(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118440211 A
(43)申请公布日 2024.08.06

(21)申请号 202410424809.0

(22)申请日 2019.05.15

(30)优先权数据
1807866.7 2018.05.15 GB
1809773.3 2018.06.14 GB

(62)分案原申请数据
201980032776.2 2019.05.15

(71)申请人 奥托路斯有限公司
地址 英国伦敦

(72)发明人 M·普勒 E·科卡拉基
S·科尔多巴 S·奥诺哈
S·托马斯 B·马 M·费拉里

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 陈丹丹

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书35页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

嵌合抗原受体

(57)摘要

本发明提供了嵌合抗原受体(CAR),其结合具有庞大的胞外域的靶抗原,其中CAR包含Fab抗原结合域。本发明还提供了编码此类CAR的核酸序列和构建体,表达此类CAR的细胞以及它们的治疗用途。

CN 118440211 A

1.嵌合抗原受体(CAR),其结合具有庞大的胞外域的靶抗原,其中所述CAR包含Fab抗原结合域。

2.根据权利要求1的CAR,其中所述靶抗原具有至少约150 Å的胞外域。

3.根据权利要求1或2的CAR,其中所述靶抗原具有至少约400个氨基酸的胞外域。

4.根据前述权利要求中任一项的CAR,其中所述靶抗原是CD22、CD21、CEACAM5、MUC1或FcRL5。

5.根据权利要求4的CAR,其中所述靶抗原是CD22。

6.根据权利要求5的CAR,其中所述抗原结合域包含:

a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列

CDR1-NFAMA(SEQ ID No.93)

CDR2-SISTGGGNTYYRDSVKG(SEQ ID No.94)

CDR3-QRNYYDGSYDYEGYTMDA(SEQ ID No.95);和

b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列

CDR1-RSSQDIGNYLT(SEQ ID No.96)

CDR2-GAIKLED(SEQ ID No.97)

CDR3-LQSIQYP(SEQ ID No.98)。

7.根据权利要求6的CAR,其包含具有如SEQ ID No.65所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.66所示的序列的VL域。

8.根据权利要求5的CAR,其中所述抗原结合域包含:

a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列

CDR1-TSGMGVG(SEQ ID No.101)

CDR2-NIWWDDDKNYNPSLKN(SEQ ID No.102)

CDR3-IAHYFDGYYYVMDV(SEQ ID No.103);和

b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列

CDR1-LASGGISNDLA(SEQ ID No.104)

CDR2-AASRLQD(SEQ ID No.105)

CDR3-QQSYKYPY(SEQ ID No.106)。

9.根据权利要求6的CAR,其包含具有如序列SEQ ID No.99所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.100所示的序列的VL域。

10.核酸序列,其编码根据前述权利要求中任一项的CAR。

11.根据权利要求10的核酸序列,其具有以下一般结构:

VH-CH-间隔区-TM-endo-coexpr-VL-CL

其中:

VH是编码第一多肽的重链可变域的核酸序列;

CH是编码所述第一多肽的重链恒定域的核酸序列;

间隔区是编码所述第一多肽的间隔区的核酸序列;

TM是编码所述第一多肽的跨膜区的核酸序列;

endo是编码所述第一多肽的胞内域的核酸序列;

VL是编码第二多肽的轻链可变域的核酸序列;

CL是编码所述第二多肽的轻链恒定域的核酸序列;和

coexpr是使所述第一多肽和第二多肽能够共表达的核酸序列。

12.核酸构建体,其包含根据权利要求10或11的第一核酸序列,和编码具有域抗体(dAb)或scFv抗原结合域的第二嵌合抗原受体的第二核酸序列。

13.核酸构建体,其包含根据权利要求10或11的第一核酸序列;编码具有域抗体(dAb)抗原结合域的第二嵌合抗原受体的第二核酸序列;以及编码具有scFv抗原结合域的第三CAR的第三核酸序列。

14.根据权利要求13的核酸构建体,其中所述第一核酸序列编码抗CD22 Fab CAR;所述第二核酸序列编码抗CD79 dAb CAR;且所述第三核酸序列编码抗CD19 scFv CAR。

15.载体,其包含根据权利要求10或11的核酸序列或根据权利要求12至14中任一项的核酸构建体。

16.细胞,其表达根据权利要求1至9中任一项的CAR。

17.细胞,其表达根据权利要求1至9中任一项的第一CAR,和具有域抗体(dAb)或scFv抗原结合域的第二嵌合抗原受体。

18.细胞,其表达根据权利要求1至9中任一项的第一CAR,和具有域抗体(dAb)抗原结合域的第二CAR;以及具有scFv抗原结合域的第三CAR。

19.根据权利要求16的细胞,其中所述第一CAR是抗CD22 Fab CAR;所述第二CAR是抗CD79 dAb CAR;以及所述第三CAR是抗CD19 scFv CAR。

20.用于制备根据权利要求16至19中任一项的细胞的方法,其包括以下步骤:离体向细胞导入根据权利要求10或11的核酸序列;根据权利要求12至14中任一项的核酸构建体;或根据权利要求15的载体。

21.药物组合物,其包含多个根据权利要求16至19中任一项的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

22.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据权利要求19的药物组合物的步骤。

23.根据权利要求22的方法,其中所述癌症是B细胞淋巴瘤或白血病。

24.根据权利要求21的药物组合物,其用于治疗癌症。

25.根据权利要求16至19中任一项的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

嵌合抗原受体

[0001] 本申请是基于申请日为2019年5月15日,优先权日为2018年5月15日,申请号为201980032776.2,发明名称为“嵌合抗原受体”的专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)。特别地,其涉及具有Fab样抗原结合域的CAR。

发明背景

[0004] 嵌合抗原受体(CAR)

[0005] 已经描述了用于癌症治疗中的一些免疫治疗剂,包括治疗性单克隆抗体(mAb)、双特异性T细胞衔接器和嵌合抗原受体(CAR)。

[0006] 嵌合抗原受体是将单克隆抗体(mAb)的特异性移植到T细胞的效应子功能的蛋白质。它们通常的形式是I型跨膜域蛋白,其具有抗原识别氨基末端(结合物)和连接至传输T细胞激活信号的胞内域的跨膜域。

[0007] 这些分子的最常见形式是识别靶抗原的衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)经由跨膜域与信号传导胞内域融合的融合物。此类分子响应于scFv对其靶标的识别导致T细胞活化。当T细胞表达此类CAR时,它们识别并杀伤表达靶抗原的靶细胞。已经开发出针对各种肿瘤相关抗原的CAR,并且许多目前正处于临床试验中。

[0008] 尽管CAR-T细胞介导的治疗已显示出对致密靶抗原如CD19或GD2的成功,但嵌合抗原受体通常无法响应具有庞大的胞外域的抗原发出信号。

[0009] 遇到抗原后有效触发下游信号传导需要最佳的突触距离。当T细胞与抗原呈递细胞相遇时(经由TCR与肽MHC的相互作用),界面处的蛋白质会根据大小被动分离。诸如CD45和CD148的具有大胞外域的磷酸酶被排除在T细胞和APC之间紧密接触的区域之外(见图1)。通过肽MHC和TCR相互作用形成的突触最适合CD45的掩蔽。在靶向诸如CD19的较小抗原的CAR-T细胞的情况下,突触形成没有障碍,并且此类抗原可以有效地靶向多个表位。如图2中所示,诸如CD22的大蛋白质形成独特的问题。靶向此类蛋白质上的膜远端表位很可能提供次优的突触长度,从而允许磷酸酶进入突触并抑制酪氨酸磷酸化。靶向膜近端区域可以改善突触形成,但是表位的空间掩蔽很可能导致靶标的次优连接,从而允许突触内存在磷酸酶,抑制酪氨酸磷酸化,激酶活性,并因此抑制CAR信号传导。

[0010] 因此,需要可替代的CAR T细胞方法,能够杀伤表达大(large)或庞大(bulky)的靶抗原的靶细胞。

附图说明

[0011] 图1-阐明Fab CAR(Fab),具有scFv抗原结合域(scFv)的经典CAR,磷酸酶CD45,CD4/TCR/MHC复合物和CD2:CD58复合物的胞外域相对大小的示意图。当T细胞经由TCR:MHC相互作用或CAR:靶抗原相互作用与肿瘤细胞相互作用时形成免疫突触,而磷酸酶(如CD45和CD148)被排除在外。

[0012] 图2-阐明CD22,CD45,CD4/TCR/MHC复合物和CD2:CD58复合物的胞外域相对大小的示意图。CD22具有非常大的庞大胞外域。这使其难以成为CAR T细胞的靶标,因为CAR胞外域和CD22胞外域的组合的长度对于最佳T细胞;靶细胞突触而言太长,这意味着磷酸酶(如CD45和CD148)不被有效地排除在外。

[0013] 图3-阐明(A)靶向CD22的Fab CAR和(B)靶向CD22的经典scFv CAR的T细胞:靶细胞突触的示意图。出人意料的是,尽管胞外域比scFv CAR胞外域更长且更庞大,因而可以预测会加剧与具有大且庞大的胞外域的靶抗原有关的问题,但是Fab CAR导致靶细胞相遇时更好的CAR介导的信号传导,以及更有效地杀伤靶细胞。

[0014] 图4-比较表达Fab CAR或scFv CAR的T细胞对表达CD22的靶细胞的杀伤的图。用表达Fab CAR或具有CD8茎间隔区的scFv CAR的病毒载体转导T细胞。抗原结合域基于同一抗CD22抗体,即10C1或1D9-3。将T细胞与表达CD22的SupT1靶细胞共培养24小时,并计算靶细胞的绝对数目,并根据未转导(NT)条件下的靶标数目对CAR中的数目进行标准化。标准化数据表示为靶细胞存活的百分比。

[0015] 图5-显示与靶细胞共培养4天后T细胞增殖的直方图。将表达耗竭CD56的CAR的T细胞与Raji靶细胞共培养,并通过流式细胞术进行分析,以测量Cell Trace Violet(CTV)随着T细胞分裂的稀释度。用405nm(紫色)激光激发用CTV标记的T细胞。测试了用于杀伤测定的同一组构建体,即:10C1Fab CAR;具有CD8茎间隔区的10C1 scFv CAR;1D9-3 Fab CAR和具有CD8茎间隔区的1D9-3 scFv CAR。

[0016] 图6-嵌合抗原受体的不同结合域形式

[0017] (a)Fab CAR形式;(b)dAb CAR形式;(c)scFv CAR形式。

[0018] 图7-使用不同形式CAR靶向CD19、CD22和CD79的CAR或门(OR gate)

[0019] (a)使用两个FMD-2A序列分离两个受体的编码序列可以生成三顺反子盒;(b)结合了三种不同形式的或门:用于CD19的scFv-CAR,用于CD22的Fab CAR和用于CD79的dAb CAR。

[0020] 图8-显示基于FACS的杀伤测定的结果图,其比较了表达具有9A8抗原结合域的Fab CAR的T细胞和表达具有3B4抗原结合域的Fab CAR的T细胞的靶细胞杀伤。

[0021] 图9-显示与SupT1靶细胞共培养72小时后IL-2释放的图,其比较了表达具有9A8抗原结合域的Fab CAR的T细胞和表达具有3B4抗原结合域的Fab CAR的T细胞。

[0022] 图10-显示基于FACS的杀伤测定的结果图,其比较了表达各种抗CD22Fab CAR的T细胞的靶细胞杀伤。靶细胞是未转导的SupT1细胞(A);或经转导以表达CD22的SupT1细胞,其显示CD22表达的三个水平之一:

[0023] B-“超低”,流式细胞术检测不到

[0024] C-“低”,平均255个拷贝的CD22/细胞

[0025] D-“高”,平均78,916个拷贝的CD22/细胞。

[0026] 图11-阐明表达两个Fab CAR时交叉配对问题的示意图。

[0027] 图12-阐明“Crossmab”和“Ortho-Fab”以避免Fab CAR之间交叉配对的示意图。

[0028] 发明方面概述

[0029] 本发明人发现,使用具有Fab结合域而不是scFv结合域的CAR,可以改善CAR介导的庞大的抗原的靶向性和CAR介导的杀伤表达庞大的靶抗原的靶细胞的效率。

[0030] 因此,本发明的第一方面提供了结合具有庞大的胞外域的靶抗原的嵌合抗原受体

(CAR),其中所述CAR包含Fab抗原结合域。

[0031] 靶抗原可以具有至少约150 Å的胞外域。

[0032] 靶抗原可以具有至少约400个氨基酸的胞外域。

[0033] 靶抗原可以选自以下组:CD22、CD21、CEACAM5、MUC1或FcRL5。特别地,靶抗原可以是CD22。

[0034] 抗原结合域可以包含;

[0035] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0036] CDR1-NFAMA(SEQ ID No.93)

[0037] CDR2-SISTGGGNTYYRDSVKG(SEQ ID No.94)

[0038] CDR3-QRNYYDGSYDYEGYTMDA(SEQ ID No.95);和

[0039] b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0040] CDR1-RSSQDIGNYLT(SEQ ID No.96)

[0041] CDR2-GAIKLED(SEQ ID No.97)

[0042] CDR3-LQSIQYP(SEQ ID No.98)。

[0043] 抗原结合域可以包含:

[0044] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0045] CDR1-TSGMGVG(SEQ ID No.101)

[0046] CDR2-NIWWDDDKNYNPSLKN(SEQ ID No.102)

[0047] CDR3-IAHYFDGYYYVMDV(SEQ ID No.103);和

[0048] b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0049] CDR1-LASGGISNDLA(SEQ ID No.104)

[0050] CDR2-AASRLQD(SEQ ID No.105)

[0051] CDR3-QQSYKYPY(SEQ ID No.106)。

[0052] CAR可以包含具有如SEQ ID No.65所示序列的VH域;和具有如SEQ ID No.66所示序列的VL域。

[0053] CAR可以包含具有如SEQ ID No.99所示序列的VH域;和具有如SEQ ID No.100所示序列的VL域。

[0054] 在第二方面,提供了编码本发明第一方面的CAR的核酸序列。

[0055] 核酸序列可以具有以下一般结构:

[0056] VH-CH-间隔区-TM-endo-coexpr-VL-CL

[0057] 其中:

[0058] VH是编码第一多肽的重链可变域的核酸序列;

[0059] CH是编码第一多肽的重链恒定域的核酸序列;

[0060] 间隔区是编码第一多肽的间隔区的核酸序列;

[0061] TM是编码第一多肽的跨膜区的核酸序列;

[0062] endo是编码第一多肽的胞内域的核酸序列;

[0063] VL是编码第二多肽的轻链可变域的核酸序列;

[0064] CL是编码第二多肽的轻链恒定域的核酸序列;和

[0065] coexpr是使第一多肽和第二多肽能够共表达的核酸序列。

[0066] 在第三方面,提供了核酸构建体,其包含根据本发明第二方面的第一核酸序列和编码具有域抗体(dAb)或scFv抗原结合域的第二嵌合抗原受体的第二核酸序列。

[0067] 特别地,提供了核酸构建体,其包含根据本发明第二方面的第一核酸序列;编码具有域抗体(dAb)抗原结合域的第二嵌合抗原受体的第二核酸序列;以及编码具有scFv抗原结合域的第三CAR的第三核酸序列。

[0068] 第一核酸序列可以编码抗CD22 Fab CAR;第二核酸序列可以编码抗CD79 dAb CAR;以及第三核酸序列可以编码抗CD19 scFv CAR。

[0069] 在第四方面,提供了载体,其包含根据本发明第二方面的核酸序列或根据本发明第三方面的核酸构建体。

[0070] 在第五方面,提供了细胞,其表达根据本发明第二方面的CAR。

[0071] 特别地,提供了细胞,其表达根据本发明第一方面的第一CAR,和具有域抗体(dAb)或scFv抗原结合域的第二嵌合抗原受体。

[0072] 特别地,提供了细胞,其表达根据本发明第一方面的第一CAR;具有域抗体(dAb)抗原结合域的第二CAR;以及具有scFv抗原结合域的第三CAR。

[0073] 第一CAR可以是抗CD22 Fab CAR;第二CAR可以是抗CD79 dAb CAR;以及第三CAR可以是抗CD19 scFv CAR。

[0074] 在第六方面,提供了用于制备根据本发明第五方面的细胞的方法,其包括离体向细胞引入根据本发明第二方面的核酸序列;根据本发明第三方面的核酸构建体;或者根据本发明第四方面的载体的步骤。

[0075] 在第七方面,提供了药物组合物,其包含多个根据本发明第五方面的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0076] 在第八方面,提供了用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据本发明第七方面的药物组合物的步骤。

[0077] 癌症可以是,例如B细胞淋巴瘤或白血病。

[0078] 在第九方面,提供了根据本发明第七方面的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0079] 在第十方面,提供了根据本发明第五方面的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0080] 本发明提供了嵌合抗原受体,当靶向具有庞大的胞外域的抗原时,其显示出改进的CAR介导的信号传导和靶细胞杀伤。此类抗原由于其形成了次优的T细胞:靶细胞突触而很难用经典CAR靶向。

[0081] 靶向此类抗原的能力为癌症治疗开辟了全新的可能性。许多潜在有用的癌症靶抗原具有庞大的胞外域,例如CD22、CD21、CEACAM5、MUC1或FcRL5。本发明提供了用于靶向这些抗原的改进的构建体,使它们能够用作单一靶标,并且重要的是,其被包括在靶向多种抗原的策略中,以提高CAR-T细胞的效力和安全性。

发明详述

[0083] 嵌合抗原受体

[0084] 本发明涉及具有Fab抗原结合域的嵌合抗原受体。

[0085] 经典嵌合抗原受体(CAR)是嵌合I型跨膜蛋白质,其将细胞外抗原识别域(结合物)

连接至细胞内信号传导域(胞内域)。结合物通常是衍生自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv),但其可以基于包含抗体样抗原结合位点的其他形式。通常需要间隔区域将结合物与膜分开并允许其适当定位。使用的常见间隔区域是IgG1的Fc。取决于抗原,更致密的间隔区可以满足,例如来自CD8α的茎部,以及甚至仅仅是单独的IgG1铰链。跨膜域将蛋白质锚定在细胞膜中并将间隔区连接至胞内域。

[0086] 早期的CAR设计具有衍生自FcεR1或CD3ζ的γ链的细胞内部分的胞内域。因此,这些第一代受体传输免疫信号1,其足够触发T细胞对同源靶细胞的杀伤但不能完全激活T细胞以增殖或存活。为了克服这一限制,构建了复合胞内域:将T细胞共刺激分子的细胞内部分融合至CD3ζ的细胞内部分,产生了第二代受体,其可以在抗原识别后同时传输激活和共刺激信号。最常使用的共刺激域是CD28的共刺激域。这提供了最强力的共刺激信号,即免疫信号2,其触发T细胞增殖。已经描述了一些受体,其包括TNF受体家族胞内域,如紧密相关的OX40和41BB,其传输存活信号。现在已经描述甚至更强力的第三代CAR,其具有能够传输激活、增殖和存活信号的胞内域。

[0087] 当CAR结合靶抗原时,这导致激活信号传输至上面有其表达的T细胞。因此CAR将T细胞的特异性和细胞毒性引向表达靶定抗原的肿瘤细胞。

[0088] 因而CAR通常包含:(i)抗原结合域;(ii)间隔区;(iii)跨膜域;以及(iii)包含信号传导域或者与信号传导域缔合的细胞内域。

[0089] CAR可以具有以下一般结构:

[0090] 抗原结合域-间隔区域-跨膜域-细胞内信号传导域(胞内域)。

[0091] 抗原结合域

[0092] 抗原结合域是嵌合受体识别抗原的部分。在经典CAR中,抗原结合域包含:衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)(见图6c)。同样还产生了具有域抗体(dAb)或VHH抗原结合域的CAR(见图6b)。

[0093] 在本发明的嵌合抗原受体中,抗原结合包含例如单克隆抗体的Fab片段(见图6a)。Fab CAR包含两条链:一条具有抗体样轻链可变区(VL)和恒定区(CL);而一条具有重链可变区(VH)和恒定区(CH)。一条链还包含跨膜域和细胞内信号传导域。CL和CH之间的缔合引起受体的组装。

[0094] Fab CAR的两条链可以具有一般结构:

[0095] VH-CH-间隔区-跨膜域-细胞内信号传导域;和VL-CL

[0096] 或者

[0097] VL-CL-间隔区-跨膜域-细胞内信号传导域;和VH-CH。

[0098] 对于本文所述的Fab型嵌合受体,抗原结合域由来自一条多肽链的VH和来自另一条多肽链的VL组成。

[0099] 多肽链可以包含在VH/VL域和CH/CL域之间的接头。接头可以是柔性的,并且用于将VH/VL域与CH/CL域在空间上分开。

[0100] 柔性接头可以由小的非极性残基(如甘氨酸,苏氨酸和丝氨酸)组成。接头可以包含甘氨酸-丝氨酸接头的一个或多个重复序列,例如$(Gly_4Ser)_n$接头,其中n是重复的数目。所述接头或每个接头的长度可以小于50、40、30、20或10个氨基酸。

[0101] 恒定区域

[0102] 人中有两种类型的轻链:kappa(κ)链和lambda(λ)链。lambda类具有4种亚型:λ_1、λ_2、λ_3和λ_4。Fab型嵌合受体的轻链恒定区可以衍生自这些轻链类型中的任何一种。

[0103] 本发明的嵌合受体的轻链恒定域可以具有如SEQ ID NO.1所示的序列,其为kappa链恒定域。

[0104] SEQ ID No.1

[0105] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

[0106] NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

[0107] SFNRGEC

[0108] 哺乳动物免疫球蛋白重链有五种类型:γ、δ、α、μ和ε,其分别定义了免疫球蛋白IgG,IgD,IgA,IgM和IgE类别。重链γ、δ和α具有由三个串联Ig域组成的恒定域,并且具有铰链以增加柔性。重链μ和ε由四个域组成。

[0109] 本发明的Fab型嵌合受体的CH域可以包含如SEQ ID No.2所示的序列,其来自γ免疫球蛋白重链。

[0110] SEQ ID No.2

[0111] STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

[0112] TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

[0113] 间隔区

[0114] 经典CAR包含间隔区序列以将抗原结合域与跨膜域连接并且将抗原结合域与胞内域在空间上分开。柔性间隔区允许抗原结合域以不同方向定位以促进结合。

[0115] 如在经典的嵌合抗原受体(图6C)和dAb CAR(图6B)中,在Fab CAR(图6A)中,间隔区可以导致多肽链中的两条二聚化。多肽链中的两条可以,例如包含一个或多个合适的半胱氨酸残基以形成一个或多个二硫化物桥。IgG1的铰链在这方面是合适的。基于IgG1铰链的间隔区可以具有如SEQ ID.3所示的序列。

[0116] SEQ ID No.3(人IgG1铰链):

[0117] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

[0118] 可选择地,铰链间隔区可以具有如SEQ ID No.4所示的序列。

[0119] SEQ ID No.4(铰链间隔区)

[0120] EPKSCDKTHTCPPCP

[0121] 在本发明的Fab CAR中,二聚体Fab CAR的两个多肽是相同的,如图6A所示。它们具有衍生自同一抗体的相同抗原结合域,并且它们结合同一靶抗原上的相同表位。二聚体中的第一多肽和第二多肽仅仅是由同一转录本编码的多肽的重复拷贝。

[0122] 跨膜域

[0123] 跨膜域是嵌合受体跨越膜的部分。跨膜域可以是在膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。这通常是包含几个疏水残基的alpha螺旋。任何跨膜蛋白的跨膜域可以用于提供嵌合受体的跨膜部分。蛋白质的跨膜域的存在和跨度可以由本领域技术人员使用TMHMM算法(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)确定。可选择地,可以使用人工设计的TM域。

[0124] 胞内域

[0125] 胞内域是嵌合受体的信号传输部分。它可以是嵌合受体的细胞内域的一部分或与

之缔合。抗原识别后,受体簇天然CD45和CD148从突触中排除,且信号传输到细胞。最常用的胞内域组分是包含3个ITAM的CD3-zeta组分。抗原结合后,这会向T细胞传输激活信号。CD3-zeta可能无法提供完全有效的激活信号,并且可能需要其他共刺激信号。共刺激信号促进T细胞增殖和存活。共刺激信号有两种主要类型:属于Ig家族(CD28,ICOS)和TNF家族(OX40、41BB,CD27,GITR等)的信号。例如,嵌合CD28和OX40可以与CD3-Zeta一起使用来传输增殖/存活信号,或者可以将这三种一起使用。

[0126] 胞内域可以包含:

[0127] (i)含有ITAM的胞内域,例如来自CD3 zeta的胞内域;和/或

[0128] (ii)共刺激域,例如来自CD28或ICOS的胞内域;和/或

[0129] (iii)传输存活信号的域,例如TNF受体家族胞内域,例如OX-40、4-1BB,CD27或GITR。

[0130] 已经描述了许多系统,其中抗原识别部分位于与信号传输部分分开的分子上,例如WO015/150771;WO2016/124930和WO2016/030691中描述的那些。因此,本发明的嵌合受体可以包含含有抗原结合域和跨膜域的抗原结合组分;其能够与包含信号传导域的单独的细胞内信号传导组分相互作用。本发明的载体可以表达包含此类抗原结合组分和细胞内信号传导组分的嵌合受体信号传导系统。

[0131] 嵌合受体可以包含信号肽,以使得当其在细胞内表达时,新生蛋白被引导至内质网,随后被引导至表达它的细胞表面。信号肽可以在分子的氨基末端。

[0132] 靶抗原

[0133] “靶抗原”是被本发明的嵌合受体的抗原结合域特异性识别并结合的实体。

[0134] 靶抗原可以是癌细胞上存在的抗原,例如肿瘤相关抗原。

[0135] 靶抗原可以具有相对长和/或庞大的胞外域。CD45的胞外域大小为216Å。取决于通常使用的间隔区,经典CAR的抗原结合域将在25-75Å范围内,因此,大于150Å的抗原由于不良的突触形成而难以靶向,从而导致所述突触内存在磷酸酶。

[0136] 靶抗原可以具有大于约150 Å的胞外域,例如靶抗原可以具有大小为150-400 Å,200-350 Å或250-310 Å的胞外域。

[0137] 靶抗原胞外域的分子大小与氨基酸长度之间存在相关性。下表显示了具有致密胞外域的抗原(EpCAM,CD19)和具有庞大的胞外域的抗原(CEACAM5,CD22)的胞外域大小和氨基酸数目的示例。

[0138]

蛋白质	胞外域大小	氨基酸
EpCAM	48Å	242
CD19	63Å	272
CEACAM5	280Å	651
CD22	306Å	668

[0139] 靶抗原可以具有长度大于约400个氨基酸的胞外域,例如靶抗原可以具有长度为400-1000、500-900、600-800或600-700个氨基酸的胞外域。

[0140] CD22的胞外域在其胞外域中具有七个IgG样域。本发明的嵌合受体的靶抗原可以具有相当于至少4、5、6或7个Ig样域的长度。CD21的胞外域具有21个短的共有重复序列(SCR),每个重复序列约60个氨基酸。本发明的嵌合受体的靶抗原长度可以相当于至少15、17、19或21个CSR。

[0141] 靶抗原可以具有比T细胞:靶细胞突触处T细胞与靶细胞之间的最佳细胞内距离更长的胞外域。靶细胞可以具有至少40、50、60或70nM的胞外域。

[0142] 靶抗原可以是CD22、CD21、CEACAM5、MUC1或FCRL5。

[0143] CD22

[0144] CD22具有七个胞外IgG样域,通常被鉴定为Ig域1至Ig域7,其中Ig域7最靠近B细胞膜,而Ig域1离Ig细胞膜最远。

[0145] 根据CD22的氨基酸序列(http://www.uniprot.org/uniprot/P20273)在下表中总结了Ig域的位置:

[0146]

Ig 域	氨基酸
7	20-138
6	143-235

[0147]

5	242-326
4	331-416
3	419-500
2	505-582
1	593-676

[0148] Haso等(Blood;2013;121(7))描述了具有衍生自m971,HA22和BL22scFv的抗原结合域的抗CD22 CAR的实例。抗体HA22和BL22与CD22的Ig域5上的表位结合。

[0149] 已知其他抗CD22抗体,例如小鼠抗人CD22抗体1D9-3、3B4-13、7G6-6、6C4-6、4D9-12、5H4-9、10C1-D9、15G7-2、2B12-8、2C4-4和3E10-7;以及人源化的抗人CD22抗体LT22和伊组单抗(Inotuzumab)(G5_44)。表1总结了每种抗体的VH,VL和CDR序列(粗体和下划线)以及在CD22上靶表位的位置。

[0150] 表1

[0151]

抗体	VH	VL	CD22 上表位的位置
1D9-3	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFN**TYAMH**WVRQAPGKGLEWVA**RIRSKSSNYATYYADSVKD**RFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVV**DYLYAMDY**WGQGTSVTVSS(SEQ ID No. 39)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC**KASQNVRTAVA**WYQQKPGQSPKALIY**LASNRHT**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC**LQHWNYPFT**FGSGTKLEIK(SEQ ID No. 40)	域 1 和 2
3B4-13	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFT**DYEMH**WVKQTPVHGLEWIG**AIDPETGATAYNQKFKG**KAILTADKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCTR**YDYGSSPWFAY**WGQGTLVTVSA(SEQ ID No. 41)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC**RSSAGAVTTSNYAN**WVQEKPDHLFTGLIG**GTNNRAP**GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC**ALWNSNHWV**FGGGTKLTVL(SEQ ID No. 42)	域 1 和 2
7G6-6	QVQLQQPGAELVMPGASVKLSCKASGYTFT**SYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**EIDPSDSYTNYNQKFKG**KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**GYYGSSSFDY**WGQGTTLTVSS(SEQ ID No. 43)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC**KSSQSLLYSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC**QQYYSYT**FGGGTKLEIK(SEQ ID No. 44)	域 1 和 2
6C4-6	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT**SYGVH**WVRQPPGKGLEWLV**VIWSDGSTTY**	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC**RASENIYSYLA**WYQQKQGKSPQLLVY**NAKT**	域 3

	NSALKSRLSISKDNSKSQVF LKMNSLQTDDTAMYYCAR **HADDYGFAWFAY**WGQGTL VTVSA(SEQ ID No. 45)	**LAE**GVPSRFSGSGSGTQFS LKINSLQPEDFGSYYC**QH HYGTPPT**FGGGTKLEIK(S EQ ID No. 46)	
4D9-12	EFQLQQSGPELVKPGASVKI SCKASGYSFT**DYNMN**WVK QSNGKSLEWIG**VINPNYGTT SYNQKFKG**KATLTVDQSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYYC AR**SSTTVVDWYFDV**WGTG TTVTVSS(SEQ ID No. 47)	DIQMTQSPSSLSASLGERV SLTC**RASQEISGYLS**WLQ QKPDGTIKRLIY**AASTLDS** GVPKRFSGSRSGSDYSLTI SSLESEDFADYYC**LQYAS YPFT**FGSGTKLEIK(SEQ ID No. 48)	域 4
5H4-9	QVQVQQPGAELVRPGTSVK LSCKASGYTFT**RYWMY**WV KQRPGQGLEWIG**VIDPSDNF TYYNQKFKG**KATLTVDTSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC AR**GYGSSYVGY**WGQGTTL TVSS(SEQ ID No. 49)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQ ASISC**RSSQSLVHSNGNT YLH**WYLQKPGQSPKLLIY **KVSNRFS**GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGV YFC**SQSTHVPP**WTFGGGT KLEIK(SEQ ID No. 50)	域 4
10C1-D9	QVTLKESGPGILQSSQTLSLT CSFSGFSLS**TSDMGVS**WIRQ PSGKGLEWLA**HIYWDDDK RYNPSLKS**RLTISKDASRNQ VFLKIATVDTADTATYYCAR **SPWIYYGHYWCFDV**WGTG TTVTVSS(SEQ ID No. 51)	DIQMTQTTSSLSASLGDR VTISC**RASQDISNYLN**WY QQKPDGTVKLLIY**YTSRL HS**GVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFC**QQG NTLPFT**FGSGTKLEIK(SE Q ID No. 52)	域 4
[0152] 15G7-2	QVQLQQSGAELVKPGASVK LSCKASGYTFT**EYTIH**WVK QRSGQGLEWIG**WFYPGSGS IKYNEKFKD**KATLTADKSS STVYMELSRLTSEDSAVYFC A**RHGDGYYLPPYYFDY**WG QGTTLTVSS(SEQ ID No. 53)	QIVLTQSPAIMSASPGEKV TMTC**SASSSVSYMY**WYQ QKPGSSPRLLIY**DTSNLAS** GVPVRFSGSGSGTSYSLTI SRMEAEDAATYYC**QQWS SYPLT**FGAGTKLELK(SEQ ID No. 54)	域 4
2B12-8	QVQLQQSGAELARPGASVK LSCKASGYIFT**SYGIS**WVKQ RTGQGLEWIG**EIYPRSGNTY YNEKFKG**KATLTADKSSST AYMELRSLTSEDSAVYFCAR **PIYYGSREGFDY**WGQGTTL TVSS(SEQ ID No. 55)	DIVLTQSPATLSVTPGDSV SLSC**RASQSISTNLH**WYQ QKSHASPRLLIK**YASQSVS** GIPSRFSGSGSGTDFTLSIN SVETEDFGIFFC**QQSYSW PYT**FGGGTKLEIK(SEQ ID No. 56)	域 4
2C4-4	QVQLQQPGAELVMPGASVK LSCKASGYTFT**SYWMH**WV KQRPGQGLEWIG**EIDPSDSY TNYNQKFKG**KSTLTVDKSS STAYIQLSSLTSEDSAVYYC AR**WASYRGYAMDY**WGQG TSVTVSS(SEQ ID No. 57)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQ ASISC**RSSQSIVHSNGNTY LE**WYLQKPGQSPKLLIY**K VSNRFS**GVPDRFSGSESG TDFTLKISRVEAEDLGVY YC**FQGSHVPWT**FGGGTK LEIK(SEQ ID No. 58)	域 5-7
3E10-7	EFQLQQSGPELVKPGASVKI SCKASGYSFT**DYNMN**WVK QSNGKSLEWIG**VINPNYGTT SYNQRFKG**KATLTVDQSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYYC	DIQMTQSPSSLSASLGERV SLTC**RASQEISGYLS**WLQ QKPDGTIKRLIY**AASTLDS** GVPKRFSGSRSGSDYSLTI SSLESEDFADYYC**LQYAS**	域 5-7

[0153]

	ARSGLRYWYFDVWGTGTTVTVSS(SEQ ID No. 59)	YPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID No. 60)	
LT22	EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWMGNIYPSDSFTNYNQKFKDRVTITADKSTSTVYLELRNLRSDDTAVYYCTRDTQERSWYFDVWGQGTLVTVSS(SEQ ID No. 61)	DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPARFSGSGSGAEFTLTISSLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIKR(SEQ ID No. 62)	域 5
伊组单抗G5_44	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGGINPGNNYATYRRKFQGRVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTREGYGNYGAWFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID No. 63)	DVQVTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLANSYGNTFLSWYLHKPGKAPQLLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGTHQPYTFGQGTKVEIKR(SEQ ID No. 64)	域 7
9A8-1	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNFAMAWVRQPPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDDAKNTQYLQMDSLRSEDTATYYCARQRNYYDGSYDYEGYTMDAWGQGTSVTVSS (SEQ ID No. 65)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRSSQDIGNYLTWFQQKVGRSPRRMIYGAIKLEDGVPSRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDVADYQCLQSIQYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID No. 66)	域 1 和 2
1G3-4	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLTNIWWDDDKNYNPSLKNRLTISKDTSINQAFLKITNVDTADTATYYCARIAHYFDGYYYVMDVWGQGTSVTVSS (SEQ ID No. 99)	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLASGGISNDLAWYQQKSGKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQSEDEADYFCQQSYKYPYTFGGGTKLELK (SEQ ID No. 100)	域 4

[0154] 与CD22结合的Fab CAR的抗原结合域可以包含来自表1中所列的任何CD22抗体的VH和/或VL序列,或其具有至少70%,80%,90%或90%序列同一性的变体,所述变体保留结合CD22的能力。

[0155] CD21

[0156] CD21,又称为CR2,是参与补体系统的成熟B细胞和滤泡树突状细胞表达的蛋白质。在成熟B细胞上,CD21与CD19和CD81形成B细胞共受体复合物。当膜IgM与抗原结合时,CD21通过附着的C3d与抗原结合。

[0157] 成熟CD21为1,408个氨基,其包括21个短的共有重复序列(SCR)(每个重复序列约60个氨基酸),加上跨膜和胞质区。

[0158] 已知针对CD21的市售单克隆抗体,例如MAB4909(MDS Systems)以及EP3093,SP186,Bu32,SP199、1F8和LT21(Abcam)。

[0159] CEACAM5

[0160] 癌胚抗原相关细胞粘附分子5(CEACAM5)是癌胚抗原(CEA)基因家族(与细胞粘附有关的一组高度相关的糖蛋白)的成员。CEACAM5在胎儿发育期间在胃肠组织中产生,但也由某些癌症包括肺癌、胰腺癌、宫颈癌和胃肠道癌表达。

[0161] CEACAM5由642个氨基酸组成,分子量约为70kDa,且具有28个潜在的N-连接糖基化位点。该蛋白质包含Ig可变区(IgV)样域(被称为N),接着是六个Ig恒定区(IgC)2型样域(被

称为A1,B1,A2,B2,A3和B3)。

[0162] 已知针对CEACAM5的市售单克隆抗体,例如EPR20721(Abcam)。

[0163] MUC1

[0164] 粘蛋白1或MUC1是具有其胞外域的大量O-连接糖基化的糖蛋白。粘蛋白排列在肺、胃、肠、眼和其他一些器官的上皮细胞顶端表面。它们通过病原体与胞外域中的寡糖结合而保护身体免受感染,从而防止病原体到达细胞表面。MUC1的过表达通常与结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌有关。

[0165] MUC1的核心蛋白质量为120-225kDa,其随着糖基化作用增加到250-500kDa。它延伸超过细胞表面200-500nm。胞外域包括20个氨基酸可变数目串联重复序列(VNTR)域,在不同个体中重复序列的数目从20至120个不等。最常见的等位基因包含41和85个重复序列。这些重复序列富含丝氨酸,苏氨酸和脯氨酸残基,其允许大量的o-糖基化。

[0166] 已知针对MUC1的市售单克隆抗体,例如EPR1203,EP1024Y,HMFG1,NCRC48,SM3,MH1和115D8(Abcam)。

[0167] FCRL5

[0168] Fc受体样蛋白5(FCRL5)是免疫球蛋白受体超家族的成员,并且Fc受体样FCRL5家族是单程I型膜蛋白,且包含8个免疫球蛋白样C2型域。成熟蛋白为106kDa。

[0169] FCRL5具有带有两个抑制性ITIM磷酸化信号传导基序的胞质尾巴。它通过在B细胞抗原受体共同刺激时募集SHP1来抑制B细胞抗原受体信号传导,从而导致减少钙内流和蛋白酪氨酸磷酸化。FCRL5和B细胞抗原受体的共同刺激促进初始B细胞的增殖和分化。FCRL5在成熟B细胞和浆细胞上表达,并由EBV蛋白诱导。它在毛细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤患者的恶性B细胞中过表达。

[0170] 已知针对FCRL5的市售单克隆抗体,例如CD307e(ThermoFisher)和REA391(Miltenyi Biotec)。

[0171] 本发明人还产生了四种新的抗FCRL5抗体,其VH,VL和CDR序列总结于表2中。CDR序列以粗体加下划线标出。

[0172] 表2

[0173]

抗体	VH	VL
1F6	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTV SGFSLT**SYTVS**WVRQPPGKGLEWI A**AISSGGSTYYNSALKS**RLSISRD TSKSQVFLKMNSLQTEDTAMYFC AR**YTTDSGFDY**WGQGVMVTVSS (SEQ ID No. 107)	DIQMTQSPSVLSASVGDRVTL SC**KASQNINKNLD**WYQQKL GEAPKLLIY**FTNNLQT**GIPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDVA TYYC**YQYNSGWT**FGGGTKL ELK(SEQ ID No. 108)
2H9	EVQLVESGGDLVQPGRSLKLSCAS SGFTFS**DYNMA**WVRQAPKKGLE WVA**TISYDGTNTYYRDSVKG**RF TISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTA TYYCAR**QDSSYVYLSWFAY**WGQ GTLVTVSS (SEQ ID No. 109)	DIQMTQSPASLSASLGETVTIE C**RASEDIYNGLT**WYQQKPGK SPQLLIS**NANCLHT**GVPSRFS GSGSGTQYSLKINSLQSEDVA SYFC**QQYYNYPWT**FGGGTK LDLK(SEQ ID No. 110)
7F10	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTV SGFSLT**SYTVS**WVRQPPGRGLEWI A**AISSGGNTYYNSGLKS**RLSISRD TSKSQVFLKMNSLQTEDTAMYFC AR**YAQIRGKDY**WGQGVMVTVSS (SEQ ID No. 111)	DIQMTQSPPILSASVGDRVTLS C**KASQNINKNLD**WYQQKHG EAPKLLIY**YTHNLQT**GIPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDVA TYYC**YQYYSGWT**FGGGTKL QLK(SEQ ID No. 112)

[0174] 或门

[0175] 本发明的CAR可以与一种或多种其他激活性或抑制性嵌合抗原受体组合使用。例如,它们可以在“逻辑门(logic-gate)”中与一种或多种其他CAR组合使用,所述CAR组合在由细胞(例如T细胞)表达时能够检测至少两种靶抗原的特定表达模式。如果将至少两种靶抗原任意指定为抗原A和抗原B,则三种可能的选项如下:

[0176] “或门(OR GATE)”-当靶细胞上存在抗原A或抗原B时,T细胞触发

[0177] “与门(AND GATE)”-仅当靶细胞上存在抗原A和抗原B两者时,T细胞触发

[0178] “与非门(AND NOT GATE)”-当靶细胞上抗原A单独存在时,T细胞触发,而在靶细胞上抗原A和抗原B两者同时存在时,T细胞不触发

[0179] 可以基于两种或多种标志物的特定表达(或缺乏表达),将表达这些CAR组合的工程化T细胞定制为对癌细胞具有强特异性。

[0180] 例如,在WO2015/075469,WO2015/075470和WO2015/075470中描述了此类“逻辑门”。

[0181] “或门”包含两个或更多个激活性CAR,每个CAR针对由靶细胞表达的不同靶抗原。或门的优点在于靶细胞上增加有效的可靶向抗原,因为它实际上是抗原A+抗原B。这对于在靶细胞上以可变或低密度表达的抗原特别重要,因为单个抗原的水平可能低于CAR-T细胞有效靶向所需的阈值。而且,它避免了抗原逃逸的现象。例如,一些淋巴瘤和白血病在CD19靶向后变为CD19阴性:如果发生这种情况时,将靶向CD19的或门与另一抗原组合使用则提供了“后备”抗原。

[0182] 本发明的Fab CAR可以与针对由靶细胞表达的第二靶抗原的第二CAR组合在或门中使用。

[0183] 对于抗CD22 Fab CAR,或门可以包含针对B细胞中表达的第二抗原(例如,CD19,CD20或CD79)的CAR。

[0184] 第二CAR可以具有任何合适的抗原结合域,例如基于scFv,域抗体(dAb)或Fab的结

合域。

[0185] 第二CAR可以包含间隔区以将抗原结合域与跨膜域在空间上分开并提供一定程度的柔性。各种序列通常用作CAR的间隔区,例如IgG1 Fc区,IgG1铰链(如上所述)或人CD8茎部。间隔区可以包含卷曲螺旋域,例如WO2016/151315中所述。

[0186] 第二CAR包含激活胞内域。它可以,例如包含来自CD3ζ的胞内域。它可以包含一个或多个如上所述的共刺激域。例如,它可以包含来自CD28、OX-40或4-1BB的胞内域。

[0187] 本发明的Fab CAR可以用于三或门(triple OR gate),其包含由靶细胞表达的针对第二抗原的第二CAR和针对第三抗原的第三CAR。

[0188] 对于抗CD22 Fab CAR,三或门可以包含针对B细胞中表达的第二抗原和第三抗原(例如CD19、CD20或CD79)的CAR。

[0189] 特别地,本发明提供了三或门,其包含:

[0190] (i)抗CD22 Fab CAR;

[0191] (ii)抗CD79 dAb CAR;和

[0192] (iii)抗CD19 scFv CAR(见图7b)。

[0193] 双重FAB CAR

[0194] 本发明的或门可以包含两个(或更多个)Fab CAR。

[0195] 与两个Fab CAR的表达相关的问题是交叉配对或错配对事件,从而产生了非功能性CAR(图11)。为了避免这样,可以使用“Crossmab”和/或“Ortho-Fab”形式,如图12中所示意性阐明的。

[0196] “Crossmab”涉及在链之间切换CL和CH1域,使得在一个分子中可变轻链(VL)连接至重链恒定域(CH);并且在另一分子中可变重链(VH)连接至轻链恒定域(CL)(图12,Crossmab 1和2)。

[0197] 以crossmab形式编码Fab CAR的核酸构建体可以具有以下结构:

[0198] VH-CL-间隔区-TM-endo-coexpr-VL-CH或

[0199] VL-CH-间隔区-TM-endo-coexpr-VH-CL

[0200] 其中:

[0201] VH是编码重链可变区的核酸序列;

[0202] CH是编码重链恒定区的核酸序列;

[0203] 间隔区是编码间隔区的核酸序列;

[0204] TM是编码跨膜域的核酸序列;

[0205] endo是编码胞内域的核酸序列;

[0206] coexpr是使第一多肽和第二多肽能够共表达的核酸序列;

[0207] VL是编码轻链可变区的核酸序列;和

[0208] CL是编码轻链恒定区的核酸序列。

[0209] “Ortho-Fab”涉及引入突变以避免替代组合。例如,可以将具有庞大的侧链的氨基酸经工程化改造成一条链(例如,CL)以产生突出物,并且可以将正确配对的域(例如CH)经工程化改造来容纳突出物。可选择地,或另外地,可以将带电的侧链经工程化改造为一条链(例如,将VH经工程化改造为具有带正电荷的氨基酸),并且将正确配对的域(例如VL)经工程化改造为具有带负电荷的氨基酸。

[0210] 本发明的双重Fab CAR可以包含以野生型Fab CAR形式具有如SEQ ID No.69-74所示的CDR的CD19 Fab CAR;和以orthoFab或crossmab1 Fab CAR形式具有如SEQ ID No.93-98所示的CDR的CD22 Fab CAR。

[0211] CD79结合物

[0212] 术语“CD79”或“分化簇79”是指B细胞表面涵盖两个跨膜蛋白CD79a和CD79b的蛋白质,所述两个跨膜蛋白形成二硫键连接的异二聚体,并且是免疫球蛋白(Ig)基因超家族的成员。跨膜CD79a和CD79b蛋白在细胞外末端与五种不同类型的跨膜Ig分子(IgM,IgD,IgG,IgE或IgA)中的任何一种偶联,这些分子是由两条Ig重链和两条Ig轻链组成的二硫化物连接的蛋白质。B细胞表面CD79和免疫球蛋白的这种组合形成了B细胞信号传导受体(BCR)。CD79a和CD79b的胞质内域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),其在抗原诱导的BCR聚集后将激活信号传输至B细胞。

[0213] CD79表达仅限于前B细胞和成熟B细胞(浆细胞除外)。CD79在大多数B细胞来源的恶性肿瘤中也有表达。这种狭窄的表达模式使其成为癌症靶向疗法有希望的靶标,对正常组织的靶向性最低。

[0214] 术语“CD79a”或“CD79A”是指B细胞抗原受体复合物相关蛋白alpha链,又被称为Ig-alpha,MB-1膜糖蛋白,膜结合免疫球蛋白相关蛋白和表面IgM相关蛋白。CD79a的人同等型于2018年4月20日在Uniprot数据库中以登录号P11912.1(同等型1或长)和P11912.2(同等型2或短)进行了描述。

[0215] 术语“CD79b”或“CD79B”是指B细胞抗原受体复合物相关蛋白beta链,又被称为Ig-beta,B细胞特异性糖蛋白B29和免疫球蛋白相关B29蛋白。CD79b的人同等型于2018年4月20日的在Uniprot数据库中以登录号P40259-1(同等型长),P40259-2(同等型短)和P40259-3(同等型3)进行了描述。

[0216] 活化的B淋巴细胞具有增加量的短或截短CD79同等型。在特定的实施方案中,本发明涉及特异性结合CD79a的CAR。在优选实施方案中,CAR结合未剪接部分或CD79a胞外域,即CD79a同等型1的残基33至143,如下示为SEQ ID No.67(Uniprot登录号P11912.1)。在另一特定实施方案中,本发明涉及特异性结合CD79b的CAR。在另一优选实施方案中,CAR结合未剪接部分或CD79b胞外域,即CD79b同等型长的残基29至159,如下示为SEQ ID No.68(Uniprot登录号P40259-1)。

[0217] CD79a同等型1-SEQ ID No.67

[0218] MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP

[0219] CD79b同等型2-SEQ ID No.68

[0220] MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

[0221] 本发明提供了包含结合CD79的嵌合抗原受体(CAR)的或门。

[0222] CAR可以特异性结合CD79A。例如,它可以结合CD79A胞外域的未剪接部分(SEQ ID NO:67的残基33至143)。

[0223] CAR可以特异性结合CD79B。例如,它可以结合CD79B胞外域的未剪接部分(SEQ ID NO:68的残基29至159)。

[0224] 许多抗CD79抗体是本领域已知的,例如JCB117、SN8、CB3.1和2F2(Polatuzumab)。

[0225] CD79结合域可以包含

[0226] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0227] CDR1-SDYAWN(SEQ ID No.5);

[0228] CDR2-NIWYSGSTTYNPSLKS(SEQ ID No.6)

[0229] CDR3-MDF(SEQ ID No.7);和

[0230] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0231] CDR1-RASESVDSYGKTFMHWH(SEQ ID No.8);

[0232] CDR2-RVSNLES(SEQ ID No.9);

[0233] CDR3-QQSNEDPFT(SEQ ID No.10)。

[0234] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0235] SEQ ID No.11-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0236] EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSS

[0237] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列:

[0238] SEQ ID No 12-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0239] DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKR

[0240] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列:

[0241] SEQ ID NO:13(鼠抗食蟹猴(Macaca fascicularis)CD79b 10D10 scFv)

[0242] DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSS

[0243] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其抗原结合域包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0244] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14);

[0245] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15);

[0246] CDR3-RVPVYFDY(SEQ ID No.16);和

[0247] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0248] CDR1-KASQSVDYDGDSFLN(SEQ ID No.17);

[0249] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18);

[0250] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0251] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0252] SEQ ID No.20-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0253] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSS

[0254] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列：

[0255] SEQ ID No.21-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0256] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR

[0257] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列：

[0258] SEQ ID NO:22(人源化抗CD79b-v17 scFv)

[0259] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSS

[0260] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区以下序列：

[0261] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14)；

[0262] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15)；

[0263] CDR3-RVPIRLDY(SEQ ID No.23)；和

[0264] b)具有CDR的轻链可变区(VH),所述CDR具有以下序列：

[0265] CDR1-KASQSVDYDGDSFLN(SEQ ID No.17)；

[0266] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18)；

[0267] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0268] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列：

[0269] SEQ ID No.24-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0270] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0271] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列：

[0272] SEQ ID No.21-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0273] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR

[0274] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列：

[0275] SEQ ID NO:25(人源化抗CD79b v18 scFv)

[0276] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0277] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列：

[0278] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14)；

[0279] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15)；

[0280] CDR3-RVPIRLDY(SEQ ID No.23);和

[0281] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0282] CDR1-KASQSVDYEGDSFLN(SEQ ID No.26);

[0283] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18);

[0284] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0285] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0286] SEQ ID No.24-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0287] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0288] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列:

[0289] SEQ ID No.27-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0290] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR

[0291] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列:

[0292] SEQ ID NO:28(人源化抗CD79b v28 scFv)

[0293] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0294] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0295] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14);

[0296] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15);

[0297] CDR3-RVPIRLDY(SEQ ID NO:23);和

[0298] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0299] CDR1-KASQSVDYSGDSFLN(SEQ ID No.29);

[0300] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18);

[0301] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0302] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0303] SEQ ID No.24-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0304] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0305] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列:

[0306] SEQ ID No.30-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0307] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPKLFIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR

[0308] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列:

[0309] SEQ ID NO:31(人源化抗CD79b v32 scFv)

[0310] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPK

LFIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATF
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0311] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0312] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14);

[0313] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15);

[0314] CDR3-RVPVYFDY(SEQ ID NO:16);和

[0315] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0316] CDR1-KASQSVDYDGDSFLN(SEQ ID No.17);

[0317] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18);

[0318] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0319] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0320] SEQ ID No.32-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0321] EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSS

[0322] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列:

[0323] SEQ ID No.33-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0324] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKR

[0325] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列:

[0326] SEQ ID NO:34(鼠抗CD79b SN8 scFv)

[0327] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPK
LFIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKATF
TADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSS

[0328] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0329] CDR1-SYWIE(SEQ ID No.14);

[0330] CDR2-EILPGGGDTNYNEIFKG(SEQ ID No.15);

[0331] CDR3-RVPIRLDY(SEQ ID NO:23);和

[0332] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0333] CDR1-KASQSVDYEGDSFLN(SEQ ID No.26);

[0334] CDR2-AASNLES(SEQ ID No.18);

[0335] CDR3-QQSNEDPLT(SEQ ID No.19)。

[0336] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列:

[0337] SEQ ID No.24-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0338] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0339] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列：

[0340] SEQ ID No.27-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0341] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR

[0342] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列：

[0343] SEQ ID NO:28(人源化抗CD79b 2F2 scFv)

[0344] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS

[0345] 可选择地,抗CD79 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列：

[0346] CDR1-NYGMN(SEQ ID No.15)；

[0347] CDR2-RIYPGSGSTNYQKFKG(SEQ ID No.16)；

[0348] CDR3-YAMDY(SEQ ID NO:35)；和

[0349] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列：

[0350] CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE(SEQ ID No.18)；

[0351] CDR2-KVSNRPS(SEQ ID No.19)；

[0352] CDR3-FQGSHVPWT(SEQ ID No.20)。

[0353] 抗CD79 CAR可以包含以下VH序列：

[0354] SEQ ID No.36-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0355] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQRPGQGLQWIGRIYPGSGSTNYQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSENSAVYYCARYAMDYTGQGTSVTVSS

[0356] 抗CD79 CAR可以包含以下VL序列：

[0357] SEQ ID No.37-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0358] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRPSGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVQAQNLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKR

[0359] 抗CD79 CAR可以包含以下scFv序列：

[0360] SEQ ID NO:38(鼠抗CD79a scFv)

[0361] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRPSGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVQAQNLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQRPGQGLQWIGRIYPGSGSTNYQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSENSAVYYCARYAMDYTGQGTSVTVSS

[0362] 有可能在所述CDR或每个CDR中引入一个或多个突变(取代、添加或缺失),而不负面影响CD79结合活性。每个CDR可以,例如具有一个、两个或三个氨基酸突变。

[0363] CD19结合物

[0364] 先前已经以CAR形式描述了几种抗CD19抗体,例如fmc63、4G7、SJ25C1、CAT19(如WO2016/139487中所述)和CD19ALAb(如WO2016/102965中所述)。

[0365] 用于本发明的双或三或门的抗CD19 CAR可以包含衍生自这些抗CD19抗体中的一

个的抗原结合域,例如scFv型抗原结合域。

[0366] CD19结合域可以包含:

[0367] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0368] CDR1-GYAFSSS(SEQ ID No.69);

[0369] CDR2-YPGDED(SEQ ID No.70);

[0370] CDR3-SLLYGDYLDY(SEQ ID No.71);和

[0371] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0372] CDR1-SASSSVSYMH(SEQ ID No.72);

[0373] CDR2-DTSKLAS(SEQ ID No.73);

[0374] CDR3-QQWNINPLT(SEQ ID No.74)。

[0375] 可以在每个CDR中引入一个或多个突变(取代、添加或缺失),而不负面影响CD19结合活性。每个CDR可以,例如具有一个、两个或三个氨基酸突变。

[0376] CDR可以是单链可变片段(scFv)的形式,其是抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的融合蛋白,与10至约25个氨基酸的短接头肽连接。scFv可以在定向为VH-VL,即VH在CAR分子的氨基末端,且VL域连接至间隔区,并依次连接至跨膜域和胞内域。

[0377] CDR可以被移植到人抗体或scFv的框架上。例如,本发明的CAR可以包含由以下序列中的一种组成或包含以下序列中的一种的CD19结合域:

[0378] 抗CD19 CAR可以包含以下VH序列:

[0379] SEQ ID No.75-来自鼠单克隆抗体的VH序列

[0380] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSS

[0381] 抗CD19 CAR可以包含以下VL序列:

[0382] SEQ ID No 76-来自鼠单克隆抗体的VL序列

[0383] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

[0384] 抗CD19 CAR可以包含以下scFv序列:

[0385] SEQ ID No 77-来自鼠单克隆抗体的VH-VL scFv序列

[0386] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEAEDAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKR

[0387] 可选择地,抗CD19 CAR可以包含抗原结合域,其包含a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0388] CDR1-SYWMN(SEQ ID No.78);

[0389] CDR2-QIWPGDGDTNYNGKFK(SEQ ID No.79);

[0390] CDR3-RETTTVGRYYYAMDY(SEQ ID No.80);和

[0391] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0392] CDR1-KASQSVDYDGDSYLN(SEQ ID No.81);

[0393] CDR2-DASNLVS(SEQ ID No.82);

[0394] CDR3-QQSTEDPWT(SEQ ID No.83)。

[0395] 可以在所述CDR或每个CDR中引入一个或多个突变(取代、添加或缺失),而不负面影响CD19结合活性。每个CDR可以,例如具有一个、两个或三个氨基酸突变。

[0396] 本发明的CAR可以包含以下氨基酸序列中的一种:

[0397] SEQ ID No.84(鼠CD19ALAb scFv序列)

[0398] QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

[0399] SEQ ID No.85(人源化CD19ALAb scFv序列-重链19,κ16)

[0400] QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKGTLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0401] SEQ ID No.86(人源化CD19ALAb scFv序列-重链19,κ7)QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKGTLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLIYDASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0402] scFv可以以VH-VL定向(如SEQ ID No.84、85和86所示)或以VL-VH定向。

[0403] 本发明的CAR可以包含以下VH序列中的一种:

[0404] SEQ ID No.87(鼠CD19ALAb VH序列)

[0405] QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0406] SEQ ID No.88(人源化CD19ALAb VH序列)

[0407] QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKGTLVTVSS

[0408] 抗CD19 CAR可以包含以下VL序列中的一种:

[0409] SEQ ID No.89(鼠CD19ALAb VL序列)

[0410] DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK

[0411] SEQ ID No.90(人源化CD19ALAb VL序列,κ16)

[0412] DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0413] SEQ ID No.91(人源化CD19ALAb VL序列,κ7)

[0414] DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLIYDASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

[0415] CAR可以包含与SEQ ID No.84至91所示序列具有至少80%,85%,90%,95%,98%或99%序列同一性的变体,条件是该变体序列保留结合CD19的能力(如果适用,与互补的VL或VH域结合)。

[0416] 两条多肽序列之间的同一性百分比可以容易地通过程序如BLAST来确定,该程序可从http://blast.ncbi.nlm.nih.gov免费获得。

[0417] 核酸构建体

[0418] 本发明还提供了编码本发明嵌合受体的核酸构建体。

[0419] 编码Fab CAR的核酸构建体(图6A)可以具有以下结构:

[0420] VH-CH-间隔区-TM-endo-coexpr-VL-CL或

[0421] VL-CL-间隔区-TM-endo-coexpr-VH-CH

[0422] 其中:

[0423] VH是编码重链可变区的核酸序列;

[0424] CH是编码重链恒定区的核酸序列;

[0425] 间隔区是编码间隔区的核酸序列;

[0426] TM是编码跨膜域的核酸序列;

[0427] endo是编码胞内域的核酸序列;

[0428] coexpr是使第一多肽和第二多肽能够共表达的核酸序列;

[0429] VL是编码轻链可变区的核酸序列;和

[0430] CL是编码轻链恒定区的核酸序列。

[0431] 对于上述两种结构,编码这两种多肽的核酸序列在构建体中可以是任何顺序。

[0432] 还提供了编码或门的核酸构建体,其包含两个或更多个CAR,其中至少一个是根据本发明的Fab CAR。

[0433] 编码双或门的核酸构建体可以具有以下结构:

[0434] VH-CH-间隔区1-TM1-endo1-coexpr1-VL-CL-coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2;或

[0435] VL-CL-间隔区-TM1-endo1-coexpr1-VH-CH-coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2

[0436] 其中:

[0437] VH是编码第一CAR的重链可变区的核酸序列;

[0438] CH是编码第一CAR的重链恒定区的核酸序列;

[0439] 间隔区1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列;

[0440] TM1是编码第一CAR的跨膜域的核酸序列;

[0441] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列;

[0442] Coexpr1和coexpr2,可以相同或不同,是使第一CAR的第一多肽和第二多肽;以及第一CAR和第二CAR能够共表达的核酸序列;

[0443] VL是编码第一CAR的轻链可变区的核酸序列;

[0444] CL是编码第一CAR的轻链恒定区的核酸序列;

[0445] AgBD是编码第二CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0446] 间隔区2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列;

[0447] TM2是编码第二CAR的跨膜域的核酸序列;以及

[0448] Endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列。

[0449] 第二CAR的抗原结合域可以是,例如scFv或dAb。

[0450] 对于上述两种结构,编码第一CAR的两条多肽的核酸序列;以及编码第一CAR和第

二CAR的核酸序列在构建体中可以是任何顺序。

[0451] 还提供了编码三或门的核酸构建体,其包含三个CAR,其中一个是根据本发明的Fab CAR。

[0452] 编码三或门的核酸构建体可以具有以下结构:

[0453] VH-CH-间隔区1-TM1-endo1-coexpr1-VL-CL-coexpr2-AgBD2-间隔区2-TM2-endo2-coexpr3-AgBD3-间隔区3-TM3-endo3;或

[0454] VL-CL-间隔区1-TM1-endo1-coexpr1-VH-CH-coexpr2-AgBD2-间隔区2-TM2-endo2-coexpr3-AgBD3-间隔区3-TM3

[0455] 其中:

[0456] VH是编码第一CAR的重链可变区的核酸序列;

[0457] CH是编码第一CAR的重链恒定区的核酸序列;

[0458] 间隔区1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列;

[0459] TM1是编码第一CAR的跨膜域的核酸序列;

[0460] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列;

[0461] Coexpr1、coexpr2和coexpr3,可以相同或不同,是使第一CAR的第一多肽和第二多肽;以及第一CAR,第二CAR和第三CAR能够共表达的核酸序列;

[0462] VL是编码第一CAR的轻链可变区的核酸序列;

[0463] CL是编码第一CAR的轻链恒定区的核酸序列;

[0464] AgBD2是编码第二CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0465] 间隔区2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列;

[0466] TM2是编码第二CAR的跨膜域的核酸序列;

[0467] Endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列;

[0468] AgBD3是编码第三CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0469] 间隔区3是编码第三CAR的间隔区的核酸序列;

[0470] TM3是编码第三CAR的跨膜域的核酸序列;以及

[0471] Endo3是编码第三CAR的胞内域的核酸序列。

[0472] 第二和第三CAR的抗原结合域可以是,例如scFv或dAb。特别地,一个CAR可以具有dAb抗原结合域,而另一个可以具有scFv抗原结合域。

[0473] 特别地,构建体可以如图7a所示。构建体可以编码如图7b所示的三个CAR,即针对CD22的Fab CAR;针对CD79的dAb CAR和针对CD19的scFV CAR。

[0474] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0475] 本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。另外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响本文所述多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要在其中表达多肽的任何具体宿主生物体的密码子使用。

[0476] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是其中包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。对寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些包括甲基膦酸酯和硫代磷酸酯主链,在分子的3’和/或5’末端处添加吖啶或聚赖氨酸链。出于本文所述用途的目的,应理解,可以通过本领域可用的任何方法修饰多核苷

酸。可以进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0477] 关于核苷酸序列的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括从该序列或对该序列的一个(或多个)核酸进行的任何取代、变化、修饰、替换、缺失或添加。

[0478] 在以上结构中,“coexpr””是使两种多肽作为单独实体能够共表达的核酸序列。其可以是编码切割位点的序列,使得核酸构建体产生通过切割位点接合的两种多肽。切割位点可以是自切割的,使得当产生多肽时,其立即切割成单独的肽而不需要任何外部切割活性。

[0479] 切割位点可以是能够使两种多肽分开的任何序列。

[0480] 术语“切割”在本文中为了方便而使用,但是切割位点可以通过除经典切割外的机制将肽分离成单独的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV)2A自切割肽(参见下文),已经提出了各种模型来解释“切割”活性:由宿主-细胞蛋白酶蛋白水解,自体蛋白水解或翻译效应(Donnelly et al(2001)J.Gen.Virol.82:1027-1041)。只要当位于编码蛋白质的核酸序列之间的切割位点导致蛋白质作为单独的实体表达时,此类“切割”的确切机制对于本发明的目的而言就并不重要。

[0481] 切割位点可以是例如弗林蛋白酶(furin)切割位点、烟草蚀刻病毒(TEV)切割位点或编码自切割肽。

[0482] “自切割肽”是指下述肽,该肽发挥功能使得当包含蛋白质和自切割肽的多肽产生时,其立即被“切割”或分离成不同的且离散的第一和第二多肽,而不需要任何外部切割活性。

[0483] 自切割肽可以是来自口蹄病毒或心脏病毒的2A自切割肽。口蹄病毒和心脏病毒的主要2A/2B切割由在其自身C端“切割”的2A介导。在口蹄病毒例如口蹄疫病毒(FMDV)和马鼻炎A病毒中,2A区域是约18个氨基酸的短区段,其与蛋白2B的N端残基(保守的脯氨酸残基)一起代表了能够在其自身C端介导“切割”的自主元件(Donelly et al(2001),如上文)。

[0484] 已经在除口蹄病毒或心脏病毒外的小核糖核酸病毒,“小核糖核酸病毒样”昆虫病毒,C型轮状病毒,锥虫属物种中的重复序列和细菌序列中发现了“2A样”序列(Donelly et al(2001),如上文)。

[0485] 切割位点可以包含如SEQ ID No.92(RAEGRGSLLTCGDVEENPGP)所示的2A样序列。

[0486] 载体

[0487] 本发明还提供了载体或载体的试剂盒,其包含一个或多个编码根据本发明的嵌合受体的一种或多种核酸序列。此类载体可以用于将核酸序列引入到宿主细胞中,使得其表达根据本发明第一方面的嵌合多肽。

[0488] 载体可以是例如质粒或病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体,或基于转座子的载体或合成的mRNA。

[0489] 载体可以能够转染或转导T细胞或NK细胞。

[0490] 细胞

[0491] 本发明提供了细胞,其包含本发明的嵌合抗原受体。细胞可以包含两个或更多个CAR,例如其可以包含如以上所述的双或三或门。

[0492] 细胞可以包含本发明的核酸或载体。

[0493] 细胞可以是细胞裂解性免疫细胞,如T细胞或NK细胞。

[0494] T细胞或T淋巴细胞是在细胞介导的免疫中发挥中心作用的淋巴细胞类型。通过细胞表面存在的T细胞受体(TCR),它们可以与其他淋巴细胞例如B细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)区分开来。存在多种类型的T细胞,如下文总结的。

[0495] 辅助性T辅助细胞(TH细胞)在免疫学过程中辅助其他白细胞,包括B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及激活细胞毒性T细胞和巨噬细胞。TH细胞在其表面表达CD4。当它们通过抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC II类分子呈递肽抗原时,TH细胞得以活化。这些细胞可以分化成几种亚型之一,包括TH1、TH2、TH3、TH17、Th9或TFH,其分泌不同的细胞因子以促进不同类型的免疫应答。

[0496] 细胞裂解性T细胞(TC细胞或CTL)破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且也涉及移植排斥。CTL在其表面处表达CD8。这些细胞通过与存在于所有有核细胞表面上的MHC I类缔合的抗原结合而识别其靶标。通过调节性T细胞分泌的IL-10、腺苷和其他分子,可以使CD8+细胞失活至无能力状态,这防止自身免疫性疾病,如实验性自身免疫性脑脊髓炎。

[0497] 记忆T细胞是在感染已经解决之后长期持续的抗原特异性T细胞的亚组。它们在再次暴露于其同源抗原后迅速扩增为大量效应T细胞,从而为免疫系统提供针对过去感染的“记忆”。记忆T细胞包含三种亚型:中央记忆T细胞(TCM细胞)和两种类型的效应记忆T细胞(TEM细胞和TEMRA细胞)。记忆细胞可以是CD4+或CD8+。记忆T细胞通常表达细胞表面蛋白CD45RO。

[0498] 以前称为抑制性T细胞的调节性T细胞(Treg细胞)对于维持免疫耐受性至关重要。它们的主要作用是关闭T细胞介导的免疫以朝向免疫反应的结束,和抑制逃避胸腺中阴性选择过程的自身反应性T细胞。

[0499] 已经描述了两种主要类型的CD4+Treg细胞,即天然存在的Treg细胞和适应性Treg细胞。

[0500] 天然存在的Treg细胞(也称为CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞)出现在胸腺中,并且已经与发育中的T细胞和已经用TSLP激活的髓样(CD11c+)和浆细胞样(CD123+)树突状细胞两者之间的相互作用相关。天然存在的Treg细胞可以通过称为FoxP3的细胞内分子的存在与其他T细胞区分开来。FOXP3基因的突变可以阻止调节性T细胞发育,导致致命的自身免疫性疾病IPEX。

[0501] 适应性Treg细胞(也称为Tr1细胞或Th3细胞)可以在正常免疫应答期间起源。

[0502] 细胞可以是自然杀伤细胞(或NK细胞)。NK细胞形成先天免疫系统的一部分。NK细胞以不依赖于MHC的方式对来自病毒感染细胞的先天信号提供快速应答。

[0503] NK细胞(属于先天性淋巴样细胞的组)定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),并构成从生成B和T淋巴细胞的共同淋巴样祖细胞分化的第三种细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾、扁桃体和胸腺中分化和成熟,在那里它们进入循环。

[0504] 本发明的细胞可以是以上描述的任何细胞类型。

[0505] 根据本发明第一方面的T细胞或NK细胞可以从患者自己的外周血(第一方)离体创建,或在来自供体外周血的造血干细胞移植物(第二方)的环境中创建,或来自不相关供体的外周血(第三方)。

[0506] 可选择地,根据本发明第一方面的T细胞或NK细胞可以衍生自诱导型祖细胞或胚胎祖细胞离体分化为T或NK细胞。可选择地,可以使用保留其裂解功能并且可以充当治疗剂

的永生化T细胞系。

[0507] 在所有这些实施方案中,通过包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染的许多方式之一引入编码嵌合多肽的DNA或RNA来生成表达嵌合多肽的细胞。

[0508] 本发明的细胞可以是来自受试者的离体T细胞或NK细胞。T细胞或NK细胞可以来自外周血单个核细胞(PBMC)样品。可以在用编码提供根据本发明第一方面的嵌合多肽的分子的核酸转导之前活化和/或扩增T细胞或NK细胞,例如通过用抗CD3单克隆抗体处理。

[0509] 本发明的T细胞或NK细胞可以通过以下制备:

[0510] (i)从受试者或上文列出的其他来源分离含有T细胞或NK细胞的样品;和

[0511] (ii)用一种或多种编码嵌合多肽的核酸序列转导或转染T细胞或NK细胞。

[0512] 然后可以纯化T细胞或NK细胞,例如通过基于抗原结合多肽的抗原结合域的表达进行选择来进行。

[0513] 药物组合物

[0514] 本发明还涉及包含多个根据本发明的细胞的药物组合物。

[0515] 药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。此类配制剂可以是例如适合用于静脉内输注的形式。

[0516] 治疗方法

[0517] 本发明提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,其包括向受试者施用本发明的细胞(例如在上文所述的药物组合物中)的步骤。

[0518] 用于治疗疾病的方法涉及本发明细胞的治疗性用途。在本文中,可以对已患有疾病或病况的受试者施用细胞以减轻、降低或改善至少一种与疾病相关的症状和/或减缓、降低或阻断疾病的进展。

[0519] 用于预防疾病的方法涉及本发明的细胞的预防性用途。在本文中,可以对尚未感染疾病和/或未显示任何疾病症状的受试者施用此类细胞,以预防或削弱疾病的起因,或减少或预防至少一种与疾病有关的症状的形成。受试者可以具有疾病的素因,或被认为有形成疾病的风险。

[0520] 方法可以涉及以下步骤:

[0521] (i)分离含有T细胞或NK细胞的样品;

[0522] (ii)用本发明提供的核酸序列或载体转导或转染此类细胞;

[0523] (iii)向受试者施用来自(ii)的细胞。

[0524] 可以从受试者或从其他来源分离含有T细胞或NK细胞的样品,例如如上所述。可以从患者自己的外周血(第一方),或在来自供体外周血的造血干细胞移植物(第二方)的环境中,或从来自不相关供体的外周血(第三方)分离T细胞或NK细胞。

[0525] 本发明提供了本发明的表达嵌合多肽的细胞,其用于治疗和/或预防疾病。

[0526] 本发明还涉及本发明的表达嵌合多肽的细胞在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途。

[0527] 通过本发明的方法治疗和/或预防的疾病可以是癌性疾病,如膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肾癌(肾细胞)、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌和甲状腺癌。

[0528] 该疾病可以是多发性骨髓瘤(MM)、B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、神经母细胞瘤、T细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL)或弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0529] 本发明的细胞可以能够杀伤靶细胞,如癌细胞。靶细胞的特征可以在于在靶细胞附近存在肿瘤分泌的配体或趋化因子配体。靶细胞的特征可以在于可溶配体的存在以及靶细胞表面肿瘤相关抗原(TAA)的表达。

[0530] 本发明的细胞和药物组合物可以用于治疗和/或预防上述疾病。

[0531] 其他方面

[0532] 本发明还提供了新的CD22结合抗体,被称为9A8-1。9A8的VH,VL和CDR序列如以上表1所示。

[0533] 该抗体在CAR中显示出特别好的功效。例如,如以下实施例3中所示,Fab CAR形式中的9A8-1显示出与具有替代CD22结合物3B4的等量CAR相比改善的靶细胞杀伤和细胞因子释放。

[0534] 本发明还提供在以下编号的段落中概述的方面。

[0535] 1.抗原结合域,其包含:

[0536] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0537] CDR1-NFAMA(SEQ ID No.93)

[0538] CDR2-SISTGGGNTYYRDSVKG(SEQ ID No.94)

[0539] CDR3-QRNYYDGSYDYEGYTMDA(SEQ ID No.95);和

[0540] b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0541] CDR1-RSSQDIGNYLT(SEQ ID No.96)

[0542] CDR2-GAIKLED(SEQ ID No.97)

[0543] CDR3-LQSIQYP(SEQ ID No.98)。

[0544] 2.根据段落1的抗原结合域,其包含具有如SEQ ID No.65所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.66所示的序列的VL域。

[0545] 3.抗体,其包含根据段落1或2的抗原结合域。

[0546] 4.抗体-药物缀合物(ADC)或双特异性T细胞衔接器(BiTE),其包含根据段落3的抗体。

[0547] 5.嵌合抗原受体(CAR),其包含根据段落1或2的抗原结合域。

[0548] 6.根据段落5的CAR,其为Fab CAR。

[0549] 7.根据段落5的CAR,其为scFv CAR。

[0550] 8.核酸序列,其编码根据段落1或2的抗原结合域,和根据段落3的抗体,根据段落4的ADC或BiTE,或根据段落5至7中任一项的CAR。

[0551] 9.根据段落8的核酸序列,其编码根据段落5至7中任一项的CAR,并且具有至少60%的GC含量。

[0552] 10.根据段落8的核酸序列,其编码根据段落5至7中任一项的CAR,并且具有约64%的GC含量。

[0553] 11.根据段落8至10中任一项的核酸序列,其包含延伸因子1-alpha(EF1α)启动子。

[0554] 12.核酸构建体,其包含根据段落8至11中任一项的第一核酸序列和编码抗CD19

CAR的第二核酸序列,所述第一核酸序列编码根据段落5至7中任一项的CAR。

[0555] 13.根据段落12的核酸构建体,其中所述抗CD19 CAR的抗原结合域包含

[0556] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0557] CDR1-GYAFSSS(SEQ ID No.69)

[0558] CDR2-YPGDED(SEQ ID No.70)

[0559] CDR3-SLLYGDYLDY(SEQ ID No.71);和

[0560] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0561] CDR1-SASSSVSYMH(SEQ ID No.72)

[0562] CDR2-DTSKLAS(SEQ ID No.73)

[0563] CDR3-QQWNINPLT(SEQ ID No.74)。

[0564] 14.根据段落13的核酸构建体,其中所述抗CD19 CAR的抗原结合域包含如SEQ ID No.75所示的VH域和如SEQ ID No.76所示的VL域。

[0565] 15.根据段落12至14中任一项的核酸构建体,其中所述抗CD22 CAR为Fab形式,所述核酸构建体具有以下一般结构:

[0566] VH-CH-间隔区1-TM1-endo1-coexpr1-VL-CL-coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2;

[0567] VL-CL-间隔区-TM1-endo1-coexpr1-VH-CH-coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2;

[0568] AgBD-间隔区2-TM2-endo2-VH-CH-间隔区1-TM1-endo1-coexpr2-VL-CL;

[0569] AgBD-间隔区2-TM2-endo2-coexpr1-VL-CL-间隔区-TM1-endo1-coexpr2-VH-CH;

[0570] VL-CL-coexpr1-VH-CH-间隔区1-TM1-endo1--coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2;

[0571] VH-CH-coexpr1-VL-CL-间隔区-TM1-endo1-coexpr2-AgBD-间隔区2-TM2-endo2;

[0572] AgBD-间隔区2-TM2-endo2-VL-CL-coexpr2-VH-CH-间隔区1-TM1-endo1;或

[0573] AgBD-间隔区2-TM2-endo2-coexpr1-VH-CH-coexpr2-VL-CL-间隔区-TM1-endo1

[0574] 其中:

[0575] VH是编码第一CAR的重链可变区的核酸序列;

[0576] CH是编码第一CAR的重链恒定区的核酸序列;

[0577] 间隔区1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列;

[0578] TM1是编码第一CAR的跨膜域的核酸序列;

[0579] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列;

[0580] Coexpr1和coexpr2,可以相同或不同,是使第一CAR的第一多肽和第二多肽,以及第二CAR能够共表达的核酸序列;

[0581] VL是编码第一CAR的轻链可变区的核酸序列;

[0582] CL是编码第一CAR的轻链恒定区的核酸序列;

[0583] AgBD是编码第二CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0584] 间隔区2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列;

[0585] TM2是编码第二CAR的跨膜域的核酸序列;以及

[0586] Endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列。

[0587] 16.根据段落12至14中任一项的核酸构建体,其中所述抗CD22 CAR为ScFv形式,所述核酸构建体具有以下一般结构:

[0588] AgBD1-间隔区1-TM1-endo1-coexpr-AgBD2-间隔区2-TM2-endo2;或

[0589] AgBD2-间隔区2-TM2-endo2-coexpr-AgBD1-间隔区1-TM1-endo1

[0590] 其中:

[0591] AgBD1是编码第一CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0592] 间隔区1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列;

[0593] TM1是编码第一CAR的跨膜域的核酸序列;且

[0594] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列;

[0595] Coexpr是使第一CAR和第二CAR能够共表达的核酸序列;

[0596] AgBD2是编码第二CAR的抗原结合域的核酸序列;

[0597] 间隔区2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列;

[0598] TM2是编码第二CAR的跨膜域的核酸序列;以及

[0599] Endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列。

[0600] 17.载体,其包含根据段落8至11中任一项的核酸序列或根据段落12至16中任一项的核酸构建体。

[0601] 18.载体的试剂盒,其包括包含如段落12至16中任一项所定义的第一核酸序列的第一载体;和包括包含如段落12至16中任一项所定义的第二核酸序列的第二载体。

[0602] 19.根据段落17或18的载体或载体的试剂盒,其是逆转录病毒载体。

[0603] 20.根据段落17或18的载体或载体的试剂盒,其是慢病毒载体。

[0604] 21.细胞,其表达段落5至7中任一项的CAR。

[0605] 22.细胞,其共表达根据段落5至7中任一项的第一CAR和第二CAR,所述第二CAR为抗CD19 CAR。

[0606] 23.根据段落22的细胞,其中所述抗CD19 CAR的抗原结合域包含

[0607] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0608] CDR1-GYAFSSS(SEQ ID No.69)

[0609] CDR2-YPGDED(SEQ ID No.70)

[0610] CDR3-SLLYGDYLDY(SEQ ID No.71);和

[0611] b)具有CDR的轻链可变区(VL),所述CDR具有以下序列:

[0612] CDR1-SASSSVSYMH(SEQ ID No.72)

[0613] CDR2-DTSKLAS(SEQ ID No.73)

[0614] CDR3-QQWNINPLT(SEQ ID No.74)。

[0615] 24.根据段落23的细胞,其中所述抗CD19 CAR的抗原结合域包含如SEQ ID No.75所示的VH域和如SEQ ID No.76所示的VL域。

[0616] 25.用于制备根据段落21至24中任一项的细胞的方法,其包括以下步骤:离体向细胞导入根据段落8至11中任一项的编码CAR的核酸序列;根据段落12至16中任一项的核酸构建体,或根据段落17至20中任一项的载体或载体的试剂盒。

[0617] 26.药物组合物,其包含多个根据段落21至24中任一项的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0618] 27.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据段落26的药物组合物的步骤。

[0619] 28.根据段落27的方法,其中所述癌症是B细胞白血病或淋巴瘤。

[0620] 29.根据段落21至24中任一项的细胞,其用于治疗癌症。

[0621] 30.根据段落21至24中任一项的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0622] 前述部分中所述的例如嵌合抗原受体,核酸序列和构建体,载体,细胞,药物组合物以及制备和使用细胞的方法的一般特征也适用于以上段落中所述的相应组分。

[0623] 本发明还提供了新的CD22结合抗体,被称为1G3-4。1G3-4的VH,VL和CDR序列如以上表1所示。

[0624] 该抗体在CAR中显示出特别好的功效。例如,如以下实施例3中所示,Fab CAR形式中的9A8-1显示出与具有替代CD22结合物3B4的等量CAR相比改善的靶细胞杀伤和细胞因子释放。

[0625] 本发明还提供在以下编号的段落中概述的方面。

[0626] A1.抗原结合域,其包含:

[0627] a)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0628] CDR1-TSGMGVG(SEQ ID No.101)

[0629] CDR2-NIWWDDDKNYNPSLKN(SEQ ID No.102)

[0630] CDR3-IAHYFDGYYYVMDV(SEQ ID No.103);和

[0631] b)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0632] CDR1-LASGGISNDLA(SEQ ID No.104)

[0633] CDR2-AASRLQD(SEQ ID No.105)

[0634] CDR3-QQSYKYPY(SEQ ID No.106)。

[0635] A2.根据段落A1的抗原结合域,其包含具有如SEQ ID No.99所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.100所示的序列的VL域。

[0636] A3.抗体,其包含根据段落A1或A2的抗原结合域。

[0637] A4.抗体-药物缀合物(ADC)或双特异性T细胞衔接器(BiTE),其包含根据段落A3的抗体。

[0638] A5.嵌合抗原受体(CAR),其包含根据段落A1或A2的抗原结合域。

[0639] A6.根据段落A5的CAR,其为Fab CAR。

[0640] A7.核酸序列,其编码根据段落A1或A2的抗原结合域,和根据段落A3的抗体,根据段落A4的ADC或BiTE,或根据段落A5或A6的CAR。

[0641] A8.载体,其包含根据段落A7的核酸序列。

[0642] A9.细胞,其表达根据段落A5或A6的CAR。

[0643] A10.用于制备根据段落A9的细胞的方法,其包括向细胞导入根据段落A7的编码CAR的核酸序列的步骤。

[0644] A11.药物组合物,其包含多个根据段落A9的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0645] A12.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据段落A11的药物组合物的步骤。

[0646] A13.根据段落A12的方法,其中所述癌症是B细胞白血病或淋巴瘤。

[0647] A14.根据段落A9的细胞,其用于治疗癌症。

[0648] A15.根据段落A9的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0649] B1.抗原结合域,其包含:

[0650] ai)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0651] CDR1-SYTVS(SEQ ID No.113)

[0652] CDR2-AISSGGSTYYNSALKS(SEQ ID No.114)

[0653] CDR3-YTTDSGFDY(SEQ ID No.115);和

[0654] bi)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0655] CDR1-KASQNINKNLD(SEQ ID No.116)

[0656] CDR2-FTNNLQT(SEQ ID No.117)

[0657] CDR3-YQYNSGWT(SEQ ID No.118);或者

[0658] aii)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0659] CDR1-DYNMA(SEQ ID No.119)

[0660] CDR2-TISYDGTNTYYRDSVKG(SEQ ID No.120)

[0661] CDR3-QDSSYVYLSWFAY(SEQ ID No.121);和

[0662] bii)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0663] CDR1-RASEDIYNGLT(SEQ ID No.122)

[0664] CDR2-NANCLHT(SEQ ID No.123)

[0665] CDR3-QQYYNYPWT(SEQ ID No.124);或者

[0666] aiii)具有互补决定区(CDR)的重链可变区(VH),所述互补决定区具有以下序列:

[0667] CDR1-SYTVS(SEQ ID No.125)

[0668] CDR2-AISSGGNTYYNSGLKS(SEQ ID No.126)

[0669] CDR3-YAQIRGKDY(SEQ ID No.127);和

[0670] biii)具有互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL),所述互补决定区具有以下序列:

[0671] CDR1-KASQNINKNLD(SEQ ID No.128)

[0672] CDR2-YTHNLQT(SEQ ID No.129)

[0673] CDR3-YQYYSGWT(SEQ ID No.130)。

[0674] B2.根据段落1的抗原结合域,其包含:i)具有如SEQ ID No.107所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.108所示的序列的VL域;或ii)具有如SEQ ID No.109所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.110所示的序列的VL域;或iii)具有如SEQ ID No.111所示的序列的VH域;和具有如SEQ ID No.112所示序列的VL域。

[0675] B3.抗体,其包含根据段落B1或B2的抗原结合域。

[0676] B4.抗体-药物缀合物(ADC)或双特异性T细胞衔接器(BiTE),其包含根据段落B3的抗体。

[0677] B5.嵌合抗原受体(CAR),其包含根据段落B1或B2的抗原结合域。

[0678] B6.根据段落B5的CAR,其为Fab CAR。

[0679] B7.核酸序列,其编码根据段落B1或B2的抗原结合域,和根据段落B3的抗体,根据段落B4的ADC或BiTE,或根据段落B5或B6的CAR。

[0680] B8.载体,其包含根据段落B7的核酸序列。

[0681] B9.细胞,其表达根据段落B5或B6的CAR。

[0682] B10.用于制备根据段落B9的细胞的方法,其包括向细胞导入根据段落B7的编码CAR的核酸序列的步骤。

[0683] B11.药物组合物,其包含多个根据段落B9的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0684] B12.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据段落B11的药物组合物的步骤。

[0685] B13.根据段落B12的方法,其中所述癌症是B细胞白血病或淋巴瘤。

[0686] B14.根据段落B9的细胞,其用于治疗癌症。

[0687] B15.根据段落B9的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0688] 前述部分中所述的例如嵌合抗原受体,核酸序列和构建体,载体,细胞,药物组合物以及制备和使用细胞的方法的一般特征也适用于以上段落中所述的相应组分。

[0689] 现在将通过实施例的方式进一步描述本发明,所述实施例旨在帮助本领域的普通技术人员实施本发明,并不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0690] 基于针对表达具有庞大的胞外域(CD22)的抗原的靶细胞的同一抗体,进行了一系列实验以比较Fab CAR与scFv CAR的作用。在细胞毒性和增殖方面,比较了表达两种类型CAR的CAR-T细胞。

[0691] 实施例1-基于FAC的杀伤(FBK)

[0692] 如以下概述产生一组CAR,并比较了它们针对表达CD22的靶细胞的细胞毒性能力。

[0693] NT:未转导的10C1-D9 Fab:基于10C1 mAb的FabCAR

[0694] 所有CAR都具有包含CD3ζ和4-1BB共刺激域的第二代胞内域。

[0695] 将T细胞与表达CD22的SupT1靶细胞以1:1的比率共培养。该测定使用$5x10^4$个转导的T细胞/孔和等数目的靶细胞,在96孔板中以0.2ml总体积进行。共培养物在转导效率标准化后建立。温育24小时后进行FBK。

[0696] FBK的结果如图4中所示。对于两种所测试的CD22结合物:10C1和1D9-3,在靶细胞杀伤方面,具有Fab抗原结合域的CAR均优于等量的具有scFv抗原结合域的CAR。

[0697] 实施例2-增殖测定(PA)

[0698] 为了测量增殖,用染料Cell Trace Violet(CTV,一种被水解并保留在细胞内的荧光染料)标记实施例1中描述的同一组表达CAR的T细胞。它被405nm(紫色)激光激发,并可以在pacific blue通道中检测到荧光。将CTV染料在DMSO中复原至5mM。将T细胞以$2x10^6$个细胞/ml重悬于PBS中,并加入1ul/ml CTV。将T细胞在37℃下CTV中温育20分钟。随后,通过添加5V完全培养基淬灭细胞。5分钟温育后,洗涤T细胞并将其重悬于2ml完全培养基中。在室温下温育另外的10分钟,使乙酸盐水解并保留染料。

[0699] 将标记的T细胞与Raji靶细胞共培养四天。该测定使用$5x10^4$个转导的T细胞/孔和等数目的靶细胞(比率1:1),在96孔板中以0.2ml总体积进行。在第四天的时间点,通过流式细胞术分析T细胞以测量CTV随着T细胞分裂的稀释度。计算在共培养结束时存在的T细胞数目,并表示为相比T细胞输入数目的增殖倍数。

[0700] 图5表明,对于所测试的两种CD22结合物:10C1和1D9-3,表达具有Fab抗原结合域

的CAR的T细胞比等量的具有scFv抗原结合域的CAR增殖更多。与等量scFv CAR构建体相比，两种FabCAR构建体的曲线下面积都沿X轴移动了更多。

[0701] 实施例3-研究FabCAR形式中抗CD22抗体9A8-1的功效

[0702] 如以下概述产生一组CAR,并比较了它们针对表达CD22的SupT1靶细胞的细胞毒性能力。

[0703] NT:未转导的

[0704] 3B4:基于3B4 mAb的FabCAR

[0705] 9A8:基于9A8-1 mAb的FabCAR

[0706] 所有CAR都具有包含CD3ζ和4-1BB共刺激域的第二代胞内域。

[0707] 首先,研究了表达CAR的T细胞杀伤靶细胞的能力。T细胞与表达CD22的SupT1靶细胞以1:4E:T的比率共培养。温育72小时后,如下所述进行基于FACS的杀伤测定。

[0708] FBK的结果显示在图8中。就靶细胞杀伤而言,具有9A8抗原结合域的CAR优于等量的具有3B4抗原结合域的CAR。

[0709] 接着,比较了两种CAR的细胞因子释放。与表达CD22的SupT1靶细胞共培养72小时后,如下所述通过ELISA研究IL-2表达。结果显示在图9中。与等量的具有3B4抗原结合域的CAR相比,具有9A8抗原结合域的CAR观察到显著更高的IL-2释放水平。

[0710] 实施例4-研究FabCAR形式的抗CD22抗体1g3-4的功效

[0711] 如以下概述产生一组CAR:

[0712] NT:未转导的

[0713] Fmc63:抗CD19 CAR(阴性对照)

[0714] 10C1:基于10C1 mAb的抗CD22 FabCAR

[0715] 3B4:基于3B4 mAb的抗CD22 FabCAR

[0716] 7G6:基于7G6 mAb的抗CD22 FabCAR

[0717] 9F8-2:基于9F8-2 mAb的抗CD22 FabCAR

[0718] 9A8-1:基于9A8-1 mAb的抗CD22 FabCAR

[0719] 1G3-4:基于1G3-4 mAb的抗CD22 FabCAR

[0720] 9F9-6:基于9F9-6 mAb的抗CD22 FabCAR

[0721] 所有CAR都具有包含CD3ζ和4-1BB共刺激域的第二代胞内域。

[0722] 研究了表达CAR的T细胞杀伤SupT1靶细胞的能力。SupT1细胞保持未转导(图10,图A)或转导以表达CD22。转导的靶细胞被分为三个群体:具有无法通过流式细胞术检测到的CD22表达水平的细胞(图10,B组);具有低水平的CD22表达的细胞,平均255个拷贝/细胞(图10,C组);以及具有高水平的CD22表达的细胞,平均78,916个拷贝/细胞(图10,图D)。

[0723] 将T细胞与表达CD22的SupT1靶细胞以1:4E:T的比率共培养。温育72小时后,如下所述进行基于FACS的杀伤测定。

[0724] FBK的结果示于图10中。所有抗CD22 FabCAR均显示出有效杀伤表达高水平靶抗原的靶细胞(图10D)。但是,即使在超低水平的靶抗原表达的情况下,具有9A8抗原结合域或1G3-4抗原结合域的Fab CAR也表现出对靶细胞的杀伤作用(图10B)。

[0725] 转导

[0726] 使用Gene Juice(EMD Millipore),用RDF质粒(RD114包膜),gag/pol质粒和CAR T

细胞质粒瞬时转染293T细胞来产生逆转录病毒,并在48小时和72小时收集病毒上清液。在T175 TC处理的烧瓶中,使用0.5μg/mL抗CD3和抗CD28抗体来刺激T细胞,并维持在100U/mL IL-2中。根据制造商的说明(Takara Bio),将未经过TC处理的六孔板用Retronectin包被,并在T细胞转导之前于4℃温育24小时。铺板3ml病毒上清液,然后以1x10^6个细胞/ml的浓度添加1ml活化的T细胞,接着添加100U/mL IL-2,并在室温下以1000xg离心40分钟,然后在37℃和5% CO_2下温育2-3天。

[0727] NK细胞和NKT细胞耗竭

[0728] 使用EasySep™人CD56正选试剂盒来进行CD56耗竭(STEMCELL 18055)。

[0729] 细胞毒性测定

[0730] 为了测量细胞毒性,将CAR T细胞与SupT1-NT和SupT1 CD22以4:1的效应子:靶标比率(200,000:50,000个细胞)在TC处理的96孔板中共培养。通过用抗hCD34-APC(FAB7227A),抗CD2-FITC和抗CD3-PeCy7(300419)染色来区分效应T细胞和靶细胞,在72小时读取读数,使用7-AAD细胞活力染料(420403)排除死细胞,并使用磷酸盐缓冲液(10010023)在温育之间进行细胞洗涤。使用MACSQuant® Analyzer 10流式细胞仪(Miltenyi Biotec)获得细胞毒性读数。

[0731] 细胞因子释放

[0732] 通过以下测量由CAR T细胞产生的IL-2:在72小时从处于4:1E:T的比率的共培养物中收集上清液,并在-20℃下冷冻,然后通过ELISA分析。根据制造商方案,使用人IFN-γ ELISA MAX™Deluxe Sets(BioLegend,430106)和IL-2ELISA MAX™Deluxe Sets(BioLegend,431806)进行细胞因子分析。Varioskan LUX多模式酶标仪(Thermo Fisher)用于测量ELISA信号。

[0733] 本申请要求于2018年5月15日提交的英国申请号第1807866.7号和于2018年6月14日提交的英国申请号第1809773.3号的权益。上述两个申请通过引用以其整体并入本文。

[0734] 以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明所述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合特定的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解的是,所要求保护的本发明不应当不适当地限制于此类特定的实施方案。实际上,对于分子生物学或相关领域的技术人员而言显而易见的用于实施本发明的所述方式的各种修改旨在落入所附权利要求的范围内。

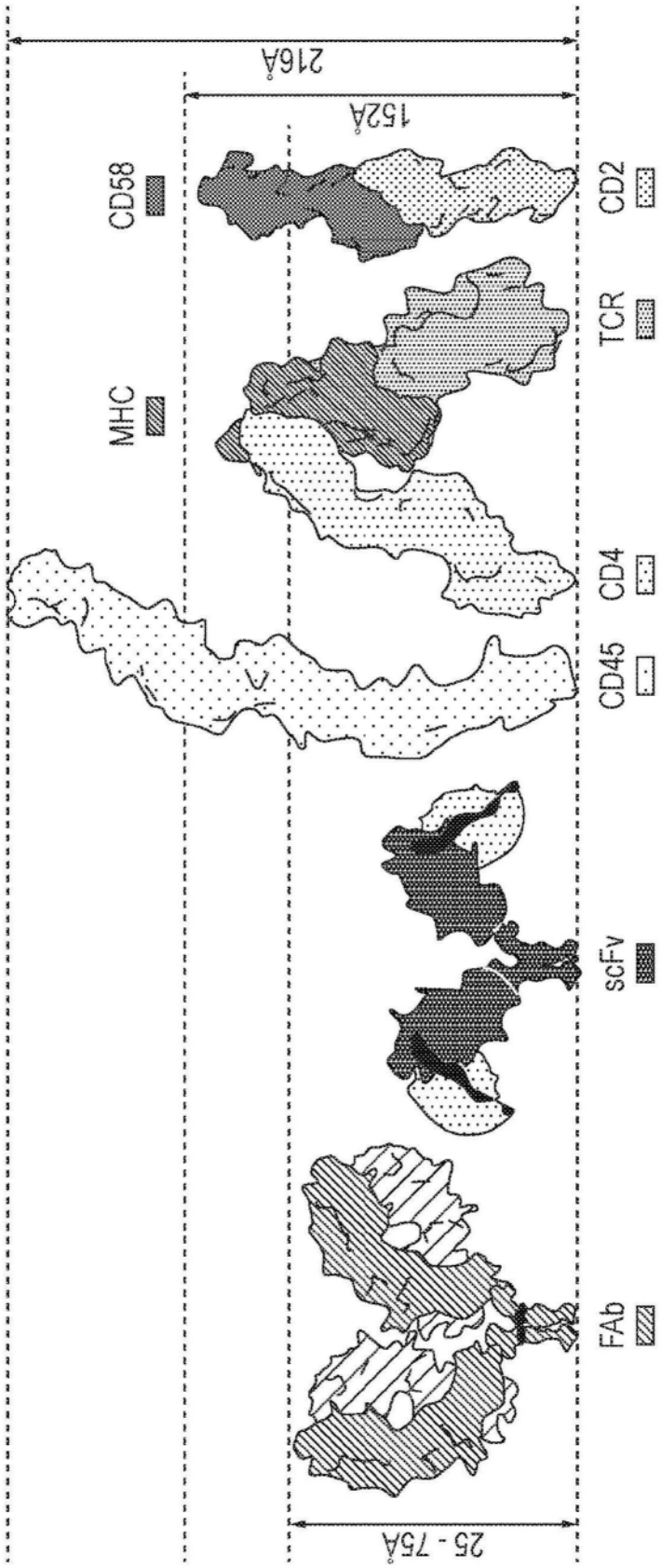


图1

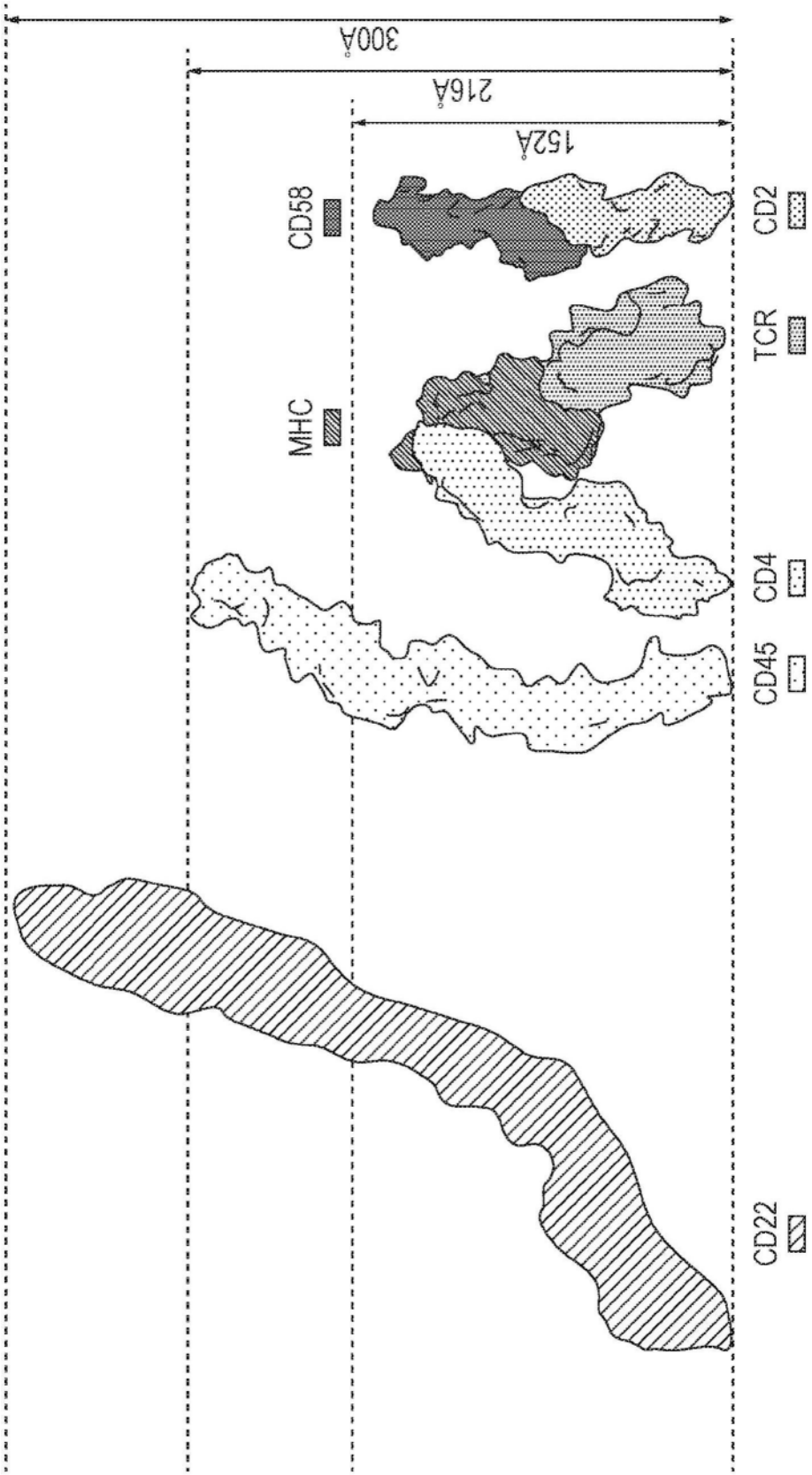


图2

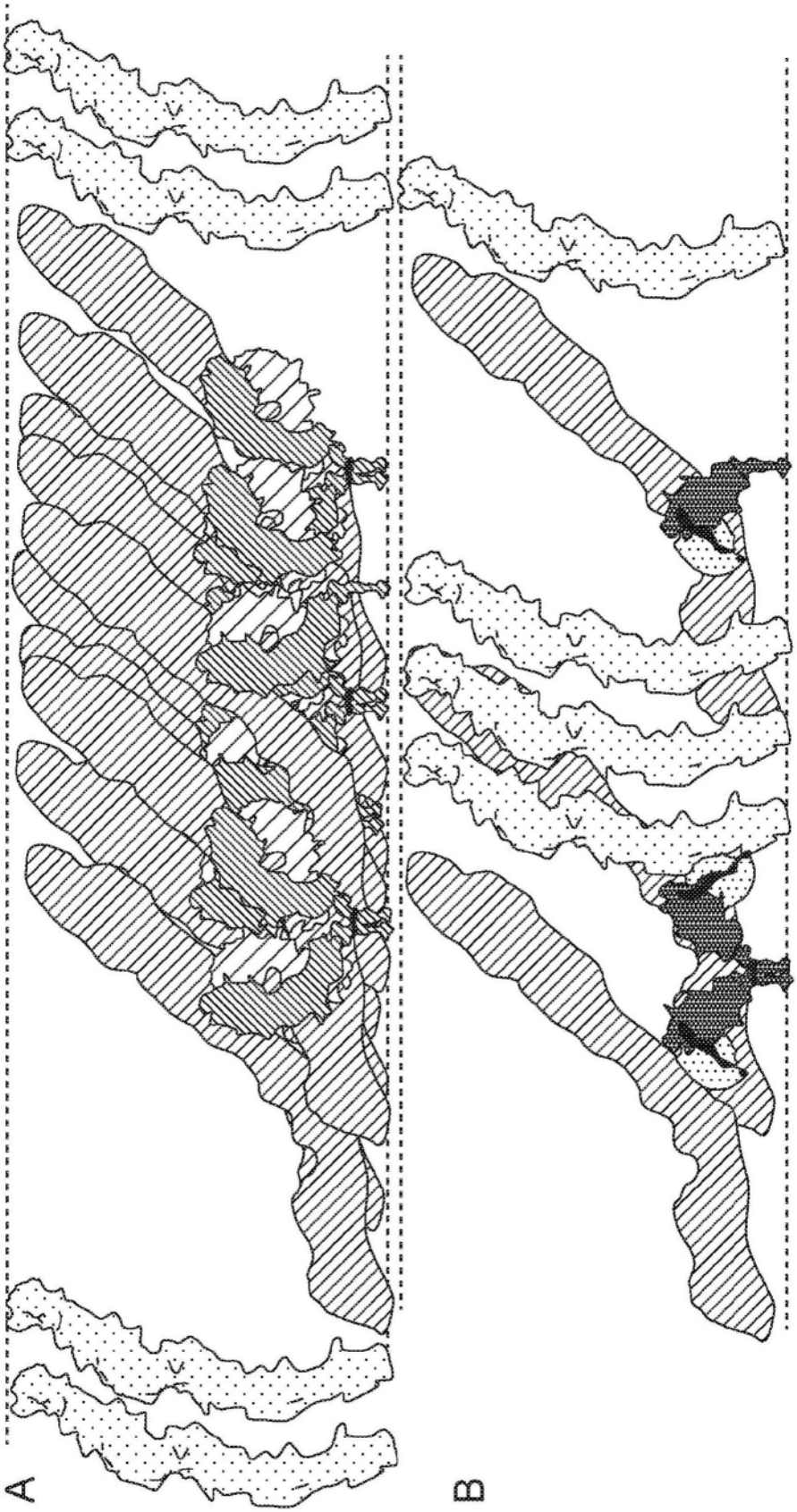


图3

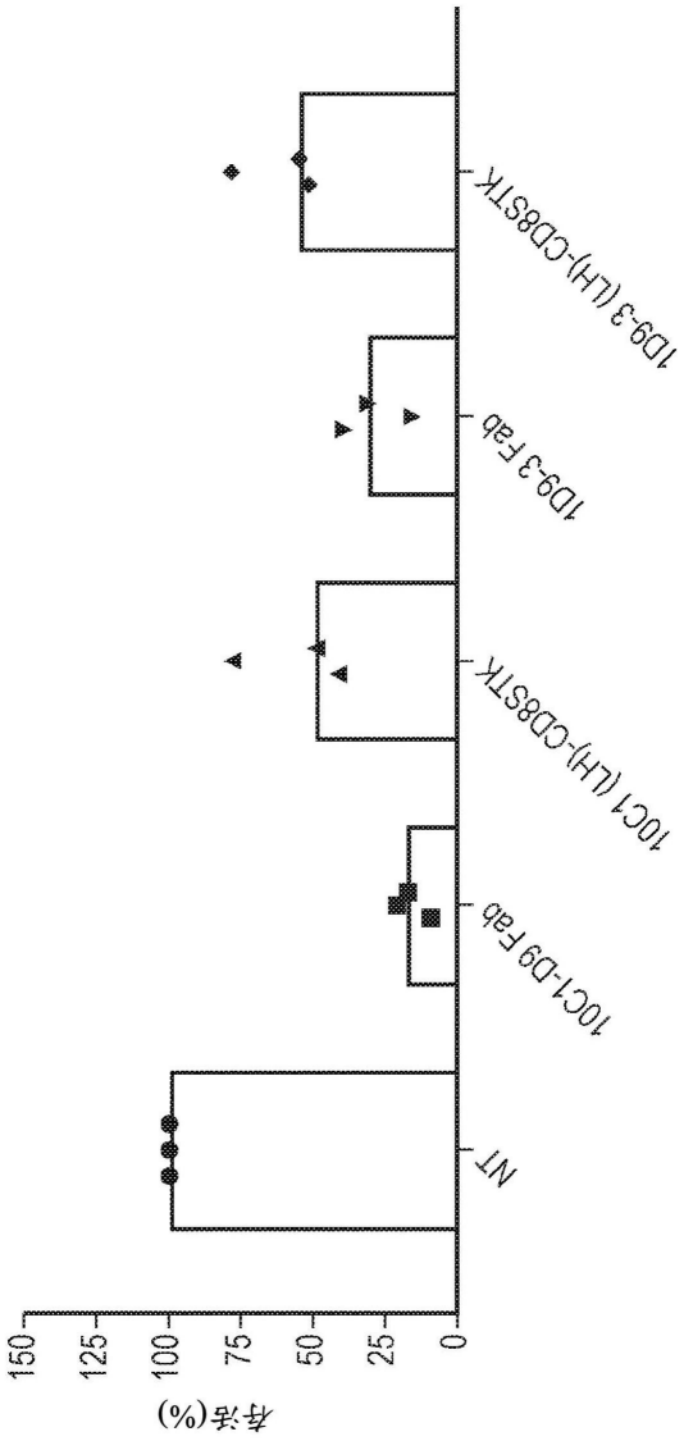

存活(%)
150
125
100
75
50
25
0
NT
10C1-D9 Fab
10C1 (LH)-CD8STK
1D9-3 Fab
1D9-3 (LH)-CD8STK

图4

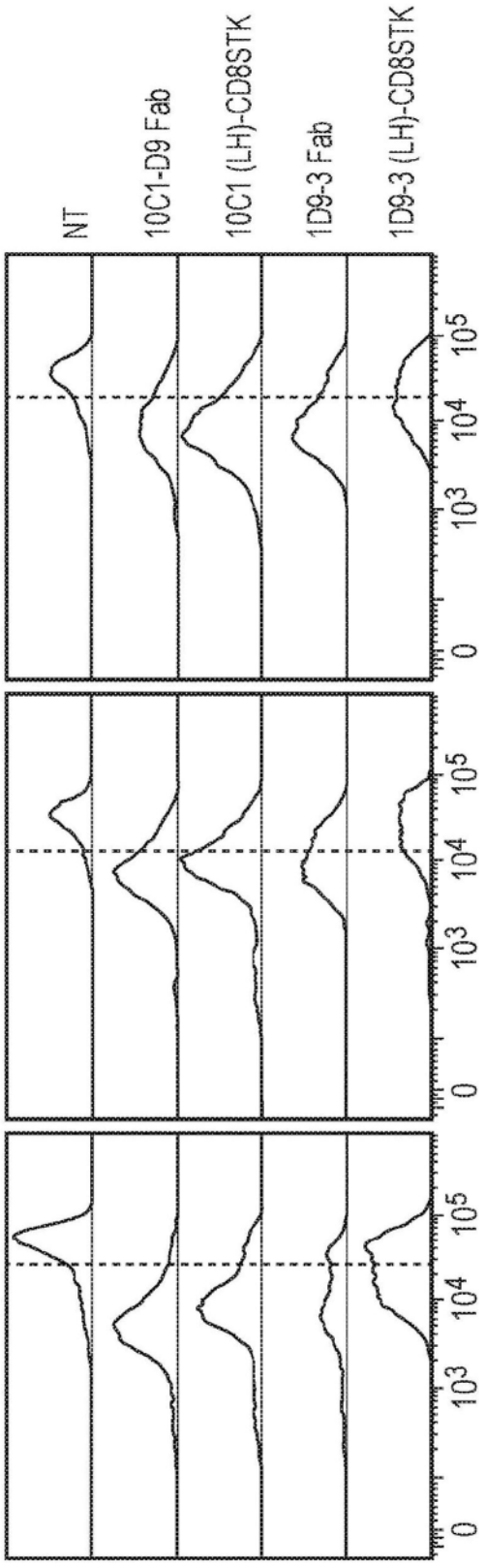

NT
10C1-D9 Fab
10C1 (LH)-CD8STK
1D9-3 Fab
1D9-3 (LH)-CD8STK
0
10^3
10^4
10^5

图5

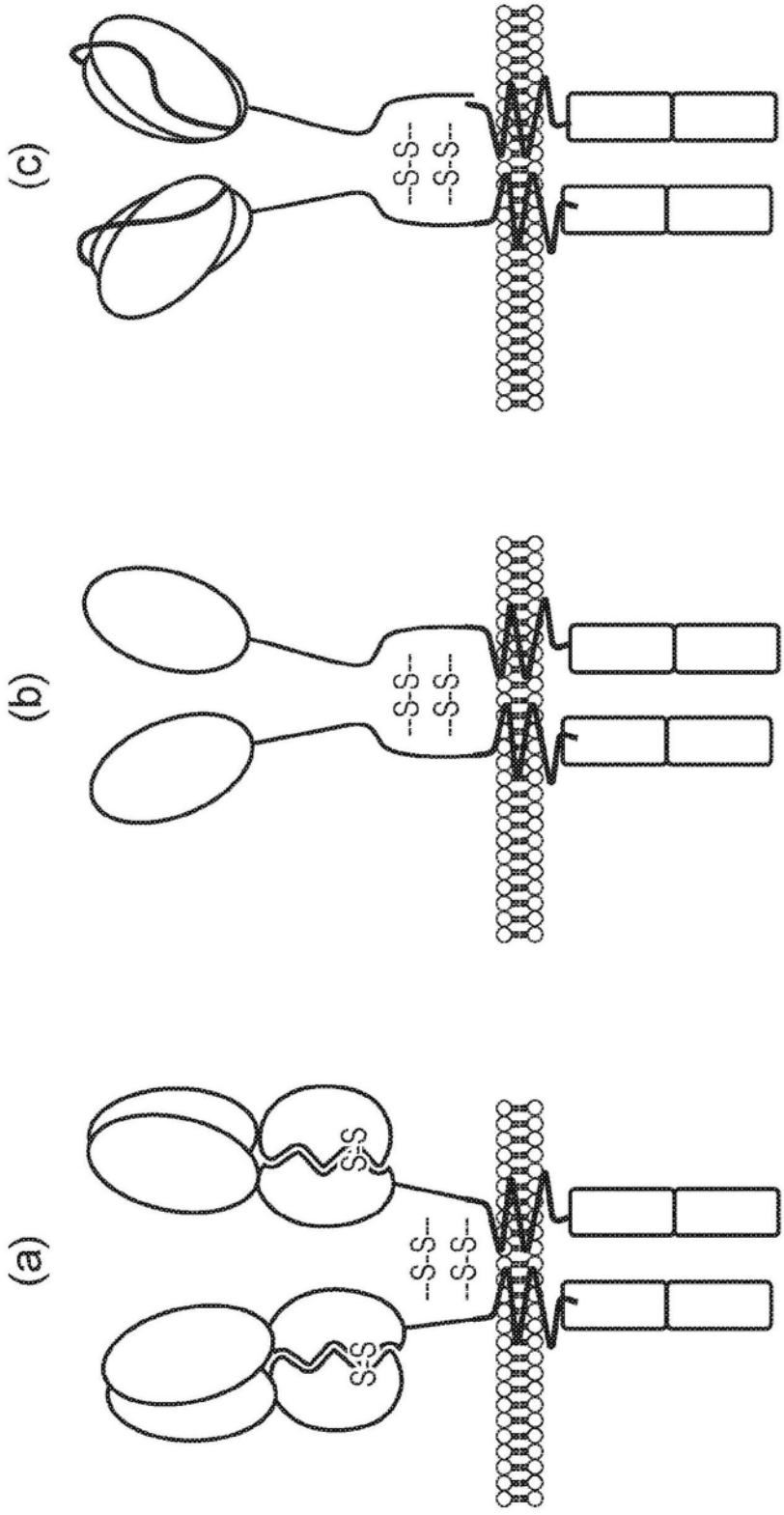


图6

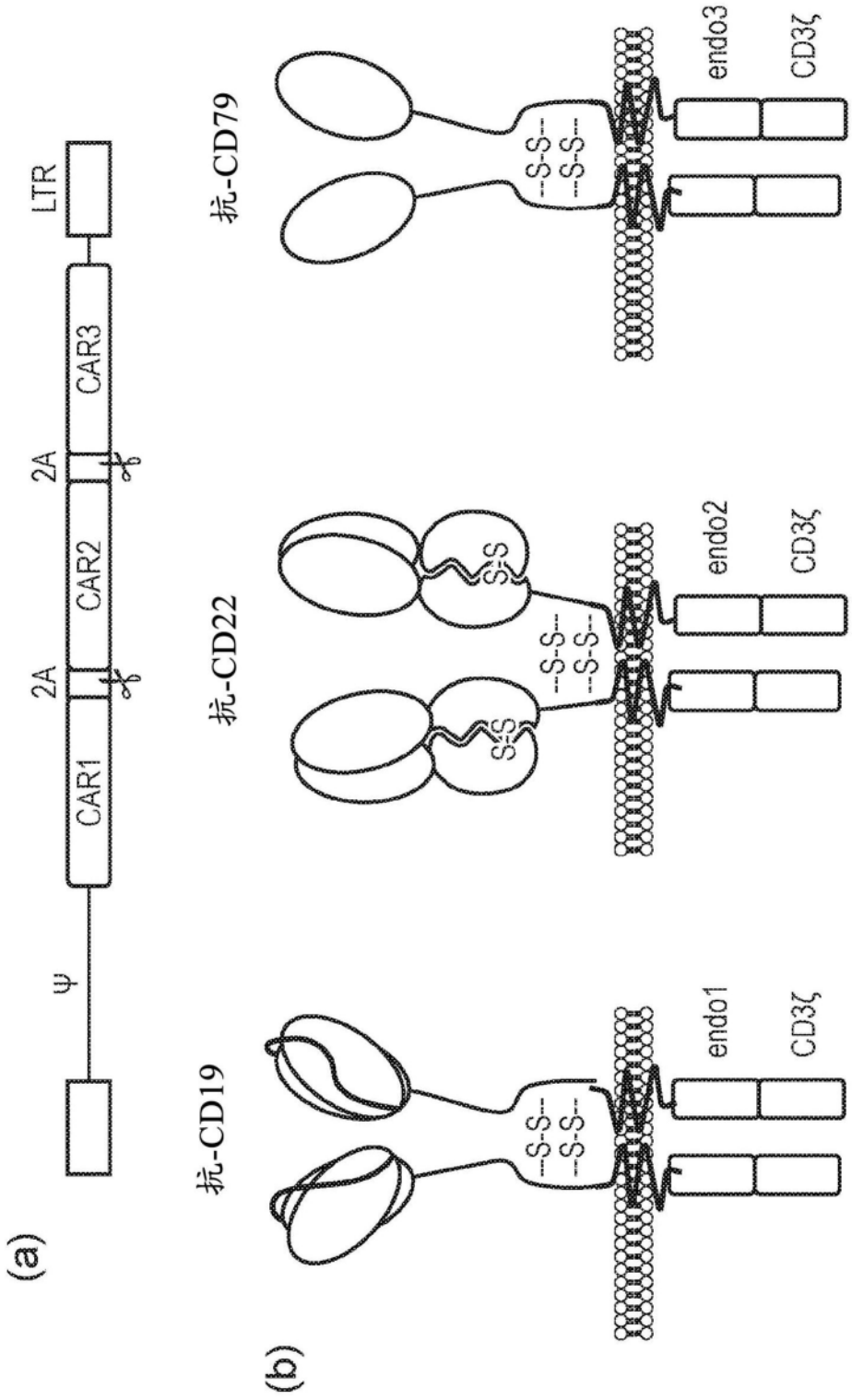

(a)
Ψ
CAR1
2A
CAR2
2A
CAR3
LTR
(b)
抗-CD19
抗-CD22
抗-CD79
endo1
CD3ζ
endo2
CD3ζ
endo3
CD3ζ
S-S
S-S
S-S
S-S
S-S
S-S

图7

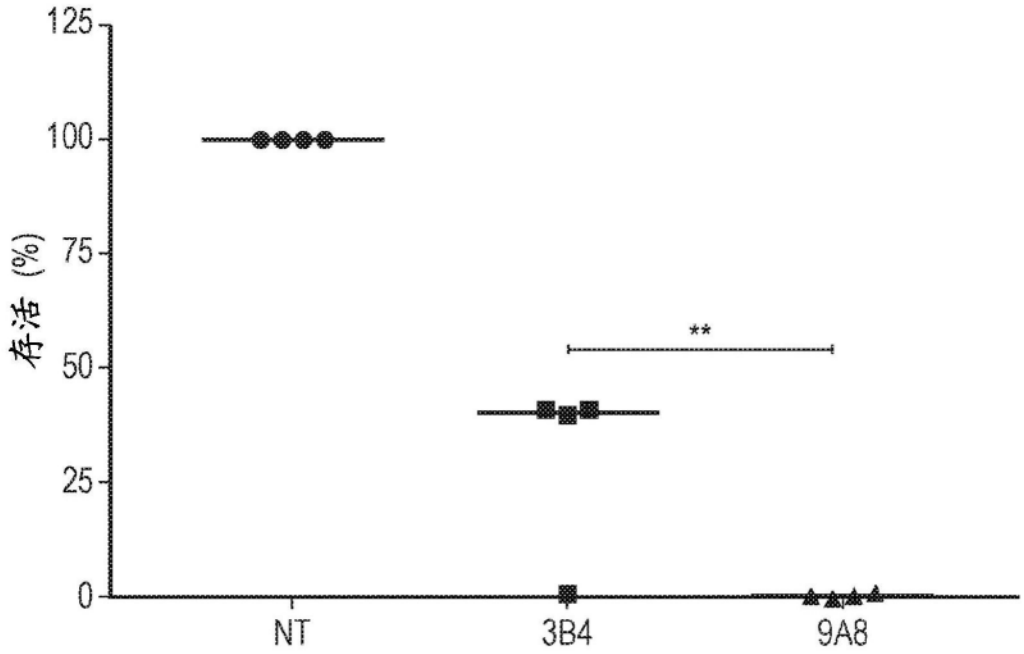

125
100
75
50
25
0
存活 (%)
**
NT
3B4
9A8

图8

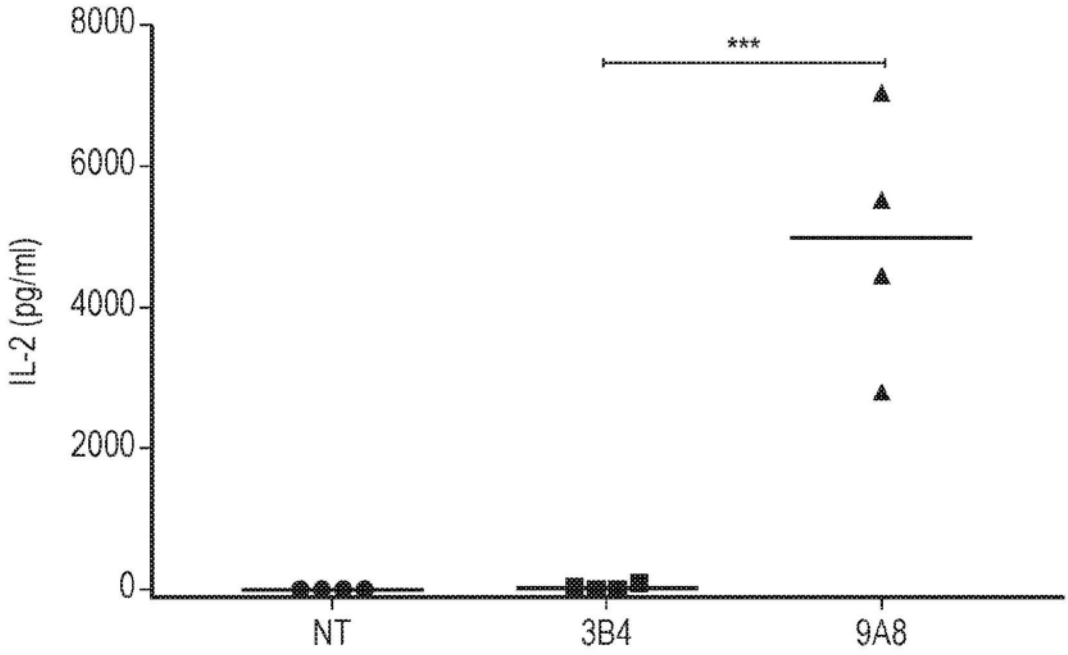

8000
6000
4000
2000
0
IL-2 (pg/ml)
***
NT
3B4
9A8

图9

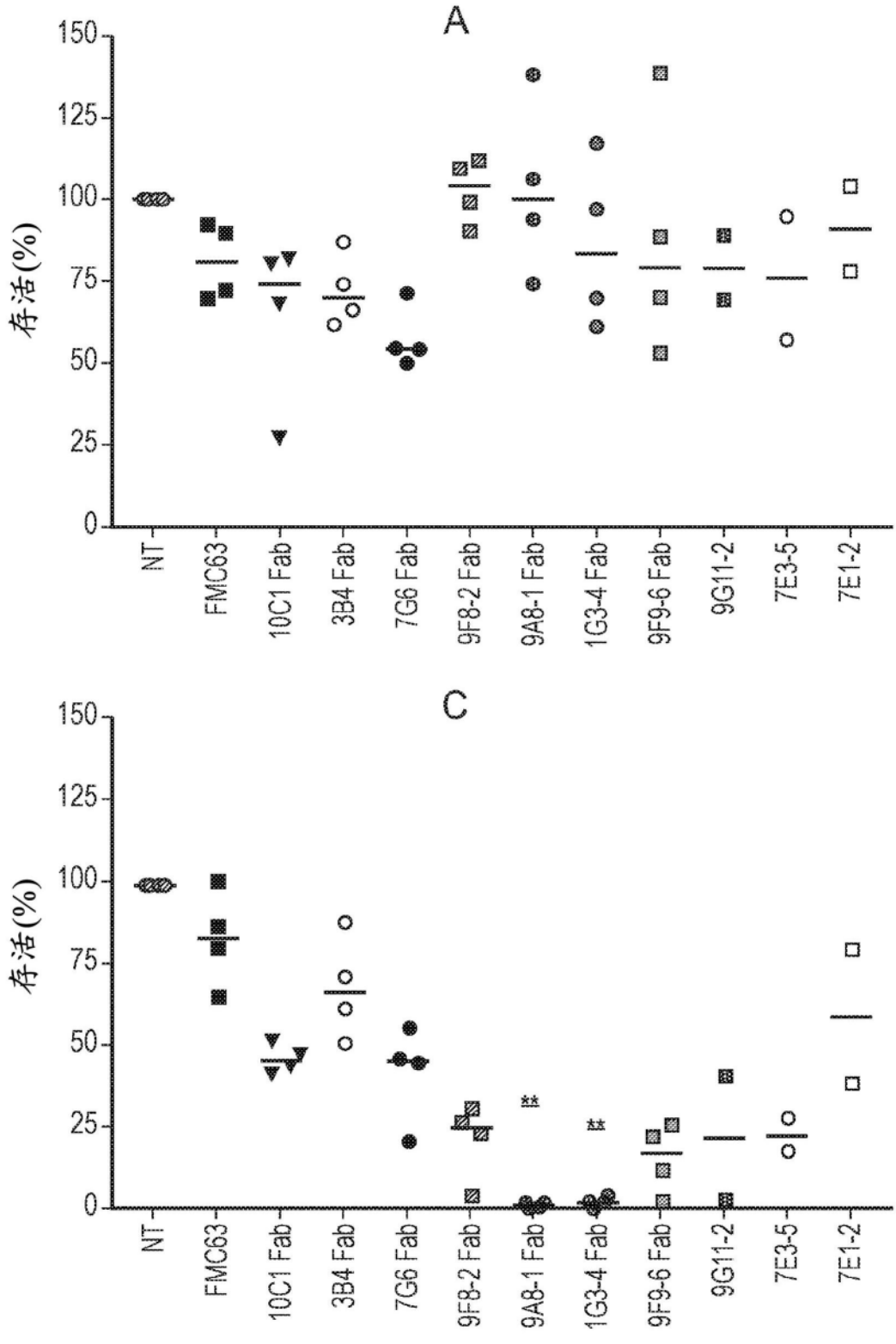

A
C
存活(%)
150
125
100
75
50
25
0
NT
FMC63
10C1 Fab
3B4 Fab
7G6 Fab
9F8-2 Fab
9A8-1 Fab
1G3-4 Fab
9F9-6 Fab
9G11-2
7E3-5
7E1-2
**
**

图10

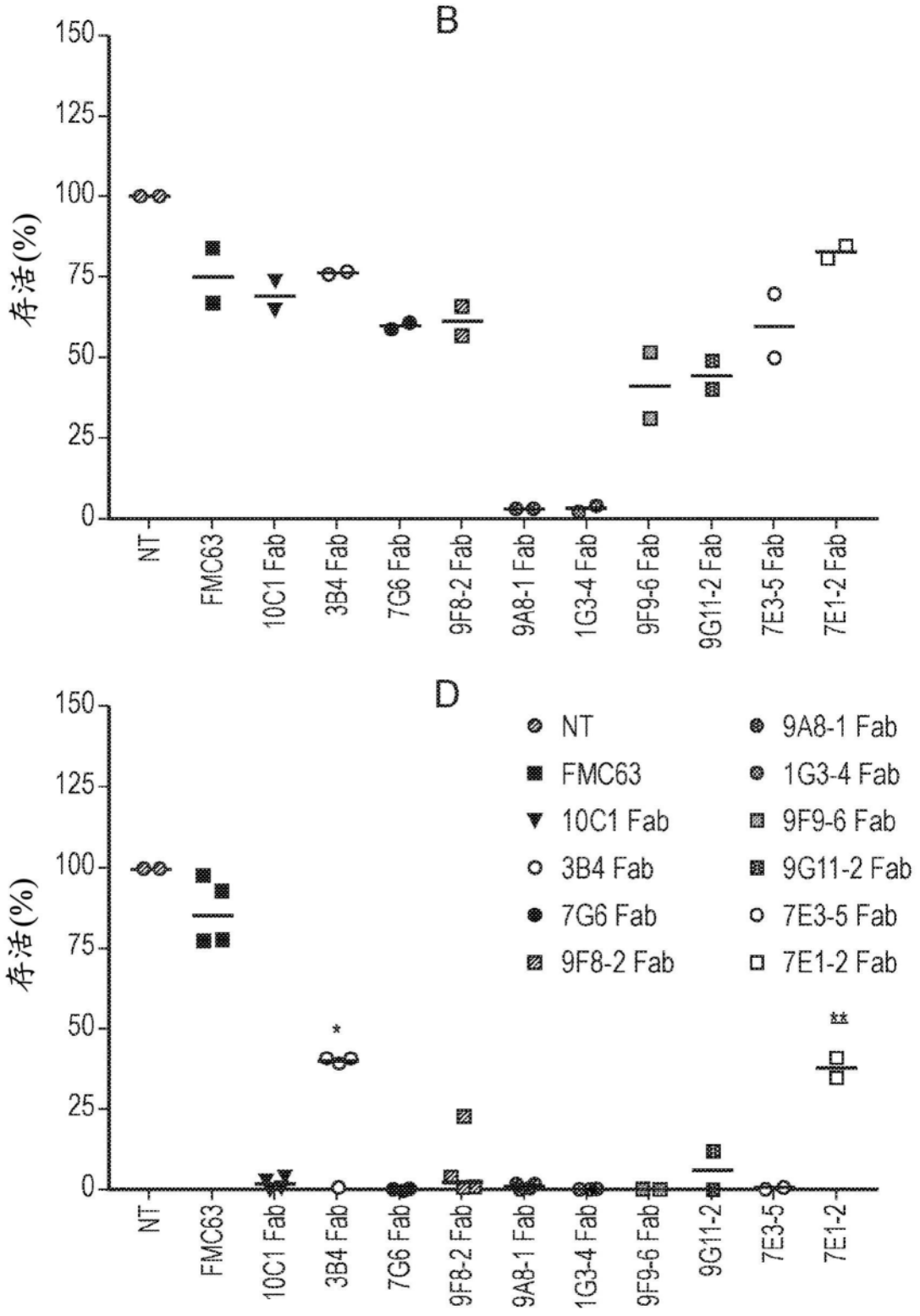

B
存活(%)
150
125
100
75
50
25
0
NT
FMC63
10C1 Fab
3B4 Fab
7G6 Fab
9F8-2 Fab
9A8-1 Fab
1G3-4 Fab
9F9-6 Fab
9G11-2 Fab
7E3-5 Fab
7E1-2 Fab
D
存活(%)
NT
FMC63
10C1 Fab
3B4 Fab
7G6 Fab
9F8-2 Fab
9A8-1 Fab
1G3-4 Fab
9F9-6 Fab
9G11-2 Fab
7E3-5 Fab
7E1-2 Fab
*
**

图10(续)

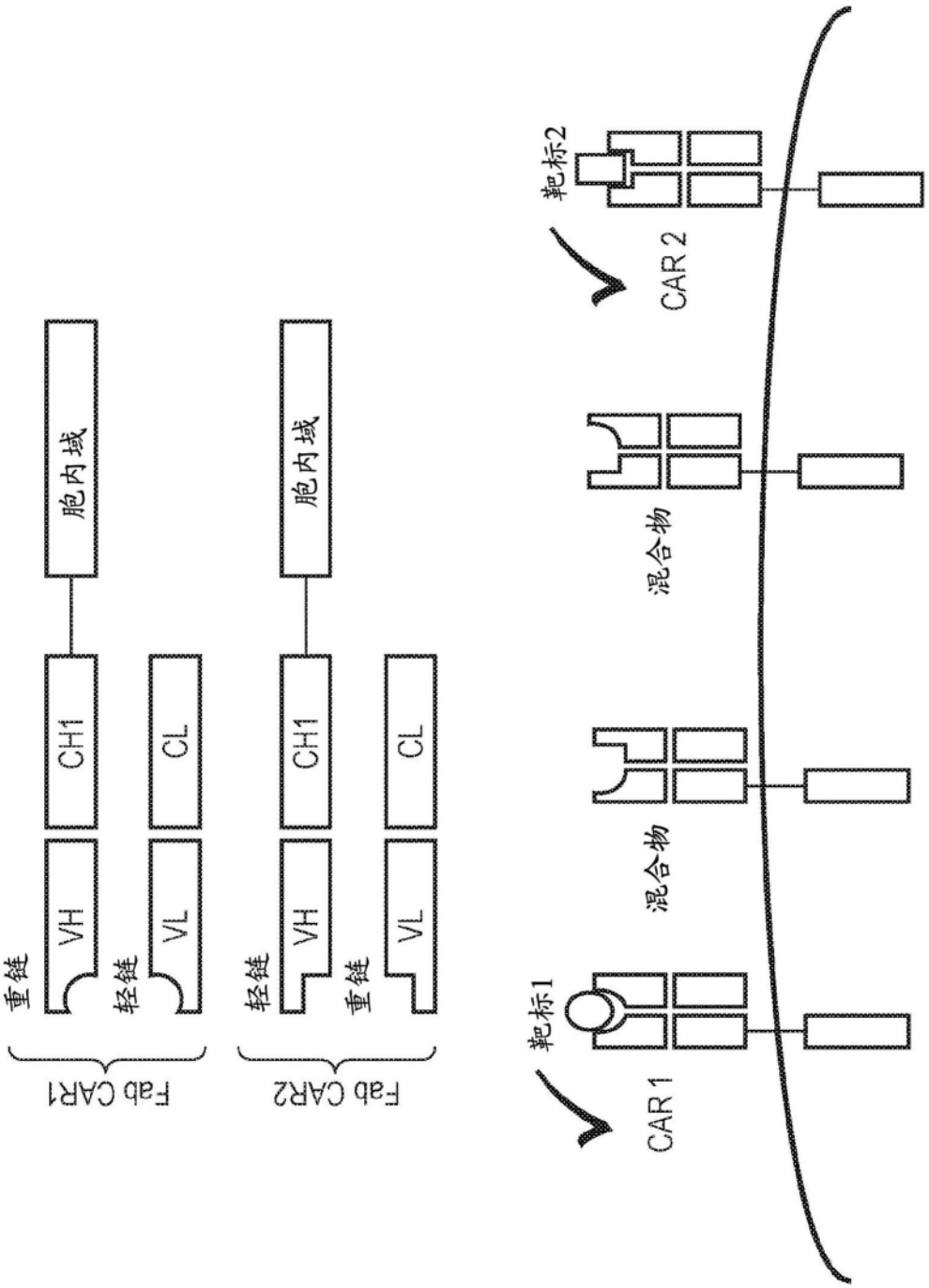

重链
VH
CH1
胞内域
轻链
VL
CL
Fab CAR1
轻链
VH
CH1
胞内域
重链
VL
CL
Fab CAR2
靶标1
CAR 1
混合物
混合物
靶标2
CAR 2

图11

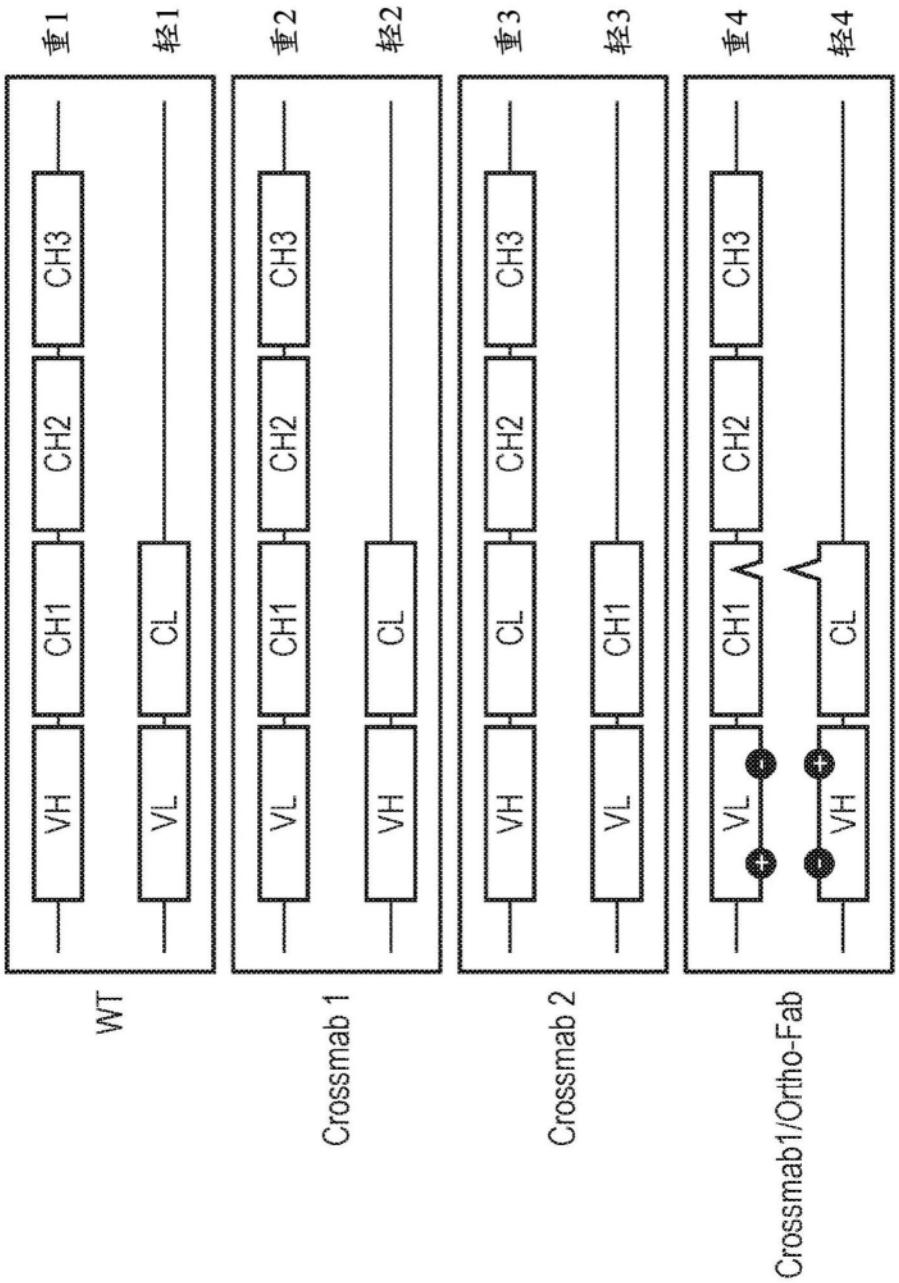

重1
轻1
重2
轻2
重3
轻3
重4
轻4
VH
CH1
CH2
CH3
VL
CL
WT
Crossmab 1
Crossmab 2
Crossmab1/Ortho-Fab

图12