



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107847601 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201680043851.1

(22)申请日 2016.06.03

(30)优先权数据

62/171,004 2015.06.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/035916 2016.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/197064 EN 2016.12.08

(71)申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 艾伦·L·爱泼斯坦

(74)专利代理机构 广州市天河区倪律专利代理
事务所(普通合伙) 44348

代理人 倪小敏 何锦标

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书46页

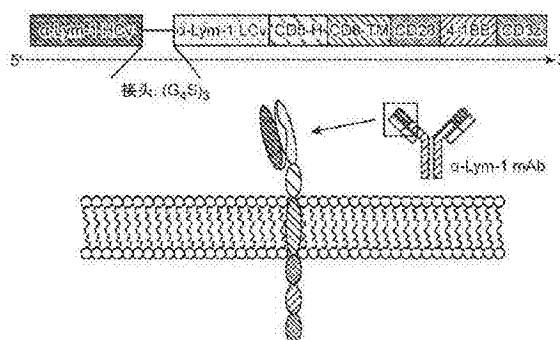
序列表27页 附图16页

(54)发明名称

LYM-1和LYM-2靶向的CAR细胞免疫疗法

(57)摘要

作为癌症治疗的新方法,描述了CAR细胞靶向和抗体人类HLA-DR。本发明提出,HLA-DR CAR细胞在患者中是安全和有效的,并且可以被用来治疗表达HLA-DR的人类肿瘤。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包括: (a) 抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域; (b) CD8 α 链结构域; (c) CD8 α 跨膜结构域; (d) CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域; 以及 (e) CD3 ζ 信号传导结构域。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其包括含有抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域的抗HLA-DR重链可变区域和抗HLA-DR轻链可变区域。

3. 根据权利要求2所述的CAR, 其进一步包括位于所述抗HLA-DR重链可变区域和所述抗HLA-DR轻链可变区域之间的接头多肽。

4. 根据权利要求2或3所述的CAR, 其中所述抗HLA-DR重链可变区域包括含有SEQ ID NO: 1至6或其每个的等效物中的一个或多个的CDR区域。

5. 根据权利要求2或3所述的CAR, 其中所述抗HLA-DR重链可变区域包括以下中的一个或多个: (i) 由SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9编码的多肽; (ii) 含有SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10的多肽; 或者 (iii) 其每个的等效物。

6. 根据权利要求2或3所述的CAR, 其中所述抗HLA-DR轻链可变区域包括含有SEQ ID NO: 11至16或其每个的等效物中的一个或多个的CDR区域。

7. 根据权利要求2或3所述的CAR, 其中所述抗HLA-DR轻链可变区域包括含有以下中的一个或多个的CDR区域: (i) 由SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 19编码的多肽; (ii) 含有SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 20的多肽; 或者 (iii) 其每个的等效物。

8. 根据权利要求2至7中的任一项所述的CAR, 其中所述抗HLA-DR重链可变区域和轻链可变区域通过接头连接, 所述接头任选地是甘氨酸-丝氨酸接头。

9. 根据前述权利要求中的任一项所述的CAR, 其进一步包括可检测标记物或纯化标记物。

10. 根据权利要求2至9中的任一项所述的CAR, 其中等效物包括与该多肽具有至少80%的氨基酸同一性的多肽, 或者由在高度严格条件下与编码该多肽的多核苷酸的补体杂交的多核苷酸编码的多肽。

11. 一种复合物, 其包括前述权利要求中的任一项所述的CAR, 所述CAR被结合至表达HLA-DR的细胞。

12. 一种分离的核酸序列, 其编码权利要求1至10中的任一项所述的CAR或其补体或其每个的等效物。

13. 根据权利要求12所述的分离的核酸, 其进一步包括位于所述抗HLA-DR抗体或HLA-DR配体的抗原结合结构域的上游的Kozak共有序列。

14. 根据权利要求12或13所述的分离的核酸序列, 其进一步包括抗生素抗性的多核苷酸。

15. 一种载体, 其包括权利要求12至14中的任一项所述的分离的核酸序列。

16. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体是质粒。

17. 根据权利要求15所述的载体, 其中所述载体是慢病毒载体。

18. 一种分离的细胞, 其包括权利要求1至10中的任一项所述的CAR; 和/或权利要求12至14中的任一项所述的分离的核酸; 和/或权利要求15至17中的任一项所述的载体。

19. 根据权利要求18所述的分离的细胞, 其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

20. 根据权利要求18至19中的任一项所述的分离的细胞, 其进一步包括可检测标签。

21. 一种复合物,其包括权利要求18至20中的任一项所述的分离的细胞,所述分离的细胞被结合至表达HLA-DR的细胞。

22. 一种组合物,其包括载体和以下中的一个或多个:含有权利要求1至10中的任一项所述的CAR的分离的细胞;和/或权利要求12至14中的任一项所述的分离的核酸;和/或权利要求15至17中的任一项所述的载体;和/或权利要求18至20中的任一项所述的分离的细胞。

23. 一种生产表达HLA-DR CAR的细胞的方法,其包括:

(i) 使用编码权利要求1至10中的任一项所述的CAR的核酸序列转导分离的细胞的群体;以及

(ii) 选择已经使用步骤(i)的所述核酸序列成功转导的所述分离的细胞的亚群体,从而生产表达HLA-DR CAR的细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

25. 一种在有需要的对象中抑制肿瘤的生长的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求18至20中的任一项所述的分离的细胞。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述分离的细胞对于正被治疗的所述对象来说是自体同源的或同种异体的。

27. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述肿瘤是癌性的。

28. 根据权利要求25至27中的任一项所述的方法,其中与正常的、非癌性的对应细胞相比,所述肿瘤过度表达HLA-DR。

29. 根据权利要求25至28中的任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。

30. 根据权利要求25至29中的任一项所述的方法,其中所述肿瘤是B细胞淋巴瘤肿瘤或白血病肿瘤。

31. 根据权利要求25至30中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括:向所述对象施用除了HLA-DR CAR疗法之外的抗肿瘤疗法。

32. 一种治疗有需要的癌症患者的方法,所述方法包括向对象施用有效量的权利要求18至20所述的分离的细胞。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述分离的细胞对于正被治疗的所述对象来说是自体同源的或同种异体的,并且任选地是一线、二线、三线、四线或五线疗法。

34. 根据权利要求32或33所述的方法,其中与正常的、非癌性的对应细胞相比,所述癌症的细胞表达或过度表达HLA-DR。

35. 根据权利要求32至34中的任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。

36. 根据权利要求32至35中的任一项所述的方法,其中所述癌症是B细胞淋巴瘤或白血病。

37. 根据权利要求32至36中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括:向所述对象施用除了HLA-DR CAR疗法之外的抗肿瘤疗法。

38. 一种用于确定对象是可能响应还是不可能响应HLA-DR CAR疗法的方法,所述方法包括将从患者分离的肿瘤或癌症样品与选择性地结合HLA-DR的试剂接触,其中结合至所述肿瘤或癌症样品的试剂的存在表明所述对象可能响应所述HLA-DR CAR疗法,而结合至所述肿瘤或癌症样品的试剂的不存在表明所述对象不可能响应所述HLA-DR CAR疗法。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中选择性地结合HLA-DR的所述试剂是抗HLA DR抗

体或其抗原结合片段。

40. 根据权利要求38或39所述的方法, 其中所述试剂或抗HLA DR抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。

41. 一种用于确定对象是可能响应还是不可能响应HLA-DR CAR疗法的方法, 所述方法包括确定在从所述对象分离的肿瘤或癌症样品中的HLA-DR多肽的表达水平, 其中与正常的对应样品相比HLA-DR多肽的表达提高表明所述对象可能响应所述HLA-DR CAR疗法, 而表达提高的缺失表明所述对象不可能响应所述HLA-DR疗法。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中通过包括免疫组织化学或聚合酶链式反应(PCR)的方法来确定HLA-DR多肽的表达水平。

43. 一种用于监控在正在接受疗法的对象中的HLA-DR CAR疗法的方法, 所述方法包括将从患者分离的样品与选择性地结合HLA-DR的试剂接触, 并且确定结合至所述样品的任何试剂的存在。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中选择性地结合HLA-DR的所述试剂是抗HLA DR抗体或其抗原结合片段。

45. 根据权利要求43或44所述的方法, 其中所述试剂或抗HLA DR抗体或其抗原结合片段被可检测地标记。

46. 根据权利要求38至45中的任一项所述的方法, 其中癌症或肿瘤选自癌、肉瘤或白血病。

47. 根据权利要求38至46中的任一项所述的方法, 其中所述样品包括以下中的一种或多种: 痰液、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊髓液、腹水、血液或组织。

48. 根据权利要求38至42中的任一项所述的方法, 所述方法进一步包括: 向被确定可能响应HLA-DR CAR疗法的患者施用有效量的HLA-DR CAR疗法。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述疗法是一线、二线、三线、四线或五线疗法。

50. 一种试剂盒, 其包括HLA-DR CAR疗法以及使用说明。

51. 根据权利要求50所述的试剂盒, 其进一步包括用于检测在从对象分离的样品上HLA-DR的存在的试剂和说明。

LYM-1和LYM-2靶向的CAR细胞免疫疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据35 U.S.C. § 119(e) 要求2015年6月4日提交的美国临时申请号62/171,004的优先权,其全文通过引用合并入本文中。

[0002] 序列表

本申请包含序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且其全文通过引用并入本文中。所述ASCII副本创建于2016年6月1日,命名为064189-7202_SL.txt,大小为51,804字节。

背景技术

[0003] 本发明总体上涉及人免疫学领域,具体涉及癌症免疫疗法。

[0004] 背景技术的以下讨论仅提供来辅助读者理解本发明,并非承认描述或构成本发明的现有技术。

[0005] Lym-1和Lym-2针对主要在人B细胞、树突细胞和B细胞衍生的淋巴瘤和白血病的表面上表达的MHC II类HLA-DR分子。

[0006] 发明概述

本发明提供了涉及新的癌症免疫疗法嵌合抗原受体(CAR)的方法和组合物。本发明的一些方面涉及一种嵌合抗原受体(CAR),其包括:(a) Lym-1和/或Lym-2抗体的抗原结合结构域;(b) 铰链结构域;(c) 跨膜结构域;以及(d) 细胞内结构域,或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。本发明的进一步的方面涉及一种嵌合抗原受体(CAR),其包括:(a) Lym-1和/或Lym-2抗体的抗原结合结构域;(b) CD8 α 铰链结构域;(c) CD8 α 跨膜结构域;(d) CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域;以及(e) CD3 ζ 信号传导结构域,或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。

[0007] 本发明的一些方面涉及Lym-1和Lym-2抗体。

[0008] 本发明的一些方面涉及一种嵌合抗原受体(CAR),其包括对人类HLA-DR抗原具有特异性的抗原结合结构域——例如Lym-1和Lym-2抗体的抗原结合结构域。

[0009] 本发明的进一步的方面涉及编码Lym1或Lym-2 CAR的分离的核酸序列,以及包含所述分离的核酸序列的载体。

[0010] 本发明的其他方面涉及包含Lym1或Lym-2 导向的CAR的分离的细胞,以及生产这样的细胞的方法。本发明的其他方面涉及用于抑制肿瘤的生长并且治疗癌症患者的方法,其包括以下步骤、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:向有需要的组织或对象施用有效量的所述分离的细胞。

[0011] 本发明的进一步的方法方面涉及用于确定患者是可能响应还是不可能响应Lym-1 CAR或Lym-2 CAR疗法的方法,其通过使用Lym-1或Lym-2抗体和/或Lym-1 CAR或Lym-2 CAR细胞中的一种或多种。

[0012] 本发明的其他方面涉及组合物,其包括载体和在本文公开的实施方式中描述的产品中的一种或多种。

附图说明

[0013] 图1A-1F示出了(图1A)阴性对照;(图1B)Lym-1;(图1C)Lym-1和B1;(图1D)单独的B1;(图1E)Lym-2;以及(图1F)Lym-2和B1与患者的正常外周血淋巴细胞的染色活性的流式细胞术分析。Lym-1和Lym-2都具有结合至正常的人外周B细胞的不同图谱。

[0014] 图2A-2B示出了正常人扁桃体的Lym-1和Lym-2染色,证明了B细胞生发中心中的膜阳性。在Lym-1(图2A)和Lym-2(图2B)之间,染色模式上的差异是明显的。在T细胞区中仅有分散的滤泡间树突状细胞对两种抗体均呈阳性(IHC,冷冻切片,x325)。

[0015] 图3A和3B示出了Lym-1和Lym-2单克隆抗体与中级恶性B细胞淋巴瘤的免疫过氧化物酶染色。Lym-1(图3A)和Lym-2(图3B)单克隆抗体与中级恶性B细胞淋巴瘤的免疫过氧化物酶染色(冷冻切片,x720)。注意切片中大部分细胞的突出的膜染色图案。

[0016] 图4A-4C示出了结合图和Scatchard图,(图4A)Lym-1单克隆抗体对Raji细胞以及Lym-2单克隆抗体对ARH-77细胞的结合图;(图4B)Lym-1单克隆抗体与Raji细胞的Scatchard图分析;(图4C)Lym-2单克隆抗体与ARH-77细胞的Scatchard图分析。

[0017] 图5A和5B示出了通过Lym-1(图5A)和SC-2抗HLA-DR抗体(图5B)进行的³⁵S-甲硫氨酸和¹⁴C-亮氨酸标记的Raji蛋白的免疫沉淀。

[0018] 图6A和6B示出了用于免疫治疗的(图6A)Lym-1和(图6B)Lym-2 CAR T细胞的构建示意图。图6A和6B公开了SEQ ID NO: 51。

[0019] 图7示出了非限制性的示例性Lym-1基因转移载体和转基因的示意图。基因转移载体的骨架是基于HIV的双顺反子慢病毒载体pLVX-IRES-ZsGreen,其包括HIV-1 5' 和3' 长末端重复(LTR)、包装信号(Ψ)、EF1 α 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、ZsGreen(一种绿色荧光蛋白)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、和猿病毒40来源(SV40)。通过EF-1 α 启动子的存在,确保了包含CD8前导序列、Lym-1特异性scFV、CD8铰链和跨膜区域以及4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的转基因的组成型表达。通过IRES区域进行检测蛋白质ZsGreen的表达。可以通过荧光显微镜观察细胞中ZsGreen的存在来评估载体的整合。

[0020] 图8示出了Lym-1 CAR在原代人类T细胞上的表达。将T细胞用Lym-1 CAR进行转导,并先后用生物素-蛋白L和链霉亲和素-PE进行染色。通过流式细胞术分析细胞。

[0021] 图9示出了Lym-1-CAR T细胞的细胞毒性。使用如在“方法”中所述的LDH细胞毒性试剂盒测定表达Lym-1 CAR的T细胞的细胞毒性。在测定之前,使用 α CD3/CD8珠(Stem Cell Technologies,30 μ l至2ml的培养基)活化T细胞。用Lym-1 CAR慢病毒颗粒转导活化的T细胞,然后用 α CD3/CD8珠活化T细胞。将未转导的活化的T细胞用作对照。每孔接种15,000个Raji细胞。以20:1、10:1、5:1和1:1的比率将Lym-1 CAR转导的T细胞加入孔中。每个数据点代表三次测量的平均值。

[0022] 图10示出了非限制性的示例性Lym-2基因转移载体和转基因的示意图。基因转移载体的骨架是基于HIV的双顺反子慢病毒载体pLVX-IRES-ZsGreen,其包括HIV-1 5' 和3' 长末端重复(LTR)、包装信号(Ψ)、EF1 α 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、ZsGreen(一种绿色荧光蛋白)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、和猿病毒40来源(SV40)。通过EF-1 α 启动子的存在,确保了包含CD8前导序列、Lym-2特异性scFV、CD8铰链和跨膜区域以及CD28、4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的转基因的组成型表达。通过IRES区域进行检测蛋白质

ZsGreen的表达。可以通过荧光显微镜观察细胞中ZsGreen的存在来评估载体的整合。

[0023] 图11示出了Lym-2 CAR在原代人类T细胞上的表达。将T细胞用Lym-2 CAR进行转导,并先后用生物素-蛋白L和链霉亲和素-PE进行染色。通过流式细胞术分析细胞。

[0024] 图12示出了Lym-2-CAR T细胞的细胞毒性。使用如在“方法”中所述的LDH细胞毒性试剂盒测定表达Lym-2 CAR的T细胞的细胞毒性。在测定之前,使用 α CD3/CD8珠(Stem Cell Technologies, 30 μ l至2ml的培养基)活化T细胞。用Lym-2 CAR慢病毒颗粒转导活化的T细胞,然后用 α CD3/CD8珠活化T细胞。将未转导的活化的T细胞用作对照。每孔接种15,000个Raji细胞。以20:1、10:1、5:1和1:1的比率将Lym-2 CAR转导的T细胞加入孔中。每个数据点代表三次测量的平均值。

[0025] 图13证明了Lym-1、Lym-2和CD19 CAR T细胞对人类淋巴瘤Raji细胞具有高度细胞毒性。Raji Burkitt淋巴瘤细胞对于由Lym-1和Lym-2靶向的HLA-Dr以及作为CD19 CAR T细胞的阳性对照的CD19都是阳性的。阴性对照由CD3+ T细胞和ZsGreen细胞组成。

[0026] 图14证明了Lym-1、Lym-2而非CD19 CAR在体外对HLA-Dr阳性但CD19阴性的TLBR-2人类T淋巴瘤细胞具有高度细胞溶解性(细胞毒性)。来自乳房植入物相关淋巴瘤的TLBR-2人类T淋巴瘤细胞对于HLA-Dr而非CD19是阳性的(Lechner et al. (2012) Clin. Cancer Res. 18 (17):4549-4559)。这些结果证明了Lym-1和Lym-2 CAR T细胞的特异性及其杀死HLA-Dr阳性肿瘤的效力。使用常规的未转导的原代T细胞将Lym-1 CAR-T和CD19 CAR-T阳性细胞的百分比调整至50%。Lym-2 CAR-T细胞的百分比是24%。

[0027] 图15示出了转染的NK细胞的FAC分析结果。

[0028] 详细描述

应该理解的是,本发明不被限制至所述特定的方面,因为这些方面当然可能发生改变。还应该理解的是,本文所用的术语仅仅是为了描述特定的方面,并且并非旨在限制,因为本发明的范围将仅仅被附加的权利要求限制。

[0029] 除非另有定义,否则此处所使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同含义。虽然与本文所述的任何方法和材料类似或等价的方法和材料可用于实践或测试本技术,但现在要描述的是目前优选的方法、装置和材料。此处引用的所有技术和专利出版物均通过引用纳入本文中。本文的任何部分不应被解释为承认本技术不早于这些公开内容。

[0030] 除非另有说明,否则本技术的实践将采用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,这是在本领域的技术之内的。参见例如 Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid*

Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); 以及 Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*。

[0031] 所有数值(包括范围值),例如pH、温度、时间、浓度和分子量,都是近似值,适当时可上(+)下(-)浮动1.0或0.1,或浮动+/- 15%、或10%、或5%、或2%。要理解的是,虽然不会总是明确表述,但所有数值前都有术语“约”。还要理解的是,虽然不会总是明确表述,但本文所述的试剂仅仅是示例性的,这些试剂的等效物在本领域是已知的。

[0032] 不需明确指出,除非另有说明,否则推定当本发明涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,它们的等效物或生物等效物也预期在本发明的范围内。

[0033] 定义

如在本文和在权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”、以及“所述”包括复数指代,除非文中另外明确规定。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0034] 如本文所用的,术语“动物”表示活的多细胞脊椎动物生物,是包括例如哺乳动物和鸟类的类别。术语“哺乳动物”包括人类哺乳动物和非人类哺乳动物。

[0035] 术语“对象”、“宿主”、“个体”和“患者”在此被可交换地使用,表示人类和兽医对象,例如人类、动物、非人灵长类动物、狗、猫、羊、鼠、马和牛。在一些实施方式中,所述对象是人类。

[0036] 如本文使用的,术语“抗体”统一指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括例如但不限于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM及其组合,以及在任何脊椎动物中在免疫反应期间产生的类似分子,所述脊椎动物例如是哺乳动物(例如人类、山羊、兔和鼠)以及非哺乳动物物种(例如鲨鱼免疫球蛋白)。除非另有具体说明,否则术语“抗体”包括特异性地结合至感兴趣的分子(或感兴趣的高度相似的分子的群组)至实质性排除结合至其他分子的完整的免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”(例如,在生物样品中与对其他分子的结合常数相比,对感兴趣的分子的结合常数大至少 10^3 M^{-1} 、至少 10^4 M^{-1} 或至少 10^5 M^{-1} 的抗体和抗体片段)。术语“抗体”还包括遗传工程形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、异源偶联抗体(例如双特异性抗体)。还请参见Pierce Catalog and Handbook (1994-1995) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J. (1997) *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York。抗体的“抗原结合片段”是抗体的保留特异性地结合至抗体的靶抗原的能力的一部分。

[0037] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是指,通过B淋巴细胞的单一克隆制造的抗体,或者通过其中已经转染了单一抗体的轻链和重链基因的细胞制造的抗体。单克隆抗体是通过本领域技术人员已知的方法制造的,例如通过由骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合而制造杂交抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体和人类抗体。

[0038] 就抗体结构而言,免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。存

在两种类型的轻链： λ 和 κ 。存在决定抗体分子的功能活性的五种主要的重链类型（或同种型）：IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每个重链和轻链都包括恒定区域和可变区域（所述区域也被称为“结构域”）。结合起来，重链和轻链可变区域特异性地结合抗原。重链和轻链可变区域包括被三个高度可变区域打断的“框架”区域，所述高度可变区域也被称为“互补决定区域”或“CDR”。框架区域和CDR的范围已经被确定（参见Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 其以引用的方式合并入本文中）。Kabat数据库现在在线维护。不同的轻链或重链的框架区域的序列在物种之内是相对保守的。抗体的框架区域，即组成的轻链和重链的结合的框架区域，主要采用 β 折叠构象，而CDR形成环，该环连接所述 β 折叠结构或者在一些情况中形成所述 β 折叠的一部分。因此，框架区域作用来形成支架，其用来通过互链、非共价相互作用将CDR定位在正确的朝向中。

[0039] CDR主要负责结合至抗原的表位。每个链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3，这是从N末端开始依次进行编号，并且也通常由该特定的CDR所位于的链而确定（重链区域标记为CDHR而轻链区域标记为CDLR）。因此，CDHR3是来自位于发现其的抗体的重链的可变结构域的CDR3，而CDLR1是来自发现其的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。TNT抗体将具有对TNT相关抗原独特的特异性的 V_H 区域和 V_L 区域序列，并因此具有特异性的CDR序列。具有不同的特异性（即对不同抗原的不同结合位点）的抗体具有不同的CDR。虽然抗体与抗体之间不同的是CDR，但是在CDR之内只有数量有限的氨基酸位置直接涉及抗原结合。在CDR之内的这些位置被称为特异性决定残基（SDR）。

[0040] 如本文使用的，术语“抗原”是指可以被特异性的体液或细胞免疫的产品（例如抗体分子或T细胞受体）特异性地结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子，包括例如半抗原、简单中间代谢物、糖（例如寡糖）、脂质和激素以及大分子（例如复合碳水化合物（例如多糖）、磷脂和蛋白质。常见的抗原的类别包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物和其他寄生虫抗原、肿瘤抗原、涉及自身免疫性疾病的抗原、过敏和移植排斥、毒素和其他杂项抗原。

[0041] 如本文使用的，术语“抗原结合结构域”是指能够特异性地结合至抗原靶标的任何蛋白或多肽结构域。

[0042] 如本文使用的，术语“嵌合抗原受体”（CAR）是指这样的融合蛋白，其包括能够结合至抗原的细胞外结构域、衍生自与该细胞外结构域衍生自的多肽不同的多肽的跨膜结构域、以及至少一个细胞内结构域。“嵌合抗原受体（CAR）”有时被称为“嵌合受体”、“T-体（T-body）”或“嵌合免疫受体（CIR）”。“能够结合至抗原的细胞外结构域”是指能够结合至某个抗原的任何寡肽或多肽。“细胞内结构域”或“细胞内信号传导结构域”是指已知用作发送信号来引起细胞内的生物过程的激活或抑制的结构域的任何寡肽或多肽。在一些实施方式中，除了主信号传导结构域之外，细胞内结构域可以包括一个或多个共刺激信号传导结构域、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。“跨膜结构域”是指已知跨越细胞膜并且能够作用来连接细胞外结构域和信号传导结构域的任何寡肽或多肽。嵌合抗原受体可以任选地包括“铰链（hinge）结构域”，其用作细胞外结构域和跨膜结构域之间的接头。本文提供了其非限制性的例子，例如：

铰链结构域：IgG1重链铰链序列，SEQ ID NO：42：

CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCG

跨膜结构域:CD28跨膜区域,SEQ ID NO: 43:

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTT
TCTGGGTG

细胞内结构域:4-1BB共刺激信号传导区域,SEQ ID NO: 44:

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGG
AAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

细胞内结构域:CD28共刺激信号传导区域,SEQ ID NO: 45:

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCA
AGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

细胞内结构域:CD3 ζ 信号传导区域,SEQ ID NO: 46:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT
GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA。

[0043] 如本文使用的,术语“HLA-DR”是指与该名称相关的MHC II类细胞表面受体,以及
与任何HLA-DR变体具有至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、或至少95%序列同
一性的具有类似的生物功能的任何其他分子,包括但不限于其数个变体中的任何一个,包
括但不限于包含HLA-DRA和HLA-DRB单倍型的组合的HLA-DR血清型DR1至DR75。HLA-DR序列
的例子在本领域中是已知的,在Rose, L.M. et al. (1996) Cancer Immunol.
Immunother. 43:26-30中公开了其非限制性的例子:

HLA-DRB1*1001 [DR10] SEQ ID NO: 30 GDTRPRFLEEVKFECHFFNGTERVRLLERRVHNQEEYA
RYSDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLERRRAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHHNLL
VCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPQSSEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARS
ESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQKGHSLPPTGFLS;HLA-DRB3*0201 [DR52] SEQ ID NO:
31 GDTRPRFLELLKSECHFFNGTERVRFLERHFHNQEEYARFSDSDVGEYRAVFELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRQ
VDNYCRHNYGVVESFTVQRRVHPQVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNG
DWTFTQLVMLETFRPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWSARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQKGHS
GLQPTGFLS;HLA-DRB1*0301 [DR17 (3)] SEQ ID NO: 32 GDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRYLD
RYFHNQEENVRFDSDVGEFRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRGRVDNYCRHNYGVVESFTVQRRVHPKVTVPYPSK
TQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTS
PLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQKGHSLQPRGFLS,及其每个的等效物。

[0044] Rose等人还公开了HLA-DR特异性抗体可以结合的示例性表位,因此其可以用作产
生其他抗体、单克隆抗体及其每个的抗原结合片段的免疫原。与对应于名称HLA-DR或其等
效物(包括但不限于特定的HLA-DR亚型)的列出的参考和GenBank登录号中的每一个相关的
序列通过引用并入本文作为附加的非限制性实例。

[0045] “组合物”通常是指活性剂(例如CAR T细胞或CAR NK细胞、抗体、化合物)和天然存
在或非天然存在的载体的组合,所述载体是惰性的,例如可检测试剂或标签,或者是活性

的,例如佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等,并且包括药学上可接受的载体。载体还包括药物赋形剂和添加剂蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二寡糖、三寡糖、四寡糖和寡糖;衍生的糖,例如糖醇、醛糖酸、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物),其可以单独地或组合地存在,以重量或体积计单独地或组合地包括1-99.99%。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA))、明胶、酪蛋白等。还可以以缓冲能力起作用的代表性的氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。碳水化合物赋形剂也旨在位于本技术的范围之内,其例子包括但不限于:单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及糖醇,例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇(葡萄糖醇)和肌醇。

[0046] 如本文使用的,术语“共有序列(consensus sequence)”是指这样的氨基酸或核苷酸序列,其通过对齐一系列的多个序列而确定,并且定义了代表在所述多个序列的每个对应位置处的氨基酸或碱基的主要选择的理想化序列。根据该系列的多个序列的序列,该系列的共有序列可以与这些序列的每一个有零个、一个、几个、或更多个取代基的不同。并且,根据该系列的多个序列的序列,可以对该系列确定一个以上的共有序列。已经对共有序列的生成进行过深入的数学分析。可以使用各种软件程序来确定共有序列。

[0047] 如本文使用的,术语“CD8 α 铰链结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD8 α 铰链结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177中提供了人类、小鼠和其他物种的CD8 α 铰链结构域的示例性序列。在Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177中提供了与CD8 α 铰链结构域相关的序列。其非限制性的例子包括:

人类CD8 α 铰链结构域 (SEQ ID NO: 33);
PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY 小鼠CD8 α 铰链结构域 (SEQ ID NO: 34);
KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY 猫CD8 α 铰链结构域 (SEQ ID NO: 35);
PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY,及其每个的等效物。

[0048] 如本文使用的,术语“CD8 α 跨膜结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD8 α 跨膜结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。与人类T细胞表面糖蛋白CD8 α 链的183至203位氨基酸(NCBI参考序列:NP_001759.3)、或者小鼠T细胞表面糖蛋白CD8 α 链的197至217位氨基酸(NCBI参考序列:NP_001074579.1)、以及大鼠T细胞表面糖蛋白CD8 α 链的190至210位氨基酸(NCBI参考序列:NP_113726.1)相关的片段序列,提供了CD8 α 跨膜结构域的其他示例性序列。与列出的NCBI的每一个相关的序列提供如下:

人类CD8 α 跨膜结构域, (SEQ ID NO: 36): IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT; 小鼠CD8 α 跨膜

结构域, (SEQ ID NO: 37): IWAPLAGICVALLLSLIITLI; 大鼠CD8 α 跨膜结构域, (SEQ ID NO: 38): IWAPLAGICAVLLLSLVITLI, 及其每个的等效物。

[0049] 如本文使用的, 术语“4-1BB共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段, 以及与本文所示的4-1BB共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国专利公开号2013/0266551 A1 (以美国申请号13/826,258提交) 中提供了4-1BB共刺激信号传导区域的非限制性的示例性序列。在美国申请号13/826,258中公开的4-1BB共刺激信号传导区域相关的序列公开如下:

4-1BB共刺激信号传导区域 (SEQ ID NO: 39): KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL, 及其每个的等效物。

[0050] 如本文使用的, 术语“CD28共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段, 以及与本文所示的CD28共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。CD28共刺激区域包含跨膜结构域和胞内结构域。在美国专利号5,686,281; Geiger, T.L. et al. (2001) Blood 98:2364-2371; Hombach, A. et al. (2001) J Immunol. 167:6123-6131; Maher, J. et al. (2002) Nat Biotechnol. 20:70-75; Haynes, N.M. et al. (2002) J Immunol. 169:5780-5786; Haynes, N.M. et al. (2002) Blood 100:3155-3163中提供了示例性的CD28共刺激信号传导结构域序列。非限制性的例子包括以下CD28序列的114-220残基, (SEQ ID NO: 40): MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSD YMNMPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS ; 及其等效物。

[0051] 如本文使用的, 术语“ICOS共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段, 以及与本文所示的ICOS共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国公开号2015/0017141A1中提供了ICOS共刺激信号传导区域的非限制性的示例性序列。示例性的多核苷酸序列提供如下。

[0052] ICOS共刺激信号传导区域, SEQ ID NO: 47:

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta。

[0053] 如本文使用的, 术语“OX40共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段, 以及与本文所示的OX40共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国公开号2012/20148552A1中公开了OX40共刺激信号传导区域的非限制性的示例性序列, 其包括以下提供的示例性序列。

[0054] OX40共刺激信号传导区域, SEQ ID NO: 48:

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA GTTTCGGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATC。

[0055] 如本文使用的, 术语“CD3 ζ 信号传导结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片

段,以及与本文所示的CD3 ζ 信号传导结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国申请号13/826,258(公开号US 2013/0266551)中提供了CD3 ζ 信号传导结构域的非限制性的示例性序列。与CD3 ζ 信号传导结构域相关的序列如下(SEQ ID NO: 41):

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR,及其等效物。

[0056] 如本文使用的,术语“T细胞”是指在胸腺中成熟的一类淋巴细胞。T细胞在细胞介导的免疫中起重要作用,并且与其他淋巴细胞(例如B细胞)的不同点在于细胞表面上存在T细胞受体。

[0057] 如本文使用的,术语“NK细胞”(也被称为自然杀伤细胞)是指起源于骨髓并且在先天免疫系统中起重要作用的一类淋巴细胞。NK细胞提供针对病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫反应,即使是细胞表面上不存在抗体和主要组织相容性复合体。

[0058] 如本文使用的,术语“核酸序列”和“多核苷酸”被可互换地使用来指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、DNA基因组、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学的或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0059] 术语“编码”在被应用至核酸序列时是指,被陈述来“编码”多肽的多核苷酸,以其天然状态或者在通过本领域技术人员熟知的方法操纵时,可以被转录和/或翻译来产生用于该多肽和/或其片段的mRNA。反义链是这样的核酸的补体,并且编码序列可以由此导出。

[0060] 如本文使用的,术语“信号肽”或“信号多肽”是指通常出现在新合成的分泌或膜多肽或蛋白的N末端的氨基酸序列。它作用来引导多肽跨过或者进入细胞膜,然后随后被移除。其例子在本领域中是已知的。非限制性的例子是在美国专利号8,853,381和5,958,736中描述的。

[0061] 如本文使用的,术语“载体”是指被设计来用于在不同的宿主之间传送的核酸构建体,其包括但不限于质粒、病毒、粘粒、噬菌体、BAC、YAC等。在一些实施方式中,可以从商业上可获得的载体制备质粒载体。在其他实施方式中,可以根据本领域已知的技术从杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒、AAV等制造病毒载体。在一个实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。

[0062] 如本文使用的,术语“分离的细胞”通常是指细胞基本上和组织的其他细胞分离。该术语包括原核和真核细胞。

[0063] “免疫细胞”包括例如衍生自在骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白血细胞(白细胞)、淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和骨髓来源的细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 γ - δ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+ T细胞、自然杀伤(NK)细胞和嗜中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。

[0064] 术语“转导”在其被应用至生产嵌合抗原受体细胞时是指,外来核酸序列被引入细胞中的过程。在一些实施方式中,该转导是通过载体完成的。

[0065] 如本文使用的,术语“自体同源的(autologous)”在涉及细胞时是指,被分离并且

被灌注回相同的对象(受体或宿主)的细胞。“同种异体的(allogeneic)”是指非自体同源的细胞。

[0066] “有效量”是指该量的试剂(例如HLA-DR CAR细胞)或合并的量的两种或多种试剂在被施用来治疗哺乳动物或其他个体时,足以影响对疾病的这种治疗。“有效量”将会根据试剂、疾病及其严重程度和要被治疗的对象的年龄、体重等而发生变化。

[0067] “实体肿瘤”是通常不包括囊肿或液体区域的异常的组织块。实体肿瘤可以是良性的或恶性的。不同类型的实体肿瘤以形成它们的细胞的类型命名。实体肿瘤的例子包括肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0068] 术语“B细胞淋巴瘤或白血病”是指这样的一种癌症,它在淋巴系统或骨髓的问题中形成,并经历恶性转化,其使得在对宿主有机体病态的癌症之内的细胞能够侵入或扩散到身体的其他部位。

[0069] 如本文使用的,术语“包括”旨在表示组合物和方法包括所述的元素但不排除其他元素。“基本上由……组成”当被用来定义组合物和方法时,应该表示排除对于预期用途的组合来说具有任何实质性作用的其他元素。例如,如本文定义的基本上由该元素组成的组合物,将不会从分离和纯化方法和药学上可接受的载体(例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)中排除微量污染物。“由……组成”应该表示排除多于微量元素的其他成分和用于施用本文公开的组合物实质性方法步骤。通过这些过渡性术语的每一个进行定义的方面都在本发明的范围之内。

[0070] 如本文使用的,术语“可检测的标记物”是指能够直接或间接制造可检测的信号至少一个标记物。该标记物的非穷举性的列表包括酶,其例如通过比色、荧光、发光制造可检测的信号,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、发色团(例如荧光剂、发光染料)、带有通过电子显微镜或通过其电性质(例如电导率、电流分析、伏安法、阻抗)检测的电子密度的基团、可检测的基团,例如其分子具有足够的大小来诱导其物理和/或化学性质上的可检测的修饰,这样的检测可以通过任选的方法完成,例如衍射、表面等离子体共振、表面变化、接触角变化或物理方法(例如原子力谱、隧道效应)、或放射性分子(例如 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I)。

[0071] 如本发明使用的,术语“纯化标记物”是指可用于纯化或鉴定的至少一个标记物。该标记物的非穷举性的列表包括His、lacZ、GST、麦芽糖结合蛋白、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、樱桃、硫氧还蛋白、聚(NANP)、V5、Snap、HA、几丁质结合蛋白、Softag 1、Softag 3、Strep或S蛋白。合适的直接或间接荧光标记物包括FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、樱桃、Cy3、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7、DNP、AMCA、生物素、地高辛、Tamra、得克萨斯红、罗丹明、Alexa荧光、FITC、TRITC或任何其他荧光染料或半抗原。

[0072] 如本文使用的,术语“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或被转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白的过程。如果多核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可以包括mRNA在真核细胞中的剪接。可以通过测量细胞或组织样品中mRNA或蛋白的量确定基因的表达水平。在一个方面,来自一个样品的基因的表达水平可以直接与来自对照或参照样品的基因的表达水平进行比较。在另一个方面,来自一个样品的基因的表达水平可以在施用化合物之后直接与来自同一样品的该基因的表达水平进行比较。

[0073] 如本文使用的,当被用在两个或更多个核酸或多肽序列的内容中时,“同源性”或

“相同的”、“同一性”或“相似性”百分比是指,两个或更多个序列或子序列是相同的,或者在特定的区域(例如编码本文所述的抗体的核苷酸序列或本文所述的抗体的氨基酸序列)上特定百分比的核苷酸或氨基酸残基是相同的,例如至少60%同一性、优选地至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。可以通过比较为了进行比较而被对齐的每个序列中的位置,确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则这些分子在该位置是同源的。序列之间的同源性的程度是这些序列享有的匹配的或同源的位置的数目的函数。可以使用本领域已知的软件程序来确定对齐和同源性或序列同一性百分比,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1中描述的软件程序。优选地,使用默认参数进行对齐。优选的对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选的程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。术语“同源性”或“相同的”、“同一性”或“相似性”百分比还表示、或者可以被应用至测试序列的补体。所述术语还包括具有缺失和/或添加、以及具有取代基的序列。如本文描述的,优选的算法可以解释间隙等。优选地,在长度至少为约25个氨基酸或核苷酸的区域上、或者更优选地在长度至少为50-100个氨基酸或核苷酸的区域上存在同一性。“不相关的”或“非同源的”序列与本文公开的序列中的一个享有少于40%的同一性、或者替代地少于25%的同一性。

[0074] 短语“一线”或“二线”或“三线”是指患者接受的治疗的顺序。一线治疗方案是首先给出的治疗,而二线或三线疗法是分别在一线疗法之后或在二线疗法之后给出的。美国国家癌症研究所将一线疗法定义为“用于疾病或病症的第一治疗”。在患有癌症的患者中,主要的治疗可以是手术、化疗、放射治疗或这些疗法的组合。一线疗法还被本领域技术人员称为“主要疗法和主要治疗”。参见美国国家癌症研究所的网站www.cancer.gov,最后一次访问是在2008年5月1日。通常,患者被给予后续的化疗方案,因为患者对一线疗法没有显示出阳性的临床或亚临床反应,或者一线疗法已经停止。

[0075] 在一个方面,术语抗体的“等效物”或“生物等效物”表示抗体如通过ELISA或其他合适的方法测定地选择性地结合其表位蛋白或其片段的能力。生物等效的抗体包括但不限于与参照抗体结合至相同的表位的抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。

[0076] 在没有明确描述的情况下应该推断、并且除非另有说明,否则当本技术涉及多肽、蛋白、多核苷酸或抗体时,这样的等效物或生物等效物旨在落入本技术的范围之内。如本文使用的,在指示蛋白、抗体、多肽或核苷酸时,术语“其生物等效物”旨在与“其等效物”是同义的,是指具有最小的同源性,同时仍然保持期望的结构或功能。除非本文具体说明,否则可以预期的是,本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白还包括其等效物。例如,等效物是指与参照蛋白、多肽或核苷酸具有至少约70%同源性或同一性、或至少80%同源性或同一性和替代地、或至少约85%、或替代地至少约90%、或替代地至少约95%、或替代地98%百分比同源性或同一性并且表现出基本上等效的生物活性。替代地,当指示多核苷酸时,其等效物是在

严格条件下与参照多核苷酸或其补体(complement)杂交的多核苷酸。替代地,当指示多肽或蛋白质时,其等效物是来自在严格条件下与编码参考多肽或蛋白质的多核苷酸或其补体杂交的多核苷酸表达的多肽或蛋白质。

[0077] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一个序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”是指,当被对齐时,该百分比的碱基(或氨基酸)在两个序列的比较中是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定对齐和同源性或序列同一性百分比,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1中描述的软件程序。优选地,使用默认参数进行对齐。优选的对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选的程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0078] “杂交”是指其中一个或多个多核苷酸反应来形成复合物,并且该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键结合而被稳定的反应。可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen结合或通过任何其他序列特异性的方式来发生氢键结合。所述复合物可以包括形成双螺旋结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单一的自我杂交的链、或这些的任何组合。杂交反应可以由在更广泛的过程中的步骤组成,例如PCR过程的起始步骤、或者通过核酶进行的多核苷酸的酶裂解步骤。

[0079] 严格杂交条件的例子包括:约25°C至约37°C的孵育温度;约6x SSC至约10x SSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;以及约4x SSC至约8x SSC的洗涤溶液。中度杂交条件的例子包括:约40°C至约50°C的孵育温度;约9x SSC至约2x SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;以及约5x SSC至约2x SSC的洗涤溶液。高严格杂交条件的例子包括:约55°C至约68°C的孵育温度;约1x SSC至约0.1x SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1x SSC至约0.1x SSC的洗涤溶液、或去离子水。一般来说,杂交孵育时间为5分钟至24小时,具有1、2、或更多个洗涤步骤,并且洗涤孵育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15 M NaCl和15 mM柠檬酸缓冲液。应该理解的是,可以采用使用其他缓冲系统的SSC的等效物。

[0080] “与肿瘤组织类型对应的正常细胞”是指来自与肿瘤组织相同的组织类型的正常细胞。非限制性例子是来自患有肺肿瘤的患者们的正常肺细胞、或者来自患有结肠肿瘤的患者们的正常结肠细胞。

[0081] 如本文使用的,术语“分离的”是指,分子或生物体或细胞材料基本上不含其他材料。在一个方面,术语“分离的”是指,核酸(例如DNA或RNA)或蛋白或多肽(例如抗体或其衍生物)或细胞或细胞器、或组织或器官与存在于自然来源中的其他DNA或RNA、或蛋白或多肽、或细胞或细胞器、或组织或器官分离。术语“分离的”还指,核酸或肽基本上不含细胞材料、病毒材料、或培养基(当通过重组DNA技术生产时)、或化学前体或其他化学品(当化学合成时)。再者,“分离的核酸”旨在包括天然地不形成片段并且不会在天然状态下发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中还被用来指从其他细胞蛋白分离的多肽,并且旨在包括纯化的和重组的多肽。术语“分离的”在本文中还被用来指从其他细胞分离的细胞或组织,并

且旨在包括培养的和工程化的细胞或组织。

[0082] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是指,通过B淋巴细胞的单一克隆制造的抗体,或者通过其中已经转染了单一抗体的轻链和重链基因的细胞制造的抗体。单克隆抗体是通过本领域技术人员已知的方法制造的,例如通过由骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合而制造杂交抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0083] 术语“蛋白”、“肽”和“多肽”被可互换地使用,并且以其最广泛的意义来指两个或更多个氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物子单元的化合物。所述子单元可以通过肽键而被连接。在另一个方面,所述子单元可以通过其他键(例如酯键、醚键等)而被连接。蛋白或肽必须包括至少两个氨基酸,并且对于可以组成蛋白或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。如本文使用的,术语“氨基酸”是指天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L光学异构体、氨基酸类似物和肽模拟物。

[0084] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”被可互换地使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其类似物。多核苷酸可以具有任意的三维结构并且可以进行已知或未知的任何作用。以下是多核苷酸的非限制性例子:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、RNAi、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则对核苷酸结构的修饰可以被施加在多核苷酸的组装之前或之前。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。多核苷酸可以在聚合之后被进一步修饰,例如与标签组分偶联。该术语还指双链分子和单链分子。除非另有说明或者需要,否则本技术的涉及多核苷酸任何方面都包括双链形式以及已知或预测形成双链形式的两个互补的单链形式中的每一个。

[0085] 如本文使用的,术语“纯化的”不要求绝对的纯度;相反,它旨在作为相对性的的术语。因此,例如,纯化的核酸、肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物是整体地或部分地与蛋白或其他污染物分离的。通常,用于在本发明中使用的基本上纯化的肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物,在该肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物与药物载体、赋形剂、缓冲剂、吸收促进剂、稳定剂、防腐剂、佐剂或其它辅助成分在用于治疗性给药的完整的药物制剂中混合或制备之前,包括多于80%的存在于制剂中的所有大分子物种。更一般地,在与其他制剂成分混合之前,所述肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物被纯化,以代表大于90%、通常大于95%的存在于纯化制剂中的所有大分子物种。在其他情况中,纯化制剂可以是基本上均质的,其中其他大分子物种不能通过常规技术而被检测到。

[0086] 如本文使用的,术语“特异性结合”是指抗体和抗原之间的接触具有的结合亲和力为至少 10^{-6} M。在一些方面,抗体结合具有的亲和力为至少约 10^{-7} M,并且优选 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M。

[0087] 如本文使用的,术语“重组蛋白”是指通过重组DNA技术制造的多肽,其中通常编码该多肽的DNA被插入进合适的表达载体,该表达载体被用来转化宿主细胞以产生异源蛋白。

[0088] 如本文使用的,“治疗”在对象中的疾病是指(1)防止症状或疾病在预先有倾向的或尚未显示疾病症状的对象中发生;(2)抑制疾病或阻止其发展;或者(3)改善或消退疾病或疾病的症状。如本领域中理解的,“治疗”是用于获得有益的或期望的结果(包括临床结

果)的方法。对于本技术的目的,有益的或期望的结果可以包括但不限于以下中的一种或多种:一个或多个症状的缓解或改善,病症(包括疾病)的程度的降低,病症(包括疾病)的稳定化(即不恶化)状态,病症(包括疾病)的延迟或减缓,病症(包括疾病)、状态和缓解(无论是部分还是全部)的进展、改善或缓解,无论是可检测的还是不可检测的。当该疾病是癌症时,以下临床终点是治疗的非限制性实例:肿瘤负荷减轻、肿瘤生长减缓、总体生存期延长、肿瘤进展时间延长、转移抑制或肿瘤转移减少。

[0089] 如本文使用的,术语“过度表达”是指细胞、组织、或器官表达蛋白的量大于在对照细胞、对照组织、或器官中生产的量。过度表达的蛋白可以对于宿主细胞来说是内源性的或者对于宿主细胞来说是外源性的。

[0090] 如本文使用的,术语“接头序列”是指任何这样的氨基酸序列,其包括可以被重复1至10、或替代地至约8、或替代地至约6、或替代地约5、或4或替代地3、或替代地2次的1至10个、或替代地8个氨基酸、或替代地6个氨基酸、或替代地5个氨基酸。例如,接头可以包括由重复三次的五肽组成的多达15个氨基酸残基。接头序列的非限制性例子在本领域中是已知的,例如GGGSGGGSGGGG(及其等效物)(SEQ ID NO: 49);三肽EFM;或者Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met (SEQ ID NO: 50),及其每个的等效物。在一个方面,接头序列是包括gly-gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 52)的三个拷贝的(Glycine4Serine)3柔性多肽接头(SEQ ID NO: 51),及其等效物。

[0091] 如本文使用的,术语“增强子”是指不管其相对于要被表达的氨基酸序列的位置和朝向,都增强、改善或改良氨基酸序列的转录的序列元件。增强子可以增强来自单个启动子的转录,或者同时增强来自一个以上的启动子的转录。只要保留或基本上保留该改善转录的功能(例如至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的野生型活性,即全长序列的活性),则野生型增强子序列的任何截断的、突变的或修饰的变体都同样在上述定义之内。

[0092] 如本文使用的,术语“启动子”是指调节编码序列(例如基因)的表达的任何序列。启动子可以例如是组成型的、可诱导的、可抑制的或组织特异性的。“启动子”是这样的控制序列,它是多核苷酸序列的一个区域,在此控制转录的起始和速率。它可以包括遗传性元件,在此调节蛋白和分子可以结合例如RNA聚合酶和其他转录因子。

[0093] 如本文使用的,术语“WPRE”或“土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件”是指与该名称相关的特定的核苷酸片段,以及与本文所示的WPRE序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。例如,WPRE是指在土拨鼠肝炎病毒基因组序列(GenBank登录号J04514)中出现的类似于人类乙型肝炎病毒转录后调控元件(HBVPRE)的区域,并且该基因组序列的1093位至1684位的592个核苷酸对应于转录后调控区域(Donello, J.E. et al. (1998) Journal of Virology 72:5085-5092)。使用逆转录病毒载体的分析显示,被插入至感兴趣的基因的3'末端未翻译区域的WPRE提高了产生的蛋白的量5至8倍。还被报道的是,WPRE的引入抑制了mRNA降解(Zufferey, R. et al. (1999) Journal of Virology 73:2886-2892)。在广义上,例如WPRE的通过使mRNA稳定而提高氨基酸翻译的效率的元件也被认为是增强子。

[0094] 缩写列表

CAR: 嵌合抗原受体 HLA: 组织相容性淋巴细胞抗原 Ip: 腹膜内 IRES: 内部核糖体

进入位点 MFI: 平均荧光强度 MOI: 感染复数 PBMC: 外周血单核细胞 PBS: 磷酸盐缓冲盐水 scFv: 单链可变片段 WPRE: 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件。

[0095] 用于实施本发明的方式

由于最近在B细胞淋巴瘤和白血病中利用基因工程嵌合抗原受体(CAR)T细胞进行自体治疗而获得了前所未有的结果(Maude, S.L. et al. (2014) New Engl. J. Med. 371: 1507-1517; Porter, D.L. et al. (2011) New Engl. J. Med. 365:725-733),许多实验室已经开始将这种方法应用于实体肿瘤,包括卵巢癌、前列腺癌和胰腺肿瘤。CAR修饰的T细胞将单克隆抗体的HLA非依赖性靶向特异性与活化的T细胞的细胞毒活性、增殖性及归巢特性相结合,但对检查站抑制不响应。由于其直接杀死抗原表达靶点的能力,CAR T细胞对任何抗原阳性细胞或组织都具有很高的毒性,因此有必要利用高度肿瘤特异性的抗体来构建CAR。到目前为止,已构建出了应用至人体实体肿瘤靶向 α -叶酸受体、间皮素和MUC-CD、PSMA及其他靶标的CAR修饰的T细胞,但大多数在正常组织中具有偏离靶标的抗原表达。这些构建体在患者中没有显示出同样的超常结果,所以需要进行更多的研究,以确定可用于抗实体肿瘤的CAR T细胞构建体的新靶点和方法。

[0096] 因此,本发明提供对HLA-DR特异的抗体,及其应用和生产相关的方法和组合物。此外,本发明提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含对HLA-DR特异的抗原结合域(在某些情况下是Lym-1和Lym-2抗体的抗原结合域),及其应用和生产相关的方法和组合物。

[0097] 抗体及其用途

I. 组合物

抗体的大体结构在本领域中是已知的,在此仅将进行简要的概述。免疫球蛋白单体包括通过二硫键连接的两条重链和两条轻链。每条重链都和轻链中的一个配对,它们通过二硫键被直接结合。每条重链包括恒定区域(其根据抗体的同种型而变化)和可变区域。可变区域包括三个高度可变区域(或互补决定区域),其被命名为CDRH1、CDRH2和CDRH3并且被支撑在框架区域之内。每条轻链包括恒定区域和可变区域,可变区域包括三个高度可变区域(命名为CDRL1、CDRL2和CDRL3),其以与重链的可变区域类似的方式被支撑在框架区域中。

[0098] 每对重链和轻链的高度可变区域相互配合来提供能够结合靶标抗原的抗原结合位点。每对重链和轻链的结合特异性由重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列来界定。因此,一旦确定了引起特定的结合特异性的一组CDR序列(即重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列),则原则上该组CDR序列能够被插入进通过任何抗体恒定区域来连接的任何其他抗体的框架之内的适当位置,从而提供具有相同的抗原结合特异性的不同的抗体。

[0099] 在一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,其包括重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,其中所述重链和轻链免疫球蛋白可变结构域序列形成结合至人类HLA-DR的表位的抗原。

[0100] 在一些实施方式中,重链可变区域包括CDRH1序列,所述CDRH1序列包含这样的氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成:所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始:(i) GFSLTSYG (SEQ ID NO: 1)、(ii) GFTFSNYW (SEQ ID NO: 2)、或其每个的等效物,接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0101] 在一些实施方式中,重链可变区域包括CDRH2序列,所述CDRH2序列包含这样的氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成:所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始:(i) IWSDGST (SEQ ID NO: 3)、(ii) IRFKSHNYAT (SEQ ID NO: 4)、或其每个的等效物,接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0102] 在一些实施方式中,重链可变区域包括CDRH3序列,所述CDRH3序列包含这样的氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成:所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始:(i) ASHYGSTLAFAS (SEQ ID NO: 5)、(ii) TRRIGNSDYDWWYFDV (SEQ ID NO: 6)、或其每个的等效物,接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0103] 在一些实施方式中,重链可变区域包括由以下多核苷酸序列编码的多肽、或基本上由其组成、或进一步由其组成:

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAAACCAGCTATGGTGTA CACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATATGGAGTGATGGAAGCACAACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACA ACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTCCAACTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGTCACTACGGTAGTACCCTTGCCCTTTGCTTCCTGGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 7)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0104] 在一些实施方式中,重链可变区域包括以下氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成:

QLKESGPGLVAPSQSLTCTISGFSLTSYGVHWVRQPPGKLEWLVIWSDGSTTYSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCASHYGSTLAFASWGHGTLVTVSA (SEQ ID NO: 8)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0105] 在一些实施方式中,重链可变区域包括由以下多核苷酸序列编码的多肽、或基本上由其组成、或进一步由其组成:

GAAGTGCAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGCTCCATGAACTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTTAAATCTCATAATTATGCAACACATTTGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACA ACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACCAGGAGGATAGGAACTCTGATTACGACTGGTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC (SEQ ID NO: 9)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

在一些实施方式中,重链可变区域包括以下氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成:

EVQLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKLEWVAEIRFKSHNYATHFAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNNLRAEDTGIYYCTRRIGNSDYDWWYFDVWGAGTSVTVSSAS (SEQ ID NO: 10)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0106] 在一些实施方式中,轻链可变区域包括CDRL1序列,所述CDRL1序列包含这样的氨

氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成：所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始：(i) VNIYSY (SEQ ID NO: 11)、(ii) QNVGNN (SEQ ID NO: 12)、或其每个的等效物，接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0107] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括CDRL2序列，所述CDRL2序列包含这样的氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成：所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始：(i) NAK (SEQ ID NO: 13)、(ii) SAS (SEQ ID NO: 14)、或其每个的等效物，接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0108] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括CDRL3序列，所述CDRL3序列包含这样的氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成：所述氨基酸序列以以下序列中的任一个开始：(i) QHHYGTFT (SEQ ID NO: 15)、(ii) QQYNTYPFT (SEQ ID NO: 16)、或其每个的等效物，接着是在羧基末端额外的50个氨基酸、或替代地约40个氨基酸、或替代地约30个氨基酸、或替代地约20个氨基酸、或替代地约10个氨基酸、或替代地约5个氨基酸、或替代地约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0109] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括由以下多核苷酸序列编码的多肽、或基本上由其组成、或进一步由其组成：

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCATATGTCGAGCAAGTGTGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCCAAAATCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTACATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 17)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0110] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括以下氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成：

DIQMTQSPASLSASVGETVTIIICRASVNIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNKILAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0111] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括由以下多核苷酸序列编码的多肽、或基本上由其组成、或进一步由其组成：

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACACCTATCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 19)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0112] 在一些实施方式中，轻链可变区域包括以下氨基酸序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成：

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGNNAWYQQKPGQSPKVLISASRYSGVPDRFTGSGSGTDFTL

TISNVQSEDLAEYFCQQYNTYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)、或其抗原结合片段或其每个的等效物。

[0113] 在技术的另一个方面,所述分离的抗体包括以下特征中的一个或多个:

(a)轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括与公开的轻链序列中的任一个的轻链可变结构域的CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

(b)重链免疫球蛋白可变结构域序列包括与公开的重链序列中的任一个的重链可变结构域的CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

(c)轻链免疫球蛋白可变结构域序列与公开的轻链序列中的任一个的轻链可变结构域至少85%相同;

(d)HC免疫球蛋白可变结构域序列与公开的轻链序列中的任一个的重链可变结构域至少85%相同;以及

(e)所述抗体结合的表位与由公开的序列中的任一个结合的表位有重叠。

[0114] 在表1和表2中分别公开了包含所公开的CDR序列和重链和轻链可变序列的示例性的抗体。

[0115] 表1:

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Lym-1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15
Lym-2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16

表2:

抗体	重链可变区域	轻链可变区域
Lym-1	SEQ ID NO: 7和8	SEQ ID NO: 17和18
Lym-2	SEQ ID NO: 9和10	SEQ ID NO: 19和20

在一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,它与选自Lym-1和Lym-2的抗体至少85%相同。

[0116] 在一个方面,本发明提供了包含Lym-1的CDR的分离的抗体。在一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,它与Lym-1至少85%相同。

[0117] 在一个方面,本发明提供了包含Lym-2的CDR的分离的抗体。在一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,它与Lym-2至少85%相同。

[0118] 在本发明提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包括Lym-1的可变结构域序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成,并且LC可变结构域序列包括Lym-1的可变结构域序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成。

[0119] 在本发明提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包括Lym-2的可变结构域序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成,并且LC可变结构域序列包括Lym-2的可变结构域序列、或基本上由其组成、或进一步由其组成。

[0120] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体结合人类HLA-DR的解离常数(K_D)为小于 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M。在本文提供的抗体的一些方面,所述抗原结合位点特异性地结合至人类HLA-DR。

[0121] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是可溶性Fab。

[0122] 在本文提供的抗体的一些方面,所述HC和LC可变结构域序列是相同的多肽链的部件。在本文提供的抗体的一些方面,所述HC和LC可变结构域序列是不同的多肽链的部件。

- [0123] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是全长抗体。
- [0124] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是单克隆抗体。
- [0125] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是嵌合的或人源化的。
- [0126] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体片段选自Fab、F(ab)'₂、Fab'、scF_v和F_v。
- [0127] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体包括Fc结构域。在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是兔抗体。在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是人或人源化抗体或在人体中是非免疫原性的。
- [0128] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体包括人抗体构架区。
- [0129] 在其他方面,在本文提供的抗体的CDR中的一个或多个氨基酸残基被另一个氨基酸取代。所述取代可以是“保守的”,意思是在相同家族的氨基酸之内的取代。天然存在的氨基酸可以被分为以下四个家族并且保守性取代将在这些家族之内发生。
- [0130] 1) 具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸、精氨酸、组氨酸;
- 2) 具有酸性侧链的氨基酸:天冬氨酸、谷氨酸;
- 3) 具有不带电极性侧链的氨基酸:天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸;
- 4) 具有非极性侧链的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸。
- [0131] 在另一个方面,一个或多个氨基酸残基被添加至抗体的一个或多个CDR或者被从中删除。这样的添加或删除(缺失)发生在CDR的N或C末端或者在CDR之内的位置处。
- [0132] 通过氨基酸的添加、缺失或取代而改变抗体的CDR的氨基酸序列,可以得到各种效果,例如提高对靶标抗原的结合亲和力。
- [0133] 应该理解的是,包括这样的被改变的CDR序列的本发明的抗体仍然通过与被公开的抗体相似的特异性和灵敏度而结合HLA-DR。这可以通过本领域技术人员已知的并且在此简要描述的结合测试来进行检测。
- [0134] 抗体的恒定区域也可以被改变。例如,抗体可以设有任何同种型的Fc区域:IgA (IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 或IgM。恒定区域序列的非限制性例子包括:

人类 IgD 恒定区域, Uniprot: P01880 (SEQ ID NO: 21)
APT KAPDVFPIISGCRHPKDN SPVVLACLI TGYHPTSVTVTWYMG TQS QPQR TFPEI QR RDSYYMTSSQLSTPLQQW
RQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE SPKAQASSVPTAQ PQAEGSLAKATTAPAT TRNTGRGGEEKKKEKEEQEER
ETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGS QSQH
SRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMW
LEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVS HEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPMK、
及其等效物。

[0135] 人类 IgG1 恒定区域, Uniprot: P01857 (SEQ ID NO: 22)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK、及其等效物。

[0136] 人类IgG2恒定区域,Uniprot: P01859 (SEQ ID NO: 23)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG
TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK、及其等效物。

[0137] 人类IgG3恒定区域,Uniprot: P01860 (SEQ ID NO: 24)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP
PCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH EALHNRTQKSLSLSPGK、及其等
效物。

[0138] 人类IgM恒定区域,Uniprot: P01871 (SEQ ID NO: 25)
GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGKYAATSQVLLPSKD
VMQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQ
VGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSF
ASIFLTKSTKLTLCLVDTLTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSNGERFTCTVTHT
DLPSPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPE
PQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY、及其等效
物。

[0139] 人类IgG4恒定区域,Uniprot: P01861 (SEQ ID NO: 26)
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQDEPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLGLK、及其等效物。

[0140] 人类IgA1恒定区域,Uniprot: P01876 (SEQ ID NO: 27)
ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQC
LAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTSPSTPPTSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRD
ASGVTFTWTPSSGKSAVQGP PERDLGCGYSVSSVLP GCAEPWNHGTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVH
LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVA AEDWKKG
DTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY、及其等效物。

[0141] 人类IgA2恒定区域,Uniprot: P01877 (SEQ ID NO: 28)
ASPTSPKVFPLSLDSTPDGNVVVACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQC
PDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSG
KSAVQGP PERDLGCGYSVSSVLP GCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALP
LAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY、及其等效物。

[0142] 人类 Ig κ 恒定区域, Uniprot: P01834 (SEQ ID NO: 29) TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC、及其等效物。

[0143] 在一些方面,所述抗体包括与SEQ ID NO: 7至10中的任一个至少80%相同的重链恒定区域。

[0144] 在一些方面,所述抗体包括与SEQ ID NO: 17至20中的任一个至少80%相同的轻链恒定区域。

[0145] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体结合至由Lym-1和Lym-2抗体结合的表位。

[0146] 在本文提供的抗体的一些方面,HLA-DR特异性的抗体与Lym-1和Lym-2竞争结合至人类HLA-DR。

[0147] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体包括结构性的修饰,以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,HLA-DR抗体包括在抗体的CH2恒定重链区域中的缺失,以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,Fab片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,F(ab)'2片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。

[0148] 所述抗体、片段及其等效物可以与载体(例如药学上可接受的载体或其他试剂)结合,以提供用于使用和/或储存的制剂。

[0149] 进一步提供的是一种分离的多肽,其包括可用来产生结合至HLA-DR的抗体的HLA-DR的氨基酸序列或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成,以及编码它们的分离的多核苷酸。在一个方面,所述分离的多肽或多核苷酸进一步包括标记和/或连续的多肽序列(例如匙孔血蓝蛋白(KLH)载体蛋白),或者在多核苷酸的情况下,包括可操作地结合至多肽或多核苷酸的编码该序列的多核苷酸。所述多肽或多核苷酸可以与各种载体(例如磷酸盐缓冲盐水)结合。进一步提供了宿主细胞,例如原核或真核细胞,例如细菌、酵母、哺乳动物(大鼠、类人猿、仓鼠、或人类),其包括所述分离的多肽或多核苷酸。所述宿主细胞可以与载体结合。

[0150] II. 用于制备组合物的方法

抗体、它们的制造和用途是广为人知的并且被公开于例如Harlow, E. and Lane, D. (1999) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.。可以使用本领域已知的标准方法来生产抗体。抗体的例子包括(但不限于)单克隆、单链、和抗体的功能性片段。用于产生这样的抗体的方法在本领域中是已知的,参见例如Collarini et al. (2009) *J. Immunol.* 183(10):6338-6345。

[0151] 可以在一定范围的宿主(例如山羊、兔、大鼠、小鼠、人类等)内制造抗体。可以通过使用具有免疫原性特性的靶标抗原或其片段或寡肽(例如HLA-DR的C末端片段或分离的多肽)进行的注射来使它们免疫。根据宿主种类,可以加入和使用各种佐剂,以提高免疫反应。这样的佐剂包括但不限于弗氏(Freund's)试剂、矿物凝胶(例如氢氧化铝)、以及表面活性物质,例如溶血卵磷脂、普流尼克(pluronic)多元醇、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔血蓝蛋白、以及二硝基苯酚。在用于人类的佐剂中,BCG (*Bacille Calmette-Guerin*, 卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)是特别有用的。本发明还提供了分离的多肽和佐剂。

[0152] 在一些方面,本发明的抗体是多克隆抗体,即具有不同的氨基酸序列的多个类型的抗HLA-DR抗体的混合物。在一个方面,所述多克隆抗体包括具有不同的CDR的多个类型的抗HLA-DR抗体的混合物。因此,培养制造不同的抗体的细胞的混合物,并且可以使用从得到的培养物纯化的抗体(参见国际专利申请公开号WO 2004/061104)。

[0153] 单克隆抗体生产。可以使用能够通过培养物中的连续细胞系来生产抗体分子的任何技术来制备HLA-DR的单克隆抗体。这样的技术包括但不限于杂交瘤技术(参见例如Kohler, G. et al. (1975) *Nature* 256:495-497);三肿瘤技术;人类B细胞杂交瘤技术(参见例如Kozbor, D. et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72)以及EBV杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(参见例如Cole et al. (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96)。人单克隆抗体可以被用在本技术的实践中,并且可以使用人类杂交瘤(参见例如Cote, R.J. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030)或者通过用Epstein Barr病毒体外转染人类B细胞(参见例如Cole et al. (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96)来生产。例如,可以分离编码抗体的区域的核酸的群体。使用采用衍生自编码抗体的保守区域的序列的引物的PCR,来扩增抗体的来自该群体的部分的序列,然后重建编码来自该被扩增的序列的抗体或其片段(例如可变结构域)的DNA。这样的被扩增的序列也可以被融合至编码其他蛋白(例如噬菌体外壳、或细菌细胞表面蛋白)的DNA,用于表达和展示噬菌体或细菌上的融合多肽。然后可以根据例如被表达的抗体或其片段对于存在于HLA-DR多肽上的抗原或表位的亲和力,表达和进一步选择或分离被扩增的序列。替代地,可以通过例如使用包括HLA-DR的氨基酸序列或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成的分离的多肽,使对象免疫,然后使用常规方法来从所述对象的脾分离杂交瘤,来制备表达杂交瘤的抗HLA-DR单克隆抗体。参见例如Galfre, G. et al. (1981) *Methods Enzymol.* 73:3-46。使用标准方法来筛选杂交瘤将制造不同特异性(即对不同表位的特异性)和亲和力的单克隆抗体。具有期望的特性(例如HLA-DR结合)的选择的单克隆抗体可以(i)被用作通过杂交瘤来表达,(ii)被结合至例如聚乙二醇(PEG)的分子以改变其特性,或(iii)可以通过各种方法来分离、序列化和操纵编码所述单克隆抗体的cDNA。在一个方面,通过杂交瘤来生产抗HLA-DR单克隆抗体,该杂交瘤包括从转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,其中该转基因非人动物具有包括被融合至永生化细胞的人类重链转基因和轻链转基因的基因组。杂交瘤技术包括本领域已知的技术,以及在Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349; Hammerling et al. (1981) *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681中教导的技术。

[0154] 噬菌体展示技术。如上所述,可以通过应用重组DNA和噬菌体展示技术来生产本发明的抗体。例如,可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来制备抗HLA-DR抗体。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域被展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面。通过直接使用抗原进行选择,通常是被结合或者被捕获至固体表面或珠粒的抗原,从全部的或组合的抗体文库(例如人类或鼠类)中选择具有期望的结合特性的噬菌体。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括具有Fab、F_v的fd和M13,或者二硫化稳定化的F_v抗体结构域被重组地融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白。此外,方法可以适用于构建

Fab表达文库(参见例如Huse, W.D. et al. (1989) Science 246:1275-1281),以允许具有HLA-DR多肽(例如多肽或其衍生物、片段、类似物或同系物)的所需的特异性的单克隆Fab片段的快速和有效的识别。可以被用来制造本发明的分离的抗体的噬菌体展示方法的其他例子包括在以下文献中公开的方法:Huston, J.S. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; Chaudhary, V.K. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:1066-1070; Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames, R.S. et al. (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic, L. et al. (1997) Gene 187:9-18; Burton, D.R. et al. (1994) Advances in Immunology 57: 191-280; 国际专利申请号PCT/GB91/01134; 国际专利申请公开号WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council et al.); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); 以及美国专利号5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727和5,733,743。

[0155] 洛宁的美国专利号6,753,136已经描述了可用于通过经由二硫键来连接多肽而在噬菌体颗粒的表面上显示多肽的方法。如在以上参考文献中描述的,在噬菌体选择之后,编码来自噬菌体的区域的抗体可以被分离并且被用来产生整个抗体(包括人类抗体、或任何其他期望的抗原结合片段),并且被表达在任何期望的宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中。例如,还可以使用本领域中已知的方法来采用重组地产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术,例如在国际专利申请公开号WO 92/22324; Mullinax, R.L. et al. (1992) BioTechniques 12:864-869; Sawai, H. et al. (1995) AJRI 34:26-34; 以及Better, M. et al. (1988) Science 240:1041-1043中公开的。

[0156] 通常,可以针对合适的抗体来选择被克隆进显示载体的杂交抗体或杂交抗体片段,从而识别维持了良好的结合活性的变体,因为所述抗体或抗体片段将会被呈现在噬菌体或噬菌粒颗粒的表面。参见例如Barbas III et al., *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)。但是,其他载体形式可以被用于该方法,例如将抗体片段文库克隆进溶解性噬菌体载体(被修饰的T7或Lambda Zap系统)以用于选择和/或筛选。

[0157] 抗体生产的替代性方法。还可以通过诱导淋巴细胞群体中的体内产生,或者通过筛选高度特异性结合试剂的重组免疫球蛋白文库或面板,来产生抗体(Orlandi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299)。

[0158] 替代地,可以使用用于生产单链抗体的技术。单链抗体(scFv)包括通过接头肽(通常长度为5至25个氨基酸)连接的重链可变区域和轻链可变区域。在scFv中,重链和轻链的可变区域可以衍生自相同的抗体或不同的抗体。可以使用重组技术来合成scFv,例如通过编码该scFv的载体在宿主生物(例如*E. coli*)中的表达。可以通过以下方法获得编码scFv的DNA:使用部分DNA作为模板进行扩增,其中该部分DNA编码选自编码上述抗体的重链或重链的可变区域的DNA和编码其轻链或轻链的可变区域的DNA的DNA的整个或所需的氨基酸序

列,通过使用定义其两个末端的引物对的PCR,并且进一步结合编码多肽接头部分的DNA和定义其两个末端的引物对来进行扩增,从而将接头的两个末端分别连接至重链和轻链。可以根据本领域已知的常规方法来获得含有编码scFv的DNA的表达载体和由该表达载体转化的宿主。

[0159] 还可以产生抗原结合片段,例如F(ab')₂片段可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化来产生,而Fab片段可以通过减少F(ab')₂片段的二硫键而产生。替代地,可以构建Fab表达文库来进行具有期望的特异性的单克隆Fab片段的快速和简单的识别(Huse, W.D. et al. (1989) Science 256:1275-1281)。

[0160] 抗体修饰。本发明的抗体可以被多聚化来提高对抗原的亲合力。要被多聚化的抗体可以是一种抗体或识别相同抗原的多个表位的多种抗体。作为抗体的多聚化的方法,例如可以是IgG CH3结构域结合至两个scFv分子、结合至链霉亲和素、引入螺旋-转角-螺旋基序等。

[0161] 本文公开的抗体组合物可以是在这些抗体中的任一个和另一个试剂(免疫偶联物)之间形成的偶联物的形式。在一个方面,本文公开的抗体被偶联至放射性物质。在另一个方面,本文公开的抗体可以被结合至多种分子,例如聚乙二醇(PEG)。

[0162] 抗体筛选。可以使用多种免疫测试来进行筛选,以识别具有期望的特异性的抗体。使用具有已建立的特异性的多克隆或单克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射测试的许多程序在本领域中是已知的。这些免疫测试通常涉及测量在HLA-DR、或其任何片段或寡肽和其特异性抗体之间的复合物形成。可以使用采用对两个非干扰的HLA-DR表位特异的单克隆抗体进行的双位点、基于单克隆的免疫测试,但是也可以采用竞争性结合测试(Maddox, D.E. et al. (1983) J. Exp. Med. 158:1211-1216)。

[0163] 抗体纯化。可以将本文公开的抗体纯化至同质化。可以采用常规的蛋白分离和纯化方法,进行抗体的分离和纯化。

[0164] 仅仅作为例子,可以通过色谱柱、过滤器、超滤、盐析、透析、制备性聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳等的适当选择和组合使用,分离和纯化抗体。*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Marshak, D.R. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

[0165] 色谱法的例子包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱、以及吸附色谱。在一个方面,可以采用液体色谱(例如HPLC或FPLC)进行色谱。

[0166] 在一个方面,在亲和色谱中可以使用Protein A柱或Protein G。其他示例性的柱包括Protein A柱、Hyper D、POROS、Sepharose F. F. (Pharmacia)等。

[0167] 使用方法

概述。本文公开的抗体可用于本领域中涉及HLA-DR多肽的定位和/或定量的方法(例如用于测量在适当的生理样品之内的HLA-DR多肽的水平、用于诊断方法、用于使多肽成像等)。本文公开的抗体可用于通过标准技术(例如亲和色谱或免疫沉淀)分离HLA-DR多肽。本文公开的HLA-DR抗体可以促进来自生物样品(例如哺乳动物血清或细胞)的天然HLA-DR多肽以及在宿主系统中表达的重组地制造的HLA-DR多肽的纯化。再者,可以使用HLA-DR抗体

来检测HLA-DR多肽(例如在血浆、细胞裂解物或细胞上清液中),从而评估多肽的表达的丰度和模式。可以诊断性地使用本文公开的LHR多肽,以作为临床测试过程的一部分来监控组织中的HLA-DR水平,例如从而确定给定的治疗方案的功效。可以通过将本文公开的HLA-DR抗体结合(即物理地连接)至可检测的物质,以促进检测。

[0168] 在另一个方面,本文提供了一种组合物,其包括结合至肽的本文公开的抗体或抗原结合片段,所述肽包括例如人类HLA-DR蛋白或其片段。在一个方面,所述肽与细胞相关。例如,所述组合物可以包括采用本文公开的抗体或抗体片段进行标记的被分解的细胞样品,该组合物可用于例如用于分离细胞的亲和色谱方法或基于流式细胞术的细胞分析或细胞分选。作为另一个例子,所述组合物可以包括采用本文公开的抗体或抗体片段进行标记的固定的组织样品或细胞涂片,该组合物可用于例如免疫组织化学或细胞学分析。在另一个方面,所述抗体或抗体片段被结合至固体支撑物,其可用于例如:ELISA;亲和色谱法或免疫沉淀法,用于分离HLA-DR蛋白或其片段、HLA-DR阳性细胞、或含有HLA-DR和其他细胞组分的复合物。在另一个方面,所述肽被结合至固体支撑物。例如,所述肽可以通过对该肽特异的二级抗体而被结合至固体支撑物,其可用于例如夹心ELISA。作为另一个例子,所述肽可以被结合至色谱柱,其可用于例如根据本技术的抗体的分离或纯化。在另一个方面,所述肽被置于溶液中,例如裂解溶液或含有被分馏的细胞的亚细胞组分的溶液,其可用于例如ELISA和亲和色谱法或免疫沉淀法,用于分离HLA-DR蛋白或其片段、或含有HLA-DR和其他细胞组分的复合物。在另一个方面,所述肽与基质相关,例如凝胶电泳凝胶或通常被用于蛋白免疫印迹的基质(例如由硝化纤维素或聚偏二氟乙烯制成的膜),该组合物可用于电泳和/或免疫印迹技术,例如蛋白免疫印迹。

[0169] *HLA-DR多肽的检测*。用于检测生物样品中的HLA-DR多肽的水平的示例性方法涉及从对象获得生物样品,并且将所述生物样品与能够检测HLA-DR多肽的本文公开的HLA-DR抗体相接触。

[0170] 在一个方面,HLA-DR抗体Lym-1或Lym-2或其片段被可检测地标记。关于抗体的术语“标记”旨在包括抗体的直接标记和抗体的间接标记,前者通过将可检测的物质结合(即物理地连接)至抗体,而后者通过与被直接地标记的另一种化合物的反应性。间接标记的非限制性例子包括使用荧光标记的二级抗体进行的初级抗体的检测,以及使用生物素进行的DNA探针的末端标记,使得它能够通过荧光标记的链霉亲和素而被检测。

[0171] 本发明的检测方法可以被用来体外及体内检测生物样品中的HLA-DR多肽的表达水平。用于HLA-DR多肽的检测的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白免疫印迹、流式细胞术、免疫沉淀、放射免疫测定和免疫荧光(例如IHC)。进一步地,用于HLA-DR多肽的检测的体内技术包括将被标记的抗HLA-DR抗体引入对象中。仅仅作为例子,可以使用放射性标记物来标记所述抗体,可以通过标准的成像技术来检测该标记物在对象中的存在和位置。在一个方面,所述生物样品包括来自测试对象的多肽分子。

[0172] *免疫测试和成像*。本文公开的HLA-DR抗体可以被用来使用基于抗体的技术测试生物样品(例如人类血浆)中的HLA-DR多肽水平。例如,可以使用经典的免疫组织化学(IHC)染色方法来研究组织中的蛋白表达。Jalkanen, M. et al. (1985) J. Cell. Biol. 101: 976-985; Jalkanen, M. et al. (1987) J. Cell. Biol. 105:3087-3096。可用于检测蛋白基因表达的其他基于抗体的方法包括免疫测试,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射

免疫测定(RIA)。合适的抗体测试标签在本领域中是已知的并且包括:酶标签,例如葡萄糖氧化酶;以及放射性同位素或其他放射剂,例如碘(^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{112}In)、和锝(^{99}mTc);以及荧光标签,例如荧光素和罗丹明、以及生物素。

[0173] 除了在生物样品中测试HLA-DR多肽水平之外,还可以通过成像而在体内检测HLA-DR多肽水平。可以与抗HLA-DR抗体结合以用于HLA-DR多肽水平的体内成像的标签包括能够通过X射线照相、NMR或ESR检测的标签。对于X射线照相,适当的标签包括放射性同位素(例如钨或铈),其发射可检测的辐射但不对象显著有害。用于NMR和ESR的适当的标记物包括具有可检测的特性螺旋的标记物(例如氘),其可以通过对于相关的scFv克隆的营养素的标记而被结合进HLA-DR抗体。

[0174] 已经标记有合适的可检测的成像部分(例如放射性同位素(例如 ^{131}I 、 ^{112}In 、 ^{99}mTc)、不透射线的物质或可通过核磁共振检测的材料)的HLA-DR抗体,被引入(例如肠胃外、皮下或腹膜内)进所述对象。在本领域中理解的是,对象的大小和使用的成像系统将确定产生诊断图像所需的成像部分的量。在放射性同位素部分的情况中,对于人类对象,注射的放射性的量将通常为约5至20毫居里 ^{99}mTc 。被标记的HLA-DR抗体然后将会优先地积累在含有特异性靶标多肽的细胞的位置。例如,在Burchiel, S.W. et al. (1982) *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* 13中描述了体内肿瘤成像。

[0175] 在一些方面,含有促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放的结构性修饰的HLA-DR抗体可用于体内成像检测方法。在一些方面,HLA-DR抗体包括在抗体的CH2恒定重链区域中的缺失,以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,Fab片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,F(ab)'₂片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。

[0176] HLA-DR抗体的诊断性使用。本文公开的HLA-DR抗体组合物可用于诊断和预后方法。因此,本发明提供了用于在对象中的HLA-DR相关的医疗状况的诊断中使用本文公开的抗体的方法。可以选择本文公开的抗体,使得它们具有对HLA-DR多肽的高水平的表位结合特异性和高的结合亲和力。一般来说,抗体的结合亲和力越高,则在免疫测试中可以进行的洗涤条件越严格,以在不移除靶标多肽的情况下移除非特异性结合的材料。相应地,可用于诊断性测试的本技术的HLA-DR抗体通常的结合亲和力为至少 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 或 10^{-12} M。在一些方面,被用作诊断试剂的LHR抗体具有足够的动力学上的速率(kinetic on-rate),以在至少12小时、至少5小时、至少1小时、或至少30分钟在标准条件下达到平衡。

[0177] 本技术的一些方法采用抗HLA-DR抗体的多克隆制剂和多克隆的抗HLA-DR抗体组合物作为诊断试剂,而其他方法采用单克隆分离物。在采用根据上述方法而制备的多克隆人类抗HLA-DR抗体的方法中,制剂通常包括HLA-DR抗体的混合物,例如具有对靶标多肽的不同的表位特异性的抗体。本发明的单克隆抗HLA-DR抗体可用于在存在或可能存在紧密相关的抗原的情况下检测单一的抗原。

[0178] 本发明的HLA-DR抗体可以被用作对于任何类型的生物样品的诊断试剂。在一个方面,本文公开的HLA-DR抗体可用作对于人类生物样品的诊断试剂。HLA-DR抗体可以被用来在多种标准测试方式中检测HLA-DR多肽。这样的方式包括免疫沉淀、蛋白免疫印迹、ELISA、放射免疫测定、流式细胞术、IHC和免疫测定。参见Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); U.S.

Patent Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,879,262; 4,034,074, 3,791,932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074和4,098,876。可以从对象的任何组织(包括活组织检查)、细胞或体液中获得生物样品。

[0179] 在另一个方面,本发明提供了用于确定是否能够使用本文所述的CAR T细胞或CAR NK细胞组合物有效地治疗对象的方法。所述方法包括使用任何合适的方法测定从患者分离的癌症或肿瘤样品的HLA-DR蛋白或多肽表达,所述合适的方法例如是使用HLA-DR抗体的免疫组织化学或者聚合酶链式反应(PCR)。在一个方面,确定在从该对象获得的生物样品中HLA-DR多肽的表达水平,并且与在从不患该疾病的对象或患者群体获得的生物样品中发现的HLA-DR表达水平相比较。与来自不患该疾病的患者的患者样品中的多肽或蛋白质的表达水平相比,HLA-DR多肽的提高,表明该患者可能响应本发明的CAR T细胞或CAR NK细胞疗法,而提高的表达的缺失,则表明该患者不可能响应本发明的CAR T细胞或CAR NK细胞疗法。样品的非限制性的例子包括例如任何体液,包括但不限于例如痰液、血清、血浆、淋巴、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水或血液,并且包括身体组织的活组织检查样品。所述样品也可以是肿瘤细胞。根据测试形式、测试方法的特性和被用作被测试的样品的组织、细胞或提取物,在上述方法中使用的测试样品将会发生改变。另一个方面,向所述对象或患者施用有效量的HLA-DR CAR疗法。

[0180] 在特定的方面,本发明涉及用于确定患者是可能响应还是不可能响应HLA-DR CAR疗法的方法。在特定的实施方式中,该方法包括将从所述患者分离的肿瘤样品与有效量的HLA-DR结合试剂(例如HLA-DR抗体)接触,以及检测结合至所述肿瘤样品的任何抗体的存在。在进一步的实施方式中,结合至所述肿瘤样品的抗体的存在表明所述患者可能响应所述HLA-DR CAR疗法,而结合至所述肿瘤样品的抗体的不存在表明所述患者不可能响应HLA-DR疗法。样品的非限制性的例子包括例如任何体液,包括但不限于例如痰液、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊髓液、腹水或血液,并且包括身体组织的活组织检查样品。所述样品也可以是肿瘤细胞。根据测试形式、测试方法的特性和被用作被测试的样品的组织、细胞或提取物,在上述方法中使用的测试样品将会发生改变。在一些实施方式中,所述方法包括额外的步骤,其中向被确定可能响应HLA-DR CAR疗法的患者施用有效量的HLA-DR CAR疗法。在一些实施方式中,所述患者患有表达HLA-DR的肿瘤和/或癌症。

[0181] 有许多疾病状态其中提高的HLA-DR多肽的表达水平被已知指示患有该疾病的对象是否可能响应于对特定类别的疗法或治疗。这种疾病状态的非限制性的例子包括癌症,例如癌(carcinoma)、肉瘤(sarcoma)或白血病。因此,检测生物样品中的HLA-DR多肽的方法可以被用作预后的方法,例如从而评估该对象将会响应于疗法或治疗的可能性。确定来自对象的合适的组织或体液样品中的HLA-DR多肽的水平,并将其与合适的对照进行比较,所述对照例如是患有相同的疾病但是有利地响应该治疗的对象中的水平。样品的非限制性的例子包括例如任何体液,包括但不限于例如痰液、血清、血浆、淋巴液、囊液、尿液、粪便、脑脊髓液、腹水或血液,并且包括身体组织的活组织检查样品。所述样品也可以是肿瘤细胞。根据测试形式、测试方法的特性和被用作被测试的样品的组织、细胞或提取物,在上述方法中使用的测试样品将会发生改变。用于制备细胞的蛋白提取物或膜提取物的方法在本领域中是已知的,并且可以容易地进行调整以获得与所使用的系统相容的样品。

[0182] 在一个方面,本发明提供了监控试剂(例如本发明的CAR T细胞或CAR NK细胞组合物、药物、化合物或小分子)对LHR多肽的表达的影响的方法。这样的测试可以被应用在基础药物筛选和临床试验中。例如,可以在显示出提高的HLA-DR的表达的对象(例如被诊断有癌症的对象)的临床试验中,监控试剂降低HLA-DR多肽水平的效力。可以通过施用试剂并观察反应,识别影响HLA-DR多肽的表达的试剂。通过这种方式,HLA-DR多肽的表达模式可以作为标记物,其是对象对试剂的生理反应的指示。相应地,可以在使用该试剂的对象的之前、以及在期间的各种时间点,确定该反应状态。在一些实施方式中,所述方法包括额外的步骤,其中向被确定需要额外疗法的患者施用有效量的HLA-DR CAR疗法。

[0183] 本发明的进一步的方面涉及用于确定患者是可能响应还是不可能响应HLA-DR CAR疗法的方法。在特定的实施方式中,该方法包括将从所述患者分离的肿瘤样品与有效量的HLA-DR抗体接触,以及检测结合至所述肿瘤样品的任何抗体的存在。在进一步的实施方式中,结合至所述肿瘤样品的抗体的存在表明所述患者可能响应所述HLA-DR CAR疗法,而结合至所述肿瘤样品的抗体的不存在表明所述患者不可能响应HLA-DR疗法。在一些实施方式中,所述方法包括额外的步骤,其中向被确定可能响应HLA-DR CAR疗法的患者施用有效量的HLA-DR CAR疗法。在一些实施方式中,所述患者患有表达HLA-DR的肿瘤和/或癌症。

[0184] III. 试剂盒

如本文所述,本发明提供了用于确定HLA-DR的表达水平的诊断方法。在一个特定的方面,本发明提供了用于执行这些方法的试剂盒,以及用于进行本发明的方法的说明,例如收集组织和/或进行筛选、和/或分析结果。

[0185] 所述试剂盒包括本文公开的HLA-DR抗体组合物(例如单克隆抗体)以及使用说明、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。所述试剂盒可用于检测生物样品中HLA-DR多肽的存在,所述生物样品例如是任何体液,包括但不限于例如痰液、血清、血浆、淋巴、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水或血液并且包括身体组织的活检样品。测试样品也可以是肿瘤细胞、肿瘤附近的正常细胞、对应于肿瘤组织类型的正常细胞、血细胞、外周血淋巴细胞、或其组合。根据测试形式、测试方法的特性和被用作被测试的样品的组织、细胞或提取物,在上述方法中使用的测试样品将会发生改变。用于制备蛋白提取物或细胞的膜提取物的方法在本领域中是已知的,并且可以容易地进行调整以获得与所使用的系统相容的样品。

[0186] 在一些方面,所述试剂盒可以包括:能够结合生物样品中的HLA-DR多肽的一种或多种HLA-DR抗体(例如具有HLA-DR抗体Lym-1或Lym-2的相同的抗原结合特异性的抗体或其抗原结合片段);用于确定样品中的HLA-DR多肽的量的装置;以及用于将所述样品中的HLA-DR多肽的量与标准进行比较的装置。所述HLA-DR多肽中的一种或多种可以被标记。所述试剂盒组件(例如试剂)可以被包装在合适的容器中。所述试剂盒可以进一步包括使用该试剂盒来检测HLA-DR多肽的说明。在一些方面,所述试剂盒包括:第一抗体,例如被连接至固体支撑物,其结合至HLA-DR多肽;以及任选地2)第二、不同的抗体,其结合至所述HLA-DR多肽或所述第一抗体,并且被偶联至可检测的标签。

[0187] 所述试剂盒还可以包括例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。所述试剂盒可以进一步包括检测所述可标记的标签(例如酶或底物)必要的组件。所述试剂盒还可以包括对照样品或一系列的对照样品,其可以被检测并且与测试样品相比较。所述试剂盒的每个组件都可以被包裹在单个容器之内,并且所有的各种容器可以与用于解读使用该试剂盒进行的

测试的结果的说明一起,处于单一的包装之内。本发明的试剂盒可以包括在所述试剂盒容器之上或之内的书面产品。所述书面产品描述了如何使用被包含在试剂盒之内的试剂。

[0188] 经得起考验的是,可以以本领域技术人员习惯使用的方式来包装这些建议的试剂盒组件。例如,这些建议的试剂盒组件可以被提供于溶液中或者作为液体分散体等。

[0189] IV. 载体

所述抗体还可以被结合至许多不同的载体。因此,本发明还提供了含有所述抗体和活性或惰性的另一种物质的组合物。熟知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂和磁铁矿。所述载体的性质可以是可溶的或不可溶的以用于本发明。本领域技术人员将会知晓用于结合抗体的其他合适的载体、或者将会能够使用常规实验来确定这些载体。

[0190] 嵌合抗原受体及其用途

I. 组合物

本发明提供了结合至HLA-DR的嵌合抗原受体(CAR),其包括细胞激活部分、或基本上由其组成,所述细胞激活部分包括细胞外、跨膜和细胞内结构域。所述细胞外结构域包括靶标特异性结合元件,或者被称为抗原结合结构域。所述细胞内结构域或细胞质结构域包括共刺激信号传导区域和 ζ 链部分。所述CAR任选地进一步包括多达300个氨基酸、优选地10至100个氨基酸、更优选地25至50个氨基酸的隔离结构域。

[0191] 抗原结合结构域。在一些方面,本发明提供了一种CAR,其包括对HLA-DR特异的抗原结合结构域、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。在一些实施方式中,所述抗原结合结构域包括抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。在进一步的实施方式中,抗HLA-DR抗体的重链可变区域和轻链可变区域包括抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。

[0192] 在一些实施方式中,所述抗体的重链可变区域包括SEQ ID NO: 7至10或其每个的等效物、或基本上由其组成、或由其组成,和/或包括一个或多个含有SEQ ID NO: 1至6或其每个的等效物的CDR区域。在一些实施方式中,所述抗体的轻链可变区域包括SEQ ID NO: 17至20或其每个的等效物、或基本上由其组成、或由其组成,和/或包括一个或多个含有SEQ ID NO: 11至16或其每个的等效物的CDR区域。

[0193] 跨膜结构域。跨膜结构域可以衍生自天然的或合成的来源。在所述来源是天然的情况下,所述结构域可以衍生自任何膜结合或者跨膜蛋白。具有在本发明中的特定用途的跨膜区域可以衍生自CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD 154、TCR。替代地所述跨膜结构域可以是合成的,在该情况中它将主要包括疏水残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成的跨膜结构域的每个末端将会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长度为2至10个氨基酸)可以形成CAR的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供了特别合适的接头。

[0194] 细胞质结构域。CAR的细胞质结构域(胞质域)或细胞内信号传导结构域负责在其中置有CAR的免疫细胞的传统效应器功能中的至少一个的激活。细胞内信号传导结构域是指蛋白的转导效应器功能信号并引导免疫细胞来进行其特异性功能的一部分。可以使用整个信号传导结构域或其截断的部分,只要该截断的部分足够来转导效应器功能信号。TCR和

共受体的细胞质序列以及其衍生物或变体能够作用为细胞内信号传导结构域以在CAR中使用。具有在本发明中的特定用途的细胞内信号传导结构域可以衍生自FcR、TCR、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d。因为通过TCR产生的信号单独不足以进行T细胞的完全激活,所以还可能需二级或共刺激信号。因此,共刺激信号传导分子的细胞内区域包括但不限于CD27、CD28、4-1BB (CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、或特异性地与CD83结合的配体也可以被包括在CAR的细胞质结构域中。

[0195] 在一些实施方式中,嵌合抗原受体的细胞激活部分是T细胞信号传导结构域,其包括以下中的一个或多个蛋白或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:CD8蛋白、CD28蛋白、4-1BB蛋白、和CD3- ζ 蛋白。

[0196] 在具体的实施方式中,所述CAR包括、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、共刺激信号传导区域、以及CD3 ζ 信号传导结构域。在进一步的实施方式中,所述共刺激信号传导区域包括CD28共刺激信号传导区域和4-1BB共刺激信号传导区域中的一个或两个。

[0197] 在一些实施方式中,所述CAR可以进一步包括可检测的标记物或纯化标记物。

[0198] 在进一步的方面,本发明提供了含有结合至其靶标细胞的HLA-DR CAR细胞的复合物。在进一步的方面,所述复合物被可检测地标记。可检测的标记在本领域中是已知的并且在此简要地进行了描述。

[0199] II. 用于制备CAR的方法

本发明的一些方面涉及包括HLA-DR CAR的分离的细胞以及制备这样的细胞的方法。所述细胞是原核或真核细胞。在一个方面,所述细胞是T细胞或NK细胞。所述真核细胞可以来源于任何优选的物种,例如动物细胞、哺乳动物细胞,例如人类、猫或犬科动物细胞。

[0200] 在具体的实施方式中,所述分离的细胞包括外源性CAR、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成,所述CAR包括、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、以及CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方式中,所述分离的细胞是T细胞,例如动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞。

[0201] 在一些实施方式中,公开了生产表达HLA-DR CAR的细胞的方法,所述方法包括以下步骤、或替代地基本上由以下步骤组成:(i)使用编码HLA-DR CAR的核酸序列转导分离的细胞的群体,以及(ii)选择已经使用步骤(i)的所述核酸序列成功转导的细胞的亚群体。在一些实施方式中,所述分离的细胞是T细胞、动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞,从而生产HLA-DR CAR T细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞,从而生产HLA-DR CAR NK细胞。

[0202] 分离的细胞的来源。在本发明的细胞的扩增和遗传修饰之前,可以从对象(例如在涉及自体疗法的实施方式中)或商业培养物中获得细胞。

[0203] 细胞可以获得自对象中的许多来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐

带血、胸腺组织、来自感染位点的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。

[0204] 分离相关细胞的方法在本领域中是熟知的并且可以容易地适用至本申请；在以下例子中描述了示例性的方法。用于与本发明相关的用途的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads® 系统；STEMcell Technologies EasySep™、RoboSep™、RosetteSep™、SepMate™；Miltenyi Biotec MACS™ 细胞分离试剂盒、以及其他商业上可获得的细胞分离和分隔试剂盒。可以通过使用在对独特的细胞表面标记物特异的这样的试剂盒中可用的珠粒或其他结合试剂，分离免疫细胞的特定的亚群体。例如，MACS™ CD4+和CD8+ MicroBeads可以被用来分离CD4+和CD8+ T细胞。

[0205] 替代地，细胞可以通过商业上可用的细胞培养物而获得，其包括但不限于：对T细胞，BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™)、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™)、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™)、Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™) 细胞系；以及对于NK细胞，NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™) 细胞系。

[0206] 载体。可以使用载体制备CAR。本发明的一些方面涉及编码HLA-DR CAR的分离的核酸序列以及载体，所述载体包括编码所述CAR的分离的核酸序列及其补体及其每个的等效物，或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。

[0207] 在一些实施方式中，所述分离的核酸序列编码CAR，该CAR包含以下组分、或基本上由以下组分组成、或由以下组分组成：抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、CD8 α铰链结构域、CD8 α跨膜结构域、CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、以及CD3ζ信号传导结构域。在具体的实施方式中，所述分离的核酸序列包括编码以下组分的序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成：(a) 抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域、随后的(b) CD8 α铰链结构域、(c) CD8 α跨膜结构域、随后的(d) CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、随后的(e) CD3ζ信号传导结构域。

[0208] 在一些实施方式中，所述分离的核酸序列包括位于编码抗HLA-DR抗体的抗原结合结构域的序列的上游的Kozak共有序列、或基本上由该共有序列组成、或由该共有序列组成。在一些实施方式中，所述分离的核酸包括赋予抗生素抗性的多核苷酸。

[0209] 在一些实施方式中，所述分离的核酸序列被包括在载体中。在一些实施方式中，所述载体是质粒。在其他实施方式中，所述载体是病毒载体。在具体的实施方式中，所述载体是慢病毒载体。

[0210] 在以下例子中详细地讨论了使用所述载体来制备示例性的载体和生产表达CAR的细胞。总的来说，通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子，并且将构建体结合进表达载体，实现编码CAR的天然的或合成的核酸的表达。所述载体可以适于复制和整合真核生物。用于生产包括载体和/或外源性核酸的细胞的方法在本领域中是熟知的。参见例如Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

[0211] 在一个方面，术语“载体”是指这样的重组载体，其保留了感染和转导不分裂和/或缓慢分裂的细胞并整合到靶细胞的基因组中的能力。在一些方面，所述载体衍生自或者基于野生型病毒。在进一步的方面，所述载体衍生自或者基于野生型慢病毒。这样的例子包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和

猫免疫缺陷病毒 (FIV)。替代地,应该理解的是,其他逆转录病毒可以被用作载体骨架的基础,例如鼠白血病病毒 (MLV)。很明显,根据本发明的病毒载体不必被局限于特定病毒的组件。所述病毒载体可以包括衍生自两种或更多种不同病毒的组件,并且还可以包括合成的组件。载体组件可以被操纵来获得所需的特性,例如靶细胞特异性。

[0212] 本发明的重组载体衍生自灵长类和非灵长类。灵长类慢病毒的例子包括人类免疫缺陷病毒 (HIV)、人类获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 的致病因子、以及猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。非灵长类慢病毒群组包括“慢病毒”原型visna/maedi病毒 (VMV)、以及相关的山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)、马传染性贫血病毒 (EIAV) 和更近期地被描述的猫免疫缺陷病毒 (FIV) 和牛免疫缺陷病毒 (BIV)。现有技术的重组慢病毒载体在本领域中是已知的,例如参见美国专利号6,924,123;7,056,699;7,07,993;7,419,829和7,442,551,其以引用的方式合并入本文中。

[0213] 美国专利号6,924,123公开了某些逆转录病毒序列促进整合进靶细胞基因组。该专利教导了每个逆转录病毒包括被称为gag、pol和env的基因,其编码病毒粒子蛋白和酶。这些基因通过被称为长末端重复 (LTR) 的区域而被处于两个末端的侧翼。所述LTR负责前病毒整合和转录。它们也用作增强子-启动子序列。换句话说,LTR能够控制病毒基因的表达。逆转录病毒RNA的封装通过位于病毒基因组的5'末端的psi序列而发生。LTR自身是可以被分为三种元件的相同的序列,其被称为U3、R和U5。U3衍生自对RNA的3'末端独特的序列。R衍生自在RNA的两个末端重复的序列,而U5衍生自RNA的5'末端独特的序列。在不同的逆转录病毒之间这三种元件的尺寸可以发生较大的变化。对于病毒基因组,聚合(A)加成(终止)的位点是在LRT右手边的R和U5之间的边界处。U3含有前病毒的大多数转录控制元件,其包括启动子和多重增强子序列,它们响应细胞(在某些情况下为病毒)转录激活蛋白。

[0214] 关于结构基因gag、pol和env自身,gag编码病毒的内部结构蛋白。gag蛋白被蛋白水解地处理成成熟蛋白MA(基质)、CA(衣壳)和NC(核衣壳)。pol基因编码逆转录酶(RT),其包括DNA聚合酶、相关的RNA酶H和整合酶(IN),它们介导基因组的复制。

[0215] 对于病毒载体颗粒的生产,载体RNA基因组被表达自在宿主细胞中的编码它的DNA构建体。通过在宿主细胞中表达的其他核酸序列(“包装系统”,其通常包括gag/pol和env中的一个或两个),以反式的形式提供不被所述载体基因组编码的颗粒的部件。可以通过瞬时转染将生产病毒载体颗粒所需的一组序列引入宿主细胞,或者它们可以被整合进宿主细胞基因组、或者它们可以以混合物的方式而被提供。涉及的技术对于本领域技术人员来说是已知的。

[0216] 用于在本发明中使用的逆转录病毒载体包括但不限于:Invitrogen的pLenti系列版本4、6和6.2“ViraPower”系统,由Lentigen Corp.制造;pHIV-7-GFP,由City of Hope Research Institute实验室生成和使用;“Lenti-X”慢病毒载体,pLVX,由Clontech制造;pLK0.1-puro,由Sigma-Aldrich制造;pLemiR,由Open Biosystems制造;以及pLV,由Virology (CBF), Berlin, Germany 的Charité Medical School, Institute实验室生成和使用。

[0217] 不管被用来将外源性核酸引入宿主细胞或将细胞暴露至本发明的抑制剂的方法如何,为了确认重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可以进行多种测试。这样的测试包括:例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和

PCR;“生物化学”测定,例如检测特定的肽是否存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或者通过本文描述的测试来识别落入本发明的范围之内的试剂。

[0218] 细胞的激活和扩增。无论是在表达所需的CAR的细胞的遗传修饰之前还是之后,都可以使用通常已知的方法来通常地激活和扩增细胞,这些方法例如是在美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041中描述的方法。使用HLA-DR抗原离体刺激能够激活并扩增表达细胞亚群体的所选的CAR。替代地,可以通过与HLA-DR抗原相互作用,体内激活细胞。

[0219] 激活相关细胞的方法在本领域中是熟知的并且可以容易地适用至本申请;在以下例子中描述了示例性的方法。用于与本发明相关的用途的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads®系统激活和扩增试剂盒;BD Biosciences Phosflow™激活试剂盒、Miltenyi Biotec MACS™激活/扩增试剂盒、以及对相关细胞的激活部分特异性的其他商业上可获得的细胞试剂盒。可以通过使用在这样的试剂盒中可用的珠粒或其他试剂,激活或扩增免疫细胞的特定的亚群体。例如, α -CD3/ α -CD28 Dynabeads®可以被用来激活和扩增分离的T细胞的群体。

[0220] III. 使用方法

治疗应用。本发明的方法方面涉及用于在有需要的对象中抑制肿瘤的生长方法和/或用于治疗有需要的癌症患者的方法。在一些实施方式中,所述肿瘤/癌症是B细胞淋巴瘤或白血病肿瘤/癌症。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体肿瘤,例如癌。在一些实施方式中,所述肿瘤或癌症表达HLA-DR。在一些实施方式中,这些方法包括向所述对象或患者施用有效量的分离的细胞、或基本上由该步骤组成、或由该步骤组成。在进一步的实施方式中,该分离的细胞包括HLA-DR CAR。在更进一步的实施方式中,所述分离的细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞对于被治疗的所述对象或患者来说是自体同源的。在进一步的方面,所述肿瘤表达HLA-DR抗原,并且所述对象已经通过诊断(例如本文所述的一种)而被选择进行治疗。所述对象是动物、哺乳动物、犬科动物、猫科动物、牛科动物、马科动物、鼠科动物或人类患者。所述疗法可以是一线疗法、二线疗法、三线疗法、或四线疗法或治疗医师确定的任何另外的疗法。它们可以与其他疗法结合并按顺序或同时施用。

[0221] 本文公开的CAR细胞可以被单独地施用,或者与稀释剂、除了所述CAR细胞之外的其他抗癌治疗剂、和/或与其他组分(例如细胞因子或免疫调节的其他细胞群体)一起施用。

[0222] 可以以适于要被治疗或预防的疾病的方式,施用本发明的药物组合物。虽然可以通过临床试验确定合适的剂量,但是施用的量和频率将由例如患者的情况、以及患者的疾病的种类和严重性等因素确定。

[0223] IV. 载体

本发明的其他方面涉及组合物,其包括载体和在本文公开的实施方式中描述的产品中的一种或多种,例如包括HLA-DR CAR的分离的细胞、分离的核酸、载体、任何抗HLA-DR抗体的分离的细胞或CAR细胞、抗HLA-DR。

[0224] 简单来说,包括但不限于本发明的组合物中的任何一种的本发明的药物组合物,可以包括本文公开的靶标细胞群体,联合一种或多种药学上或生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这样的组合物可以包括:缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水

化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);以及防腐剂。本发明的组合物可以被配制用于口服、静脉内、局部、肠内和/或肠胃外给药。在一些实施方式中,本发明的组合物被配制用于静脉给药。

实施例

[0225] 以下实施例是可被用来在各种情况下来将本发明付诸实施的示例性程序。

[0226] 实施例1-小鼠抗人HLA-DR单克隆抗体的产生

抗原

使用Raji非洲伯基特(Burkitt)淋巴瘤细胞核作为产生Lym-1抗体的抗原。CLL活检细胞核被用作产生Lym-2抗体的抗原。

[0227] 免疫过程

从Harlan实验室购买的四周龄雌性BALB/c小鼠每两周x4免疫接种,其中使用完全弗氏佐剂(第一次和第二次免疫)或不完全弗氏佐剂(第三和第四次免疫)乳化的 10^7 个核。每次免疫接种,在小鼠的背上对小鼠皮下注射分成三个独立的点的总共 10^7 个核/佐剂。最后一次免疫后十天,获得血液样品并通过ELISA方法在抗原包被的平板上滴定。显示最高滴度的小鼠然后静脉内接受第五次免疫增强(不含佐剂),其中通过侧尾静脉注射在无菌磷酸盐缓冲盐水的100 μ l溶液中的 10^6 个核。

[0228] 杂交瘤的产生

四天后,将这些小鼠处死,取出脾脏用于杂交瘤程序。将脾细胞分散在含有Pen/Strep抗生素的RPMI-1640培养基的溶液中后,使用PEG((Hybri MAX, mol wt 1450, Cat. No: p7181, Sigma))将脾细胞与鼠NS0细胞融合。然后使用HAT选择仅使融合的细胞生长。然后首先通过针对抗原包被的平板的ELISA,然后通过HLA-DR阳性(Raji)和阴性人肿瘤细胞系(CEM T-细胞白血病)的流式细胞术,筛选来自具有生长的杂交瘤细胞的孔的上清液。显示阳性和高平均荧光指数(MFI)的杂交瘤通过有限稀释方法进行选择以用于亚克隆。然后通过流式细胞术重新检测亚克隆,在液氮中冷冻,并在2L容器中扩增,然后通过tandon Protein A或G和离子交换色谱法纯化抗体。然后将纯化的抗体通气并储存在-20℃直到使用。

[0229] 流式细胞术程序和数据

使用来自通过ELISA发现对抗原包被的平板呈阳性的杂交瘤的上清液,在HLA-DR阳性(Raji)和阴性(CEM)细胞系上进行使用流式细胞术的筛选方法。然后将产生高平均荧光指数(MFI)的那些杂交瘤进行亚克隆并针对对HLA-DR的选择性阳性进行重新筛选。如在图1A-1F中所示,Lym-1和Lym-2对表达HLA-DR的Raji细胞系产生高MFI,具有与B1抗体不同的谱。根据这些数据,如下所述选择Lym-1和Lym-2以产生CAR-T细胞。

[0230] 使用选择的抗体进行免疫组织化学

如图2A-2B所示,使用标准免疫组织化学方法和抗原修复方法发现抗体Lym-1和Lym-2染色在人扁桃体组织的生发中心中的HLA-DR阳性细胞。胸腺、脾脏和骨髓中的染色仅限于表达HLA-DR抗原的B细胞或树突细胞(表3)。

[0231] 表3:Lym-1和Lym-2与人正常淋巴和造血组织在冰冻切片或细胞因子中的反应性

器官	Lym-1	Lym-2
淋巴结		
生发中心	+++	++
皮质 (Mantle) 区域	+	+++
T 细胞区域	--	--
交错组织细胞	++	++
实质组织细胞	--	--
内皮	--	--
胸腺		
皮质	--	--
髓质	++ 树突细胞	--
脾		
白髓	++ B 细胞区域	++ B 细胞区域
红髓	--	--
骨髓		
髓	--	--
红系细胞	--	--
巨核细胞	--	--

^a从-至+++的免疫过氧化物酶染色的强度。

[0232] 如图3A-3B所示,在例如中级B细胞淋巴瘤的抗原阳性肿瘤的细胞膜上看到HLA-DR阳性。最后,来自正常组织和器官的组织切片显示出对于皮肤的淋巴B细胞和巨噬细胞的有限的反应性(表4)。利用免疫组织化学技术检测HLA-DR的辅助诊断抗体的可用性,使得能够在即将进行的临床试验中鉴定可能从HLA-DR CAR T细胞疗法中受益的患者。

[0233] 表4:Lym-1和Lym-2与正常非淋巴组织在冰冻切片中的反应性

组织	反应性	
	Lym-1	Lym-2
肾上腺	+	—
脑	—	—
乳房	—	—
宫颈	—	—
结肠	+表面上皮	—
十二指肠	—	—
心脏	—	—
肾	—	—
肝	—	—
肺	—	—
子宫	—	—
胰腺	—	—
唾液腺	—	—
皮肤	+仅巨噬细胞	—
骨骼肌	—	—
平滑肌	—	—
胃	—	—
睾丸	—	—
甲状腺	—	—

^a从-至+++的免疫过氧化物酶染色的强度。

[0234] 活细胞放射免疫分析

使用Lym-1或Lym-2,使用活细胞放射免疫测定程序筛选一组人淋巴瘤和实体瘤细胞系的结合。对于该测定,在由PBS、牛血清白蛋白(1 mg/ml)和0.02%叠氮化钠组成的冷缓冲液中将用EDTA-胰蛋白酶从其烧瓶中移出的悬浮培养物和实体瘤细胞系洗涤两次。将重悬于100 μl洗涤缓冲液中的细胞(5×10^5)移液到用PBS 中的BSA(10mg/ml)预处理过夜的微孔中,以防止抗体结合至孔。然后加入Lym-1或Lym-2上清液(100 μl/孔),持续30分钟的温育时间,同时在室温下用96孔板的微型搅拌器连续摇动。洗涤4次后,再加入100,000 cpm的I-125山羊抗小鼠IgG 100μl,与细胞一起温育30分钟,持续摇动。最后4次洗涤后,在γ计数器中对孔进行计数,以确定结合至每种细胞制剂的抗体。这些研究的结果显示,对于大型人淋巴瘤和白血病活检组,Lym-1和Lym-2的反应性仅限于B细胞而不是T细胞来源的肿瘤(表5)。

[0235] 表5:Lym-1和Lym-2与人类恶性淋巴瘤和白血病活检标本的反应性

诊断	Lym-1 ^a	Lym-2 ^a
淋巴瘤^b (淋巴结活检的冷冻切片^c)		
分化良好的淋巴细胞	1/3	3/3
分化不良的淋巴细胞, 结节性	0/2	2/2
分化不良的淋巴细胞, 弥漫性	1/3	3/3
混合的淋巴细胞和组织细胞	8/9	7/9
组织细胞 (B 细胞)	12/17	12/17
T 细胞	0/2	0/2
白血病 (外周血的细胞因子^d)		
慢性淋巴细胞白血病		
B 细胞类型	4/10	8/10
T 细胞类型	0/5	0/5

^a阳性/总数。

[0236] ^b拉帕波特分类。

[0237] ^c免疫过氧化物酶技术。

[0238] ^d间接免疫荧光。

[0239] 与这些结果一致,发现Lym-1和Lym-2结合至选择数目的人淋巴瘤和白血病细胞系,如表6所示。

[0240] 表6:Lym-1和Lym-2与人恶性淋巴瘤细胞系的活细胞放射免疫分析法的反应性

细胞系	Lym-1	Lym-2
伯基特淋巴瘤		
Raji	++++ ^a	++
EB3	-	-
DG-75	++++	++++
NK-9	++	++++
AL-1	-	+
Daudi	+	+++
NU-AmB-1	+	++
SU-AmB-1	-	+
SU-AmB-2	-	-
RAMOS	-	-
Chevallier	++++	-
B46M	+	+
B35M	++++	++++
DND-39	+	-

U-698-M	+	++
HRIK	-	+
大细胞淋巴瘤		
SU-DHL-1	-	-
SU-DHL-2	-	-
SU-DHL-4	-	++++
SU-DHL-5	+	++
SU-DHL-6	+++	+++
SU-DHL-7	+	-
SU-DHL-8	+	-
SU-DHL-9	+	+
SU-DHL-10	-	++++
SU-DHL-16	-	-
NU-DHL-1	++++	-
U-937	-	-
未分化的淋巴瘤		
NU-DUL-1	-	+

^a-, <2,000 cpm; +, 2,000-6,000cpm; ++, 6,000-10,000 cpm; +++, 10,000-15,000 cpm; +++++, >15,000 cpm。

[0241] 相比之下,使用上述活细胞放射免疫测定程序未发现Lym-1和Lym-2结合至35个人类实体肿瘤细胞系(表7)。

[0242] 表7:Lym-1和Lym-2与35个人类实体肿瘤细胞系的活细胞放射免疫分析法的反应性

细胞系	推导	Lym-1	Lym-2
734B	乳腺癌	- ^a	-
578T	乳腺癌	-	-
C-399	结肠癌	-	-
Hutu-80	结肠癌	-	-
HT-29	结肠癌	-	-
HeLa	子宫颈癌	-	-
SW 733	膀胱乳头状癌	-	-
SW 780	膀胱移行细胞癌	-	-
SW 451	食管鳞状细胞癌	-	-
SW 579	甲状腺鳞状细胞癌	-	-
SW 156	肾上腺样瘤	-	-
60	肺小细胞癌	-	-
464	肺小细胞癌	-	-

NCI-H69	肺小细胞癌	-	-
125	肺腺癌	-	-
A427	肺腺癌	-	-
A549	肺腺癌	-	-
SW 1503	间皮瘤	-	-
BM 166	神经母细胞瘤	-	-
IMR-5	神经母细胞瘤	-	-
Y79	视网膜母细胞瘤	-	-
A172	星形细胞瘤	-	-
SW 608	星形细胞瘤	-	-
U118 MG	胶质母细胞瘤	-	-
NU-04	胶质母细胞瘤	-	-
CaCl 74-36	黑色素瘤	-	-
Colo 38	黑色素瘤	-	-
SW 872	脂肪肉瘤	-	-
HS 919	脂肪肉瘤	-	-
SW 1045	滑膜肉瘤	-	-
SW 80	横纹肌肉瘤	-	-
SW 1353	软骨肉瘤	-	-
4-998	成骨肉瘤	-	-
4-906	成骨肉瘤	-	-
SU-CCS-1	清除细胞肉瘤	-	-

^a-, <2,000 cpm; +, 2,000-6,000cpm; ++, 6,000-10,000 cpm; +++, 10,000-15,000 cpm; +++++, >15,000 cpm。

[0243] 和Lym-2抗体的结合概况和Lym-1抗原的鉴定

在图4A中显示了与Raji细胞结合的Lym-1的结合图谱和Scatchard图分析。同样地,在图4B中显示了与ARH-77骨髓瘤细胞系结合的Lym-2的Scatchard图分析。这些数据表明,两种抗体对抗原阳性肿瘤细胞系具有 10^8 M^{-1} 结合亲和力。如表8所示,与正常外周血B细胞相比,与通过肿瘤细胞所见的相比,结合亲和力降低二至四倍。此外,用³⁵S -甲硫氨酸和¹⁴C -亮氨酸对Raji细胞进行代谢标记显示HLA-DR所见的特征性条带模式(图5A-5B)。作为对照,平行使用SC-1抗HLA-DR抗体,并通过SDS-凝胶电泳给出具有相同蛋白质分子量的相同条带模式。

[0244] 表6:使用靶肿瘤细胞系(Raji、ARH-77)和扁桃体淋巴细胞的Lym-1和Lym-2的亲数和常数

单克隆抗体	肿瘤细胞系	扁桃体
Lym-1	$4.02 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$0.88 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
Lym-2	$2.33 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1.23 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

实施例2- HLA-DR CAR T细胞的生成
构建和合成单链HLA-DR抗体基因

从MCLAB (South San Francisco, CA)获得在实验室中产生的2种高结合性抗HLA-DR抗体的DNA序列(Lym-1和Lym-2)。测试两种抗体以确定哪一种在下述测定中产生最有效的CAR。如下所示,构建第二或第三代(图6)CAR载体,其由以下串联基因组成:kozak共有序列;CD8信号肽;抗HLA-DR重链可变区域;(甘氨酸4丝氨酸)3柔性多肽接头(SEQ ID NO: 51);各自的抗HLA-DR轻链可变区域;CD8铰链和跨膜结构域;以及CD28、4-1BB和CD3 ζ 细胞内共刺激信号传导结构域。铰链、跨膜和信号结构域DNA序列由Carl June的专利(参见美国专利申请公开号2013/0287748 A1)确定。抗HLA-DR CAR基因由Genewiz, Inc. (South Plainfield, NJ)在含有 bla 基因的pUC57载体骨架内合成,其赋予载体宿主氨苄青霉素抗性。

[0245] 基因亚克隆进慢病毒质粒

使用抗HLA-DR质粒cDNA转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。在被转化的大肠杆菌细胞生长之后,纯化CAR质粒,并使用合适的限制酶进行消化,从而通过过夜T₄ DNA连接酶反应(New England Biosciences; Ipswich, MA)被插入进基于HIV-1的慢病毒载体,该载体包括HIV-1长末端重复(LTR)、包装信号(Ψ)、EF1 α 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。然后使用得到的含有抗HLA-DR的慢病毒质粒,转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。

[0246] 慢病毒颗粒的生产

在转染之前,在10 mL完全-Tet-DMEM中在 4.0×10^6 个细胞/100 mm组织培养物处理过的板上接种HEK293T细胞,并且在加湿的5% CO₂培养器中在37°C下过夜孵育。一旦80-90%融合,则使用CAR-基因慢病毒质粒和含有形成慢病毒包膜和衣壳组分所需的基因的慢病毒包装质粒,以及专有的反应缓冲液和聚合物,共转染HEK293T细胞,以促进结合HEK293T细胞的含有质粒的纳米颗粒的形成。在37°C下孵育被转染的HEK293T细胞培养物4小时之后,将转染培养基替换为10 mL新鲜的完全Tet DMEM。然后再孵育HEK293T细胞48小时,然后收获细胞上清液,并通过针对p24这一主要慢病毒衣壳蛋白的夹心ELISA测试慢病毒颗粒。将含有慢病毒的上清液进行等分,并储存在-80°C,直至用于靶标CD4⁺和CD8⁺ T细胞的转导。

[0247] 人类CD4⁺和CD8⁺外周血T细胞的纯化、活化和富集

回收使用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)进行密度梯度离心而富集的外周血单核细胞(PBMC),并通过离心进行洗涤,该洗涤程序使用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS。可以使用MACS CD4⁺和CD8⁺ MicroBeads (Miltenyi Biotec; San Diego, CA)试剂盒来分离这些人类T细胞亚群,其中使用磁激活的LS柱来主动选择CD4⁺和CD8⁺ T细胞。然后从磁性MACS分离器中移除磁结合的T细胞,从LS柱中冲刷,并在新鲜的完全培养基中洗涤。通过使用Life Technologies Acoustic Attune® 细胞仪进行的流式细胞术评估CD4⁺和CD8⁺ T细胞的纯度,并在有需要的情况下通过在USC的流式细胞术核心设施进行的荧光活化细胞分选而进行富集。在合适的细胞培养容器中在补充有100 IU/mL IL-2的完全培养基中将CD4⁺和CD8⁺ T细胞维持 1.0×10^6 个细胞/mL的密度,其中 α -CD3/ α -CD28人类T细胞戴诺磁珠(Life Technologies; Carlsbad, CA)被加入来激活被培养的T细胞。在5% CO₂培养器中在37°C下孵育T细胞2天,然后使用CAR慢病毒颗粒进行转导。

[0248] ⁺和CD8⁺ T细胞的慢病毒转导

收集活化的T细胞,并通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心或使用MACS死细胞移除试剂

盒(Miltenyi Biotec; San Diego, CA), 移除死细胞。在6孔板中, 以 1.0×10^6 个细胞/mL完全培养基的密度将活化的T细胞进行铺板。对于各个孔, 以各种感染复数(MOI) (例如1、5、10和50) 将含有HLA-DR CAR的慢病毒颗粒加入至细胞悬浮液。以4 $\mu\text{g/mL}$ 的终浓度加入聚凝胺, 它是一种阳离子聚合物, 通过促进慢病毒颗粒和靶细胞表面之间的相互作用而辅助转导。在 32°C 下以 $800 \times g$ 将培养板离心1小时。在离心之后, 对含有慢病毒的培养基进行抽吸, 并将细胞丸粒重悬在具有100 IU/mL IL-2的新鲜完全培养基中。在 37°C 将细胞置于5% CO_2 加湿的培养器中过夜。在转导之后三天, 将细胞丸粒化并重悬在具有IL-2和400 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素(G418硫酸盐)(Life Technologies; Carlsbad, CA) 的新鲜完全培养基中。通过流式细胞术和southern印迹分析来评估HLA-DR CAR修饰的T细胞, 以证明转导过程成功。在体外和体内测试之前, 使用FACS富集HLA-DR CAR T细胞并1:1混合以进行体内研究。

[0249] 通过钙黄素释放细胞毒性测定进行CAR功效的体外评估

收集HLA-DR抗原阳性和阴性人类细胞系, 洗涤, 并以 1.0×10^6 个细胞/mL的浓度重悬在完全培养基中。以15 μM 的浓度将钙荧光素乙酰氧(AM) 加入至靶细胞样品, 然后在5% CO_2 加湿的培养器中在 37°C 下孵育30分钟。将被染色的阳性和阴性靶细胞洗涤两次, 并通过离心重悬在完全培养基中, 并以 1.0×10^4 个细胞/孔的密度将其加入至96孔板。以50:1、5:1和1:1的效应与靶细胞的比例, 将HLA-DR CAR T细胞加入至完全培养基中的板。悬浮在完全培养基和具有2% triton X-100的完全培养基中的被染色的靶细胞分别作为自发对照和最大释放对照。在 $365 \times g$ 和 20°C 下将培养板离心2分钟, 然后放置回培养器中3小时。然后将板离心10分钟, 并将细胞上清液等分至黑色聚苯乙烯96孔板上的各个孔, 并分别在485/20 nm和528/20 nm的激发和发射波长在Bio-Tek® Synergy™ HT酶标仪上评估荧光度。

[0250] 通过Luminex生物测定进行的人细胞因子的定量

使用在实验室中常规执行的标准程序, 测量HLA-DR CAR修饰的T细胞和HLA-DR阳性和阴性肿瘤细胞系的上清液的细胞因子分泌, 作为CAR T细胞激活的测量。将数据与单独的培养基进行比较, 并且与使用未激活的人类T细胞的培养物进行比较, 以识别背景活性。在孵育过程期间, 随着时间推移测量IL-2、IFN- γ 、IL-12和其他相关细胞因子的浓度。

[0251] 在两个异种移植HLA-DR阳性癌症模型中体内评估CAR T细胞功效

使用两个不同的人类肿瘤细胞系异种移植肿瘤模型, 进一步体内评估HLA-DR CAR T细胞。对于两个模型, 通过注射 5×10^6 个HLA-DR阳性或HLA-DR阴性实体肿瘤细胞系, 在6-8周龄裸小鼠中皮下地建立固体实体肿瘤。当肿瘤的直径达到0.5 cm时, 使用1或 3×10^7 个人类T细胞(作为阴性对照), 或者使用根据体外研究结果从最活性的HLA-DR抗体构建的HLA-DR CAR T细胞, 静脉处理小鼠群($n=5$)。然后使用卡尺3X /周测量肿瘤体积, 并生成体积增长曲线, 以证明实验处理相对于对照的效果。

[0252] 发现HLA-DR是CAR T细胞发展的突出靶标。

[0253] 实施例3 - Lym-1 CAR细胞

CAR慢病毒构建体的构建

Lym-1 CAR载体含有CD8前导序列, 随后是特异性结合至Lym-1抗原的细胞外抗原结合部分或scFV。scFV经由CD8铰链区域连接至由CD8跨膜区域和来自4-1BB和CD3 ζ 的信号传导结构域组成的细胞质信号传导结构域(图7)。通过Genewiz Gene Synthesis服务(Piscataway, NJ) 合成地合成含有信号传导结构域的CAR序列。纯化质粒, 并使用合适的限

制酶进行消化,从而通过过夜T4 DNA连接酶反应(New England Biosciences; Ipswich, MA)被插入进基于HIV-1的慢病毒载体(pLVX-IRES-ZsGreen, Clontech, Signal Hill, CA),该载体包括HIV-1 5'和3'长末端重复(LTR)、包装信号(Ψ)、EF1 α 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、和猿病毒40起源(SV40),随后使用限制性内切酶消化和T4 DNA连接酶连接删除IRES-ZsGreen。然后使用得到的含有CAR的慢病毒质粒,转化NovaBlue Singles™化学感受态的大肠杆菌细胞。

[0254] 慢病毒颗粒的生产

在转染之前,在补充有10%透析过的FCS的20 mL DMEM中在 4.0×10^6 个细胞/150 cm²组织培养物处理过的烧瓶接种HEK 293T细胞,并且在加湿的5% CO₂培养器中在37°C下过夜孵育。一旦80-90%融合,则在37°C加湿的5% CO₂培养器中在补充有1%透析过的FCS的且不含青霉素/链霉素的20 mL DMEM中孵育HEK 293T细胞两小时。使用CAR质粒和含有形成慢病毒包膜和衣壳组分所需的基因的慢病毒包装质粒,共转染HEK293T细胞。还加入了专有的反应缓冲液和聚合物,以促进结合HEK 293T细胞的含有质粒的纳米颗粒的形成。在37°C下孵育被转染的HEK 293T细胞培养物24小时之后,将转染培养基替换为20 mL新鲜的完全DMEM。每24小时收集慢病毒上清液至三天,并且在4°C以1,250 rpm将上清液离心5分钟,然后过滤灭菌并在4°C以20,000 g在超离心中离心2小时。将被浓缩的慢病毒重悬在含有7%海藻糖和1%BSA的PBS中。然后将慢病毒进行等分,并储存在-80°C,直至用于靶标CD4⁺和CD8⁺T细胞的转导。24小时之后收获细胞上清液,并通过针对p24这一主要慢病毒衣壳蛋白的夹心ELISA测试慢病毒颗粒。用生物素标记的蛋白L抗体(Genscript, Piscataway, NJ)进行染色,然后与缀合至PE的链霉抗生物素蛋白温育,并通过FACS分析进行检测,估算转染效率在20%-50%之间。

[0255] 人类CD4⁺和CD8⁺外周血T细胞的纯化、活化和富集

回收使用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)进行密度梯度离心而富集的外周血单核细胞(PBMC),并通过离心进行洗涤,该离心使用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS。使用T细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies)来磁性地分离这些人类T细胞亚群,其中对于CD4⁺和CD8⁺T细胞使用阴性选择。通过使用Life Technologies Acoustic Attune®细胞仪进行的流式细胞术评估CD4⁺和CD8⁺T细胞的纯度,并且通过荧光活化细胞分选而进行富集。在合适的细胞培养容器中在补充有100 IU/mL IL-2的完全50% Click's培养基/50% RPMI-1640培养基中将1:1混合的CD4⁺和CD8⁺T细胞维持 1.0×10^6 个细胞/mL的密度,其中 α -CD3/ α -CD28人类T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies)被加入来激活被培养的T细胞。在5% CO₂培养器中在37°C下孵育T细胞2天,然后使用CAR慢病毒颗粒进行转导。

[0256] ⁺和CD8⁺T细胞的慢病毒转导

收集活化的T细胞,并通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心或使用MACS死细胞移除试剂盒(Miltenyi Biotec; San Diego, CA),移除死细胞。在6孔板中,以 1.0×10^6 个细胞/mL完全培养基的密度将活化的T细胞进行铺板。使用补充有Lentiblast(一种细胞转染辅助试剂)(Oz Biosciences, San Diego, CA)的慢病毒颗粒转导细胞。在加湿的5% CO₂培养器中在37°C下孵育被转导的细胞24小时。然后对细胞进行离心和更换培养基,然后加入T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)。

[0257] 通过流式细胞术检测Lym-1 CAR表达

慢病毒转导后七天,使用洗涤缓冲液(在PBS中的4%BSA)将原代T细胞洗涤3次。将细胞与Biotein-Protein L(2ug, Genscript, Piscataway, NJ)在4°C下孵育45分钟。再次使用洗涤缓冲液洗涤细胞3次,随后与2ul的链霉抗生物素蛋白-PE(BD Sciences, La Jolla, CA)在4°C下孵育45分钟。将细胞洗涤3次并使用流式细胞术(Attune Cytometer, Applied Biosciences, Carlsbad, CA)进行分析。

[0258] 细胞毒性测定

使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性试剂盒(Thermo Scientific, Carlsbad, CA),确定Lym-1 CAR T细胞的细胞毒性。收集被激活的T细胞,并使用上述的Lym-1 CAR 慢病毒构建体来转导 1×10^6 个细胞。使用T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)来激活细胞两天,然后进行细胞毒性测试。根据厂家的说明来确定靶细胞的最佳数目。为了测试,在5% CO₂培养器中在37°C下在96孔板中一式三份地将合适的靶细胞进行铺板24小时,然后以20:1、10:1、5:1和1:1的比率加入被激活的CAR T细胞,并在5% CO₂培养器中在37°C下孵育24小时。在37°C下裂解细胞45分钟,并以1,250 rpm离心5分钟。将上清液转移至新鲜的96孔板,然后加入反应混合物30分钟。使用停止溶液来停止反应,并在450nm对培养板进行读数,使用在650 nm的吸光度来修正读数。

[0259] 体内肿瘤消退测试

使用永生化的B淋巴瘤细胞系Raji注射Foxn1缺陷小鼠,其表达Lym-1抗原。将在200 ul的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 2×10^6 个Raji细胞与 1×10^6 个人成纤维细胞注射进预照射的小鼠(400 rad)的左侧,以减少循环NK细胞的数量,使得异种移植物能够以高频植入。使用 α CD3/CD28活化剂复合物(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)活化T细胞2天。然后使用Lym-1 CAR慢病毒颗粒,转染被活化的T细胞,随后用 α CD3/CD28活化剂复合物再活化2天。在肿瘤接种之后第7天,将被活化的表达Lym-1 CAR的T细胞(2.5×10^6)通过侧尾静脉静脉内注射入小鼠。使用游标卡尺每周三次评估肿瘤尺寸,并计算体积。

[0260] 表达的检测

Lym-1 CAR T细胞的Lym-1 CAR的表达的分析显示,62.5%转导的T细胞对Lym-1为阳性(图8中间图)。相反,只有1%的用作对照的未转导的T细胞对于CAR表达是阳性的(图8左图)。使用CD19转导的T细胞作为阳性对照,并显示CD19 CAR的52%表达(图8右图)。

[0261] 细胞的细胞毒性

使用B细胞淋巴瘤细胞系Raji,检验Lym-1 CAR T细胞的细胞溶解活性。如通过FACS分析确定的,Raji表达Lym-1抗原(HLA-Dr10)。以20:1、10:1、5:1和1:1的效应细胞与靶细胞的比率,将Lym-1 CAR T细胞加入至Raji细胞。在5:1、10:1和20:1的比率下,Lym-1 CAR T细胞显示出增加的目标Raji细胞的裂解,裂解率为22%。相比之下,在所测试的任何比率下,未诱导的T细胞都不裂解Raji细胞。

[0262] 实施例4 - Lym-2 CAR细胞**CAR慢病毒构建体的构建**

Lym-2 CAR载体含有CD8前导序列,随后是特异性结合至Lym-2抗原(HLA-Dr)的细胞外抗原结合部分或scFV。scFV经由CD8铰链区域连接至由CD8跨膜区域和来自4-1BB和CD3 ζ 的信号传导结构域组成的细胞质信号传导结构域。通过Genewiz Gene Synthesis服务

(Piscataway, NJ) 合成地合成含有信号传导结构域的CAR序列。纯化质粒, 并使用合适的限制酶进行消化, 从而通过过夜T₄ DNA连接酶反应(New England Biosciences; Ipswich, MA) 被插入进基于HIV-1的慢病毒载体(pLVX-IRES-ZsGreen, Clontech, Signal Hill, CA), 该载体包括HIV-1 5' 和3' 长末端重复(LTR)、包装信号(Ψ)、EF1 α 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、和猿病毒40起源(SV40), 随后使用限制性内切酶消化和T₄ DNA连接酶连接删除IRES-ZsGreen。然后使用得到的含有CAR的慢病毒质粒, 转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。

[0263] 慢病毒颗粒的生产

在转染之前, 在补充有10%透析过的FCS的20 mL DMEM中在 4.0×10^6 个细胞/150 cm²组织培养物处理过的烧瓶接种HEK 293T细胞, 并且在加湿的5% CO₂培养器中在37°C下过夜孵育。一旦80-90%融合, 则在37°C加湿的5% CO₂培养器中在补充有1%透析过的FCS的且不含青霉素/链霉素的20 mL DMEM中孵育HEK 293T细胞两小时。使用CAR质粒和含有形成慢病毒包膜和衣壳组分所需的基因的慢病毒包装质粒, 共转染HEK293T细胞。还加入了专有的反应缓冲液和聚合物, 以促进结合HEK 293T细胞的含有质粒的纳米颗粒的形成。在37°C下孵育被转染的HEK 293T细胞培养物24小时之后, 将转染培养基替换为20 mL新鲜的完全DMEM。每24小时收集慢病毒上清液至三天, 并且在4°C以1,250 rpm将上清液离心5分钟, 然后过滤灭菌并在4°C以20,000 g在超离心中离心2小时。将被浓缩的慢病毒重悬在含有7%海藻糖和1%BSA的PBS中。然后将慢病毒进行等分, 并储存在-80°C, 直至用于靶标CD4⁺和CD8⁺ T细胞的转导。24小时之后收获细胞上清液, 并通过针对p24这一主要慢病毒衣壳蛋白的夹心ELISA测试慢病毒颗粒。用生物素标记的蛋白L抗体(Genscript, Piscataway, NJ) 进行染色, 然后与缀合至PE的链霉抗生物素蛋白温育, 并通过FACS分析进行检测, 估算转染效率在20%-50%之间。

[0264] 人类CD4⁺和CD8⁺外周血T细胞的纯化、活化和富集

回收使用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 进行密度梯度离心而富集的外周血单核细胞(PBMC), 并通过离心进行洗涤, 该离心使用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS。使用T细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies)来磁性地分离这些人类T细胞亚群, 其中对于CD4⁺ 和CD8⁺ T细胞使用阴性选择。通过使用Life Technologies Acoustic Attune® 细胞仪进行的流式细胞术评估CD4⁺ 和CD8⁺ T细胞的纯度, 并且通过荧光活化细胞分选而进行富集。在合适的细胞培养容器中在补充有100 IU/mL IL-2的完全50% Click's培养基/50% RPMI-1640培养基中将1:1混合的CD4⁺ 和CD8⁺ T细胞维持 1.0×10^6 个细胞/mL的密度, 其中 α -CD3/ α -CD28人类T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies)被加入来激活被培养的T细胞。在5% CO₂培养器中在37°C下孵育T细胞2天, 然后使用CAR慢病毒颗粒进行转导。

[0265] ⁺和CD8⁺ T细胞的慢病毒转导

收集活化的T细胞, 并通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心或使用MACS死细胞移除试剂盒(Miltenyi Biotec; San Diego, CA), 移除死细胞。在6孔板中, 以 1.0×10^6 个细胞/mL完全培养基的密度将活化的T细胞进行铺板。使用补充有Lentiblast(一种细胞转染辅助试剂)(Oz Biosciences, San Diego, CA)的慢病毒颗粒转导细胞。在加湿的5% CO₂培养器中在37°C下孵育被转导的细胞24小时。然后对细胞进行离心和更换培养基, 然后加入T细胞

激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)。

[0266] 细胞毒性测定

使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性试剂盒(Thermo Scientific, Carlsbad, CA),确定Lym-2 CAR T细胞的细胞毒性。收集被激活的T细胞,并使用上述的Lym-2 CAR 慢病毒构建体来转导 1×10^6 个细胞。使用T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego,CA)来激活细胞两天,然后进行细胞毒性测试。根据厂家的说明来确定靶细胞的最佳数目。为了测试,在5% CO₂培养器中在37°C下在96孔板中一式三份地将合适的靶细胞进行铺板24小时,然后以20:1、10:1、5:1和1:1的比率加入被激活的CAR T细胞,并如上所述地孵育24小时。在37°C下裂解细胞45分钟,并以1,250 rpm离心5分钟。将上清液转移至新鲜的96孔板,然后加入反应混合物30分钟。使用停止溶液来停止反应,并在450nm对培养板进行读数,使用在650 nm的吸光度来修正读数。

[0267] 体内肿瘤消退测试

使用永生化的B淋巴瘤细胞系Raji注射Foxn1缺陷小鼠,其表达Lym-2抗原。将在200 μ l的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 2×10^6 个Raji细胞与 1×10^6 个人成纤维细胞注射进预照射(400 rad)的BALB/c小鼠的左侧,确保肿瘤的高发生率。使用 α CD3/CD28活化剂复合物(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)活化T细胞2天。然后使用Lym-2 CAR慢病毒颗粒,转染被活化的T细胞,随后用 α CD3/CD28活化剂复合物再活化2天。在肿瘤接种之后第7天,将被活化的表达Lym-2 CAR的T细胞(2.5×10^6)静脉内注射入小鼠。使用游标卡尺每周三次评估肿瘤尺寸,并计算体积。

[0268] 表达的检测

Lym-2 CAR T细胞的Lym-2 CAR的表达的分析显示,28%转导的T细胞对Lym-2为阳性(图11中间图)。相反,只有1%的用作对照的未转导的T细胞对于CAR表达是阳性的(图11左图)。使用CD19转导的T细胞作为阳性对照,并显示CD19 CAR的52%表达(图11右图)。

[0269] 细胞的细胞毒性

使用B细胞淋巴瘤细胞系Raji,确定Lym-2 CAR T细胞的细胞溶解活性。如通过FACS分析确定的,Raji表达Lym-2抗原(HLA-Dr10)。以20:1、10:1、5:1和1:1的效应细胞与靶细胞的比率,将Lym-2 CAR T细胞加入至Raji细胞。在5:1和10:1的比率下,Lym-2 CAR T细胞显示出增加的目标Raji细胞的裂解,裂解率为22%。相比之下,在所测试的任何比率下,未诱导的T细胞都不裂解Raji细胞。

[0270] 实施例5 -NK细胞转导

NK-92MI转导

NK-92Mi细胞系购自ATCC (CRL-2408)并且维持在具有10% FBS的RPMI-1640中。在转导之前,使用在300 μ L磷酸盐缓冲溶液(PBS)中的10 μ g RetroNectin (Clontech T100A),在室温下孵育未组织处理的24个孔2小时。将一百万个NK-92Mi细胞和慢病毒(MOI = 5)混合并加到RetroNectin包被的平板上。然后将平板在28°C 800g离心90分钟。离心后,将细胞保持在细胞培养箱中过夜。孵育后,第二天早上用PBS洗涤细胞三次,然后将转导的NK-92Mi细胞转移至24孔G-Rex(Wilson Wolf)板中进行扩增。慢病毒转导后7天,将细胞在洗涤缓冲液(在PBS中的4%BSA)中洗涤3次,用Biotin-Protein L(1 μ g/100万细胞,Genscript)在4°C染色45分钟,并用洗涤缓冲液洗涤3次,然后在4°C加入2 μ l链霉亲和素-APC(BD science)

45分钟。在洗涤缓冲液中最后3次洗涤后,通过FAC (Attune) 对细胞进行分析(图15)。

[0271] 等效物

除非另有定义,否则本文所用的所有的技术和科学的术语都具有如本发明的所属领域中的普通技术人员中的一个通常所理解的相同的含义。

[0272] 可以在缺少在本文没有具体公开的任何元素或限制的情况下,适当地实施本文说明性地描述的本技术。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“含有”等应该被广泛且没有限制地理解。此外,本文采用的术语和表达已经被用作描述而非限制,在这些术语和表达的使用中,没有意图排除所示和所述特征或其部分的任何等效物,但是应该认识到,在本发明技术的范围之内各种变化都是可能的。

[0273] 因此,应该理解的是,在此提供的材料、方法和例子是优选的方面的代表,是示例性的,并且不旨在作为对本技术的范围的限制。

[0274] 本文广泛地和一般地描述了本技术。落入一般性描述之内的较窄的种类和亚属分组中的每一个也都形成本技术的一部分。这包括了具有从该属中移除任何主题的附带条件或负面限制的本技术的一般性描述,无论被删除的材料是否在本文中被具体描述。

[0275] 此外,在以马库什组描述本技术的特征或方面的情况中,本领域技术人员将认识到,还借此以该马库什组中的任何单独成员或成员的亚组描述了本技术。

[0276] 在本文中提及的所有公开文献、专利申请、专利和其他参考文献,其整体都以引用的方式明确地合并入本文中,至如同每个都单独地以引用的方式合并的相同程度。如发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0277] 在以下权利要求中阐述了其他方面。

序列表

<110> 艾伦·L·爱泼斯坦

<120> LYM-1和LYM-2靶向的CAR T细胞免疫疗法

<130> 064189-7202

<140>

<141>

<150> 62/171,004

<151> 2015-06-04

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 3

Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 4

Ile Arg Phe Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 5

Ala Ser His Tyr Gly Ser Thr Leu Ala Phe Ala Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 6

Thr Arg Arg Ile Gly Asn Ser Asp Tyr Asp Trp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 7

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 7

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcacca tctcagggtt ctcatataacc agctatgggtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctggtagtg atatggagtg atggaagcac aacctataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctccaaac tgatgacaca gccatataact actgtgccag tcactacggt 300
 agtacccttg cctttgcttc ctggggccac gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 8

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

<210> 9

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 9

```
gaagtgcagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggctc catgaaactc 60
tcctgtgttg cctctggatt cactttcagt aactattgga tgaactgggt ccgccagtct 120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgetgaa attagattta aatctcataa ttatgcaaca 180
cattttgcgg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240
gtctacctgc aaatgaacaa cttagagct gaagacactg gcatttatta ctgtaccagg 300
aggataggaa actctgatta cgactggtgg tacttcgatg tctggggcgc agggacctca 360
gtcaccgtct cctcagctag c 381
```

<210> 10

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 10

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

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 11

Val	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr
1				5	

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 12

Gln	Asn	Val	Gly	Asn	Asn
1				5	

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 13

Asn Ala Lys

1

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 14

Ser Ala Ser

1

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 15

Gln His His Tyr Gly Thr Phe Thr

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Phe Thr

1

5

<210> 17

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 17

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcatatgtc gagcaagtgt gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gccaaaatct tagcagaagg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttctctga agatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cattatggta cattcacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaataaaa 318

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成的多肽

<400> 18

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

<210> 19

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 19

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaagtact gatttactcg gcatectacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tataacacct atccattcac gttcggctcg 300
 gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 20

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

<210> 21

<211> 384

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

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

Met	Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	Gln	Gln	Trp	Arg	Gln	Gly
65					70					75					80
Glu	Tyr	Lys	Cys	Val	Val	Gln	His	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Lys	Lys	Glu
				85					90					95	
Ile	Phe	Arg	Trp	Pro	Glu	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Ala	Ser	Ser	Val	Pro
				100					105					110	
Thr	Ala	Gln	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala
				115					120					125	
Pro	Ala	Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys
				130					135					140	
Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Arg	Glu	Thr	Lys	Thr	Pro	Glu
145					150					155					160
Cys	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala
				165					170						175
Val	Gln	Asp	Leu	Trp	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Phe	Val
				180					185					190	
Val	Gly	Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	His	Leu	Thr	Trp	Glu	Val	Ala	Gly
				195					200					205	
Lys	Val	Pro	Thr	Gly	Gly	Val	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	His	Ser
				210					215					220	
Asn	Gly	Ser	Gln	Ser	Gln	His	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu
225					230					235					240
Trp	Asn	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Leu	Asn	His	Pro	Ser	Leu
				245					250						255
Pro	Pro	Gln	Arg	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Glu	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Pro
				260					265					270	
Val	Lys	Leu	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Asp	Pro	Pro	Glu	Ala
				275					280					285	
Ala	Ser	Trp	Leu	Leu	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Pro	Pro	Asn	Ile
				290					295					300	
Leu	Leu	Met	Trp	Leu	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Asn	Thr	Ser	Gly	Phe
305					310					315					320
Ala	Pro	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Phe	Trp	Ala
				325					330					335	
Trp	Ser	Val	Leu	Arg	Val	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Thr
				340					345					350	
Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Ala
				355					360					365	
Ser	Arg	Ser	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Val	Thr	Asp	His	Gly	Pro	Met	Lys

370	375	380
<210> 22		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 22		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1 5 10 15		
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20 25 30		
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35 40 45		
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50 55 60		
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65 70 75 80		
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85 90 95		
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100 105 110		
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115 120 125		
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130 135 140		
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145 150 155 160		
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165 170 175		
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180 185 190		
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195 200 205		
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210 215 220		
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225 230 235 240		
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245 250 255		
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		

260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
325	330	
<210> 23		
<211> 326		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 23		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		15
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		80
85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		160
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		

195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210> 24

<211> 377

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

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

130	135	140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro		
145	150	155
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
165	170	175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
180	185	190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr		
195	200	205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
210	215	220
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
225	230	235
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
245	250	255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln		
260	265	270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
275	280	285
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
290	295	300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
305	310	315
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
325	330	335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile		
340	345	350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln		
355	360	365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
370	375	
<210> 25		
<211> 452		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 25		
Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn		
1	5	10
Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp		

20	25	30
Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr	Leu Ser Trp Lys Tyr Lys	Asn Asn Ser
35	40	45
Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly	Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly	Gly Lys
50	55	60
Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val	Leu Leu Pro Ser Lys Asp	Val Met Gln
65	70	75
Gly Thr Asp Glu His Val Val	Cys Lys Val Gln His Pro	Asn Gly Asn
85	90	95
Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu	Pro Val Ile Ala Glu Leu	Pro Pro Lys
100	105	110
Val Ser Val Phe Val Pro Pro	Arg Asp Gly Phe Phe Gly	Asn Pro Arg
115	120	125
Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln	Ala Thr Gly Phe Ser Pro	Arg Gln Ile
130	135	140
Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu	Gly Lys Gln Val Gly Ser	Gly Val Thr
145	150	155
Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu	Ala Lys Glu Ser Gly Pro	Thr Thr Tyr
165	170	175
Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr	Ile Lys Glu Ser Asp Trp	Leu Gly Gln
180	185	190
Ser Met Phe Thr Cys Arg Val	Asp His Arg Gly Leu Thr	Phe Gln Gln
195	200	205
Asn Ala Ser Ser Met Cys Val	Pro Asp Gln Asp Thr Ala	Ile Arg Val
210	215	220
Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe	Ala Ser Ile Phe Leu Thr	Lys Ser Thr
225	230	235
Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr	Asp Leu Thr Thr Tyr Asp	Ser Val Thr
245	250	255
Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn	Gly Glu Ala Val Lys Thr	His Thr Asn
260	265	270
Ile Ser Glu Ser His Pro Asn	Ala Thr Phe Ser Ala Val	Gly Glu Ala
275	280	285
Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp	Asn Ser Gly Glu Arg Phe	Thr Cys Thr
290	295	300
Val Thr His Thr Asp Leu Pro	Ser Pro Leu Lys Gln Thr	Ile Ser Arg
305	310	315
Pro Lys Gly Val Ala Leu His	Arg Pro Asp Val Tyr Leu	Leu Pro Pro
325	330	335

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu		
340	345	350
Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg		
355	360	365
Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro		
370	375	380
Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val		
385	390	395
Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His		
405	410	415
Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr		
420	425	430
Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala		
435	440	445
Gly Thr Cys Tyr		
450		
<210> 26		
<211> 327		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 26		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
130	135	140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
	165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
	195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
	290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	325		

<210> 27

<211> 353

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

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

Lys	Ser	Val	Thr	Cys	His	Val	Lys	His	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp
				85				90				95			
Val	Thr	Val	Pro	Cys	Pro	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro
				100				105				110			
Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser	Cys	Cys	His	Pro	Arg	Leu	Ser
				115				120				125			
Leu	His	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Asn
				130				135				140			
Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Phe
145				150				155				160			
Thr	Trp	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu
				165				170				175			
Arg	Asp	Leu	Cys	Gly	Cys	Tyr	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Cys
				180				185				190			
Ala	Glu	Pro	Trp	Asn	His	Gly	Lys	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ala	Ala	Tyr
				195				200				205			
Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Pro	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn
				210				215				220			
Thr	Phe	Arg	Pro	Glu	Val	His	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser	Glu	Glu	Leu
225				230				235				240			
Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe	Ser
				245				250				255			
Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Gly	Ser	Gln	Glu	Leu	Pro
				260				265				270			
Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	Arg	Gln	Glu	Pro	Ser	Gln	Gly
				275				280				285			
Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp
				290				295				300			
Trp	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Phe	Ser	Cys	Met	Val	Gly	His	Glu	Ala	Leu
305				310				315				320			
Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gln	Lys	Thr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Gly	Lys	Pro
				325				330				335			
Thr	His	Val	Asn	Val	Ser	Val	Val	Met	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Cys
				340				345				350			

Tyr

<210> 28

<211> 340

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Lys	Val	Phe	Pro	Leu	Ser	Leu	Asp	Ser	Thr
1				5					10					15	
Pro	Gln	Asp	Gly	Asn	Val	Val	Val	Ala	Cys	Leu	Val	Gln	Gly	Phe	Phe
			20					25					30		
Pro	Gln	Glu	Pro	Leu	Ser	Val	Thr	Trp	Ser	Glu	Ser	Gly	Gln	Asn	Val
		35					40					45			
Thr	Ala	Arg	Asn	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Tyr
	50					55					60				
Thr	Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Thr	Leu	Pro	Ala	Thr	Gln	Cys	Pro	Asp	Gly
65				70					75					80	
Lys	Ser	Val	Thr	Cys	His	Val	Lys	His	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ser	Gln	Asp
			85					90					95		
Val	Thr	Val	Pro	Cys	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Cys	Cys	His	Pro
			100					105					110		
Arg	Leu	Ser	Leu	His	Arg	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser
	115						120					125			
Glu	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Gly
	130					135					140				
Ala	Thr	Phe	Thr	Trp	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Val	Gln	Gly
145				150					155					160	
Pro	Pro	Glu	Arg	Asp	Leu	Cys	Gly	Cys	Tyr	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Leu
			165					170					175		
Pro	Gly	Cys	Ala	Gln	Pro	Trp	Asn	His	Gly	Glu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr
		180					185						190		
Ala	Ala	His	Pro	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Thr	Ala	Asn	Ile	Thr	Lys
	195					200						205			
Ser	Gly	Asn	Thr	Phe	Arg	Pro	Glu	Val	His	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser
	210					215					220				
Glu	Glu	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	Arg
225				230					235					240	
Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Gly	Ser	Gln
			245					250					255		
Glu	Leu	Pro	Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	Arg	Gln	Glu	Pro
		260						265					270		
Ser	Gln	Gly	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Leu	Arg	Val	Ala
	275					280							285		
Ala	Glu	Asp	Trp	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Phe	Ser	Cys	Met	Val	Gly	His
	290					295					300				

50	55	60
Lys Asp Leu Leu Glu Arg Arg Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg		
65	70	75
His Asn Tyr Gly Val Gly Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val Gln		80
	85	90
Pro Lys Val Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His		95
	100	105
Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Asn Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu		110
	115	120
Val Arg Trp Phe Arg Asn Gly Gln Glu Glu Lys Thr Gly Val Val Ser		125
	130	135
Thr Gly Leu Ile Gln Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met		140
	145	150
Leu Glu Thr Val Pro Gln Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu		155
	165	170
His Pro Ser Val Met Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser		175
	180	185
Glu Ser Ala Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu		190
	195	200
Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln		205
	210	215
Lys Gly His Ser Gly Leu Pro Pro Thr Gly Phe Leu Ser		220
	225	230
		235
<210> 31		
<211> 237		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
<400> 31		
Gly Asp Thr Arg Pro Arg Phe Leu Glu Leu Leu Lys Ser Glu Cys His		
1	5	10
Phe Phe Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Phe Leu Glu Arg His Phe His		15
	20	25
Asn Gln Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Tyr Arg		30
	35	40
Ala Val Phe Glu Leu Gly Arg Pro Asp Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln		45
	50	55
Lys Asp Leu Leu Glu Gln Lys Arg Gly Gln Val Asp Asn Tyr Cys Arg		60

65	70	75	80
His Asn Tyr Gly Val	Val Glu Ser Phe Thr Val	Gln Arg Arg Val	His
85	90	95	
Pro Gln Val Thr Val	Tyr Pro Ala Lys Thr Gln	Pro Leu Gln His	His
100	105	110	
Asn Leu Leu Val Cys Ser	Val Ser Gly Phe Tyr Pro	Gly Ser Ile Glu	
115	120	125	
Val Arg Trp Phe Arg Asn	Gly Gln Glu Glu Lys Ala	Gly Val Val Ser	
130	135	140	
Thr Gly Leu Ile Gln Asn	Gly Asp Trp Thr Phe Gln	Thr Leu Val Met	
145	150	155	160
Leu Glu Thr Phe Pro Arg	Ser Gly Glu Val Tyr Thr	Cys Gln Val Glu	
165	170	175	
His Pro Ser Val Thr Ser	Pro Leu Thr Val Glu Trp	Ser Ala Arg Ser	
180	185	190	
Glu Ser Ala Gln Ser Lys	Met Leu Ser Gly Val Gly	Gly Phe Val Leu	
195	200	205	
Gly Leu Leu Phe Leu Gly	Ala Gly Leu Phe Ile Tyr	Phe Arg Asn Gln	
210	215	220	
Lys Gly His Ser Gly Leu	Gln Pro Thr Gly Phe Leu	Ser	
225	230	235	
<210>	32		
<211>	237		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列的描述:合成的多肽		
<400>	32		
Gly Asp Thr Arg Pro Arg	Phe Leu Glu Tyr Ser Thr	Ser Glu Cys His	
1	5	10	15
Phe Phe Asn Gly Thr Glu	Arg Val Arg Tyr Leu Asp	Arg Tyr Phe His	
20	25	30	
Asn Gln Glu Glu Asn Val	Arg Phe Asp Ser Asp Val	Gly Glu Phe Arg	
35	40	45	
Ala Val Thr Glu Leu Gly	Arg Pro Asp Ala Glu Tyr	Trp Asn Ser Gln	
50	55	60	
Lys Asp Leu Leu Glu Gln	Lys Arg Gly Arg Val Asp	Asn Tyr Cys Arg	
65	70	75	80
His Asn Tyr Gly Val Val	Glu Ser Phe Thr Val Gln	Arg Arg Val His	

Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro
1 5 10 15

Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg
 20 25 30

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

Tyr

<210> 35

<211> 51

<212> PRT

<213> 家猫

<400> 35

Pro Val Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Gln Ala
 1 5 10 15

Pro Ile Thr Thr Ser Gln Arg Val Ser Leu Arg Pro Gly Thr Cys Gln
 20 25 30

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

Asp Ile Tyr

50

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 37

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Leu Ile

20

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 38

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Ala Val Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Val Ile Thr Leu Ile

20

<210> 39

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 39

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 40

<211> 220

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

CD28序列

<400> 40

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser

35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys		
100	105	110
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser		
115	120	125
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
130	135	140
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
145	150	155
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
165	170	175
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
180	185	190
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
195	200	205
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
210	215	220

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

CD3 ζ信号传导结构域

<400> 41

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

<210> 42

<211> 48

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

IgG1重链铰链序列

<400> 42

ctcgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccg 48

<210> 43

<211> 81

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

CD28跨膜区域

<400> 43

ttttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 44

<211> 126

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

4-1BB共刺激信号传导区域

<400> 44

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 45

<211> 123

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

CD28共刺激信号传导区域

<400> 45

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 46

<211> 339

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

CD3 ζ信号传导区域

<400> 46

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggagggggca aggggcacga tggcctttac cagggtetca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttcatatgca ggccctgccc cctcgctaa 339

<210> 47

<211> 105

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

ICOS共刺激信号传导区域

<400> 47

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60
gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105

<210> 48

<211> 108

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述:

OX40共刺激信号传导区域

<400> 48

agggaccaga ggctgcccc cgatgcccac aagccccctg ggggaggcag tttccgacc 60
cccatccaag aggagcaggc cgacgcccac tccacctgg ccaagatc 108

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 50

Glu Phe Gly Ala Gly Leu Val Leu Gly Gly Gln Phe Met

1 5 10

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

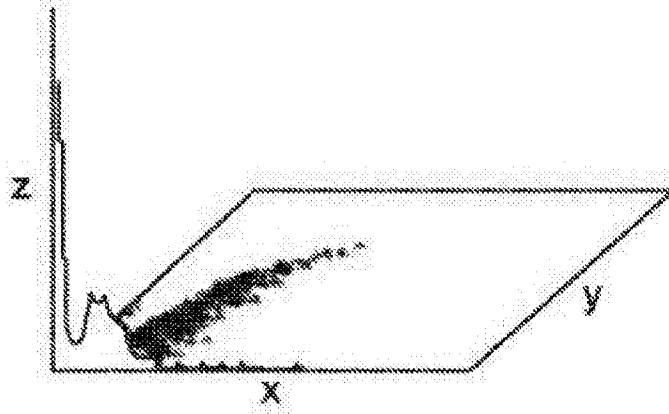


图1A

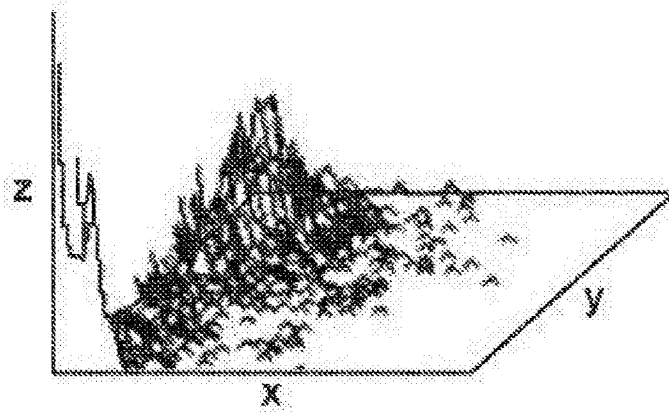


图1B

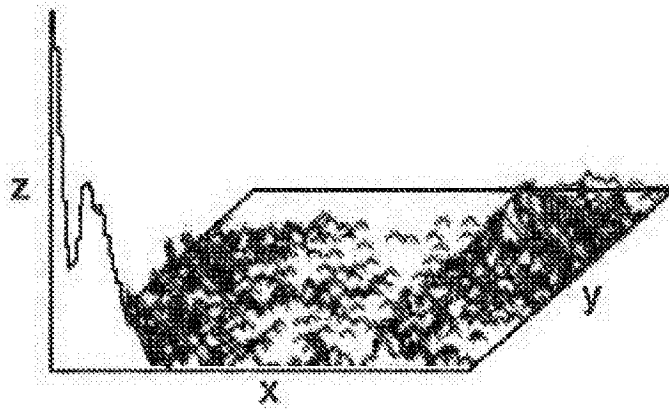


图1C

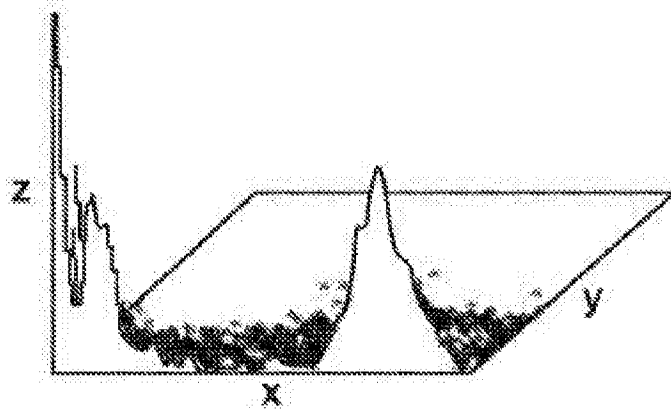


图1D

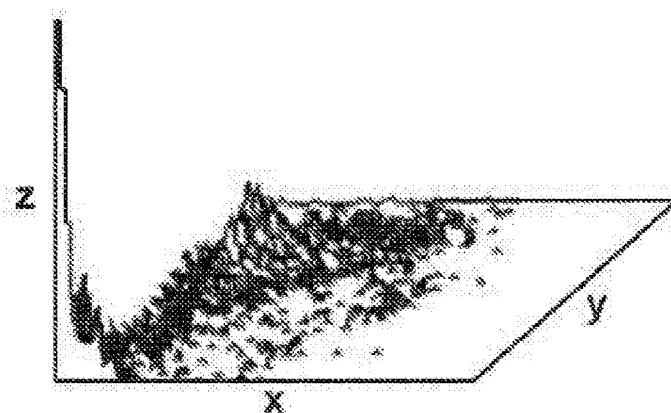


图1E

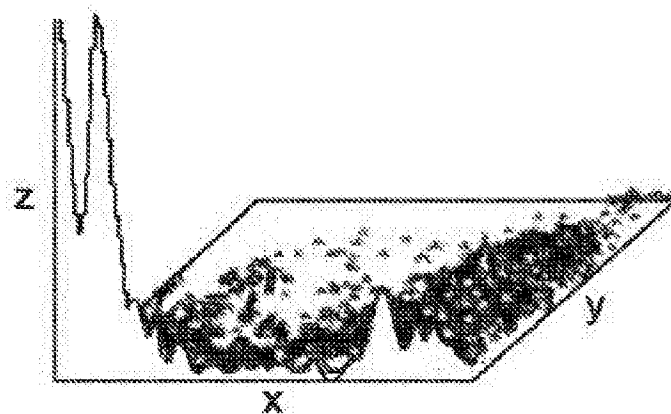


图1F



图2A



图2B

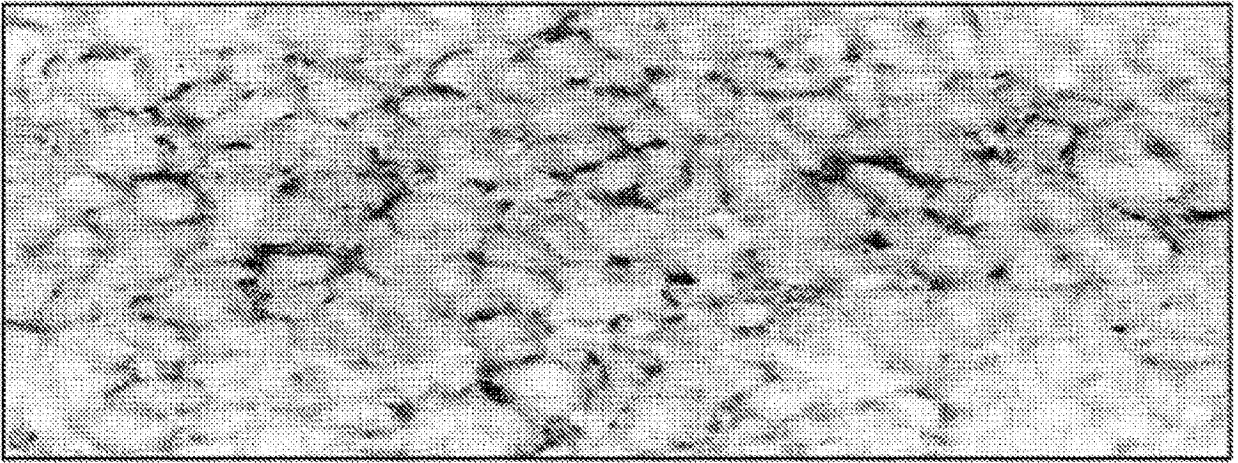


图3A

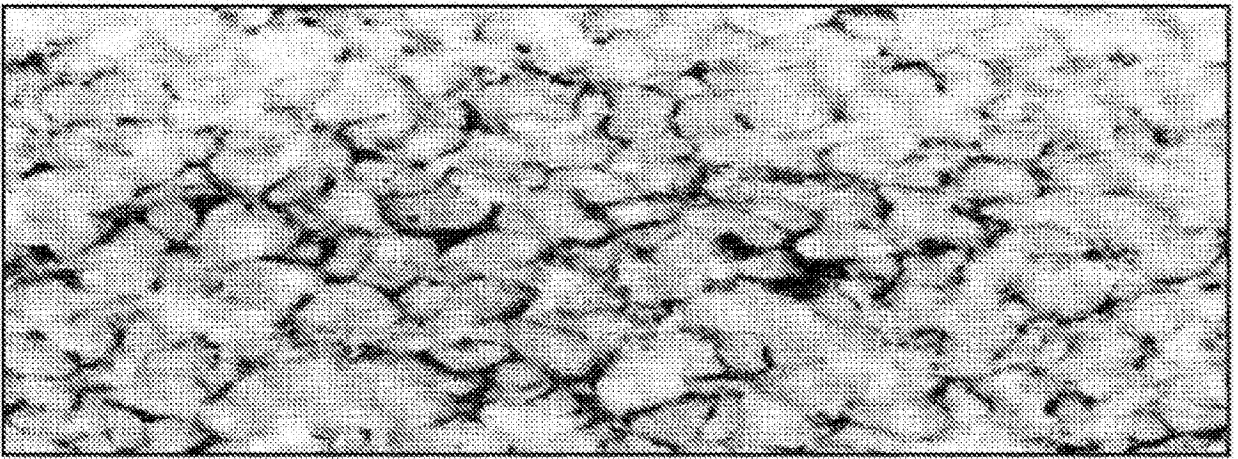


图3B

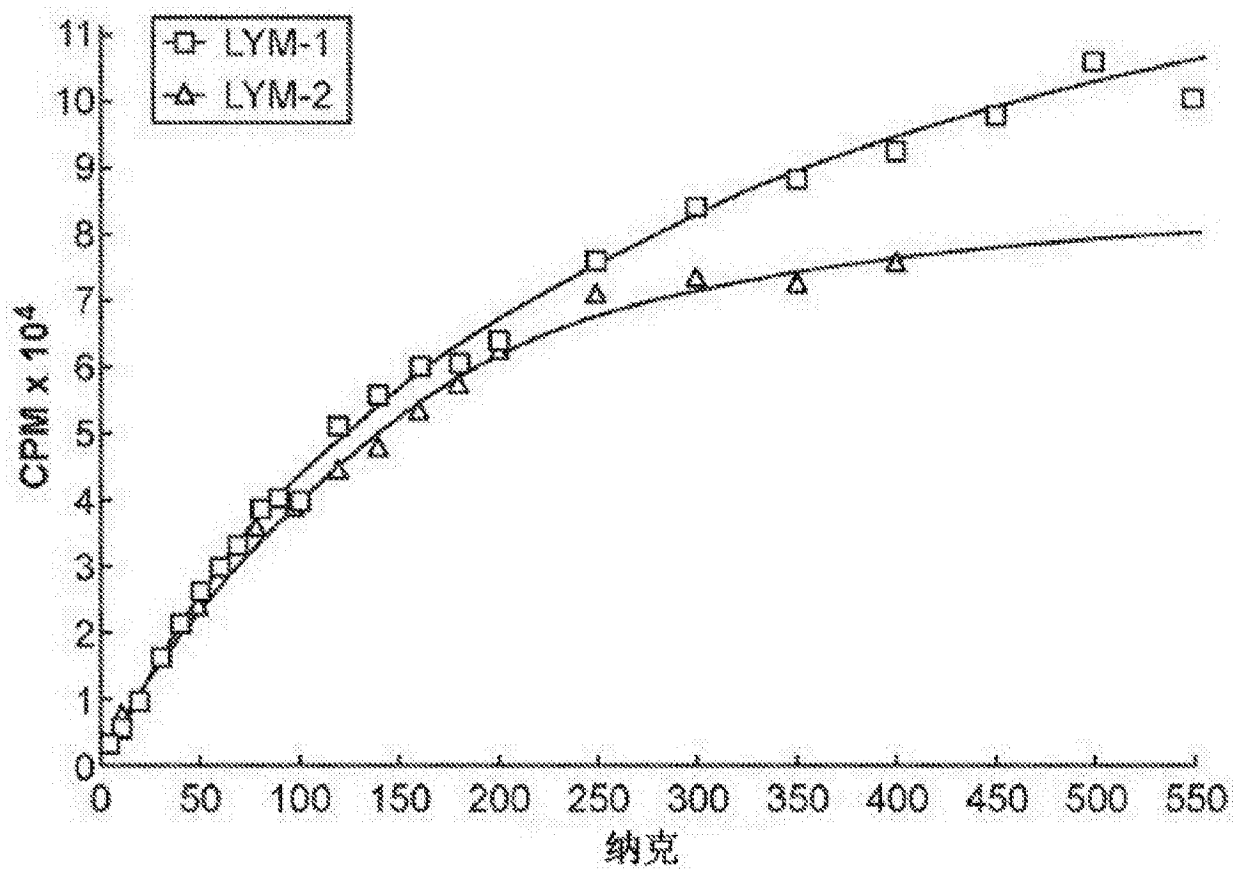


图4A

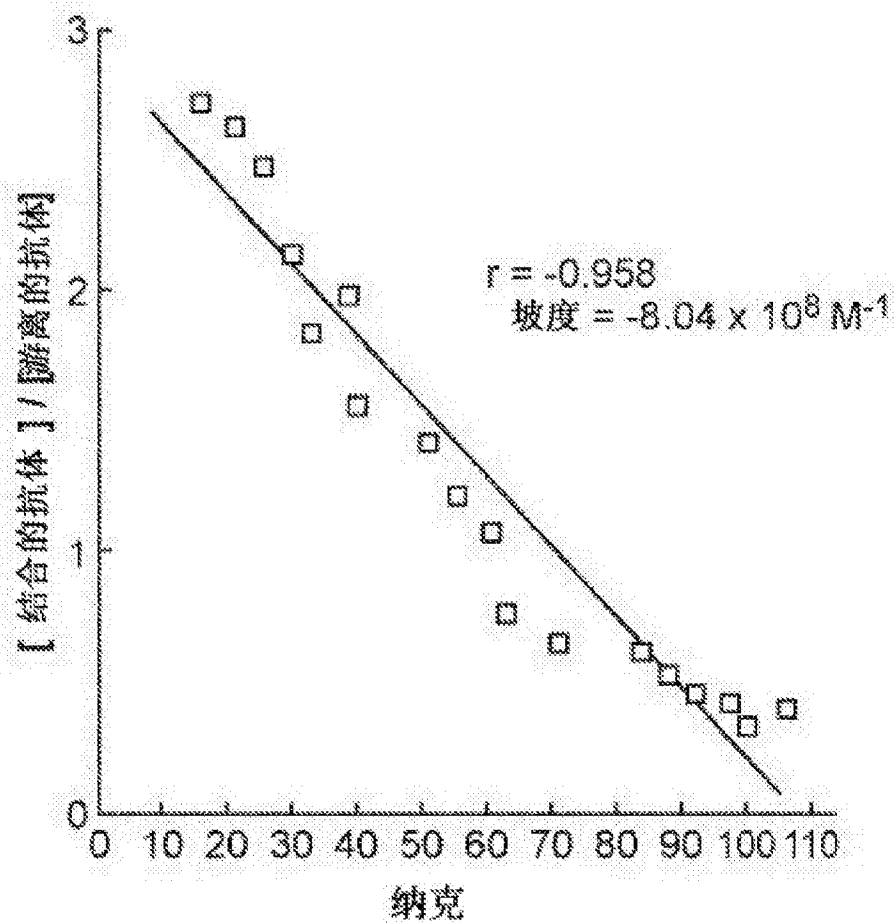


图4B

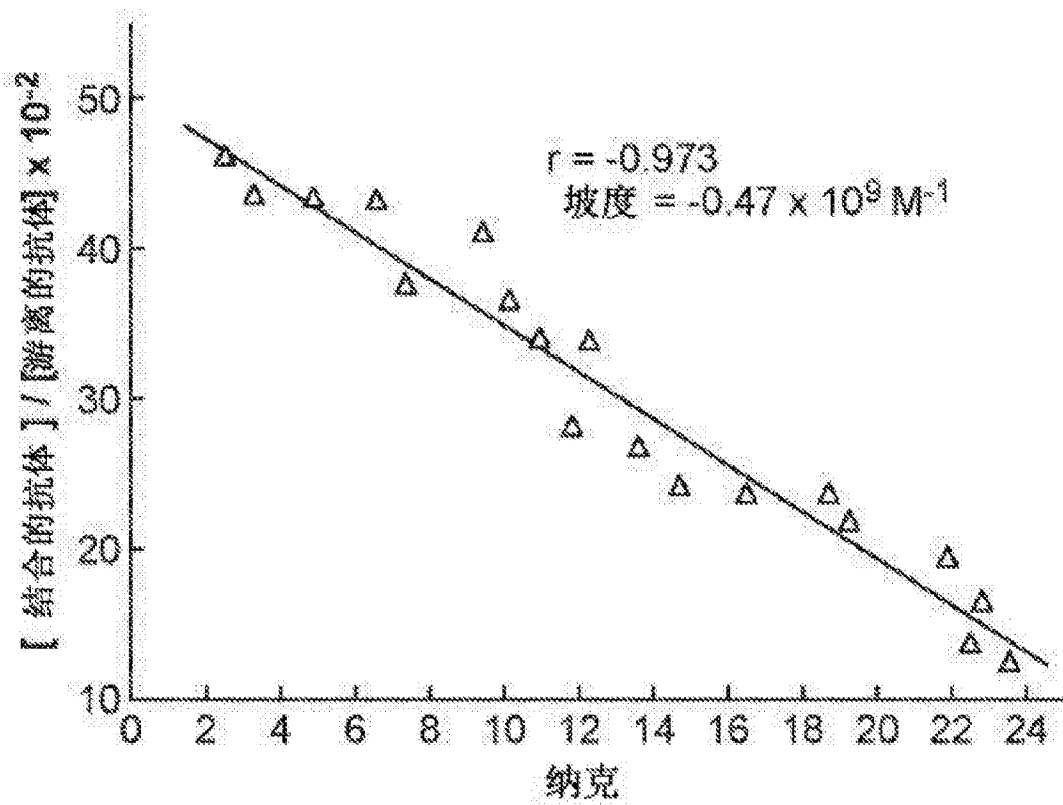


图4C

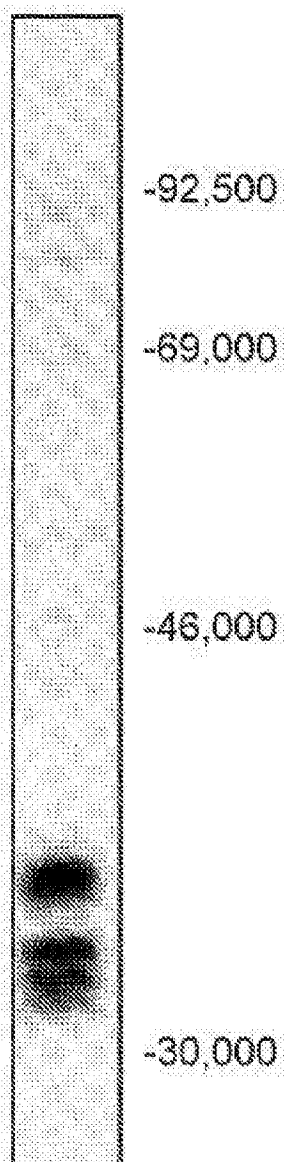


图5A

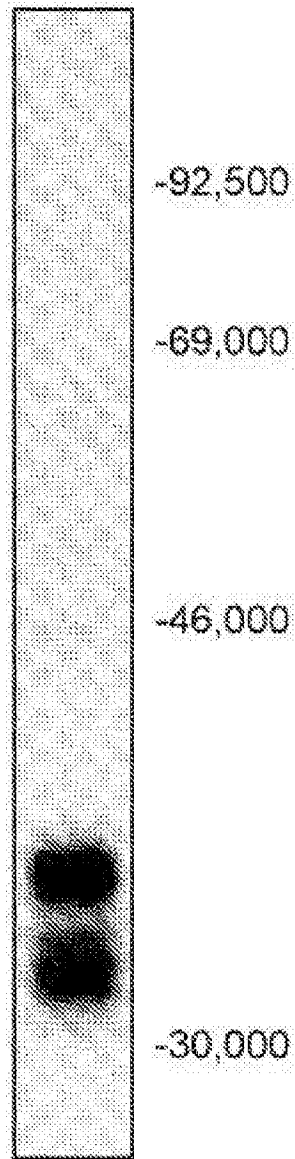


图5B

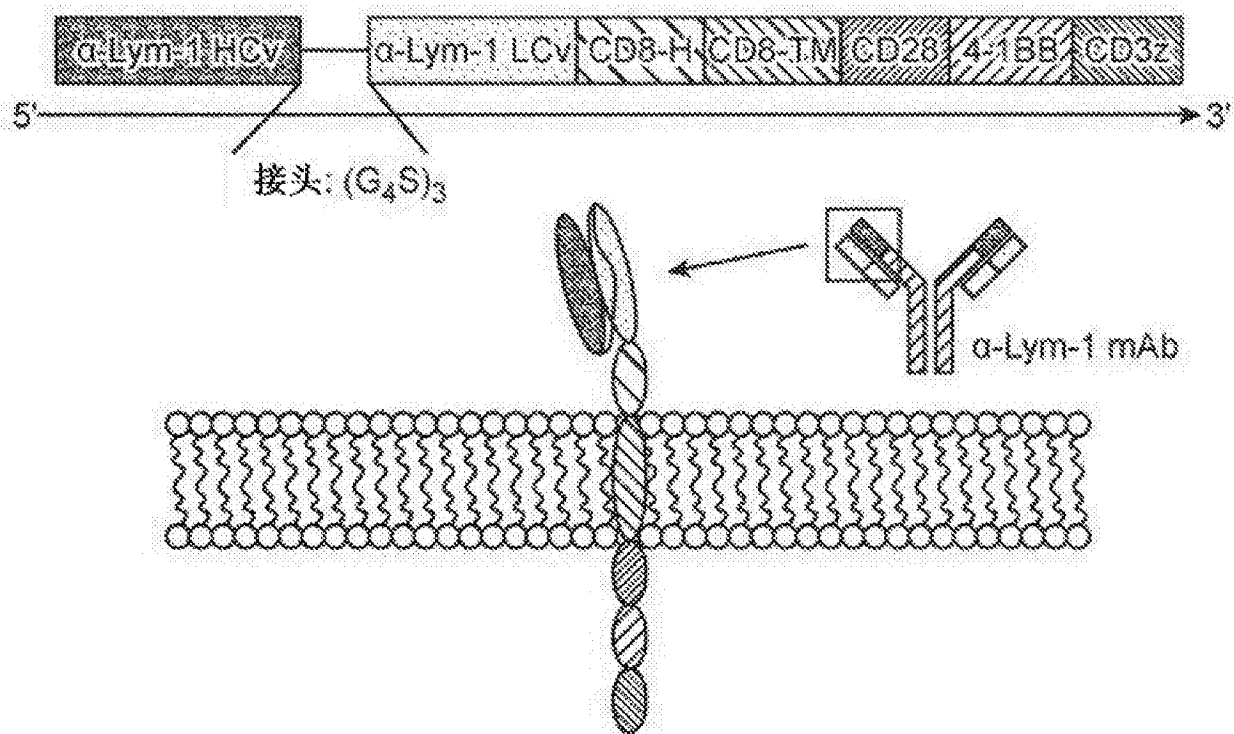


图6A

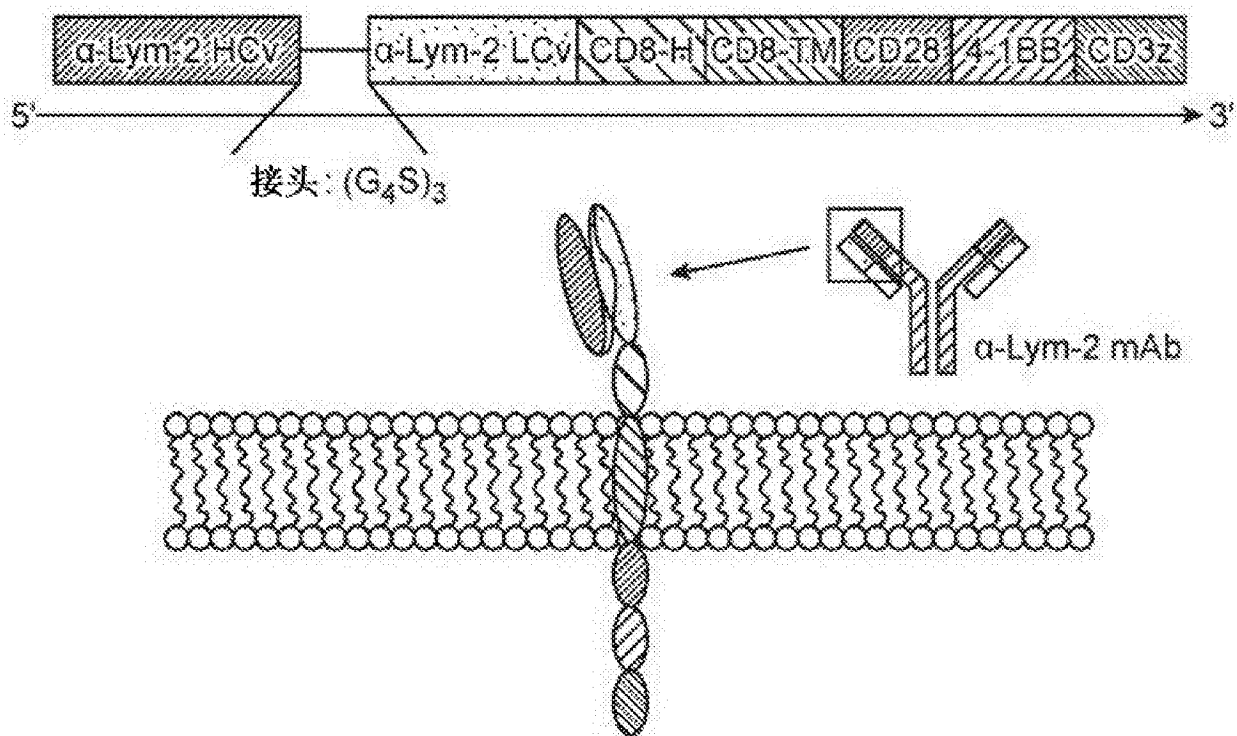


图6B

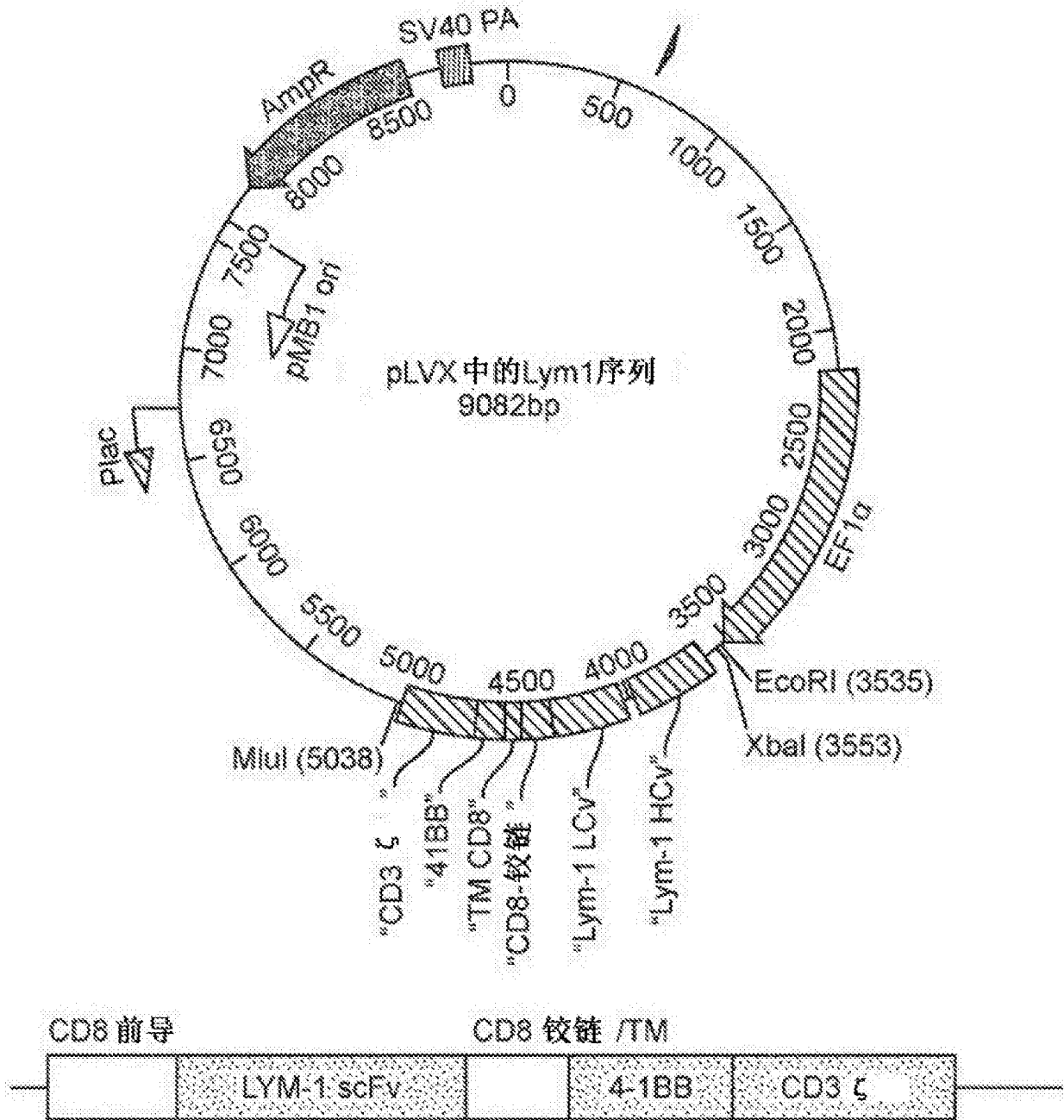


图7

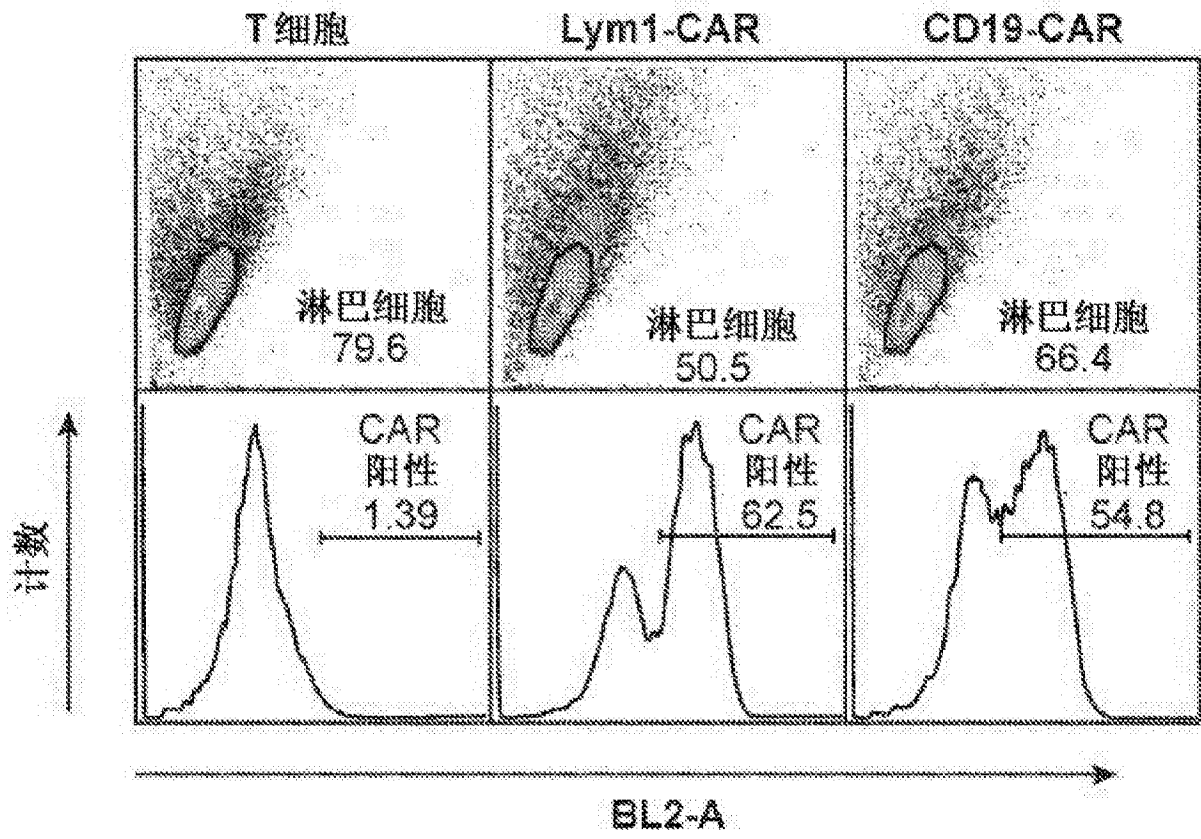


图8

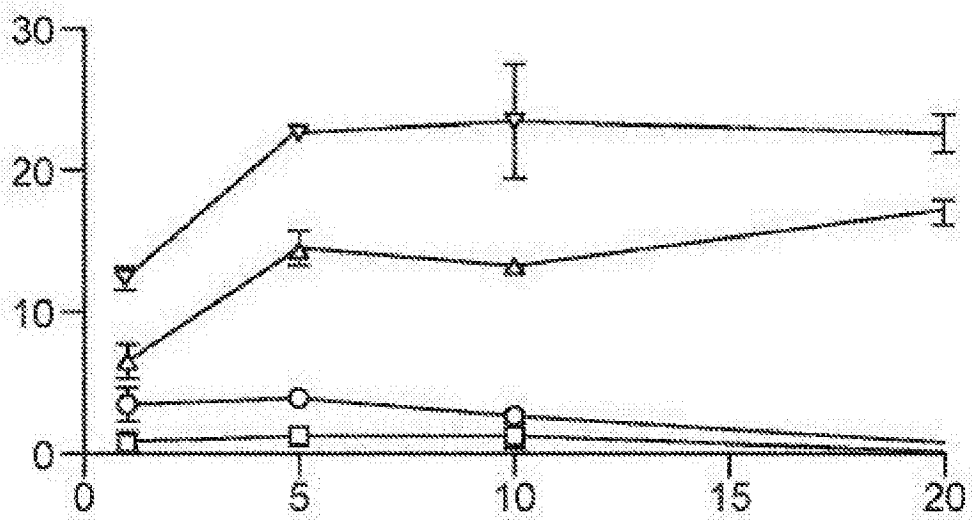


图9

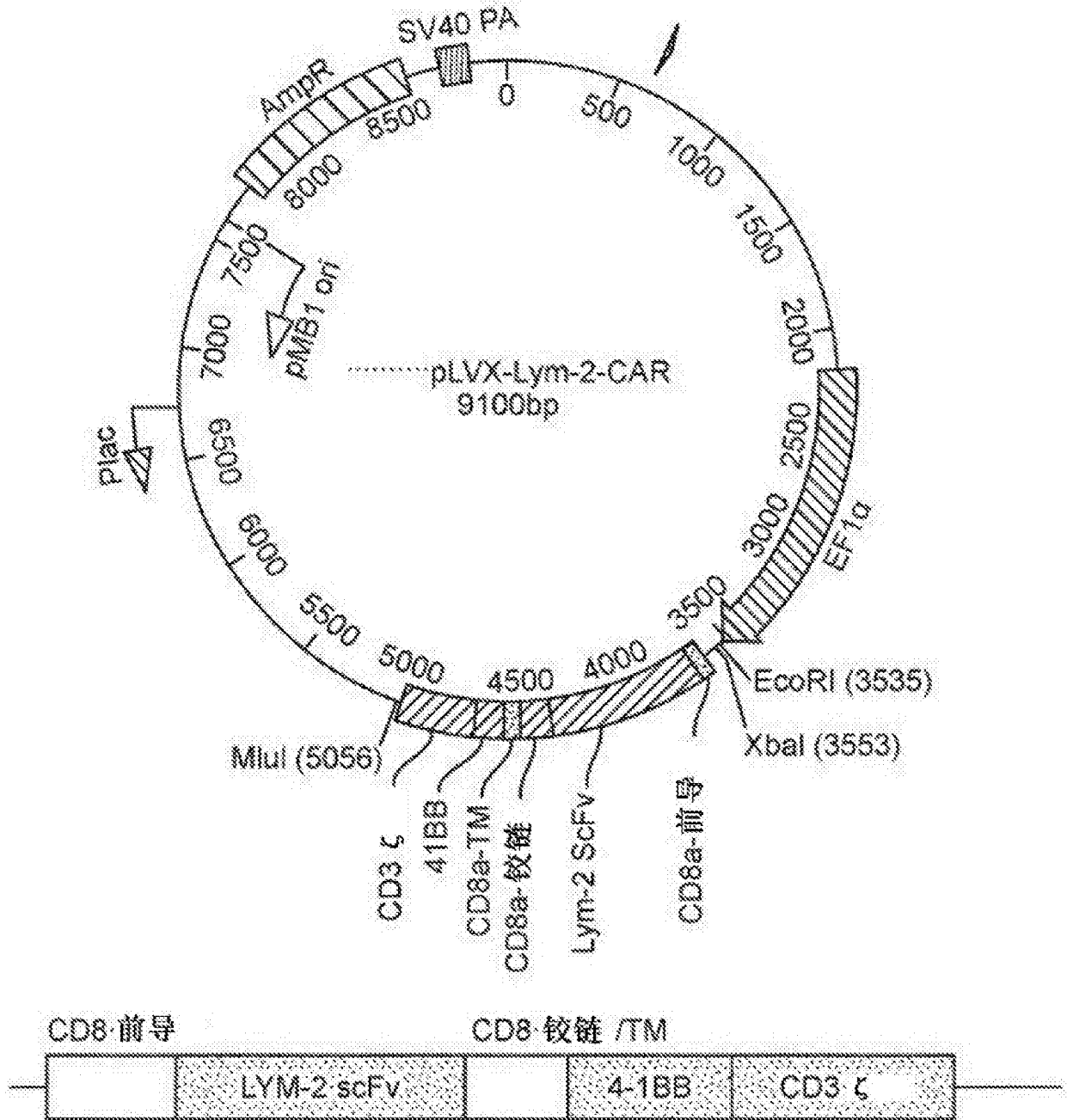


图10

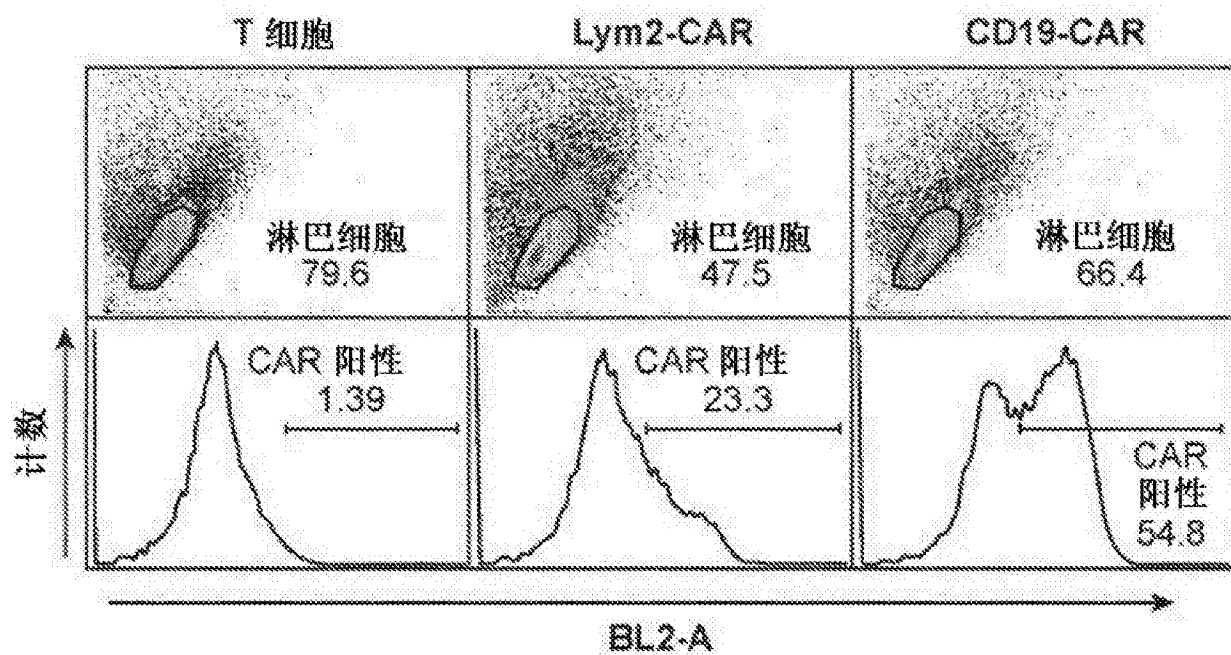


图11

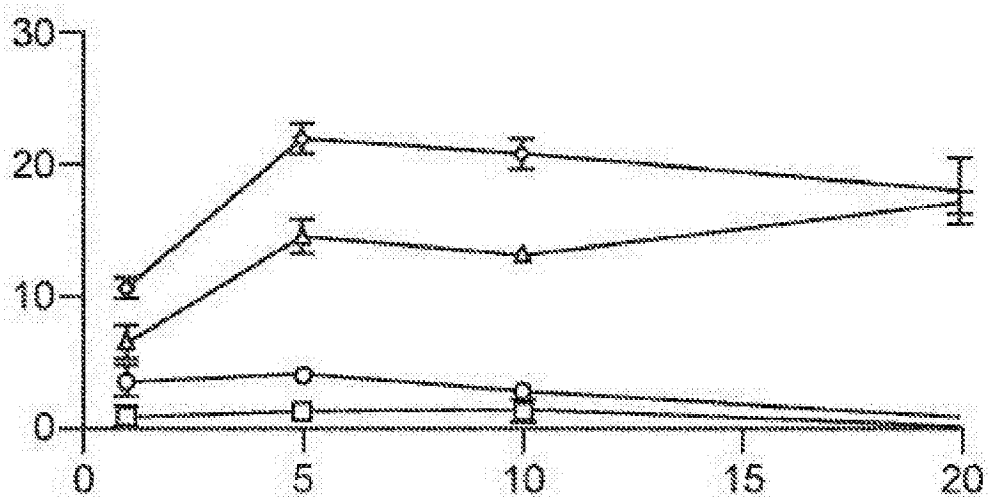


图12

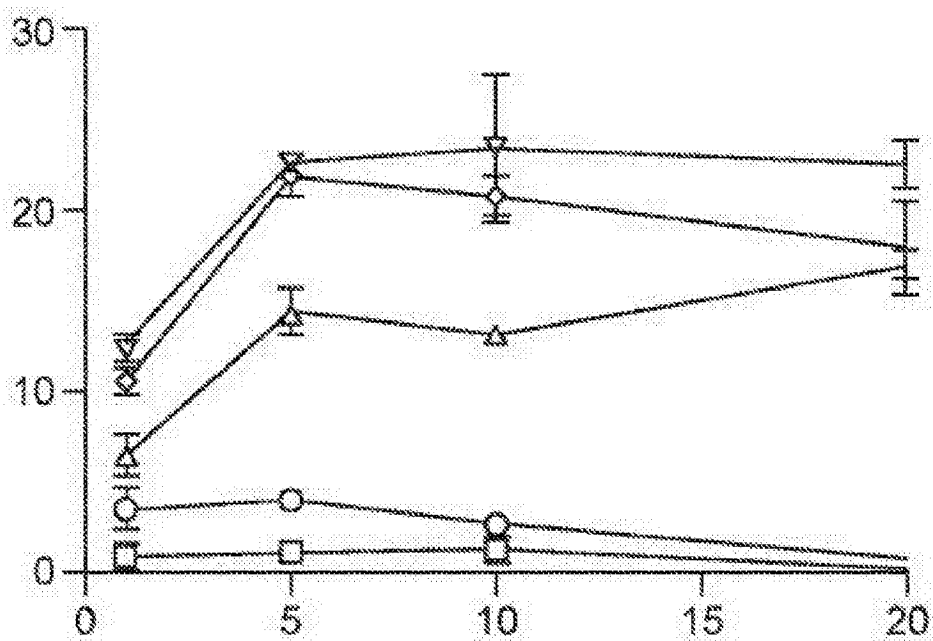


图13

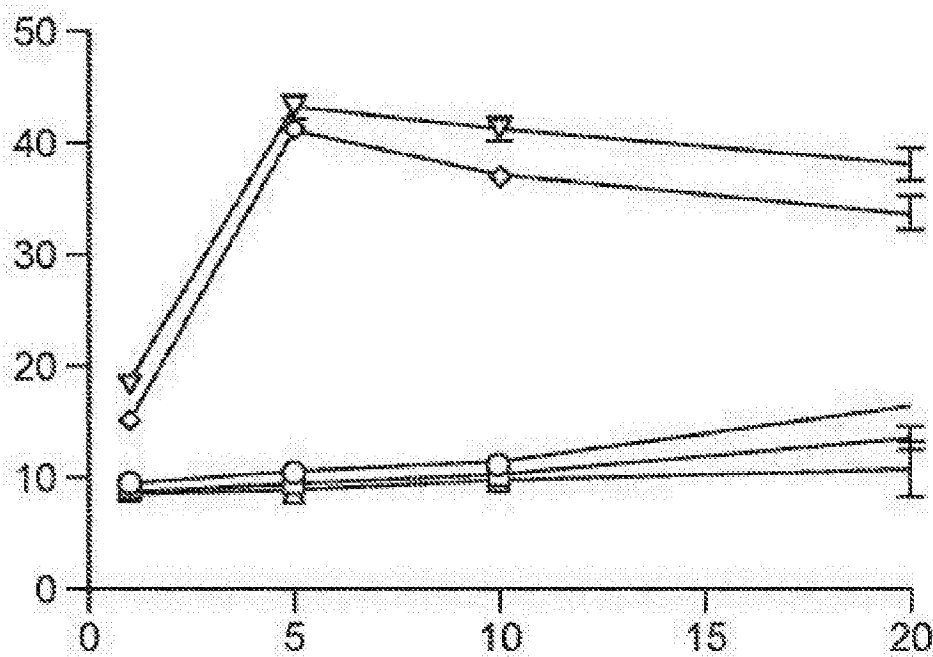


图14

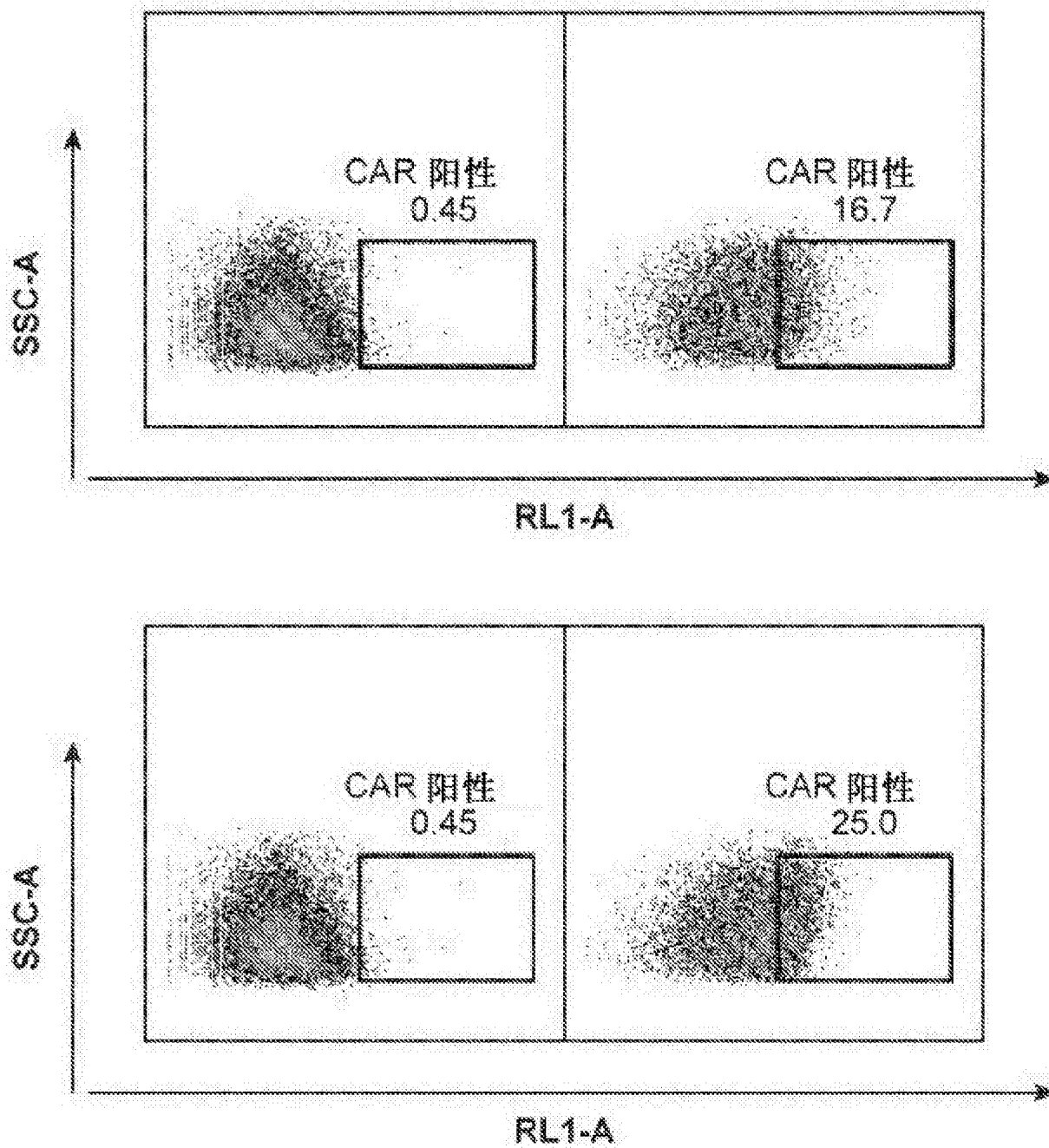


图15