



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111542545 A

(43)申请公布日 2020.08.14

(21)申请号 201880085146.7

(22)申请日 2018.11.02

(30)优先权数据

62/581,466 2017.11.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/058642 2018.11.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/087151 EN 2019.05.09

(71)申请人 索伦托治疗有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 张延良 周贺钺 Q·马

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 吴瑜 顾云峰

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书39页

序列表13页 附图6页

(54)发明名称

CD38定向嵌合抗原受体构建体

(57)摘要

本申请公开了涉及或衍生自抗CD38抗体的组合物和方法。更具体地,本申请公开了结合CD38的全人抗体、CD38抗体结合片段和该抗体的衍生物、以及包含该片段的CD38结合多肽。更进一步地,本申请公开了编码该抗体、抗体片段和衍生物以及多肽的核酸,包含该多核苷酸的细胞,制备该抗体、抗体片段和衍生物以及多肽的方法,以及使用该抗体、抗体片段和衍生物以及多肽的方法(包括治疗疾病的方法)。

1. 一种抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其包含:

i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;

ii) 跨膜结构域;和

iii) 胞内结构域。

2. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其还包含所述重链可变 (VH) 结构域和所述轻链可变 (VL) 结构域之间的肽接头,其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区。

5. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述跨膜结构域是包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。

7. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域和CD3- ζ 胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

9. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其表达抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含:

i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;

ii) 跨膜结构域;和

iii) 胞内结构域,

其中用与编码所述抗CD38 CAR构建体的核酸可操作地连接的表达载体转导所述宿主细胞或宿主细胞群,以及

其中所述表达载体指导所述抗CD38 CAR构建体在所述宿主细胞中的表达。

10. 一种宿主细胞或宿主细胞群,其表达抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含:

iv) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和

轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的 CDR,所述轻链可变 (VL) 结构域包含如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的CDR;

v) 跨膜结构域;和

vi) 胞内结构域,

其中用与编码所述抗CD38 CAR构建体的核酸可操作地连接的表达载体转导所述宿主细胞或宿主细胞群,以及

其中所述表达载体指导所述抗CD38嵌合CAR构建体在所述宿主细胞中的表达。

11. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述表达载体包含逆转录病毒或慢病毒表达载体。

12. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其选自下组:T宿主细胞(或其种群),胎盘来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)。

13. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述重链可变 (VH) 结构域和所述轻链可变 (VL) 结构域之间的肽接头,其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

14. 根据权利要求9所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

15. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区。

16. 根据权利要求9所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

17. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述跨膜结构域是包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。

18. 根据权利要求9或10所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域和CD3- ζ 胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

19. 根据权利要求9所述的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

20. 一种分离的核酸,其编码抗CD38 CAR构建体,其中所述抗CD38构建体包含

a. 胞外抗原结合蛋白,其包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;

b. 跨膜结构域;和

c. 胞内结构域。

21. 一种分离的核酸,其编码抗CD38 CAR构建体,其中所述抗CD38构建体包含

a. 胞外抗原结合蛋白,其包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的CDR,所述轻链可变 (VL) 结构域包

含如SEQ ID NO:的氨基酸序列所示的CDR;

- b. 跨膜结构域; 和
- c. 胞内结构域。

22. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述抗CD38 CAR构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头, 并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

23. 根据权利要求20所述的分离的核酸, 其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

24. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述抗CD38 CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区, 其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区。

25. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述抗CD38 CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域, 并且其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

26. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述跨膜结构域是包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。

27. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域和CD3-ζ胞内结构域, 所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列, 所述CD3-ζ胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

28. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

29. 根据权利要求20或21所述的分离的核酸, 其中所述胞外抗原结合蛋白是scFv。

30. 一种表达载体, 其包含根据权利要求20或21所述的核酸。

CD38定向嵌合抗原受体构建体

[0001] 本申请要求2017年11月3日提交的、且题目为“CD38定向CAR构建体”的美国临时申请62/581,466的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0002] 在整个本申请中,引用了各种出版物、专利和/或专利申请。出版物、专利和/或专利申请的公开内容在此通过引用整体并入本申请中,以便更全面地描述本公开所属领域的现有技术。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已经以ASCII形式电子提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2018年10月31日,命名为“T103019_1210W0_SL.txt”,大小为24,560字节。

技术领域

[0005] 本公开通过提供由scFv抗体介导的CAR(嵌合抗原受体)构建体,提供了进行CD38CAR转导时T细胞同族杀伤(fratricide)问题的解决方案,所述scFv抗体具有包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域和具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域。更具体地,本公开提供了一种CD38定向的CAR构建体,其通过优先结合CD38较高表达的肿瘤细胞且不靶向CD38较低表达的正常T细胞(包括CAR转导的T细胞)而显示出更高的安全性。

背景技术

[0006] 通过转基因T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)的基因转移已经在T细胞中产生了新的特异性。CAR是由单个融合分子中的与一个或多个信号传导结构域相连的靶向部分组成的合成受体。通常,CAR的结合部分由单链抗体(scFv)的抗原结合结构域组成,包含通过柔性接头连接的单克隆抗体的轻链和重链可变片段。第一代CAR的信号传导结构域衍生自CD3 ζ 的胞质区域或Fc受体 γ 链。第一代CAR已被证明可以成功地重新定向T细胞的细胞毒性,但是,它们无法在体内提供持久的扩增和抗肿瘤活性。已单独添加(第二代)或组合添加(第三代)来自包括CD28、OX-40(CD134)和4-1BB(CD137)的共刺激分子的信号传导结构域,以增强CAR修饰的T细胞的存活并使其增殖增加。CAR已成功地使T细胞重新定向于来自各种恶性肿瘤(包括淋巴瘤和实体瘤)的肿瘤细胞表面表达的抗原。

[0007] 目前使用过继(adoptive)免疫疗法的患者治疗方案是基于自体细胞转移。在这种方法中,从患者中回收T淋巴细胞,离体进行基因修饰或选择,然后在体外培养,以在必要时扩增细胞数量,并最终输注入患者体内。除淋巴细胞输注外,还可以通过其他方式(例如预调节(pre-conditioning)(采用放射或化学疗法)和施用淋巴细胞生长因子(例如IL-2))对宿主(患者)进行操作,所述其他方式支持T细胞的植入或它们参与免疫反应。每个患者使用患者自己的淋巴细胞(即自体疗法)来接受个性化制备的(fabricated)治疗。自体疗法在实际应用中面临着巨大的技术和后勤障碍,其产生需要昂贵的专用设施和专家人员,必须在患者诊断后的短时间内产生,并且在许多情况下,对患者的预处理(pretreatment)导致免

疫功能降低,因此患者的淋巴细胞功能可能不佳,并且数量很少。由于这些障碍,每位患者的自体细胞制剂实际上是一种新产品,导致功效和安全性的显著差异。

[0008] 对于表达CAR或转基因TCR的工程改造的T细胞,如果靶抗原由T细胞自身表达,则上靶脱肿瘤(on-target off-tumor)副作用也可包括“T细胞同族杀伤”。对于CD38 CAR-T,在体外培养过程中观察到了T细胞同族杀伤。使用阻断CAR-靶标相互作用的抗CD38抗体可在某种程度上缓解这种情况。但是,这种方法尚未在体内进行测试。仅在鼠模型中使用针对CD244的单克隆抗体对NK细胞显示了体内抗体介导的同族杀伤的阻断作用(Taniguchi等人,(2007)Blood 110,2020-2023)。

[0009] 对于表达转基因TCR的T细胞,如果使用对靶向的HLA型呈阴性的同种异体T细胞供体,则同族杀伤是可以避免的(Leisegang,M.,Wilde,S.,Spranger,S.,Milosevic,S.,Frankenberger,B.,Uckert,W.,和Schendel,D.J.(2010).MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing surviving-specific transgenic T cell receptors.The Journal of Clinical Investigation 120,3869-3877.Schendel,D.J.,和Frankenberger,B.(2013).Limitations for TCR gene therapy by MHC-restricted fratricide and TCR-mediated hematopoietic stem cell toxicity.Oncoimmunology 2,e22410.)。

[0010] CD38是具有长的C末端胞外结构域和短的N末端胞浆结构域的45kD II型跨膜糖蛋白。CD38蛋白是一种双功能胞外酶(ectoenzyme),其可以催化NAD⁺转化为环状ADP-核糖(cADPR),也可以将cADPR水解为ADP-核糖。在个体发育过程中,CD38出现在CD34⁺定型(CD34+committed)干细胞和谱系定型(lineage-committed)的淋巴细胞、红细胞和髓细胞的祖细胞上。CD38表达主要在淋巴谱系中持续存在,并且在T细胞和B细胞发育的不同阶段具有不同的表达水平。

[0011] CD38在许多造血系统恶性肿瘤和源自各种造血系统恶性肿瘤的细胞系中上调,包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、多发性骨髓瘤(MM)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B和T急性淋巴细胞白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性髓细胞白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性髓细胞白血病(CML)。另一方面,造血系统最原始的多能干细胞是CD38⁻。CD38在造血系统恶性肿瘤中的表达及其与疾病进展的相关性使CD38成为抗CD38抗体治疗的诱人靶标。

[0012] 多发性骨髓瘤(MM)是产生抗体的浆细胞的恶性肿瘤,并且是继淋巴瘤和白血病之后全世界第三最常见的血液学癌症(Ferlay等人,Int.J.Cancer 136(5):E359-386.2015)。2016年,在美国MM的新病例估计为30,330,死亡病例估计为12,650(Howlader等人,“SEER Cancer Statistics Review,1975-2013,National Cancer Institute.Bethesda,MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/,based on November 2015SEER data submission,posted to the SEER web site.”2016)。尽管在治疗MM上有重大进展,包括新型免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂和自体造血干细胞移植,但目前尚无治愈该疾病的方法,其五年生存率仅为45%(Kumar等人,Blood 111(5):2516-2520,2008;和Kharfan-Dabaja等人,J.Hematol.Oncol.6:2,2013)。开发新颖且有效的治疗选择对于MM患者来说仍然是迫切需求。提供本公开内容以解决该需求。

[0013] 如病毒和自身免疫疾病中所见,以及如罕见的癌症自发缓解中所见,T细胞几乎可

以穿透每个生物空间并具有处置正常或恶性细胞的能力。但是,T细胞很容易被自身或肿瘤抗原所耐受,并且“免疫监视”在所有临床上明显可见的癌症中均已明显失败。CAR-T研究的目标是通过识别抗体定义的抗恶性细胞标志物,为患者的T细胞提供特异性和亲和力,而不考虑其“内源性”T细胞受体(TCR)库,以基于恶性细胞表达CAR识别的抗原来杀死恶性细胞。

[0014] 已经探索了通过输注T细胞工程改造的CAR用于重定向的杀瘤活性的过继免疫疗法,来治疗转移性癌症。通过将抗体的抗原识别结构域与来自T细胞的受体的信号传导结构域连接来构建CAR。用CAR基因修饰T细胞使T细胞具有重新靶向的抗体型抗肿瘤细胞毒性。由于杀伤不受主要组织相容性复合物(MHC)的限制,因此该方法为所有携带相同抗原的患者提供了通用疗法。用抗原特异性CAR工程改造的T细胞称为“T细胞”、“CAR-T细胞”或“T体”(Eshar等人,1993Proc.Nat'l.Acad.of Sci.USA 90(2):720-724)。第一代CAR,免疫球蛋白-T细胞受体(IgTCR),被工程改造为含有仅传递激活刺激(信号1)的信号传导结构域(TCR-CD3 ζ)(Gross等人,1989Proc.Nat'l.Acad.of Sci.USA 86(24):10024-10028;Eshar等人,1993Proc.Nat'l.Acad.of Sci.USA 90(2):720-724;Haynes等人,2001The Journal of Immunology 166(1):182-187)。单独用第一代CAR移植的T细胞由于欠佳的激活而显示出有限的抗肿瘤功效。第二代CAR,免疫球蛋白CD28-CD3 ζ -T细胞受体(IgCD28TCR)将共刺激CD28(信号2)整合到第一代受体中,这使CAR-T细胞具有更强的抗肿瘤能力(Finney等人,1998Journal of Immunology 161(6):2791-2797;Hombach等人,2001Journal of Immunology 167(11):6123-6131;Maher等人,2002Nature Biotechnology 20(1):70-7;Emtage等人,2008 Clinical Cancer Research 14(24):8112-812;Lo等人,2010 Clinical Cancer Research 16(10):2769-2780)。

[0015] 发明概述

[0016] 本公开提供了一种包含抗CD38抗体的嵌合抗原受体(CAR)构建体,所述抗CD38抗体提供能够优先靶向CD38高表达的肿瘤细胞而避开CD38较低表达细胞的CD38结合动力学。更具体地,本公开提供了一种核酸序列,其编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体A2,其中所述CAR构建体包含具有重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域的scFv抗体,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列,所述轻链可变(VL)结构域具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。优选地,所述scFv抗体还包含所述VH和VL之间的肽接头,所述肽接头包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5。抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体可以具有包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的scFv抗体区域。优选地,所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,所述铰链区包含SEQ ID NO:6的CD8铰链区。优选地,所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的CD28胞外结构域。优选地,所述跨膜结构域是SEQ ID NO:8的CD28跨膜结构域。优选地,有两个信号传导结构域。更优选地,第一信号传导结构域是具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CD28信号传导结构域。更优选地,第二信号传导结构域是具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CD3- ζ 信号传导结构域。优选地,所述CAR构建体在N-末端还包含信号肽。

[0017] 在另一个具体的实施方案中,核酸序列编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体D8,其中所述CAR构建体包含具有重链可变(VH)结构域和轻链可变(VL)结构域的scFv抗体,所

述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%同源的氨基酸序列;跨膜结构域;和胞内信号传导结构域。优选地,所述scFv抗体还包含所述VH和VL之间的肽接头,所述肽接头包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:5。抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体可以具有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的scFv抗体区域。优选地,所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,所述铰链区包含SEQ ID NO:6的CD8铰链区。优选地,所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的CD28胞外结构域。优选地,所述跨膜结构域是SEQ ID NO:8的CD28跨膜结构域。优选地,有两个信号传导结构域。更优选地,第一信号传导结构域是具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CD28信号传导结构域。更优选地,第二信号传导结构域是具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CD3- ζ 信号传导结构域。优选地,所述CAR构建体在N-末端还包含信号肽。

[0018] 本公开还提供了一种编码抗CD38 CAR的核酸序列,所述抗CD38 CAR包含与CD38结合的单链抗体,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同或至少99%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同或至少99%相同的氨基酸序列;跨膜结构域;和胞内结构域。

[0019] 本公开还提供了一种编码抗CD38 CAR的核酸序列,所述抗CD38 CAR包含与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同或至少99%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同或至少99%相同的氨基酸序列;跨膜结构域;和胞内结构域。

[0020] 本公开还提供了通过向受试者施用表达本文所提供的抗CD38 CAR构建体的遗传工程改造的细胞来进行过继细胞疗法的方法。

[0021] 本公开还提供了一种治疗具有有害CD38表达相关的病症的人类受试者的方法。该方法包括,例如,向人类受试者施用表达本文所述的抗CD38 CAR的宿主细胞(或用编码本文所述的抗CD38 CAR的核酸序列转导的宿主细胞)。优选地,所述病症是癌症,包括但不限于血液学乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、膀胱癌、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、肝癌、肾癌、食道癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤。

[0022] 优选地,所述癌症是选自下组的血液学癌症:非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、伯基特淋巴瘤 (BL)、B慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL)、B和T急性淋巴细胞白血病 (ALL)、T细胞淋巴瘤 (TCL)、急性髓细胞白血病 (AML)、毛细胞白血病 (HCL)、霍奇金淋巴瘤 (HL) 和慢性髓细胞白血病 (CML)。最优选地,所述癌症是多发性骨髓瘤 (MM)。

[0023] 本公开提供了编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列,其中所编码的构建体包含:(i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变

(VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域; 和(iii) 胞内结构域。在一个实施方案中, 编码所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸是分离的核酸。

[0024] 本公开提供了编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列, 其中所编码的构建体包含: (i) 与CD38结合的抗原结合蛋白, 其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域, 所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列, 并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域, 所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域; 和(iii) 胞内结构域。在一个实施方案中, 编码所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸是分离的核酸。

[0025] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其还包含所述重链可变 (VH) 结构域和所述轻链可变 (VL) 结构域之间的肽接头, 其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0026] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0027] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区, 其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0028] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域, 其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0029] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域, 所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0030] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域, 所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中, 所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域, 所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中, 所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40 (CD134) 或4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中, 所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中, 所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中, 所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含CD3- ζ , 和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中, 所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0031] 本公开还提供了编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列, 所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中, 编码所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸是分离的核酸。

[0032] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所编码的构建体包含:(i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链链可变 (VL) 结构域,所述轻链链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述表达载体包含逆转录病毒或慢病毒表达载体。在一个实施方案中,所述表达载体是表达载体系统的一部分,所述表达载体系统具有用于宿主细胞转导和/或包装的一种或多种其他载体。

[0033] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所编码的构建体包含:(i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述表达载体包含逆转录病毒或慢病毒表达载体。在一个实施方案中,所述表达载体是表达载体系统的一部分,所述表达载体系统具有用于宿主细胞转导和/或包装的一种或多种其他载体。

[0034] 在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述表达载体包含衍生自逆转录病毒或慢病毒的核酸主链序列。在一个实施方案中,所述表达载体是病毒转导系统的一部分,所述病毒转导系统包括一种或多种包装载体和/或包膜载体,并且这些载体一起指导转基因在宿主细胞中的表达。

[0035] 本公开还提供了一种表达载体,其是第一代或第二代逆转录病毒表达载体系统的一部分。在一个实施方案中,第一代表达载体系统包含与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的逆转录病毒表达载体 (转移载体),携带逆转录病毒env序列的包膜载体和携带逆转录病毒gag和pol序列的包装载体。在一个实施方案中,第二代表达载体系统包含与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的表达载体,和在包装细胞系中稳定表达的逆转录病毒gag、pol和env序列。

[0036] 本公开还提供了一种表达载体,其是第一代、第二代或第三代慢病毒表达载体系统的一部分。在一个实施方案中,第一代表达载体系统包含与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的慢病毒表达载体 (转移载体),携带慢病毒env序列的包膜载体和携带gag、pol、tat和rev序列的慢病毒包装载体。在一个实施方案中,第二代表达载体系统包含与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的慢病毒表达载体,携带非慢病毒env序列 (异源env序列) 的包膜载体,和携带慢病毒gag、pol、tat和rev序列的包装载体。在一个实施方案中,第三代表达载体系统包含与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的并且从3' LTR中去除了慢病毒tat序列的慢病毒表达

载体,第一包装质粒(gag和pol),第二包装质粒(rev)和包膜质粒(携带异源env序列)。

[0037] 本公开还提供了表达载体和一种或多种包装载体,其可以指导将转基因瞬时导入宿主细胞或将转基因稳定地插入宿主细胞的基因组。所述表达载体和一种或多种包装载体可以指导转基因在宿主细胞中的转录和/或翻译。与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸可操作地连接的表达载体,与一种或多种包装载体一起,可以指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的产生,CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体可以展示在被转导的宿主细胞的表面上。

[0038] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述CAR构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0039] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0040] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0041] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述CAR构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0042] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0043] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40(CD134)或4-1BB(CD137)的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0044] 本公开还提供了与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接的表达载体,其中所述CAR构建体包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸是分离的核酸。

[0045] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,与呈现较低CD38表达的细胞相比,其优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0046] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其包含:(i)与CD38结合

的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体是分离的多肽。

[0047] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其包含:(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体是分离的多肽。

[0048] 本公开还提供了一种抗原结合蛋白,其还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0049] 本公开还提供了所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0050] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0051] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0052] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0053] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40(CD134)或4-1BB(CD137)的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0054] 本公开还提供了一种抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体是分离的多肽。

[0055] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含:(i)与CD38结合

的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)。在一个实施方案中,在被转导的宿主细胞或被转导的细胞群中,编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在所述宿主细胞或宿主细胞群中的表达。

[0056] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含:(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)。在一个实施方案中,在被转导的宿主细胞或被转导的细胞群中,编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在所述宿主细胞或宿主细胞群中的表达。

[0057] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0058] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0059] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0060] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0061] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0062] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含

SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3-ζ胞内结构域,所述CD3-ζ胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3-ζ、OX-40 (CD134) 或4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3-ζ、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3-ζ。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3-ζ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3-ζ和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0063] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的构建体包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0064] 本公开还提供了用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导的宿主细胞或宿主细胞群,其中所述核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 在宿主细胞中的表达。

[0065] 本公开还提供了表达所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的宿主细胞或宿主细胞群,其中在宿主细胞或群体中表达的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,与呈现较低CD38表达的细胞相比,优先结合呈现CD38高表达的细胞 (例如靶细胞)。

[0066] 本公开还提供了表达抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的宿主细胞或宿主细胞群,所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含: (i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,用表达载体转导所述宿主细胞或宿主细胞群,所述表达载体与编码所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在所述宿主细胞或宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述表达载体包含逆转录病毒或慢病毒表达载体。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组: T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群) 和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群)。

[0067] 本公开还提供了表达抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的宿主细胞或宿主细胞群,所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含: (i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,用表达载体转导所述宿主细胞或宿主细胞群,所述表达载体与编码所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在所述宿主细胞或宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述表达载体包含逆转录病毒或慢病毒表达载体。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组: T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞

(或其种群)和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)。

[0068] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞(或其种群)、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞(或其种群)。

[0069] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0070] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0071] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区。

[0072] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0073] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述跨膜结构域是包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。

[0074] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40 (CD134) 或4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0075] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含与SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0076] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞或宿主细胞群中,所述表达载体与编码本公开所述的任何抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体包含指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达的表达载体。在一个实施方案中,所述表达载体包含衍生自逆转录病毒或慢病毒的核酸主链序列。在一个实施方案中,所述表达载体是病毒转导系统的一部分,所述病毒转导系统包括一种或多种包装载体,并且所述表达载体和包装载体一起指导转基因在宿主细胞中的表达。所述表达载体和一种或多种包装载体可以指导将转基因瞬时导入宿主细胞或将转基因稳定地插入宿主细胞的基因组。所述表

达载体和一种或多种包装载体可以指导转基因在宿主细胞中的转录和/或翻译。与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的表达载体,与一种或多种包装载体一起,可以指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的产生,CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体可以展示在被转导的宿主细胞的表面上。

[0077] 本公开还提供了一种制备转导的宿主细胞或转导的细胞群的方法,所述方法包括:在合适的条件下用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的构建体包含 (i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的所述核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群) 和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群)。

[0078] 本公开还提供了一种制备转导的宿主细胞或转导的细胞群的方法,所述方法包括:在合适的条件下用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的构建体包含 (i) 与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变 (VH) 结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变 (VL) 结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域;和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中,编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的所述核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群) 和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群)。

[0079] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述重链可变 (VH) 结构域和所述轻链可变 (VL) 结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0080] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0081] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0082] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0083] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所述跨膜结

构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0084] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40 (CD134) 或4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0085] 本公开还提供了一种制备转导的宿主细胞或转导的细胞群的方法,所述方法包括:在合适的条件下用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导宿主细胞或宿主细胞群,其中所编码的构建体与SEQ ID NO:21或22的氨基酸序列至少95%相同。在一个实施方案中,编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的所述核酸序列与表达载体可操作地连接,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或细胞群中的表达。在一个实施方案中,所述宿主细胞或宿主细胞群选自下组:T宿主细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群) 和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞 (或其种群)。

[0086] 在一个实施方案中,在制备转导的宿主细胞或宿主细胞群的方法中,所述表达载体与编码本公开所述的任何抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体包含指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达的表达载体。在一个实施方案中,所述表达载体包含衍生自病毒家族逆转录病毒科 (Retroviridae) (包括逆转录病毒和慢病毒载体) 的核酸主链序列。在一个实施方案中,所述表达载体是病毒转导系统的一部分,所述病毒转导系统包括一种或多种包装载体,并且所述表达载体和包装载体一起指导转基因在宿主细胞中的表达。所述表达载体和一种或多种包装载体可以指导将转基因瞬时导入宿主细胞或将转基因稳定地插入宿主细胞的基因组。所述表达载体和一种或多种包装载体可以指导转基因在宿主细胞中的转录和/或翻译。与编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸可操作地连接的表达载体,与一种或多种包装载体一起,可以指导所述抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的产生,CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体可以展示在被转导的宿主细胞的表面上。

[0087] 本公开还提供了长期稳定培养宿主细胞群的方法,所述方法包括在适合于扩增携带所述核酸序列的宿主细胞数量的条件下,培养用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导的宿主细胞群,其中培养的宿主细胞在体外表现出降低的T细胞同族杀伤,并且其中与呈现较低CD38表达的细胞相比,所述宿主细胞优先结合并杀死呈现CD38高表达的细胞。

[0088] 本公开还提供了培养宿主细胞群的方法,所述方法包括:在适合于扩增携带所述核酸序列的宿主细胞数量的条件下,培养用编码抗CD38嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸

序列转导的宿主细胞群,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。

[0089] 本公开还提供了培养宿主细胞群的方法,所述方法包括:在适合于扩增携带所述核酸序列的宿主细胞数量的条件下,培养用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞群,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。

[0090] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0091] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0092] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0093] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0094] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0095] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40(CD134)或4-1BB(CD137)的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0096] 本公开还提供了培养宿主细胞群的方法,所述方法包括:在适合于扩增携带所述核酸序列的宿主细胞数量的条件下,培养用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导的宿主细胞群,其中所编码的构建体与SEQ ID NO:21或22的氨基酸序列至少95%

相同。

[0097] 在一个实施方案中,在培养宿主细胞群的方法中,所述宿主细胞群选自下组:宿主T细胞群、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞群和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞群。在一个实施方案中,编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述核酸序列与表达载体可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在所述宿主细胞群中的表达。

[0098] 本公开还提供了表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法,所述方法包括:使宿主细胞群处于适合于表达所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的条件,其中用表达载体转导所述宿主细胞群,所述表达载体包含编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述表达载体与编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接,其中所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞群优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0099] 本公开还提供了表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法,所述方法包括:使宿主细胞群处于适合于表达所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的条件,其中用表达载体转导所述宿主细胞群,所述表达载体包含编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述表达载体与编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接,其中所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在宿主细胞群中的表达。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞群优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0100] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0101] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0102] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0103] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0104] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0105] 在一个实施方案中,在表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40(CD134)或4-1BB(CD137)的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0106] 本公开还提供了表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法,所述方法包括:使宿主细胞群处于适合于表达所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的条件,其中用包含编码所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列的表达载体转导所述宿主细胞群,其中所编码的构建体与SEQ ID NO:21或22的氨基酸序列至少95%相同。

[0107] 在一个实施方案中,在于宿主细胞群中表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所述宿主细胞群选自下组:宿主T细胞群、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞群和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞群。在一个实施方案中,编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述核酸序列与表达载体可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在所述宿主细胞群中的表达。

[0108] 在一个实施方案中,在于宿主细胞群中表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的方法中,所述表达载体与编码本公开所述的任何抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列可操作地连接。在一个实施方案中,所述表达载体包含指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体在宿主细胞或宿主细胞群中的表达的表达式载体。在一个实施方案中,所述表达式载体包含衍生自病毒家族逆转录病毒科(Retroviridae)(包括逆转录病毒和慢病毒载体)的核酸主链序列。在一个实施方案中,所述表达式载体是病毒转导系统的一部分,所述病毒转导系统包括一种或多种包装载体,并且所述表达式载体和包装载体一起指导转基因在宿主细胞中的表达。所述表达式载体和一种或多种包装载体可以指导将转基因瞬时导入宿主细胞或将转基因稳定地插入宿主细胞的基因组。所述表达式载体和一种或多种包装载体可以指导转基因在宿主细胞中的转录和/或翻译。与编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸可操作地连接的表达式载体,与一种或多种包装载体一起,可以指导所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的产生,CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体可以展示在被转导的宿主细胞的表面上。

[0109] 本公开还提供了诱导细胞因子释放的方法,所述方法包括:在适于诱导细胞因子释放的条件下,使表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞群与表达CD38的靶细胞接触,其中所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述细胞因子包含干扰素- γ 或IL-2。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述宿主细胞优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0110] 本公开还提供了诱导细胞因子释放的方法,所述方法包括:在适于诱导细胞因子释放的条件下,使表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的宿主细胞群与表达CD38的靶细胞接触,其中所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,所述细胞因子包含干扰素- γ 或IL-2。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述宿主细胞优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0111] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0112] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0113] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0114] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0115] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其功能部分。

[0116] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40(CD134)或4-1BB(CD137)的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞

内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0117] 本公开还提供了诱导细胞因子释放的方法,所述方法包括:在适于诱导细胞因子释放的条件下,使表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的T宿主细胞群与表达CD38的靶细胞接触,其中所述抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体与SEQ ID NO:21或22的氨基酸序列至少95%相同。在一个实施方案中,所述细胞因子包含干扰素- γ 或IL-2。

[0118] 在一个实施方案中,在诱导细胞因子释放的方法中,所述宿主细胞群选自下组:宿主T细胞群、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞群和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞群。

[0119] 本公开还提供了诱导T细胞细胞毒性的方法,所述方法包括:在适于诱导靶细胞杀伤的条件下,使表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的T宿主细胞群与表达CD38的靶细胞接触,其中用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导所述T宿主细胞群,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述宿主细胞群优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0120] 本公开还提供了诱导T细胞细胞毒性的方法,所述方法包括:在适于诱导靶细胞杀伤的条件下,使表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的T宿主细胞群与表达CD38的靶细胞接触,其中用编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列转导所述T宿主细胞群,其中所编码的构建体包含(i)与CD38结合的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且所述与CD38结合的抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内结构域。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述宿主细胞群优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶细胞)。

[0121] 在一个实施方案中,在诱导T细胞细胞毒性的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0122] 在一个实施方案中,在诱导T细胞细胞毒性的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0123] 在一个实施方案中,在诱导T细胞细胞毒性的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受

体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区, 其中所述铰链区是包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 CD8 铰链区或其功能部分。

[0124] 在一个实施方案中, 在诱导 T 细胞细胞毒性的方法中, 所编码的抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的 CD28 胞外结构域, 其中所述 CD28 胞外结构域包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或其功能部分。

[0125] 在一个实施方案中, 在诱导 T 细胞细胞毒性的方法中, 所述跨膜结构域包含 CD28 跨膜结构域, 所述 CD28 跨膜结构域包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列或其功能部分。

[0126] 在一个实施方案中, 在诱导 T 细胞细胞毒性的方法中, 所述胞内结构域包含 CD28 胞内结构域, 所述 CD28 胞内结构域包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列。在一个实施方案中, 所述胞内结构域还包含 CD3- ζ 胞内结构域, 所述 CD3- ζ 胞内结构域包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。在一个实施方案中, 所述胞内结构域还包含来自 CD28、CD3- ζ 、OX-40 (CD134) 或 4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中, 所述胞内结构域包含 CD28 胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40 和/或 4-1BB 的任何一种或任何组合。在一个实施方案中, 所述核酸编码第一代抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含 CD3- ζ 。在一个实施方案中, 所述核酸编码第二代抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含 CD3- ζ , 和 CD28 胞内结构域或 4-1BB。在一个实施方案中, 所述核酸编码第三代抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体, 其中所述胞内结构域包含 CD3- ζ 和 CD28 胞内结构域、以及 4-1BB 或 OX-40。

[0127] 本公开还提供了诱导 T 细胞细胞毒性的方法, 所述方法包括: 在适于诱导靶细胞杀伤的条件下, 使表达抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的 T 宿主细胞群与表达 CD38 的靶细胞接触, 其中用编码抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的核酸序列转导所述 T 宿主细胞群, 其中所编码的构建体与 SEQ ID NO:21 或 22 的氨基酸序列至少 95% 相同。

[0128] 在一个实施方案中, 在诱导 T 细胞细胞毒性的方法中, 所述靶细胞包含表达 CD38 的癌症靶细胞。

[0129] 本公开还提供了在需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用表达抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的 T 宿主细胞群, 其中所述构建体包含 (i) 与 CD38 结合的抗原结合蛋白, 其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域, 所述重链可变 (VH) 结构域包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列, 并且所述与 CD38 结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域, 所述轻链可变 (VL) 结构域包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构域; 和 (iii) 胞内结构域。在一个实施方案中, 所述受试者中的癌症或肿瘤生长呈现上调的 CD38 表达。在一个实施方案中, 与呈现较低 CD38 表达的细胞相比, 表达抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的所述 T 宿主细胞群优先结合呈现 CD38 高表达的细胞 (例如靶肿瘤细胞)。

[0130] 本公开还提供了在需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用表达抗 CD38 嵌合抗原受体 (CAR) 构建体的 T 宿主细胞群, 其中所述构建体包含 (i) 与 CD38 结合的抗原结合蛋白, 其中所述抗原结合蛋白包含重链可变 (VH) 结构域, 所述重链可变 (VH) 结构域包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列, 并且所述与 CD38 结合的抗原结合蛋白包含轻链可变 (VL) 结构域, 所述轻链可变 (VL) 结构域包含与 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列; (ii) 跨膜结构

域;和(iii)胞内结构域。在一实施方案中,所述受试者中的癌症或肿瘤生长呈现上调的CD38表达。在一个实施方案中,与呈现较低CD38表达的细胞相比,表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的所述宿主细胞群优先结合呈现CD38高表达的细胞(例如靶肿瘤细胞)。

[0131] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述重链可变(VH)结构域和所述轻链可变(VL)结构域之间的肽接头,并且其中所述肽接头包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0132] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体包含抗原结合蛋白,所述抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:12或16的氨基酸序列。

[0133] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的铰链区,其中所述铰链区是包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CD8铰链区或其功能部分。

[0134] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所编码的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体还包含所述抗原结合蛋白和所述跨膜结构域之间的CD28胞外结构域,其中所述CD28胞外结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其功能部分。

[0135] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域,所述CD28跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或其功能部分。

[0136] 在一个实施方案中,在于需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域,所述CD28胞内结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含CD3- ζ 胞内结构域,所述CD3- ζ 胞内结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述胞内结构域还包含来自CD28、CD3- ζ 、OX-40 (CD134) 或4-1BB (CD137) 的胞内结构域或共刺激结构域的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述胞内结构域包含CD28胞内结构域、CD3- ζ 、OX-40和/或4-1BB的任何一种或任何组合。在一个实施方案中,所述核酸编码第一代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 。在一个实施方案中,所述核酸编码第二代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ ,和CD28胞内结构域或4-1BB。在一个实施方案中,所述核酸编码第三代抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,其中所述胞内结构域包含CD3- ζ 和CD28胞内结构域、以及4-1BB或OX-40。

[0137] 本公开还提供了在需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括:向所述受试者施用表达抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的T宿主细胞群,其中所述构建体与SEQ ID NO:21或22的氨基酸序列至少95%相同。

[0138] 在一个实施方案中,在于受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法中,所述需要治疗的受试者具有CD38过表达或有害表达相关的病症。

[0139] 本公开还提供了在需要治疗的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,其中所述癌症包括血液学癌症,所述血液学癌症选自下组:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B和T急性淋巴细胞白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、

急性髓细胞白血病 (AML)、毛细胞白血病 (HCL)、霍奇金淋巴瘤 (HL) 和慢性髓细胞白血病 (CML)。

附图说明

[0140] 图1是本文公开的“抗CD38 A2 CAR”和逆转录病毒载体的结构。

[0141] 图1A是抗CD38 A2 CAR的示意图。

[0142] 图1B是表达抗CD38 A2 CAR的逆转录病毒载体的示意图。通过将抗CD38抗体克隆A2的scFv与CD28跨膜结构域 (TMD) 和胞内信号传导结构域以及CD3 ζ 胞内信号传导结构域连接,并使用衍生自CD8 α 铰链部分的介入间隔区,来创建抗CD38 A2 CAR。将来自人抗体重链的信号肽和用于识别CAR表达的myc标签添加到N末端。

[0143] 图2A显示了未转导的对照T细胞和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞的数据,所述细胞是在转导后通过流式细胞术进行分析。数据证实转导的T细胞表达抗CD38 A2构建体。

[0144] 图2B是蛋白质印迹 (Western blot),其显示了CAR-T细胞中CAR2-抗CD38A2 CAR的同源二聚体的形成。使用CD3 ζ 抗体,通过蛋白质印迹检测非还原和还原条件下的未转导的对照和CAR2-抗CD38A2 CAR转导的活化T细胞的膜部分。CAR和TCR ζ 的单体和二聚体的位置显示在右侧。分子量标记 (kDa) 显示在左侧。在还原条件下,CAR2-抗CD38A2 CAR被检测为分子量 \sim 70kDa的单体,在非还原条件下,其被检测为分子量140kDa的同源二聚体。这些结果表明CAR2-抗CD38A2 CAR在CAR-T细胞表面上形成同源二聚体。

[0145] 图3显示了结合数据。将未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞与2 μ g/ml CD38-Fc融合蛋白一起孵育,并通过流式细胞术进行分析 (用PE-缀合的山羊抗人IgG检测CD38-Fc结合,并且用FITC-缀合的山羊抗-Myc抗体检测T细胞上CAR的表达)。这些数据证明抗CD38 A2 CAR T细胞可以与其靶向的抗原CD38结合。

[0146] 图4显示了在各种细胞类型上的相对CD38表达。通过流式细胞术 (用小鼠抗人CD38 mAb染色,然后用APC-缀合的山羊抗小鼠IgG抗体染色) 分析了未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞。评估抗CD38 CAR-T细胞上的CD38表达以研究抗CD38 A2 CAR-T的同族杀伤活性 (如图5所示)。

[0147] 图5显示了培养的抗CD38 A2 CAR转导的T细胞的稳定性和活力 (viability) 数据,这表明抗CD38 A2 CAR转导的T细胞的同族杀伤性降低。在转导后的第15天,通过流式细胞术分析未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞 (通过用PE-缀合的抗myc抗体染色分析 (A) CAR-T细胞的稳定性,且通过用前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 对活细胞进行门控来分析 (B) T细胞的活力)。

[0148] 图5A显示了培养15天后未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞的稳定性,其中转导的T细胞中CAR阳性细胞的百分比仅从转导后第4天的74% (图5A) 略微下降至第15天的65%。

[0149] 图5B显示了转导的T细胞的活力 (85%) 与对照T细胞 (91%) 相当。从其他供体获得了类似的结果。

[0150] 图6显示了由抗CD38 CAR A2转导的T细胞产生的细胞因子。未转导的对照T细胞和抗CD38 CAR A2转导的T细胞与对照CD38-阴性K562细胞 (对照T) 或与表达CD38的RPMI 8226肿瘤细胞 (CAR-T) 孵育24小时。直方图中描绘的柱形代表 (从左到右) 无肿瘤细胞、K562或

RPMI 8226细胞。收集上清液并通过ELISA测定IFN γ (图6, 左) 和IL2 (图6, 右) 的产生。一旦与它们靶向的CD38-阳性MM肿瘤细胞RPMI8622而非与CD38-阴性对照肿瘤细胞K562结合后, 抗CD38 A2 CAR-T细胞产生了大量的细胞因子IFN γ 和IL2, 这表明抗CD38 A2 CAR-T细胞可在靶向的肿瘤细胞结合后被特异性激活。

[0151] 图7显示了来自抗CD38 CAR A2转导的T细胞的细胞毒性数据。将未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞 (E) 与荧光增强配体标记的CD38-阴性K562 (图7, 左) 或表达CD38的RPMI8226 (图7, 右) 肿瘤细胞 (T) 以指示的比例孵育2小时, 并进行处理且通过DELTA细胞毒性试验进行分析。这些数据显示了所公开的抗CD38 A2 CAR-T细胞的CD38特异性细胞毒性。

[0152] 图8显示了在异种移植动物模型中评估的抗CD38 A2 CAR-T细胞的杀肿瘤活性。对免疫受损的NSG小鼠静脉内接种 1×10^7 Luc-GFP标记的表达CD38的RPMI8226 MM肿瘤细胞。3周后, 在所有接种的小鼠中形成了IVIS可测量的全身性 (systemic) 肿瘤。用不同剂量的抗CD38 A2 CAR-T细胞静脉内治疗小鼠, 未经治疗的小鼠作为对照。每周通过生物发光成像 (IVIS) 评估肿瘤负荷。总之, 这些数据证明抗CD38 A2 CAR-T细胞表现出抗体型特异性, 其可以以MHC非限制性方式识别CD38高表达细胞, 从而导致T细胞活化、体外靶细胞溶解和体内MM肿瘤的根除。

[0153] 发明详述

[0154] 本文所公开的嵌合抗原受体 (CAR) 构建体优先与具有CD38高表达的肿瘤细胞结合, 而不与呈现较低CD38表达水平的正常细胞结合。正是这种差异结合解决了自溶 (autolysis) 问题。不受理论的束缚, 所公开的CAR表现出更优异的副作用特征并且能够在培养物中生长, 这是因为所公开的CAR构建体在转导时似乎避免了在具有较低CD38表达和中等CD38表达的细胞中的自溶, 而溶解了具有较高CD38表达的那些细胞。换言之, CAR构建体的抗体组分的结合特性实现了对CD38更低且更有利的结合特性。

[0155] 定义

[0156] 术语“分离的”是指基本上不含其他细胞物质的蛋白 (例如抗体) 或多核苷酸。使用本领域众所周知的蛋白纯化技术, 可以通过分离使蛋白基本上不含天然相关的组分 (或用于产生抗体的细胞表达系统相关的组分)。在一个实施方案中, 本公开的抗CD38嵌合抗原受体、抗体或抗原结合片段是分离的。

[0157] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用, 是指核苷酸的聚合物。核酸包括天然存在形式和重组形式。核酸包括DNA分子 (cDNA或基因组DNA)、RNA分子 (例如, mRNA)、使用核苷酸类似物 (例如, 肽核酸和非天然存在的核苷酸类似物) 产生的DNA或RNA的类似物, 及其杂交体。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施方案中, 本公开的核酸分子包含编码抗体、或其片段或scFv、衍生物、突变蛋白、或变体的连续的开放阅读框。

[0158] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”可互换使用, 是指氨基酸的聚合物, 并且不限于任何特定的长度。多肽包含天然和非天然氨基酸。多肽可以是天然存在形式或重组形式。这些术语涵盖天然和人造蛋白、蛋白序列的蛋白片段和多肽类似物 (例如突变蛋白、变体、嵌合蛋白和融合蛋白), 以及翻译后修饰的或通过其他方式共价或非共价修饰的蛋白。肽、多肽或蛋白可以是单体的或聚合的。多肽包括抗体、抗体链、scFv和嵌合抗原受体构建体。

[0159] “同一性百分比”或“同源性百分比”是指两个多肽之间或两个多核苷酸序列之间

相似性的定量测量。两个多肽序列之间的同一性百分比是两个多肽序列之间共享的对齐位置处相同氨基酸数目的函数,其中考虑了可能需要引入以优化两个多肽序列的比对的缺口的数目和每个缺口的长度。以类似的方式,两个多核苷酸序列之间的同一性百分比是两个多核苷酸序列之间共享的对齐位置处相同核苷酸数目的函数,其中考虑了可能需要引入以优化两个多核苷酸序列的比对的缺口的数目和每个缺口的长度。可以使用数学算法完成两个多肽序列之间或两个多核苷酸序列之间的序列比较和同一性百分比的确定。例如,可以通过使用GAP计算机程序(GCG Wisconsin Package的一部分,版本10.3(Accelrys, San Diego, Calif.))、使用其默认参数比较序列来确定两个多肽或两个多核苷酸序列的“同一性百分比”或“同源性百分比”。

[0160] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”描述了包含胞外抗原结合蛋白的融合蛋白,所述融合蛋白优选地包含衍生自融合单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的单链可变片段(scFv或sFv),其与能够激活或刺激免疫细胞的胞内信号传导结构域融合。可替代地,可以使用衍生自Fab(而不是衍生自抗体,例如获自Fab文库)的scFv。

[0161] 术语“抗体”描述了由四条多肽链——两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白(Ig)分子,或其任何功能片段、突变体、变体或衍生物(其保留了Ig分子的基本表位结合特征)。

[0162] 术语“抗CD38抗体”和“与CD38结合的抗体”是指能够结合CD38的抗体。

[0163] Fab片段是具有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域的单价片段; $F(ab')_2$ 片段是具有在铰链区通过二硫键桥连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段具有 V_H 和 C_{H1} 结构域;Fv片段具有抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域;以及dAb片段具有 V_H 结构域、 V_L 结构域、或 V_H 或 V_L 结构域的抗原结合片段(美国专利6,846,634和6,696,245)。

[0164] “载体”是指可以与外来遗传物质(例如核酸转基因)可操作地连接的核酸分子(例如DNA或RNA)。载体可以是单链或双链的核酸分子。载体可以是线性或环状的核酸分子。载体可用作将外来遗传物质引入细胞(例如宿主细胞)的工具。载体的一种类型是“质粒”,其是指可以与转基因连接、并能够在宿主细胞中复制且能够转录和翻译所述转基因的线性或环状双链染色体外DNA分子。病毒载体通常含有可与转基因连接的病毒RNA或DNA主链序列。可以修饰病毒主链序列以使失去感染能力,但是保留将病毒主链和共连接的转基因插入宿主细胞基因组中。病毒载体的实例包括逆转录病毒、慢病毒和腺病毒载体。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,包含细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)在被引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。“表达载体”是一种可以含有一个或多个调节序列的载体,所述调节序列例如诱导型和/或组成型启动子或核糖体结合位点,其指导与被转导到宿主细胞中的表达载体连接的转基因的转录、或转录和翻译。

[0165] 当转基因和载体之间存在连接以允许包含在载体中的载体序列起作用或表达时,转基因与载体“可操作地连接”。载体序列可以是复制起始序列、诱导型或组成型启动子或增强子序列、至少一种可选择标记序列、5' 和3' LTR序列、以及任选地病毒env、pol和/或gag序列的任何一种或任何组合。

[0166] 当调节序列影响转基因的表达(例如,表达的水平、时机或位置)时,转基因与调节序列“可操作地连接”。“调节序列”是影响与其可操作地连接的转基因的表达(例如,表达的

水平、时机或位置)的核酸序列。调节序列可以例如直接在所调节的核酸上发挥作用,或通过一种或多种其他分子(例如与调节序列和/或核酸结合的多肽)的作用发挥作用。调节序列可以是载体的一部分。调节序列的实例包括启动子、增强子、核糖体结合位点和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。调控序列的其他实例描述于,例如Goeddel,1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. 和Baron等人,1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-3606。

[0167] “宿主细胞”或“宿主细胞群”是指已引入外来(外源)核酸的细胞(或其种群)。外源核酸可以包括与转基因可操作地连接的表达载体,并且宿主细胞可以用于表达外源核酸(转基因)。在一个实例中,可以将与编码本文所述的嵌合抗原受体(CAR)的核酸可操作地连接的表达载体引入宿主细胞(或其种群)。宿主细胞(或其种群)可以是培养的细胞或可以从受试者中提取。宿主细胞(或其种群)包括原代受试者细胞及其后代,而无需考虑传代次数。与亲代细胞相比,后代细胞可能携带或可能不携带相同的遗传物质。宿主细胞包括后代细胞。

[0168] 宿主细胞可以是原核细胞,例如大肠杆菌,或者它可以是真核细胞,例如单细胞真核生物(例如酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如人细胞、猴子细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。宿主细胞的实例包括RPMI8226 (Gentry等人,2004 *Leuk. Res.* 28 (3) :307-313) 和人慢性骨髓性白血病细胞系K562。其他实例包括猴肾细胞的COS-7系(ATCC CRL 1651) (Gluzman等人,1981, *Cell* 23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或它们的衍生物(例如在无血清培养基中生长的Veggie CHO和相关的细胞系(Rasmussen等人,1998, *Cytotechnology* 28:31)或DHFR缺乏的CHO菌株DX-B11 (Urlaub等人,1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源自非洲绿猴肾细胞系CV1(ATCC CCL70)的CV1/EBNA细胞系(McMahan等人,1991, *EMBO J.* 10:2821)、人胚胎肾细胞(如293,293EBNA或MSR 293)、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化的灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源自原代组织体外培养的细胞株、原外植体、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物宿主细胞,例如人宿主细胞。通常,宿主细胞是可以引入外源多肽编码核酸的原代细胞或培养细胞,所述外源多肽编码核酸随后可以在宿主细胞中表达。应当理解,术语宿主细胞是指特定的受试者细胞,也指这种细胞的后代或潜在后代。由于在随后的世代中可能由于例如突变或环境影响而发生某些修饰,因此这种后代实际上与亲代细胞可能不同,但仍包括在本文所用术语的范围内。

[0169] 宿主细胞描述了已经以任何方式被修饰、转染、转导、转化和/或操纵以表达如本文所公开的抗CD38-CAR构建体的任何细胞(包括其后代)。优选地,宿主细胞是人T细胞,胎盘细胞或NK细胞。

[0170] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸(例如,转基因)转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”宿主细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。宿主细胞包括原代受试细胞及其后代。

[0171] 转基因(例如所公开的编码抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体的核酸序列)可以与载体(包括病毒载体)可操作地连接,所述载体用作将转基因引入宿主细胞的工具。引入宿主细胞的转基因(例如,通过转导、转染或转化引入)可以瞬时引入或优选稳定地整合到宿

主细胞的基因组中。引入宿主细胞的转基因可以在后代细胞中繁殖。载体可以是单链或双链DNA或RNA载体。载体包括指导转基因在宿主细胞中表达的表达载体。合适的载体包括表达载体,其可以含有复制起始序列、诱导型或组成型启动子序列以及至少一种选择性标记序列,其中这些序列在包装细胞和/或宿主细胞中起作用。用于将转基因引入宿主细胞的病毒载体包括衍生自病毒家族逆转录病毒科(Retroviridae)(包括逆转录病毒和慢病毒载体)的载体。逆转录病毒载体可用于转导分裂中的宿主细胞,而慢病毒载体可用于转导非分裂中的宿主细胞。用与表达载体连接的所需转基因转导的宿主细胞包括T细胞、胎盘来源的自然杀伤宿主细胞和脐带血来源的自然杀伤宿主细胞。

[0172] 逆转录病毒载体可以源自任何禽类或哺乳动物来源。逆转录病毒载体能够感染包括小鼠、大鼠和人在内的几种不同物种的宿主细胞(例如双嗜性),或者可以具有有限的宿主范围(例如单嗜性)。逆转录病毒载体可来源于莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾脏病灶病毒(SFFV)。

[0173] 在典型的第一代逆转录病毒转移载体(例如, γ 逆转录病毒载体)系统中,可以用所需的转基因替换编码逆转录病毒gag、pol和env的序列,并且所述转基因的侧翼两侧可以为顺式作用的长末端重复(LTR)序列。gag和pol序列可以在包装质粒上携带,env序列可以在包膜质粒上单独携带,并且这三个病毒序列的表达具有反式作用。在存在转染试剂将载体和质粒转导到包装细胞中的情况下,转移载体(含有转基因)以及包装质粒和包膜质粒与包装细胞反应。被转导的包装细胞产生细胞培养物上清液,该细胞培养物上清液包含具有携带转基因的转移载体的感染性病毒颗粒。通过使宿主细胞与病毒颗粒上清液反应来产生转导的宿主细胞。转导后,逆转录病毒转移载体(携带转基因)整合到宿主细胞的基因组中(Morgan和Boyerinas 2016Biomedicines 4(2):9“Review:Genetic Modification of T Cells”)。逆转录病毒转移载体还可以含有指导转基因的诱导型或组成型转录的启动子。第二代逆转录病毒载体系统通常包括在包装细胞系中稳定表达的gag、pol和env序列,从而不需要单独的包装和包膜质粒。包装细胞系与包装载体(携带转基因)反应以产生转导的包装细胞和病毒颗粒上清液。Phoenix无辅助逆转录病毒包装细胞系是第二代逆转录病毒系统的一个实例。逆转录病毒载体用于宿主细胞转导(WO2014/055668)。

[0174] 源自HIV、SIV或FIV的慢病毒载体可以用于将转基因引入宿主细胞。已经开发了几代慢病毒载体。第一代慢病毒系统与第一代逆转录病毒系统相似,它们均采用转移载体(携带转基因)、包装质粒(携带gag、pol、tat、rev和辅助序列)和包膜质粒(携带异源env序列)。第二代慢病毒系统采用转移载体(转基因)、包装质粒(gag、pol、tat和rev,且去除了辅助序列)和包膜质粒(携带异源env序列)。第三代慢病毒系统,有时也称为自我失活(SIN)系统,采用转移载体(转基因和已去除tat的3' LTR)、第一包装质粒(gag和pol)、第二包装质粒(rev)和包膜质粒(携带异源env序列)。与逆转录病毒系统相似,这些慢病毒系统中的任何一个都涉及将载体/质粒与包装细胞和转导试剂反应以产生含有病毒颗粒的细胞培养上清液,该上清液反过来又用于转导宿主细胞。慢病毒载体用于转导宿主细胞(WO2012/031744;美国专利8,802,374;和美国2016/0152723)。

[0175] 用于将转基因引入宿主细胞的其他病毒载体包括猿猴病毒40(SV40)、单纯疱疹病毒1、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)(Gross 1989 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:10024-10028)。

[0176] 表达载体通常包括启动子和/或增强子序列,所述序列指导在将要引入转基因的包装细胞和/或宿主细胞中的诱导型或组成型表达(例如,转录)。组成型启动子包括逆转录病毒LTR、极早期巨细胞病毒(CMV)启动子、延伸生长因子1 α (EF-1 α)、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)启动子、禽白血病毒启动子、Epstein-Barr病毒极早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)、UbC(泛素C)、MLV(莫洛尼鼠白血病毒)和CAG(巨细胞病毒早期增强子元件、鸡 β -肌动蛋白的第一外显子和内含子的启动子、以及兔 β -珠蛋白的剪接受体)增强子序列。诱导型启动子序列包括四环素操纵子(TetO)位点(Sakemura 2016 Cancer Immunology Research 4(8):658-668)和来自大肠杆菌的lac阻遏物系统。适用于慢病毒载体高表达的启动子包括人泛素、MHC I类、MHC II类和 β 2微球蛋白启动子(WO 2016/012623)。逆转录病毒和慢病毒表达载体可从多种来源商购获得,包括Applied Biological Materials(ABM)(加拿大,温哥华)和Addgene(马萨诸塞州,沃特敦)。

[0177] 术语“靶细胞”是表达一种或多种靶多肽的细胞,所述靶多肽使得细胞可以被抗体或抗体衍生物识别。在一个实施方案中,靶细胞包括表达CD38多肽的癌症靶细胞,所述靶细胞被本公开所述的嵌合抗原受体(CAR)构建体识别以结合。

[0178] 术语“约”或“大约”是指由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差,其部分取决于如何测量或确定该值。例如,术语“约”或“大约”是指给定值或范围的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%内。

[0179] 抗CD38嵌合抗原受体(CAR)

[0180] 本公开描述了一种新的CAR构建体,其包含在第二代CAR构建体框架上并且通常具有不同组分跨膜结构域和胞内结构域的已知抗CD38全人抗体A2(描述于US 2016/0297888,其公开内容通过引用并入本文)。通过以优雅的方式避免“T细胞同族杀伤”,将前述组分汇集入本文公开的CAR构建体产生了令人惊讶的结果。更具体地,所公开的CD38导向的嵌合抗原受体(CAR)可以避免由于T细胞展示CD38靶标的自溶。更具体地,本公开提供了编码抗CD38 CAR的核酸序列,用于转导入T细胞、培养的NK细胞或胎盘来源的NK细胞,其中CAR由结合亲和力稍低的抗体结合区引导。这种较低的结合亲和力使所公开的CAR转导的宿主细胞避免具有中等或较低表面CD38展示的T或NK细胞的大量溶解。因此,具有本文所公开的靶向抗体的所述CAR构建体实现了更优异的安全性,并且能够作为特性改良的CAR构建体不产生自溶地生长。

[0181] CAR构建体通常含有胞外区域,例如识别肿瘤抗原(如CD38)的抗体的单链可变片段(scFv),以及胞内区域,例如T细胞受体(如模拟TCR激活的(TCR) ζ 链)和源自CD28或4-1BB以模拟共刺激的信号传导结构域。通常通过将抗体的抗原识别结构域与来自T细胞的受体的信号传导结构域连接来构建CAR。用编码CAR的核酸序列修饰T细胞,使T细胞具有重新靶向的抗体型抗肿瘤细胞毒性。由于杀伤不受MHC限制,因此该方法为所有携带相同抗原的患者提供了一种通用疗法。这些用CAR工程改造的T细胞通常称为“设计者T细胞”、“CAR-T细胞”或“T-体”(Eshhar等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(2):720-724,1993;Ma等人,Cancer Chemother.Biol Response Modif.20:315-341,2002)。

[0182] 具体地,抗CD38 A2抗体重链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且轻链包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。抗CD38scFv A2抗体包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0183] 可替代地,抗CD38 CAR的抗原结合区包含scFv,所述scFv包含与抗CD38抗体D8的轻链和重链可变区相对应的CDR序列。抗CD38D8抗体重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且轻链包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。抗CD38scFv包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0184] 公开的抗CD38 CAR还包含铰链区,优选地CD8铰链区(SEQ ID NO:6或17)或其功能片段。所公开的抗CD38 CAR还包含胞外结构域,优选地CD28胞外结构域(SEQ ID NO:7)或其功能片段。所公开的抗CD38 CAR还包含跨膜结构域,优选地选自来自下组蛋白的跨膜结构域的跨膜结构域:T细胞受体的 α 链、T细胞受体的 β 链、T细胞受体的 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、LFA-1T细胞共受体、CD2T-细胞共受体/粘附分子、CD8 α 及其组合。优选地,跨膜结构域来自CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:8)或其功能片段。

[0185] 公开的抗CD38 CAR还包含胞内信号传导结构域,所述胞内信号传导结构域包含选自CD3- ζ 链、4-1BB、CD28及其组合的信号传导结构域。如果有两个信号传导结构域,则第二个称为共刺激信号传导结构域。优选地,共刺激信号传导结构域包含但不限于以下蛋白的胞内结构域或其片段:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体及其任何组合。在一些实施方案中,所述胞内信号传导结构域包含CD28信号传导结构域。在进一步的实施方案中,所述CD28信号传导结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其功能片段。在一些实施方案中,所述胞内信号传导结构域包含CD3- ζ 信号传导结构域。在进一步的实施方案中,所述CD3- ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其功能片段。

[0186] 因此,本公开涵盖了分离的核酸分子,其包含编码所公开的抗CD38 CAR构建体的序列。应当注意,在描述氨基酸序列的情况下,还包括编码该氨基酸序列的核酸序列。

[0187] 1. 胞外抗CD38结合蛋白

[0188] 本公开提供了一种包含与CD38结合的抗原结合蛋白的抗CD38 CAR,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。优选地,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少96%同源的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0189] 此外,本公开提供了一种包含与CD38结合的抗原结合蛋白的CAR,其中所述抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0190] 优选地,所公开的抗CD38 CAR包含scFv,其包含轻链和重链,所述轻链具有包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变结构域,所述重链具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的可变结构域。

[0191] 本公开提供了一种包含与CD38结合的抗原结合蛋白的抗CD38 CAR,其中所述抗原结合蛋白包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变(VH)结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。优选地,所述VH结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少96%同源的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述VH结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0192] 此外,本公开提供了一种包含与CD38结合的抗原结合蛋白的CAR,其中所述抗原结合蛋白包含轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变(VL)结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述VL结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0193] 与本文所述的CAR构建体的氨基酸序列相比,本公开提供了具有一种或多种变化(包括氨基酸取代、缺失和/或插入)的抗CD38嵌合抗原受体(CAR)构建体,只要变体CAR构建体包含与SEQ ID NO:20或21至少95%相同的氨基酸序列即可。

[0194] 优选地,所公开的抗CD38 CAR包含scFv,其包含轻链和重链,所述轻链具有包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的可变结构域,所述重链具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的可变结构域。

[0195] 可以通过经由氨基酸桥(短肽接头)连接重链和轻链可变结构域(Fv区)片段从而产生一条多肽链来形成单链抗体。通过将编码肽接头的DNA融合在编码两个可变结构域多肽(VL和VH)的DNA之间来制备该单链Fv(scFv)。取决于两个可变结构域之间柔性接头的长度,所产生的多肽可以自身折回以形成抗原结合单体,或者它们可以形成多聚体(例如,二聚体、三聚体或四聚体)(Kortt等人,1997,Prot.Eng.10:423;Kortt等人,2001,Biomol.Eng.18:95-108)。通过组合不同的含VL和VH的多肽,可以形成与不同表位结合的多聚scFv(Kriangkum等人,2001,Biomol.Eng.18:31-40)。为生产单链抗体而开发的技术包括描述在以下文献中的那些技术:美国专利4,946,778;Bird,1988,Science 242:423;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879;Ward等人,1989,Nature 334:544,和de Graaf等人,2002,Methods Mol.Biol.178:379-87。

[0196] 2.跨膜结构域

[0197] 所公开的抗CD38 CAR构建体的跨膜结构域描述了在细胞膜(优选地哺乳动物细胞膜)中热力学稳定的任何多肽结构。与所公开的抗CD38 CAR构建体中的使用相容的跨膜结构域可获自任何天然的跨膜蛋白或其片段。可替代地,所述跨膜结构域可以是合成的,非天然存在的跨膜蛋白或其片段,例如在细胞膜(例如哺乳动物细胞膜)中热力学稳定的疏水蛋白片段。

[0198] 优选地,CAR中使用的跨膜结构域衍生自选自下组的膜蛋白:CD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD137、CD154、

LFA-1T细胞共受体,CD2T细胞共受体/粘附分子、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B。优选地,所述跨膜结构域衍生自CD8 α 、4-1BB/CD137、CD28或CD34。

[0199] 优选地,抗CD38 CAR的跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0200] 3. 胞内结构域

[0201] 本文公开的抗CD38 CAR包含胞内信号传导结构域。信号传导结构域通常负责激活细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”描述了细胞的特殊功能。例如,T细胞或NK细胞的效应子功能包括细胞溶解活性或辅助活性。“信号传导结构域”描述了转导效应子功能信号并指导细胞执行其特殊功能的蛋白质部分。尽管通常可以使用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下,不必使用整个链或整个结构域。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要其转导效应子功能信号,就可以使用该截短部分以代替完整结构域。

[0202] 初级信号传导结构域以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级信号传导结构域可以含有被称为免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的信号传导基序。抗CD38 CAR中使用的含有ITAM的初级信号传导结构域包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的信号传导结构域。优选地,初级信号传导结构域是CD3 ζ 或CD28。

[0203] 优选地,抗CD38 CAR的初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0204] 优选地,抗CD38 CAR的初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述初级信号传导结构域包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0205] 此外,所公开的抗CD38 CAR构建体还包含共刺激信号传导结构域。嵌合受体中使用的共刺激信号传导结构域的实例是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,所述共刺激蛋白选自下组成员:B7/CD28家族(B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6);TNF超家族成员(4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- α /TNF- β 、OX40/TNFRSF4、

OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 和TNF RII/TNFRSF1B)；白细胞介素-1受体/To11样受体 (TLR) 超家族成员 (TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和TLR10)；SLAM家族成员 (2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150)；CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I类、HLA-DR、ikaros、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP10、DAP12、MYD88、TRIF、TIRAP、TRAF、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 和NKG2C。优选地，共刺激结构域包含选自下组的活化受体蛋白的胞内结构域： α 4 β 1整合素、 β 2整合素 (CD11a-CD18、CD11b-CD18、CD11b-CD18)、CD226、CRTAM、CD27、NKp46、CD16、NKp30、NKp44、NKp80、NKG2D、KIR-S、CD100、CD94/NKG2C、CD94/NKG2E、NKG2D、PEN5、CEACAM1、BY55、CRACC、Ly9、CD84、NTBA、2B4、SAP、DAP10、DAP12、EAT2、FcR γ 、CD3 ζ 和ERT。优选地，共刺激结构域包含选自下组的抑制性受体蛋白的胞内结构域：KIR-L、LILRB1、CD94/NKG2A、KLRG-1、NKR-P1A、TIGIT、CEACAM、SIGLEC 3、SIGLEC 7、SIGLEC9和LAIR-1。优选地，共刺激结构域包含选自下组蛋白的胞内结构域：CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0206] 4. 铰链区

[0207] 抗CD38 CAR还包含铰链区。铰链区位于scFv抗体区和跨膜结构域之间。铰链区是通常存在于在蛋白质的两个结构域之间，并且使抗CD38 CAR具有柔性以及允许一个或两个结构域相对于彼此运动的氨基酸区段。优选地，铰链区包含约10至约100个氨基酸，例如约15至约75个氨基酸、约20至约50个氨基酸或约30至约60个氨基酸。或者，铰链区是天然存在蛋白的铰链区。优选地，铰链区是选自由CD8铰链区和CD8a铰链区组成的组的CD8a铰链区。优选地，铰链区设置在scFv的C末端和CAR的跨膜结构域的N末端之间。

[0208] 优选地，抗CD38 CAR的铰链区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0209] 优选地，抗CD38 CAR的铰链区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列，或者所述铰链区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0210] 5. 信号肽

[0211] 信号序列是将多肽靶向至细胞中所需的位点 (如细胞的分泌途径)，并且将抗CD38CAR整合和锚定到细胞膜的脂质双层中的肽序列。优选地，该信号是来自CD8 α 、CD28和CD16的信号序列。

[0212] 优选地，抗CD38 CAR的信号序列包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%相同

的氨基酸序列,或者所述信号序列包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少96%相同的氨基酸序列,或者所述信号序列包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少97%相同的氨基酸序列,或者所述信号序列包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列,或者所述信号序列包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0213] 宿主细胞

[0214] 用本文公开的抗CD38构建体转导分离的宿主细胞或宿主细胞群以表达抗CD38 CAR。有两组不同的宿主细胞。第一组是患者来源的分离的T细胞,也称为自体T细胞。此类自体T细胞群是从患者获得、分离并扩增的。然后,用所公开的抗CD38 CAR构建体转导扩增的T细胞,以实现尽可能大量的被转导的T细胞群,所述T细胞被扩增并返回(施用)给个体患者。所公开的抗CD38 CAR构建体能够实现仅具有CD38高表达肿瘤细胞(主要是多发性骨髓瘤(MM)肿瘤细胞)的细胞溶解。

[0215] 第二组宿主细胞是胎儿来源的培养的T或NK细胞,优选地来自怀孕后的胎盘或脐带组织。第二组宿主细胞不是自体的,而是培养的和在所有人类患者中普遍使用的。

[0216] 本公开提供了CAR构建体,其可以转导T细胞、培养的NK细胞或胎盘来源的NK细胞,并且能够避免具有中等或较低表面CD38展示的T或NK细胞的溶解。

[0217] 抗CD38 CAR的治疗方法和用途

[0218] 本公开提供了在有此需要的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向受试者施用包含抗CD38 CAR的分离的宿主细胞或转导的宿主细胞群。可以使用本文公开的抗CD38 CAR来治疗血液学癌症。可以使用本公开所述方法治疗的血液学癌症的实例包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、B慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B和T急性淋巴细胞白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性髓细胞白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性髓细胞白血病(CML)。优选地,所述血液学癌症是多发性骨髓瘤(MM)。

[0219] 多发性骨髓瘤(MM)是浆细胞的恶性肿瘤,并且是全世界第二常见的血液学癌症。目前尚无法治愈该疾病,且其五年生存率仅为45%。在过去的十年中,MM的治疗取得了重大进展,包括新型的免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂和自体造血干细胞移植(Kumar等人,Blood 111(5):2516-2520,2008;Barosi等人,Ann.Hematol.91(6):875-888,2012;Kharfan-Dabaja等人,J.Hematol.Oncol.6:2,2013)。

[0220] 本公开提供了抑制表达癌症相关抗原的肿瘤生长的方法,所述方法包括使肿瘤的癌细胞与包含抗CD38 CAR的被转导的宿主细胞或被转导的宿主细胞群接触,其中所述宿主细胞是NK细胞,例如胎盘NK细胞。

[0221] 所转导的宿主细胞可以约 10^1 至约 10^9 个细胞/kg体重的剂量施用。在上述剂量中间的范围(例如,约 10^2 至约 10^8 个细胞/kg体重、约 10^4 至约 10^7 个细胞/kg体重、约 10^5 至约 10^6 个细胞/kg体重)也意在成为本公开的一部分。

[0222] 所转导的宿主细胞可以每天施用或优选地更不频繁地施用。

[0223] 表达抗CD38 A2 CAR的逆转录病毒载体的构建

[0224] 通过使用从专有的人单链可变区(scFv)抗体库中筛选的人抗CD38抗体,产生了第二代抗CD38 A2 CAR。将来自人cmv基因的10个氨基酸的myc标签(氨基酸:EQKLISEEDL(SEQ ID NO:12),DNA:GAGCAGAAGCTTATCTCCGAGGAAGATCTG(SEQ ID NO:22))添加到scFv的N端区

域以检测CAR的表达。

[0225] 该公开的构建的抗-CD38 CAR,被称为“抗-CD38 A2 CAR”。它是第二代IgCD28TCR CAR,其包含542个氨基酸残基,其中包括来自小鼠抗体重链的信号肽的19个氨基酸残基,其后是2个其他的氨基酸残基Asp和Ile,人myc标签的10个氨基酸残基,抗CD38抗体的VH的118个氨基酸残基,(G4)S3形式的接头的15个氨基酸残基,抗CD38抗体的VL的110个氨基酸残基,CD8 α 铰链的46个氨基酸残基,CD28胞外结构域的40个氨基酸残基(用作间隔区),CD28跨膜结构域的27个氨基酸残基,CD28胞内信号传导结构域的41个氨基酸残基和TCR ζ 胞内结构域的112个氨基酸残基(图1)。成熟的所公开的抗CD38 A2 CAR包含523个氨基酸残基,预测的单体蛋白重量为~57kDa。

[0226] 通过用表达抗CD38 CAR的逆转录病毒载体转导抗CD3抗体(OKT3)(Miltenyi Biotech)激活的T细胞来生成抗CD38 A2 CAR-T细胞(图2A)。当通过蛋白质印迹分析时,抗CD38 CAR在还原条件下以~70kD的分子量迁移,而在非还原条件下以~140kD的分子量迁移(图2B),这证实了T细胞表面同源二聚体的形成。较慢的迁移带可能代表分子的糖基化形式。在还原条件下,CAR2-抗CD38A2 CAR被检测为分子量为~70kDa的单体,在非还原条件下,被检测为分子量为~140kDa的同型二聚体。这些结果表明CAR2-抗CD38A2 CAR在CAR-T细胞表面形成同型二聚体。

[0227] 当与CD38-Fc融合蛋白一起孵育时,抗CD38 A2 CAR-T细胞显示出与CAR表达相关的强CD38结合活性(图3A和3B)。这些结果证实了抗CD38 A2 CAR-T细胞可以通过表达的CAR与CD38特异性和高效地结合。为了证明抗CD38 A2 CAR T细胞可以结合其靶抗原CD38,将未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞与2 μ g/ml CD38-Fc融合蛋白一起孵育,并通过流式细胞术进行分析(用PE缀合的山羊抗人IgG检测CD38-Fc结合,且用FITC缀合的山羊抗Myc抗体检测T细胞上CAR的表达)(图3)。

[0228] 抗CD38 A2 CAR-T细胞选择性地杀死CD38上调的细胞。已发现CD38在活化的T细胞上表达并被视为T细胞活化标记物(Deaglio等人,J.Immunol.160(1):395-402,1998和Sandoval-Montes和Santos-Argumedo,J.Leukocyte Biol.77(4):513-521,2005)。我们检测了抗CD38 CAR-T细胞中的CD38表达种群,发现在抗CD38 CAR-T细胞中仅CD38上调的种群被清除(图3)。在长期细胞培养过程中,其余的CD38阴性和低表达CAR-T细胞群是稳定的,具有与对照T细胞相当的活力。抗CD38 CAR-T细胞的这一特性可使CAR-T细胞在培养物中良好存活,避免自溶,并且为与CAR-T细胞相关的有限的上靶脱肿瘤副作用提供了临床优势,这是因为抗CD38 CAR-T细胞将选择性地杀死CD38上调的MM细胞,而不杀死CD38正常表达的细胞。

[0229] 为了研究抗CD38 A2 CAR-T的同族杀伤活性,评估了抗CD38 CAR-T细胞上的CD38表达(图4)。通过流式细胞术(用小鼠抗人CD38mAb染色,然后用APC缀合的山羊抗小鼠IgG抗体染色)分析了未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞。

[0230] 通过公开的具有A2抗体的抗CD38 CAR细胞在长期细胞培养中的稳定性和活力来显示避免同族杀伤的能力。在转导后的第15天,通过流式细胞术分析未转导的对照和抗CD38A2 CAR转导的T细胞(通过用PE-缀合的抗myc抗体染色分析(图5A)CAR-T细胞的稳定性,且通过用前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)对活细胞进行门控来分析(图5B)T细胞的活力)。培养15天后,转导的T细胞中CAR阳性细胞的百分比仅从转导后第4天的74%(图5A)略

微下降至第15天的65%，并且活力与对照T细胞相当(85%比91%)。从其他供体获得了类似的结果。

[0231] 为了测试抗CD38 A2 CAR-T细胞是否可被表达CD38的肿瘤细胞激活以产生细胞因子，将未转导的对照T细胞和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞与对照CD38-阴性K562细胞(对照T)或与表达CD38的RPMI 8226肿瘤细胞(CAR-T)孵育24小时。一旦与它们靶向的CD38-阳性MM肿瘤细胞RPMI8622而非与CD38-阴性对照肿瘤细胞K562结合后，抗CD38 A2 CAR-T细胞产生了大量的细胞因子IFN γ 和IL2，这表明抗CD38 A2 CAR-T细胞可在靶向的肿瘤细胞结合后被特异性激活(图6)。未转导的对照T细胞和抗CD38 CAR A2转导的T细胞与对照CD38阴性K562细胞(对照T)或与表达CD38的RPMI 8226肿瘤细胞(CAR-T)孵育24小时。收集上清液，并通过ELISA测定IFN γ 和IL2的产生。

[0232] CAR-T细胞的重要功能标准是其能够特异性杀死表达靶抗原的肿瘤细胞。为了确认抗CD38 A2 CAR-T细胞的CD38特异性细胞毒性，进行了细胞毒性试验。将未转导的对照和CAR转导的T细胞(E)与CD38阴性K562或表达CD38的RPMI8226肿瘤细胞(T)孵育2小时。对于CD38-阴性的K562肿瘤细胞，未转导的对照T细胞和转导的CAR-T细胞均无细胞毒性(图7，左)。相比之下，抗CD38 A2 CAR-T细胞，而非未转导的对照T细胞，以细胞剂量依赖性方式有效溶解了表达CD38的RPMI8226MM肿瘤细胞(图7，右)。这些结果证实，抗CD38 CAR-T细胞的溶细胞活性高度有效的且对表达CD38的MM肿瘤细胞特异性的。图7显示了未转导的对照和抗CD38 A2 CAR转导的T细胞(E)与荧光增强配体标记的CD38-阴性K562或表达CD38的RPMI8226肿瘤细胞(T)以指示的比例孵育2小时，并进行处理且通过DELTA细胞毒性试验进行分析。这些数据显示了抗CD38 A2 CAR-T细胞的CD38特异性细胞毒性。

[0233] 图8显示了在异种移植动物模型中评估的抗CD38 A2 CAR-T细胞的杀肿瘤活性。对免疫受损的NSG小鼠静脉内接种 1×10^7 Luc-GFP标记的表达CD38的RPMI8226MM肿瘤细胞。3周后，在所有接种的小鼠中形成了IVIS可测量的全身性肿瘤。用不同剂量的抗CD38 A2 CAR-T细胞静脉内治疗小鼠，未经治疗的小鼠作为对照。每周通过生物发光成像(IVIS)评估肿瘤负荷。总之，这些数据证明抗CD38 A2 CAR-T细胞表现出抗体型特异性，其可以以MHC非限制性方式识别CD38高表达细胞，从而导致T细胞活化、体外靶细胞溶解和体内MM肿瘤的根除。这项体内研究证明了通过抗CD38 A2 CAR-T细胞剂量依赖性根除表达CD38的MM肿瘤。这项研究的目的是开发不同剂量的CD38特异性CAR-T细胞，用于CD38高表达MM的过继免疫疗法。测试了异种移植动物模型中抗CD38 A2 CAR-T细胞的杀肿瘤活性，以模拟剂量依赖性抗CD38 A2 CAR-T细胞在CD38上调的MM患者中的潜在治疗应用。将抗CD38 A2 CAR-T细胞以不同剂量静脉内施用给免疫缺陷NSG小鼠，该免疫缺陷NSG小鼠具有已确定的全身性异种移植人RPMI8226MM肿瘤。图8描述了该实验的结果。以 1×10^7 个CAR-T细胞治疗1周后，从经治疗的小鼠中清除了所有已确定的RPMI8226MM肿瘤，在12周时(当前)所有十只小鼠均无肿瘤。以 1×10^6 个CAR-T细胞治疗1周后，平均肿瘤负荷减少了85%(档案数据)；2周后，肿瘤负荷减少了94%。但是，肿瘤从第3周开始逐渐长大，表明自不完全治疗的肿瘤复发。相比之下，在所有未经治疗的小鼠和用 1×10^5 CAR-T细胞治疗的小鼠中，RPMI8226 MM肿瘤恶性生长直至所有小鼠在 81 ± 2.7 天内死于肿瘤。这些结果证明，抗CD38 A2 CAR-T细胞可以有效地根除具有CD38上调的体内MM肿瘤。

[0234] 总之，以上结果证明抗CD38 A2 CAR-T细胞表现出抗体型特异性，其可以以MHC非

限制性方式识别CD38高表达细胞,从而导致T细胞活化、体外靶细胞溶解和体内MM肿瘤的根除。

[0235] 为了研究CAR2-抗CD38 CAR-T细胞可能的同族杀伤活性,进行了两种测定。在第一个测定中,监测了CAR2-抗CD38 CAR-T细胞上的CD38表达。通过分别使用K562和RPMI8226作为CD38阴性和高表达对照,并根据CD38表达水平,将活化的T细胞分为三个群体:CD38阴性、CD38低表达和CD38高表达群体。在其中一个供体中,对照未转导的T细胞中的所述T细胞群分别为12%、77%和11%,而CAR-T细胞中的所述T细胞群分别为17%、82%和1% (图4)。从其他供体获得了类似的结果。CAR-T细胞中CD38高表达群的消失代表了同族杀伤活性,并且CAR-T细胞中CD38阴性和低表达群的保留表明CAR2-抗CD38 CAR-T细胞选择性地溶解了CD38高表达细胞。

[0236] 在第二种测定中,监测了CAR-T细胞在长期细胞培养中的稳定性和活力(图5A和B)。培养15天后,转导的T细胞中CAR阳性细胞的百分比仅从转导后第4天的74%略微下降至第15天的65%,并且活力与对照细胞相当(85%比91%)。从其他供体获得了类似的结果。这些结果进一步证实,CAR2-抗CD38 CAR-T细胞表现出有限的同族杀伤活性,并且在长期细胞培养后仍保持相对稳定和活力。

[0237] CAR2-抗CD38 CAR-T细胞的第二个独特性质是CAR2-抗CD38 CAR-T细胞选择性地溶解CD38高表达细胞,而使CD38低表达细胞完整无损。该特性可使CAR-T细胞在培养物中良好存活,具有有限的同族杀伤活性,并且为CAR-T细胞相关的有限的上靶脱肿瘤副作用提供了临床优势,这是因为CAR2-抗CD38 CAR-T细胞将选择性地杀死CD38高表达的MM细胞,而不杀死CD38低表达的正常细胞。

[0238] 基于小鼠抗CD38mAb,THB-7的抗CD38 CAR的产生(Mihara等人,J.Immunother.32(7):737-743,2009;Mihara等人,Br.J.Haematol.151(1):37-46;和2010,Bhattacharyya等人,Blood Cancer J.2(6):e75,2012)显示抗CD38 CAR-T细胞无法独自生存。据推测这是由于抗CD38 CAR与活化T细胞表面表达的固有CD38结合而导致的高同族杀伤活性。

[0239] Drent等人报告了其基于人抗CD38抗体的抗CD38 CAR-T研究,其中只有CD38阴性抗CD38 CAR-T细胞在培养物中存活(Drent等人,Haematologica 101(5):616-625,2016)。但是,本文前述数据表明,所公开的CAR2-抗CD38 CAR-T细胞(基于A2和D8抗体)仅溶解了一小部分CD38高表达T细胞,而使大部分T细胞(CD38低表达或CD38阴性细胞)完好无损,这导致非常有限的同族杀伤活性,并且在长期细胞培养中经转导的T细胞保持高活性。不受理论的束缚,该偏好性可能是由于所使用的人抗体A2的亲合力较低。不受理论的束缚,低亲和力的人抗CD38抗体可有效地使CAR-T细胞在体外表现出高效而强大的靶细胞溶解活性,并在体内根除CD38高表达的MM肿瘤。不同于在MM中测试的CD38阴性并且仅暂时抑制肿瘤生长的其他抗CD38 CAR-T细胞(Drent等人,同上),前述CAR2-抗CD38 CAR-T细胞在动物模型中根除了表达CD38的肿瘤细胞且没有复发。前述CAR2-抗CD38 CAR-T细胞区分低和高CD38表达细胞的能力,即选择性杀死CD38高表达的肿瘤细胞而不杀死CD38低表达的正常细胞的能力,提供了重要的临床优势。

实施例

[0240] 以下实施例旨在说明,并且可用于进一步理解本公开的实施方案,并且不应被解

释为以任何方式限制本教导的范围。

[0241] 实施例1:细胞系、抗体和CD38-Fc融合蛋白

[0242] 以相对较高的水平表达CD38 (Genty等人, Leuk Res 28 (3):307-313 2004) 的人浆细胞瘤/多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226 (Dalton等人, 1986 Cancer Research 46:5125-5130), 和CD38阴性的人慢性骨髓性白血病细胞系K562 (Gregorini, Tomasetti等人, 2006 Cell Biology International 30 (9):727-732) 购自美国典型培养物保藏中心 (Rockville, MD)。用我们创建的表达Luc-GFP的逆转录病毒载体, 通过逆转录病毒介导的转导来创建表达荧光素酶和绿色荧光蛋白融合蛋白 (Luc-GFP) 的RPMI8226细胞。所有细胞均在补充了10%热灭活胎牛血清、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素的RPMI1640培养基中生长。

[0243] R-藻红蛋白 (PE)-缀合的小鼠抗myc标签单克隆抗体 (mAb) 购自R&D Systems (Minneapolis, MN)。FITC-缀合的山羊抗Myc标签多克隆抗体购自Abcam (Cambridge, MA)。小鼠抗人CD38mAb购自Biolegend (San Diego, CA)。PE-缀合的山羊抗人IgG抗体购自Southern Biotech (Birmingham, AL)。APC-缀合的小鼠抗人CD3来自BD Bioscience (San Diego, CA)。

[0244] CD38-Fc融合蛋白, 其由氨基酸19至238位的人CD38胞外结构域和N末端的人IgG1 Fc区组成, 购自Creative BioMart (Shirley, NY)。

[0245] 实施例2:用CAR2-抗CD38 CAR对T细胞进行逆转录病毒介导的转导

[0246] 如Ma等人, 2004 The Prostate 61:12-25; 和Ma等人, The Prostate 74 (3):286-296, 2014 (其公开内容通过引用整体并入本文) 中所述, 用CAR对T细胞进行了逆转录病毒介导的转导。简而言之, 使用FuGene试剂 (Promega, Madison, WI) 将逆转录病毒载体DNA转染到Phoenix Ecotropic 293细胞中, 并用瞬时病毒上清液转导PG13包装细胞。来自PG13细胞的病毒上清液用于转导活化的T细胞, 以稳定表达CAR2-抗CD38 CAR。用3ml病毒上清液转导由10μg/ml重组人纤维蛋白片段 (Clontech, Mountain View, CA) 预涂的6孔板中的 5×10^6 个活化的人T细胞, 并在32℃下以1000g离心1小时。根据需要重复转导过程。通过用100ng/ml小鼠抗人CD3抗体OKT3 (Ortho Biotech, Raritan, NJ) 和300-1000U/ml IL2激活在补充有5% FBS的AIM-V生长培养基 (GIBCO-Thermo Fisher scientific, Waltham, MA) 中的正常的健康供体外周血单核细胞 (PBMC) 两天来制备激活的人T细胞。转导后, 将转导的T细胞在补充有5% FBS和300-1000U/ml IL2的AIM-V生长培养基中扩增。

[0247] 实施例3:蛋白质印迹

[0248] 使用膜提取试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 提取未转导的和CAR2-抗CD38 CAR转导的T细胞的膜部分。在有 (还原条件) 或没有 (非还原条件) 10%2-巯基乙醇 (β -ME) 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 样品缓冲液中变性样品, 并在4-12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上分离, 然后电转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。用Tris缓冲盐 (20mM Tris/500mM NaCl, pH 7.5) 中的5%脱脂奶粉封闭膜1-2小时。膜用TBST (含0.05% Tween-20的Tris缓冲盐) 进行洗涤, 然后用抗CD3 ζ 抗体 (BD, San Jose, CA) 以1:1000的稀释度孵育1小时, 然后用辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的山羊抗小鼠IgG抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 以1:5000的稀释度孵育1小时, 全部在TBST中的5%脱脂奶粉中。用ECL化学发光底物 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 显影该膜, 并通过ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA) 检测化

学发光信号(图2)。

[0249] 实施例4:流式细胞术分析

[0250] 为了检测CD38在细胞表面的表达,进行了流式细胞术测定。将细胞与小鼠抗人CD38mAb在50 μ l结合缓冲液(含有10%马血清的RPMI 1640)中混合孵育30分钟。然后将细胞用PBS进行洗涤,并在相同条件下用APC-缀合的山羊抗小鼠IgG抗体进行孵育。用PBS洗涤后,在Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)上分析样品。为了检测转导的T细胞上的CAR2-抗CD38 CAR,将细胞用PE-缀合的小鼠抗myc标签mAb染色30分钟,并通过流式细胞仪进行分析。为了分析CAR2-抗CD38 CAR-T细胞的抗原结合活性,将 1×10^6 个未转导的对照T细胞或转导的CAR-T细胞与CD38-Fc融合蛋白一起孵育,然后用PE-缀合的山羊抗人抗体IgG抗体和FITC-缀合的山羊抗myc抗体染色,用流式细胞仪分析样品。

[0251] 实施例5:T细胞活化测定

[0252] 在微滴定板中用K562或RPMI8226肿瘤细胞刺激未转导的对照T细胞和CAR2-抗CD38 CAR转导的T细胞。为了进行细胞因子产生测定,将 1×10^5 个细胞/孔未转导的对照T细胞或CAR2-抗CD38 CAR-转导的T细胞与 1×10^5 个细胞/孔K562或RPMI8226在生长培养基中混合。培养24小时后,收集培养上清液,并用来自eBioscience(San Diego,CA)的ELISA测定试剂盒测量IL2和IFN γ 。对于CAR-T细胞抗原特异性克隆扩增试验,首先在37 $^{\circ}$ C下用50 μ M丝裂霉素C(MMC,R&D,Minneapolis,MN)处理K562和RPMI8226肿瘤细胞1.5小时以阻止细胞增殖,然后以 2.5×10^5 细胞/孔接种在48孔板中。将 1×10^6 个细胞/孔转导的CAR-T细胞添加至肿瘤细胞,并在37 $^{\circ}$ C下用300U/ml IL2共培养7天。收集细胞并用APC-缀合的抗CD3和FITC-缀合的抗myc抗体染色,并通过流式细胞仪分析抗原特异性CAR-T细胞的克隆扩增。所有实验均重复三次。

[0253] 实施例6:T细胞细胞毒性测定

[0254] 通过DELFI A细胞毒性测定(PerkinElmer,Waltham,MA)测量CAR2-抗CD38 CAR-T细胞的细胞毒性。首先将K562和RPMI8226肿瘤细胞在37 $^{\circ}$ C下加载荧光增强配体25分钟。然后将 2.5×10^3 个细胞/孔的K562或 5×10^3 个细胞/孔的RPMI8226肿瘤细胞与未转导的对照或转导的T细胞以不同的效应子:靶标(E:T)比率混合,并孵育2小时。收集20 μ l/孔的上清液,并通过添加铈溶液形成荧光螯合物来分析释放的配体。在具有TRF功能的酶标仪Cytation 5(BioTek Instruments,Winooski,VT)上测量时间分辨荧光(TRF)。使用以下公式计算细胞毒性:比溶解%=(实验-自发)/(最大-自发)*100。

[0255] 实施例7:NSG小鼠中MM异种移植物的治疗

[0256] 所有动物实验均按照实验动物护理和使用指南进行。购自杰克逊实验室(Bar Harbor,ME)的八周龄雌性NSG免疫缺陷小鼠经尾静脉内(i.v.)接种 1×10^7 Luc-GFP标记的RPMI8226细胞。使用IVIS Spectrum体内成像系统(PerkinElmer,Waltham,MA)通过生物发光成像每周测量肿瘤负荷。在第23天IVIS可测量的全身性肿瘤形成后,用 1×10^7 个未转导的对照T细胞或转导的CAR-T细胞对小鼠进行静脉内注射。从T细胞注射的前一天开始,连续5天每天通过腹膜内注射施用1 μ g人IL15,以增强T细胞的植入。每周测量一次肿瘤负荷。在T细胞注射后的3小时、第1天、第2天、然后每周一次通过尾静脉采血采集外周血样品,并按组合并在一起。用APC-缀合的小鼠抗人CD3和PE-缀合的小鼠抗myc抗体通过流式细胞术测定了T细胞的植入和扩增。通过使用Bio-Rad Luminex测定(Bio-Rad,Hercules,CA)来测量人

细胞因子IFN γ 、IL2和TNF α 的血液水平。监测动物的疾病进展和明显毒性的迹象,例如GVHD(体重减轻>15%、皮毛损失和垂死可证明)。存活研究的终点是小鼠体重减轻超过15%或垂死的那一天。

[0257] 表1.序列

SEQ ID NO:	序列	描述
1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIR QAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTL VTVSS	C38A2 可变重链-氨基酸
2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIVSTNYVHWVR QAPGKGLEWVSGIYSDPYTSYAYSDSVKGRFTISRDMK NTVYLQMNRLRAEDTAVYYCARETNTGFSNSWYLDWF GQGTLLTVSS	C38D8 可变重链-氨基酸
3	QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIGINFVYWYQHL PGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFSGSKSGNSASLAISGLR SEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL	C38A2 可变轻链-氨基酸
4	QPVLTPPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNIVNWYQQL PGTTPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLHS EDEADYYCATWDDSLNGWVFGGGTKLTVL	C38D8 可变轻链-氨基酸
5	GGGSGGGSGGGGS	连接 VH 和 VL 的肽接头-氨基酸
6	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFA	CD8 铰链区-氨基酸
7	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	CD28 胞外结构域/间隔区-氨基酸
8	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 跨膜结构域-氨基酸
9	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	CD28 胞内信号传导结构域-氨基酸
10	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3- ζ 信号传导结构域-氨基酸
11	EQKLISEEDL	Myc 标签

[0258]

[0259]

SEQ ID NO:	序列	描述
12	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIR QAPGKGLEWVASVSNRPTTYADSVRGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTL VTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAGLTQPPSASGTSGQRV TISCSGSSSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL GYVFGSGTKVTVL	CD38A2 scFv
13	FS1 5'-ACACAGTCCTGCTGACCA-3'	测序引物
14	FS5 5'-GGGAGTCATGTTTCATGTAG-3'	测序引物
15	BS2 5'-TGGTGATATTGTTGAGT-3'	测序引物
16	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFIVSTNYVHWVR QAPGKGLEWVSGIYSDPYTSYAYSDSVKGRFTISRDMK NTVYLQMNRLRAEDTAVYYCARETNTGFSNSWYLDFW GQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQPVLTQPPSASGT PGQRTVITISCSGSSSNIGRNIVNWYQQLPGTTPKLLIYSNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLHSEDEADYYCATW DDSLNGWVFGGGTKLTVL	CD38D8 scFv
17	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFGPSKP	铰链序列-氨基酸
18	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 全长-氨基酸
19	MEWSWVFLFLSVTTGVHS	小鼠抗体重链信号肽

[0260]

SEQ ID NO:	序列	描述
20	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIEQKLISEEDLQVQLVESG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNRPTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQAGLTQPPSASGTSGQRTISCSGSSS NIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFSGS KSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSG TKVTVLAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFAKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CD38A2 CAR-氨基酸
21	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDIEQKLISEEDLQVQLVESG GGVVQPGGSLRLSCAASGFIVSTNYVHWVRQAPGKGLE WVSGIYSDPYTSYAYSDSVKGRFTISRDMSKNTVYLQM NRLRAEDTAVYYCARETNTGFSNSWYLDWFGQGTTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQPVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSSSNIGRNIVNWYQQLPGTTPKLLIYSNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLHSEDEADYYCATWDDSLNGW VFGGGTKLTVLAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFAKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	CD38D8 CAR-氨基酸
22	GAGCAGAAGCTTATCTCCGAGGAAGATCTG	编码人 cmc 标签的 DNA 序列

序列表

<110> 索伦托治疗有限公司

<120> CD38定向CAR构建体

<130> 074537-8018CN01

<140> 尚未分配

<141> 2018-11-02

<150> 62/581,466

<151> 2017-11-03

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

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

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

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

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成肽"

<400> 5

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

<210> 6

<211> 46

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

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

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

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

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 9

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

50	55	60			
Lys Asp Lys Met Ala Glu	Ala Tyr Ser Glu Ile Gly	Met Lys Gly Glu			
65	70	75	80		
Arg Arg Arg Gly Lys Gly	His Asp Gly Leu Tyr Gln	Gly Leu Ser Thr			
	85	90	95		
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr	Asp Ala Leu His Met Gln	Ala Leu Pro Pro			
	100	105	110		
Arg					
<210> 11					
<211> 10					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 11					
Glu Gln Lys Leu Ile Ser	Glu Glu Asp Leu				
1	5	10			
<210> 12					
<211> 243					
<212> PRT					
<213> 人造序列					
<220>					
<221> 来源					
<223> /备注="人造序列的描述：合成					
多肽"					
<400> 12					
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro	Gly Gly			
1	5	10	15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	Asp Asp			
	20	25	30		
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	Trp Val			
	35	40	45		
Ala Ser Val Ser Asn Gly Arg	Pro Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp	Ser Val			
	50	55	60		
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser	Leu Tyr			
65	70	75	80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys			
	85	90	95		
Ala Arg Glu Asp Trp Gly Gly	Glu Phe Thr Asp Trp Gly Arg	Gly Thr			
	100	105	110		
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser			

115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala	Gly Leu Thr Gln Pro	Pro Ser Ala Ser
130	135	140
Gly Thr Ser Gly Gln Arg Val	Thr Ile Ser Cys Ser Gly	Ser Ser Ser
145	150	155
Asn Ile Gly Ile Asn Phe Val	Tyr Trp Tyr Gln His Leu	Pro Gly Thr
165	170	175
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	Lys Asn Asn Gln Arg Pro	Ser Gly Val
180	185	190
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	Lys Ser Gly Asn Ser Ala	Ser Leu Ala
195	200	205
Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr	Cys Ala Ala
210	215	220
Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly	Tyr Val Phe Gly Ser Gly	Thr Lys Val
225	230	235
Thr Val Leu		

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 13

acacagtcct gctgacca 18

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 14

gggagtcatg ttcatgtag 19

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 15

tggtgatatt gttgagt 17

<210> 16

<211> 249

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成多肽"

<400> 16

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Val	Ser	Thr	Asn
			20					25					30		
Tyr	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Asp	Pro	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Asp	Ser
		50				55					60				
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Met	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65				70					75					80	
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Glu	Thr	Asn	Thr	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Trp	Tyr	Leu	Asp
			100					105					110		
Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		115				120						125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Val	Leu	Thr
		130				135						140			
Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser
145				150						155				160	
Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Arg	Asn	Ile	Val	Asn	Trp	Tyr
				165					170					175	
Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asn

180	185	190
Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly		
195	200	205
Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu His Ser Glu Asp Glu Ala		
210	215	220
Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe		
225	230	235
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
245		

<210> 17

<211> 88

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

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

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 65 70 75 80
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 85 90 95
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 100 105

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 20

<211> 541

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人造序列的描述：合成
 多肽"

<400> 20

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
 20 25 30

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 35 40 45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp Tyr
 50 55 60

Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 65 70 75 80

Ser Val Ser Asn Gly Arg Pro Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 85 90 95

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 100 105 110

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 115 120 125

Arg Glu Asp Trp Gly Gly Glu Phe Thr Asp Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
130	135	140
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
145	150	155
Gly Gly Gly Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly		
	165	170
Thr Ser Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn		
	180	185
Ile Gly Ile Asn Phe Val Tyr Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala		
	195	200
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro		
	210	215
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Ala Ile		
225	230	235
Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp		
	245	250
Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr		
	260	265
Val Leu Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro		
	275	280
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
	290	295
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
305	310	315
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser		
	325	330
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
	340	345
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
	355	360
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
	370	375
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
385	390	395
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
	405	410
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe		
	420	425
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		

435	440	445
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
450	455	460
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg		
465	470	475
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		480
485	490	495
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
500	505	510
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
515	520	525
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
530	535	540
<210> 21		
<211> 547		
<212> PRT		
<213> 人造序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /备注="人造序列的描述：合成多肽"		
<400> 21		
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
1	5	10
Val His Ser Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln		15
20	25	30
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser		
35	40	45
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Thr Asn Tyr		
50	55	60
Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
65	70	75
Gly Ile Tyr Ser Asp Pro Tyr Thr Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser Val		80
85	90	95
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Met Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
100	105	110
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
115	120	125
Ala Arg Glu Thr Asn Thr Gly Phe Ser Asn Ser Trp Tyr Leu Asp Phe		

130	135	140
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
145	150	155
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln		
165	170	175
Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys		
180	185	190
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Ile Val Asn Trp Tyr Gln		
195	200	205
Gln Leu Pro Gly Thr Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln		
210	215	220
Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr		
225	230	235
Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu His Ser Glu Asp Glu Ala Asp		
245	250	255
Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe Gly		
260	265	270
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala		
275	280	285
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser		
290	295	300
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr		
305	310	315
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr		
325	330	335
Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys		
340	345	350
His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp		
355	360	365
Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val		
370	375	380
Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu		
385	390	395
Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr		
405	410	415
Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr		
420	425	430
Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln		
435	440	445

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
450 455 460
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
465 470 475 480
Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
485 490 495
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
500 505 510
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
515 520 525
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
530 535 540
Pro Pro Arg
545
<210> 22
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人
<400> 22
gagcagaagc ttatctccga ggaagatctg

30

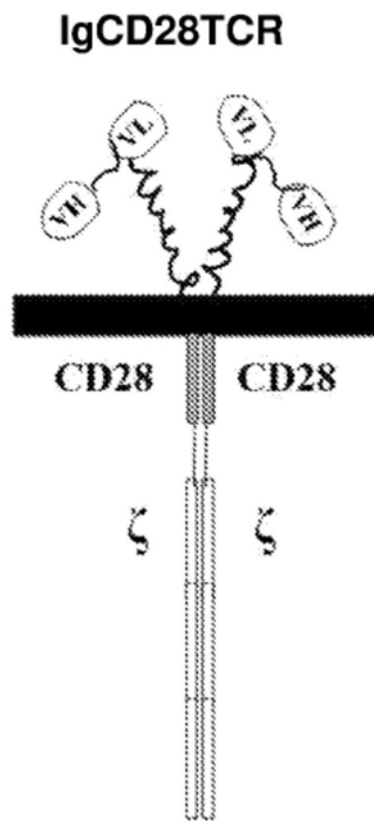


图1A

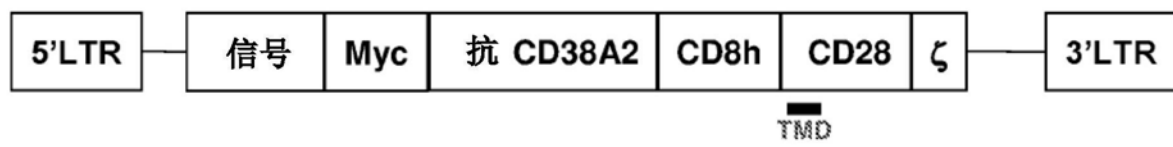


图1B

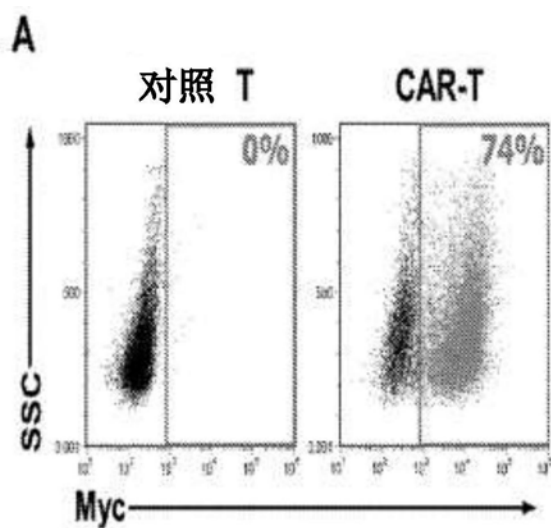


图2A

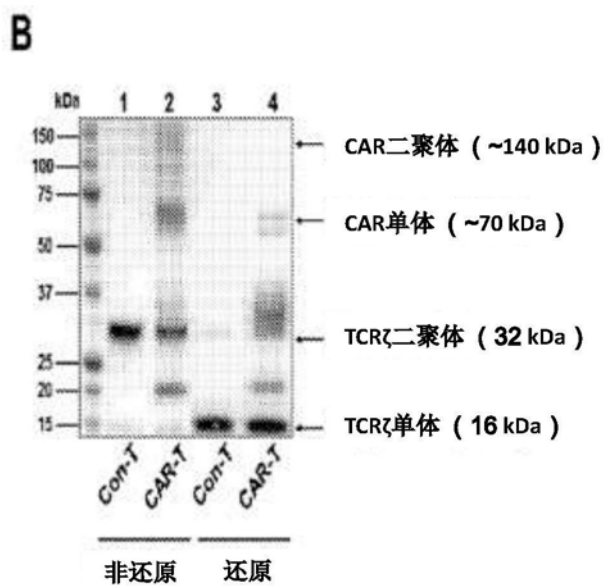


图2B

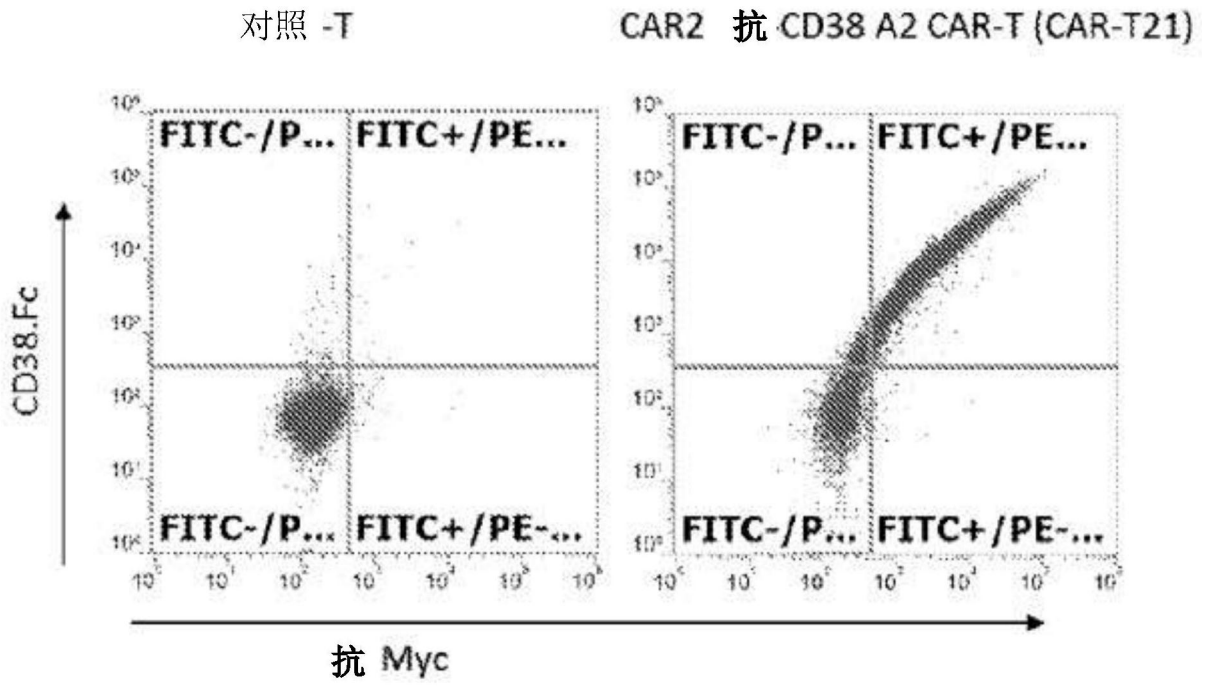


图3

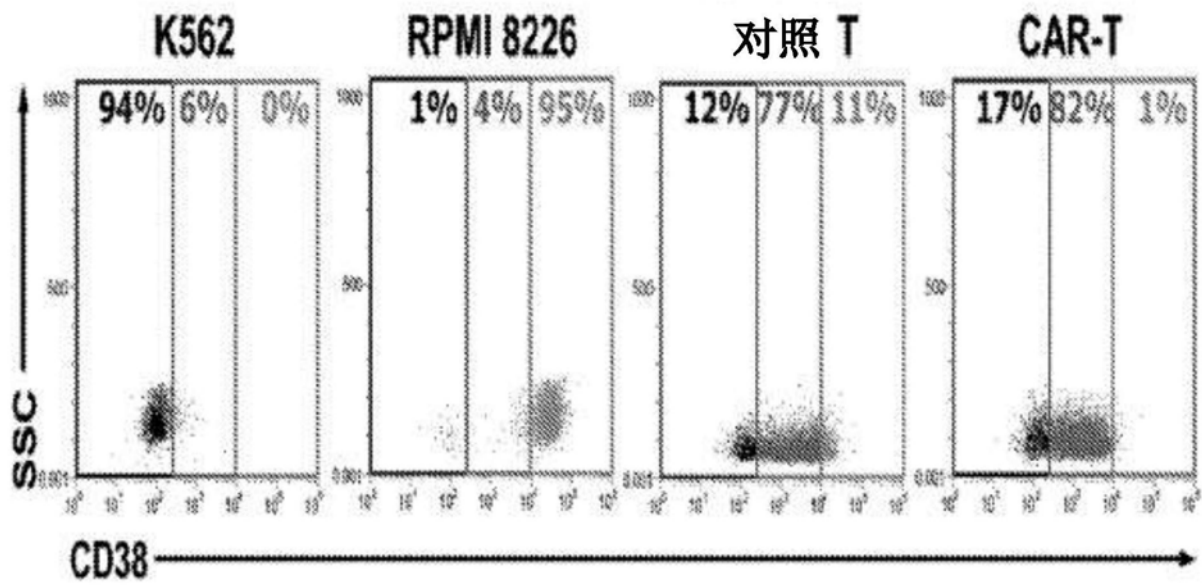


图4

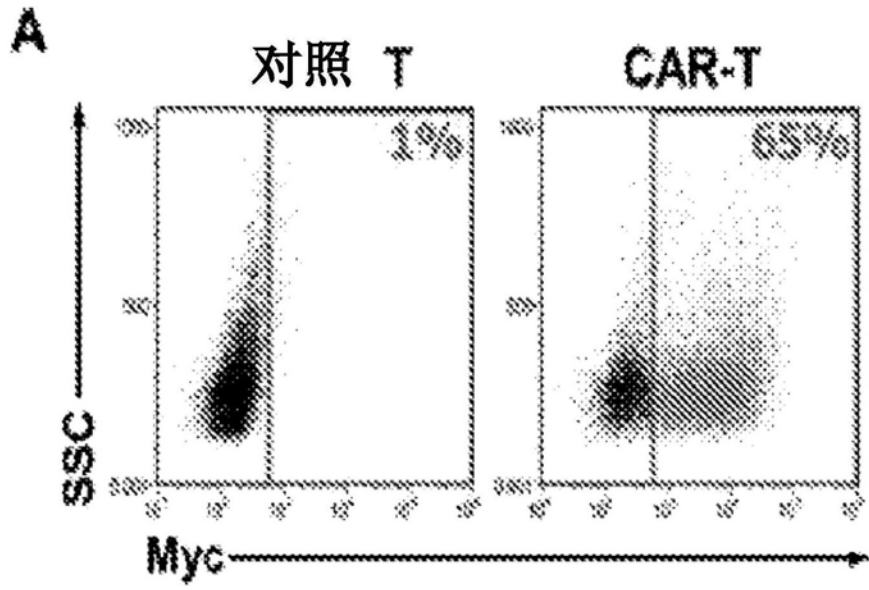


图5A

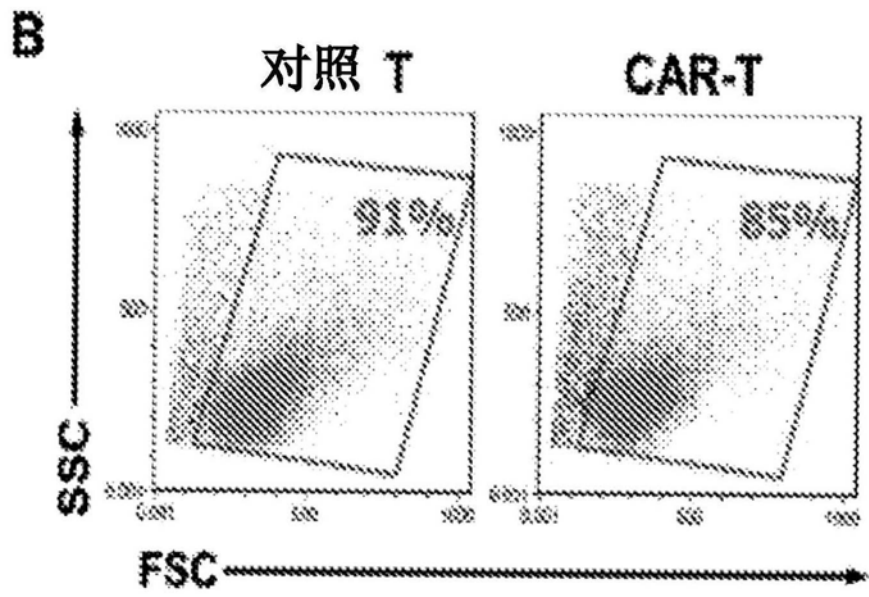


图5B

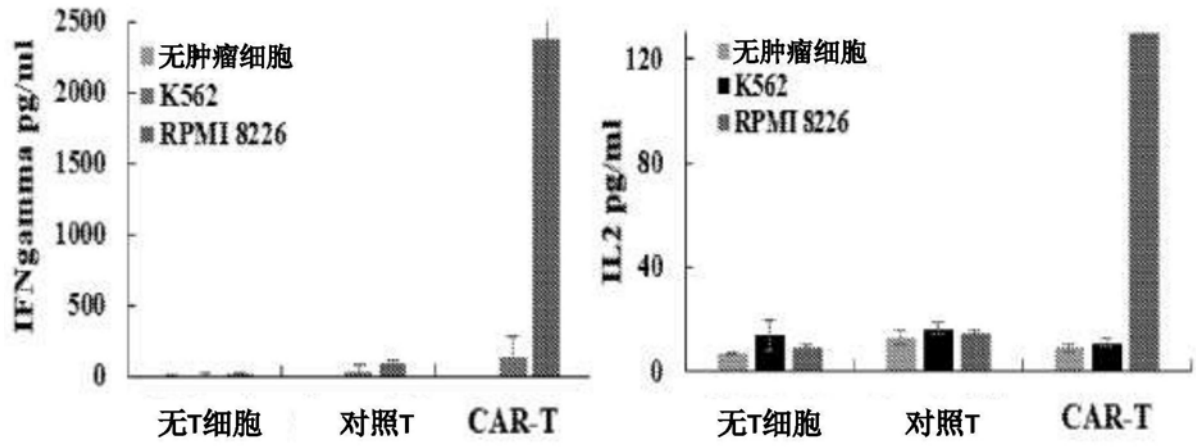


图6

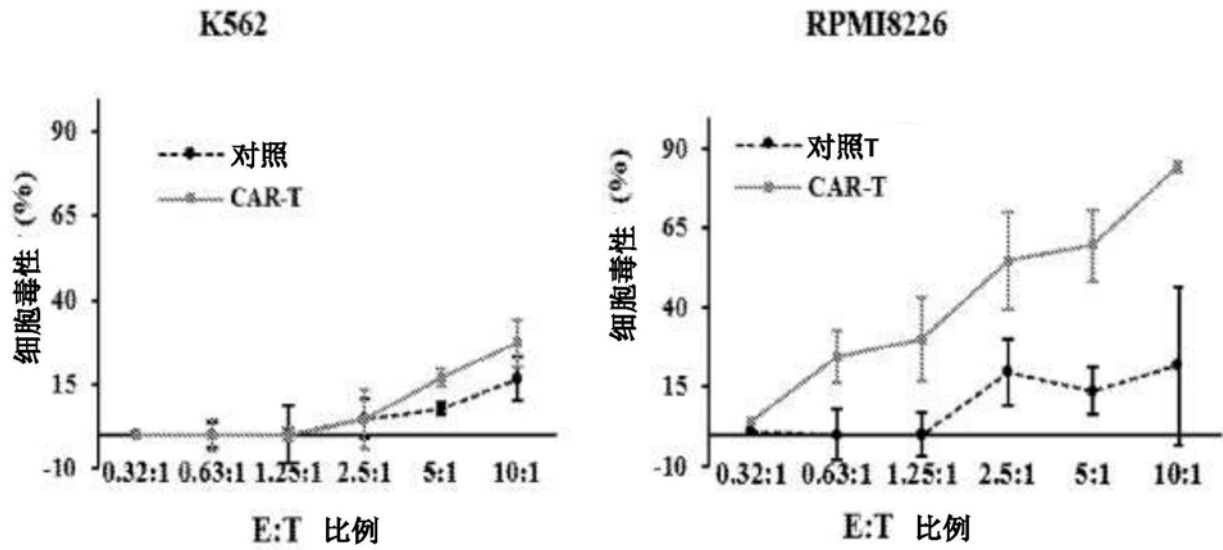


图7

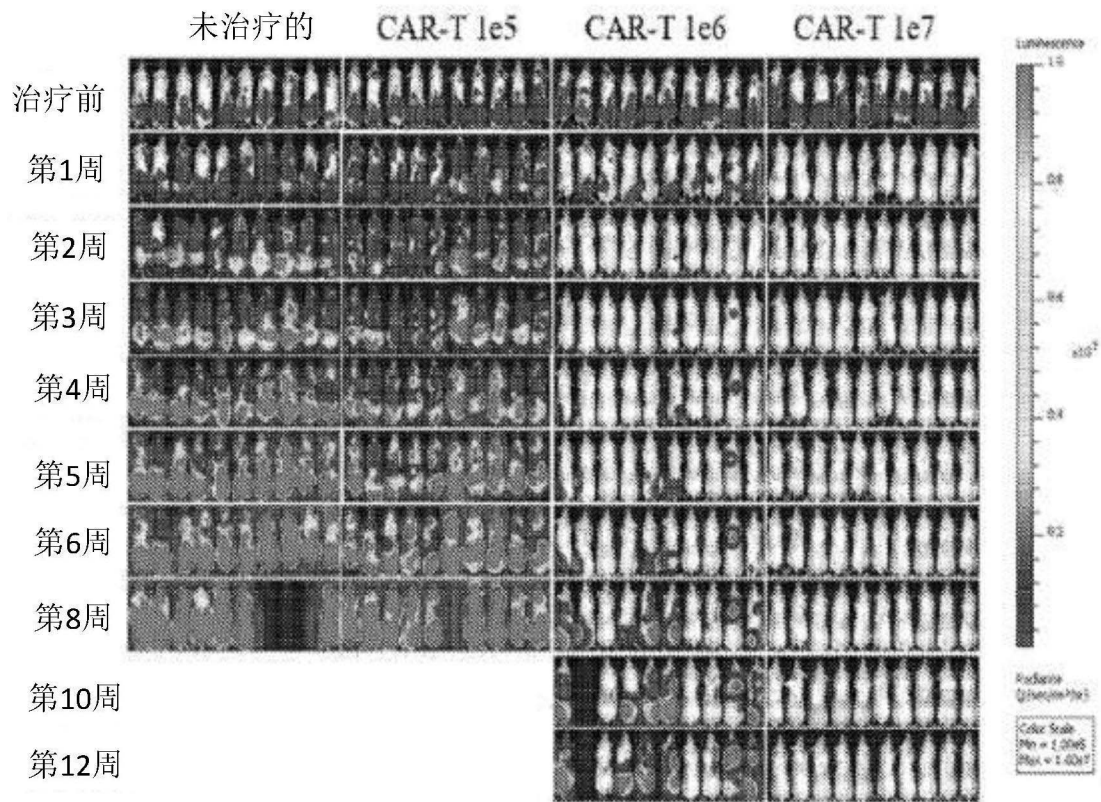


图8