



(10) 授权公告号 CN 112437671 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 25

(21) 申请号 201980048197.7

(22) 申请日 2019.07.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112437671 A

(43) 申请公布日 2021.03.02

(30) 优先权数据
62/700,615 2018.07.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/042452 2019.07.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/018825 EN 2020.01.23

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 D·迪利略 F·德尔菲诺
K·布雷 T·C·米格尔
J·克什纳 O·西涅舍科娃

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2017226216 A1, 2017.08.10

审查员 李雪莹

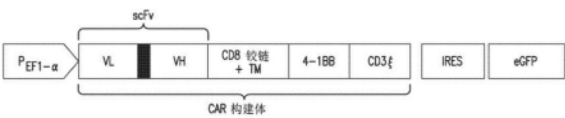
权利要求书2页 说明书40页
序列表37页 附图1页

(54) 发明名称

具有BCMA特异性的嵌合抗原受体及其用途

(57) 摘要

B细胞成熟抗原 (BCMA) 在恶性浆细胞上表达。本发明提供了BCMA特异性嵌合抗原受体和表达这种嵌合抗原受体的细胞。在某些实施方式中,表达本发明的嵌合抗原受体的工程化的细胞能够抑制表达BCMA的肿瘤的生长。本发明的工程化的细胞可用于治疗这样的疾病和病症:其中,上调的或诱导的BCMA靶向的免疫反应是期望的和/或在治疗上是有益的。例如,表达本发明的BCMA特异性嵌合抗原受体的工程化的细胞可用于治疗多种癌症,包括多发性骨髓瘤。



1. 一种B细胞成熟抗原 (BCMA) 特异性嵌合抗原受体, 其从N端到C端包括: (a) 包括抗BCMA抗原结合域的胞外配体结合域; (b) CD8铰链; (c) CD8跨膜域; 以及 (d) 包括4-1BB共刺激域和CD3zeta信号传导域的胞质域;

其中, 所述胞外配体结合域为抗BCMA单链可变片段 (scFv) 域, 其包括通过接头连接的轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR),

其中, 所述LCVR包括LCDR1-LCDR2-LCDR3域, 其分别为SEQ ID NO: 60-62-64的氨基酸序列;

其中, 所述HCVR包括HCDR1-HCDR2-HCDR3域, 其分别为SEQ ID NO: 52-54-56的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其中, 所述接头包括选自SEQ ID NO: 93-96组成的组的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其中, 所述LCVR由SEQ ID NO: 58的氨基酸序列组成; 所述HCVR由SEQ ID NO: 50的氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的嵌合抗原受体, 其中:

(i) 所述铰链包括SEQ ID NO: 97的氨基酸序列;

(ii) 所述跨膜域包括SEQ ID NO: 98的氨基酸序列;

(iii) 所述共刺激域包括SEQ ID NO: 99的氨基酸序列; 或

(iv) 所述信号传导域包括SEQ ID NO: 100的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其包括SEQ ID NO: 88的氨基酸序列。

6. 一种分离的核酸分子, 其编码根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合抗原受体。

7. 根据权利要求6所述的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子包含SEQ ID NO: 87的核苷酸序列。

8. 一种包括根据权利要求6或7所述的核酸分子的载体。

9. 根据权利要求8所述的载体, 其中, 所述载体是DNA载体。

10. 根据权利要求8所述的载体, 其中, 所述载体是质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

11. 一种RNA载体, 其包含权利要求6的核酸分子。

12. 权利要求11的载体, 其中所述载体是质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。

13. 一种包括根据权利要求6或7所述的核酸分子或根据权利要求8至12中任一项所述的载体的细胞。

14. 根据权利要求13所述的细胞, 其中, 所述细胞是人类T细胞。

15. 一种工程化的细胞, 包括根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合抗原受体。

16. 根据权利要求15所述的工程化的细胞, 其中所述工程化的细胞是免疫细胞。

17. 根据权利要求15所述的工程化的细胞, 其中所述工程化的细胞是免疫细胞, 且所述免疫细胞是免疫效应子细胞。

18. 根据权利要求15所述的工程化的细胞, 其中所述工程化的细胞是T淋巴细胞。

19. 根据权利要求15所述的工程化的细胞, 其中所述工程化的细胞是T淋巴细胞, 且所述T淋巴细胞是炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细

胞。

20. 根据权利要求18所述的工程化的细胞,所述工程化的细胞是CD8⁺ 细胞毒性T淋巴细胞。

21. 一种工程化细胞群,其可通过如下方式获得:

- (a) 提供从受试者获得的免疫细胞群体;
- (b) 将编码根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合抗原受体的核酸分子引入所述免疫细胞;
- (c) 在表达所述核酸分子的条件下培养所述免疫细胞;以及
- (d) 分离在细胞表面表达所述嵌合抗原受体的所述免疫细胞。

22. 一种药物组合物,包括以下之一:

- (a) 基因修饰的人类T细胞和药学上可接受的载体,其中,所述基因修饰的人类T细胞包括根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合抗原受体;或
- (b) 根据权利要求15所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体;或
- (c) 根据权利要求16所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体;或
- (d) 根据权利要求17所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体;或
- (e) 根据权利要求18所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体;或
- (f) 根据权利要求19所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体;或
- (g) 据权利要求20所述的工程化的细胞和药学上可接受的载体。

23. 根据权利要求22所述的药物组合物在制备用于在受试者中治疗表达BCMA的多发性骨髓瘤的药物中的用途。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述受试者是人个体。

25. 一种工程化细胞群以表达嵌合抗原受体的体外方法,包括:

- (a) 提供免疫细胞群体;
- (b) 将编码根据权利要求1至5中任一项所述的嵌合抗原受体的核酸分子引入所述免疫细胞;
- (c) 在表达所述核酸分子的条件下培养所述免疫细胞;以及
- (d) 分离在细胞表面表达所述嵌合抗原受体的所述免疫细胞。

26. 根据权利要求25所述的方法,进一步包括:从受试者获得所述免疫细胞群体。

具有BCMA特异性的嵌合抗原受体及其用途

[0001] 对序列表的引用

[0002] 该申请通过引用并入了以计算机可读形式文件10455W001-Sequence.txt提交的序列表,该文件于2019年7月17日创建,包含66,907字节。

技术领域

[0003] 本发明涉及对B细胞成熟抗原 (BCMA) 具有特异性的嵌合抗原受体 (CAR) 和包括这种CAR的工程化的细胞及其使用方法。

背景技术

[0004] B细胞成熟抗原 (BCMA),也称为TNFRSF17或CD269,是一种III型跨膜蛋白,其缺乏信号肽并含有富含半胱氨酸的胞外域。BCMA与密切相关的蛋白质一起促进B细胞在发育的不同阶段存活。BCMA仅在B细胞谱系细胞中表达,特别是在生发中心的滤泡间区以及成浆细胞和分化浆细胞中表达。BCMA在浆细胞分化过程中被选择性诱导,并且是长寿命浆细胞在骨髓中最佳存活所必需的。在多发性骨髓瘤中,BCMA在恶性浆细胞上以升高的水平广泛表达,并且BCMA表达随着从正常细胞向活跃的多发性骨髓瘤进展而增加。BCMA在其他B细胞恶性肿瘤中也有表达,包括Waldenström氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤。Tai等人,Immunotherapy,7(11):1187-1199,2015。

[0005] 过继性免疫疗法涉及体外产生的自体抗原特异性T细胞的转移,是治疗病毒感染和癌症的有前途的策略。用于过继性免疫疗法的T细胞可以通过抗原特异性T细胞的扩增或通过基因工程改造的T细胞的重定向来产生。

[0006] 通过转基因T细胞受体或嵌合抗原受体 (CAR) 的基因转移,已成功地在T细胞中产生了新的特异性 (Jena,Dotti等人2010)。CAR是由与单个融合分子中的一个或多个信号传导域相关的靶向部分组成的合成受体。通常,CAR的结合部分由单链抗体 (scFv) 的抗原结合域组成,其包括单克隆抗体的通过柔性接头连接的轻链和重链可变片段。第一代CAR的信号传导域衍生自CD3zeta或Fc受体gamma链的胞质区。第一代CAR已被证明可以成功地重定向T细胞的细胞毒性。然而,它们不能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。已添加了来自共刺激分子的信号传导域以及跨膜和铰链域来形成第二代和第三代CAR,从而对人类进行了一些成功的治疗性试验。例如,对B细胞分化抗原CD19具有特异性的CAR重定向T细胞在治疗B细胞恶性肿瘤方面显示出显著功效,而TCR重定向T细胞显示出对患有实体肿瘤的患者有益处。Stauss等人描述了修饰治疗性CAR和TCR的策略,以用于治疗癌症,例如增强抗原特异性效应子功能并限制工程化的T细胞的毒性 (Current Opinion in Pharmacology 2015,24:113-118)。

[0007] 表达靶向BCMA的嵌合抗原受体的工程化的细胞可用于这样的治疗环境:其中,需要对表达BCMA的细胞进行特异性靶向和T细胞介导的杀伤。

发明内容

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种B细胞成熟抗原 (BCMA) 特异性嵌合抗原受体,其从N端到C端包括:(a) 包括抗BCMA抗原结合域的胞外配体结合域;(b) 铰链;(c) 跨膜域;以及(d) 包括共刺激域和信号传导域的胞质域。

[0009] 在一些情况下,所述胞外配体结合域包括抗BCMA单链可变片段(scFv) 域,其包括轻链可变区(LCVR) 和重链可变区(HCVR)。在一些实施方式中,所述抗BCMA scFv域包括在所述LCVR和所述HCVR之间的接头。在一些情况下,所述嵌合抗原受体还包括在所述胞外配体结合域(例如,所述scFv域) 与所述铰链之间的接头。在一些情况下,所述接头包括选自自由SEQ ID NO:93-96组成的组的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述接头是(G4S)_n接头,其中,n为1-10。

[0010] 在一些情况下,所述铰链、所述跨膜域或两者来自CD8 α 多肽。在一些情况下,所述共刺激域包括4-1BB共刺激域。在一些情况下,所述信号传导域包括CD3zeta信号传导域。在一些实施方式中,所述铰链包括SEQ ID NO:97的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述跨膜域包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述4-1BB共刺激域包括SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述CD3zeta信号传导域包括SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0011] 在一些情况下,所述LCVR包括LCVR的互补决定区(CDR),其包括选自自由SEQ ID NO:10、26、42、58和74组成的组的氨基酸序列。在一些情况下,所述LCVR包括LCDR1-LCDR2-LCDR3域,其分别包括SEQ ID NO:12-14-16、28-30-32、44-46-48、60-62-64或76-78-80的氨基酸序列。在一些情况下,所述HCVR包括HCVR的CDR,其包括选自自由SEQ ID NO:2、18、34、50和66组成的组的氨基酸序列。在一些情况下,所述HCVR包括HCDR1-HCDR2-HCDR3域,其分别包括SEQ ID NO:4-6-8、20-22-24、36-38-40、52-54-56或68-70-72的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方式中,所述LCVR包括选自自由SEQ ID NO:10、26、42、58和74组成的组的氨基酸序列,或具有与选自自由SEQ ID NO:10、26、42、58和74组成的组的氨基酸序列的95%-99%的序列同一性的氨基酸序列;并且所述HCVR包括选自自由SEQ ID NO:2、18、34、50和66组成的组的氨基酸序列,或具有与选自自由SEQ ID NO:2、18、34、50和66组成的组的氨基酸序列的95%-99%的序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述LCVR包括选自自由SEQ ID NO:10、26、42、58和74组成的组的氨基酸序列,并且所述HCVR包括选自自由SEQ ID NO:2、18、34、50和66组成的组的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方式中,所述scFv域包括LCVR/HCVR氨基酸序列对,其包括SEQ ID NO:10/2、26/18、42/34、58/50或74/66的氨基酸序列。在一些情况下,所述LCVR和HCVR通过接头连接,任选地通过(G4S)_n接头连接,其中,n=1-3。

[0014] 在一些情况下,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0015] 在另一方面,本发明提供了一种分离的核酸分子,其编码上文或本文讨论的嵌合

抗原受体。在一些情况下,所述核酸分子包括选自SEQ ID NO:81、83、85、87和89组成的组的核苷酸序列。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种包括上文或本文讨论的核酸分子的载体。在一些情况下,所述载体是DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体。在一些实施方式中,所述载体是慢病毒载体。

[0017] 在另一方面,本发明提供了一种包括上文或本文讨论的核酸分子或载体的细胞。在一些情况下,所述细胞是人类T细胞。

[0018] 在另一方面,本发明提供了一种工程化的细胞,包括上文或本文讨论的嵌合抗原受体。在一些情况下,所述工程化的细胞是免疫细胞。在一些情况下,所述免疫细胞是免疫效应子细胞。在一些情况下,所述免疫效应子细胞是T淋巴细胞。在一些实施方式中,所述T淋巴细胞是炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞。在一些实施方式中,所述工程化的细胞是CD8+细胞毒性T淋巴细胞。

[0019] 在一些情况下,本发明的工程化的细胞用于治疗BCMA表达的癌症。在一些情况下,所述BCMA表达的癌症是多发性骨髓瘤。

[0020] 在另一方面,本发明提供了一种包括嵌合抗原受体的工程化的人类T细胞,所述嵌合抗原受体从N端到C端包括:(a) 包括抗BCMA单链可变片段(scFv)域的胞外配体结合域,其包括轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b) 铰链;(c) 跨膜域;以及(d) 包括4-1BB共刺激域和CD3zeta信号传导域的胞质域。

[0021] 在一些情况下,所述scFv域包括LCVR/HCVR氨基酸序列对,其包括SEQ ID NO:10/2、26/18、42/34、58/50或74/66的氨基酸序列。在一些情况下,所述铰链包括SEQ ID NO:97的氨基酸序列。在一些情况下,所述跨膜域包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些情况下,所述4-1BB共刺激域包括SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在一些情况下,所述CD3zeta信号传导域包括SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,所述工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:88的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0023] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,包括基因修饰的人类T细胞和药学上可接受的载体,其中,所述基因修饰的人类T细胞包括上文或本文讨论的嵌合抗原受体。在一些情况下,所述药物组合物用于治疗BCMA表达的癌症。在一些实施方式中,所述BCMA表达的癌症是多发性骨髓瘤。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种上文或本文讨论的工程化的细胞。在一些情况下,所述药物组合物用于治疗BCMA表达的癌症。在一些实施方式中,所述BCMA表达的癌症是多发性骨髓瘤。

[0025] 在另一方面,本发明提供了上文或本文讨论的嵌合抗原受体、核酸分子、载体、细胞或工程化的细胞在制备用于治疗BCMA表达的癌症的药物中的用途。在一些情况下,所述

BCMA表达的癌症是多发性骨髓瘤。在各种实施方式中,可以想到将上文或本文讨论的嵌合抗原受体、核酸分子、载体、细胞或工程化的细胞用于上文或本文讨论的任何方法。例如,在一些实施方式中,将本文讨论的CAR或工程化的细胞用于药物或用于治疗上文或本文讨论的癌症。

[0026] 在另一方面,本发明提供了一种对受试者增强T淋巴细胞活性的方法,包括:将包括上文或本文讨论的嵌合抗原受体的T淋巴细胞引入所述受试者。

[0027] 在另一方面,本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,包括:将治疗有效量的包括上文或本文讨论的嵌合抗原受体的T淋巴细胞引入所述受试者。

[0028] 在另一方面,本发明提供了一种用于对受试者刺激对靶细胞群体或组织的T细胞介导的免疫反应的方法,包括:向所述受试者给药有效量的经基因修饰以表达上文或本文讨论的嵌合抗原受体的细胞。

[0029] 在另一方面,本发明提供了一种对受试者提供抗肿瘤免疫力的方法,所述方法包括:向所述受试者给药有效量的经基因修饰以表达上文或本文讨论的嵌合抗原受体的细胞。

[0030] 在上文讨论的方法的一些实施方式中,所述受试者是人类。在一些情况下,所述受试者患有多发性骨髓瘤、B谱系急性淋巴细胞性白血病、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、白血病和淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病、霍奇金氏淋巴瘤或儿童急性淋巴细胞性白血病。在一些实施方式中,所述受试者患有多发性骨髓瘤。

[0031] 在另一方面,本发明提供了一种工程化细胞群以表达嵌合抗原受体的方法,其中,所述包括:(a)提供免疫细胞群体;(b)将编码上文或本文讨论的嵌合抗原受体的核酸分子引入所述免疫细胞;(c)在表达所述核酸分子的条件培养所述免疫细胞;以及(d)分离在细胞表面表达所述嵌合抗原受体的所述免疫细胞。在一些情况下,所述方法进一步包括:在引入所述核酸分子之前从受试者获得所述免疫细胞群体。

[0032] 在另一方面,本发明提供了一种对受试者治疗BCMA表达的癌症的方法,其中,所述方法包括:(a)根据上文讨论的方法工程化细胞群体;以及(b)将表达所述嵌合抗原受体的所述免疫细胞群体重新引入所述受试者。在一些实施方式中,所述BCMA表达的癌症是多发性骨髓瘤。

[0033] 通过阅读随后的详细描述,其他实施方式将变得显而易见。

附图说明

[0034] 图1示出了用于表达嵌合抗原受体(CAR)构建体的示例性核苷酸构建体。示例性核苷酸构建体包括抗BCMA VL-接头-VH scFv、人类CD8铰链和跨膜域、4-1BB共刺激域、CD3zeta信号传导域以及用于追踪CAR转导细胞的IRES:eGFP序列。

具体实施方式

[0035] 在描述本发明之前,应当理解的是,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求的限制。任何实施方式或实施方式的特征可以彼此组合,并且这样的组合明确地涵盖在本发明的范围内。上文或本文讨论

的任何具体值可以与上文或本文讨论的另一相关值组合以列举范围,该范围具有代表该范围的上端和下端的值,并且这样的范围涵盖在本公开的范围之内。

[0036] 除非另有限定,否则本文使用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。如本文所用,当用于引用所列举的特定数值时,术语“约”意指该数值可以与所引用的值相差不超过1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101以及其之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0037] 现在描述优选的方法和材料,然而类似或等效于本文描述的那些方法和材料的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0038] 定义

[0039] 如本文所用,表述“BCMA”是指B细胞成熟抗原。BCMA(也称为TNFRSF17和CD269)是在恶性浆细胞上表达的细胞表面蛋白,并且在调节B细胞成熟和分化为产生免疫球蛋白的浆细胞中起着核心作用。如本文所用,“BCMA”是指人类BCMA蛋白,除非被指定为来自非人类物种(例如,“小鼠BCMA”、“猴子BCMA”等)。人类BCMA蛋白具有SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列。

[0040] 如本文所用,“结合BCMA的抗体”或“抗BCMA抗体”包括特异性识别BCMA的抗体及其抗原结合片段。

[0041] 术语“配体结合域”和“抗原结合域”在本文中可互换使用,并且是指嵌合抗原受体或相应抗体与预定抗原(例如,BCMA)特异性结合的部分。引用“相应抗体”是指衍生出嵌合抗原受体中使用的CDR或可变区(HCVR和LCVR)的抗体。例如,实例2中讨论的嵌合抗原受体构建体包括具有衍生自特异性抗BCMA抗体的可变区的scFv。这些抗BCMA抗体是针对各个嵌合抗原受体的“相应抗体”。

[0042] 如本文所用,术语“抗体”是指包括与特定抗原(例如,BCMA)特异性结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子,免疫球蛋白分子包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链、以及其多聚体(例如IgM)。术语“抗体”还包括这样的免疫球蛋白分子:其包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包括重链可变区(本文缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括三个域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个域(C_L1)。可以将 V_H 区和 V_L 区进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着更保守的被称作框架区(FR)的区域。每个 V_H 和 V_L 包括三个CDR和四个FR,按以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方式中,抗BCMA抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人类种系序列相同,或者可以是天然的或人工修饰的。可以基于两个或更多个CDR的并列分析来定义氨基酸共有序列。

[0043] 如本文所用,术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术衍生自完整抗体分子,如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变以及任选地恒定域的DNA的重组基因工程技术。这种DNA是已知的和/或

易于从例如商业来源、DNA库(包括,例如,噬菌体-抗体文库)获得,或可以合成。DNA可以通过化学方法或通过分子生物学技术进行测序和操作,例如,将一个或多个可变和/或恒定域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0044] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 最小识别单元,其由模拟抗体的高变区(例如,经分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其它工程分子,如域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等),小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼变异IgNAR域也涵盖在本文所使用的表述“抗原结合片段”内。

[0045] 抗体的抗原结合片段通常包括至少一个可变域。可变域可以具有任何大小或氨基酸组成,并且通常包括与一个或多个框架序列相邻或在框架内的至少一个CDR。在具有与V_L域相关联的V_H域的抗原结合片段中,V_H域和V_L域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且含有V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体V_H或V_L域。

[0046] 在某些实施方式中,抗体的抗原结合片段可以含有至少一个与至少一个恒定域共价连结的可变域。可以在本发明的抗体的抗原结合片段内发现的可变域和恒定域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H-C_H1;(ii) V_H-C_H2;(iii) V_H-C_H3;(iv) V_H-C_H1-C_H2;(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi) V_H-C_H2-C_H3;(vii) V_H-C_L;(viii) V_L-C_H1;(ix) V_L-C_H2;(x) V_L-C_H3;(xi) V_L-C_H1-C_H2;(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii) V_L-C_H2-C_H3;以及(xiv) V_L-C_L。在可变区和恒定区的任何构型中,包括上文所列出的任何示例性构型、可变域和恒定域可以彼此直接连结或可以通过完整或部分铰链或接头区域连结。铰链区可以由至少2个(例如,5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其引起单个多肽分子中相邻可变域和/或恒定域之间的柔性或半柔性连结。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包括上文所列出的任何可变域和恒定域构型的同二聚体或异二聚体(或其它多聚体),其彼此非共价缔合和/或与一个或多个单体V_H或V_L域非共价缔合(例如,通过一个或多个二硫键)。

[0047] 在某些实施方式中,抗BCMA抗体是人类抗体。如本文所用,术语“人类抗体”旨在包括具有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人类抗体可以包括并非由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变),例如在CDR区中,特别是在CDR3区中。然而,如本文所用,术语“人类抗体”不旨在包括这样的抗体:其中,衍生自另一种哺乳动物物种的种系(如小鼠)的CDR序列已经移植到人类框架序列上。

[0048] 在一些实施方式中,抗体可以是重组人类抗体。如本文所用,术语“重组人类抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,如:使用转染到宿主细胞(下文进一步描述)内的重组表达载体表达的抗体;从重组、组合人类抗体库(下文进一步描述)中分离的抗体;从对于人类免疫球蛋白基因而言为转基因的动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见,例如,Taylor等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295);或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述其他方式包括将人类免疫球蛋白基因序列拼接到其他DNA序列上。这种重组人类抗体具有从人类种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区。

然而,在某些实施方式中,此类重组人类抗体经历体外诱变(或,当使用转基因人类Ig序列的动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的 V_H 区和 V_L 区的氨基酸序列是如下序列:虽然衍生自人类种系 V_H 序列和 V_L 序列并与之相关,但可能并非天然体内存在于人类抗体种系库中。

[0049] 人类抗体可以以与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括大约150-160kDa的稳定四链构建体,其中,二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成约75-80kDa的分子,其由共价偶联的轻链和重链(半抗体)构成。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0050] 在各种完整IgG同种型中出现第二种形式的频率是基于但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构差异。人类IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以显著降低第二种形式的出现(Angal等人(1993)Molecular Immunology 30:105)到通常使用人类IgG1铰链所观察到的水平。本发明涵盖在铰链、 C_H2 区或 C_H3 区具有一个或多个突变的抗体,其可能是例如,在生产中所期望的,以提升所期望的抗体形式的产量。

[0051] 抗体可以是分离的抗体。如本文所用,“分离的抗体”是指已经从其天然环境的至少一种组分中识别和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分,或从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或除去的抗体是用于本发明的目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方式,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学品。

[0052] 如与衍生抗体的相应种系序列相比,本文公开的抗BCMA抗体可以在重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如,公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包括抗体及其抗原结合片段,其衍生自本文公开的任何氨基酸序列,其中一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为衍生抗体的种系序列的一个或多个相应残基,或突变为另一种人类种系序列的一个或多个相应残基,或突变为一个或多个相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地生产包括一个或多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施方式中, V_H 域和/或 V_L 域内的全部框架和/或CDR残基突变回在衍生出抗体的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施方式中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其它实施方式中,框架中和/或一个或多个CDR残基的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗体可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基可以维持或突变为不同种系序列的对应残基。一旦获得,可以容易地测试含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或多种所期望的特性,如经改善的结合特异性、增加的结合亲和力、经改善或增强的拮抗或激动的生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本发明内。

[0053] 抗BCMA抗体可以包括本文公开的具有一个或多个保守取代的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如,抗BCMA抗体可以具有HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,其相对于本文阐述的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列具有例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0054] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子的可变区中的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个的表位。因此,不同的抗体可以结合抗原上的不同区域,并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位通过来自线性多肽链的不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0055] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一种核酸(或其互补链)最佳对齐时,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量的为至少约95%,更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基的核苷酸序列同一性,如下文所讨论的。在某些情况下,具有与参考核酸分子基本同一性的核酸分子可以编码具有与由参考核酸分子编码的多肽相同或基本上类似的氨基酸序列的多肽。

[0056] 当应用于这些多肽时,术语“基本相似性”或“基本上相似”是指如通过程序GAP或BESTFIT使用默认间隙权重最佳对齐时的两个肽序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有化学特性(例如,电荷或疏水性)类似的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。总体而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见,例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331,其通过引用并入本文。具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸与苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及(7)含硫侧链:半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-苯丙氨酸-酪氨酸-赖氨酸-精氨酸-丙氨酸-缬氨酸-谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。可替代地,保守替代是在通过引用并入本文的Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替代是PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0057] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列相似性,也称为序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰,包括保守氨基酸取代的相似性的测量来匹配类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit等程序,所述程序可以与默认参数一起使用,以确定紧密相关的多肽,如来自不同生物体物种的同源多肽之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如,GCG Version 6.1.还可以使用FASTA(GCG Version 6.1中的程序)利用默认的或推荐的参数来比较多肽序列。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的对齐和序列一致

性百分比 (Pearson (2000), 同上文)。当比较本发明的序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库时, 另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST, 尤其是BLASTP或TBLASTN。参见, 例如, Altschul等人 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410和Altschul等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, 其各自通过引用并入本文。

[0058] 如本文所用, 术语“核酸”或“多核苷酸”是指: 核苷酸和/或多核苷酸, 例如脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA); 寡核苷酸; 通过聚合酶链反应 (PCR) 产生的片段; 以及通过连接、分裂、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用产生的片段。核酸分子可以由作为天然存在的核苷酸 (例如DNA和RNA) 的单体、或天然存在的核苷酸的类似物 (例如, 天然存在的核苷酸的对映体形式) 或两者的组合组成。修饰的核苷酸可以在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分中具有变化。糖修饰包括, 例如, 用卤素、烷基、胺和叠氮基取代一个或多个羟基, 或者糖可以被官能化为醚或酯。此外, 整个糖部分可以被空间上和电子上相似的结构代替, 例如氮杂糖和碳环糖类似物。碱基部分的修饰的实例包括烷基化的嘌呤和嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶或其他众所周知的杂环取代基。核酸单体可以通过磷酸二酯键或此类连结的类似物连结。核酸可以是单链或双链的。

[0059] 术语“嵌合抗原受体” (CAR) 是指这样的分子: 其将针对靶细胞上存在的组分的结合域——例如对所需抗原 (例如肿瘤抗原, 例如BCMA) 的基于抗体的特异性——与T细胞受体激活胞内域组合, 以产生表现出特定的抗靶细胞免疫活性的嵌合蛋白。通常, CAR由与T细胞抗原受体复合物Zeta链的胞内信号传导域融合的胞外单链抗体结合域 (scFv) 组成, 并在T细胞中表达时具有基于单克隆抗体的特异性重定向抗原识别的能力。

[0060] 如本文所用, 术语“载体”包括但不限于病毒载体、质粒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子, 其可由染色体、非染色体、半合成或合成核酸组成。在一些情况下, 载体是能够自主复制的载体 (附加载体) 和/或能够表达与其连结的核酸的载体 (表达载体)。大量合适的载体是本领域技术人员已知的并且可商购。病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒 (例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒 (例如正粘病毒 (如流感病毒)、弹状病毒 (如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒 (如麻疹和仙台病毒))、正链RNA病毒 (例如小核糖核酸病毒和甲型病毒) 以及双链DNA病毒 (包括腺病毒、疱疹病毒 (如1型和2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒) 和痘病毒 (如痘苗、鸡痘和金丝雀痘))。例如, 其他病毒包括诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、巴氏病毒、嗜肝dna病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括: 禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组和慢病毒。

[0061] “共刺激域”或“共刺激分子”是指T细胞上与共刺激配体特异性结合从而介导细胞的共刺激反应 (例如但不限于增殖) 的同源结合配偶体。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和To11配体受体。共刺激分子的实例包括CD27、CD28、CD8、4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 99)、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和与CD83特异性结合的配体等。共刺激分子是有效免疫反应所需的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。

[0062] “共刺激配体”是指抗原呈递细胞上的一种分子, 该分子与T细胞上的同源共刺激分子特异性结合, 从而除了提供初级信号 (例如通过将TCR/CD3复合物与加载有肽的MHC分子结合来提供) 以外, 还提供介导T细胞反应 (包括但不限于增殖激活、分化等) 的信号。共刺激配体可以包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导

型共刺激配体 (ICOS-L)、胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、M1CB、HVEM、淋巴毒素beta受体、3/TR6、ILT3、ILT4、结合Toll配体受体的激动剂或抗体、以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0063] “共刺激信号”是指这样的信号,其与初级信号(诸如TCR/CD3连接)结合,引起T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调。

[0064] 如本文所用,术语“胞外配体结合域”是指能够结合配体(例如细胞表面分子)的寡核苷酸或多肽。例如,可以选择胞外配体结合域以识别在与特定疾病状态(例如癌症)相关的靶细胞上充当细胞表面标记的配体。可以充当配体的细胞表面标记的实例包括那些与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关的标记。

[0065] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”包括动物界的所有成员,包括非人类灵长类动物和人类。在一个实施方式中,患者是患有癌症(例如多发性骨髓瘤)的人类。

[0066] 如本文所用,CAR的“信号转导域”或“信号传导域”负责胞外配体结合域与靶标结合后的胞内信号传导,从而引起免疫细胞的激活和免疫反应。换句话说,信号转导域负责在其中表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的激活。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“信号转导域”是指蛋白质的一部分,其转导效应子功能信号并引导细胞执行专门的功能。用于CAR的信号转导域的实例可以是T细胞受体和共受体(它们共同作用以在抗原受体接合后启动信号转导)的胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体及具有相同功能的任何合成序列。在一些情况下,信号传导域包括两类不同的胞质信号传导序列:一类胞质信号传导序列启动抗原相关的初级激活,而另一类胞质信号传导序列以非抗原相关的方式起作用以提供次级或共刺激信号。初级胞质信号传导序列可以包括信号传导基序,其被称为ITAM的基于免疫受体酪氨酸的激活基序。ITAM是存在于各种受体的胞浆内尾部中的明确定义的信号传导基序,其充当syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点。示例性ITAM包括衍生自TCRzeta、FcRgamma、FcRbeta、FcRepsilon、CD3gamma、CD3delta、CD3epsilon、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一些实施方式中,CAR的信号转导域可以包括CD3zeta信号传导域(SEQ ID NO:100)。

[0067] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0068] 嵌合抗原受体 (CAR) 将T细胞特异性重定向至在细胞(例如癌细胞)表面表达的抗体识别抗原,而T细胞受体 (TCR) 扩展了靶标范围,包括胞内抗原(例如肿瘤抗原)。

[0069] 本发明的一个方面包括对在恶性浆细胞表面表达的B细胞成熟抗原 (BCMA) 具有特异性的嵌合抗原受体 (CAR)。在本发明的一个实施方式中,本文所述的CAR包括胞外靶特异性结合域、跨膜域、胞内信号传导域(例如衍生自CD3zeta或FcRgamma的信号传导域)和/或一个或多个衍生自共刺激分子的共刺激信号传导域,例如但不限于4-1BB。在一个实施方式中,CAR包括在胞外结合域和跨膜域之间的铰链或间隔区,例如CD8alpha铰链。

[0070] CAR的结合域或胞外域使CAR具有结合目标靶抗原的能力。结合域(例如,配体结合域或抗原结合域)可以是具有特异性识别并结合生物分子(例如,细胞表面受体或肿瘤蛋白,或其组分)的能力的任何蛋白质、多肽、寡肽或肽。结合域包括目标生物分子的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。例如,并且如本文进一步描述的,结合域可以是抗体的轻链和重链可变区,或者轻链和重链可变区可以单链和以任一定向连接在一起(例如,VL-VH或VH-VL)。已知用于鉴定本公开的与特定靶标特异性结合的结合域的多

种测定法,包括蛋白质印迹、ELISA、流式细胞术或表面等离子共振分析(例如,使用BIAcore分析)。靶标可以是临床需要的抗原,期望触发针对该抗原的效应子免疫反应,引发杀死肿瘤。在一个实施方式中,嵌合抗原受体的结合域的靶抗原是肿瘤细胞(特别是B细胞谱系的肿瘤细胞,例如多发性骨髓瘤细胞)表面上的BCMA蛋白。

[0071] 例示性配体结合域包括抗原结合蛋白,例如抗体的抗原结合片段,例如scFv、scTCR、受体的胞外域、细胞表面分子/受体的配体或其受体结合域以及肿瘤结合蛋白。在某些实施方式中,本发明的CAR中包括的抗原结合域可以是可变区(Fv)、CDR、Fab、scFv、VH、VL、域抗体变体(dAb)、骆驼科抗体(VHH)、纤连蛋白3域变体、锚蛋白重复序列变体和源自其他蛋白支架的其他抗原特异性结合域。

[0072] 在一个实施方式中,CAR的结合域是抗BCMA单链抗体(scFv),并且可以是鼠类、人类或人源化的scFv。可以从对所需靶标特异的杂交瘤的V区基因克隆单链抗体。在例如Orlandi等人,PNAS,1989;86:3833-3837中已有描述可以用于克隆可变区重链(VH)和可变区轻链(VL)的技术。因此,在某些实施方式中,结合域包括抗体衍生的结合域,但可以是非抗体衍生的结合域。抗体衍生的结合域可以是抗体的片段或抗体的一个或多个片段的基因工程化产物,该片段参与与抗原的结合。

[0073] 在某些实施方式中,本发明的CAR可以包括为分子的适当间隔和构象而添加的在各个域之间的接头。例如,在一个实施方式中,在结合域VH或VL之间可以存在接头,其长度可以在1-10个氨基酸之间。在其他实施方式中,嵌合抗原受体的任何域之间的接头的长度可以在1-20个氨基酸之间或为20个氨基酸长。就这一点而言,接头可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长。在进一步的实施方式中,接头可以是21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸长。包括本文所述数字的范围也包括在本文中,例如,长度为10-30个氨基酸的接头。

[0074] 在某些实施方式中,适用于本文所述的CAR的接头是柔性接头。可以容易地选择合适的接头,并且其可以具有任何合适的不同长度,例如从1个氨基酸(例如,Gly)至20个氨基酸,从2个氨基酸至15个氨基酸,从3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸,5个氨基酸至9个氨基酸,6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0075] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(其中,n是至少为一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对来说是无结构的,因此能够用作融合蛋白(例如本文所述的CAR)的域之间的中性系链。甘氨酸访问甚至比丙氨酸显著更phi-psi的空间,并且比具有较长侧链的残基所受的限制要少得多(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,CAR的设计可以包括全部或部分柔性的接头,使得接头可以包括柔性接头以及一个或多个赋予较不柔性的结构以提供期望的CAR结构的部分。具体的接头包括(G4S)_n接头,其中n=1-3,如SEQ ID NO:95-97所示,以及SEQ ID NO:96所示的接头。

[0076] 在CAR的结合域之后可以存在“间隔区”或“铰链”,其是指这样的区域:所述区域将抗原结合域移离效应子细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活(Patel等人,Gene Therapy,1999;6:412-419)。CAR中的铰链区通常在跨膜(TM)和结合域之间。在某

些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白铰链区,并且可以是野生型免疫球蛋白铰链区或改变的野生型免疫球蛋白铰链区。在本文所述的CAR中所使用的其他示例性铰链区包括衍生自I型膜蛋白(诸如CD8alpha、CD4、CD28和CD7)的胞外区域的铰链区,其可以是来自这些分子的野生型铰链区或可以被改变。在一个实施方式中,铰链区包括CD8alpha铰链(SEQ ID NO: 97)。

[0077] “跨膜”区或域是CAR的一部分,其将胞外结合部分锚固至免疫效应子细胞的质膜,并促进结合域与靶抗原的结合。跨膜域可以是CD3zeta跨膜域,然而可以使用的其他跨膜域包括从CD8alpha、CD4、CD28、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154获得的那些。在一个实施方式中,跨膜域是CD137的跨膜域。在一些实施方式中,所述跨膜域包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在某些实施方式中,跨膜域是合成的,在这种情况下,其将主要包括疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。

[0078] “胞内信号传导域”或“信号传导域”是指嵌合抗原受体蛋白的一部分,其参与将与靶抗原结合的有效CAR的信息转导至免疫效应子细胞的内部以引发效应子细胞功能,例如激活、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括向与CAR结合的靶细胞释放细胞毒性因子,或利用与胞外CAR域结合的抗原引起的其他细胞反应。术语“效应子功能”是指细胞的专门功能。T细胞的效应子功能例如可以是溶细胞活性或帮助或包括细胞因子分泌的活性。因此,本文可互换使用的术语“胞内信号传导域”或“信号传导域”是指转导效应子功能信号并引导细胞执行专门功能的蛋白质部分。尽管通常可以使用整个胞内信号传导域,但是在许多情况下,不必使用整个域。就使用胞内信号传导域的截短部分而言,只要其转导效应子功能信号,就可以使用该截短部分代替整个域。术语“胞内信号传导域”意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导域的任何截短部分。胞内信号传导域也被称为“信号转导域”,并且通常衍生自人类CD3或FcRγ链的部分。

[0079] 已知仅通过T细胞受体产生的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次级或共刺激信号。因此,可以说T细胞激活是由两类不同的胞质信号传导序列介导的:通过T细胞受体启动抗原相关性初级激活的那些序列(初级胞质信号传导序列)和以非抗原相关性方式起作用来提供次级或共刺激信号的那些序列(次级胞质信号传导序列)。以共刺激方式起作用的胞质信号传导序列可以包含信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0080] 在本发明中特别使用的包含ITAM的初级胞质信号传导序列的实例包括衍生自TCRzeta、FcRgamma、FcRbeta、CD3gamma、CD3delta、CD3epsilon、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个特定的实施方式中,本文所述的抗BCMA CAR的胞内信号传导域衍生自CD3zeta。在一些实施方式中,信号传导域包括SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0081] 如本文所用,术语“共刺激信号传导域”或“共刺激域”是指CAR的包括共刺激分子的胞内域的部分。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体以外的细胞表面分子,其在结合抗原后提供T淋巴细胞的有效激活和功能所需的第二信号。这种共刺激分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS(CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2和特异性结合CD83的配体。因此,尽管本公开提供了衍生自CD3zeta和4-1BB的示例性共刺激域,但是其他共刺激域也被考虑与本文所述的CAR一起使用。包括一个或多个共刺激性信号传导域可以增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。胞内信号传导和共刺激

信号传导域可以以任何顺序串联连结至跨膜域的羧基端。在一些实施方式中,共刺激域包括SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0082] 尽管工程化为包含来自CD3或FcRgamma的信号传导域的基于scFv的CAR被示出为T细胞激活和效应子功能提供强力信号,但其在不存在伴随的共刺激信号的情况下不足以引发促进T细胞存活和扩增的信号。包含结合域、铰链、跨膜和衍生自CD3zeta或FcRgamma的信号传导域以及一个或多个共刺激信号传导域(例如,衍生自CD28、CD137、CD134和CD278的胞内共刺激域)的其他CAR可以更有效地引导在体外以及在动物模型和癌症患者中表达CAR的T细胞具有抗肿瘤活性以及增加的细胞因子分泌、裂解活性、存活和增殖(Milone等人,Molecular Therapy,2009;17:1453-1464;Zhong等人,Molecular Therapy,2010;18:413-420;Carpenito等人,PNAS,2009;106:3360-3365)。

[0083] 在各种实施方式中,本发明的BCMA CAR包括:(a)抗BCMA scFv作为结合域(例如,具有来自表1中标识的任何一种或多种BCMA抗体的结合区(例如,CDR或可变域)的scFv), (b)衍生自人类CD8alpha的铰链区, (c)人类CD8alpha跨膜域,和(d)人类T细胞受体CD3zeta链(CD3)胞内信号传导域,以及任选地一个或多个共刺激信号传导域,例如4-1BB。在一个实施方式中,不同的蛋白质域从氨基到羧基端按以下顺序排列:结合域、铰链区和跨膜域。胞内信号传导域和任选的共刺激信号传导域以任何顺序串联连结至跨膜羧基端,以形成单链嵌合多肽。在一个实施方式中,编码BCMA CAR的核酸构建体是包括核酸分子的嵌合核酸分子,该核酸分子包括不同的编码序列,例如(5'至3')人类抗BCMA scFv、人类CD8alpha铰链、人类CD8alpha跨膜域和CD3zeta胞内信号传导域的编码序列。在另一个实施方式中,编码BCMA CAR的核酸构建体是包括核酸分子的嵌合核酸分子,该核酸分子包括不同的编码序列,例如(5'至3')人类抗BCMA scFv、人类CD8alpha铰链、人类CD8alpha跨膜域、4-1BB共刺激域和CD3zeta共刺激域的编码序列。

[0084] 在某些实施方式中,将编码本文所述的CAR的多核苷酸插入载体。载体是这样的载具:可以将编码蛋白质的多核苷酸共价插入到该载具中,以便引发该蛋白质的表达和/或多核苷酸的克隆。这样的载体也可以称为“表达载体”。可以使用本领域已知的任何合适方法将分离的多核苷酸插入载体,例如但不限于,可以使用合适的限制酶消化该载体,然后可以将其与具有匹配的限制性端的分离的多核苷酸连接。表达载体具有掺入并表达编码至少一部分能够在细胞中转录的基因产物的异源或修饰核酸序列的能力。在大多数情况下,RNA分子然后被翻译成蛋白质。表达载体可以包括多种控制序列,其是指在特定宿主生物体中有效连接的编码序列的转录和可能翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列外,载体和表达载体还可包括具有其他功能的核酸序列,并在下文中讨论。表达载体可以包括其他元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以在两种生物体中维持,例如在人类细胞中进行表达,并在原核宿主中进行克隆和扩增。

[0085] 表达载体可以具有必需的5'上游和3'下游调节元件,例如启动子序列,例如CMV、PGK和EF1alpha启动子、核糖体识别和结合TATA盒、以及3'UTR AAUAAA转录终止序列,以在其各自的宿主细胞中进行有效的基因转录和翻译。其他合适的启动子包括猿猴病毒40(SV40)早期启动子的组成型启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、HIV LTR启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、EBV立即早期启动子和劳斯肉瘤病毒启动子。也可以使用人类基因启动子,包括但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶

启动子。在某些实施方式中,诱导型启动子也被认为是表达嵌合抗原受体的载体的一部分。这提供了能够开启目的多核苷酸序列的表达或关闭表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫氨酸启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子或四环素启动子。

[0086] 表达载体可以具有并入表达的CAR中的其他序列,例如6x-组氨酸、c-Myc和FLAG标签。因此,表达载体可以被工程化为包含5'和3'非翻译调控序列,其有时可以充当这样的增强子序列、启动子区域和/或终止子序列:其可以促进或增强表达载体上所携带的目标核酸的有效转录。表达载体还可以被改造用于在特定细胞类型、细胞位置或组织类型中的复制和/或表达功能(例如,转录和翻译)。表达载体可以包括用于在宿主或受体细胞中维持载体的选择标记。

[0087] 在各种实施方式中,载体是质粒、自主复制序列和转座元件。其他示例性载体包括但不限于质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体(例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC))、噬菌体(例如lambda噬菌体或M13噬菌体)以及动物病毒。可用作载体的动物病毒类别的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳头病毒(例如SV40)。表达载体的实例是用于在哺乳动物细胞中表达的Lenti-X™双顺反子表达系统(Neo)载体(Clontech)、pCIneo载体(Promega);pLenti4/V5-DEST.TM.、pLenti6/V5-DEST.TM.和pLenti6.2N5-GW/lacZ(Invitrogen),用于哺乳动物细胞中的慢病毒介导的基因转移和表达。可将本文公开的CAR的编码序列连接到此类表达载体中,以在哺乳动物细胞中表达嵌合蛋白。

[0088] 在某些实施方式中,在病毒载体中提供了编码本发明的CAR的核酸。病毒载体可以是衍生自逆转录病毒、慢病毒或泡沫病毒的载体。如本文所用,术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包括至少一种病毒起源的元件并且具有被包装到病毒载体颗粒中的能力。病毒载体可以包括非必需病毒基因的本文所述的各种嵌合蛋白的编码序列。可以将载体和/或颗粒用于在体外或在体内将DNA、RNA或其他核酸转移到细胞中的目的。多种形式的病毒载体是本领域已知的。

[0089] 在某些实施方式中,包含本文描述的CAR的编码序列的病毒载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要来源于逆转录病毒的结构和功能遗传元件的载体。术语“慢病毒载体”是指在LTR之外包括主要来自慢病毒的结构和功能遗传元件的载体。

[0090] 用于本文的逆转录病毒载体可以衍生自任何已知的逆转录病毒(例如,c型逆转录病毒,例如莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、Friend、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯肉瘤病毒(RSV))。本发明的“逆转录病毒”还包括人类T细胞白血病病毒、HTLV-1和HTLV-2、以及逆转录病毒的慢病毒家族,例如人类免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马免疫缺陷病毒(EIV)和其他类别的逆转录病毒。

[0091] 本文使用的慢病毒载体是指衍生自慢病毒(一种引起缓慢发展的疾病的逆转录病毒的类(或属))的载体。该类中所包括的病毒包括HIV(人类免疫缺陷病毒;包括1型HIV和2型HIV);羊进行性间质肺炎(visna-maedi);山羊关节炎-脑炎病毒;马传染性贫血病毒;猫

免疫缺陷病毒 (FIV) ;牛免疫缺陷病毒 (BIV) ;和猿猴免疫缺陷病毒 (SIV) 。重组慢病毒的制备可以使用根据Dull等人和Zufferey等人 (Dull等人, J.Virol., 1998; 72: 8463-8471和Zufferey等人, J.Virol. 1998; 72: 9873-9880) 的方法来实现。

[0092] 可以使用标准克隆技术、通过以本文所述的顺序和定向组合所需的DNA序列来形成用于本发明的逆转录病毒载体 (即, 慢病毒和非慢病毒两者) (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. 等人 (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), 第9.10-9.14节和其他标准实验室手册; Eglitis等人 (1985) Science 230: 1395-1398; Danos和Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460-6464; Wilson等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3014-3018; Armentano等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6141-6145; Huber等人 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8039-8043; Ferry等人 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8377-8381; Chowdhury等人 (1991) Science 254: 1802-1805; van Beusechem等人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7640-7644; Kay等人 (1992) Human Gene Therapy 3: 641-647; Dai等人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10892-10895; Hwu等人 (1993) J. Immunol 150: 4104-4115; 美国专利号4,868,116; 美国专利号4,980,286; PCT申请WO 89/07136; PCT申请WO 89/02468; PCT申请WO 89/05345; 以及PCT申请WO 92/07573)。

[0093] 获得用于形成载体的逆转录病毒 (即慢病毒和非慢病毒两者) 序列的合适来源包括, 例如, 基因组RNA和cDNA, 其可从商购来源获得, 包括马里兰州罗克维尔的类型培养物保藏中心 (ATCC)。序列也可以化学合成。

[0094] 为了表达BCMA CAR, 可以将载体引入宿主细胞以允许多肽在宿主胞内表达。表达载体可以包括多种用于控制表达的元件, 包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择标记和信号序列。如上所述, 这些元素可以由本领域普通技术人员适当地选择。例如, 可以选择启动子序列以促进载体中多核苷酸的转录。合适的启动子序列包括但不限于T7启动子、T3启动子、SP6启动子、beta-肌动蛋白启动子、EF1a启动子、CMV启动子和SV40启动子。可以选择增强子序列以增强多核苷酸的转录。可以选择选择标记以允许从那些载体中选择没有插入载体的宿主细胞, 例如, 选择标记可以是赋予抗生素抗性的基因。可以选择信号序列以使表达的多肽被转运到宿主细胞之外。

[0095] 为了克隆多核苷酸, 可以将载体引入宿主细胞 (分离的宿主细胞) 中, 以允许载体自身复制, 从而扩增其中所含多核苷酸的拷贝。克隆载体可以含有序列成分, 通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择标记。这些要素可以由本领域普通技术人员适当地选择。例如, 可以选择复制起点以促进载体在宿主细胞中的自主复制。

[0096] 在某些实施方式中, 本公开提供了包含本文提供的载体的分离的宿主细胞。包含载体的宿主细胞可用于表达或克隆包括在载体中的多核苷酸。合适的宿主细胞可包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或更高等的真核细胞, 例如哺乳动物细胞。用于该目的的合适的原核细胞包括但不限于: 真细菌, 诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌 (Enterobacteriaceae), 如埃希氏菌属, 例如大肠杆菌、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属, 例如鼠伤寒沙门氏菌、沙雷氏菌, 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和志贺氏菌, 以及芽孢杆菌, 例如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌、

假单胞菌,例如铜绿假单胞菌和链霉菌。

[0097] 使用本领域已知的转染和/或转导技术将本发明的CAR引入宿主细胞。如本文所用,术语“转染”和“转导”是指将外源核酸序列引入宿主细胞的过程。所述核酸可以整合到宿主细胞DNA中或可以染色体外保持。核酸可以瞬时维持或可以是稳定的引入。转染可以通过本领域已知的多种方式来完成,包括但不限于磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、多聚烯介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂质转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和基因枪。转导是指使用病毒或逆转录病毒载体通过病毒感染而不是通过转染来递送基因。在某些实施方式中,逆转录病毒载体通过在与细胞接触之前将其包装入病毒体中来转导。例如,逆转录病毒载体携带的编码BCMA CAR的核酸可以通过感染和前病毒整合被转导到细胞中。

[0098] 如本文所用,术语“基因工程化的”或“基因修饰的”是指将DNA或RNA形式的额外遗传物质添加到细胞的总遗传物质中。术语“基因修饰的细胞”、“修饰的细胞”和“重定向的细胞”可互换使用。

[0099] 特别地,在免疫效应子细胞中引入和表达本发明的CAR,以便将其特异性重定向至目标靶抗原,例如恶性浆细胞,如多发性骨髓瘤。

[0100] 本发明提供了用于制备表达本文所述的CAR的免疫效应子细胞的方法。在一个实施方式中,该方法包括转染或转导自受试者(例如具有BCMA表达的肿瘤细胞的受试者)分离的免疫效应子细胞,使得免疫效应子细胞表达一种或多种本文所述的CAR。在某些实施方式中,免疫效应子细胞是从个体中分离出来的,并且无需进一步的体外操作就可以进行基因修饰。然后将此类细胞直接重新给药给个体。在其他实施方式中,在被基因修饰以表达CAR之前,首先激活免疫效应子细胞并刺激其在体外增殖。在这方面,免疫效应子细胞可以在被基因修饰(即,如本文所述被转导或转染以表达CAR)之前或之后培养。

[0101] 可以在本文所述的免疫效应子细胞的体外操纵或基因修饰之前从受试者获得细胞来源。特别地,与本文所述的CAR一起使用的免疫效应子细胞包括T细胞。T细胞可从多种来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织和肿瘤。在某些实施方式中,可以使用本领域技术人员已知的许多技术(例如FICOLL分离)从收集自受试者的单位血液中获得T细胞。在一个实施方式中,通过单采血液分离术获得来自个体循环血液的细胞。血液分离术产品通常包括淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方式中,可以洗涤通过单采血液分离术收集的细胞以除去血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以进行后续处理。在本发明的一个实施方式中,用PBS洗涤细胞。在另一个实施方式中,洗涤后的溶液缺少钙,并且可能缺少镁,或者可能缺少许多(如果不是全部的话)二价阳离子。如本领域普通技术人员将理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,例如通过使用半自动流通式离心机。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液或其他带或不带缓冲液的盐溶液中。在某些实施方式中,单采血液分离术样品的不想要的成分可以在细胞直接重悬浮的培养基中去除。

[0102] 在某些实施方式中,通过裂解红细胞并消耗单核细胞而从外周血单核细胞(PBMC)中分离T细胞(例如通过经由PERCOLL™梯度离心)。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离T细胞的特定亚群,例如CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞。例如,通过阴性选择

富集T细胞群可以通过针对阴性选择细胞特有的表面标记的抗体组合来完成。本文使用的一种方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,该方法使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标记的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可以用于分离感兴趣的细胞群以用于本发明。

[0103] 使用本文所述的方法,PBMC可直接用于CAR的基因修饰。在某些实施方式中,在分离PBMC之后,进一步分离T淋巴细胞,并且在某些实施方式中,可以在基因修饰和/或扩增之前或之后将细胞毒性和辅助T淋巴细胞分类为原初、记忆和效应T细胞亚群。可以通过使用标准方法获得CD8⁺细胞。在一些实施方式中,通过鉴定与那些类型的CD8⁺细胞中的每一种相关的细胞表面抗原,将CD8⁺细胞进一步分类为原初、中央记忆和效应子细胞。在实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚集中。用抗CD8和抗CD62L抗体染色后,将PBMC分为CD62L⁻CD8⁺和CD62L⁺CD8⁺部分。在一些实施方式中,中央记忆TCM的表型标记的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和CD127,并且对颗粒酶B是阴性的。在一些实施方式中,中央记忆T细胞是CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,效应T细胞对于CD62L、CCR7、CD28和CD127是阴性的,而对于颗粒酶B和穿孔素则是阳性的。在一些实施方式中,原初CD8⁺T淋巴细胞的特征在于原初T细胞的表型标记的表达,包括CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD 127和CD45RA。

[0104] 在某些实施方式中,将CD4⁺T细胞进一步分类为亚群。例如,通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,可以将CD4⁺T辅助细胞分类为原初、中央记忆和效应子细胞。CD4⁺淋巴细胞可以通过标准方法获得。在一些实施方式中,原初CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,中央记忆CD4⁺细胞是CD62L阳性和CD45RO阳性。在一些实施方式中,效应子CD4⁺细胞是CD62L和CD45RO阴性的。

[0105] 免疫效应子细胞,例如T细胞,可以在使用已知方法分离后进行基因修饰,或者在进行基因修饰之前,可以在体外激活和扩增免疫效应子细胞(或在祖细胞的情况下进行分化)。在另一个实施方式中,免疫效应子细胞,例如T细胞,用本文所述的嵌合抗原受体基因修饰(例如,用包括编码CAR的核酸的病毒载体转导),然后在体外被激活和扩增。用于激活和扩增T细胞的方法在本领域中是已知的,并且描述于例如美国专利号6,905,874;美国专利号6,867,041;美国专利号6,797,514;W02012079000中。通常,此类方法包括:在具有适当细胞因子(例如IL-2)的培养基中,使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂(例如抗CD3和抗CD28抗体,通常附着于珠子或其他表面)接触。附着在同一珠子上的抗CD3和抗CD28抗体充当“替代”抗原呈递细胞(APC)。在其他实施方式中,可以使用诸如美国专利号6,040,177;美国专利号5,827,642;和W02012129514中所述的方法,用饲养细胞以及适当的抗体和细胞因子激活和刺激T细胞增殖。

[0106] 本发明提供了修饰的免疫效应子细胞群体用于治疗患有由BCMA表达的肿瘤引起的恶性肿瘤(例如多发性骨髓瘤)的患者,所述修饰的免疫效应子细胞包括本文公开的BCMA CAR。

[0107] 如本文所述制备的CAR表达的免疫效应子细胞可用于根据已知技术的过继性免疫疗法的方法和组合物,或其基于本公开对本领域技术人员显而易见的变型。参见,例如,Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;还请参见Rosenberg的美国专利号4,

690,915。

[0108] 在一些实施方式中,通过首先从细胞的培养基中收获细胞,然后在适合于给药的治疗有效量的介质和容器系统(“药学上可接受的”载体)中洗涤并浓缩细胞来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,通常是生理盐水、Normosol R(Abbott)或Plasma-Lyte A(Baxter),但也可以使用在水中或林格氏乳酸中的5%葡萄糖。输注介质可以补充人类血清白蛋白。

[0109] 组合物中治疗有效量的细胞为至少2个细胞(例如,至少1个CD8+中央记忆T细胞和至少1个CD4+辅助T细胞亚群),或更通常大于 10^2 个细胞,多达 10^6 到包括 10^8 或 10^9 个细胞,并且可以大于 10^{10} 个细胞。细胞的数量将取决于组合物所预期的最终用途,以及其中所含细胞的类型。

[0110] 细胞对于接受治疗的患者可以是自体的或异源的。如果需要的话,如本文所述,治疗还包括给药促分裂原(例如PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)以增强免疫反应的诱导。

[0111] 本发明的表达CAR的免疫效应子细胞群体可以单独给药,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分如IL-2或其他细胞因子或细胞群体组合给药。简而言之,本发明的药物组合物可以包括表达CAR的免疫效应子细胞群体,例如本文所述的T细胞,以及一种或多种药学或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这样的组合物可以包括缓冲剂,例如中性缓冲盐溶液、磷酸盐缓冲盐溶液等;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,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内给药。

[0112] 通过使用本文所述的方法或本领域已知的其他方法给药本文所述的CAR表达的T细胞在受试者中诱导的抗肿瘤免疫反应可包括由能够杀死感染细胞的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫反应、调节性T细胞和辅助性T细胞反应。也可以诱导主要由能够激活B细胞从而导致抗体产生的辅助T细胞介导的体液免疫反应。可以使用多种技术来分析由本发明的组合物诱导的免疫反应的类型,这在本领域中已进行了很好地描述;例如,Current Protocols in Immunology,编辑:John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober(2001) John Wiley&Sons,NY,N.Y.

[0113] 因此,本发明提供了治疗被诊断为或疑似患有造血系统恶性肿瘤或处于发展中的危险的个体的方法,所述造血系统恶性肿瘤的部分特征在于产生免疫球蛋白的浆细胞在骨髓中(例如在多发性骨髓瘤中)异常积累,包括向个体给药治疗有效量的本文所述的CAR表达的免疫效应子细胞。

[0114] 在一个实施方式中,本发明提供了一种治疗被诊断为患有BCMA表达的癌症的受试者的方法,该方法包括从被诊断为患有BCMA表达的癌症的受试者中去除免疫效应子细胞,用包括编码本发明的嵌合抗原受体的核酸的载体基因修饰所述免疫效应子细胞,从而产生修饰的免疫效应子细胞群体,并向同一受试者给药修饰的免疫效应子细胞群体。在一个实施方式中,免疫效应子细胞包括T细胞。

[0115] 用于给药本文所述的细胞组合物的方法包括有效引起重新引入体外基因修饰的免疫效应子细胞的任何方法,所述免疫效应子细胞在受试者体内直接表达本发明的CAR或

者在重新引入免疫效应子细胞的基因修饰的祖细胞时(在引入受试者后分化为表达CAR的成熟免疫效应子细胞)表达。一种方法包括用根据本发明的核酸构建体离体转导外周血T细胞,并将转导的细胞返回受试者。

[0116] 嵌合抗原受体和相应抗体的结合特性

[0117] 如本文所用,在嵌合抗原受体或相应抗体与例如预定抗原(如细胞表面蛋白)或其片段结合的上下文中,术语“结合”通常是指至少两个实体或分子结构之间的相互作用或缔合,例如抗原结合域:抗原相互作用。

[0118] 例如,当在BIAcore 3000仪器中使用抗原作为配体和抗体或嵌合抗原受体作为分析物(或抗配体)通过例如表面等离子共振(SPR)技术测定时,结合亲和力通常对应于约 10^{-7} M或更小的KD值,如 10^{-8} M或更小,如约 10^{-9} M或更小。通常还使用基于细胞的结合策略,如荧光激活细胞分选(FACS)结合测定,并且FACS数据与其它方法(如放射性配体竞争结合和SPR)具有较强相关(Benedict,CA,J Immunol Methods.1997,201(2):223-31;Geuijen,CA等人.J Immunol Methods.2005,302(1-2):68-77)。

[0119] 因此,本发明的嵌合抗原受体或相应抗体与预定抗原或细胞表面分子(受体)结合,所述预定抗原或细胞表面分子(受体)具有对应于 K_D 值的亲和力,所述亲和力比其与非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力低至少十倍。根据本发明,嵌合抗原受体或对应抗体的 K_D 值等于或小于非特异性抗原的十倍以下的亲和力可以被认为是不可检测的结合。

[0120] 术语“ K_D ”(M)是指特定抗原结合结构域的解离平衡常数:抗原相互作用,或相应抗体与抗原的解离平衡常数。 K_D 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 K_D 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强亲和力”涉及较高的形成相互作用的能力并因此涉及较小的 K_D 值,并且相反,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及较低的形成相互作用的能力,并且因此 K_D 值更大。在一些情况下,特定分子(例如,嵌合抗原受体或相应抗体)与其相互作用配偶体分子(例如,抗原X)的结合亲和力(或 K_D)高于该分子(例如,嵌合抗原受体或相应抗体)与另一相互作用配偶体分子(例如抗原Y)的结合亲和力,该较高结合亲和力可以表达为通过将较大的 K_D 值(较低或较弱的亲和力)除以较小的 K_D (较高或较强的亲和力)而确定的结合率,例如表达为5倍或10倍大的结合亲和力,视情况而定。

[0121] 术语“ k_d ”(sec-1或1/s)是指特定抗原结合域:抗原相互作用的解离速率常数,或嵌合抗原受体或相应抗体的解离速率常数。所述值也称为 k_{off} 值。

[0122] 术语“ k_a ”(M-1x sec-1或1/M)是指特定抗原结合域:抗原相互作用的缔合速率常数,或嵌合抗原受体或相应抗体的缔合速率常数。

[0123] 术语“ K_A ”(M-1或1M)是指特定抗原结合域:抗原相互作用的缔合平衡常数,或嵌合抗原受体或相应抗体的缔合平衡常数。通过将 k_a 除以 k_d 获得缔合平衡常数。

[0124] 术语“EC50”或“EC₅₀”是指一半最大有效浓度,其包括嵌合抗原受体的浓度,其在指定的暴露时间后诱导基线和最大值之间的一半响应。EC₅₀基本上代表嵌合抗原受体的浓度,其中观察到其最大效应的50%。在某些实施方式中,EC₅₀值等于本发明的赋予与表达抗原(例如,肿瘤相关抗原,如BCMA)的细胞的半数最大接合的嵌合抗原受体或相应抗体的浓度,其通过例如FACS结合测定来确定。因此,观察到降低的或较弱的结合,所述结合具有增大的EC₅₀或最大有效浓度值的半数。

[0125] 在一个实施方式中,减少的结合可以被定义为增加的 EC_{50} 嵌合抗原受体或相应的抗体浓度,其能够结合至半数最大量的靶细胞。

[0126] 嵌合抗原受体的序列变体

[0127] 与其衍生相应抗体的各个抗原结合域的相应种系序列相比,嵌合抗原受体或本发明可以在重链和轻链可变域的框架和/或CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如,公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明的嵌合抗原受体可以包括衍生自本文公开的任何示例性CDR或可变区氨基酸序列的抗原结合域,其中,一个或多个框架和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为从其衍生相应抗体的种系序列的相应的一个或多个残基,或突变为另一人类种系序列的相应的一个或多个残基,或突变为相应的一个或多个种系残基的保守氨基酸取代(这样的序列变化在本文中统称为“种系突变”)。从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,本领域普通技术人员可以容易地生产包括一个或多个个别种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实例中, V_H 域和/或 V_L 域内的框架和/或CDR残基的全部突变回在最初衍生抗原结合域的原始种系序列中所发现的残基。在其它实施方式中,仅将某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的最后8个氨基酸内所发现的突变后的残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3中发现的突变后的残基。在其它实例中,框架中和/或一个或多个CDR残基的一个或多个突变为不同种系序列(即,与最初衍生抗原结合域的种系序列不同的种系序列)的一个或多个对应的残基。此外,本发明的抗原结合域可以含有框架和/或CDR区内的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基突变为特定种系序列的对应残基,而与原始种系序列不同的某些其它残基可以维持或突变为不同种系序列的对应残基。

[0128] 嵌合抗原受体和相应抗体的生物学特性

[0129] 本发明包括具有抗原结合域的嵌合抗原受体,所述抗原结合域衍生自以高亲和力(例如纳摩尔或亚纳摩尔的 K_D 值)结合人类BCMA的抗体。

[0130] 根据某些实施方式,本发明包括具有抗原结合域的嵌合抗原受体,所述抗原结合域衍生自以表面等离子共振测量的以小于约5nM的 K_D 结合人类BCMA(例如,在25℃下)的相应抗体。在某些实施方式中,相应抗体以这样的 K_D 结合BCMA:小于约20nM、小于约10nM、小于约8nM、小于约7nM、小于约6nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM、小于约800pM、小于约700pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约50pM、或小于约25pM,通过表面等离子共振测量。

[0131] 本发明还包括具有抗原结合域的嵌合抗原受体,该抗原结合域衍生自以25℃的表面等离子共振测量的以大于约10分钟或大于约125分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合BCMA的相应抗体。在某些实施方式中,相应抗体以这样的 $t_{1/2}$ 结合BCMA:大于约3分钟、大于约4分钟、大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟、大于约110分钟、或大于约120分钟,在25℃下通过表面等离子共振测量。

[0132] 本发明还包括具有抗原结合域的嵌合抗原受体,其衍生自与表达内源性BCMA的人类细胞系特异性结合的相应抗体(例如,NCI-H929、MOLP-8或OMP-2),通过FACS结合测定确定。

[0133] 本发明还包括表达BCMA特异性嵌合抗原受体的工程化的细胞,其(i)被BCMA表达的细胞激活,和/或(ii)在携带人类多发性骨髓瘤异种移植物的免疫受损小鼠中显示出对肿瘤生长的抑制作用。

[0134] 抗原结合域的制备

[0135] 对特定抗原(例如,BCMA)具有特异性的本发明的嵌合抗原受体的抗原结合域可以通过本领域已知的任何抗体产生技术来制备。在某些实施方式中,本发明的相应抗体的一种或多种单独组分(例如重链和轻链)衍生自嵌合的、人源化或完全人源抗体。制备此类抗体的方法是本领域熟知的。例如,可以使用VELOCIMMUNE™技术制备一条或多条重链和/或轻链。使用VELOCIMMUNE™技术(或任何其他人类抗体产生技术),首先分离具有人类可变区和小鼠恒定区的针对特定抗原(例如,BCMA)的高亲和力嵌合抗体。对抗体进行表征和选择以获得所需的特征,包括亲和力、选择性、表位等。如本文所述,然后将这些人类可变区(或CDR)掺入嵌合抗原受体的抗原结合域中。

[0136] 多核苷酸和载体

[0137] 本发明还涉及编码本文讨论的嵌合抗原受体的多核苷酸和载体。

[0138] 在各种实施方式中,多核苷酸可包括表达盒或表达载体(例如,用于导入细菌宿主细胞的质粒,或病毒载体,例如用于转染昆虫宿主细胞的杆状病毒载体,或质粒或病毒载体,例如用于转染哺乳动物宿主细胞的慢病毒)。

[0139] 在各种实施方式中,多核苷酸和/或载体包括核酸分子,该核酸分子包括SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:89的核苷酸序列。在各种实施方式中,多核苷酸和/或载体包括编码SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90的氨基酸序列的核苷酸序列。在各种实施方式中,多核苷酸和/或载体包括编码SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:100的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0140] 工程化表达嵌合抗原受体的免疫细胞的方法

[0141] 本发明包括制备用于免疫疗法的免疫细胞的方法,该方法包括将编码本文所述的BCMA-特异性嵌合抗原受体之一的多核苷酸或载体离体引入此类免疫细胞。

[0142] 本发明还涵盖免疫细胞,其包括编码本文讨论的BCMA特异性嵌合抗原受体之一的多核苷酸或慢病毒载体。在一些实施方式中,这些免疫细胞用于免疫疗法(例如,癌症的治疗)。

[0143] 本发明还包括基因修饰免疫细胞以使其更适合于同种异体移植的方法。根据第一方面,可以例如通过使至少一个表达T细胞受体(TCR)的一个或多个组分的基因失活来使免疫细胞同种异体,如WO 2013/176915中所述,其可以与编码或调节HLA或 $\beta 2m$ 蛋白表达的基因的失活相结合。因此,显著降低了移植物抗宿主综合征和移植物排斥的风险。根据本发明的另一方面,可以通过使编码充当“免疫检查点”(充当T细胞激活的调节子,例如PD1或CTLA-4)的蛋白质的基因失活,进一步操纵免疫细胞使其更具活性或限制耗尽。

[0144] 工程化的免疫细胞

[0145] 包括本发明的嵌合抗原受体的免疫细胞(或工程化的免疫细胞)是本发明的另一个目的。在一些情况下,所述免疫细胞是免疫效应子细胞。在一些情况下,免疫细胞是T细胞。在一些情况下,免疫细胞是选自炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞

或辅助性T淋巴细胞的T淋巴细胞。在一些情况下,免疫细胞是CD8+细胞毒性T淋巴细胞。

[0146] 在一些实施方式中,工程化的免疫细胞是包括嵌合抗原受体的人类T细胞,所述嵌合抗原受体从N端到C端包括:(a) 包括抗BCMA单链可变片段(scFv)域的胞外配体结合域,其包括轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR);(b) 铰链;(c) 跨膜域;以及(d) 包括共刺激域和信号传导域的胞质域。

[0147] 在一些实施方式中,工程化的人类T细胞的scFv域包括LCVR/HCVR氨基酸序列对,其包括SEQ ID NO:10/2、26/18、42/34、58/50或74/66的氨基酸序列。在一些情况下,所述铰链包括SEQ ID NO:97的氨基酸序列。在一些情况下,所述跨膜域包括SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在某些情况下,共刺激域是4-1BB共刺激域。在一些情况下,所述4-1BB共刺激域包括SEQ ID NO:99的氨基酸序列。在某些情况下,信号传导域是CD3zeta信号传导域。在一些情况下,所述CD3zeta信号传导域包括SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0148] 在各种实施方式中,工程化的人类T细胞包括嵌合抗原受体,该嵌合抗原受体包括SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

[0149] 生物等效物

[0150] 本发明包括嵌合抗原受体和表达嵌合抗原受体的工程化的细胞,其具有与本文公开的示例性分子的氨基酸序列不同的氨基酸序列,但保留以下能力:结合BCMA;在存在BCMA表达细胞的情况下激活表达嵌合抗原受体的免疫细胞;或抑制BCMA表达肿瘤细胞的生长或增殖。当与亲本序列比较时,此类变体分子可以包括氨基酸的一个或多个添加、缺失或取代,但展现出与所述双特异性抗原结合分子的生物活性基本相同的生物活性。

[0151] 在一个实施方式中,如果在它们的安全性、纯度和效力上没有临床上有意义的差异,则表达本发明的嵌合抗原受体的两个工程改造的免疫细胞是生物等效的。

[0152] 在一个实施方式中,如果患者可以在参考产物和生物产物之间切换一次或多次而不会出现不良反应风险的预期增加,包括与没有进行此类切换的持续治疗相比免疫原性的临床显著变化或有效性降低,则两个生物工程免疫细胞是生物等效的。

[0153] 在一个实施方式中,如果两个工程化的免疫细胞都通过一种或多种使用条件的共同机制起作用(在已知这种机制的范围内),则它们是生物等效的。

[0154] 生物等效性可以通过体内和体外方法证明。生物等效性测量包括,例如,(a) 在人类或其他哺乳动物中进行的体内测试,其中,血液、血浆、血清或其他生物流体中的工程细胞浓度是随时间变化的;(b) 与人类体内生物利用度数据相关并可以合理预测的体外试验;(c) 在人类或其他哺乳动物中进行的体内试验,其中根据时间来测量工程化细胞(或其靶标)的适当急性药理作用;以及(d) 在建立了工程细胞的安全性、功效、生物利用度或生物等效性的良好对照的临床试验中。

[0155] 可以通过例如对残基或序列进行各种取代或缺失生物学活性不需要的末端或内部残基或序列来构建本文所述的示例性工程细胞的生物等效变体。

[0156] 物种选择性和物种交叉反应性

[0157] 根据本发明的某些实施方式,提供了与人类BCMA结合但不与其他物种的BCMA结合的抗原结合域。本发明还包括与人类BCMA和一种或多种非人类物种的BCMA结合的抗原结合域。

[0158] 根据本发明的某些示例性实施方式,提供了这样的抗原结合域:其与人类BCMA结合,并且视情况而定可以结合或不结合小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、猕猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩BCMA。

[0159] 工程化免疫细胞的激活和扩增

[0160] 无论在工程改造的细胞(例如,T细胞)的基因修饰之前还是之后,即使本发明的基因修饰的免疫细胞被激活并独立于抗原结合机制增殖,本发明的免疫细胞(特别是T细胞)通常可以使用例如在美国专利号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和美国专利申请公开号20060121005中描述的方法来进一步激活和扩增。T细胞可在体外或体内扩增。

[0161] 通常,本发明的T细胞通过与刺激CD3 TCR复合物的试剂和T细胞表面上的共刺激分子接触而扩增,以产生T细胞的激活信号。例如,可以使用诸如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)或促有丝凝集素之类的植物血凝素(PHA)之类的化学物质为T细胞产生激活信号。

[0162] 作为非限制性实例,可以在体外刺激T细胞群体,例如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过接触与钙离子载体结合的蛋白激酶C激活子(例如,抑菌素)。为了在T细胞表面上共刺激辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适于刺激T细胞增殖的条件下,使T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。适用于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,Minimal Essential Media或RPMI Media 1640或X-vivo 5, (Lonza)),其可以包含增殖和生存所需的因子,包括血清(例如胎牛或人类血清)、白介素2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGF β 和TNF- α 或技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、血浆化物和还原剂,例如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇酸。介质可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 1和X-Vivo 20、Optimizer,添加了氨基酸、丙酮酸钠和维生素(不含血清)或补充有适当量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使T细胞生长和扩增的细胞因子。抗生素,例如青霉素和链霉素,仅包括在实验培养物中,而不包括在要注入对象的细胞培养物中。将靶细胞维持和支持生长所必需的条件下,例如适当的温度(例如37°C)和大气(例如空气加5%O₂)。暴露于不同刺激时间的T细胞可能表现出不同的特征。

[0163] 在另一个特定的实施方式中,可以通过与组织或细胞共培养来扩增所述细胞。所述细胞还可以在体内给药,例如在将所述细胞给药于受试者后在受试者的血液中扩增。

[0164] 治疗应用

[0165] 本发明包括组合物,其包括表达本发明的嵌合抗原受体的工程化的细胞(例如T细胞)和药学上可接受的媒介物。在某些情况下,工程化的细胞形成药物,特别是用于免疫治疗。在某些情况下,工程化的细胞用于治疗癌症(例如多发性骨髓瘤)。在一些情况下,工程化的细胞用于制造用于免疫疗法和/或治疗癌症(例如,BCMA表达的癌症)的药物。

[0166] 本发明包括这样的方法,该方法包括向需要其的受试者给药治疗组合物,所述治疗组合物包括表达本文所述的嵌合抗原受体的工程化的细胞(例如,T细胞)。治疗组合物可包括表达本文公开的任何嵌合抗原受体的细胞和药学上可接受的载体、稀释剂或媒介物。

如本文所用,表述“有需要的受试者”是指表现出一种或多种癌症的症状或标志的人类或非人类动物(例如,表达肿瘤或患有本文提及的任何癌症的受试者),或以其他方式会受益于对BCMA活性的抑制或降低或BCMA+细胞(例如多发性骨髓瘤细胞)的耗尽。

[0167] 本发明的工程细胞尤其可用于治疗刺激、激活和/或靶向免疫反应将是有益的任何疾病或病症。特别地,本发明的工程细胞可用于治疗、预防和/或改善与BCMA表达或活性或BCMA+细胞增殖有关或由其介导的任何疾病或病症。可以使用本发明的工程化的细胞抑制或杀死的BCMA表达的细胞包括例如多发性骨髓瘤细胞。

[0168] 本发明的工程化的细胞可用于治疗与BCMA表达有关的疾病或病症,例如包括多发性骨髓瘤或其他B细胞或浆细胞癌的癌症,例如**Waldenström**氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤。在一些实施方式中,BCMA表达的疾病或病症是Castleman病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病。根据本发明的某些实施方式,工程化的细胞可用于治疗患有多发性骨髓瘤的患者。根据本发明的其他相关实施方式,提供了包括向患有多发性骨髓瘤的患者给药如本文公开的工程细胞的方法。本领域已知的分析/诊断方法,例如肿瘤扫描等,可用于确定患者是否患有多发性骨髓瘤或另一种B细胞谱系癌症。

[0169] 本发明还包括用于对受试者治疗残留癌症的方法。如本文所使用的,术语“残留癌症”意指在用抗癌疗法治疗后受试者中一种或多种癌细胞的存在或持续存在。

[0170] 根据某些方面,本发明提供了用于治疗与BCMA表达相关的疾病或病症的方法(例如,多发性骨髓瘤),包括在确定受试者患有多发性骨髓瘤之后,向受试者给药本文其他地方描述的工程化的细胞群。例如,本发明包括治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括在受试者接受其他免疫疗法或化学疗法后向患者给药工程化免疫细胞1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间。

[0171] 本文讨论的治疗可以是改善性的、治愈性的或预防性的。治疗可以是自体免疫疗法的一部分,也可以是同种异体免疫疗法的一部分。自体是指用于治疗患者的细胞,细胞系或细胞群均来自患者或人类白细胞抗原(HLA)兼容的供体。同种异体是指用于治疗患者的细胞,细胞系或细胞群不是源自患者而是源自供体。

[0172] 本文描述了可与所公开的方法一起使用的细胞。该疗法可用于治疗被诊断出患有以BCMA表达细胞为特征的恶性前或恶性癌症病状的患者,尤其是以BCMA表达细胞过多为特征的患者。在诸如多发性骨髓瘤的癌症中发现了这种状况。

[0173] 用本发明的工程化的细胞治疗的癌症的类型包括但不限于多发性骨髓瘤、**Waldenström**氏巨球蛋白血症、伯基特淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤、以及其他B细胞或浆细胞癌。在一些实施方式中,工程化的细胞可用于治疗BCMA表达的疾病或病症,例如Castleman病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病。

[0174] 本发明的组合物和方法可用于治疗已表征为具有BCMA表达的细胞或组织,或怀疑具有BCMA表达的细胞或组织的受试者。例如,受益于根据本发明的治疗的受试者包括患有多发性骨髓瘤的受试者。

[0175] 根据本发明的细胞或细胞群的给药可以任何方便的方式进行,包括通过气雾吸入、注射、摄取、输血、植入或移植。本文所述的组合物可通过静脉内或淋巴内注射或腹膜

内、皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、经皮向患者给药。在一个实施方式中,本发明的细胞组合物优选通过静脉内注射给药。

[0176] 细胞或细胞群体的给药可以包括每kg体重给药 10^4 - 10^9 个细胞,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重,包括在那些范围内的所有细胞数的整数值。细胞或细胞群体可以一剂或多剂给药。在一些实施方式中,有效量的细胞以单剂量给药。在一些实施方式中,在一段时间内以多于一剂的剂量给药有效量的细胞。给药时间在医师的判断范围内,并取决于患者的临床状况。细胞或细胞群可以从任何来源获得,例如血库或供体。尽管个体需求变化,但是针对特定疾病或状况的给定细胞类型的有效量范围的确定在本领域技术范围内。有效量是指提供治疗或预防益处的量。给药的剂量将取决于接受者的年龄,健康状况和体重,同时进行的治疗的种类(如果有的话),治疗的频率和所需效果的性质。

[0177] 在一个实施方式中,肠胃外给药有效量的细胞或包括那些细胞的组合物。该给药可以是静脉内给药。在一些情况下,可以通过在肿瘤内注射直接进行给药。

[0178] 在本发明的某些实施方式中,将细胞与任何数量的相关治疗方式结合(例如,在之前,同时或之后)给予患者,所述方法包括但不限于用诸如抗病毒疗法,西多福韦和白介素等药剂治疗-2,MS患者使用阿糖胞苷(也称为ARA-C)或那他珠单抗治疗,牛皮癣患者使用依法利昔单抗治疗或PML患者采用其他治疗。在其他实施方式中,本发明的T细胞可以与化学疗法、放射线、免疫抑制剂(例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫消除剂(例如CAMPATH、抗CD3抗体)或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达雷滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、支原体酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射结合使用。

[0179] 在另一个实施方式中,结合(例如,在之前、同时或之后)骨髓移植、使用任何化学治疗剂(例如氟达拉滨)、外部束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体(例如OKT3或CAMPATH)的T细胞消融疗法,将本发明的细胞组合物给药于患者。在另一个实施方式中,在B细胞消融疗法(例如与CD20起反应的试剂,例如利妥昔单抗)之后给药本发明的细胞组合物。例如,在一个实施方式中,受试者可以接受高剂量化学疗法的标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些实施方式中,在移植后,受试者接受本发明扩增的免疫细胞的输注。在另一个实施方式中,在手术之前或之后给药扩增的细胞。在某些实施方式中,在给药本发明的扩增的免疫细胞之前,可以使用任何方式(例如手术、化学疗法或放射疗法)来减轻肿瘤负荷。在一个实施方式中,在给药本发明的工程化细胞之前减少肿瘤负荷可以减少或预防细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的可能性,或预防与CAR T细胞疗法有关的副作用。

[0180] 组合法

[0181] 本发明提供了包括与一种或多种其他治疗剂组合给药工程化细胞或包括本文所述的任何嵌合抗原受体的细胞群的方法。可以与本发明的细胞或细胞群体组合或联合给药的其他示例性治疗剂包括例如抗肿瘤剂(例如化学治疗剂,包括美法仑、长春新碱(Oncovin)、环磷酰胺(Cytosan)、依托泊苷(VP-16)、阿霉素(Adriamycin)、脂质体阿霉素(Doxil)、奥苯达莫司汀(Treanda)或已知有效治疗受试者的浆细胞肿瘤的任何其他治疗剂)。在一些实施方式中,第二治疗剂包括类固醇。在一些实施方式中,第二治疗剂包括靶向治疗剂,包括沙利度胺、来那度胺和硼替佐米,其是批准用于治疗新诊断患者的治疗剂。来那度胺、泊马度胺、硼替佐米、卡非佐米、帕比司他、伊沙佐米、艾洛珠单抗和达雷木单抗是有效治疗复发性骨髓瘤的第二治疗剂的实例。在某些实施方式中,第二治疗剂是包括放射

疗法或干细胞移植的方案。在某些实施方式中,第二治疗剂可以是免疫调节剂。在某些实施方式中,第二治疗剂可以是蛋白酶体抑制剂,包括硼替佐米(Velcade)、卡非佐米(Kyprolis)、伊沙佐米(Ninlaro)。在某些实施方式中,第二治疗剂可以是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,例如帕比司他(Farydak)。在某些实施方式中,第二治疗剂可以是单克隆抗体、抗体药物缀合物、与抗肿瘤剂缀合的双特异性抗体、检查点抑制剂或其组合。可以与本发明的抗原结合分子组合有益地给药的其他试剂包括细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂和与细胞因子结合的抗体,例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18或其各自的受体。本发明的药物组合物(例如,包括本文公开的工程化的细胞或细胞群的药物组合物)也可以作为治疗方案的一部分给药,所述治疗方案包括一种或多种选自本文所述以外的单克隆抗体的治疗组合,其可以与以下各项相互作用:浆细胞表面的另一种抗原;双特异性抗体,其一个臂与肿瘤细胞表面的抗原结合,而另一臂与T细胞上的抗原结合;抗体药物结合物;与抗肿瘤剂偶联的双特异性抗体;检查点抑制剂(例如靶向PD-1或CTLA-4的抗体);或其组合。在某些实施方式中,检查点抑制剂可选自PD-1抑制剂,例如派姆单抗(Keytruda)、尼武单抗(Opdivo)或塞米普利单抗(REGN2810)。在某些实施方式中,检查点抑制剂可以选自PD-L1抑制剂,例如阿特珠单抗(Tecentriq)、阿伐单抗(Bavencio)或杜鲁伐单抗(Imfinzi)。在某些实施方式中,检查点抑制剂可以选自CTLA-4抑制剂,例如伊匹单抗(Yervoy)。

[0182] 本发明还包括治疗组合物,其包括本文提及的任何工程化的细胞或细胞群体和VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1 (PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、uroplakin或任何上述细胞因子中的一个或多个的抑制剂,其中,所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F(ab')₂片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或如双抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单位等其它工程化分子)。在一些实施方式中,本发明的工程化细胞或细胞群体还可以作为治疗方案的一部分给药,所述治疗方案还包括放射治疗和/或常规化疗。

[0183] 一种或多种另外的治疗活性组分可以在给药本发明的工程化细胞之前、同时或之后给药;(出于本公开的目的,此类给药方案被认为是工程化细胞与另外的治疗活性组分“组合”给药)。

[0184] 本发明包括药物组合物,其中本发明的工程化细胞或细胞群体与一种或多种如本文其它地方所描述的另外的治疗活性组分共同配制。

[0185] 给药方案

[0186] 根据本发明的某些实施方式,可以在限定的时间过程中向受试者给药多剂量的工程化的细胞。根据本发明的此方面的方法包括向受试者依次给药多剂量的细胞。如本文所用,“依次给药”意指每个剂量在不同时间点给药于受试者,例如,在隔开预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同日期。本发明包括以下方法:其包括向患者依次给药单一初始剂量,然后给药一种或多种第二剂量,并且任选地随后给药一种或多种第三剂量。

[0187] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本发明的工程化细胞的给药时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时给药的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是初始剂量后给药的剂量;“第三剂量”是在第二剂量后给药的剂量。初始剂量、第二剂量和

第三剂量可以全部含有相同量的工程化细胞,但是在给药频率方面通常可以彼此不同。然而,在某些实施方式中,在治疗过程期间,初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中含有的工程化细胞的量彼此不同(例如,适当地调高或降低)。在某些实施方式中,在治疗方案开始时给药两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后是在较不频繁的基础上给药后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0188] 在本发明的一个示例性实施方式中,每个第二剂量和/或第三剂量在前一剂量后给药1到26(例如,1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}或更多)周。如本文所用,短语“前一剂量”意指在多次给药的顺序中向患者给药的剂量,其在顺序中的下一剂量之前给药于患者,没有中间剂量。

[0189] 根据本发明该方面的方法可以包括向患者给药任意数量的第二和/或第三剂量。例如,在某些实施方式中,仅向患者给药单个第二剂量。在其它实施方式中,向患者给药两个或更多个(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多个)第二剂量。同样地,在某些实施方式中,仅向患者给药单个第三剂量。在其它实施方式中,向患者给药两个或更多个(例如,2、3、4、5、6、7、8或更多个)第三剂量。

[0190] 在涉及多个第二剂量的实施方式中,每个第二剂量可以以与其它第二剂量相同的频率给药。例如,可以在前一剂量后1到2周对患者给药每个第二剂量。类似地,在涉及多个第三剂量的实施方式中,每个第三剂量可以以与其它第三剂量相同的频率给药。例如,可以在前一剂量后2到4周对患者给药每个第三剂量。可替代地,对患者给药第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。给药频率也可以在医师的治疗过程中根据临床检查后个体患者的需要进行调整。

[0191] 实例

[0192] 提出以下实例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人类认为是其发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是或接近大气压。

[0193] 实例1:抗BCMA抗体的产生

[0194] 抗BCMA抗体通过以下获得:用人类BCMA抗原(例如,hBCMA,SEQ ID NO:101)免疫经基因修饰的小鼠,或用人类BCMA抗原免疫包括编码人类免疫球蛋白重链和kappa轻链可变区的DNA的工程化小鼠。

[0195] 免疫后,从每只小鼠收获脾细胞,并且(1)与小鼠骨髓瘤细胞融合以保持其活力并形成杂交瘤细胞并筛选BCMA特异性,或(2)使用作为结合和鉴定反应性抗体(抗原阳性B细胞)的分选试剂的人类BCMA片段分选B细胞(如US 2007/0280945A1中所述)。

[0196] 最初分离出具有人类可变区和小鼠恒定区的针对BCMA的嵌合抗体。对抗体进行表征和选择以获得包括亲和力、选择性等所期望的特性。如果需要,用期望的人类恒定区(例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4恒定区)替换小鼠恒定区,以产生完全人类的抗BCMA抗体。虽然所选择的恒定区可以根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在

于可变区中。

[0197] 抗BCMA抗体的重链和轻链可变区氨基酸和核酸序列:表1列出了本发明选择的抗BCMA抗体的重链和轻链可变区和CDR的氨基酸序列标识符。相应的核酸序列标识符列于表2中。

[0198] 表1:氨基酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80

[0200] 表2:核酸序列标识符

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

[0202] 实例2:BCMA特异性嵌合抗原受体的产生

[0203] 将六种抗BCMA抗体(mAb16711、mAb16716、mAb16732、mAb16747和mAb21581)重新格式化为VL-VH单链可变片段(ScFv),并放入使用CD8 α 铰链和跨膜域、4-1BB共刺激域和CD3 ζ 刺激域的嵌合抗原受体(CAR)构建体中。将BCMA特异性CAR克隆到慢病毒表达载体(Lenti-X™ Bicistronic Expression System(Neo),Clontech Cat#632181)中,并根据制造商协议通过Lenti-X Packaging Single-Shot(VSV-G)系统(Clontech Cat#631276)生成慢病毒颗粒。然后根据制造商协议使用RetroNectin® Precoated Dishes(Clontech,Cat#T110a)用不同的CAR构建体转导被工程化为表达NFAT荧光素酶报道子的Jurkat细胞(Jurkat/NFATLuc cl.3C7)。在500 μ g/ml G418(Gibco,Cat#11811-098)中选择至少2周后,产生以下CAR-T细胞系;Jurkat/NFATLuc cl.3C7/BCMA 16716VL-VH CART,Jurkat/NFATLuc cl.3C7/BCMA 16711VL-VH CART,Jurkat/NFATLuc cl.3C7/BCMA 16732VL-VH CART,Jurkat/NFATLuc cl.3C7/BCMA 16747VL-VH CART,Jurkat/NFATLuc cl.3C7/BCMA 21581VL-VH CART.如图1所示,用于产生这些CAR-T细胞系的CAR构建体的核苷酸序列显示在SEQ ID NO: 81(mAb16711 VL/VH)、83(mAb16716 VL/VH)、85(mAb16732 VL/VH)、87(mAb16747 VL/VH)和89(mAb21581 VL/VH)中。如实例3中所述,这六个CAR-T细胞系用于评估BCMA CAR-T细胞的细胞表面表达和激活。

[0204] 使用两种抗BCMA抗体mAb21581和mAb16747的VL和VH核苷酸序列(分别对应于SEQ ID NO:89和87)来构建包含抗BCMA VL-VH scFv、huCD8跨膜域、4-1BB共刺激域和CD3 ζ 信号传导域的嵌合抗原受体。作为非结合对照,使用不相关的scFv的核苷酸序列(SEQ ID NO:91的CAR构建体)设计了类似的CAR。将这些CAR克隆到带有EF1a启动子和IRES:eGFP序列(用于

追踪CAR转导的细胞)的pLVX慢病毒载体中,并生产VSV假型慢病毒。

[0205] 从人类外周血单个核细胞(PBMC)中分离出CD3⁺T细胞,用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2刺激,并用慢病毒以MOI=5进行转导。将被转导的细胞用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2扩增3周,然后冷冻保存直至在体内实验中使用。如实例4和5所述,这三行CAR-T细胞用于评估体内减轻肿瘤负荷的功效。

[0206] 实例3:Jurkat细胞中BCMA CAR构建体的细胞表面表达和BCMA CAR-T细胞的激活

[0207] 通过流式细胞术获得了Jurkat/NFATLuc细胞中BCMA CAR构建体的相对细胞表面表达。为了染色,在96孔V型底板中将细胞以每孔200,000个细胞的密度接种在的染色缓冲液(PBS,不含钙和镁(Irving 9240)+2%FBS(ATCC30-2020))中,并在4℃下用10ug/ml的与hIgG1-Fc融合的BCMA胞外域(BCMA ecto-hFc)或与hIgG1-Fc融合的无关蛋白(Fc同种型对照)染色30min。与BCMA-hFc或Fc同种型对照一起温育后,将细胞在染色缓冲液中洗涤一次,并在4℃下用Alexa-Fluor 647耦联的第二抗体(Jackson ImmunoResearch,Cat#109-606-170)以10μg/ml染色30min。然后洗涤细胞,并使用在染色缓冲液中稀释的50%BD Cytofix(BD,Cat#554655)溶液固定。样品在Intellicyt iQue流式细胞仪上运行,并通过FlowJo 10.2分析以计算平均荧光强度(MFI)。通过BCMA-hFc或Fc同型对照MFI与仅第二抗体MFI的比值确定信噪比(S:N)。

[0208] 在CAR-T/APC(抗原呈递细胞)生物测定法中评估了CAR-T系的活性。为了进行生物测定,将50,000个CAR-T细胞添加到50ul测定培养基(含10%FBS和1%P/S/G的RPMI培养基)中的Thermo-Nunc 96孔白板(Thermo Scientific,Cat#136101)中,然后在50ul的测定培养基中加入APC的3倍系列稀释液(500,000个细胞至685个细胞)。使用了以下APC:RAJI、Daudi、RPMI8226(内源性表达BCMA)和HEK293(BCMA阴性)。在37℃、5%CO₂的条件下温育细胞混合物,加湿培养箱5小时。使用Promega One-Glo(Cat#E6130)和Perkin Elmer Envision读板仪测量NFAT-荧光素酶活性。产生相对荧光素酶单位(RLU)并在8点响应曲线上使用四参数对数方程式绘制在GraphPad Prism中。每个剂量反应曲线的零APC条件也包括在分析中,作为三倍系列稀释的延续,并表示为最低剂量。CAR-T活性通过曲线上最高与最低RLU之比确定,并在表4中表示为信号:噪声(S:N)。

[0209] 表3显示16747和21581CAR-T具有相似的表面表达,其中S:N的范围为209-273,16716CAR-T的表达比背景高44倍,而16732和16711CAR表达比S:N低得多,分别为13和4。

[0210] 表4显示所有六个BCMA CAR-T细胞系均被RAJI、Daudi和RPMI8226细胞激活。HEK293没有激活CAR-T细胞系。与BCMA表达APC无关,16747BCMA CAR在CAR-T/APC生物测定中的激活最强,而CAR 16711活性最弱。最后,观察到CAR表达(表3)和CAR活性(表4)之间的相关性。

[0211] 表3:在BCMA CAR-T细胞系上结合的可溶性FC-BCMA

[0212]	细胞系	S:N (BCMA-hFc)	S:N (同种型-hFc)
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7	1.5	0.8
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7/16716 VL-VH CART	44.0	1.1
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7/16711 VL-VH CART	3.7	1.2
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7/16732 VL-VH CART	13.1	1.0
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7/16747 VL-VH CART	209.2	1.3
	Jurkat/NFATLuc cl.3C7/21581 VL-VH CART	224.5	1.2

[0213] 表4: CAR-T/APC生物测定法中BCMA CAR-T的激活

[0214]	抗原呈递细胞	CAR-T 最大活性					
		无 CAR	16716	16711	16732	16747	21581
	RAJI	1.2	16.3	7.9	16.8	38.9	26.9
	Daudi	1.0	6.4	2.6	4.9	14.0	8.0
	RPMI8226	0.8	6.6	1.8	5.2	12.5	12.3
	HEK293	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9

[0215] 实例4: 在异种肿瘤模型中, 靶向BCMA的CAR-T细胞体内降低BCMA表达的肿瘤(OPM-2)的生长

[0216] 为了确定靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞的体内功效, 使用表达高水平BCMA的OPM-2人类多发性骨髓瘤细胞在鼠中进行了异种肿瘤研究。

[0217] 异种肿瘤植入和测量: 在第0天, 免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 小鼠静脉内给药被工程化以表达也萤火虫荧光素酶的 2×10^6 BCMA⁺OPM-2人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞(OPM-2-荧光素酶细胞)。在第21天, 给小鼠静脉内注射 2×10^6 个T细胞, 这些细胞表达对照CAR或抗BCMA CAR (由表达GFP的细胞的频率确定, 其是已被CAR转导的那些细胞的标记)。对小鼠 (每组n=5) 给药 2×10^6 个不相干的scFc CAR T (对照scFv CAR)、 2×10^6 个编码21581scFv CAR的抗BCMA CAR T、或编码16747scFv的 2×10^6 个抗BCMA CAR T。通过测量麻醉动物的肿瘤生物发光(BLI)评估肿瘤生长直至第61天。作为阳性对照, 一组小鼠(n=5)仅被给药OPM-2-荧光素酶细胞, 而不被给药T细胞。为了测量背景BLI水平, 一组小鼠(n=5)未经治疗并且未接受肿瘤或T细胞。

[0218] 异种肿瘤生长的测量: BLI成像用于测量肿瘤负荷。给小鼠腹膜内注射悬浮在PBS中的150mg/kg的荧光素酶底物D-荧光素。注射五分钟后, 使用Xenogen IVIS系统在异氟烷麻醉下对小鼠进行BLI成像。图像采集是在D视场、1.5cm物体高度和中等装箱水平下进行的, 并具有自动曝光时间, 该时间由Living Image Software确定。使用Living Image软件提取BLI信号: 在每个肿瘤块周围绘制感兴趣区域, 并将光子强度记录为p/s/cm²/sr。

[0219] 虽然在接受无关scFv CAR T细胞的小鼠中BCMA⁺OPM-2-荧光素酶肿瘤逐渐生长, 但编码21581scFv CAR的CAR T细胞将大多数动物的肿瘤负荷降低至背景水平, 而编码16747scFv CAR的CAR T细胞减少了所有动物的肿瘤负荷至背景水平。结果显示在下表5A中。

[0220] 表5A: 不同时间点的平均肿瘤大小 (按辐射)

[0221]	CAR T 治疗	植入后 5 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.22E+05 ± 2.77E+04
	无 CAR T (阳性对照)	5.62E+05 ± 2.75E+04
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.95E+05 ± 2.40E+04
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.07E+05 ± 3.97E+04
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.54E+05 ± 2.80E+04
[0222]	CAR T 治疗	植入后 11 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.90E+05 ± 3.64E+04
	无 CAR T (阳性对照)	6.22E+05 ± 3.34E+04
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.80E+05 ± 2.76E+04
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.13E+05 ± 2.90E+04
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.30E+05 ± 2.42E+04
[0223]	CAR T 治疗	植入后 20 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	7.59E+05 ± 5.82E+04
	无 CAR T (阳性对照)	2.32E+06 ± 2.94E+05
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.80E+06 ± 5.26E+05
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	3.06E+06 ± 4.42E+05
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.53E+06 ± 2.22E+05
[0224]	CAR T 治疗	植入后 26 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.51E+05 ± 2.51E+04
	无 CAR T (阳性对照)	5.96E+06 ± 8.74E+05
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.03E+06 ± 1.41E+06
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.76E+06 ± 1.34E+06
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.96E+06 ± 3.39E+05

[0225]	CAR T 治疗	植入后 31 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.62E+05 ± 3.35E+04
	无 CAR T (阳性对照)	1.58E+07 ± 4.84E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.57E+07 ± 3.05E+06
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.44E+07 ± 2.12E+06
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.01E+07 ± 5.46E+05
[0226]	CAR T 治疗	植入后 34 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	4.57E+05 ± 1.04E+04
	无 CAR T (阳性对照)	3.36E+07 ± 1.27E+07
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	3.00E+07 ± 2.82E+06
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.05E+07 ± 3.56E+06
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.31E+06 ± 9.79E+05
[0227]	CAR T 治疗	植入后 38 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.60E+05 ± 3.13E+04
	无 CAR T (阳性对照)	3.91E+07 ± 6.87E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	4.25E+07 ± 5.08E+06
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.19E+07 ± 7.88E+06
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.90E+06 ± 1.20E+06
[0228]	CAR T 治疗	植入后 40 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.39E+05 ± 9.67E+03
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.13E+07 ± 4.84E+06
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.71E+05 ± 2.80E+05

[0229]	CAR T 治疗	植入后 47 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	7.73E+05 ± 1.91E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	3.17E+07 ± 3.11E+07
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.85E+05 ± 3.72E+04

[0230]	CAR T 治疗	植入后 54 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	7.49E+05 ± 1.95E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	4.34E+07 ± 4.29E+07
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.24E+05 ± 5.48E+04

[0231]	CAR T 治疗	植入后 61 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.18E+05 ± 2.77E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.41E+05 ± 4.07E+04
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.40E+05 ± 2.93E+04

[0232] 如上所述进行进一步的实验,除了在第22天(而不是第21天)向小鼠静脉内注射表达对照CAR或抗BCMA CAR的2x10⁶个T细胞,并评估肿瘤的生长直至第56天(而不是第61天)。

[0233] 虽然BCMA⁺OPM-2-荧光素酶肿瘤在接受无关scFv CAR T细胞的小鼠中逐渐生长,但编码21581和16747scFV CAR的CAR T细胞在所有动物中均将肿瘤负荷降低至背景水平。结果显示在下表5B中。

[0234] 表5B:不同时间点的平均肿瘤大小(按辐射)

[0235]	CAR T 治疗	植入后 14 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.72E+05 ± 1.50E+04
	无 CAR T (阳性对照)	7.93E+05 ± 8.18E+04
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.09E+05 ± 2.13E+04
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.87E+05 ± 1.20E+05
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.93E+05 ± 9.05E+04
[0236]	CAR T 治疗	植入后 20 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.32E+05 ± 3.64E+04
	无 CAR T (阳性对照)	3.07E+06 ± 3.01E+05
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.91E+06 ± 2.46E+05
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.57E+06 ± 8.27E+05
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	3.13E+06 ± 5.97E+05
[0237]	CAR T 治疗	植入后 23 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.56E+05 ± 4.29E+04
	无 CAR T (阳性对照)	1.01E+07 ± 1.28E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.37E+06 ± 1.38E+06
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.00E+07 ± 3.92E+06
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	8.26E+06 ± 1.59E+06
[0238]	CAR T 治疗	植入后 27 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.18E+05 ± 2.87E+04
	无 CAR T (阳性对照)	1.67E+07 ± 1.54E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.47E+07 ± 2.36E+06
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.59E+07 ± 6.36E+06
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.03E+07 ± 1.71E+06

[0239]	CAR T 治疗	植入后 30 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.18E+05 ± 1.29E+04
	无 CAR T (阳性对照)	1.93E+07 ± 3.10E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.03E+07 ± 2.48E+06
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.21E+06 ± 1.97E+06
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.16E+07 ± 3.61E+06
[0240]	CAR T 治疗	植入后 34 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.66E+05 ± 3.76E+04
	无 CAR T (阳性对照)	3.69E+07 ± 6.27E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	4.07E+07 ± 4.13E+06
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.74E+05 ± 1.24E+04
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.66E+06 ± 9.09E+05
[0241]	CAR T 治疗	植入后 38 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	5.43E+05 ± 3.32E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.87E+07 ± 5.72E+06
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.39E+05 ± 1.58E+04
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.55E+05 ± 5.02E+04
[0242]	CAR T 治疗	植入后 44 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.42E+05 ± 3.33E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.68E+05 ± 3.09E+04
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.39E+05 ± 2.25E+04

[0243]	CAR T 治疗	植入后 56 天的辐射 [p/s/cm ² /sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	8.10E+05 ± 5.92E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581N scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.37E+05 ± 2.71E+04
	抗 BCMA CAR (16747P scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.13E+05 ± 4.17E+04

[0244] 实例5:在异种肿瘤模型中,靶向BCMA的CAR-T细胞体内降低了BCMA表达的肿瘤(MOLP-8)的生长

[0245] 为了确定靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞的体内功效,使用表达低水平BCMA的MOLP-8人类多发性骨髓瘤细胞在小鼠中进行了异种肿瘤研究。

[0246] 异种肿瘤植入和测量:在第0天,对免疫缺陷NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)小鼠静脉内给药2x10⁶ BCMA⁺MOLP-8人类多发性骨髓瘤肿瘤细胞(MOLP-8-荧光素酶细胞),所述细胞被工程化以也表达萤火虫荧光素酶。在第12天,给小鼠静脉内注射2x10⁶个T细胞,这些细胞表达对照CAR或抗BCMA CAR(由表达GFP的细胞的频率确定,其是已被CAR转导的那些细胞的标记)。小鼠(每组n=5)接受2x10⁶不相关的scFv CAR T(对照scFv CAR)、2x10⁶编码21581scFv CAR的抗BCMA CAR T或2x10⁶编码16747scFv的抗BCMA CAR T。在整个实验中,通过测量麻醉动物的肿瘤生物发光(BLI)来评估肿瘤的生长。作为阳性对照,一组小鼠(n=5)仅接受了MOLP-8-荧光素酶细胞治疗,而未给予T细胞治疗。为了测量背景BLI水平,一组小鼠(n=5)未经治疗,未接受肿瘤或T细胞。

[0247] 异种肿瘤生长的测量:BLI成像用于测量肿瘤负荷。给小鼠腹膜内注射悬浮在PBS中的150mg/kg的荧光素酶底物D-荧光素。注射五分钟后,使用Xenogen IVIS系统在异氟烷麻醉下对小鼠进行BLI成像。图像采集是在D视场、1.5cm物体高度和中等装箱水平下进行的,并具有自动曝光时间,该时间由Living Image Software确定。使用Living Image软件提取BLI信号:在每个肿瘤块周围绘制感兴趣区域,并将光子强度记录为p/s/cm²/sr。

[0248] 尽管BCMA⁺MOLP-8-荧光素酶肿瘤在接受无关scFv CAR T细胞的小鼠中逐渐生长,但编码21581scFv CAR和16747scFv CAR的CAR T细胞在所有动物中均将肿瘤负荷降低至背景水平。结果显示在下表6中。

[0249] 表6:不同时间点的平均肿瘤大小(按辐射)

[0250]	CAR T 治疗	植入后 12 天的辐射 [p/s/cm ² /sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.81E+05 ± 3.46E+04
	无 CAR T (阳性对照)	1.51E+06 ± 7.81E+04
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.72E+06 ± 1.33E+05
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.46E+06 ± 1.01E+05
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	1.32E+06 ± 5.86E+04

[0251]	CAR T 治疗	植入后 18 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	7.61E+05 ± 2.73E+04
	无 CAR T (阳性对照)	2.01E+07 ± 8.14E+05
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	2.11E+07 ± 3.02E+06
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	5.37E+06 ± 9.01E+05
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.98E+06 ± 9.57E+05

[0252]	CAR T 治疗	植入后 25 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	7.20E+05 ± 2.31E+04
	无 CAR T (阳性对照)	5.93E+07 ± 7.71E+06
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.40E+07 ± 1.71E+07
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	7.50E+05 ± 4.63E+04
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.77E+05 ± 7.41E+04

[0253]	CAR T 治疗	植入后 32 天的辐射 [p/s/cm²/sr] (平均值 ±SEM)
	无肿瘤 (背景 BLI)	6.85E+05 ± 3.99E+04
	无 CAR T (阳性对照)	安乐死的动物
	对照 CAR T (无关 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	安乐死的动物
	抗 BCMA CAR (21581 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.28E+05 ± 3.75E+04
	抗 BCMA CAR (16747 scFv) 2x10 ⁶ 个细胞	6.82E+05 ± 2.35E+04

[0254] 实例6:BCMA特异性CAR-T细胞介导BCMA表达的细胞的细胞裂解

[0255] 从人类外周血单核细胞 (PBMC) 中分离出CD3⁺T细胞,用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2刺激,并以MOI=5的慢病毒进行转导,如上文实例2所述。在进行溶细胞测定之前,将转导的细胞用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2扩增3周。

[0256] 为了确定靶向BCMA的嵌合抗原受体 (CAR) T细胞的溶细胞能力,使用扩增的CAR-T细胞和表达可变水平BCMA的多种肿瘤靶细胞系进行溶细胞测定。在扩增的第21天,将扩增的CAR-T细胞与钙黄绿素标记的BCMA+靶细胞系以不同比例一式三份共培养。收获每种靶细胞系,并以2x10⁶/mL的密度重悬浮,然后在37℃下添加浓度为8uM的钙黄绿素-AM染料35分钟。钙黄绿素标记后,将靶细胞洗涤两次以除去多余的钙黄绿素。随后,将T细胞和靶细胞以各种比例在96孔圆底板上共培养,并在收获培养上清液时在37℃下培养2.5小时。对于阴性对照,将靶细胞与使用类似CAR产生的T细胞共培养,所述CAR设计为包括不识别BCMA的无关scFv。作为额外的CAR阴性对照,使用了来自同一正常健康供体的未转导和扩增的T细胞。作为抗原特异性CAR-T细胞介导的杀伤的对照,使用慢性粒细胞性白血病K562靶细胞系,因为该细胞系对于BCMA表达是阴性的。为了确定钙黄绿素是否自H-929和MOLP-8靶细胞系自发

释放,在不存在CAR-T细胞的情况下培养每种细胞系。为了确定钙黄绿素的最大可能释放,使用补充有1%Triton™ X-114去污剂的Optimizer培养基培养并裂解靶细胞系。在上清液中,使用Viktor X4读板器测量相对钙黄绿素水平,并以((钙蛋白信号-自发钙黄绿素释放)/(钙黄绿素最大释放-自发钙黄绿素释放))*100计算细胞毒性百分比。

[0257] 如下表7A-7C所示,由使用21581和16747scFv产生的BCMA靶向的CAR+T细胞组成的培养物诱导了H-929靶细胞和MOLP-8靶细胞的强力细胞溶解。相对于H-929细胞,观察到针对MOLP8细胞的细胞毒性水平较低。该结果由H-929表达的MOMA-8细胞表达的BCMA抗原水平更高来解释。对于每种针对BCMA的CAR-T细胞培养物,都观察到了针对H-929细胞的最大程度的细胞毒性,并且使用16747scFv工程改造的针对BCMA的CAR-T细胞产生了针对两种靶细胞系的最大程度的细胞毒性。当以最大50个T细胞与一个靶细胞的比例与靶细胞共培养时,未转导和扩增(MOI 0)的T细胞以及无关的CAR-T细胞(17363)均未引起MOLP的任何细胞溶解-8和H-929靶细胞。该结果说明仅当CAR结构包括识别scFv的BCMA(例如,来自mAb21581和mAb16747)时才观察到细胞溶解。此外,针对BCMA的CAR-T细胞对缺乏BCMA表达的K562细胞的细胞毒性可忽略不计,这表明要观察细胞溶解需要BCMA表达。

[0258] 表7A:BCMA引导的CAR-T细胞裂解

T 效应子: 靶细胞比 例	CAR-T 细胞/靶细胞							
	21581 MOLP8		21581 / H929		16747 / MOLP8		16747 / H929	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
50	9.1	2.0	22.3	0.7	14.0	1.5	29.3	1.8
25	3.7	0.8	10.0	0.9	10.9	2.0	19.4	3.4
12.5	1.6	0.6	3.9	1.4	8.2	0.9	9.3	3.2
6.25	0.6	0.5	1.7	0.7	5.8	1.3	4.2	2.6
3.13	-1.5	0.3	0.0	1.1	2.2	0.9	2.9	2.4
1.56	0.3	0.5	-0.9	2.4	0.2	0.7	1.8	2.3
0.78	-1.3	2.2	-0.7	0.5	-2.9	0.5	0.9	1.7

[0260] SD:标准偏差

[0261] 表7B:BCMA引导的CAR-T细胞裂解

T 效应子: 靶细胞比 例	CAR-T 细胞/靶细胞							
	17363 HPV16 / MOLP8		17363 HPV16 / H929		21581 / K562		16747 / K562	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
50	-3.1	1.7	-0.8	1.2	2.0	1.1	3.5	1.4

[0263] SD:标准偏差

[0264] 表7C:BCMA引导的CAR-T细胞细胞裂解

[0265]		CAR-T 细胞/靶细胞			
	T 效应子: 靶细胞比 例	CAR Neg T 细胞 / MOLP8		CAR Neg T 细胞/ H929	
		平均	SD	平均	SD
		50	-1.4	2.0	-0.5

[0266] SD:标准偏差

[0267] 实例7:在来源于多发性骨髓瘤患者的骨髓中靶向BCMA的CAR-T细胞的体内细胞毒性

[0268] 从人类外周血单核细胞(PBMC)中分离出CD3⁺T细胞,用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2刺激,并以MOI=5的慢病毒进行转导,如上文实例2所述。在进行细胞毒性试验之前,先用CD3/CD28微珠加100U/ml重组人类IL-2将转导的细胞扩增3周。

[0269] 收获时,将扩增的CAR-T细胞洗涤并重悬于完全培养基(补充有10%FBS、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素和292μg/mL L-谷氨酰胺的RPMI)中。将多发性骨髓瘤患者的骨髓融化并重悬于完全培养基中。将HS-5基质细胞以每孔10000个细胞的平板接种到96孔平板中,并温育过夜。将T细胞和患者衍生的骨髓以各种E:T比(从E:T=10:1开始滴定2倍滴度)添加到含有基质的孔中,并在37℃下培养12小时。作为CAR阴性对照,使用了来自同一正常健康供体的未转导和扩增的T细胞。

[0270] 12小时后,使用流式细胞术确定多发性骨髓瘤胚细胞存活。将细胞在BD Horizon Brilliant Stain Buffer中于4℃下用荧光团偶联的抗体混合物(抗CD4、抗CD8、抗CD16、抗CD45、抗CD90、抗CD138和抗SlamF7)染色30分钟。将细胞在PBS中洗涤一次,并在4℃下用LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain染色20-30分钟,然后在PBS中洗涤两次,并重悬于冷的Miltenyi AutoMacs Buffer中。将CountBright珠子添加到样品中,以量化每孔的绝对细胞数。在BD FortessaX20流式细胞仪上分析样品。将存活的多发性骨髓瘤胚细胞选为活的单个CD4⁻/CD8⁻/SlamF7⁺/CD138⁺。存活百分比计算为在未经处理的对照中标准化为活多发性骨髓瘤细胞的经处理样品中活多发性骨髓瘤原始细胞的绝对计数。

[0271] 使用mAb21581 VH/VL产生的由BCMA靶向的CAR+T细胞组成的培养物诱导2位新诊断和1位复发的患者对多发性骨髓瘤母细胞进行稳健的靶标特异性细胞溶解。在10:1的E:T比率下,多发性骨髓瘤原始细胞的溶解了87-94%。未转导和扩增的(MOI 0)T细胞溶解了34-0%的多发性骨髓瘤母细胞。该结果证明靶向BCMA的CAR+T细胞以靶标特异性方式有效裂解源自患者的多发性骨髓瘤胚细胞的能力。结果显示在下表8中。

[0272] 表8:在BCMA引导的CAR-T细胞溶解中多发性骨髓瘤原始细胞存活%

[0273]

样品 ID	MM453		MM511		MM455	
疾病状况	新诊断		新诊断		复发	
%MM 胚细胞	25%		38%		90%	
MM 上 的 BCMA ABC	12302		2631		46925	
T 细胞:靶细胞 比例	BCMA CAR-T	对照 T	BCMA CAR-T	对照 T	BCMA CAR-T	对照 T
10	7	66	11	85	13	156
5	15	66	19	91	32	155
2.5	23	90	28	82	81	148
1.25	49	77	37	92	81	104
0.625	82	92	56	92	98	112
0.312	108	92	100	100	98	102

[0274] 本发明不被在本文所描述的具体实例限于一定的范围。实际上,除了在此说明的那些外,从上述的说明中的本发明的不同修改对于本领域中的普通技术人员将是清楚的。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 具有 BCMA 特异性的嵌合抗原受体及其用途

<130> 10455W001

<160> 101

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```

caggtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca ttacttgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattacatg atggaagtag taactactat 180
gcagagtccg tgaagggccg attcatcadc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agctgaggac acggtcttat attactgtac gaaaaggatat 300
tcagaagcag ctggcccaaa ttggttcgac ccctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 366
tcctca

```

<210> 2

[0001]

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```

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

```

[0002]	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 3	
	ggattcacct tcagtaccta tggc	24
	<210> 4	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 4	
	Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly	
	1 5	
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 5	
	atattacatg atggaagtag taac	24
	<210> 6	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 6	
	Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn	
	1 5	
	<210> 7	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 7	
	acgaaaaggt attcagaagc agctggccca aattggttcg acccc	45
	<210> 8	
	<211> 15	

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro

1

5

10

15

<210> 9

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtcg gggaattagc agctggtag cctggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcattcagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tccattcac ttteggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

His Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe

85

90

95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

[0003]

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 11	
	cggggaatta gcagctgg	18
	<210> 12	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 12	
	Arg Gly Ile Ser Ser Trp	
	1 5	
	<210> 13	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 13	
[0004]	gctgcatcc	9
	<210> 14	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 14	
	Ala Ala Ser	
	1	
	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 15	
	caacaggcta tcagtttccc attcact	27
	<210> 16	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 合成

<400> 16

Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

<210> 17

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 17

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgtca tgagttgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gactggagtg ggtctcagct attattggta gtggtggtag cacatattac 180
 gcagactccg tgaagggccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagagcc 300
 ggggataact ggaactgggt cgaccctgg gccaggga ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> 合成

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

[0006]	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 19		
	ggattcacct ttagcagcta tgtc	24	
	<210> 20		
	<211> 8		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 20		
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val		
	1 5		
	<210> 21		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 21		
	attattggta gtggtgtag caca	24	
	<210> 22		
	<211> 8		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 22		
	Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr		
	1 5		
	<210> 23		
	<211> 39		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 23		
	gcgaaaagag ccggggataa ctggaactgg ttcgacccc	39	
	<210> 24		
	<211> 13		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		

<400> 24

Ala Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 25

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggggtattag agctggtag cctggatatca gcggaaccca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tccattcac tticggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

[0007]

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 27

	cagggtatta gcagctgg	18
	<210> 28	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 28	
	Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
	1 5	
	<210> 29	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 29	
	gctgcatcc	9
	<210> 30	
	<211> 3	
	<212> PRT	
[0008]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 30	
	Ala Ala Ser	
	1	
	<210> 31	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 31	
	caacaggcta aaagtgtccc attcact	27
	<210> 32	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 32	
	Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe Thr	
	1 5	

<210> 33
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 33
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt atcagttgga atagtggtaa catgggatat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgttc 240
 ctgcaaatgc acagtttgag agctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaagtccgt 300
 ctaactgcct ttgacttttg gggccaggga acccttgtca ccgtctcctc a 351
 <210> 34
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 35
 ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

[0009]

	<210> 36	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 36	
	Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala	
	1 5	
	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 37	
	atcagttgga atagtggtaa catg	24
	<210> 38	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0010]	<223> 合成	
	<400> 38	
	Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met	
	1 5	
	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 39	
	gcaaaagtcc gtctaactgc ctttgacttt	30
	<210> 40	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 40	
	Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe	
	1 5 10	
	<210> 41	

<211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 41
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg agtcccatca 180
 aggttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgataac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321
 <210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 43
 cagagcattg gcaactat 18
 <210> 44
 <211> 6
 <212> PRT

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 44	
	Gln Ser Ile Gly Asn Tyr	
	1 5	
	<210> 45	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 45	
	actgcatcc	9
	<210> 46	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 46	
[0012]	Thr Ala Ser	
	1	
	<210> 47	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 47	
	caacagagtt tcagtacccc gtatact	27
	<210> 48	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 48	
	Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr Thr	
	1 5	
	<210> 49	
	<211> 354	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>
 <223> 合成
 <400> 49
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttcagt gactactaca tcagctggat ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagttcta gtggtagtgc cataaagtac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagaggga 300
 ggggaactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 50
 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 Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys 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 Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

[0013]

<210> 51
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成
 <400> 51
 ggattcacct tcagtacta ctac 24
 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 52	
	Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr	
	1 5	
	<210> 53	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 53	
	attagttcta gtgtagttc cata	24
	<210> 54	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 54	
	Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile	
	1 5	
[0014]	<210> 55	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 55	
	gcgagagagg gaggaacta cgtatggac gtc	33
	<210> 56	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 56	
	Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val	
	1 5 10	
	<210> 57	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 合成

<400> 57

gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggggtattaac aactgggttag tctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgggct tgggacagat ttactcttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 58

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

[0015]

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 59

cagggtatta acaactgg 18

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 60

	Gln Gly Ile Asn Asn Trp	
	1 5	
	<210> 61	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 61	
	gctgcaacc	9
	<210> 62	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 62	
	Ala Ala Thr	
	1	
	<210> 63	
	<211> 27	
[0016]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 63	
	caacaggcta acagtttccc tcccact	27
	<210> 64	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 64	
	Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr	
	1 5	
	<210> 65	
	<211> 375	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成	
	<400> 65	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60	

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aacttttga tgacctgggt cgcagagct 120
 ccaggaagg ggtctggagt ggtggccaac atgaaccaag atggaagtga gaaatactat 180
 gtggactctg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acgctgtgt attactgtgc gagatcgcg 300
 gaatatgtta ttagtaccag ctgctatgat gactttgact actggggcca gggaaccctg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 66

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser 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 Asp Arg Glu Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 67

ggattcacct ttagtaactt ttgg

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 68

[0017]

[0018]

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp

1 5

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 69

atgaaccaag atggaagtga gaaa

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 70

Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5

<210> 71

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 71

gcgagagatc gggaatattg tattagtacc agctgctatg atgacttga ctac

54

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 72

Ala Arg Asp Arg Glu Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 73

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 73
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcatagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
[0019] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 75

cagagcatta gcagctat 18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 76

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

	1	5	
	<210> 77		
	<211> 9		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 77		
	gctgcatcc		9
	<210> 78		
	<211> 3		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 78		
	Ala Ala Ser		
	1		
	<210> 79		
	<211> 30		
	<212> DNA		
[0020]	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 79		
	caacagagtt acagtacccc tccgatcacc		30
	<210> 80		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 80		
	Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr		
	1	5	10
	<210> 81		
	<211> 1404		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T		
	(16711_VK_v2(人). (G4S)3 接头. 16711 VH. hCD8a		
	铰链/TM. hCD137 (4-1BB). hCD3 zeta)		

<400> 81
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtcg gggaattagc agctggttag cctggatatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcaccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccatcac tticggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa aggcggcggg ggaictggag gcggtggaag cgggtggcggg 360
 ggaagtcagg tgcagctggt ggagtcgggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 420
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtacct atggcattca ctgggtccgc 480
 caggtccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat tacatgatgg aagtagtaac 540
 tactatgcag agtccgtgaa gggccgattc atcatctcca gagacaattc caagaacaca 600
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctctatatta ctgtacgaaa 660
 aggtattcag aagcagctgg cccaaattgg ttcgaccctc ggggccaggg aaccctggtc 720
 accgtctcct caactaccac tctgtctccc cgcccccaa cactgtctcc aactattgca 780
 tccaaccac tctccctcag acccgaagct tgcgccccg ccgccggagg tgcgttcac 840
 actagaggac tcgattttgc ttgcgacatt tatatctggg cccacttgc aggtacttgc 900
 ggagtattgc tgcctcact tgttattact cttatttga aacggggcag aaagaaactc 960
 ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 1020
 tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc 1080
 aggagcgag acgccccgc gtacaagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
 ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
 gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
 aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320
 cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
 atgcaggccc tgccccctcg ctaa 1404
 <210> 82
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16711_VK_v2(人). (G4S)3 接头. 16711 VH. hCD8a
 铰链/TM. hCD137 (4-1BB). hCD3 zeta)
 <400> 82
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0022]

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe			
	85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser			
	100	105	110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu			
	115	120	125
Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys			
	130	135	140
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Ile His Trp Val Arg			
145	150	155	160
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Leu His Asp			
	165	170	175
Gly Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile			
	180	185	190
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu			
	195	200	205
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Lys Arg Tyr Ser Glu			
210	215	220	
Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
225	230	235	240
Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala			
	245	250	255
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg			
	260	265	270
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys			
	275	280	285
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu			
	290	295	300
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu			
305	310	315	320
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln			
	325	330	335
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly			
	340	345	350
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr			
	355	360	365
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg			
	370	375	380
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met			
385	390	395	400
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu			
	405	410	415
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys			

	420	425	430
	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
	435	440	445
	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
	450	455	460
	Pro Pro Arg		
	465		
	<210> 83		
	<211> 1398		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T		
	(16716_VK(人). (G4S)3		
	接头. 16716_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137		
	(4-1BB). hCD3 zeta)		
	<400> 83		
[0023]	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc 60 atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggtag cctggtatca gcggaacca 120 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180 aggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tccattcac tticggccct 300 gggaccaaag tggatatcaa aggcggcggg ggatctggag gcggtggaag cgggtggcggg 360 ggaagtgagg tgcagctggg ggagctctgg ggagccttg tacagcctgg ggggtccctg 420 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgtcatgag ttgggtccgc 480 caggtccag ggaagggact ggagtgggtc tcagctatta ttggtagtgg tggtagcaca 540 tattacgcag actccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg 600 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 660 agagccgggg ataactggaa ctggttcgac ccctggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 720 tctcaacta ccactcctgc tccccgccc ccaacacctg ctccaactat tgcattccaa 780 ccactctccc tcagaccga agcttgtcgc cccgccgcg gaggtgctgt tcacactaga 840 ggactcgatt ttgcttgca catittatc tgggcccac ttgcaggtac ttgcggagta 900 ttgtctctct cacttgttat tactctttat tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat 960 atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc 1020 tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc 1080 gcagacgccc ccggtacaa gcaggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1140 cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc gggacctga gatgggggga 1200 aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1260 gcggaggcct acagtgatg tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1320 ggcctttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcct tcacatgcag 1380 gccctgcccc ctgcctaa 1398		
	<210> 84		
	<211> 465		

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16716_VK(人). (G4S)3
 接头. 16716_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137
 (4-1BB). hCD3 zeta)
 <400> 84
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser
 165 170 175
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ala Gly Asp
 210 215 220
 Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 245 250 255
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 260 265 270
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 275 280 285

[0024]

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Ser
 290 295 300
 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 325 330 335
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 340 345 350
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln
 355 360 365
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 370 375 380
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 385 390 395 400
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 405 410 415
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 420 425 430
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 435 440 445
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 450 455 460
 [0025] Arg
 465
 <210> 85
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16732_VK_v2(人). (G4S)3
 接头. 16732_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137
 (4-1BB). hCD3 zeta)
 <400> 85
 gacatccaga tgaccagtc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg agtcccatca 180
 aggttacttg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgataac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa aggcggcggg ggatctggag gcggtggaag cgggtggcggg 360
 ggaagtgaag tgcagctggg ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg caggtccctg 420
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttgatgatt atgcatgca ctgggtccgg 480
 caagctccag ggaaggcctt ggagtgggtc tcaggtatca gttggaatag tggtaacatg 540

```

ggatatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 600
ctgttctctgc aaatgcacag tttagagctc gaggacacgg ccttttatta ctgtgcaaaa 660
gtccgtctaa ctgcccttga cttttggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcaact 720
accactctctg ctccccgcc cccaacacct gctccaacta ttgcatccca accactctcc 780
ctcagacccg aagcttctcg ccccgccgcc ggaggtgctg ttcacactag aggactcgat 840
tttgcttgcg acatttata ctgggcccc cttgcaggta cttgcggagt attgctgctc 900
tcacttggtta ttactcttta ttgcaaacgg ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa 960
caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt 1020
ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1080
cccgcgtaca agcagggcc gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1140
gagtiacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1200
aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 1260
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1320
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc 1380
cctcgctaa
1389

```

<210> 86

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16732_VK_v2(人). (G4S)3

接头. 16732_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137

(4-1BB). hCD3 zeta)

[0026]

<400> 86

```

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

```

[0027]

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn
 165 170 175
 Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met His Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Arg Leu Thr
 210 215 220
 Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 245 250 255
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 260 265 270
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 275 280 285
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 290 295 300
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 305 310 315 320
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 325 330 335
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 340 345 350
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 405 410 415
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 420 425 430
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460
 <210> 87
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16747_VK(人). (G4S)3

接头. 16747_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137

(4-1BB). hCD3 zeta)

<400> 87

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggatattaac aactggtag tctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgggct tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa aggcggcggt ggatctggag gcggtggaag cgggtggcggg 360
 ggaagtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tcaagcctgg aggttccctg 420
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtact actacatcag ctggatccgc 480
 caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt tcatacatta gttctagtgg tagttccata 540
 aagtacgcag actctgtgaa gggccgattc accatctcca gggacaacgc caagaactca 600
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 660
 gagggaggga actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctca 720
 actaccactc ctgctccccg ccccccaaca cctgctccaa ctattgcac ccaaccactc 780
 tccctcagac ccgaagcttg tcgccccgcc gccggaggtg ctgttcacac tagaggactc 840
 gattttgctt gcgacattta tatctgggcc cacttgcag gtacttgcgg agtattgctg 900
 ctctcacttg ttattactct ttattgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc 960
 aaacaacat ttatgagacc agtacaact actcaaggagg aagatggctg tagctgccga 1020
 tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1080
 gccccgcgt acaagcagg ccagaaccag ctctataacg agtcaatct aggacgaaga 1140
 gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1200
 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1260
 gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1320
 taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 1380
 cccctcgt aa 1392

[0028]

<210> 88

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16747_VK(人). (G4S)3

接头. 16747_VH(人). hCD8a 铰链/TM. hCD137

(4-1BB). hCD3 zeta)

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
 20 25 30

[0029]

Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35				40				45							
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Pro
				85				90				95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
100				105				110							
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu
115				120				125							
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys
130				135				140							
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg
145				150				155				160			
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser
				165				170				175			
Gly	Ser	Ser	Ile	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile
180				185				190							
Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu
195				200				205							
Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Gly	Asn
210				215				220							
Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
225				230				235				240			
Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala
				245				250				255			
Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly
260				265				270							
Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile
275				280				285							
Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
290				295				300							
Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
305				310				315				320			
Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
				325				330				335			
Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	
340				345				350							
Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln
355				360				365							
Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp
370				375				380							

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 385 390 395 400
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 405 410 415
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 420 425 430
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 435 440 445
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 89

<211> 1431

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BCMA 21581 (VL-VH) ScFv CAR-T

(21581 VK(人). (G4S)3 接头. 21581

VH(人). G4S 接头_v2. hCD8a 铰链/TM. hCD137

(4-1BB). hCD3 zeta)

<400> 89

[0030]

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcatagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccctcggc 300
 caagggacac gactggagat taaaggcggc ggtggatctg gaggcggtgg aagcgggtggc 360
 gggggaagtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tgggtccagcc tggggggtcc 420
 ctgagactct cctgtgcagc ctctggatc acccttagta acttttggat gacctgggtc 480
 cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg gtggccaaca tgaaccaaga tggaagttag 540
 aaatactatg tggactctgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaagagc 600
 tctactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggtgtgtga ttactgtgcg 660
 agagatcggg aatattgtat tagtaccagc tgctatgatg actttgacta ctggggccag 720
 ggaaccctgg tcaccgtctc ctcaggagge ggagcagca ctaccactcc tgetccccgc 780
 cccccaacac ctgctccaac tattgcatcc caaccactct ccctcagacc cgaagcttgt 840
 cgccccgcg cgggaggtgc tgttcacact agaggactcg attttgettg cgacatttat 900
 atctgggccc cacttgagg tacttgcgga gtattgctgc tctcacttgt tattactctt 960
 tattgcaaac ggggcagaaa gaaactctg tatatattca aacaaccatt tatgagacca 1020
 gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga 1080
 ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc 1140
 cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 1200
 aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg gaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 1260
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgagg cctacagtga gattgggatg 1320
 aaagcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 1380
 accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1431

<210> 90
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> BCMA 21581 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (21581 VK(人). (G4S)3 接头. 21581
 VH(人). G4S 接头_v2. hCD8a 铰链/TM. hCD137
 (4-1BB). hCD3 zeta)
 <400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95
 [0031] Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 115 120 125
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 130 135 140
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Thr Trp Val
 145 150 155 160
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Met Asn Gln
 165 170 175
 Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Glu
 210 215 220
 Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Thr
 245 250 255
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 260 265 270

[0032]

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

<210> 91

<211> 1437

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T

(无关对照)

(17363_ULC-VK(1)(人), G4Sx3_4, 17363_VH(人),

G4S_V2, hCD8a 铰链/TM, hCD137 (4-1BB), hCD3 zeta)

<400> 91

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gtttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaactc tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttactc ctgtcaacag acttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaaggtgga ggcggtagtg gcggaggcgg aagtgggtgga 360
 ggaggctcag aggtgcagct gttggagtct gggggaggct tgggtacaacc tgggggtgcc 420

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accitttagca gttatgccat gacctgggtc 480
 cgccaggctc cagggatggg actggagtgg gtctcagtta ttagtggttag tggtagtgaa 540
 acatactacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa ttccaaaaac 600
 acactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaagaca cgcccgata ttactgtgtg 660
 aaagattctt cgtataggag ctctctgagg gcctactact actacggaat ggacgtctgg 720
 ggcctaggga ccacggtcac cgtctcctca ggaggtggtg gaagtactac cactcctgct 780
 ccccgcccc caacacctgc tccaactatt gcatcccaac cactctccct cagacccgaa 840
 gcttgtcgcc ccgcccggg aggtgctgtt cacactagag gactcgattt tgcttgcgac 900
 atttatatct gggccccact tgcaggtact tgcggagtat tgctgctctc acttggttatt 960
 actctttatt gcaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca accatttatg 1020
 agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa 1080
 gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtacaag 1140
 cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 1200
 ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaacct 1260
 caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagttagatt 1320
 gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt 1380
 acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg cctgcccc tcgctaa 1437

<210> 92

<211> 478

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0033]

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T

(无关对照)

(17363_ULC-VK(1)(人).G4Sx3_4.17363_VH(人).

G4S_V2.hCD8a 铰链/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 92

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

130					135					140									
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Thr	Trp	Val				
145					150					155					160				
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Met	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Gly				
165					170					175									
Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr				
180					185					190									
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser				
195					200					205									
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Asp	Ser	Ser				
210					215					220									
Tyr	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp				
225					230					235					240				
Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr				
245					250					255									
Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser				
260					265					270									
Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly				
275					280					285									
Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp				
290					295					300									
Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile				
305					310					315					320				
Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys				
325					330					335									
Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys				
340					345					350									
Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val				
355					360					365									
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn				
370					375					380									
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val				
385					390					395					400				
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg				
405					410					415									
Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys				
420					425					430									
Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg				
435					440					445									
Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys				
450					455					460									
Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
465					470					475									
<210> 93																			

[0035]

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 93
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 94
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 95
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 96
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 97
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链
<400> 97

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

<210> 98

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TM 结构域

<400> 98

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 Leu Tyr Cys
 20

<210> 99

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0036]

<223> 4-1BB

<400> 99

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> 100

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> cd3-Zeta

<400> 100

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

[0037]

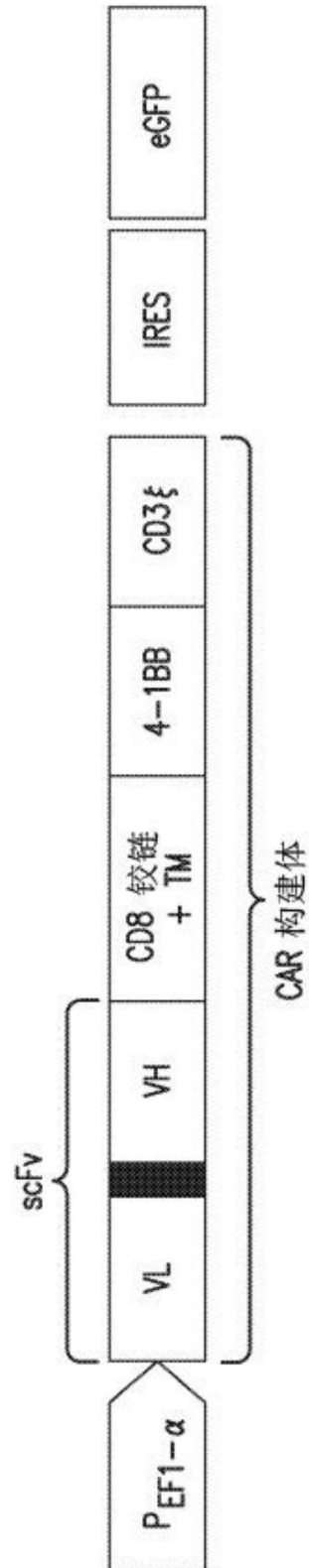


图1