基因。在非限制性实例中,经修饰的人单纯疱疹病毒-1-胸苷激酶(TK)基因的蛋白质编码序列与人CD34 cDNA的细胞外和跨膜结构域同框融合,并且在CD5*CD4-tCART Δ CD5 Δ CD4细胞中表达。

[0279] 在另一个实施方案中,线性串联CAR-T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)多肽,所述多肽包含第一信号肽、第一细胞外配体结合结构域、第二细胞外配体结合结构域、铰链区、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域,以及信号转导结构域,其中第一细胞外配体结合抗原识别结构域和第二细胞外配体结合抗原识别结构域对不同的细胞表面分子,即癌细胞(例如,恶性T细胞、恶性B细胞或恶性浆细胞)上的抗原具有亲和力;并且其中线性串联CAR-T细胞具有一种或多种基因修饰、缺失或破坏,从而导致线性串联CAR-T细胞中细胞表面分子的表达降低。

[0280] 在另一个实施方案中,信号肽是来自人CD8 α 的信号肽(SEQ ID NO:1)。

[0281] 在第三实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_L)和重(V_H)可变片段,命名为 V_H1 和 V_L1 并通过接头(例如,GGGGS)连接。在一些实施方案中,此接头肽重复2、3、4、5或6次。在一些实施方案中,第一抗原识别结构域可以选自:1)

$V_H1-(GGGS)_{3-4}-V_L1$ 或 $2) V_L1-(GGGS)_{3-4}-V_H1$ 。

[0282] 在一些实施方案中,第二细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_L)和重(V_H)可变片段,命名为 V_H2 和 V_L2 并通过接头(例如,GGGS)连接。在一些实施方案中,此接头肽重复2、3、4、5或6次。在一些实施方案中,第一抗原识别结构域可以选自:1) $V_H2-(GGGS)_{3-4}-V_L2$ 或 $2) V_L2-(GGGS)_{3-4}-V_H2$ 。

[0283] 在另外的实施方案中,第一抗原识别结构域和第二抗原识别结构域通过5个氨基酸的短接头肽(GGGS)连接。在一些实施方案中,此接头肽重复2、3、4、5或6次。

[0284] 线性串联CAR构建体

[0285] 在线性串联CAR构建体的一个实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含重(V_H)和轻(V_L)可变片段,命名为 V_H1 和 V_L1 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_L)和重(V_H)可变片段,命名为 V_L2 和 V_H2 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。

[0286] 在线性串联CAR构建体的第二实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含重(V_H)和轻(V_L)可变片段,命名为 V_H2 和 V_L2 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_L)和重(V_H)可变片段,命名为 V_L1 和 V_H1 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。

[0287] 在线性串联CAR构建体的第三实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含重(V_L)和轻(V_H)可变片段,命名为 V_L1 和 V_H1 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_H)和重(V_L)可变片段,命名为 V_H2 和 V_L2 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。

[0288] 在线性串联CAR构建体的第四实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含重(V_L)和轻(V_H)可变片段,命名为 V_L2 和 V_H2 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含轻(V_H)和重(V_L)可变片段,命名为 V_H1 和 V_L1 并通过接头(例如,GGGS)₂₋₆连接。

[0289] 对于线性串联CAR构建体实施方案中的每一个,第一和第二细胞外配体结合结构域靶向表面分子,即在恶性T细胞上表达的抗原,其选自但不限于BCMA、CS1、CD38、CD138、CD19、CD33、CD123、CD371、CD117、CD135、Tim-3、CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD79A、CD79B、APRIL、CD56和CD1a。

[0290] 下文在表6中给出线性串联CAR的另外实例。

[0291] 表6. 串联CAR和CAR-T(线性或发夹)。

[0292]

实例	CAR-T 细胞的抗原靶标	抗原缺失/抑制
T1	APRILxBCMA	-
T2	APRILxCD19	-
T3	APRILxCD38	-
T4	APRILxCD38	CD38
T5	APRILxCS1	-
T6	APRILxCS1	CS1
T7	BCMAxCD19	-
T8	BCMAxCD38	-
T9	BCMAxCD38	CD38
T10	BCMAxCS1	-
T11	BCMAxCS1	CS1
T12	CD138xAPRIL	
T13	CD138xBCMA	
T14	CD138xCD19	
T15	CD138xCD38	
T16	CD138xCD38	CD38
T17	CD138xCD79A	
T18	CD138xCD79B	
T19	CD138xCS1	
T20	CD138xCS1	CS1
T21	CD19xCD38	-

[0293]

T22	CD19xCD38	CD38
T23	CD2xCD3 ϵ	-
T24	CD2xCD3 ϵ	CD2
T25	CD2xCD3 ϵ	CD3 ϵ
T26	CD2xCD3 ϵ	CD2 和 CD3 ϵ
T27	CD2xCD4	-
T28	CD2xCD4	CD2
T29	CD2xCD4	CD4
T30	CD2xCD4	CD2 和 CD4
T31	CD2xCD4	CD2 和 TRAC
T32	CD2xCD4	CD4 和 TRAC
T33	CD2xCD4	CD2 和 CD4 以及 TRAC
T34	CD2xCD5	-
T35	CD2xCD5	CD2
T36	CD2xCD5	CD5
T37	CD2xCD5	CD2 和 CD5
T38	CD2xCD5	CD2 和 TRAC
T39	CD2xCD5	CD5 和 TRAC
T40	CD2xCD5	CD2 和 CD5 以及 TRAC
T41	CD2xCD7	-
T42	CD2xCD7	CD2
T43	CD2xCD7	CD7
T44	CD2xCD7	CD2 和 CD7
T45	CD2xCD7	CD2 和 TRAC
T46	CD2xCD7	CD7 和 TRAC
T47	CD2xCD7	CD2 和 CD7 以及 TRAC
T48	CD3 ϵ xCD4	-
T49	CD3 ϵ xCD4	CD3 ϵ
T50	CD3 ϵ xCD4	CD4
T51	CD3 ϵ xCD4	CD3 ϵ 和 CD4
T52	CD3 ϵ xCD5	-
T53	CD3 ϵ xCD5	CD3 ϵ
T54	CD3 ϵ xCD5	CD5
T55	CD3 ϵ xCD5	CD3 ϵ 和 CD5
T56	CD3 ϵ xCD7	-
T57	CD3 ϵ xCD7	CD3 ϵ
T58	CD3 ϵ xCD7	CD7
T59	CD3 ϵ xCD7	CD3 ϵ 和 CD7
T60	CD4xCD5	-
T61	CD4xCD5	CD4
T62	CD4xCD5	CD5
T63	CD4xCD5	CD4 和 CD5
T64	CD4xCD5	CD4 和 TRAC
T65	CD4xCD5	CD5 和 TRAC

[0294]

T66	CD4xCD5	CD4 和 CD5 以及 TRAC
T67	CD4xCD7	-
T68	CD4xCD7	CD4
T69	CD4xCD7	CD7
T70	CD4xCD7	CD4 和 CD7
T71	CD4xCD7	CD4 和 TRAC
T72	CD4xCD7	CD4 和 TRAC
T73	CD4xCD7	CD4 和 CD7 以及 TRAC
T74	CD5xCD7	-
T75	CD5xCD7	CD5
T76	CD5xCD7	CD7
T77	CD5xCD7	CD5 和 CD7
T78	CD5xCD7	CD5 和 TRAC
T79	CD5xCD7	CD7 和 TRAC
T80	CD5xCD7	CD5 和 CD7 以及 TRAC
T81	CD79AxAPRIL	
T82	CD79AxBCMA	
T83	CD79AxCD19	
T84	CD79AxCD38	
T85	CD79AxCD38	CD38
T86	CD79AxCD79B	
T87	CD79AxCS1	
T88	CD79AxCS1	CS1
T89	CD79BxAPRIL	
T90	CD79BxBCMA	
T91	CD79BxCD19	
T92	CD79BxCD38	
T93	CD79BxCD38	CD38
T94	CD79BxCD79A	
T95	CD79BxCS1	
T96	CD79BxCS1	CS1
T97	CS1xCD19	-
T98	CS1xCD19	CS1
T99	CS1xCD38	-
T100	CS1xCD38	CS1
T101	CS1xCD38	CD38
T102	CS1xCD38	CS1 和 CD38
T103	TCR β xCD2	-
T104	TCR β xCD2	TCR β
T105	TCR β xCD2	CD2
T106	TCR β xCD2	TCR β 和 CD2
T107	TCR β xCD3 ϵ	-
T108	TCR β xCD3 ϵ	TCR β
T109	TCR β xCD3 ϵ	CD3 ϵ
T110	TCR β xCD3 ϵ	TCR β 和 CD3 ϵ

[0295]

T111	TCR β xCD4	-
T112	TCR β xCD4	TCR β
T113	TCR β xCD4	CD4
T114	TCR β xCD4	TCR β 和 CD4
T115	TCR β xCD5	-
T116	TCR β xCD5	TCR β
T117	TCR β xCD5	CD5
T118	TCR β xCD5	TCR β 和 CD5
T119	TCR β xCD7	-
T120	TCR β xCD7	TCR β
T121	TCR β xCD7	CD7
T122	TCR β xCD7	TCR β 和 CD7
T123	TRACxCD2	-
T124	TRACxCD2	TRAC
T125	TRACxCD2	CD2
T126	TRACxCD2	TRAC 和 CD2
T127	TRACxCD3 ϵ	-
T128	TRACxCD3 ϵ	TRAC
T129	TRACxCD3 ϵ	CD3 ϵ
T130	TRACxCD3 ϵ	TRAC 和 CD3 ϵ
T131	TRACxCD4	-
T132	TRACxCD4	TRAC
T133	TRACxCD4	CD4
T134	TRACxCD4	TRAC 和 CD4
T135	TRACxCD5	-
T136	TRACxCD5	TRAC
T137	TRACxCD5	CD5
T138	TRACxCD5	TRAC 和 CD5
T139	TRACxCD7	-
T140	TRACxCD7	TRAC
T141	TRACxCD7	CD7
T142	TRACxCD7	TRAC 和 CD7

[0296] 例如,本文提供了线性串联CAR构建体,其可掺入靶向上表6中提供的任何抗原对的scFv的V_H和V_L结构域。

[0297] 表7. 线性串联CAR构建体。

[0298]

7-I	7-II	7-III	7-IV	7-V	7-VI	7-VII	7-VIII
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎

[0299]

⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2	⁶⁾ V_L2
GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}
7-IX	7-X	7-XI	7-XII	7-XIII	7-XIV	7-XV	7-XVI
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}
7-XVII	7-XVIII	7-XIX	7-XX	7-XXI	7-XXII	7-XXIII	7-XIV
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}	CD3 _{ζ(1-2)}
7-XXV	7-XXVI	7-XXVII	7-XXVIII	7-XIX	7-XXX	7-XXXI	7-XXXII
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1

[0300]

GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎
V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎	CD3 ζ ₍₁₋₂₎

[0301] 发夹串联CAR构建体

[0302] 在发夹串联CAR构建体的一个实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含两个重链可变片段,命名为V_H1和V_H2并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含两个轻链可变片段,命名为V_L2和V_L1并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。

[0303] 在发夹串联CAR构建体的第二实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含两个重链可变片段,命名为V_H2和V_H1并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含两个轻链可变片段,命名为V_L1和V_L2并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。

[0304] 在发夹串联CAR构建体的第三实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含两个轻链可变片段,命名为V_L1和V_L2并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含两个重链可变片段,命名为V_H2和V_H1并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。

[0305] 在发夹串联CAR构建体的第四实施方案中,第一细胞外配体结合结构域包含单链抗体片段(scFv),其包含两个轻链可变片段,命名为V_L2和V_L1并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。第二细胞外配体结合结构域抗原识别包含单链抗体片段(scFv),其包含两个重链可变片段,命名为V_H1和V_H2并通过接头(例如,GGGGS)₂₋₆连接。

[0306] 对于发夹串联CAR构建体实施方案中的每一个,第一和第二细胞外配体结合结构域靶向表面分子,即在恶性T细胞上表达的抗原,其选自但不限于BCMA、CS1、CD38、CD138、CD19、CD33、CD123、CD371、CD117、CD135、Tim-3、CD5、CD7、CD2、CD4、CD3、CD79A、CD79B、APRIL、CD56和CD1a。

[0307] 上文在表6中给出发夹串联CAR的另外实例。

[0308] 此外,本文提供了可掺入靶向(1) CD2和CD3;以及(2) CD2和CD7的scFv的V_H和V_L结构域的CAR构建体和CAR-T细胞,并且提供于下表8中。

[0309] 表8. 发夹串联嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列。

[0310]

<u>发夹串联 CAR 构建体</u>	<u>在实例 中的名 称</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>氨基酸序列</u>
OKT3 V_L -CD2 V_L - CD2 V_H - OKT3 V_H	WC5	SEQ ID NO:41	MALPVTALLLPLALLLHAARPQIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQ KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGS GTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPF TFGSGTKLEINRGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDIKNITQSPSSMYVSLGERVTITCKA SQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRL VDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDM EIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMKRGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLEESG AELVKPGASVKLSCRTSGFNKDTIHWVK QRPEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPKFQD KATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYC VTYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGSQVQLQQSG AELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQK FKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSPR ASTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSR VKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRR

[0311]

			TDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEA MPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATP ELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTS LHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITS VYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPE TTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPY TSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQ NKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQAD ADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLAN RTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQ DVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITG YFLMNRRSWSPI
CD3 V_L – CD2 V_L – CD2 – V_H – CD3 V_H	WC7	SEQ ID NO:42	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQSP SSLSASVGDRVITITCRASQDIRNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPW TFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIKNITQSPSSMYVSLGERVTITCKAS QDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMEI YYCLQYDEFPTYFGGGTKLEMKRGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLEESGAE LVKPGASVKLSCRTSGFNIKDTIHWVKQR PEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPKFQDKA TVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCV TYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQ APGKCLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDR FTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS PRASTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVG VLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSD YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPRRTDGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPV SEAMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNG TATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTL GSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTS VITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANV STPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPT KPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGI CLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGE EQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLL VLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGILD

[0312]

			FTEQDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAV LGITGYFLMNRRSWSPI
CD2 V_L – CD3 V_L – CD3 V_H – CD2 - V_H	WC15	SEQ ID NO:43	MALPVTALLPLALLLHAARPDIKNITQSP SSMYVSLGERVTITCKASQDINSFLSWFQ QKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMEIYYCLQYDEFP YTFGGGTKLEMKRGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMN WVRQAPGKCLEWVALINPYKGVSTYNQ KFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVK LEESGAELVKPGASVKLSCRTSGFNIKDTI HWVKQRPEQGLKWIGRIDPANGNTKYDP KFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGTAVT VSSPRASTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPRRTDGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPVSEAMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLD NNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTT PSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETT VKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTP ANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLA TSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLT QGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLC GEEQADADAGAQCSSLQAQSEVRPQCL LLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGI LDFTEQDVASHQSYSQKTLIALVTSGALL AVLGITGYFLMNRRSWSPI
CD2 V_L – OKT3 V_L – OKT3 V_H – CD2 V_H	WC13	SEQ ID NO:44	MALPVTALLPLALLLHAARPDIKNITQSP SSMYVSLGERVTITCKASQDINSFLSWFQ QKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMEIYYCLQYDEFPY TFGGGTKLEMKRGGGSGGGGSGGGG GGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAED

[0313]

			AATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSQQVQLQ QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYT MHWVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTN NQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLE ESGAELVKPGASVKLSCRTSGFNIKDTIH WVKQRPEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPK FQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSS PRASTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDFWVWLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR SRVKFSRSADAPAYKQGGQNQLYNELNLG RREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP RRTDGS GATNFSLLKQAGDVEENPGPVSE AMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTA TPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPTSLGS TSLHPVSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVI TSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVST PETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKP YTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLE QNKTTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQA DADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLA NRTEISSKLQLMKKHQSDLKKLGLDFTE QDVASHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGIT GYFLMNRRSWSPI
CD7 V_L – CD2 V_L – CD2 V_H – CD7 V_H		SEQ ID NO:45	MALPVTALLPLALLLHAARPDIMTQT SSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQ QKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYT FGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIKNITQSPSSMYVSLGERVTITCKAS QDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMEI YYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMKRGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVKLEESGAE LVKPGASVKLSCRTSGFNIKDTIHWVKQR PEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPKFQDKA TVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQ TPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTI

[0314]

			SRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYYCAR DEVRGYLDVWGAGTTVTVSPRASTTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDFWVLVVVGGLVACYSLL VTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGS GATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPGRG WTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELPT QGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPV SQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYGN TNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLK PSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSP ILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTS SCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQADADAG AQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRTEIS SKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVAS HQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFL MNRRSWSPI
CD2 V_L – CD7 V_L – CD7 V_H – CD2 V_H		SEQ ID NO:46	MALPVTALLPLALLLHAARPDIKNITQSP SSMYVSLGERVTITCKASQDINSFLSWFQ QKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSG SGQDYSLTISSLEYEDMEIYYCLQYDEFP YTFGGGTKLEMKRGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCS ASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSS LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDI ATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKRGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSW VRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKG RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDAMYY CARDEVRGYLDVWGAGTTVTVSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVKLEESGAELVK PGASVKLSCRTSGFNIKDTIHWVKQRPEQ GLKWIGRIDPANGNTKYDPKFQDKATVT ADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCVTYA YDGNWYFDVWGAGTAVTVSSPRASTTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDFWVLVVVGGLVACYSLL LVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRTDGS

[0315]

			SGATNFSLLKQAGDVEENPGPVSEAMPR GWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPELP TQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHP VSQHGNEATTNITETTVKFTSTSVITSVYG NTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTL KPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSS PILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKT SSCAEFKKDRGEGGLARVLCGEEQADADA GAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRTEI SSKLQLMKKHQSDLKKLGILDFTEQDVA SHQSYSQKTLIALVTSGALLAVLGITGYFL MNRRSWSPI
--	--	--	--

[0316] 另外,本文提供了发夹串联CAR构建体,其可掺入靶向表6中提供的任何抗原对的scFv的V_H和V_L结构域。

[0317] 表9. 发夹串联CAR构建体。

[0318]

9-I	9-II	9-III	9-IV	9-V	9-VI	9-VII	9-VIII
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2
GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎
V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎
9-IX	9-X	9-XI	9-XII	9-XIII	9-XIV	9-XV	9-XVI
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2	V _H 2
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1	V _H 1
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1	V _L 1
GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎
V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2	V _L 2
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB

[0319]

CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$
9-XVII	9-XVIII	9-XIX	9-XX	9-XXI	9-XXII	9-XXIII	9-XIV
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$
9-XXV	9-XXVI	9-XXVII	9-XXVIII	9-XIX	9-XXX	9-XXXI	9-XXXII
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎	GGGS ₍₂₋₆₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎	GGGS ₍₃₋₄₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$	CD3 $\zeta_{(1-2)}$

[0320] 例如,本文在表10中提供了掺入CD2和CD3 scFv的V_H和V_L结构域的发夹串联CAR构建体。

[0321] 表10. 靶向CD2和CD3的发夹串联CAR构建体。

[0322]

克隆 5	克隆 6	克隆 7	克隆 8	克隆 13	克隆 14	克隆 15	克隆 16
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
CD3-V_L	CD3-V_L	CD3-V_L	CD3-V_L	CD2-V_L	CD2-V_L	CD3-V_L	CD3-V_L
GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄	GGGS ₄
CD2-V_L	CD2-V_L	CD2-V_L	CD2-V_L	CD3-V_L	CD3-V_L	CD2-V_L	CD2-V_L
(GGGS) ₁₀	(GGGS) ₄ GGGGP(GGGGS) ₄	(GGGS) ₁₀	(GGGS) ₄ GGGGP(GGGGS) ₄	(GGGS) ₁₀	(GGGS) ₄ GGGGP(GGGGS) ₄	(GGGS) ₁₀	(GGGS) ₄ GGGGP(GGGGS) ₄

[0323]

CD2-V_H	CD2-V_H	CD2-V_H	CD2-V_H	CD3-V_H	CD3-V_H	CD2-V_H	CD2-V_H
GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄	GGGGS ₄
CD3-V_H	CD3-V_H	CD3-V_H	CD3-V_H	CD2-V_H	CD2-V_H	CD3-V_H	CD3-V_H
CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
CD28	CD28	CD28	CD28	CD28	CD28	CD28	CD28
CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎	CD3z ₍₁₋₂₎
P2A	P2A	P2A	P2A	P2A	P2A	P2A	P2A
CD34	CD34	CD34	CD34	CD34	CD34	CD34	CD34

[0324] 本文还在表11中提供了具有 (Cys=Cys) 双链键 (DSB) 的发夹串联CAR构建体,其可掺入靶向表6中提供的任何抗原对的scFv的V_H和V_L结构域。

[0325] 表11. 具有 (Cys=Cys) 双链键 (DSB) 的发夹串联DSB CAR构建体。

[0326]

11-I	11-II	11-III	11-IV	11-V	11-VI	11-VII	11-VIII
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₁₋₂₎ GGGGP ₍₁₎ GGGGS ₍₂₋₃₎ GGGGC ₍₁₎ GGGGS ₍₀₋₁₎
V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2	V_L2
GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎	GGGGS ₍₃₋₄₎
V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1	V_L1
CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD8 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm	CD28 Tm
41BB	CD28	41BB - CD28	CD28 -41BB	41BB	CD28	41BB -CD28	CD28 -41BB
CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎
11-IX	11-X	11-XI	11-XII	11-XIII	11-XIV	11-XV	11-XVI
CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a	CD8a
V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2	V_H2
GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎	GGGGS ₍₂₋₆₎
V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1	V_H1

[0327]

GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_L1
GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_L2
CD8 Tm 41BB	CD8 Tm CD28	CD8 Tm 41BB - CD28	CD8 Tm CD28 -41BB	CD28 Tm 41BB	CD28 Tm CD28	CD28 Tm 41BB -CD28	CD28 Tm CD28 -41BB
CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎
11-XVII	11-XVIII	11-XIX	11-XX	11-XXI	11-XXII	11-XXIII	11-XXIV
CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1	CD8a V_L1
GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L2
GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS (1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H2
GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H1
CD8 Tm 41BB	CD8 Tm CD28	CD8 Tm 41BB - CD28	CD8 Tm CD28 -41BB	CD28 Tm 41BB	CD28 Tm CD28	CD28 Tm 41BB -CD28	CD28 Tm CD28 -41BB
CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎	CD3ζ ₍₁₋₂₎
11-XXV	11-XXVI	11-XXVII	11-XXVII I	11-XXIX	11-XXX	11-XXXI	11-XXXII
CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2	CD8a V_L2
GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1	GGGGS ₍₂₋₆₎ V_L1
GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS	GGGGS ₍₀₋₁₎ GGGGC (1)GGGGS

[0328]

(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1	(1-2) GGGGP (1)GGGGS (2-3) GGGGC (1)GGGGS (0-1) V_H1
GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2	GGGGS ₍₃₋₄₎ V_H2
CD8 Tm 41BB CD3z ₍₁₋₂₎	CD8 Tm CD28 CD3z ₍₁₋₂₎	CD8 Tm 41BB - CD28 CD3z ₍₁₋₂₎	CD8 Tm CD28 -41BB CD3z ₍₁₋₂₎	CD28 Tm 41BB CD3z ₍₁₋₂₎	CD28 Tm CD28 CD3z ₍₁₋₂₎	CD28 Tm 41BB -CD28 CD3z ₍₁₋₂₎	CD28 Tm CD28 -41BB CD3z ₍₁₋₂₎

[0329] 通过基因编辑以双或串联构造工程改造CAR的方法

[0330] 在另一方面,可产生CAR-T细胞对照。例如,对照CAR-T细胞可包括与不在恶性T细胞上表达的抗原结合的细胞外结构域。例如,如果治疗性CAR-T细胞靶向诸如CD7的T细胞抗原,或诸如CD2和CD3的多个T细胞抗原,那么对照CAR-T细胞结合的抗原可以是CD19。CD19是在B细胞但不在T细胞上表达的抗原,因此具有适于结合CD19的细胞外结构域的CAR-T细胞将不与T细胞结合。这些CAR-T细胞可用作对照,以分析靶向感兴趣的癌症和/或识别感兴趣的抗原的CAR-T细胞的结合效率和非特异性结合。

[0331] CAR可如W02018027036A1中所公开进行进一步设计,任选地采用本领域技术人员将已知的变型。可以如本文所公开的那样以及通过本领域已知的方法和从商业来源获得慢病毒载体和细胞系,并且设计、验证和合成指导RNA。

[0332] 可使用逆转录病毒将工程改造的CAR引入T细胞中,所述逆转录病毒将编码嵌合抗原受体的核酸序列有效且稳定地整合到靶细胞基因组中。本领域已知的其他方法包括但不限于慢病毒转导、基于转座子的系统、直接RNA转染和CRISPR/Cas系统(例如,I型、II型或III型系统,其使用合适的Cas蛋白,诸如Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(或CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(或CasA)、Cse2(或CasB)、Cse3(或CasE)、Cse4(或CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966等)。也可使用锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)。参见,例如,Shearer RF和Saunders DN,“Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines:lentivirus and alternatives,”Genes Cells 2015年1月;20(1):1-10。

[0333] PI3K信号传导的操纵可以用于防止由组成型CAR自身信号传导引起的CAR-T细胞分化的改变,并促进长寿记忆T细胞的发育。在CAR-T制造和离体扩增期间PI3K的药理阻滞可以消除优先效应T细胞的发育,并使CAR-T效应/记忆比恢复至在空载体转导的T细胞中观察到的比率,这可以改善体内T细胞持久性和治疗活性。p110δPI3K的抑制可以增强肿瘤特异性治疗性CD8 T细胞的功效和记忆,而p110αPI3K的抑制则可以增加细胞因子的产生和抗肿瘤反应。

[0334] 提出这一点是因为即使在不存在配体的情况下,T细胞表面上CAR的存在也可以改

变其激活和分化。与scFv框架和信号传导结构域相关的通过CAR的组成型自身信号传导可以导致异常T细胞行为,包括分化改变和存活率降低。这很重要,因为CAR-T细胞在患者中的有效性与其体内寿命直接相关。CD28共刺激结构域的存在增加由持久性CAR自身信号传导引起的CAR-T细胞耗竭;4-1BB共刺激结构域的影响较小。此外,CD3- ζ 显著增强PI3K、AKT、mTOR和糖酵解途径的组成型激活,并且相对于中央/干记忆细胞促进短时效应细胞的形成。参见,例如,Zhang W.等,“Modulation of PI3K signaling to improve CAR T cell function,”Oncotarget,2018年11月9日;9(88):35807-35808。

[0335] 细胞因子基因缺失或抑制

[0336] 除了对TCR以及细胞表面蛋白和抗原进行基因编辑外,还可对可分泌蛋白(诸如细胞因子和趋化因子)的基因进行编辑。将进行这样的编辑,例如以减少或防止细胞因子释放综合征(CRS)的发展或维持。CRS是由免疫细胞响应于免疫疗法(或其他免疫刺激)而大量、快速地释放细胞因子引起的。可以使用本领域已知的方法来完成一种或多种细胞因子或趋化因子基因的修饰、破坏或缺失,诸如基因消融(基因沉默),其中通过基因序列信息的改变或缺失来消除基因表达。这可以使用本领域已知的基因工程工具来实现,所述工具诸如转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、CRISPR、小发夹RNA(shRNA)的转导、CAR到细胞因子的基因序列中的靶向转导等。

[0337] 可以例如使用Cas9-CRISPR或通过将CAR靶向转导到细胞因子的基因序列中而从如本文公开的免疫效应细胞中缺失的细胞因子或趋化因子包括但不限于以下:XCL1、XCL2、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CX3CL1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1RA、IL-18、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-3、IL-5、GM-CSF、IL-6、IL-11、G-CSF、IL-12、LIF、OSM、IL-10、IL-20、IL-14、IL-16、IL-17、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、CD154、LT- β 、TNF- α 、TNF- β 、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCE、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF、MSP、A2M、ACKR1、ACKR2、ACKR3、ACVR1、ACVR2B、ACVRL1、ADIPOQ、AGER、AGRN、AIMP1、AREG、BMP1、BMP10、BMP15、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8A、BMP8B、BMPR2、C10orf99、C1QTNF4、C5、CCL28、CCR1、CCR2、CCR3、CCR5、CCR6、CCR7、CD109、CD36、CD4、CD40LG、CD74、CER1、CHRD、CKLF、CLCF1、CMTM1、CMTM2、CMTM3、CMTM4、CMTM5、CMTM6、CMTM7、CMTM8、CNTF、CNTFR、COPS5、CRLF1、CSF1、CSF1R、CSF2、CSF3、CSF3R、CTF1、CX3CR1、CXCL16、CXCL17、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、EBI3、EDN1、ELANE、ENG、FAM3B、FAM3C、FAM3D、FAS、FASLG、FGF2、FLT3LG、FZD4、GBP1、GDF1、GDF10、GDF11、GDF15、GDF2、GDF3、GDF5、GDF6、GDF7、GDF9、GPI、GREM1、GREM2、GRN、HAX1、HFE2、HMGB1、HYAL2、IFNA10、IFNA14、IFNA16、IFNA2、IFNA5、IFNA6、IFNA8、IFNAR1、IFNAR2、IFNB1、IFNE、IFNG、IFNGR1、IFNK、IFNL1、IFNL3、IFNW1、IL10RA、IL11RA、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL17A、IL17B、IL17C、IL17D、IL17F、IL18BP、IL-19、IL1F10、IL1R1、IL1R2、IL1RAPL1、IL1RL1、IL1RN、IL20RA、IL20RB、IL21、IL22、IL22RA1、IL22RA2、IL23A、IL23R、IL24、IL25、IL26、IL27、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL31、IL31RA、IL32、IL33、IL34、IL36A、IL36B、IL36G、IL36RN、IL37、IL6R、IL6ST、INHA、INHBA、INHBB、INHBC、INHBE、ITGA4、ITGAV、ITGB1、ITGB3、KIT、KITLG、KLHL20、LEFTY1、LEFTY2、

LIFR、LTA、LTB、LTBP1、LTBP3、LTBP4、MIF、MINOS1-、MSTN、NAMPT、NBL1、NDP、NLRP7、NODAL、NOG、NRG1、NRP1、NRP2、OSMR、PARK7、PDPN、PF4、PF4V1、PGLYRP1、PLP2、PPBP、PXD、SCG2、SCGB3A1、SECTM1、SLURP1、SOSTDC1、SP100、SPP1、TCAP、TGFB1、TGFB2、TGFB3、THBS1、THNSL2、THPO、TIMP1、TNF、TNFRSF11、TNFRSF1A、TNFRSF9、TNFRSF10、TNFSF11、TNFSF12、TNFSF12-、TNFSF13、TNFSF13B、TNFSF14、TNFSF15、TNFSF18、TNFSF4、TNFSF8、TNFSF9、TRIM16、TSLP、TWSG1、TXLNA、VASN、VEGFA、VSTM1、WFIKKN1、WFIKKN2、WNT1、WNT2、WNT5A、WNT7A和ZFP36。

[0338] 这些基因的序列是本领域已知且可获得的。

[0339] ACT (CAR-T) 疗法的适应症和护理标准

[0340] 在一些实施方案中，本文公开和/或使用本文公开的方法产生的基因组编辑的免疫效应细胞表达一种或多种嵌合抗原受体 (CAR)，并且可以用作药物，即用于治疗疾病。在许多实施方案中，细胞是CAR-T细胞。

[0341] 本文公开和/或使用本文公开的方法产生的细胞可用于免疫疗法和过继性细胞转移，以用于治疗或制造药物以用于治疗癌症、自身免疫疾病、传染病和其他病状。

[0342] 癌症可以是血液系统恶性肿瘤或实体肿瘤。血液系统恶性肿瘤包括白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤以及其亚型。淋巴瘤可以多种方式归类，通常基于恶性细胞的基础类型，包括霍奇金淋巴瘤 (通常是Reed-Sternberg细胞的癌症，但有时也起源于B细胞；所有其他淋巴瘤都是非霍奇金淋巴瘤)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤以及如本文定义和本领域已知的其他淋巴瘤。

[0343] B细胞淋巴瘤包括但不限于弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL)，以及如本文定义和本领域已知的其他淋巴瘤。

[0344] T细胞淋巴瘤包括T细胞急性成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤 (T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤 (PTCL)、T细胞慢性淋巴细胞性白血病 (T-CLL) 塞萨里 (Sezary) 综合征，以及如本文定义和本领域已知的其他淋巴瘤。

[0345] 白血病包括急性髓性 (或骨髓性) 白血病 (AML)、慢性髓性 (或骨髓性) 白血病 (CML)、急性淋巴细胞性 (或成淋巴细胞性) 白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 毛细胞白血病 (有时归类为淋巴瘤)，以及如本文定义和本领域已知的其他白血病。

[0346] 浆细胞恶性肿瘤包括淋巴浆细胞性淋巴瘤、浆细胞瘤和多发性骨髓瘤。

[0347] 在一些实施方案中，所述药物可以用于治疗患者的癌症，特别是用于治疗实体肿瘤，诸如黑色素瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤或癌瘤，诸如脑部肿瘤、头颈肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤 (例如，非小细胞肺癌，NSCLC)、生殖道 (例如，卵巢) 肿瘤、上消化道肿瘤、胰腺肿瘤、肝脏肿瘤、肾脏系统 (例如，肾) 肿瘤、膀胱肿瘤、前列腺肿瘤和结肠直肠肿瘤。

[0348] 在另一个实施方案中，所述药物可以用于治疗患者的癌症，特别是用于治疗选自多发性骨髓瘤和急性髓性白血病 (AML) 的血液系统恶性肿瘤以及选自T细胞急性成淋巴细胞性白血病 (T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤和T细胞慢性淋巴细胞性白血病 (T-CLL) 的T细胞恶性肿瘤。

[0349] 在一些实施方案中，所述细胞可用于治疗自身免疫疾病，诸如狼疮、自身免疫性 (类风湿性) 关节炎、多发性硬化症、移植排斥、克罗恩病、溃疡性结肠炎、皮炎等。在一些实施方案中，细胞是嵌合自身抗体受体T细胞，或展示抗原或其片段而非抗体片段的CAR-T；在

过继性细胞转移的这一型式中,引起自身免疫疾病的B细胞将试图攻击工程改造的T细胞,后者将把其杀伤以做出反应。

[0350] 在一些实施方案中,细胞可用于治疗传染病,诸如HIV和结核病。

[0351] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞可以经历稳健的体内T细胞扩增并且可以持续延长量的时间。

[0352] 在一些实施方案中,用本公开的CAR-T细胞治疗患者可以是改善、治愈或预防性的。它可以是自体免疫疗法的一部分,也可以是同种异体免疫疗法的一部分。自体是指用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群均来源于所述患者或来源于人白细胞抗原 (HLA) 相容的供体。同种异体是指用于治疗患者的细胞或细胞群不来源于患者,而是来源于供体。

[0353] 用本公开的CAR-T细胞治疗癌症可与选自以下的一种或多种疗法组合:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突状细胞疗法、基因疗法、激素疗法、放射疗法、激光疗法以及放射疗法。

[0354] 本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群的施用通过气雾剂吸入、注射、摄取、输液、植入或移植进行。本文所述的CAR-T细胞组合物,即单CAR、双CAR、串联CAR,可皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌内、通过静脉内或淋巴管内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方案中,本公开的细胞组合物优选通过静脉内注射施用。

[0355] CAR-T细胞或CAR-T细胞群的施用可以由以下组成:施用 10^4 - 10^9 个细胞/kg体重,优选地 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重,包括那些范围内的细胞数量的所有整数值。CAR-T细胞或CAR-T细胞群可以一次或多次剂量施用。在另一个实施方案中,有效量的CAR-T细胞或CAR-T细胞群作为单剂量施用。在另一个实施方案中,有效量的细胞在一段时间内作为多于一次剂量施用。施用定时在医疗护理提供者的判断范围内,并取决于患者的临床状况。CAR-T细胞或CAR-T细胞群可获自任何来源,诸如血库或供体。虽然患者的需求变化,但是针对特定疾病或病状的给定CAR-T细胞群的有效量的最佳范围的确定在本领域技术范围内。有效量是指提供治疗或预防有益效果的量。施用的剂量将取决于患者受体的年龄、健康状况和体重、同时治疗的类型(如果有的话)、治疗的频率以及期望效果的性质。

[0356] 在另一个实施方案中,肠胃外施用有效量的CAR-T细胞或CAR-T细胞群或包含那些CAR-T细胞的组合物。施用可以是静脉内施用。可以通过在肿瘤内注射直接进行CAR-T细胞或CAR-T细胞群或包含那些CAR-T细胞的组合物的施用。

[0357] 在本公开的一个实施方案中,将CAR-T细胞或CAR-T细胞群与任何数量的相关治疗方式结合(例如,在其之前、与其同时或在其之后)施用给患者,所述相关治疗方式包括但不限于使用细胞因子进行治疗,或从CAR-T内表达细胞因子,所述细胞因子增强T细胞增殖和持久性并且包括但不限于IL-2、IL-7和IL-15或其类似物。

[0358] 在一些实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与抑制免疫抑制途径的剂组合使用,所述剂包括但不限于TGF β 的抑制剂、白介素10 (IL-10)、腺苷、VEGF、吡咯胺2,3-双加氧酶1 (IDO1)、吡咯胺2,3-双加氧酶2 (IDO2)、色氨酸2-3-双加氧酶 (IDO)、乳酸盐、低氧、精氨酸酶以及前列腺素E2。

[0359] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与T细胞检查点抑制剂组合使用,所述T细胞检查点抑制剂包括但不限于抗CTLA4(依匹木单抗 (Ipilimumab))、抗PD1(派姆单抗 (Pembrolizumab)、纳武单抗 (Nivolumab)、塞普利单抗 (Cemiplimab))、抗

PDL1 (阿特朱单抗 (Atezolizumab)、阿维单抗 (Avelumab)、德瓦鲁单抗 (Durvalumab))、抗PDL2、抗BTLA、抗LAG3、抗TIM3、抗VISTA、抗TIGIT和抗KIR。

[0360] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与T细胞激动剂组合使用,所述T细胞激动剂包括但不限于刺激CD28、ICOS、OX-40、CD27、4-1BB、CD137、GITR和HVEM的抗体。

[0361] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与治疗性溶瘤病毒组合使用,所述溶瘤病毒包括但不限于逆转录病毒、小核糖核酸病毒、弹状病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、细小病毒、腺病毒、疱疹病毒和痘病毒。

[0362] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与免疫刺激疗法组合使用,所述免疫刺激疗法诸如toll样受体激动剂,包括但不限于TLR3、TLR4、TLR7和TLR9激动剂。

[0363] 在另一个实施方案中,本公开的CAR-T细胞或CAR-T细胞群可与干扰素基因(STING)激动剂的刺激物,诸如环GMP-AMP合酶(cGAS)组合使用。

[0364] 在过继性细胞转移疗法后,免疫效应细胞发育不全,特别是T细胞发育不全也是一个问题。当所治疗的恶性肿瘤是T细胞恶性肿瘤,并且CAR-T细胞靶向T细胞抗原时,正常T细胞及其表达抗原的前体将耗尽,并且免疫系统将受损。因此,用于管理这些副作用的方法是伴随着疗法的。此类方法包括选择并保留非恶性T细胞或前体,无论是自体的还是同种异体的(任选地被工程改造成不引起排斥或不被排斥),以便随后在CAR-T细胞耗竭或失活后进行扩增并重新输注到患者体内。可替代地,识别并杀伤携带TCR的细胞的子集,诸如正常和恶性TRBC1⁺而非TRBC2⁺细胞,或可替代地,TRBC2⁺而非TRBC1⁺细胞的CAR-T细胞可用于根除T细胞恶性肿瘤,同时保存足够的正常T细胞以维持正常的免疫系统功能。

[0365] 定义

[0366] 除非本文具体定义,否则所使用的所有科技术语具有与基因疗法、生物化学、遗传学和分子生物学领域的技术人员通常所理解的相同的含义。与本文所描述的那些类似或等同的所有公开的组合物和方法可以用于实践或测试本公开。

[0367] 如本文所用,以下术语具有所指定的含义。当公开值的范围并使用“从 n_1 …至 n_2 ”或“ n_1 …与 n_2 之间”(其中 n_1 和 n_2 是数字)的表示法时,除非另外指明,否则此表示法旨在包括数字本身和它们之间的范围。此范围可以是端值之间的整数或连续范围,且包括端值。例如,范围“从2至6个碳”意在包括二、三、四、五和六个碳,因为碳为整数单位。对比,例如,范围“从1至3 μ M(微摩尔),”其意在包括1 μ M、3 μ M和在其间的所有数字至任何位数的有效数字(例如,1.255 μ M、2.1 μ M、2.9999 μ M等)。

[0368] 如本文所用,术语“约”旨在限定其修饰的数值,表明所述值是误差幅度内的变量。当没有详述特别的误差幅度,诸如在数据图或表中给定的平均值的标准偏差时,术语“约”应理解为表示将涵盖所述值的范围,和考虑到有效数字,可以被所述数字的上下舍入(rounding up or down)所包括的范围。

[0369] 关于细胞的术语“激活”(及其其他词形变化)通常被理解为与“刺激”同义,并且如本文所用,是指导致细胞群扩增的细胞处理。在T细胞中,激活通常通过暴露于CD2和CD28(有时还包括CD2)激动剂来实现的,所述激动剂通常是抗体,任选地被包被在磁珠上或与胶体聚合物基质缀合。

[0370] 如本文所用,术语“抗原”是由T细胞受体或嵌合抗原受体识别(即,是其靶标)的细胞表面蛋白。在传统意义上,抗原是由抗体识别的物质,通常是蛋白质,但就CAR包含抗体衍生的结构域,诸如识别一个或多个抗原的轻链(V_L)和重链(V_H)而言,定义是重叠的。

[0371] 术语“癌症”是指细胞在体内的恶性或异常生长。许多不同的癌症可以通过特定的细胞表面蛋白或分子进行表征或鉴定。因此,总体来说,根据本公开的癌症可指可用免疫效应细胞诸如如本文所述的CAR-T细胞治疗的任何恶性肿瘤,其中免疫效应细胞识别并结合癌细胞上的细胞表面蛋白。如本文所用,癌症可指血液系统恶性肿瘤,诸如多发性骨髓瘤、T细胞恶性肿瘤或B细胞恶性肿瘤。T细胞恶性肿瘤可包括但不限于T细胞急性成淋巴细胞性白血病(T-ALL)或非霍奇金淋巴瘤。癌症也可指实体肿瘤,诸如包括但不限于宫颈癌、胰腺癌、卵巢癌、间皮瘤和肺癌。

[0372] 如本文所用,“细胞表面蛋白”是由细胞至少部分地在细胞表面上表达的蛋白质(或蛋白质复合物)。细胞表面蛋白的实例包括TCR(及其亚基)和CD7。

[0373] 如本文所用且通常在本领域中使用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指具有细胞外配体结合结构域、跨膜结构域以及在细胞外配体结合结构域与靶细胞上存在的组分结合时指导细胞执行特化功能的信号转导结构域的重组融合蛋白。例如,CAR可以对具有激活T细胞受体的细胞内结构域的期望抗原(例如,肿瘤抗原)具有基于抗体的特异性,以产生表现出特异性抗靶标细胞免疫活性的嵌合蛋白。第一代CAR包括细胞外配体结合结构域和信号转导结构域,通常为CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 。通过包括细胞内共刺激结构域(通常为4-1BB或CD28),在第一代CAR构建体的基础上构建第二代CAR。与第一代CAR相比,这些共刺激结构域有助于增强CAR-T细胞的细胞毒性和增殖。第三代CAR包括多个共刺激结构域,主要用以增加CAR-T细胞的增殖和持久性。嵌合抗原受体与其他抗原结合剂的区别在于它们结合MHC非依赖性抗原并通过其细胞内结构域转导激活信号的能力。

[0374] “携带CAR的免疫效应细胞”是已经用至少一种CAR转导的免疫效应细胞。“CAR-T细胞”是已经用至少一种CAR转导的T细胞;CAR-T细胞可以是单、双或串联CAR-T细胞。CAR-T细胞可以是自体的,这意味着它们是从受试者自身的细胞工程改造而来的,或是同种异体的,这意味着所述细胞都来源于健康供体,并且在许多情况下,经过工程改造以免引起宿主抗移植物或移植物抗宿主反应。供体细胞也可来源于脐带血或由诱导多能干细胞产生。

[0375] 双CAR-T细胞(dCAR-T)可以定义为这样的T细胞,其具有对在同一效应细胞内表达的不同靶抗原具有亲和力的两种不同的嵌合抗原受体多肽,其中各CAR独立发挥作用。CAR可从单个或多个多核苷酸序列表达。

[0376] 串联CAR-T细胞(tCAR-T)可以定义为具有单个嵌合抗原多肽的T细胞,所述多肽包含对不同靶标具有亲和力的两个不同的细胞外配体结合结构域,其中细胞外配体结合结构域通过肽接头连接并共享一个或多个共同的共刺激结构域,其中任一细胞外配体结合结构域的结合将通过一个或多个共同的共刺激结构域和信号转导结构域进行信号传导。

[0377] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂,以治疗在本公开描述的治疗性病症或病症。此类施用涵盖以基本同时的方式共同施用这些治疗剂,诸如以具有固定比例的活性成分的单个胶囊,或以每种活性成分的多个、分离的胶囊。此外,此类施用也涵盖以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下,治疗方案将在治疗本文所述病症或病症方面提供药物组合的有益作用。

[0378] 如本文所用,术语“组合物”是指与一种或多种治疗上可接受的载剂组合的免疫治疗性细胞群。

[0379] 如本文所用,术语“疾病”意思通常与术语“病症”、“综合征”和“病状”(如在医学病状中)同义,并且与其可互换使用,因为其均反应人或动物身体或身体的一个部分的异常情况,所述异常情况损害正常的功能,通常通过有区别的病征和症状表现出来,并引起人或动物的寿命期缩短或生活质量降低。

[0380] 如本文所用,术语“自相残杀”是指在CAR-T细胞成为包含与CAR-T细胞的靶标相同的嵌合抗原受体的另一CAR-T细胞的靶标并被其杀伤时发生的过程,这是由于靶向细胞表达被在这两个细胞上的嵌合抗原受体特异性识别的抗原。缺乏嵌合抗原受体所特异性结合的抗原的包含嵌合抗原受体的CAR-T细胞将是“具有自相残杀抗性的”。

[0381] 如本文所用,术语“基因组编辑的”是指对基因进行添加、缺失或修饰以使其无功能。因此,在某些实施方案中,“基因组编辑的CAR-T细胞”是这样的CAR-T细胞:其添加了识别至少一种抗原的基因,诸如CAR;和/或缺失了诸如由CAR识别的抗原基因的基因,和/或诸如TCR或其亚基(例如, α 或 β 链)的基因缺失或被修饰以使其无功能,或缔合的CD3信号转导复合物的亚基或其亚基(例如, γ 、 δ 、 ϵ 或 ζ 链)缺失或被修饰以使其无功能。

[0382] 如本文所用,“自杀基因”是指通过本领域已知的标准方法引入CAR-T细胞的核酸序列,其在被激活时导致CAR-T细胞的死亡。如果需要,自杀基因可有助于在体内追踪和消除(即,杀伤)CAR-T细胞。通过激活自杀基因促进CAR-T细胞杀伤可以通过本领域已知的标准方法实现。本领域已知的自杀基因系统包括但不限于(a)单纯疱疹病毒(HSV)-tk,其将无毒前药更昔洛韦(GCV)转变为GCV-三磷酸,通过停止DNA复制而导致细胞死亡,(b) iCasp9可以与小分子AP1903结合并导致二聚化,从而激活固有的细胞凋亡途径,以及(c)在转导的T细胞中表达的可靶向表面抗原(例如,CD20和截短的EGFR),其允许在施用相关单克隆抗体后,通过补体/抗体依赖性细胞毒性(CDC/ADCC)有效地消除经修饰细胞。

[0383] “癌细胞”例如是恶性T细胞、恶性B细胞或恶性浆细胞。

[0384] “恶性B细胞”是源自B细胞恶性肿瘤的B细胞。B细胞恶性肿瘤包括但不限于(DLBCL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL),以及B细胞前体急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。

[0385] “恶性T细胞”是源自T细胞恶性肿瘤的T细胞。

[0386] 术语“T细胞恶性肿瘤”是指源自T细胞前体、成熟T细胞或自然杀伤细胞的恶性肿瘤的广泛、高度异质性的分组。T细胞恶性肿瘤的非限制性实例包括T细胞急性成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤(T-ALL)、人T细胞白血病病毒1型阳性(HTLV-1+)成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、T细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、成人T细胞淋巴瘤/白血病(HTLV-1相关)、侵袭性NK细胞白血病、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、ALK阳性、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、ALK阴性、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(AITL)、乳房植入物相关的间变性大细胞淋巴瘤、NK细胞的慢性淋巴增生性病症、鼻型结外NK/T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、滤泡性T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、胃肠道惰性T细胞淋巴增生性病症、单形性亲上皮性肠道T细胞淋巴瘤(Monomorphic epitheliotrophic intestinal T-cell lymphoma)、蕈样肉芽肿、具有TFH表型的结内外周T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、NOS、原发性皮肤 $\gamma\delta$ T细胞淋巴瘤、原发性皮肤CD8+侵袭性亲表皮细胞毒性T细胞淋巴瘤、原发性皮肤肢端CD8+T细胞淋巴

瘤 (Primary cutaneous acral CD8+T-cell lymphoma)、原发性皮肤CD4+小/中T细胞淋巴增生性病症[原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(C-ALCL)、淋巴样丘疹(lymphoid papulosis)]、塞萨里综合征(Sezary syndrome)、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、儿童系统性EBV+T细胞淋巴瘤,以及T细胞大颗粒淋巴细胞性白血病(LGL)。

[0387] 如本文所用,“健康供体”是不具有血液系统恶性肿瘤(例如T细胞恶性肿瘤)的供体。

[0388] 术语“治疗可接受的”是指适于被用于接触患者组织且不产生不当的毒性、刺激和过敏反应,与合理的益处/风险比相当且对它们的预期用途而言有效的物质。

[0389] 术语“治疗有效的”旨在限定用于治疗疾病或病症或实现临床终点的活性成分的量。

[0390] 如本文所用,“可分泌蛋白”是由细胞分泌的对其他细胞有影响的蛋白质。例如,可分泌蛋白包括细胞因子、趋化因子和转录因子。

[0391] 术语“供体模板”是指细胞用作模板以通过同源定向修复(HDR)DNA修复途径修复双链断裂的参考基因组材料。供体模板包含待插入基因组的DNA片段(包含待表达的基因、CAR或标志物),其两个同源臂处于双链断裂位点的两侧。在一些实施方案中,供体模板可以是腺相关病毒、单链DNA或双链DNA。

[0392] 在使物质组合物(诸如抗体)与其他物质组合物(诸如细胞)紧密接触的上下文中,如本文所用,术语“暴露于”旨在和“与...一起孵育”同义,并且使用一个术语代替另一个术语并不意味着需要更长的接触时间段。

[0393] 术语“患者”通常与术语“受试者”同义,并且包括了包括人在内的所有哺乳动物。

[0394] 通过以下实施例进一步说明本发明。

[0395] 实施例

[0396] 实施例1-通过将CAR插入CD3e基因座中来制备和测试基因组编辑的CAR-T细胞的方法

[0397] 可采取以下步骤来提供基因组编辑的CAR-T细胞,其中car由本文公开的基因编辑的基因座(CAR-T)表达。此实施例描述了CD7CART Δ CD7 Δ CD3 ϵ 细胞的制备。如本领域技术人员将认识到的,尽管可能导致不同的效率,但是某些步骤可顺序进行或不按下面列出的顺序进行。

[0398] 表12. 用于除去免疫效应细胞上的表面抗原的指导RNA序列。

靶基因	gRNA 序列
CD7	5' <u>2'OMe(A(ps)U(ps)C(ps))</u> ACGGAGGUCAAUGUCUAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:47)
CD7g1 0	5' <u>2'OMe(G(ps)U(ps)A(ps))</u> GACAUUGACCUCCGUGAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:48)
[0399] CD7g4	5' <u>2'OMe(A(ps)U(ps)C(ps))</u> ACGGAGGUCAAUGUCUAGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:49)
TRACg	5' <u>2'OMe(G(ps)A(ps)G(ps))</u> AAUCAAAAUCGGUGAAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:50)
CS1	5' <u>2'OMe(G(ps)A(ps)C(ps))</u> CAAUCUGACAUGCUGCAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:51)
CD2	5' <u>2'OMe(A(ps)C(ps)A(ps))</u> GCUGACAGGCUCGACACGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:52)
CD2g	5' <u>2'OMe(G(ps)A(ps)G(ps))</u> AAUCAAAAUCGGUGAAUGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:53)
[0400] CD3εg	5' <u>2'OMe(A(ps)G(ps)G(ps))</u> GCAUGUCAAUUUACUGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:54)
CD5	5' <u>2'OMe(C(ps)G(ps)U(ps))</u> UCCAACUCGAAGUGCCAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:55)
CD5g	5' <u>2'OMe(C(ps)G(ps)U(ps))</u> UCCAACUCGAAGUGCCAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC2'OMe(U(ps)U(ps)U(p s)U 3' (SEQ ID NO:56)

[0401] RNA; (ps) 指示硫代磷酸酯。加下划线的碱基表示靶序列。

[0402] 步骤1-T细胞激活(第0天)。

[0403] 使用Miltenyi人泛T分离试剂盒从白细胞分离术腔室中纯化T细胞。重悬在培养基中。对细胞计数。确定获得3:1的珠粒:细胞比所需的人T细胞活化CD3/CD28珠粒的数目。用T细胞培养基洗涤珠粒2x。将细胞以1.256个细胞/mL稀释于hXcyte培养基中。添加人T细胞活化CD3/CD28珠粒。将4mL/孔的1.256个细胞/mL溶液等分到6孔板中。在37C下孵育细胞。

[0404] 步骤2-CRISPR (第2天)。

[0405] 通常使靶基因缺失并且将CAR插入基因编辑的基因座中。可以使用供体模板,使用同源定向修复来修复DNA双链断裂,以修复断裂并将期望序列插入编辑的基因座中。可使用Cas9 mRNA和针对靶标的gRNA,通过电穿孔实现靶标缺失。供体模板可以是DNA质粒,或与用Cas9/gRNA电穿孔的双链断裂周围的DNA具有同源性的双链线性DNA。另外,诸如AAV的病毒载体可用作供体模板的来源。然而,可以使用其他技术来诱导DNA双链断裂。这些包括其他基因组编辑技术,诸如TALEN和大范围核酸酶。

[0406] 表13.CRISPR方案

[0407]

样品 ID	gRNA#1	gRNA#2	Cas9	核转染缓冲液 P3
UCART7	20ug gCD7	20ug gCD3ε	15ug Cas9 mRNA	100ul

[0408] 方案-使用核转染仪4D (nucleofector 4D) 进行核转染-每个反应 4×10^6 个细胞。程序E0-115-100ul转染体积。全部补充剂都需要添加到Nucleofector™ Solution P3中。通过用期望体积的推荐培养基(在6孔板中2ml)填充适当数量的孔并在潮湿的37℃/5%CO₂培养箱中预孵育/平衡板来制备细胞培养板。以磁性方式除去珠粒(进行两次,以确保完全除去)。对细胞计数并确定细胞密度。将所需数量的细胞在室温下以90xg离心10分钟。完全除去上清液。重悬于PBS (1ml)中,并转移至微量离心管中,并将所需数量的细胞在室温下以90xg离心10分钟。完全除去上清液。小心地将细胞沉淀物重悬于完全室温的4DNucleofector™ Solution P3中(每100ul 4×10^6)。将20ug的各gRNA (gCD7和gCD3ε)添加到每个管的15ug cas9中。将100ul细胞添加到每个管的Cas9/gRNA中,轻轻混合并将所有物质转移到Nucleocuvette™中。轻轻敲击以除去气泡。使用程序(Human T cell stim E0-115)进行电穿孔。运行完成后,使用专用工具小心地从固定器上移除Nucleocuvette™容器。用预热的培养基重悬细胞。从目标孔中取出培养基,添加到比色杯中,并轻轻地上下吸移两至三次。转移到孔中。对来自相同孔的培养基重复上述操作。在37℃下孵育。

[0409] 步骤3-用包含HDR修复构建体的AAV载体转导T细胞。

[0410] 在以1e4与1e6之间的MOI进行电穿孔后2-4h,将重组AAV6供体载体添加到细胞培养物中。

[0411] 步骤4-评估CRISPR活性和Td效率(第10天)。

[0412] 从每个样品中取出 5×10^5 个细胞,并通过流式细胞术进行分析。用RB洗涤样品。添加3ul的抗CD34 PE抗体(这检测CAR,因为我们的构建体包含人截短的CD34)。添加5ul的CD3 APC和2ul的CD2BV421。洗涤。执行流式细胞术。细胞应是CD3ε阴性、CD7阴性的。收获T细胞(第11天)。

[0413] CAR-T细胞的纯化。在Miltenyi Automacs上使用CD34+细胞的阳性选择,可以在单个步骤中纯化CD34+ (CAR+) 和TCR阴性的细胞。这富集CAR+细胞,并除去TCR+细胞(因为CAR插入破坏TCR信号传导)。

[0414] 步骤5-评估体内CAR-T活性

[0415] 如果执行体内成像实验,则在NSG小鼠中注射肿瘤 (5e5 MOLT3或HH: 包含荧光素酶)。(第7天)

[0416] 使用生物发光成像对小鼠的肿瘤负荷进行成像。通过尾静脉向每只小鼠I.V.注射 2×10^6 个CD34+CAR-T,或执行针对靶细胞(MOLT3或HH)的4h铬释放测定(第11天)。本领域技术人员将理解,在实施例1所指定的时间框架内可能存在一定的灵活性。

[0417] 实施例2-制备基因组编辑的串联tCAR-T细胞的方法

[0418] 在实施例1中的方案的变型中,可以制备识别两种抗原的串联CAR-T细胞。在步骤2中,可以如上所述使两种抗原从细胞表面缺失或受抑制,这通过用针对两个靶标中的每一个的gRNA和Cas9mRNA进行电穿孔来实现。然后在步骤3中,用识别两个靶标的CAR转导此CAR-T细胞。串联CAR-T细胞的变型在图2中的示意图中示出。tCAR-T细胞的另外实例在表6中示出。

[0419] 实施例3-基因组编辑的双CAR-T细胞或基因组编辑的串联CAR-T细胞

[0420] 使用上述方法可制备几种类型的基因组编辑的双或串联CAR-T细胞。图1和图2示出串联和双CAR-T细胞的实例。所述图说明了待靶向的抗原,并且未指示串联CAR构建体中scFv表达的顺序。下文在表6-11中提供了另外的实例。

[0421] 本文提供了串联和双CAR-T细胞的另外实例,其具有或不具有作为CAR的靶抗原并在CAR-T细胞上表达的一种或多种表面蛋白的缺失或抑制。一般来说,对于这些CAR-T细胞,具有多于一种抗原的缺失或抑制的实例将更可能具有更大的自相残杀抗性的益处。还应该注意的是,scFv在串联CAR中被定向的顺序在表6-11中列出,并且不是限制性的。例如,CD2*CD3 ϵ 包括具有取向CD2*CD3 ϵ 或取向CD3 ϵ *CD2的tCAR。

[0422] 本文提供了靶向在多发性骨髓瘤细胞上表达的抗原的单、串联和双CAR-T细胞的另外实例,其不具有或具有作为CAR的靶抗原并在CAR-T细胞上表达的一种或多种表面蛋白的缺失或抑制。一般来说,对于这些CAR-T细胞,具有多于一种抗原的缺失或抑制的实例将更可能具有更大的自相残杀抗性的益处。

[0423] 实施例4-用基因组编辑的双或串联CAR-T细胞治疗患者

[0424] 可使用通过如图1和图2所示的以上方法制备的细胞治疗患者。例如,可将扩增的双或串联CAR-T细胞群输注到患者体内。

[0425] 双或串联CAR-T细胞靶向癌细胞而不诱发同种异体反应性。例如,CD2*CD3 ϵ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 细胞将靶向携带CD2和CD ϵ 表面抗原的癌细胞(和其他非癌细胞)。

[0426] 实施例5-在T-ALL的异种模型中测试CD2*CD3 Δ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的功效

[0427] 在T-ALL的异种模型中测试CD2*CD3 Δ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的功效:将 5×10^5 个磕头虫红色荧光素酶(Click Beetle Red luciferase,CBR)标记的Jurkat(T-ALL-99%CD2+、99%CD3%,通过FACS获得)细胞I.V.注射到NSG受体中,然后在第+4天i.v.输注CD2*CD3 ϵ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ (WC5或WC13)、CD3CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ (UCART3)、CD2CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ (UCART2)或非靶向的CD19-CAR Δ CD2 Δ CD3 ϵ (UCART19)对照细胞。与接受CD19-CAR Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的小鼠或仅注射肿瘤的小鼠相比,接受CD2*CD3 ϵ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的小鼠表现出显著延长的生存期以及如通过图13所示的生物发光成像确定的减小的肿瘤负荷。在未来的模型中,在靶细胞缺少CD2(CD2CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ)或CD3(CD3CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ)的此模型的变型中,CD2*CD3 ϵ -dCART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 将提供优于CD3CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 、CD2CART Δ CD2 Δ CD3 ϵ 的生存优势,并减小肿瘤负荷。

[0428] 实施例6-基因组编辑的单CAR-T细胞

[0429] 下文提供了靶向在血液系统恶性肿瘤上表达的抗原的基因组编辑的单CAR-T细胞的实例,其不具有或具有作为CAR的靶抗原并在CAR-T细胞上表达的一种或多种表面蛋白的缺失或抑制。一般来说,对于这些CAR-T细胞,具有多于一种抗原的缺失或抑制的实例将更可能具有更大的自相残杀抗性的益处。

[0430] 实施例7-在激活前通过编辑制备的基因组编辑的UCART2/3细胞

[0431] 在第0天,将细胞在解冻缓冲液中解冻。此后,将细胞重悬于培养基中并使其静息两个小时。收获细胞并计数。将所需数量的细胞在室温下以100xg离心10分钟。完全除去上清液,将细胞重悬于PBS (1ml) 中并转移到微量离心管中,并在室温下以100xg离心10分钟。完全除去上清液,然后将细胞重悬于缓冲液P3中,计数,并将计数调整为 5×10^7 /mL。向含有Cas9/gRNA的管中添加100μL细胞池体积(cell pool volume),轻轻混合,并且将所有物质转移到Nucleocuvette™中,轻轻敲击以除去气泡。然后使用程序(Human Tcell stim E0-115)开始电穿孔。在此过程后,将活化的细胞转移到预热的培养基中,并以2mL等分试样的形式分配在12孔板中。使等分样品静息24小时。

[0432] 在第1天,用T细胞TransAct™激活细胞,如表14所示。

[0433] 表14. T细胞TransAct™激活。

[0434]

	名称	培养基	刺激	Cas9 p	gRNA	病毒
1	WT	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	-	-	
2	WC5	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC5
3	WC6	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC6
4	WC7	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC7
5	WC8	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC8
6	WC13	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC13
7	WC14	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC14
8	WC15	TexMacs	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC15
9	WC16	TexMACS	T 细胞 TransAct™ (50μl)	2 ul	20ug iDT CD2 + CD3ε	WC16

[0435] 在第2天,每毫升培养基 (8mg/ml储备液) 中添加1μl的聚凝胺。添加所需量的病毒以得到所需的M.O.I (感染复数)。将细胞和病毒混合并放回37℃培养箱中。

[0436] 在第3天,洗涤活化的细胞以除去刺激。

[0437] 在第12天,FACS分析显示出CD3⁺CD2⁻/CAR-T细胞的高纯度;参见图5(克隆5和克隆6)、图6(克隆7和克隆8)、图7(克隆13和克隆14)以及图8(克隆15和克隆16)。使用(⁵¹Cr)标记的基因组编辑的Jurkat细胞(Δ CD2、Δ CD3和Δ CD2 Δ CD3)执行标准的四小时铬释放(⁵¹Cr)测定。这些实验显示出对CD2和CD3靶标的相互独立的功能性肿瘤杀伤反应(参见图9A、图

9B、图9C和图9D)。

[0438] 实施例8-BCMA-CAR-T细胞的肿瘤细胞杀伤

[0439] 首先使用 ^{51}Cr 标记的MM.1S靶细胞,使用标准的四小时铬释放(^{51}Cr)测定在体外测试BCMA CAR-T的功效。为了能够进行体内追踪,对人骨髓瘤细胞系(BCMA+/CD19-)进行修饰,以表达与GFP融合的镭头虫红色荧光素酶(MM.1S-CG)。将CAR-T细胞与 ^{51}Cr 标记的MM.1S-CG细胞在一定范围的效应子(CAR-T)与靶标(MM.1S-CG)比率下一起孵育四小时,并且测量所释放的 ^{51}Cr 作为MM.1S-CG细胞死亡的标志物(图10B)。在多个效应子与靶标(E:T)比率下观察到有效杀伤。未转导的活化T细胞和CD19-CAR-T用作阴性对照并且不引起MM.1S-CG细胞的杀伤。接下来,通过向NSG小鼠中植入500,000个MM.1S-CG人骨髓瘤细胞(i.v.)来测试体内功效。二十八天后,当肿瘤负荷高时,不对小鼠进行治疗或用进行 2×10^6 个CD19-CAR-T或BCMA CAR-T进行治疗。与在第50天左右死亡的对照相比,用BCMA CAR-T治疗的所有七只小鼠都存活将近150天或更长(图10C)。BCMA CAR-T小组中死亡的一只小鼠的死因未知。流式细胞术分析揭示,在该小鼠中不存在GFP+肿瘤细胞。连续生物发光成像(BLI)揭示出在整个实验的持续时间内从未增加的背景信号水平的稳健降低(图10D)。

[0440] 实施例9-CS1-CAR-T细胞的肿瘤细胞杀伤

[0441] 通过将 5×10^5 个MM.1S-CG注射到NSG小鼠中并且28天后,在肿瘤负荷高(BLI信号为1010光子通量)时,注射 2×10^6 个CS1-CAR-T细胞或阴性对照CD19-CAR-T细胞来测试CS1-CAR-T细胞的体内功效。作为测试CS1-CAR-T细胞的特异性的方法,还向小鼠中植入缺乏CS1的MM.1S-CG细胞(使用CAS9/CRISPR技术;MM.1S-CG Δ CS1)。用CS1-CAR-T细胞治疗的所有小鼠($n=10$)存活>90天(图11B),而CD19对照小鼠($n=8$)的中值生存期为43天。如上所述,我们用CS1-CAR-T或CD19 CAR-T治疗植入了MM.1S-CG Δ CS1的小鼠。那些小鼠的生存期与对照小鼠(49天)相似,表明体内特异性。连续生物发光成像(BLI)显示,经CS1-CAR-T治疗的小鼠的光子通量和骨髓肿瘤清除率降低三个log(图11C)。CS1-CAR-T小鼠的子组出现保留CS1表达的髓外肿瘤,表明没有发生抗原逃逸。

[0442] 实施例10-靶向BCMA和CS1的串联(tCAR)的功效和细胞杀伤

[0443] 在靶向BCMA和CS1的串联(tCAR)中表达两种scFv的双靶向的CAR-T经过设计,以试图改善骨髓瘤CAR-T细胞的功效和杀伤力。作为对照,串联CAR与单靶向的BCMA-CAR-T细胞和单靶向的CS1-CAR-T细胞一起测试。CD19-CAR-T细胞用作阴性对照。首先,确认每种scFv在tCAR中表达。为了实现这一点,如图12A所示,用表达各CAR构建体的慢病毒感染Jurkat细胞。将CAR-T细胞与各自用单独的荧光荧光团标记的人重组BCMA和CS1蛋白一起孵育。对阴性对照CAR-T细胞进行门控(蓝色),并且实验性CAR-T细胞被覆盖(红色)。如所预期的,表达CD19 CAR的Jurkat细胞不结合BCMA或CS1蛋白(左下象限,图12B)。表达BCMA CAR蛋白的Jurkat细胞结合BCMA蛋白(左上象限,图12B)。表达CS1 CAR蛋白的Jurkat细胞结合CS1蛋白(右下象限,图12B)。表达串联BCMA-CS1 CAR蛋白的Jurkat细胞结合两种重组蛋白(右上象限,图12B),表明两种scFv均有表达。

[0444] 使用标准的四小时铬释放(^{51}Cr)测定测试单和串联CAR-T细胞的体外功效。对于这些实验,以一定范围的效应子与靶细胞(E:T比)孵育CAR-T细胞。BCMA-CS1 tCAR T细胞杀伤MM.1S-CG细胞,其功效与两种单靶向的CAR-T细胞相似。另外的实验将优化双靶向的BCMA-CS1 CAR-T细胞的体内功效。

[0445] 实施例11-用于gRNA选择的脱靶分析

[0446] 指导RNA是由Washington University Genome Engineering&iPSC设计并验证活性的。指导RNA是由Washington University Genome Engineering&iPSC设计并验证活性的。与给定gRNA互补的序列可存在于整个基因组中,包括但不限于靶基因座。短序列脱靶杂交的可能性更大。类似地,gRNA内的一些长序列在整个基因组中可具有精确匹配(long_0)或近似匹配(long_1、long_2,分别代表单个或两个核苷酸差异)。这些也可脱靶杂交,从而实际上导致错误基因的编辑并降低编辑效率。

[0447] 针对hCD2的2个外显子(CF58和CF59)进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。结果在表15(对于外显子CF58)和表16(对于外显子CF59)中列出。

[0448] 表15.hCD2(外显子CF58)的指导RNA(gRNA)脱靶分析

[0449]

名称	gRNA	long_0	long_1	long_2	short_0	SNP
CF58.CD2.g1	CAAAGAGATTACGAATGCCTNGG (SEQ ID NO:57)	1	1	1	3	NA
CF58.CD2.g23	CAAGGCATTTCGTAATCTCTTNGG (SEQ ID NO:58)	1	1	1	5	NA
CF58.CD2.g18	CTTG TAGATATCCTGATCATN GG (SEQ ID NO:59)	1	1	1	13	NA
CF58.CD2.g8	CTTGGGTCAGGACATCAACT NGG (SEQ ID NO:60)	1	1	1	14	NA
CF58.CD2.g14	CGATGATCAGGATATCTACA NGG (SEQ ID NO:61)	1	1	1	17	NA
CF58.CD2.g2	TTACGAATGCCTTGGAACCC NGG (SEQ ID NO:62)	1	1	1	27	NA
CF58.CD2.g3	TACGAATGCCTTGGAACCT NGG (SEQ ID NO:63)	1	1	1	34	NA
CF58.CD2.g4	ACGAATGCCTTGGAACCT GNGG (SEQ ID NO:64)	1	1	1	40	NA
CF58.CD2.g10	TGATATTGACGATATAAAAT NGG (SEQ ID NO:65)	1	1	2	3	NA
CF58.CD2.g9	ATGATATTGACGATATAAAA NGG (SEQ ID NO:66)	1	1	2	4	NA

[0450]

CF58.CD2.g 13	GCATCTGAAGACCGATGATC NGG (SEQ ID NO:67)	1	1	2	4	NA
CF58.CD2.g 7	AACCTGGGGTGCCTTGGGT CNGG (SEQ ID NO:68)	1	1	2	22	NA
CF58.CD2.g 6	TTGGAAACCTGGGGTGCCT TNGG (SEQ ID NO:69)	1	1	2	33	NA
CF58.CD2.g 15	GTATCAATATATGATACAAA NGG (SEQ ID NO:70)	1	1	2	35	NA
CF58.CD2.g 22	CAAGGCACCCAGGTTTCC ANGG (SEQ ID NO:71)	1	1	2	45	NA
CF58.CD2.g 5	CTTGAAACCTGGGGTGCC TNGG (SEQ ID NO:72)	1	1	2	62	NA
CF58.CD2.g 19	TCATCACTCATTTGAAAAC NGG (SEQ ID NO:73)	1	1	3	56	NA
CF58.CD2.g 20	CAAGTTGATGTCCTGACCCA NGG (SEQ ID NO:74)	1	1	4	27	NA
CF58.CD2.g 21	GTCCTGACCCAAGGCACCC CNGG (SEQ ID NO:75)	1	1	4	33	NA
CF58.CD2.g 17	ATATTGATTTGAAGATTCA NGG (SEQ ID NO:76)	1	1	6	35	NA
CF58.CD2.g 16	TACAAAAGGAAAAAATGTG TNGG (SEQ ID NO:77)	1	1	7	64	NA
CF58.CD2.g 12	ACATATAAGCTATTTAAAA NGG (SEQ ID NO:78)	1	1	8	58	NA
CF58.CD2.g 11	AAAAGAGAAAGAGACTTTC ANGG (SEQ ID NO:79)	1	1	15	42	NA

[0451] 表16.hCD2 (CF59) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0452]

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
CF59.CD 2.g20	CTTGATACAGGTTTAATT CGNGG (SEQ ID NO:80)	1	1	1	2	NA
CF59.CD 2.g13	ACAGCTGACAGGCTCGA CACNGG (SEQ ID NO:81)	1	1	1	4	NA
CF59.CD 2.g17	GATGTTTCCCATCTTGAT ACNGG (SEQ ID NO:82)	1	1	1	8	NA
CF59.CD 2.g12	GTCGAGCCTGTCAGCTGTC CNGG (SEQ ID NO:83)	1	1	1	24	NA
CF59.CD 2.g10	CAAAATTCAAGTGCACAGC ANGG (SEQ ID NO:84)	1	1	1	33	NA
CF59.CD 2.g16	GAATTTTGCACCTCAGGCTG GNGG (SEQ ID NO:85)	1	1	1	245	NA
CF59.CD 2.g4	GAATTAAACCTGTATCAAG ANGG (SEQ ID NO:86)	1	1	2	7	NA
CF59.CD 2.g5	AATTAAACCTGTATCAAGA TNGG (SEQ ID NO:87)	1	1	2	7	NA

[0453]	CF59.CD 2.g21	AGTTCCATTATTACCTCAC NGG (SEQ ID NO:88)	1	1	2	14	NA
	CF59.CD 2.g8	AGAGGGTCATCACACACA AGNGG (SEQ ID NO:89)	1	1	2	20	NA
	CF59.CD 2.g25	ATACAAGTCCAGGAGATCT TNGG (SEQ ID NO:90)	1	1	2	21	NA
	CF59.CD 2.g19	TCTTGATACAGGTTTAATTC NGG (SEQ ID NO:91)	1	1	2	25	NA
	CF59.CD 2.g3	CTGACCTGTGAGGTAATGA ANGG (SEQ ID NO:92)	1	1	2	29	NA
	CF59.CD 2.g7	ACATCTAAAACCTTCTCAG ANGG (SEQ ID NO:93)	1	1	2	41	NA
	CF59.CD 2.g9	GCAAAATTCAAGTGCACA GCNGG (SEQ ID NO:94)	1	1	2	46	NA
	CF59.CD 2.g24	GGTTGTGTTGATACAAGTC CNGG (SEQ ID NO:95)	1	1	3	8	NA
	CF59.CD 2.g18	ATCTTGATACAGGTTTAATT NGG (SEQ ID NO:96)	1	1	3	24	NA
	CF59.CD 2.g23	ATTCATTACCTCACAGGTC ANGG (SEQ ID NO:97)	1	1	3	35	NA
	CF59.CD 2.g6	AACATCTAAAACCTTCTCA GNGG (SEQ ID NO:98)	1	1	3	43	NA
	CF59.CD 2.g11	AGCAGGGAACAAAGTCAG CANGG (SEQ ID NO:99)	1	1	3	45	NA
	CF59.CD 2.g2	CAACACAACCCTGACCTGT GNGG (SEQ ID NO:100)	1	1	3	47	NA
	CF59.CD 2.g15	CTTGAATTTTGCACCTCAGG CNGG (SEQ ID NO:101)	1	1	4	21	NA
	CF59.CD 2.g22	CATTCATTACCTCACAGGT CNGG (SEQ ID NO:102)	1	1	10	29	NA
	CF59.CD 2.g14	TGCACTTGAATTTTGCACCT CNGG (SEQ ID NO:103)	1	2	3	26	NA
	CF59.CD 2.g1	TCTCAAAACCAAAGATCTC CNGG (SEQ ID NO:104)	1	2	5	19	NA

[0454] 通过下一代测序(NGS)针对gRNA活性对表15和表16中的gRNA序列进行归一化(相对于NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA: CF58.CD2.g1(41.2%)、CF58.CD2.g23(13.2%)、CF59.CD2.g20(26.6%)、CF59.CD2.g13(66.2%)、CF59.CD2.g17(17.5%)。归一化的NHEJ频率等于或大于15%的指导RNA(gRNA)是细胞系和动物模型创建项目的良好候选者。

[0455] 针对hCD3E进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。hCD3E的结果在表17中列出。

[0456] 表17.hCD3E的指导RNA(gRNA)脱靶分析

[0457]

名称	gRNA	long_0	long_1	long_2	long_3	short_0	SNP
MS1044. CD3E.sp 2	TTGACATGCCCTCAGT ATCCNGG (SEQ ID NO:105)	1	1	1	21	73	NA
MS1044. CD3E.sp 17	CTGGATTACCTCTTGCC CTCNGG (SEQ ID NO:106)	1	1	1	24	114	NA
MS1044. CD3E.sp 28	GAGATGGAGACTTIA TATGCNGG (SEQ ID NO:107)	1	1	1	30	44	NA
MS1044. CD3E.sp 29	AGATGGAGACTTTATAT GCTNGG (SEQ ID NO:108)	1	1	1	33	55	NA
MS1044. CD3E.sp 26	AGGGCATGTCAATATT ACTGNGG (SEQ ID NO:109)	1	1	1	23	60	NA
MS1044. CD3E.sp 30	GATGGAGACTTTATATG CTGNGG (SEQ ID NO:110)	1	1	2	26	64	NA
MS1044. CD3E.sp 12	TATTATGTCTGCTACC CCAGNGG (SEQ ID NO:111)	1	1	2	20	61	NA
MS1044. CD3E.sp 23	TGCCATAGTATTTCAGA TCCNGG (SEQ ID NO:112)	1	1	2	21	55	NA
MS1044. CD3E.sp 18	AGATAAAAGTTCGCAT CTTCNGG (SEQ ID NO:113)	1	1	2	33	6	NA
MS1044. CD3E.sp 22	CTGAAAATTCCTTCAG TGACNGG (SEQ ID NO:114)	1	1	2	44	60	NA
MS1044. CD3E.sp 16	CTGAGGGCAAGAGGT AATCCNGG (SEQ ID NO:115)	1	1	3	30	41	NA
MS1044. CD3E.sp 25	TTTCAGATCCAGGATA CTGANGG (SEQ ID NO:116)	1	1	3	38	63	NA

[0458]

MS1044. CD3E.sp 15	TATCTCTACCTGAGGG CAAGNGG (SEQ ID NO:117)	1	1	3	22	134	NA
MS1044. CD3E.sp 9	TGAGGATCACCTGTCA CTGANGG (SEQ ID NO:118)	1	1	3	44	54	NA

[0459] 通过下一代测序(NGS)针对gRNA活性对表17中的gRNA序列进行归一化(相对于

NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA: MS1044.CD3E.sp28(>15%) 和MS1044.CD3E.sp12(>15%)。归一化的NHEJ频率等于或大于15%的指导RNA(gRNA)是细胞系和动物模型创建项目的良好候选者。

[0460] 针对hCD5的3个外显子(外显子3、外显子4和外显子5)进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。结果在表18(对于外显子3)、表19(对于外显子4)和表20(对于外显子5)中列出。

[0461] 表18.hCD5(外显子3)的指导RNA(gRNA)脱靶分析

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
SP597.CD 5.g22	AATCATCTGCTACGGACAA CNGG (SEQ ID NO:119)	1	1	1	1	NA
SP597.CD 5.g39	GCAGACTTTTGACGCTTG ACNGG (SEQ ID NO:120)	1	1	1	1	NA
SP597.CD 5.g1	CCGTTCCAACCTCGAAGTGC CNGG (SEQ ID NO:121)	1	1	1	2	NA
SP597.CD 5.g2	CGTTCCAACCTCGAAGTGC CANGG (SEQ ID NO:122)	1	1	1	2	NA
SP597.CD 5.g50	CTGGCACTTCGAGTTGGAA CNGG (SEQ ID NO:123)	1	1	1	2	NA
SP597.CD 5.g17	GTCTGCCAGCGGCTGAACT GNGG (SEQ ID NO:124)	1	1	1	3	NA
SP597.CD 5.g23	ATCATCTGCTACGGACAAC TNGG (SEQ ID NO:125)	1	1	1	3	NA
SP597.CD 5.g41	AGACTTTTGACGCTTGACTG TNGG (SEQ ID NO:126)	1	1	1	3	NA
SP597.CD 5.g40	CAGACTTTTGACGCTTGACT TNGG (SEQ ID NO:127)	1	1	1	5	NA

[0463]

SP597.CD 5.g49	CCTGGCACTTCGAGTTGGA ANGG (SEQ ID NO:128)	1	1	1	5	NA
SP597.CD 5.g38	GCACCCACAGTTCAGCCG CNGG (SEQ ID NO:129)	1	1	1	8	NA
SP597.CD 5.g46	CCTTGAGGTAGACCTCCA GCNGG (SEQ ID NO:130)	1	1	1	9	NA
SP597.CD 5.g7	AGGTCTACCTCAAGGACGG ANGG (SEQ ID NO:131)	1	1	1	11	NA
SP597.CD 5.g51	TGGAACGGGTGAGCCTTGC CNGG (SEQ ID NO:132)	1	1	1	13	NA
SP597.CD 5.g20	TGTGGGGTGCCCTTAAGCCT NGG (SEQ ID NO:133)	1	1	1	19	NA
SP597.CD 5.g16	AAGCGTCAAAAGTCTGCCA GNGG (SEQ ID NO:134)	1	1	1	20	NA
SP597.CD 5.g29	TAGCAGATGATTGAGCTCTG NGG (SEQ ID NO:135)	1	1	1	25	NA
SP597.CD 5.g30	GATTGAGCTCTGAGGTGTGT NGG (SEQ ID NO:136)	1	1	1	33	NA
SP597.CD 5.g13	GGGGCCGGAGCTCCAAGCA GNGG (SEQ ID NO:137)	1	1	1	42	NA
SP597.CD 5.g33	GGTGTGTAGGTGACAAGGA ANGG (SEQ ID NO:138)	1	1	1	48	NA
SP597.CD 5.g15	CCGGAGCTCCAAGCAGTGG GNGG (SEQ ID NO:139)	1	1	1	58	NA
SP597.CD 5.g47	GGTAGACCTCCAGCTGGCC CNGG (SEQ ID NO:140)	1	1	1	78	NA
SP597.CD 5.g3	CTCGAAGTGCCAGGGCCAG CNGG (SEQ ID NO:141)	1	1	1	121	NA
SP597.CD 5.g48	CTGGCCCTGGCACTTCGAG TNGG (SEQ ID NO:142)	1	1	2	1	NA
SP597.CD 5.g18	TCTGCCAGCGGCTGAACTG TNGG (SEQ ID NO:143)	1	1	2	5	NA
SP597.CD 5.g45	CCATGTGCCATCCGTCCTTG NGG (SEQ ID NO:144)	1	1	2	5	NA
SP597.CD 5.g5	CCAGCTGGAGGTCTACCTC ANGG (SEQ ID NO:145)	1	1	2	14	NA
SP597.CD 5.g31	TCTGAGGTGTGTAGGTGAC ANGG (SEQ ID NO:146)	1	1	2	18	NA
SP597.CD 5.g37	AGGAAGGGGCCAAGGCTTA ANGG (SEQ ID NO:147)	1	1	2	18	NA
SP597.CD 5.g21	CAGAGCTCAATCATCTGCTA NGG (SEQ ID NO:148)	1	1	2	19	NA
SP597.CD 5.g14	GGGCCGGAGCTCCAAGCAG TNGG (SEQ ID NO:149)	1	1	2	23	NA

[0464]

SP597.CD 5.g43	CCTCCCACTGCTTGGAGCTC NGG (SEQ ID NO:150)	1	1	2	30	NA
SP597.CD 5.g44	TGGAGCTCCGGCCCCAGCT CNGG (SEQ ID NO:151)	1	1	2	38	NA
SP597.CD 5.g34	GTGTGTAGGTGACAAGGAA GNGG (SEQ ID NO:152)	1	1	2	48	NA
SP597.CD 5.g11	ATGGTTTGCAGCCAGAGCT GNGG (SEQ ID NO:153)	1	1	2	108	NA
SP597.CD 5.g6	CTGGAGGTCTACCTCAAGG ANGG (SEQ ID NO:154)	1	1	3	16	NA
SP597.CD 5.g19	CTGCCAGCGGCTGAACTGT GNGG (SEQ ID NO:155)	1	1	3	25	NA
SP597.CD 5.g25	AATGACATGTGTCACTCTCT NGG (SEQ ID NO:156)	1	1	3	25	NA
SP597.CD 5.g9	ACATGGTTTGCAGCCAGAG CNGG (SEQ ID NO:157)	1	1	3	30	NA
SP597.CD 5.g10	CATGGTTTGCAGCCAGAGC TNGG (SEQ ID NO:158)	1	1	3	52	NA
SP597.CD 5.g26	GACACATGTCTATTCTGCTG NGG (SEQ ID NO:159)	1	1	3	53	NA
SP597.CD 5.g42	ACTGGGGTCCTCCCACTGCT NGG (SEQ ID NO:160)	1	1	3	91	NA
SP597.CD 5.g8	CCTCAAGGACGGATGGCAC ANGG (SEQ ID NO:161)	1	1	4	5	NA
SP597.CD 5.g32	AGGTGTGTAGGTGACAAGG ANGG (SEQ ID NO:162)	1	1	4	49	NA
SP597.CD 5.g36	AAGGAAGGGGCCAAGGCTT ANGG (SEQ ID NO:163)	1	1	5	16	NA
SP597.CD 5.g4	GAAGTGCCAGGGCCAGCTG GNGG (SEQ ID NO:164)	1	1	5	93	NA
SP597.CD 5.g12	TTTGCAGCCAGAGCTGGGG CNGG (SEQ ID NO:165)	1	1	8	257	NA
SP597.CD 5.g24	AAATGACATGTGTCACTCTC NGG (SEQ ID NO:166)	1	1	10	33	NA
SP597.CD 5.g35	AGGTGACAAGGAAGGGGCC ANGG (SEQ ID NO:167)	1	1	10	202	NA
SP597.CD 5.g27	ATTTCTGCTGTGGCTGCAGT NGG (SEQ ID NO:168)	1	2	4	70	NA
SP597.CD 5.g28	GCTGTGGCTGCAGTTGGAG ANGG (SEQ ID NO:169)	1	2	19	49	NA

[0465] 表19.hCD5 (外显子4) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0466]

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
SP598.CD 5.g10	GGCGGGGGCCTTGTCTGTT GGNGG (SEQ ID NO:170)	1	1	1	1	NA
SP598.CD 5.g7	CTCTGGAGTTGTGGTGGG CGNGG (SEQ ID NO:171)	1	1	1	16	NA
SP598.CD 5.g8	TCTGGAGTTGTGGTGGGCG GNGG (SEQ ID NO:172)	1	1	1	40	NA
SP598.CD 5.g12	CGTTGGAGGTGTTGTCTTCT NGG (SEQ ID NO:173)	1	1	1	46	NA
SP598.CD 5.g1	AGACAACACCTCCAACGAC ANGG (SEQ ID NO:174)	1	1	2	2	NA
SP598.CD 5.g9	GTGGGCGGGGGCCTTGTCTG TNGG (SEQ ID NO:175)	1	1	2	5	NA
SP598.CD 5.g11	TCGTTGGAGGTGTTGTCTTC NGG (SEQ ID NO:176)	1	1	2	13	NA
SP598.CD 5.g2	ACCACAACCTCCAGAGCCCA CNGG (SEQ ID NO:177)	1	1	2	60	NA
SP598.CD 5.g6	GCTCTGGAGTTGTGGTGGG CNGG (SEQ ID NO:178)	1	1	4	74	NA
SP598.CD 5.g4	GTGGGCTCTGGAGTTGTGG TNGG (SEQ ID NO:179)	1	1	6	35	NA
SP598.CD 5.g3	TGTGGGCTCTGGAGTTGTG GNGG (SEQ ID NO:180)	1	1	8	54	NA
SP598.CD 5.g13	GTTGGAGGTGTTGTCTTCTG NGG (SEQ ID NO:181)	1	2	2	48	NA
SP598.CD 5.g5	GGCTCTGGAGTTGTGGTGG GNGG (SEQ ID NO:182)	1	3	9	51	NA

[0467] 表20.hCD5 (外显子5) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0468]

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
SP599.CD 5.g58	CATAGCTGATGGTACC CCCCNGG (SEQ ID NO:183)	1	1	1	1	NA
SP599.CD 5.g5	CGGCCAGCACTGTGCC GGCGNGG (SEQ ID NO:184)	1	1	1	2	NA
SP599.CD 5.g30	CAAGAACTCGGCCACT TTTCNGG (SEQ ID NO:185)	1	1	1	6	NA
SP599.CD 5.g44	GGTGTTCCTCGTGGCTCC CCTNGG (SEQ ID NO:186)	1	1	1	11	rs224100 2:0.158

[0469]

SP599.CD 5.g6	CCAGCACTGTGCCGGCG TGGNGG (SEQ ID NO:187)	1	1	1	13	NA
SP599.CD 5.g42	GGCAAGGGCTGGTGTT CCCGNGG (SEQ ID NO:188)	1	1	1	13	NA
SP599.CD 5.g7	GGCGTGGTGGAGTTCTA CAGNGG (SEQ ID NO:189)	1	1	1	14	NA
SP599.CD 5.g60	CCACCACGCCGGCACAG TGCNGG (SEQ ID NO:190)	1	1	1	15	NA
SP599.CD 5.g8	GGAGTTCTACAGCGGCA GCCNGG (SEQ ID NO:191)	1	1	1	17	NA
SP599.CD 5.g11	GTTCTACAGCGGCAGCC TGGNGG (SEQ ID NO:192)	1	1	1	18	NA
SP599.CD 5.g25	ACCAGCCCTTGCCAATC CAANGG (SEQ ID NO:193)	1	1	1	20	NA
SP599.CD 5.g10	AGTTCTACAGCGGCAGC CTGNGG (SEQ ID NO:194)	1	1	1	24	NA
SP599.CD 5.g55	CCAGGTCCTGGGTCTTG TCCNGG (SEQ ID NO:195)	1	1	1	25	NA
SP599.CD 5.g43	TGGTGTTCCCGTGGCTC CCCNGG (SEQ ID NO:196)	1	1	1	25	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g9	GAGTTCTACAGCGGCAG CCTNGG (SEQ ID NO:197)	1	1	1	26	NA
SP599.CD 5.g26	GAACTCAAGCTGTACCT CCCNGG (SEQ ID NO:198)	1	1	1	29	NA
SP599.CD 5.g31	AAGAACTCGGCCACTTT TCTNGG (SEQ ID NO:199)	1	1	1	29	NA
SP599.CD 5.g41	TCCATTGGATTGGCAAG GGCNGG (SEQ ID NO:200)	1	1	1	32	NA
SP599.CD 5.g12	TTCTACAGCGGCAGCCT GGGNGG (SEQ ID NO:201)	1	1	1	33	NA
SP599.CD 5.g32	AGAACTCGGCCACTTTT CTGNGG (SEQ ID NO:202)	1	1	1	37	NA
SP599.CD 5.g49	GCTTCAAGAAGGAGCCA CACNGG (SEQ ID NO:203)	1	1	1	48	NA
SP599.CD 5.g39	GATCTTCCATTGGATTGG CANGG (SEQ ID NO:204)	1	1	2	7	NA
SP599.CD 5.g59	GCTGTAGAACTCCACCA CGCNGG (SEQ ID NO:205)	1	1	2	11	NA
SP599.CD 5.g57	GTCCTGGGCCTCATAGCT GANGG (SEQ ID NO:206)	1	1	2	13	NA
SP599.CD 5.g14	TACCATCAGCTATGAGGC CCNGG (SEQ ID NO:207)	1	1	2	14	NA
SP599.CD 5.g13	GGGGGGTACCATCAGCT ATGNGG (SEQ ID NO:208)	1	1	2	16	NA

[0470]

SP599.CD 5.g35	CCTGAAGCAATGCTCCA GGGNGG (SEQ ID NO:209)	1	1	2	18	NA
SP599.CD 5.g33	TTTTCCTGAAGCAATGCT CCNGG (SEQ ID NO:210)	1	1	2	24	NA
SP599.CD 5.g48	CTCTGGCAGATGCTTCA AGANGG (SEQ ID NO:211)	1	1	2	25	NA
SP599.CD 5.g53	AGAGGAAGTTCTCCAGG TCCNGG (SEQ ID NO:212)	1	1	2	53	NA
SP599.CD 5.g4	TCTGGCGGCCAGCACTG TGCNGG (SEQ ID NO:213)	1	1	2	166	NA
SP599.CD 5.g37	TTGAGTTCTGGATCTTCC ATNGG (SEQ ID NO:214)	1	1	3	9	NA
SP599.CD 5.g38	TTCTGGATCTTCCATTGG ATNGG (SEQ ID NO:215)	1	1	3	13	NA
SP599.CD 5.g40	ATCTTCCATTGGATTGGC AANGG (SEQ ID NO:216)	1	1	3	18	NA
SP599.CD 5.g50	TCAAGAAGGAGCCACAC TGGNGG (SEQ ID NO:217)	1	1	3	31	NA
SP599.CD 5.g36	GGGAGGTACAGCTTGAG TTCNGG (SEQ ID NO:218)	1	1	3	37	NA
SP599.CD 5.g45	CCCGTGGCTCCCCTGGG TCTNGG (SEQ ID NO:219)	1	1	3	43	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g16	CCAGGACAAGACCCAGG ACCNGG (SEQ ID NO:220)	1	1	3	57	NA
SP599.CD 5.g17	CTCTGCAACAACCTCCA GTGNGG (SEQ ID NO:221)	1	1	3	67	NA
SP599.CD 5.g52	TGTTGCAGAGGAAGTTC TCCNGG (SEQ ID NO:222)	1	1	3	236	NA
SP599.CD 5.g56	CAGGTCCTGGGTCTTGT CCTNGG (SEQ ID NO:223)	1	1	4	24	NA
SP599.CD 5.g15	TGAGGCCCAGGACAAGA CCCNGG (SEQ ID NO:224)	1	1	4	30	NA
SP599.CD 5.g61	CTGTGCCACCAGCTGCA GCCNGG (SEQ ID NO:225)	1	1	4	133	NA
SP599.CD 5.g62	TGTGCCACCAGCTGCAG CCTNGG (SEQ ID NO:226)	1	1	4	139	NA
SP599.CD 5.g19	CATCTGCCAGAGACTGA GGCNGG (SEQ ID NO:227)	1	1	4	1253	NA
SP599.CD 5.g2	CTGCAGCTGGTGGCACA GTCNGG (SEQ ID NO:228)	1	1	5	17	NA
SP599.CD 5.g51	CACACTGGAGGTTGTTG CAGNGG (SEQ ID NO:229)	1	1	5	28	NA
SP599.CD 5.g3	CAGCTGGTGGCACAGTC TGGNGG (SEQ ID NO:230)	1	1	5	31	NA

[0471]

SP599.CD 5.g29	AGCAAAGGAGGGCAAG AACTNGG (SEQ ID NO:231)	1	1	6	53	NA
SP599.CD 5.g54	GAGGAAGTTCTCCAGGT CCTNGG (SEQ ID NO:232)	1	1	6	53	NA
SP599.CD 5.g63	GCCACCAGCTGCAGCCT GGGNGG (SEQ ID NO:233)	1	1	6	287	NA
SP599.CD 5.g20	GCAGGCAGAGCCCAAG ACCCNGG (SEQ ID NO:234)	1	1	7	40	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g21	CAGGCAGAGCCCAAGAC CCANGG (SEQ ID NO:235)	1	1	8	45	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g1	TCCTCCCAGGCTGCAGC TGGNGG (SEQ ID NO:236)	1	1	8	140	NA
SP599.CD 5.g47	GCTCTGCCTGCCTCAGT CTCNGG (SEQ ID NO:237)	1	1	26	412	NA
SP599.CD 5.g27	CCTCCCTGGAGCATTGCT TCNGG (SEQ ID NO:238)	1	2	3	22	NA
SP599.CD 5.g34	TTTCCTGAAGCAATGCTC CANGG (SEQ ID NO:239)	1	2	4	32	NA
SP599.CD 5.g46	CCGTGGCTCCCCTGGGT CTTNGG (SEQ ID NO:240)	1	2	5	37	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g28	AAAATCAAGCCCCAGAA AAGNGG (SEQ ID NO:241)	1	2	5	60	NA
SP599.CD 5.g18	GAAGCATCTGCCAGAGA CTGNGG (SEQ ID NO:242)	1	2	7	98	NA
SP599.CD 5.g24	CCAAGACCCAGGGGAGC CACNGG (SEQ ID NO:243)	1	2	8	56	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g22	AGGCAGAGCCCAAGACC CAGNGG (SEQ ID NO:244)	1	2	10	41	rs224100 2:0.158
SP599.CD 5.g23	CCCAAGACCCAGGGGAG CCANGG (SEQ ID NO:245)	1	2	10	99	rs224100 2:0.158

[0472] 通过下一代测序(NGS)针对gRNA活性对表18、表19和表20中的gRNA序列进行归一化(相对于NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA:外显子3:SP597.hCD5.g2(76.5%)、SP597.hCD5.g22(36.3%)、SP597.hCD5.g39(16.0%)、SP597.hCD5.g46。外显子4:SP598.hCD5.g7、SP598.hCD5.g10(58.5%)。外显子5:SP599.hCD5.g5(51.0%)、SP599.hCD5.g30、SP599.hCD5.g42、SP599.hCD5.g58(41.0%)

[0473] 针对hCSF2进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。hCSF2的结果在表21中列出。

[0474] 表21.hCSF2的指导RNA(gRNA)脱靶分析

[0475]

名称	gRNA	long 0	long 1	long 2	long 3	short 0	SNP
MS1086. CSF2.sp8	TACTCAGGTTTCAGG AGACGCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	10	11	NA
MS1086. CSF2.sp1 0	TCAGGAGACGCCG GGCCTCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	20	38	NA
MS1086.C SF2.sp9	ACTCAGGTTTCAGGA GACGCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	20	16	NA
MS1086.C SF2.sp7	CAGTGTCTCTACTCA GGTTCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	22	29	NA
MS1086.C SF2.sp14	ATGCTCCCAGGGCTG CGTGCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	42	34	rs20 6962 2
MS1086.C SF2.sp11	GAGACGCCGGGCCT CCTGGANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	26	146	NA
MS1086.C SF2.sp6	CAGCAGCAGTGTCTC TACTCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	39	24	NA
MS1086.C SF2.sp12	GATGGCATTACATG CTCCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	28	59	NA
MS1086.C SF2.sp2	GGAGCATGTGAATGC CATCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	26	48	NA
MS1086.C SF2.sp5	TAGAGACACTGCTGC TGAGANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	56	168	NA
MS1086.C SF2.sp3	GCATGTGAATGCCAT CCAGGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	41	56	NA
MS1086.C SF2.sp13	ATGGCATTACATGC TCCCANGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	30	80	NA
MS1086.C SF2.sp4	TGAATGCCATCCAGG AGGCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	65	180	NA

[0476]

MS1086.C SF2.sp15	TGCTCCCAGGGCTGC GTGCTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	57	29	rs20 6962 2
MS1086.C SF2.sp1	CAGCCCCAGCACGC AGCCCTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	15	146	41	rs20 6962 2
MS1086.C SF2.sp16	GCTCCCAGGGCTGCG TGCTGNGG (SEQ ID NO:)	1	2	9	85	37	rs20 6962 2

[0477] 通过下一代测序 (NGS) 针对gRNA活性对表21中的gRNA序列进行归一化 (相对于 NHEJ的 % 归一化)。GFP用作对照。在测序分析后, 基于脱靶谱, 推荐以下gRNA: MS1086.CSF2.sp8 (>15%) 和MS1086.CSF2.sp10 (>15%)。

[0478] 针对hCTLA4的2个外显子 (外显子1和外显子2) 进行选定gRNA的脱靶分析, 以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量, 其可包括靶位点。hCTLA4的结果在表22 (对于外显子1) 和表23 (对于外显子2) 中列出。

[0479] 表22.hCTLA4 (外显子1) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0480]

名称	gRNA	long_0	long_1	long_2	short_0	SNP
SP621.C TLA4.g2	CCTTGGATTTCAGCGG CACANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
SP621.C TLA4.g1 2	CCTTGTGCCGCTGAAA TCCANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
SP621.CT LA4.g5	TGAACCTGGCTACCAGG ACCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	11	rs2317 75:0.4 52
SP621.CT LA4.g11	AGGGCCAGGTCCTGGTA GCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	16	rs2317 75:0.4 52
SP621.CT LA4.g4	CTCAGCTGAACCTGGCT ACCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	17	rs2317 75:0.4 52
SP621.CT LA4.g8	AGAAAAAACAGGAGAG TGCANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	39	NA
SP621.CT LA4.g3	GCACAAGGCTCAGCTGA ACCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	29	NA

[0481]

SP621.CT LA4.g1	TGGCTTGCCTTGGATTTC AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	33	NA
SP621.CT LA4.g9	AAACAGGAGAGTGCAG GGCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	69	NA
SP621.CT LA4.g10	GAGAGTGCAGGGCCAG GTCCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	7	50	NA
SP621.CT LA4.g6	GGATGAAGAGAAGAAA AAACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	8	173	NA
SP621.CT LA4.g7	AAGAAAAAACAGGAGA GTGCNGG (SEQ ID NO:)	1	2	8	33	NA

[0482]

表23.hCTLA4 (外显子2) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0483]

名称	gRNA	long_ 0	long_ 1	long_ 2	short_ 0	SNP
SP622. CTLA4. g9	CCGGGTGACAGTGCTTCG GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	2	NA
SP622. CTLA4. g33	ACACAAAGCTGGCGATGC CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	4	NA
SP622.C TLA4.g 21	CCCTCAGTCCTTGGATAGTG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
SP622.C TLA4.g 14	GTGCGGCAACCTACATGATG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	9	NA
SP622.C TLA4.g 12	CTGTGCGGCAACCTACATGA NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	13	NA
SP622. CTLA4. g2	GGCCCAGCCTGCTGTGGT ACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	17	NA
SP622.C TLA4.g 23	GTTCACTTGATTTCCTACTGG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	17	NA
SP622.C TLA4.g 27	CAACTCATTCCCCATCATGT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	18	NA
SP622.C TLA4.g 28	CCGCACAGACTTCAGTCACC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	20	NA
SP622.C TLA4.g 13	TGTGCGGCAACCTACATGAT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	30	NA
SP622.C TLA4.g 20	CCTCACTATCCAAGGACTGA NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	30	NA

[0484]

SP622.C TLA4.g 31	CGGACCTCAGTGGCTTTGCC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	34	NA
SP622.C TLA4.g 22	GAGGTTCACCTGATTTCCAC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	40	NA
SP622.C TLA4.g 11	CCAGGTGACTGAAGTCTGTG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	45	NA
SP622.C TLA4.g 24	ACTGGAGGTGCCCCGTGCAG ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	15	NA
SP622.C TLA4.g 18	CAAGTGAACCTCACTATCCA NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	16	NA
SP622.C TLA4.g 3	GTGGTACTGGCCAGCAGCCG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	29	NA
SP622.C TLA4.g 8	AGGTCCGGGTGACAGTGCTT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	29	NA
SP622.C TLA4.g 17	ATCTGCACGGGCACCTCCAG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	29	NA
SP622.C TLA4.g 25	CCGTGCAGATGGAATCATCT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	36	NA
SP622.C TLA4.g 16	CTAGATGATTCCATCTGCAC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	39	NA
SP622.C TLA4.g 19	ACCTCACTATCCAAGGACTG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	40	NA
SP622.C TLA4.g 29	CCTGCCGAAGCACTGTCACC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	47	NA
SP622.C TLA4.g 36	TGGCCAGTACCACAGCAGG CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	74	NA
SP622.C TLA4.g 5	ATCTCCAGGCAAAGCCACTG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	80	NA
SP622.C TLA4.g 1	GCACGTGGCCCAGCCTGCTG NGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	121	NA
SP622.C TLA4.g 4	GTGTGTGAGTATGCATCTCC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	8	NA
SP622.C	CACTGTCACCCGGACCTCAG	1	1	3	9	NA

[0485]	TLA4.g 30	NGG (SEQ ID NO:)					
	SP622.C TLA4.g 34	GCTGGCGATGCCTCGGCTGC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	17	NA
	SP622.C TLA4.g 35	CTGCTGGCCAGTACCACAGC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	22	NA
	SP622.C TLA4.g 7	AGGCAAAGCCACTGAGGTC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	40	NA
	SP622.C TLA4.g 26	GCAGATGGAATCATCTAGGA NGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	20	NA
	SP622.C TLA4.g 15	CCTAGATGATTCCATCTGCA NGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	40	NA
	SP622.C TLA4.g 37	GGCCAGTACCACAGCAGGC TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	65	NA
	SP622.C TLA4.g 32	TGCATACTCACACACAAAGC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	7	71	NA
	SP622.C TLA4.g 10	GCTTCGGCAGGCTGACAGC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	8	58	NA
	SP622.C TLA4.g 6	CAGGCAAAGCCACTGAGGT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	11	30	NA

[0486] 通过下一代测序 (NGS) 针对gRNA活性对表22和表23中的gRNA序列进行归一化 (相对于NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA:外显子1: SP621.hCTLA4.g2 (>15%) 和SP621.hCTLA4.g12 (>15%)。外显子2: SP622.hCTLA4.g2 (>15%)、SP622.hCTLA4.g9 (>15%) 和SP622.hCTLA4.g33 (>15%)。

[0487] 针对hPDCD1的2个外显子 (CF60和CF61) 进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。结果在表24 (对于外显子CF60) 和表25 (对于外显子CF61) 中列出。

[0488] 表24.hPDCD1 (外显子CF60) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0489]

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
CF60.PD CD1.g12	TGTAGCACCGCCCAGACG ACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	1	NA
CF60.PD CD1.g3	GGCGCCCTGGCCAGTCGT CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	3	NA
CF60.PDC D1.g5	CGTCTGGGCGGTGCTACAA CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	3	NA
CF60.PDC D1.g2	AGGCGCCCTGGCCAGTCGT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
CF60.PDC D1.g13	CACCGCCCAGACGACTGGC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
CF60.PDC D1.g14	ACCGCCCAGACGACTGGCC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
CF60.PDC D1.g7	GGGCGGTGCTACAACTGGG CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	7	NA
CF60.PDC D1.g6	GTCTGGGCGGTGCTACAAC TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	9	NA
CF60.PDC D1.g16	CGACTGGCCAGGGCGCCTG TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	15	NA
CF60.PDC D1.g8	CGGTGCTACAACTGGGCTG GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	33	NA
CF60.PDC D1.g11	TGGCGGCCAGGATGGTTCTT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	33	NA
CF60.PDC D1.g15	ACGACTGGCCAGGGCGCCT GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	45	NA
CF60.PDC D1.g9	CTACAACTGGGCTGGCGGC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	57	NA
CF60.PDC D1.g4	GCCCTGGCCAGTCGTCTGG GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	2	NA
CF60.PDC D1.g1	TGCAGATCCCACAGGCGCC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	23	NA
CF60.PDC D1.g10	AACTGGGCTGGCGGCCAGG ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	17	NA

[0490] 表25.hPDCD1 (CF61) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0491]

名称	gRNA	long _0	long _1	long _2	short _0	SNP
CF61.PDC D1.g6	CGGAGAGCTTCGTGCTA AACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	1	NA
CF61.PDC	GCGTGACTTCCACATGAG	1	1	1	2	NA

[0492]

D1.g14	CGNGG (SEQ ID NO:)					
CF61.PDC D1.g17	ATGTGGAAGTCACGCCCG TTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	2	NA
CF61.PDC D1.g2	GCCCTGCTCGTGGTGAC CGANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	3	NA
CF61.PDC D1.g35	CACGAAGCTCTCCGATG TGTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	3	NA
CF61.PDC D1.g4	CCTGCTCGTGGTGACCGA AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	4	NA
CF61.PDC D1.g20	TGACACGGAAGCGGCAGT CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
CF61.PDC D1.g40	CCCCTTCGGTCACCACGA GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	5	NA
CF61.PDC D1.g8	CAGCAACCAGACGGACAA GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	6	NA
CF61.PDC D1.g19	GCAGTTGTGTGACACGGA AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	6	NA
CF61.PDC D1.g41	CCCTTCGGTCACCACGAG CANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	6	NA
CF61.PDC D1.g26	CCGGGCTGGCTGCGGTCC TCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
CF61.PDC D1.g30	AGGCGGCCAGCTTGTCGG TCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
CF61.PDC D1.g31	CAGCTTGTCCTGCTGGTTG CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
CF61.PDC D1.g43	CGGTCACCACGAGCAGGG CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	10	NA
CF61.PDC D1.g13	GTGTCACACAACTGCCCA ACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	13	NA
CF61.PDC D1.g5	CTGCAGCTTCTCCAACACA TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	23	NA
CF61.PDC D1.g9	CAAGCTGGCCGCCTTCCC CGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	23	NA
CF61.PDC D1.g12	CGTGTCACACAACTGCCC AANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	28	NA
CF61.PDC D1.g18	CGTTGGGCAGTTGTGTGA CANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	32	NA
CF61.PDC D1.g33	GCTTGTCCTGCTGGTTGCT GNNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	41	NA
CF61.PDC D1.g22	CGGAAGCGGCAGTCCTGG CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	61	NA
CF61.PDC D1.g36	CGATGTGTTGGAGAAGCT GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	135	NA
CF61.PDC D1.g16	CATGTGGAAGTCACGCC GTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	2	NA
CF61.PDC D1.g3	CCCTGCTCGTGGTGACCG AANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	3	NA
CF61.PDC D1.g27	CGGGCTGGCTGCGGTCCT CGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	3	NA

[0493]

CF61.PDC D1.g32	AGCTTGTCCTGCTGGTTGC TNNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	4	NA
CF61.PDC D1.g39	GAAGGTGGCGTTGTCCCC TTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	4	NA
CF61.PDC D1.g15	ACTTCCACATGAGCGTGG TCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	6	NA
CF61.PDC D1.g25	GCCGGGCTGGCTGCGGTC CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	17	NA
CF61.PDC D1.g42	TCGGTCACCACGAGCAGG GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	23	NA
CF61.PDC D1.g34	TCTGGTTGCTGGGGCTCAT GNNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	31	NA
CF61.PDC D1.g21	ACGGAAGCGGCAGTCCTG GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	41	NA
CF61.PDC D1.g10	CCCGAGGACCGCAGCCAG CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	46	NA
CF61.PDC D1.g28	CTGGCTGCGGTCCTCGGG GANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	16	NA
CF61.PDC D1.g7	CATGAGCCCCAGCAACCA GANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	33	NA
CF61.PDC D1.g24	AGTCCTGGCCGGGCTGGC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	42	NA
CF61.PDC D1.g55	GGGGGTTCCAGGGCCTGT CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	126	NA
CF61.PDC D1.g44	GGTCACCACGAGCAGGGC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	26	NA
CF61.PDC D1.g29	GCTGCGGTCCTCGGGGAA GGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	35	NA
CF61.PDC D1.g11	GGACCGCAGCCAGCCCGG CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	47	NA
CF61.PDC D1.g53	GAGAAGGTGGGGGGGTTC CANGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	8	NA
CF61.PDC D1.g52	GGAGAAGGTGGGGGGGTT CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	15	NA
CF61.PDC D1.g23	AGCGGCAGTCCTGGCCGG GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	39	NA
CF61.PDC D1.g56	GGGGTTCCAGGGCCTGTC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	97	NA
CF61.PDC D1.g1	CTTCTCCCCAGCCCTGCTC GNNGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	22	NA
CF61.PDC D1.g37	GTTGGAGAAGCTGCAGGT GANGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	88	NA
CF61.PDC D1.g54	GGGGGTTCCAGGGCCTG TCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	6	1286	NA
CF61.PDC D1.g38	GGAGAAGCTGCAGGTGAA GGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	9	66	NA
CF61.PDC D1.g45	CACGAGCAGGGCTGGGGA GANGG (SEQ ID NO:)	1	1	10	448	NA
CF61.PDC	GCAGGGCTGGGGAGAAG	1	1	21	125	NA

[0494]

D1.g48	GTGNGG (SEQ ID NO:)					
CF61.PDC D1.g49	CAGGGCTGGGGAGAAGGT GGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	29	214	NA
CF61.PDC D1.g46	GAGCAGGGCTGGGGAGA AGGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	30	202	NA
CF61.PDC D1.g47	AGCAGGGCTGGGGAGAA GGTNGG (SEQ ID NO:)	1	2	11	136	NA
CF61.PDC D1.g50	AGGGCTGGGGAGAAGGTG GGNGG (SEQ ID NO:)	1	2	31	179	NA
CF61.PDC D1.g51	GGGCTGGGGAGAAGGTGG GGNGG (SEQ ID NO:)	1	2	49	130	NA

[0495] 通过下一代测序(NGS)针对gRNA活性对表24和表25中的gRNA序列进行归一化(相对于NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA: CF60.PDCD1.g12(65.6%)、CF60.PDCD1.g3(69.2%)、CF61.PDCD1.g6、CF61.PDCD1.g2(72.7%)和CF61.PDCD1.g35(24.0%)。

[0496] 针对hTIM3的2个外显子(外显子2和外显子3)进行选定gRNA的脱靶分析,以确定人基因组中为精确匹配或包含最多至1或2个错配的位点的数量,其可包括靶位点。结果在表26(对于外显子2)和表27(对于外显子3)中列出。

[0497] 表26.hTIM3(外显子2)的指导RNA(gRNA)脱靶分析

[0498]

名称	gRNA	long_ 0	long_ 1	long_ 2	short 0	SNP
SP619.T IM3.g2	AGAAGTGGGAATACAGAGC GGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	2	NA
SP619.T IM3.g12	AATGTGGCAACGTGGTG CTCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	3	NA
SP619.T IM3.g20	CTAAATGGGGATTCCG CAANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	4	NA
SP619.T IM3.g18	CATCCAGATACTGGCTAAA TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
SP619.T IM3.g41	CAGACGGGCACGAGGTTC CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
SP619.T IM3.g49	GCGGCTGGGGTGTAGAA GCANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
SP619.T IM3.g7	GAACCTCGTGCCCGTCTG CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	10	NA
SP619.T IM3.g43	GACGGGCACGAGGTTCCC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	10	NA

[0499]

SP619.T IM3.g35	ATCCCCATTTAGCCAGTAT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	11	NA
SP619.T IM3.g3	GTGGAATACAGAGCGGAG GTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	12	NA
SP619.T IM3.g42	AGACGGGCACGAGGTTCC CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	12	NA
SP619.T IM3.g6	GGAACCTCGTGCCCGTCT GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	13	NA
SP619.T IM3.g32	GAGTCACATTCTCTATGGT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	14	NA
SP619.T IM3.g22	ATGTGACTCTAGCAGACA GTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	16	NA
SP619.T IM3.g27	TTTTCATCATTCATTATGCC NGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	16	NA
SP619.T IM3.g21	AATGTGACTCTAGCAGAC AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	17	NA
SP619.T IM3.g19	ATCCAGATACTGGCTAAAT GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	18	NA
SP619.T IM3.g24	TGCTGCCGGATCCAAATCC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	22	NA
SP619.T IM3.g5	TCTACACCCCAGCCGCC CANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	30	NA
SP619.T IM3.g30	TTATGCCTGGGATTTGGAT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	35	NA
SP619.T IM3.g51	CGCTCTGTATTCCACTTCT GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	83	NA
SP619.T IM3.g47	GAGGTTCCCTGGGGCGGC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	85	NA
SP619.T IM3.g40	TGCCCCAGCAGACGGGCA CGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	5	NA
SP619.T IM3.g23	ACAGTGGGATCTACTGCT GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	8	NA
SP619.T IM3.g11	TGTGTTTGAATGTGGCAA CGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	9	NA
SP619.T IM3.g25	TGAAAAATTAACTGAA GTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	16	NA
SP619.T IM3.g17	ACATCCAGATACTGGCTAA ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	19	NA
SP619.T IM3.g15	ATGAAAGGGATGTGAATTA TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	22	NA
SP619.T IM3.g13	TGGTGCTCAGGACTGATG AANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	25	NA
SP619.T IM3.g50	GGTGTAGAAGCAGGGCAG ATNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	36	NA
SP619.T IM3.g36	ACGTTGCCACATTCAAAC ACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	37	NA
SP619.T IM3.g45	ACGAGGTTCCCTGGGGCG GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	40	NA
SP619.T	GCCTGTCCTGTGTTTGAAT	1	1	2	47	NA

[0500]

IM3.g10	GNGG (SEQ ID NO:)					
SP619.T IM3.g9	GTGCCCCGTCTGCTGGGGC AANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	58	NA
SP619.T IM3.g8	AACCTCGTGCCCGTCTGC TGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	15	NA
SP619.T IM3.g48	GGCGGCTGGGGTGTAGAA GCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	15	NA
SP619.T IM3.g33	AGTCACATTCTCTATGGTC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	19	NA
SP619.T IM3.g26	CTGGTTTGATGACCAACTT CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	21	NA
SP619.T IM3.g29	CATTCATTATGCCTGGGAT TNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	24	NA
SP619.T IM3.g31	TGCTAGAGTCACATTCTCT ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	49	NA
SP619.T IM3.g44	GGGCACGAGGTTCCCTGG GGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	53	NA
SP619.T IM3.g38	GGCTCCTTTGCCCCAGCA GANGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	58	NA
SP619.T IM3.g16	ATTATTGGACATCCAGATA CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	3	106	NA
SP619.T IM3.g28	TTTCATCATTATTATGCCT NGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	23	NA
SP619.T IM3.g4	TTCTACACCCCAGCCGCC CCNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	29	NA
SP619.T IM3.g34	TCAGGGACACATCTCCTTT GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	41	NA
SP619.T IM3.g39	GCTCCTTTGCCCCAGCAG ACNGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	42	NA
SP619.T IM3.g1	CTCAGAAGTGGAATACAG AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	5	35	NA
SP619.T IM3.g46	CGAGGTTCCCTGGGGCGG CTNGG (SEQ ID NO:)	1	2	2	18	NA
SP619.T IM3.g37	GCCACATTCAAACACAGG ACNGG (SEQ ID NO:)	1	2	2	25	NA
SP619.T IM3.g14	GGTGCTCAGGACTGATGA AANGG (SEQ ID NO:)	1	2	3	28	NA

[0501] 表27.hTIM3 (外显子3) 的指导RNA (gRNA) 脱靶分析

[0502]

名称	gRNA	long_ 0	long_ 1	long_ 2	short_ 0	SNP
SP620.TI M3.g1	AGGTCACCCCTGCACCGA CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	4	rs1036 199:0. 13
SP620.TI M3.g11	CTCTCTGCCGAGTCGGTGC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	4	rs1036 199:0. 13

[0503]

SP620.TI M3.g10	TCTCTCTGCCGAGTCGGTG CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	6	rs1036 199:0. 13
SP620.T IM3.g5	CCAAGGATGCTTACCACC AGNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	8	NA
SP620.TI M3.g12	TCTCTGCCGAGTCGGTGCA GNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	9	rs1036 199:0. 13
SP620.T IM3.g7	CCCCTGGTGGTAAGCAT CCTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	10	NA
SP620.TI M3.g4	TCCAAGGATGCTTACCACC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	16	NA
SP620.TI M3.g8	GGTGGTAAGCATCCTTGGA ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	1	20	NA
SP620.TI M3.g9	GTGAAGTCTCTCTGCCGA GTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	6	rs1036 199:0. 13
SP620.TI M3.g6	ATGCTTACCACCAGGGGAC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	34	NA
SP620.TI M3.g3	TTCCAAGGATGCTTACCAC CNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	36	NA
SP620.TI M3.g13	AGTCGGTGCAGGGGTGAC CTNGG (SEQ ID NO:)	1	1	2	45	NA
SP620.TI M3.g2	ACTTCACTGCAGCCTTTCC ANGG (SEQ ID NO:)	1	1	4	38	NA

[0504] 通过下一代测序 (NGS) 针对gRNA活性对表26和表27中的gRNA序列进行归一化 (相对于NHEJ的%归一化)。GFP用作对照。在测序分析后,基于脱靶谱,推荐以下gRNA:外显子2: SP619.hTIM3.g12 (45.0%)、SP619.hTIM3.g20 (60.9%) 和SP619.hTIM3.g49 (45.4%)。外显子3: SP620.hTIM3.g5 (58.0%) 和SP620.hTIM3.g7 (2.9%)。

[0505] 本领域技术人员可以适当地改变以上公开的方法,以制备并确认本文公开的其他单、双和串联CAR-T细胞的活性。

[0506] 虽然已参考以上实施例中的某些实施方案的具体细节描述了本发明,但应理解,修改和变型涵盖在本发明的精神和范围内。

双 CAR-T

两个CAR由单个慢病毒构建体表达

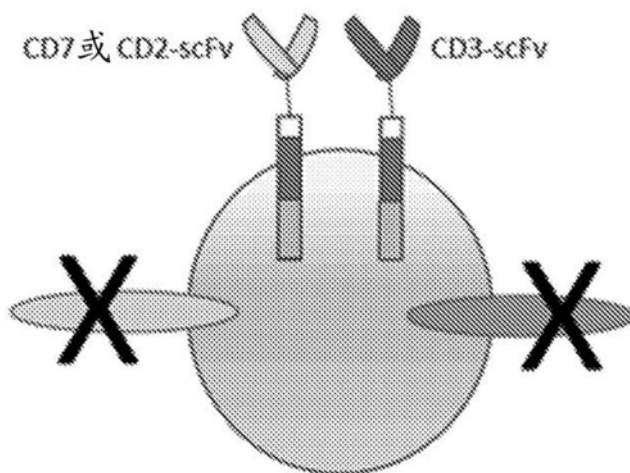


图1

串联 CAR-T

两个scFv共享单个细胞内结构域

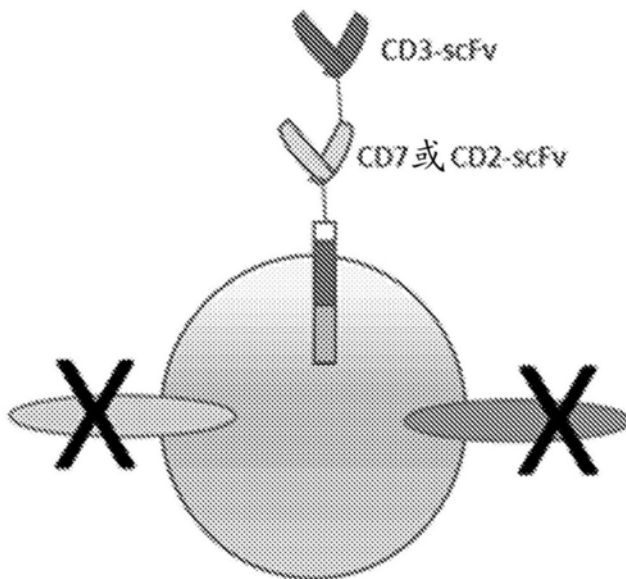


图2

串联CAR



双CAR

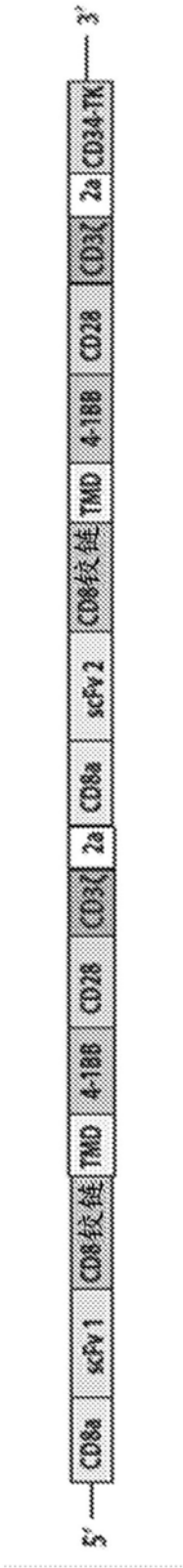


图3

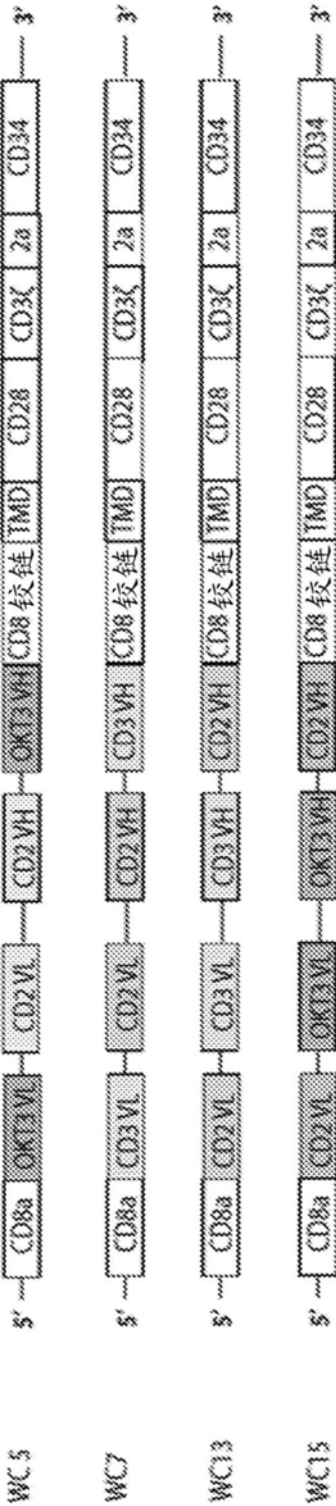
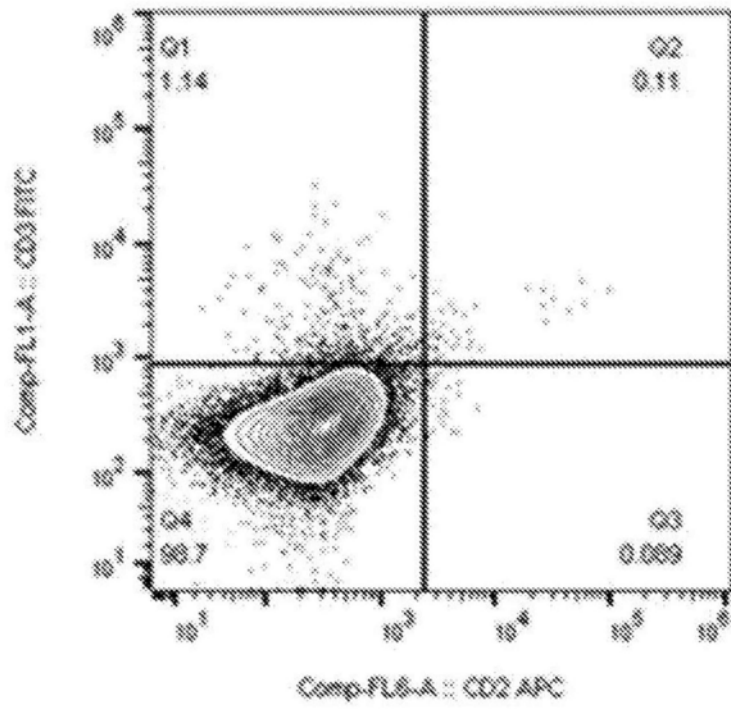
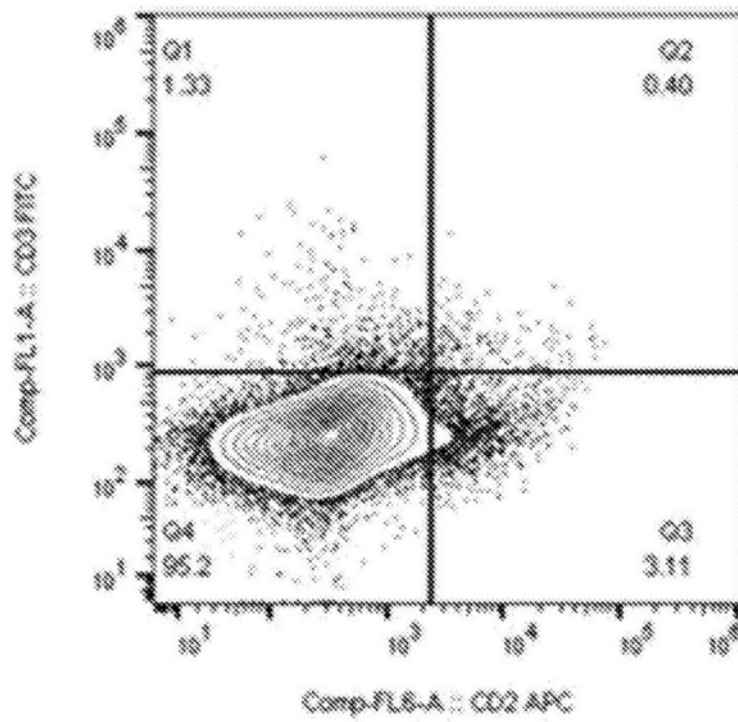


图4

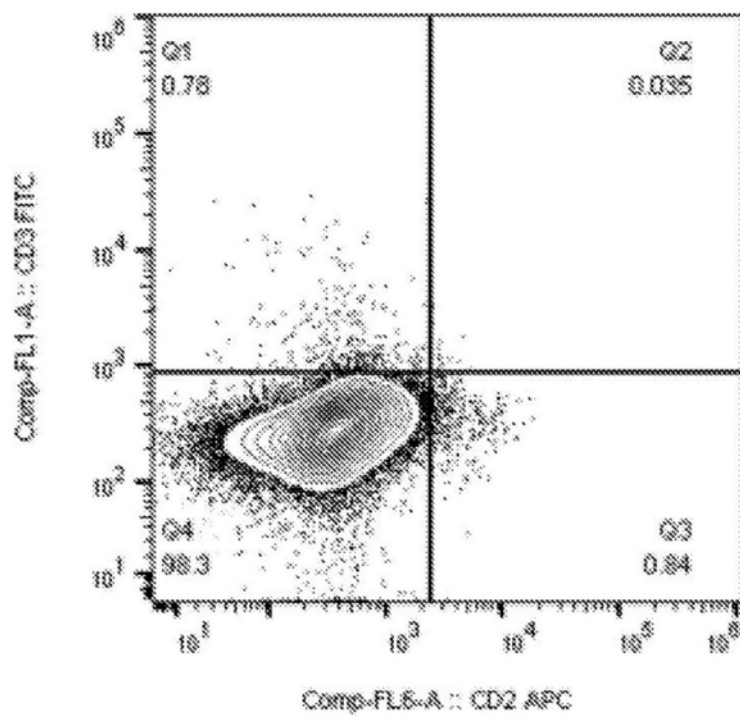


克隆5

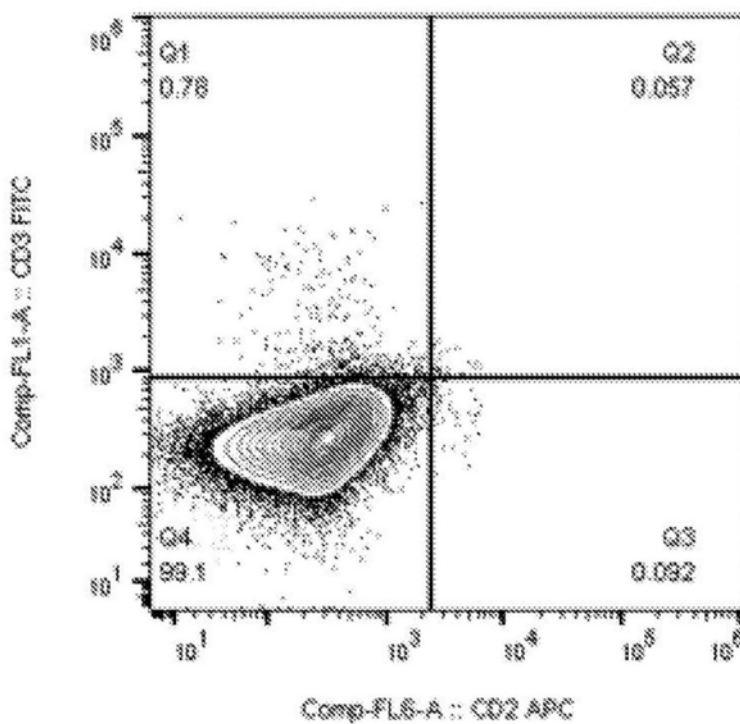


克隆6

图5

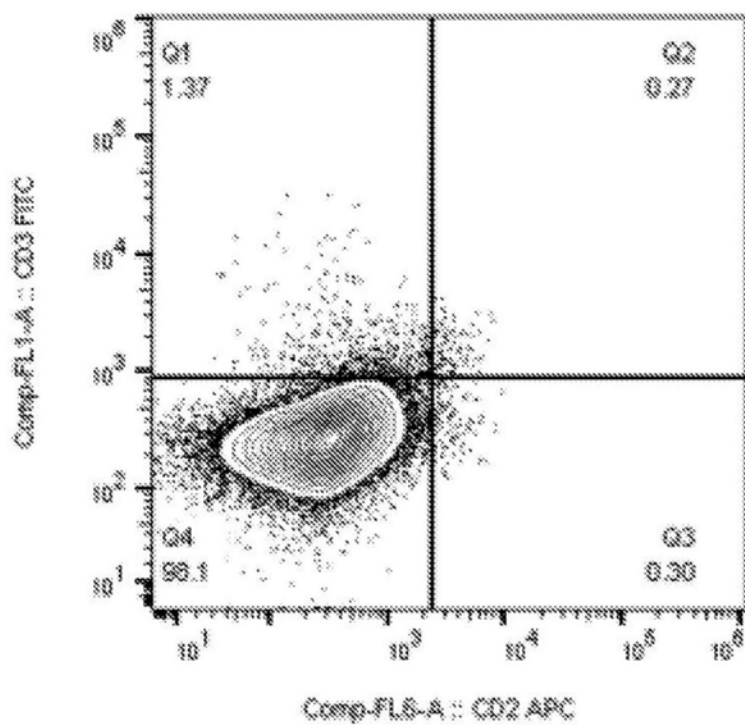


克隆7

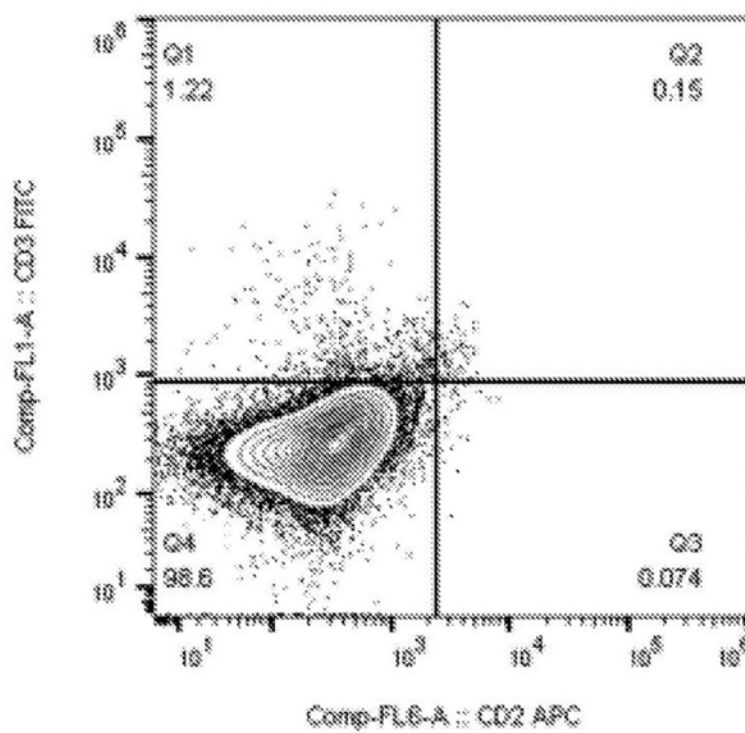


克隆8

图6

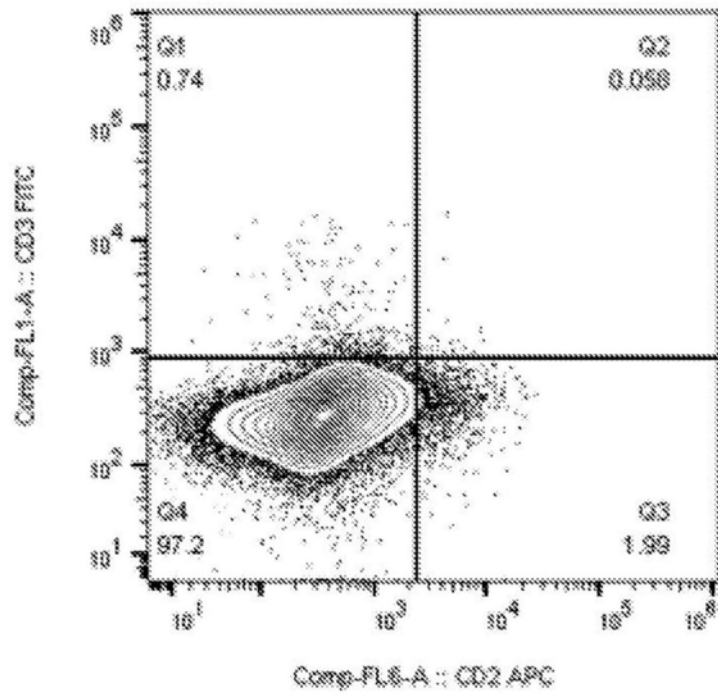


克隆13

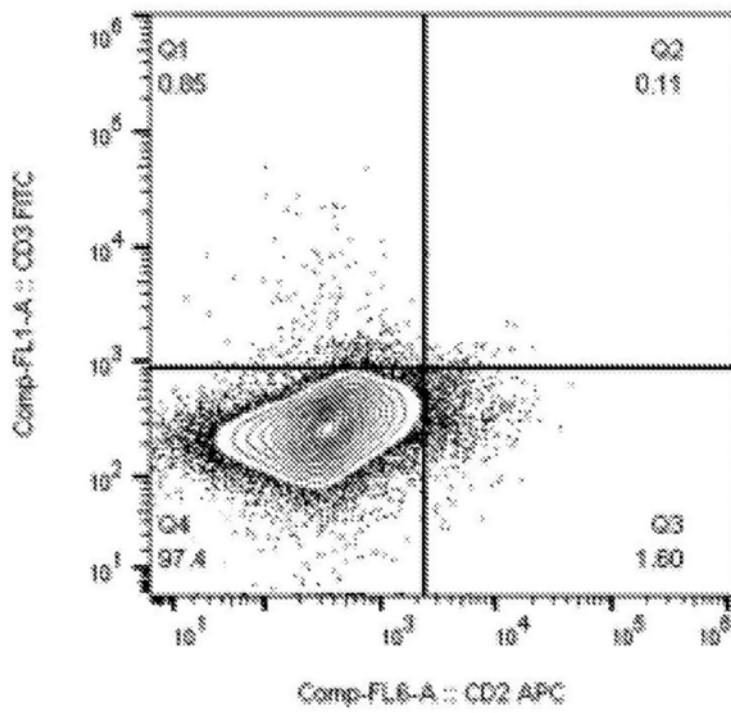


克隆14

图7



克隆15



克隆16

图8

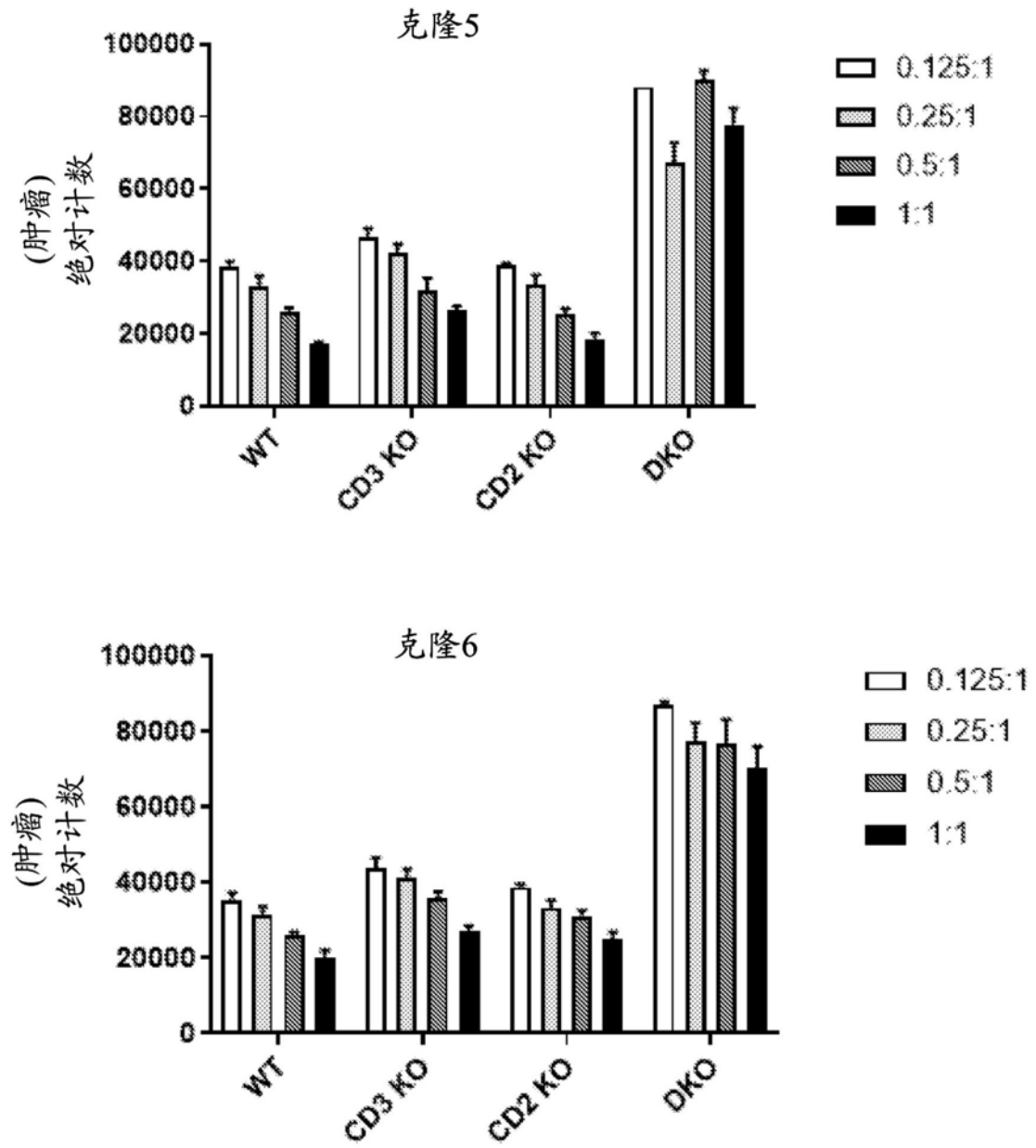


图9A

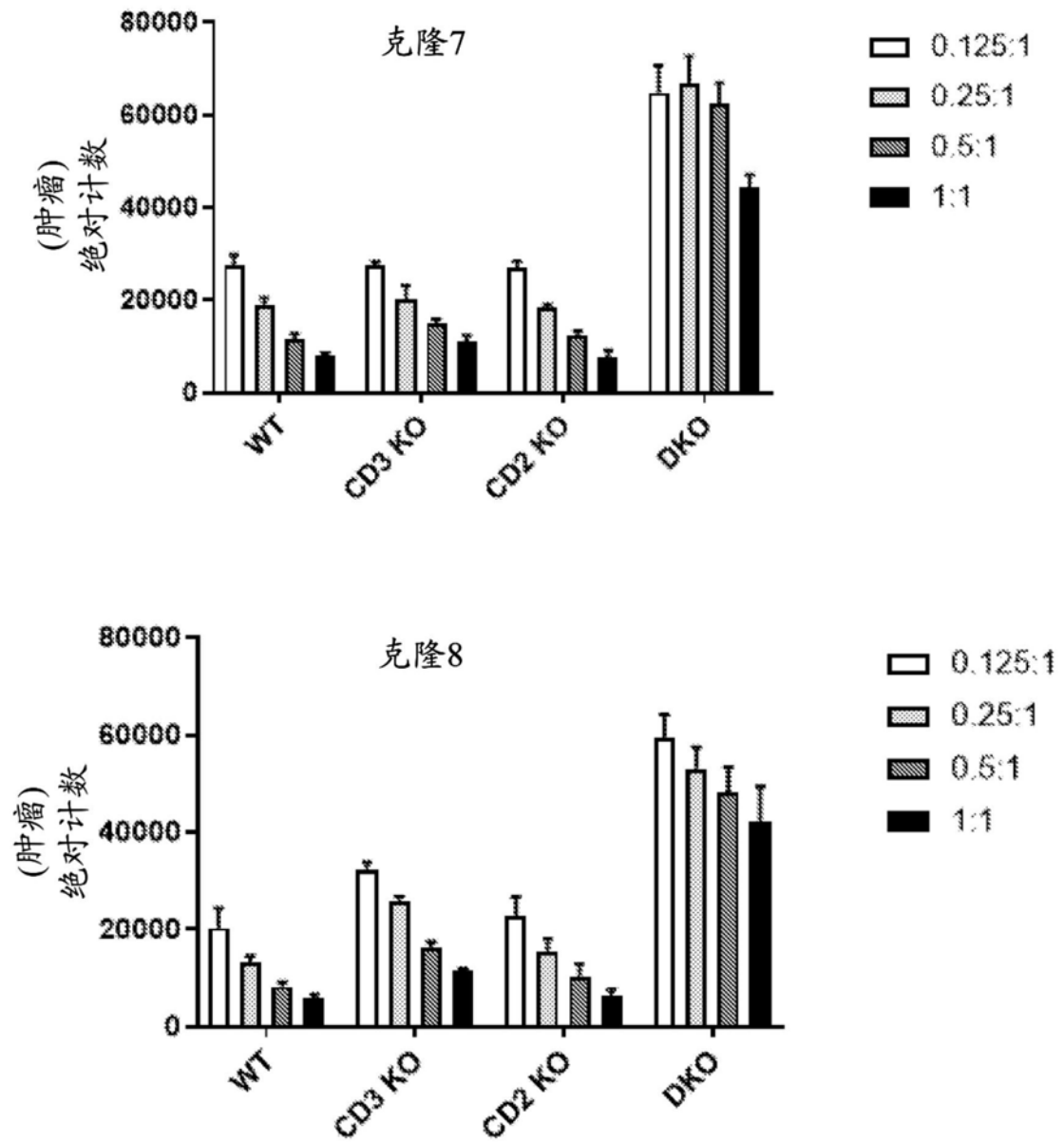


图9B

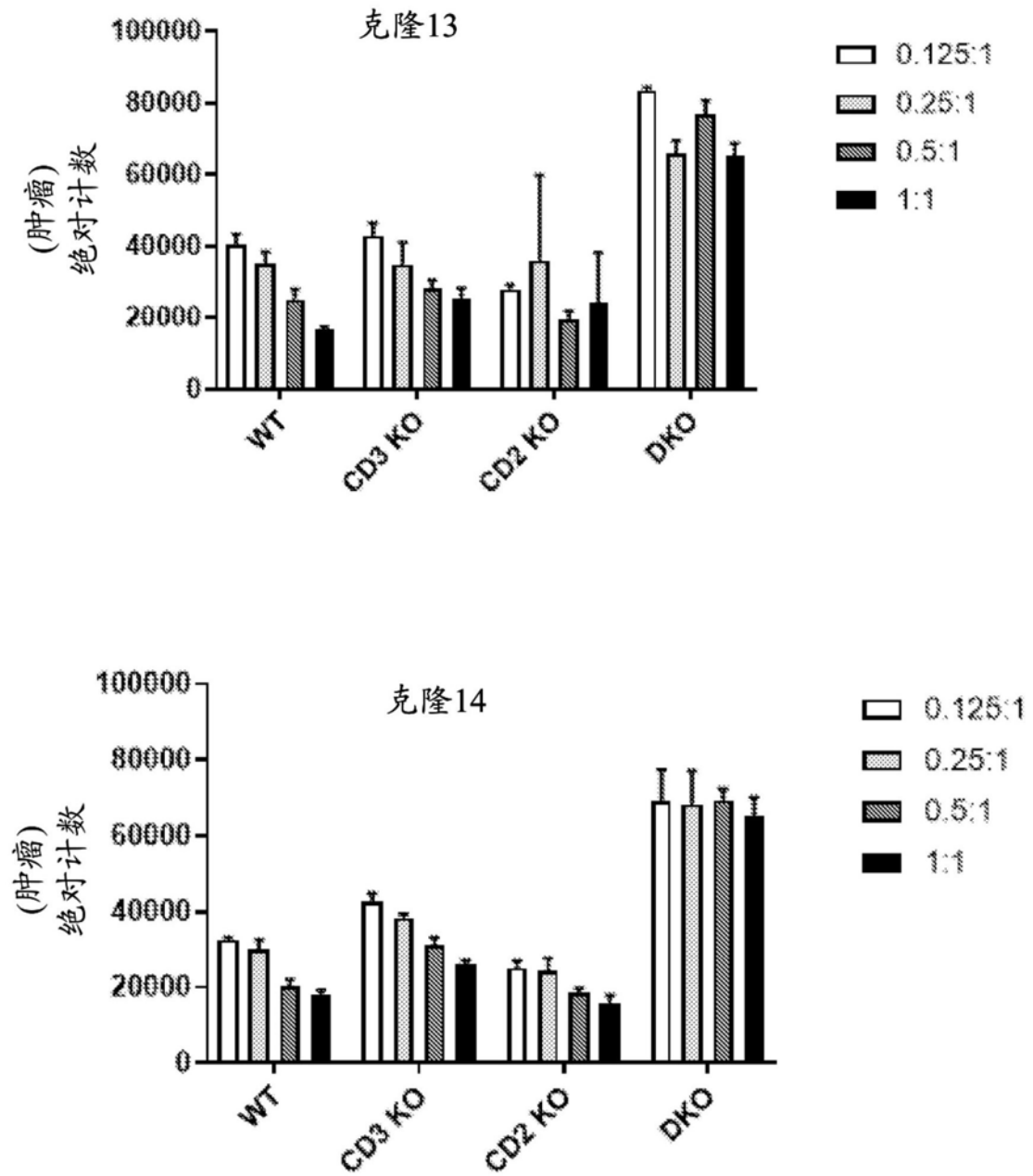


图9C

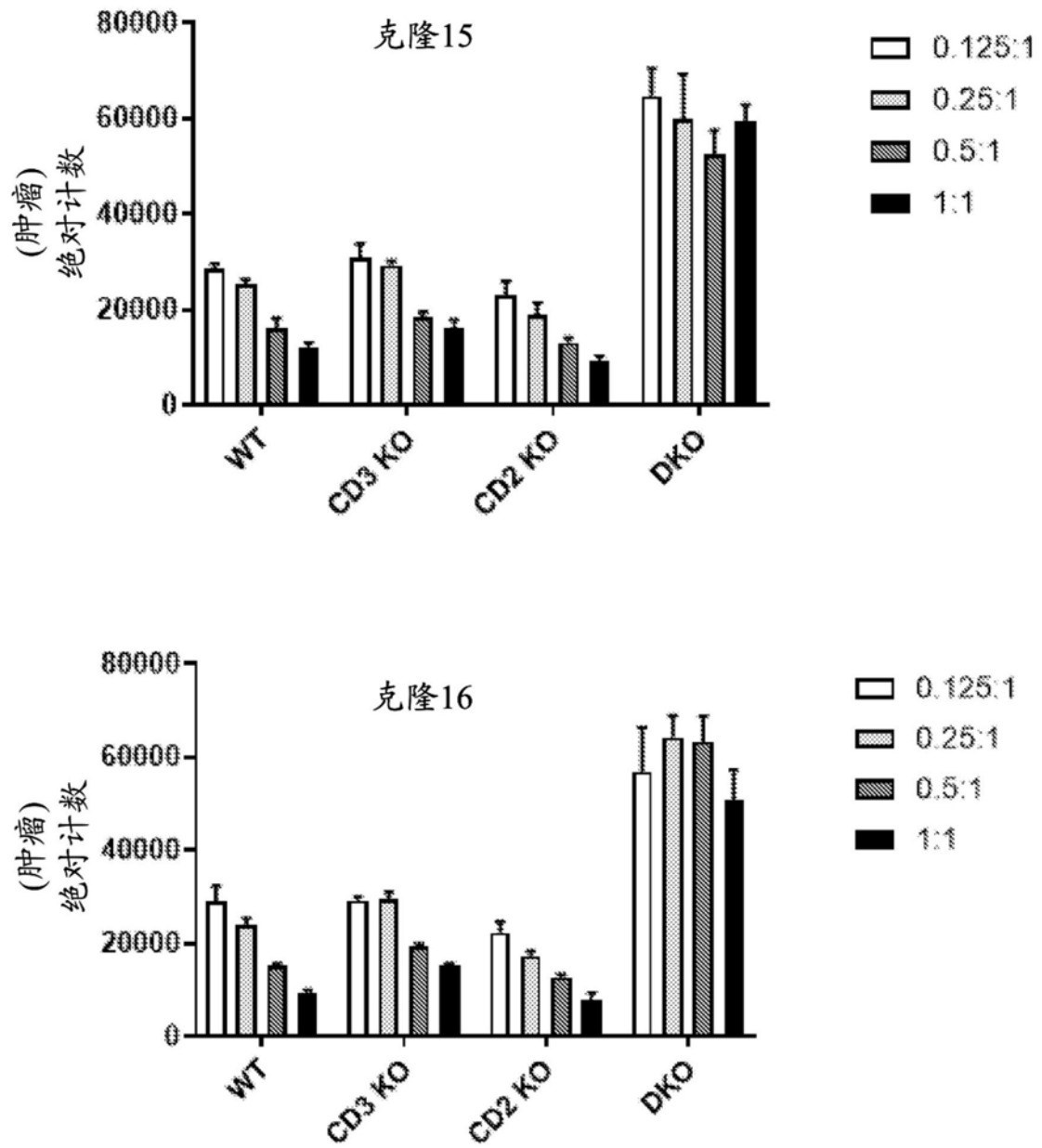


图9D



图10A

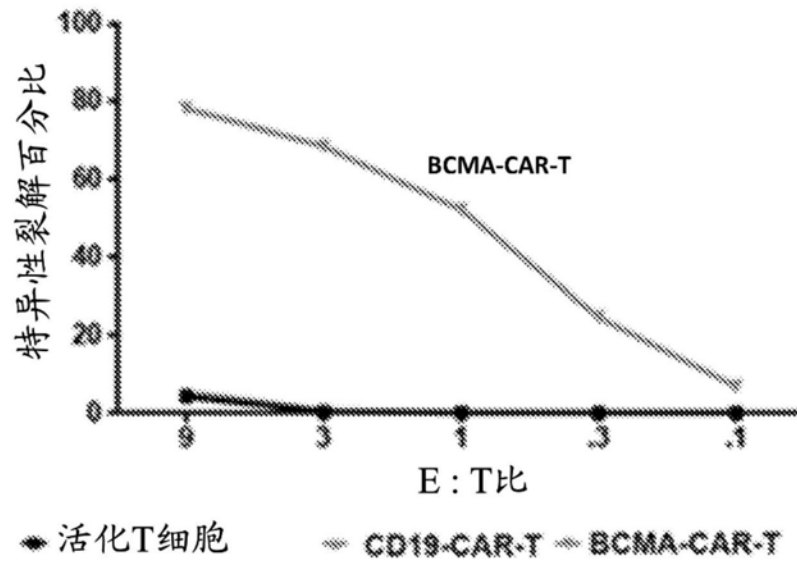


图10B

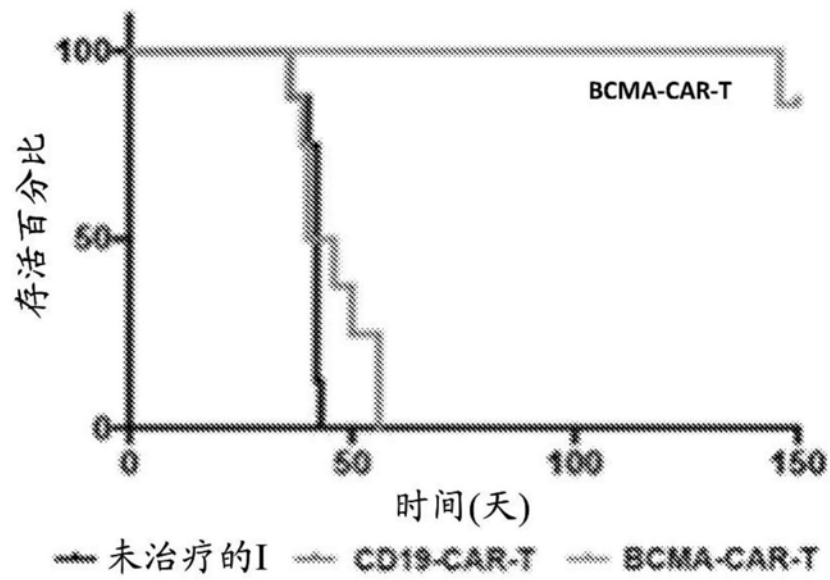


图10C

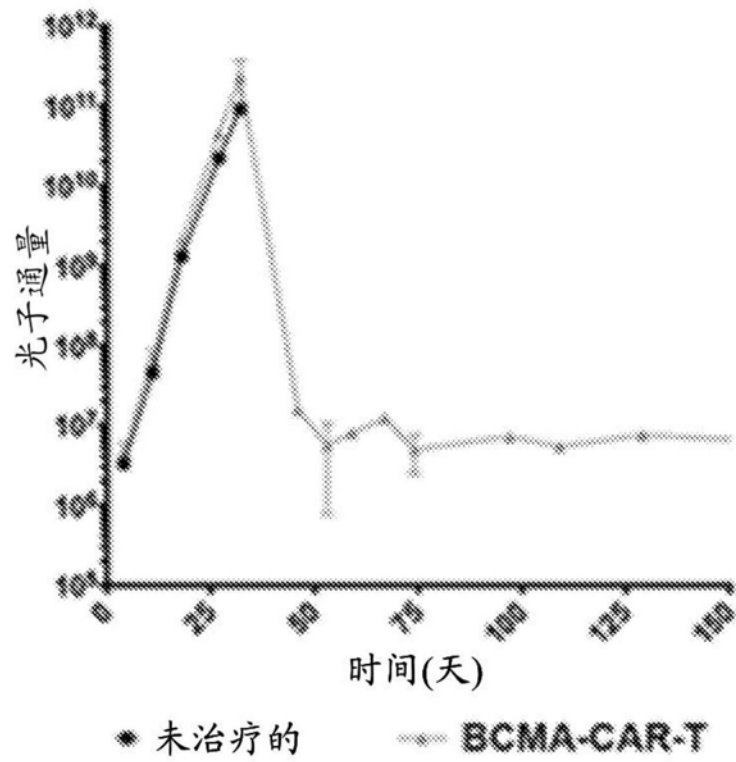


图10D

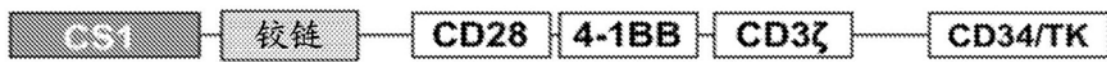


图11A

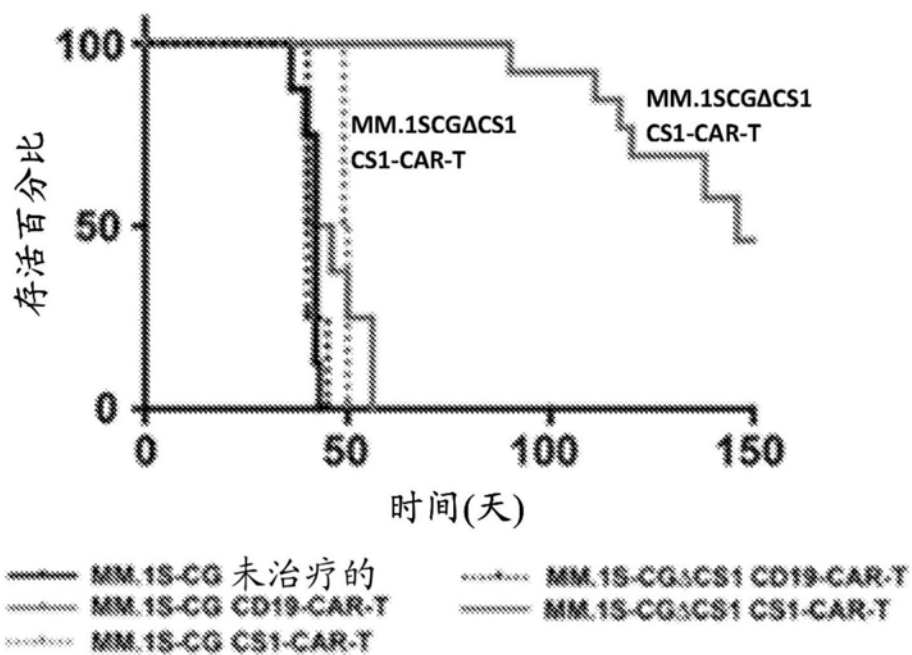


图11B

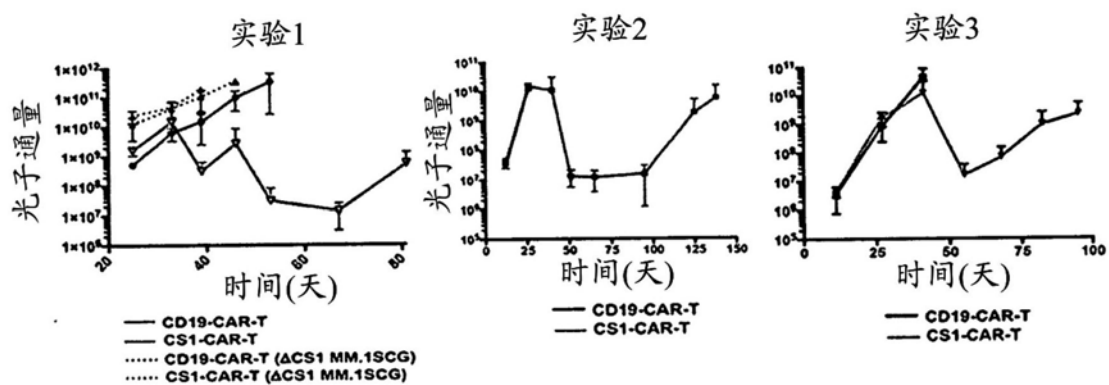


图11C

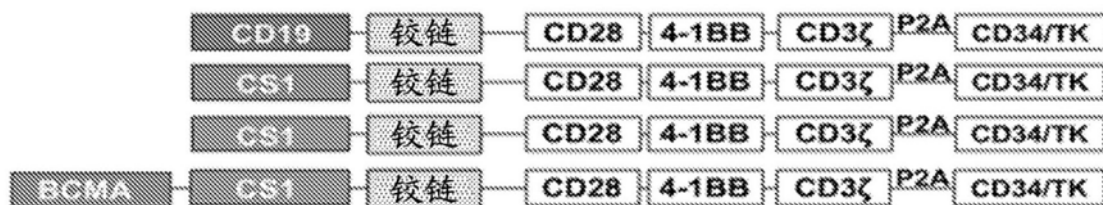


图12A

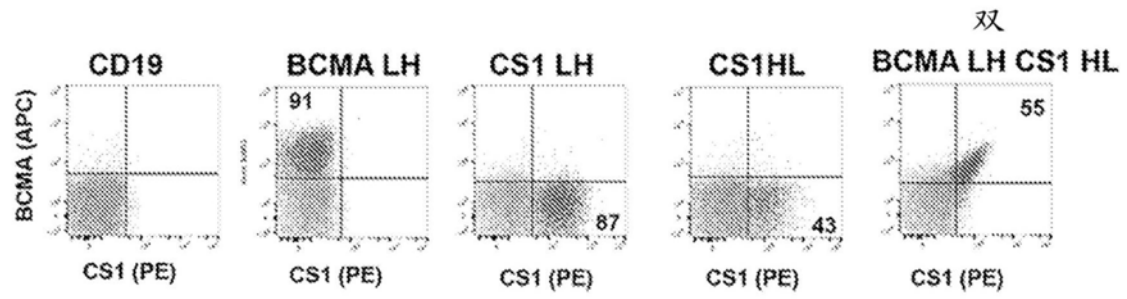


图12B

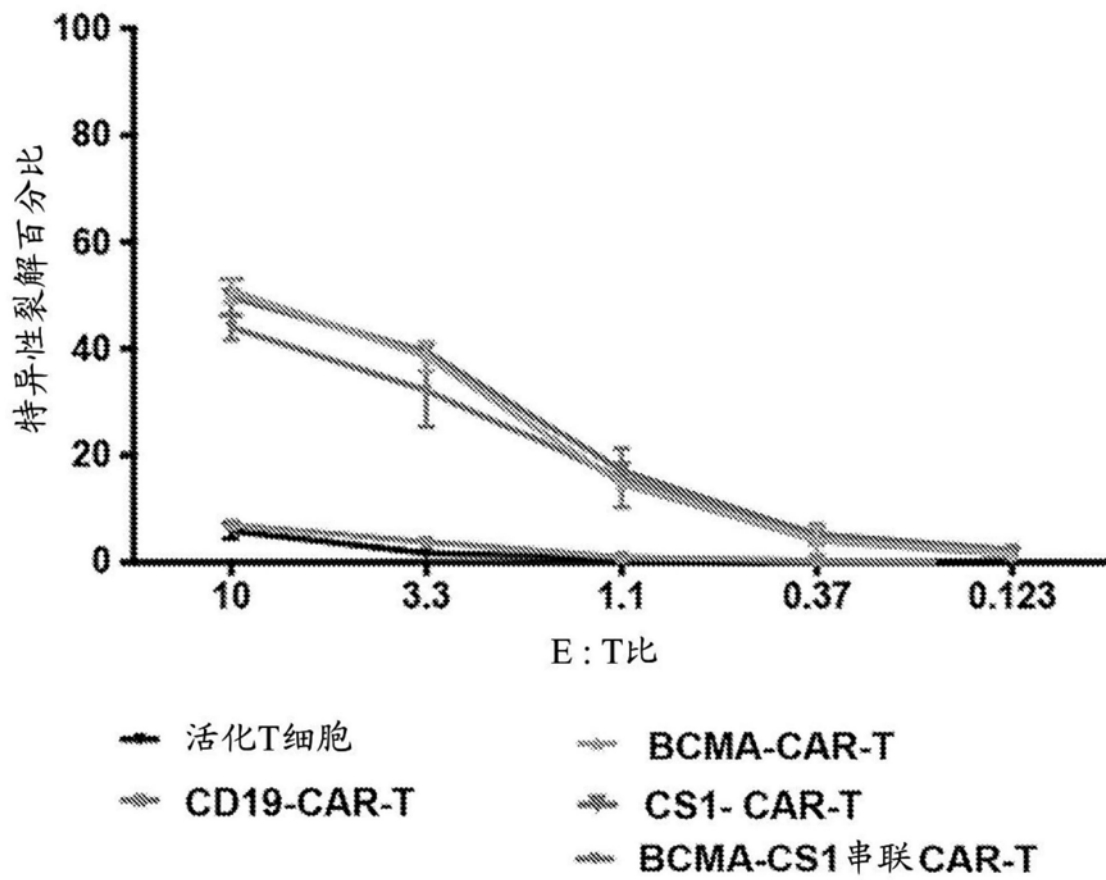


图12C

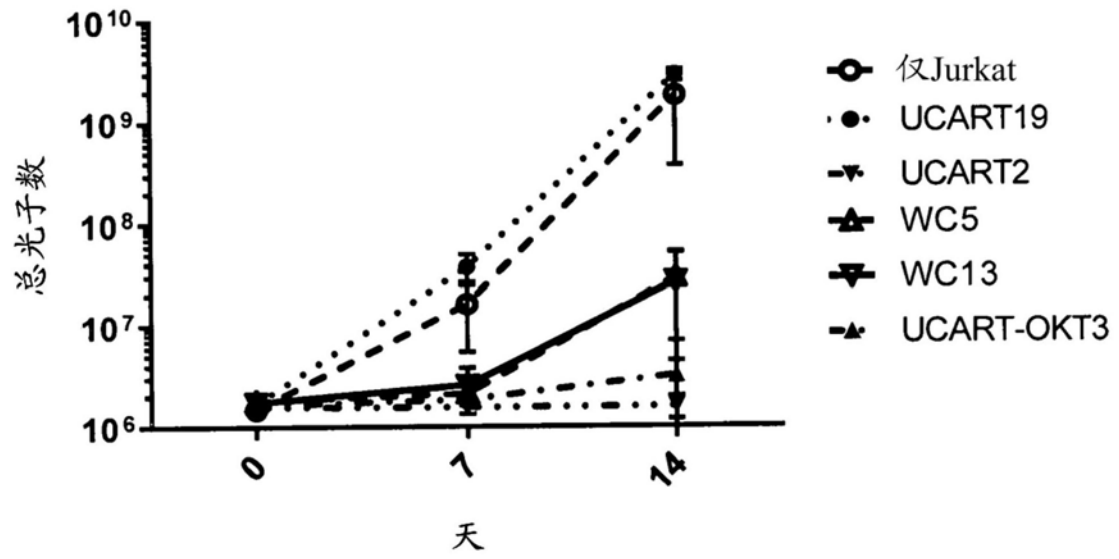


图13