



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116457464 A

(43) 申请公布日 2023.07.18

(21) 申请号 202180061115.X

(22) 申请日 2021.07.16

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2020/102457 2020.07.16 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2021/106892 2021.07.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/012683 EN 2022.01.20

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼

(72) 发明人 范晓虎 周喆 庄秋传 方旭

韩月 彭友国 卢曼曼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 杨琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书4页 说明书100页
序列表50页 附图16页

(54) 发明名称

CD19结合分子及其用途

(57) 摘要

本公开提供了与CD19结合的单结构域抗体以及包含所述单结构域抗体的嵌合抗原受体。进一步提供了包含所述嵌合抗原受体的工程化免疫效应细胞(如T细胞)。还提供了治疗疾病或病症的药物组合物、试剂盒和方法。

1. 一种抗CD19单结构域抗体(sdAb),其包含:

(i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3;

(ii) 包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;

(iii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3;

(iv) 包含SEQ ID NO:23或109的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;

(v) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3;

(vi) 包含SEQ ID NO:24或110的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3;

(vii) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR3;

(viii) 包含SEQ ID NO:25或111的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3;

(ix) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3;

(x) 包含SEQ ID NO:26或112的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;

(xi) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR3;

(xii) 包含SEQ ID NO:27或113的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3;

(xiii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR3;

(xiv) 包含SEQ ID NO:28或114的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3;或

(xv) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR3;或

(xvi) 包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3。

2. 一种抗CD19单结构域抗体(sdAb),其包含:

(i) 分别具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;

(ii) 分别具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3;

(iii) 分别具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2

和CDR3；

(iv)分别具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(v)分别具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(vi)分别具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(vii)分别具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(viii)分别具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(ix)分别具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(x)分别具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(xi)分别具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(xii)分别具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；

(xiii)分别具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3；或

(xiv)分别具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。

3.如权利要求2所述的抗CD19 sdAb,其中所述CDR1、CDR2或CDR3是根据Kabat编号方案、IMGT编号方案、AbM编号方案、Chothia编号方案、Contact编号方案或它们的组合确定的。

4.如权利要求1至3中任一项所述的抗CD19 sdAb,其进一步包含一个或多个如SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和/或SEQ ID NO:104中所示的FR区。

5.如权利要求1至4中任一项所述的抗CD19 sdAb,其包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ IDNO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列。

6.如权利要求1至4中任一项所述的抗CD19 sdAb,其中抗CD19sdAb包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ IDNO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7. 如权利要求1或权利要求2所述的抗CD19 sdAb,其中抗CD19sdAb是骆驼科sdAb。
8. 如权利要求1或权利要求2所述的抗CD19 sdAb,其中抗CD19sdAb是人源化sdAb。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的抗CD19 sdAb,其中所述抗CD19 sdAb与剂基因融合或化学缀合。
10. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:
 - (a) 包含权利要求1至9中任一项所述的抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;
 - (b) 跨膜结构域;和
 - (c) 细胞内信号传导结构域。
11. 如权利要求10所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域进一步包含一个或多个另外的抗原结合结构域。
12. 如权利要求11所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域进一步包含一个另外的抗原结合结构域。
13. 如权利要求11所述的CAR,其中所述细胞外抗原结合结构域进一步包含两个另外的抗原结合结构域。
14. 如权利要求11至13中任一项所述的CAR,其中所述一个或多个另外的抗原结合结构域与选自以下组成的组的一种或多种抗原结合:CD20、CD22、CD33、CD38、BCMA、CS1、ROR1、GPC3、CD123、IL-13R、CD138、c-Met、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3和糖脂F77。
15. 如权利要求10至14中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域来源于选自CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组的分子。
16. 如权利要求15所述的CAR,其中所述跨膜结构域来源于CD8 α 。
17. 如权利要求10至16中任一项所述的CAR,其中所述细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。
18. 如权利要求17所述的CAR,其中所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。
19. 如权利要求17或权利要求18所述的CAR,其中所述细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激信号传导结构域。
20. 如权利要求19所述的CAR,其中所述共刺激信号传导结构域来源于选自CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。
21. 如权利要求20所述的CAR,其中所述共刺激信号传导结构域来源于CD137。
22. 如权利要求10至21中任一项所述的CAR,其进一步包含位于所述细胞外抗原结合结构域的C-末端与所述跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。
23. 如权利要求22所述的CAR,其中所述铰链结构域来源于CD8 α 。
24. 如权利要求10至23中任一项所述的CAR,其进一步包含位于所述多肽的N-末端的信号肽。
25. 如权利要求24所述的CAR,其中所述信号肽来源于CD8 α 。
26. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含选自SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列。
27. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求1至9中任一项所述的抗CD19 sdAb的核酸序

列。

28. 一种载体,其包含权利要求27所述的分离的核酸。

29. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求10至26中任一项所述的CAR的核酸序列。

30. 一种载体,其包含权利要求29所述的分离的核酸。

31. 一种工程化免疫效应细胞,其包含权利要求10至26中任一项所述的CAR、权利要求29所述的分离的核酸或权利要求30所述的载体。

32. 如权利要求31所述的工程化免疫效应细胞,其中所述免疫效应细胞是T细胞或B细胞。

33. 一种药物组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述的抗CD19 sdAb、权利要求31或权利要求32所述的工程化免疫效应细胞或权利要求28或权利要求30所述的载体以及药学上可接受的赋形剂。

34. 一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括对所述受试者施用有效量的权利要求1至9中任一项所述的抗CD19 sdAb、权利要求31或权利要求32所述的工程化免疫效应细胞或权利要求33所述的药物组合物。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述疾病或病症是B细胞相关的疾病或病症和/或CD19相关的疾病或病症。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。

39. 如权利要求34所述的方法,其中所述疾病或病症选自由以下组成的组:边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、伯基特淋巴瘤、原发性眼内淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病(HCL)、前体B成淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、高级B细胞淋巴瘤(HGBL)和多发性骨髓瘤(MM)。

40. 如权利要求34所述的方法,其中所述疾病或病症是自身免疫和/或炎性疾病。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述自身免疫和/或炎性疾病与不适当或增高的B细胞数目和/或激活相关。

CD19结合分子及其用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月16日提交的国际专利申请号PCT/CN2020/102457的优先权权益,该国际专利申请的内容以全文引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请以引用的方式并入随同本申请一起提交的序列表,该序列表为文本格式,标题为“14651-025-228_SEQ_LISTING”,创建于2021年7月9日,且大小为85,728字节。

1. 技术领域

[0005] 本公开涉及抗CD19单结构域抗体、嵌合抗原受体、工程化免疫效应细胞及其使用方法。本公开进一步涉及用于治疗用途的细胞的激活和扩增,特别涉及基于嵌合抗原受体的T细胞免疫疗法。

2. 背景技术

[0006] CD19在正常B细胞上表达并且由各种疾病和病状(包括大多数B细胞恶性肿瘤)的细胞和组织表达。CD19通过调节B细胞受体依赖性和非依赖性信号传导关键性地参与建立内在B细胞信号传导阈值。CD19作为成熟B细胞表面上的多分子复合物的主要信号传导组分起作用,并且在维持体液、抗原诱导的反应与耐受性诱导之间的平衡方面起到关键作用。参见Wang等人,Exp Hematol Oncol.1:36(2012)。

[0007] 各种CD19结合分子都是可用的,包括抗CD19抗体和含有抗CD19抗体部分的嵌合抗原受体以及表达此类嵌合受体的细胞。嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞疗法是一种新兴且有效的癌症免疫疗法。特别是在血液恶性肿瘤中,CAR-T细胞已经取得了令人振奋的结果。两种基于抗CD19 scFv的CAR-T疗法已被批准用于治疗CD19阳性白血病或淋巴瘤。然而,CAR-T细胞的应用受到诸如细胞因子释放综合征和结合非肿瘤组织里的靶标而产生的毒性(on-target off-tumor toxicity)的副作用的阻碍(Yu等人,Molecular Cancer 18(1):125(2019))。需要改进的CD19结合分子和工程化的CD19靶向细胞。例如,需要开发稳定且小尺寸的CD19结合分子以用于更有效或高效的CAR-T疗法。

3. 发明内容

[0008] 一方面,本文提供了抗CD19单结构域抗体(sdAb),其包含:(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3;(ii)包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3;(iii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3;(iv)包含SEQ ID NO:23或109的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;(v)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的

CDR3; (vi) 包含SEQ ID NO:24或110的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3; (vii) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR3; (viii) 包含SEQ ID NO:25或111的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR3; (ix) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3; (x) 包含SEQ ID NO:26或112的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3; (xi) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR3; (xii) 包含SEQ ID NO:27或113的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR3; (xiii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR3; (xiv) 包含SEQ ID NO:28或114的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR3; 或 (xv) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR3; 或 (xvi) 包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列的CDR1; 包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列的CDR2; 和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR3。

[0009] 另一方面, 本文提供了抗CD19单结构域抗体(sdAb), 其包含: (i) 分别具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (ii) 分别具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (iii) 分别具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (iv) 分别具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (v) 分别具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (vi) 分别具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (vii) 分别具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (viii) 分别具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (ix) 分别具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (x) 分别具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (xi) 分别具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (xii) 分别具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; (xiii) 分别具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3; 或 (xiv) 分别具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中, CDR1、CDR2或CDR3根据Kabat编号方案、IMGT编号方案、AbM编号方案、Chothia编号方案、Contact编号方案或它们的组合来确定。

[0010] 在一些实施方案中, 本文提供的抗CD19 sdAb进一步包含一个或多个如SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和/或SEQ ID NO:104中所示的FR区。

[0011] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD19 sdAb包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供的抗CD19 sdAb包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0012] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD19 sdAb是美洲驼或骆驼科sdAb。在其它实施方案中,本文提供的抗CD19 sdAb是人源化sdAb。在某些实施方案中,所述抗CD19 sdAb与剂基因融合或化学缀合。

[0013] 另一方面,本文提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)包含本文提供的抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域进一步包含一个或多个另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域进一步包含一个另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域进一步包含两个另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的抗原结合结构域与选自由以下组成的组的一种或多种抗原结合:CD20、CD22、CD33、CD38、BCMA、CS1、ROR1、GPC3、CD123、IL-13R、CD138、c-Met、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3和糖脂F77。

[0014] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域来源于选自由以下组成的组的分子:CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。在一些具体实施方案中,所述跨膜结构域来源于CD8 α 。

[0015] 在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。

[0016] 在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些具体实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于CD137。

[0017] 在一些实施方案中,本文提供的CAR进一步包含位于所述细胞外抗原结合结构域的C-末端与所述跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域。在一些具体实施方案中,所述铰链结构域来源于CD8 α 。

[0018] 在一些实施方案中,本文提供的CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽。在一些具体实施方案中,所述信号肽来源于CD8 α 。

[0019] 另一方面,本文提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含选自由SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列。另一方面,本文提供了包含编码本文提供的抗CD19sdAb的核酸序列的分离的核酸。

[0020] 另一方面,本文提供了包含分离的核酸的载体,所述分离的核酸包含编码本文提供的抗CD19 sdAb的核酸序列。在又一方面,本文提供了分离的核酸,其包含编码本文提供

的CAR的核酸序列。在又一方面,本文提供了包含分离的核酸的载体,所述分离的核酸包含编码本文提供的CAR的核酸序列。

[0021] 在又一方面,本文提供一种工程化免疫效应细胞,其包含本文提供的CAR、分离的核酸或载体。在一些实施方案中,所述免疫效应细胞是T细胞或B细胞。

[0022] 在又一方面,本文提供一种药物组合物,其包含本文提供的抗CD19 sdAb、工程化免疫效应细胞或载体,和药学上可接受的赋形剂。

[0023] 在又一方面,本文提供治疗受试者的疾病或病症的方法,该方法包括对所述受试者施用有效量的本文提供的抗CD19 sdAb、工程化免疫效应细胞或药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症是CD19相关疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞相关疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述B细胞恶性肿瘤是B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,所述疾病或病症选自自由以下组成的组:边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、伯基特淋巴瘤、原发性眼内淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病(HCL)、前体B成淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、高级B细胞淋巴瘤(HGBL)和多发性骨髓瘤(MM)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫和/或炎性疾病。在一些实施方案中,所述自身免疫和/或炎性疾病与不适当或增高的B细胞数目和/或激活相关。

4. 附图说明

[0024] 图1A-1C示出基于VHH的CAR-T细胞(图1A和1B)和基于scFv的CAR-T细胞(图1C)的转导效率。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0025] 图2A-2G示出基于VHH的CAR-T细胞与基于scFv的CAR-T细胞相比对CD19阳性细胞系(图2A-2D)或CD19阴性细胞系(图2E-2G)的体外细胞毒性。

[0026] 图3A-3I示出示例性的基于VHH的CAR-T细胞与基于scFv的CAR-T细胞相比对CD19阳性细胞系(图3A-3D、3F和3G)或CD19阴性细胞系(图3E、3H和3I)的体外细胞毒性。

[0027] 图4A-4C示出示例性的基于VHH的CAR-T细胞与基于scFv的CAR-T细胞相比在以不同的E:T比率与Daudi.Luc、Nalm.6.Luc、Raji.Luc、K562-CD20.Luc或K562-CD22.Luc细胞共培养24小时后的IFN- γ 释放水平。

[0028] 图5A-5C示出示例性的基于VHH的CAR-T细胞在Raji异种移植NCG小鼠模型中的体内功效。通过生物发光成像(图5A-5B)和体重(图5C)定期评估小鼠以监测肿瘤生长。

[0029] 图6A-6C示出来自评估抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb的结合亲和力的研究的示例性结果。MFI=平均荧光强度。

[0030] 图7A-7D示出在20:1、15:1、10:1、5:1或2.5:1的不同效应细胞与靶细胞比率(E:T)下示例性人源化CD19 VHH CAR-T细胞对四种细胞系的细胞毒性。

5. 具体实施方式

[0031] 本公开部分地基于与CD19结合的新型单结构域抗体(例如,VHH结构域)、嵌合抗原

受体或包含它的工程化细胞,以及它们的改进的特性。

[0032] 5.1. 定义

[0033] 本文描述或引用的技术和程序包括本领域技术人员使用常规方法通常充分理解和/或通常采用的那些,举例如以下文献中描述的广泛利用的方法: Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版, 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编, 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An编, 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar编, 2010); 和 *Antibody Engineering* 第1和2卷 (Kontermann和Dübel编, 第2版, 2010)。除本文另有定义外,本说明书中使用的技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。出于解释本说明书的目的,以下对术语的描述将适用,并且在适当的情况下,以单数形式使用的术语也将包括复数,反之亦然。在所陈述的术语的任何描述与以引用的方式并入本文的任何文献冲突的情况下,应以下文对所陈述的术语的描述为准。

[0034] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用,并且以最广泛的含义使用,并且具体地涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整单克隆抗体),具有多表位或单表位特异性的抗体组合物,多克隆或单价抗体,多价抗体,由至少两种完整抗体、单链抗体及其片段(例如,结构域抗体)形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物活性即可),如下所述。抗体可以是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和/或亲和力成熟抗体,以及来自其它物种(例如来自小鼠、兔、美洲驼等)的抗体。术语“抗体”旨在包括免疫球蛋白类多肽内的B细胞的多肽产物,该多肽产物能够与特定分子抗原结合,并且由两个同一的多肽链对组成,其中每对具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa),每条链的每个氨基末端部分包括约100至约130或更多个氨基酸的可变区,并且每条链的每个羧基末端部分包括恒定区。参见例如 *Antibody Engineering* (Borrebaeck编, 第2版1995); 和 Kuby, *Immunology* (第3版1997)。抗体还包括但不限于合成抗体、重组产生的抗体、包括来自骆驼科物种(例如,美洲驼或羊驼)的单结构域抗体在内的单结构域抗体或其人源化变体、细胞内抗体、抗独特型(抗Id)抗体以及上述任一者的功能片段(例如,抗原结合片段),该功能片段是指抗体重链或轻链多肽的一部分,该部分保留了该片段所来源的抗体的一些或全部结合活性。功能性片段(例如,抗原结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(dsFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。特别地,本文提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如抗原结合结构域或含有与抗原结合的抗原结合位点的分子(例如,抗体的一个或多个CDR)。此类抗体片段可见于例如Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1989); *Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers编, 1995); Huston等人, 1993, *Cell Biophysics* 22: 189-224; Plückthun和Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.* 178: 497-515; 和 Day, *Advanced Immunochimistry* (第2版1990)。本文提供的抗体可以属于任何类别(例如, IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)的免疫球蛋白分子。抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。抗体可以既不是激动性的也不是拮抗性的。

[0035] “抗原”是抗体可以与其选择性结合的结构。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核

酸、脂质、半抗原或其它天然存在的或合成的化合物。在一些实施方案中,靶抗原是多肽。在某些实施方案中,抗原与细胞相关,例如存在于细胞上或细胞中。

[0036] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定区CH1、CH2和CH3的抗体。恒定区可包括人恒定区或其氨基酸序列变体。在某些实施方案中,完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0037] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单个多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步包含在VH与VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun的The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0038] 术语“仅有重链的抗体”或“HCAb”是指这样的功能性抗体,其包含重链,但缺少通常见于4-链抗体中的轻链。已知骆驼科动物(如骆驼、美洲驼或羊驼)产生HCAb。

[0039] 如本文所用的“单结构域抗体”或“sdAb”是指单个单体可变抗体结构域,并且能够进行抗原结合(例如,与CD19结合的单结构域抗体)。单结构域抗体包括如本文所述的VHH结构域。单结构域抗体的实例包括但不限于天然缺乏轻链的抗体(如来自骆驼科物种(例如,美洲驼)的抗体)、来源于常规4-链抗体的单结构域抗体、工程化抗体和除来源于抗体的单结构域支架以外的单结构域支架。单结构域抗体可来源于任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、山羊、兔和牛。例如,单结构域抗体可来源于骆驼科物种中产生的抗体,例如骆驼、美洲驼、单峰骆驼、羊驼和原驼中产生的抗体,如本文所述。骆驼科以外的其它物种可产生天然缺乏轻链的重链抗体;来源于这类其它物种的VHH在本公开的范围内。在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体(例如,VHH)具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构。如本文所述,单结构域抗体可与另一种分子(例如,药剂)遗传融合或化学缀合。单结构域抗体可以是更大的结合分子(例如,多特异性抗体或嵌合抗原受体)的一部分。

[0040] 术语“结合(bind/binding)”是指分子之间的相互作用,包括例如用于形成复合物的相互作用。相互作用可以是例如非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可以包括通过共价或非共价键、相互作用或力保持在一起的两个或更多个分子的结合。抗体上的单个抗原结合位点与靶分子(如抗原)的单个表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体或功能片段对该表位的亲和力。结合分子(例如,抗体)与单价抗原的解离速率($k_{\text{解离}}$)与缔合速率($k_{\text{结合}}$)的比率($k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$)是解离常数 K_D ,该解离常数与亲和力成反比。 K_D 值越低,抗体的亲和力越高。 K_D 的值因抗体和抗原的不同复合物而异,并且取决于 $k_{\text{结合}}$ 和 $k_{\text{解离}}$ 两者。可使用本文提供的任何方法或本领域技术人员熟知的任何其它方法来确定本文提供的抗体的解离常数 K_D 。在一个结合位点处的亲和力并不总是反映抗体与抗原之间的相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇的复合抗原(如多价抗原)与含有多个结合位点的抗体发生接触时,抗体与抗原在一个位点处的相互作用将增加在第二个位点处发生反应的可能性。多价抗体与抗原之间的此类多重相互作用的强度被称为亲合力(avidity)。

[0041] 关于本文所述的结合分子,诸如“与……结合”、“与……特异性结合”的术语及类似术语在本文中也可互换使用,并且是指与抗原特异性结合的抗原结合结构域的结合分子,如多肽。与抗原结合或特异性结合的结合分子或抗原结合结构域可例如通过免疫测定、

Octet[®]、Biacore[®]或本领域技术人员已知的其它技术来鉴定。在一些实施方案中,当如使用诸如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)的实验技术所测定,结合分子或抗原结合结构域以比与任何交叉反应性抗原结合更高的亲和力与抗原结合时,该结合分子或抗原结合结构域与抗原结合或特异性结合通常,特异性或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且可以背景的超过10倍。关于结合特异性的讨论,参见例如 *Fundamental Immunology* 332-36 (Paul编,第2版1989)。在某些实施方案中,例如如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或RIA测定,结合分子或抗原结合结构域与“非靶”蛋白的结合的程度小于结合分子或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合的约10%。与抗原结合的结合分子或抗原结合结构域包括能够以足够的亲和力结合所述抗原以使得结合分子可在靶向所述抗原中用作例如治疗和/或诊断剂的结合分子或抗原结合结构域。在某些实施方案中,与抗原结合的结合分子或抗原结合结构域具有小于或等于1 μ M、800nM、600nM、550nM、500nM、300nM、250nM、100nM、50nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域与在来自不同物种的抗原当中保守的抗原的表位结合。

[0042] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“嵌合”序列,其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源,而该一条或多条链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段(只要它们表现出所需的生物活性即可)中的相应序列同一或同源(参见美国专利号4,816,567;和Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-55)。嵌合序列可包括人源化序列。

[0043] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含非人(例如,骆驼科、鼠、非人灵长类动物)抗体的“人源化”形式的部分,其包括来自人免疫球蛋白(例如,受体抗体)的序列,其中原生CDR残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(例如,供体抗体)如骆驼科、小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的相应CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白序列的一个或多个FR区残基被相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含不见于受体抗体中或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。人源化抗体重链或轻链可包含实质上所有的至少一个或多个可变区,其中所有或实质上所有的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且所有或实质上所有的FR是人免疫球蛋白序列的FR。在某些实施方案中,人源化抗体将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于进一步的细节,参见Jones等人,Nature 321:522-25(1986); Riechmann等人,Nature 332:323-29(1988); Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-96(1992); Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89(1992);美国专利号6,800,738、6,719,971、6,639,055、6,407,213和6,054,297。

[0044] 在某些实施方案中,结合分子或抗原结合结构域可包含“完全人抗体”或“人抗体”的部分,其中所述术语在本文中可互换使用,并且是指包含人可变区和例如人恒定区的抗体。结合分子可包含单结构域抗体序列。在具体实施方案中,所述术语是指包含人源的可变区和恒定区的抗体。“完全人”抗体在某些实施方案中还可以涵盖结合多肽并由作为人种系免疫球蛋白核酸序列的天然存在的体细胞变体的核酸序列编码的抗体。术语“完全人抗体”包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体,如Kabat等人(参见

Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S.Department of Health and Human Services, NIH公布号91-3242)所述。“人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或已经使用任何用于制备人抗体的技术制备的氨基酸序列的抗体。人抗体的这一定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域中已知的各种技术产生人抗体, 该技术包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter, *J.Mol.Biol.* 227:381 (1991); Marks等人, *J.Mol.Biol.* 222:581 (1991)) 和酵母展示文库(Chao等人, *Nature Protocols* 1:755-68(2006))。以下文献中描述的方法也可用于制备人单克隆抗体: Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner等人, *J.Immunol.* 147(1):86-95 (1991); 以及van Dijk和van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:368-74(2001)。人抗体可通过将抗原施用于转基因动物来制备, 该转基因动物已被修饰成响应于抗原攻击而产生此类抗体, 但该转基因动物的内源基因座已被禁用, 例如小鼠(关于XENOMOUSETM技术, 参见例如akobovits, *Curr.Opin.Biotechnol.* 6(5):561-66 (1995); Brüggemann和Taussing, *Curr.Opin.Biotechnol.* 8(4):455-58(1997); 以及美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体, 还参见例如Li等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103:3557-62(2006)。

[0045] 在某些实施方案中, 结合分子或抗原结合结构域可包含“重组人抗体”的部分, 其中该短语包括通过重组手段制备、表达、创造或分离的人抗体, 诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体文库中分离的抗体、从针对人免疫球蛋白基因进行转基因和/或转染色体的动物(例如, 小鼠或母牛)中分离的抗体(参见例如Taylor, L.D.等人, *Nucl.Acids Res.* 20:6287-6295(1992)) 或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它手段制备、表达、创造或分离的抗体。此类重组人抗体可具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(参见Kabat, E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S.Department of Health and Human Services, NIH公布第91-3242号)。然而, 在某些实施方案中, 对此类重组人抗体进行体外诱变(或者, 当使用针对人Ig序列转基因的动物时, 进行体内体细胞诱变), 因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列, 该序列虽然来源于人种系VH和VL序列并与其有关, 但可能不天然存在于体内人抗体种系库内。

[0046] 在某些实施方案中, 结合分子或抗原结合结构域可包含“单克隆抗体”的一部分, 其中如本文所用的该术语是指获自实质上同质的抗体的群体的抗体, 例如, 除了有少量存在的可能的天然存在的突变或熟知的翻译后修饰如氨基酸异构化或脱酰胺化、甲硫氨酸氧化或天冬酰胺或谷氨酰胺脱酰胺化之外, 构成所述群体的单个抗体是同一的, 每种单克隆抗体通常将识别抗原上的单个表位。在具体实施方案中, 如本文所用的“单克隆抗体”是由单个杂交瘤或其它细胞产生的抗体。术语“单克隆”不限于用于制备抗体的任何特定方法。例如, 可用于本公开的单克隆抗体可通过由Kohler等人, *Nature* 256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法制备, 或者可使用重组DNA方法在细菌或真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利号4,816,567)。也可以使用例如Clackson等人, *Nature* 352:624-28(1991)和Marks等人, *J.Mol.Biol.* 222:581-97(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法是本领域中熟知的。参见例

如Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编,第5版2002)。

[0047] 典型的4-链抗体单元是由两条同一的轻(L)链和两条同一的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。在IgG的情况下,4-链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链相连,而两条H链通过一个或多个二硫键彼此相连,这取决于H链同种型。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N-末端具有可变结构域(VH),接着对于 α 和 γ 链中的每一者具有三个恒定结构域(CH),且对于 μ 和 ϵ 同种型具有四个CH结构域。每条L链在N-末端具有可变结构域(VL),接着在其另一端具有恒定结构域(CL)。将VL与VH比对,且将CL与重链的第一恒定结构域(CH1)比对。据信特定的氨基酸残基形成轻链可变结构域与重链可变结构域之间的界面。VH与VL的配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别的抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology 71 (Stites等人编,第8版1994);和Immunobiology (Janeway等人编,第5版2001)。

[0048] 术语“Fab”或“Fab区”是指与抗原结合的抗体区。常规的IgG通常包含两个Fab区,每个Fab区均驻存于Y形IgG结构的两个臂之一上。每个Fab区通常由重链和轻链中的每一者的一个可变区和一个恒定区组成。更具体地,Fab区中重链的可变区和恒定区是VH和CH1区,且Fab区中轻链的可变区和恒定区是VL和CL区。Fab区中的VH、CH1、VL和CL可以按各种方式排列以赋予根据本公开的抗原结合能力。例如,VH和CH1区可以在一个多肽上,且VL和CL区可以在分开的多肽上,类似于常规IgG的Fab区。可替代地,VH、CH1、VL和CL区可以都在相同的多肽上,并且以不同的顺序定向,如下文部分中更详细描述。

[0049] 术语“可变区”、“可变结构域”、“V区”或“V结构域”是指抗体的轻链或重链的一部分,该部分通常位于轻链或重链的氨基末端,并且具有在重链中约120至130个氨基酸和在轻链中约100至110个氨基酸的长度,并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。重链的可变区可以被称为“VH”。轻链的可变区可以被称为“VL”。术语“可变的”是指可变区的某些区段在抗体之间的序列上有广泛差异的事实。V区介导抗原结合,并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在可变区的110个氨基酸跨度上不是均匀分布的。相反,V区由通过各自是9-12个氨基酸长的被称为“高变区”的较大可变性(例如,极端可变性)的较短区分隔的约15-30个氨基酸的被称为框架区(FR)的较小可变性(例如,相对不变)的延伸段组成。重链和轻链的可变区各自包含四个FR,该四个FR主要采取 β 折叠构型,由三个高变区连接,该三个高变区形成连接 β 折叠结构的环,并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧密地保持在一起,并且与来自其他链的高变区一起为抗体的抗原结合位点的形成作出贡献(参见例如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest (第5版1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。可变区在不同抗体之间的序列上有广泛的差异。在具体实施方案中,可变区是人可变区。

[0050] 术语“根据Kabat的可变区残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变化形式是指Kabat等人(同上)中的抗体汇编中针对重链可变区或轻链可变区所使用的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有较少或另外的氨基酸,该较少或另外的氨基酸对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或者向可变结构域的FR或CDR中的插入。例如,重链可变结构域可包括在残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在残基82之后的三个插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体,残

基的kabat编号可通过在所述抗体的序列的同源区与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定。当提到可变结构域中的残基(近似为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,同上)。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,Kabat等人,同上中报道的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG 1EU抗体的残基编号。其它编号系统已经例如由AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon描述。

[0051] 当在提及抗体时被使用时,术语“重链”是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含约120至130或更多个氨基酸的可变区,且羧基末端部分包含恒定区。基于重链恒定区的氨基酸序列,恒定区可以是被称为alpha (α)、delta (δ)、epsilon (ϵ)、gamma (γ)和mu (μ)的五种不同类型(例如,同种型)之一。不同的重链大小不同: α 、 δ 和 γ 含有近似450个氨基酸,而 μ 和 ϵ 含有近似550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生五种熟知类别(例如,同种型)的抗体,即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括IgG的四个亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0052] 当在提及抗体时被使用时,术语“轻链”是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含约100至约110或更多个氨基酸的可变区,且羧基末端部分包含恒定区。轻链的近似长度为211至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列,存在被称为kappa (κ)或lambda (λ)的两种不同类型。

[0053] 如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“互补决定区”和“CDR”可互换使用。“CDR”是指免疫球蛋白(Ig或抗体)VH β -折叠框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,或抗体VL β -折叠框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是散布在框架区序列内的可变区序列。

[0054] CDR区是本领域技术人员熟知的,并且已经由熟知的编号系统定义。例如,kabat互补决定区(CDR)是基于序列可变性,并且是最常用的(参见例如Kabat等人,同上)。Chothia代之以指结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-17(1987))。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变化,这取决于该环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入物置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则该环在32处结束;如果仅35A存在,则该环在33处结束;如果35A和35B都存在,则该环在34处结束)。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用(参见例如,Antibody Engineering第2卷(Kontermann和Dübel编,第2版2010))。所述“contact”高变区基于对可用的复杂晶体结构的分析。另一个已经开发并被广泛采用的通用编号系统是ImMunoGeneTics(IMGT) Information System[®](Lafranc等人,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT是一个综合信息系统,该系统专门研究人和其它脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TCR)和主要组织相容性复合体(MHC)。在本文中,CDR是根据氨基酸序列和在轻链或重链中的位置二者来提及的。由于CDR在免疫球蛋白可变结构域的结构内的“位置”在物种之间是保守的,并且存在于称为环的结构中,因此通过使用根据结构特征比对可变结构域序列的编号系统,很容易鉴定CDR和框架残基。在来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基移植和替换到来自通常人抗体的受体框架中时可使用这种信息。Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-70(2001)已经开发了另外的编号系统(AHon)。包括例如Kabat编号和IMGT独特编号系统在内的编号系统之间的对应关系是

本领域技术人员熟知的(参见例如Kabat,同上;Chothia和Lesk,同上;Martin,同上;Lefranc等人,同上)。下表1中例示了来自这些高变区或CDR中的每一个高变区或CDR的残基。

[0055] 表1. 根据各种编号系统的示例性CDR

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 或 L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 或 L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 或 L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (Kabat 编号)	H26--H35B	H26--H32.. 34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Chothia 编号)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 或 H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 或 H95--H102	H93--H101	H105-H117

[0057] 给定CDR的边界可根据用于鉴定的方案而变化。因此,除另有规定外,术语给定抗体或其区域(如可变区)的“CDR”和“互补决定区”以及抗体或其区域的单个CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2)应被理解为涵盖由如本文上文所述的任何已知方案所定义的互补决定区。在一些情况下,指定了用于鉴定特定的一个或多个CDR的方案,如由IMGT、Kabat、Chothia或Contact方法定义的CDR。在一些情况下,根据Kabat编号的一个或多个位置可能不在实际序列中被占据,或者实际序列可含有比Kabat编号所允许的数目更多的氨基酸残基。关于根据Kabat对VHH结构域的示例性编号,参见例如,Deschacht等人,2010. J Immunol 184:5696-704。在其它情况下,给出了CDR的特定氨基酸序列。应该注意的是,CDR区也可由各种编号系统的组合,例如Kabat和Chothia编号系统的组合或Kabat和IMGT编号系统的组合来定义。因此,诸如“如特定VH或VHH中所示的CDR”的术语包括由上述示例性CDR编号系统定义的任何CDR1,但不限于此。一旦给出可变区(例如,VHH、VH或VL),本领域技术人员将理解的是,该区域内的CDR可由不同的编号系统或其组合来定义。

[0058] 高变区可包含如下“扩展高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。

[0059] 术语“恒定区”或“恒定结构域”是指轻链和重链的不直接参与抗体与抗原的结合、但表现出各种效应子功能(如与Fc受体相互作用)的羧基末端部分。该术语是指免疫球蛋白

分子的一部分,该部分相对于免疫球蛋白的另一部分(即含有抗原结合位点的可变区)具有更保守的氨基酸序列。恒定区可含有重链的CH1、CH2和CH3区以及轻链的CL区。

[0060] 术语“框架”或“FR”是指侧接CDR的那些可变区残基。FR残基存在于例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、结构域抗体(例如,单结构域抗体)、双抗体、线性抗体和双特异性抗体中。FR残基是除高变区残基或CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0061] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区域,包括例如原生序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能会变化,但人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226或从Pro230处的氨基酸残基延伸到其羧基末端。可例如在抗体的产生或纯化期间或通过以重组的方式将编码抗体的重链的核酸工程化来移除Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。因此,完整抗体的组合物可包含移除了所有K447残基的抗体群体、没有移除K447残基的抗体群体以及具有含和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。“功能性Fc区”具有原生序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调等。此类效应子功能通常需要Fc区与结合区或结合结构域(例如,抗体可变区或结构域)组合,并且可使用本领域技术人员已知的各种测定法进行评估。“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失)而不同于原生序列Fc区的氨基酸序列的氨基酸序列。在某些实施方案中,变体Fc区与原生序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如,在原生序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中的约一至约十个氨基酸取代或约一至约五个氨基酸取代。本文的变体Fc区可与原生序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%的同源性,或者与其具有至少约90%的同源性,例如与其具有至少约95%的同源性。

[0062] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语,并且是指结合分子(例如,包含单结构域抗体序列的抗体)可与之特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象的、非线性的或不连续的表位。例如在多肽抗原的情况下,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位),或者表位可包含来自多肽的两个或更多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)。本领域技术人员将理解的是,一般来说,线性表位可依赖或不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方案中,结合分子与一组氨基酸结合,而不管它们是否在天然三维蛋白质结构中折叠。在其它实施方案中,结合分子需要构成表位的氨基酸残基呈现出特定的构象(例如,弯曲、扭曲、翻转或折叠),以便识别并结合表位。

[0063] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其所结合的抗原的生物活性的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体或拮抗剂抗体实质性地或完全地抑制抗原的生物活性。

[0064] “激动剂”或激活抗体是增强或启动其所结合的抗原的信号传导的抗体。在一些实施方案中,激动剂抗体在不存在天然配体的情况下引起或激活信号传导。

[0065] 关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”被定义为在对候选序列和特定肽或多肽序列进行比对并且在必要的情况下引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,该候选序列中与该特定肽或多肽序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以按本领域技术范围内的各种方式(例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件)实现。本领域技术人员可确定用

于测量比对的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0066] 如本文所用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指基因工程化受体,该基因工程化受体可被用于将一种或多种抗原特异性地移植到免疫效应细胞如T细胞上。一些CAR也被称为“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”或“嵌合免疫受体”。在一些实施方案中,CAR包含对一种或多种抗原(如肿瘤抗原)具有特异性的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和T细胞和/或其它受体的细胞内信号传导结构域。“CAR-T细胞”是指表达CAR的T细胞。

[0067] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,并且是指任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是直链或支链的,它可包含经修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖已经天然或通过干预(例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵或修饰)修饰的氨基酸聚合物。该定义中还包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括但不限于非天然氨基酸以及本领域中已知的其它修饰形式)的多肽。要理解的是,因为本公开的多肽可基于抗体或免疫球蛋白超家族的其它成员,所以在某些实施方案中,“多肽”可作为单链或作为两条或更多条相关链出现。

[0068] 如本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入到聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及其类似物。如本文所用的“寡核苷酸”是指短的、通常是单链的合成多核苷酸,该多核苷酸长度通常但不一定少于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不相互排斥。上文针对多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。产生本公开的结合分子的细胞可包括亲本杂交瘤细胞以及已经引入了编码抗体的核酸的细菌和真核宿主细胞。除另有说明外,本文公开的任何单链多核苷酸序列的左手端是5'端;双链多核苷酸序列的左手方向称为5'方向。新生RNA转录物的从5'到3'添加的方向称为转录方向;DNA链上与RNA转录物具有相同序列的在RNA转录物的5'端的5'的序列区称为“上游序列”;DNA链上的与RNA转录物具有相同序列的在RNA转录物的3'端的3'的序列区称为“下游序列”。

[0069] “分离的核酸”是这样的核酸(例如RNA、DNA或混合核酸),该核酸实质上与天然伴随原生序列的其它基因组DNA序列以及蛋白质或复合物如核糖体和聚合酶分离。“分离的”核酸分子是这样的核酸分子,该核酸分子与该核酸分子的天然来源中存在的其它核酸分子分离。此外,“分离的”核酸分子,诸如cDNA分子,在通过重组技术产生时可以实质上不含其它细胞材料或培养基,或者在化学合成时实质上不含化学前体或其它化学品。在具体的实施方案中,分离或纯化一种或多种编码单结构域抗体或如本文所述的抗体的核酸分子。该术语包括已经从其天然存在的环境中移出的核酸序列,并且包括重组或克隆的DNA分离物和化学合成的类似物或通过异源系统生物合成的类似物。实质上纯的分子可包括该分子的经分离形式。具体地,编码本文所述的CAR或sdAb的“分离的”核酸分子是这样的核酸分子,该核酸分子被鉴定出来并且与在产生该核酸分子的环境中通常与该核酸分子缔合的至少一种污染核酸分子分离。

[0070] 术语“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如适用于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多聚腺苷酸化信号和增强子。

[0071] 如本文所用,术语“可操作地连接(的)”和类似的短语(例如,基因融合(的))在提及核酸或氨基酸时被使用时分别是指被放置成彼此处于功能关系的核酸序列或氨基酸序列的可操作连接。例如,可操作连接的启动子、增强子元件、开放阅读框、5' 和3' UTR以及终止子序列导致核酸分子(例如,RNA)的准确产生。在一些实施方案中,可操作连接的核酸元件导致开放阅读框的转录,并最终导致多肽的产生(即,开放阅读框的表达)。作为另一实例,可操作连接的肽是其中功能结构域以彼此适当的距离被放置以赋予每个结构域的预期功能的肽。

[0072] 术语“载体”是指用于携带或包含核酸序列(包括例如编码如本文所述的结合分子(例如,抗体)的核酸序列)以便将该核酸序列引入到宿主细胞中的物质。适用的载体包括例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,它们可以包括可用于稳定整合到宿主细胞的染色体中的选择序列或标志物。另外,载体可包含一种或多种可选择的标志基因和适当的表达控制序列。可以包含的可选择的标志基因例如提供对抗生素或毒素的抗性、补充营养缺陷型不足或提供培养基中没有的关键营养素。表达控制序列可包括本领域中熟知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当要共表达两种或更多种核酸分子(例如,抗体重链和轻链或抗体VH和VL)时,可以将这两种核酸分子例如插入到单个表达载体或分开的表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以可操作地连接到一个共同的表达控制序列或连接到不同的表达控制序列,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可使用本领域中熟知的方法确认将核酸分子引入到宿主细胞中。此类方法包括例如核酸分析,如Northern印迹或mRNA的聚合酶链式反应(PCR)扩增、用于基因产物表达的免疫印迹或用于测试引入的核酸序列或其相应基因产物的表达的其它合适的分析方法。本领域技术人员要理解的是,核酸分子以足以产生所需产物的量表达,并且进一步要理解的是,可使用本领域中熟知的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0073] 如本文所用的术语“宿主”是指动物,如哺乳动物(例如,人)。

[0074] 如本文所用的术语“宿主细胞”是指可以用核酸分子转染的特定受试者细胞和此种细胞的子代或潜在子代。由于在后续世代中可能发生的突变或环境影响或者核酸分子向宿主细胞基因组中的整合,此种细胞的子代可能与用核酸分子转染的亲本细胞不是同一的。

[0075] 如本文所用的术语“自体的”意指任何这样的材料,该材料来源于该材料后来要被重新引入到的同一个体中。

[0076] “同种异体的”是指来源于相同物种的不同个体的移植物。

[0077] 如本文所用的术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指外源核酸被转移或引入到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代受试细胞及其子代。

[0078] 如本文所用的术语“药学上可接受的”意指由联邦或州政府监管机构批准的或者在美国药典、欧洲药典或其它公认的药典中列出用于动物,并且更具体地用于人。

[0079] “赋形剂”意指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或包封材料。赋形剂包括例如包封材料或添加剂,如吸收促进剂、抗氧化剂、粘结剂、缓冲剂、载剂、包衣剂、着色剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、保湿剂、润滑剂、香料、防腐剂、推进剂、释放剂、杀菌剂、甜味剂、增溶剂、润湿剂及其混合物。术

语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))或媒介物。

[0080] 在一些实施方案中,赋形剂是药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的实例包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,少于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICSTM。在Remington和Gennaro, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (第18版1990)中描述了药学上可接受的赋形剂的其它实例。

[0081] 在一个实施方案中,每种组分在与药物制剂的其它成分相容的意义上是“药学上可接受的”,并且适于与人和动物的组织或器官接触使用而没有过度毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其它问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。参见例如Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA,2005;Handbook of Pharmaceutical Excipients,第6版;Rowe等人编;The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association:2009;Handbook of Pharmaceutical Additives,第3版;Ash和Ash编;Gower Publishing Company:2007;Pharmaceutical Preformulation and Formulation,第2版;Gibson编;CRC Press LLC:Boca Raton,FL,2009。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂在所采用的剂量和浓度下对暴露其中的细胞或哺乳动物是无毒的。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是水性pH缓冲溶液。

[0082] 在一些实施方案中,赋形剂是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如,药物组合物)时,水是示例性赋形剂。盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油水溶液也可用作液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。赋形剂还可以包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇(propylene glycol)、水、乙醇等。如果需要的话,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等形式。包括制剂在内的口服组合物可包含标准赋形剂,如药用级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0083] 包括药物化合物的组合物可含有例如分离或纯化形式的结合分子(例如,抗体)连同合适量的赋形剂。

[0084] 如本文所用的术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以产生所需结果的本文提供的单结构域抗体或包含剂和单结构域抗体的治疗分子或药物组合物的量。

[0085] 术语“受试者”和“患者”可互换使用。如本文所用,在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,如非灵长类动物或灵长类动物(例如,人)。在具体实施方案中,受试者是人。在一个实施方案中,受试者是被诊断为患有疾病或病症的哺乳动物,例如人。在另一实施方案中,受试者是处于发展疾病或病症的风险中的哺乳动物,例如人。

[0086] “施用(administer/administration)”是指例如通过粘膜、皮内、静脉内、肌肉内递送和/或本文所述或本领域中已知的任何其它物理递送方法,将存在于体外的物质注射或以其它方式物理递送到患者体内的动作。

[0087] 如本文所用,术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指由施用一种或多种疗法引起的疾病或病状的进展、严重程度和/或持续时间的减少或改善。可以通过评估与潜在病症相关的一种或多种症状是否已经减少、缓和和/或纾缓从而使得在患者身上观察到改进来确定治疗,尽管患者可能仍然受到潜在病症的折磨。术语“治疗”包括控制和改善疾病。术语“管控(manage/managing/management)”是指受试者从疗法中获得的有益效果,该疗法不一定导致疾病的治愈。

[0088] 术语“预防(prevent/preventing/prevention)”是指降低疾病、病症、病状或相关症状(例如,糖尿病或癌症)发作(或复发)的可能性。

[0089] 如本文所用,“延迟”癌症的发展意指推迟、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或推延所述疾病的发展。这种延迟可能具有不同的时间长度,这取决于病史和/或正在接受治疗的个体。正如本领域技术人员显而易见的,充分或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会发展该疾病。“延迟”癌症的发展的方法是当与不使用该方法相比时,在给定的时间框架内降低疾病发展的可能性和/或在给定的时间框架内降低疾病程度的方法。这类比较通常基于临床研究,使用统计学上显著数量的个体。癌症的发展可使用标准方法检测,该方法包括但不限于计算机化轴向断层摄影术(CAT扫描)、磁共振成像(MRI)、腹部超声、凝血测试、动脉造影术或活组织检查。发展也可以指最初可能检测不到的癌症进展,并且包括出现、复发和发作。

[0090] 如本文所用的“B细胞相关疾病或病症”是指由B细胞介导或由异常B细胞功能(如B细胞功能的失调)赋予的疾病或病症。如本文所用的“B细胞相关疾病或病症”包括但不限于B细胞恶性肿瘤,如B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。它还包括边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、伯基特淋巴瘤、原发性眼内淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病(HCL)、前体B成淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、高级B细胞淋巴瘤(HGBL)和多发性骨髓瘤(MM)。“B细胞相关疾病或病症”还包括某些自身免疫性和/或炎性疾病,如与不适当或增高的B细胞数目量和/或激活相关的那些。

[0091] 如本文所用的“CD19相关疾病或病症”是指包含表达CD19的细胞或组织的疾病或病症。在一些实施方案中,CD19相关疾病或病症包含异常表达CD19的细胞,例如,与正常或健康细胞相比具有更高的CD19表达的细胞。

[0092] 术语“约”和“近似”意指在给定值或范围的20%以内、15%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内或更少。

[0093] 除上下文另有明确规定外,如本公开和权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述/该(the)”包括复数形式。

[0094] 要理解的是,每当本文用术语“包含”来描述实施方案时,也提供了按照“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的另外类似的实施方案。还要理解的是,每当本文用短语“基本上由……组成”来描述实施方案时,也提供了按照“由……组成”描述的另外类似的实施方案。

[0095] 如在诸如“A与B之间”或“A-B之间”的短语中所用的术语“之间”是指包括A和B两者

的范围。

[0096] 如本文在诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”旨在包括:A和B两者;A或B;A(单独);和B(单独)。同样地,如在诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施方案中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0097] 5.2. 单结构域抗体

[0098] 5.2.1. 与CD19结合的单结构域抗体

[0099] 一方面,本文提供了能够与CD19结合的单结构域抗体(例如,VHH结构域)。

[0100] 在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体(例如,VHH结构域)与人CD19结合。人CD19抗原是属于免疫球蛋白(Ig)超家族的95kd跨膜糖蛋白。Carter和Barrington, Curr Dir Autoimmun.7:4-32(2004)。CD19由位于16号染色体16p11.2的短臂上的7.41千碱基对(kilobite)cd19基因编码。Zhou等人, Immunogenetics.35(2):102-11(1992)。CD19在正常和增生性B细胞以及滤泡树突状细胞中特异性表达。

[0101] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD19单结构域抗体调节一种或多种CD19活性。在一些实施方案中,本文提供的抗CD19单结构域抗体是拮抗剂抗体。

[0102] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD19单结构域抗体以 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)与CD19(例如,人CD19)结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的,其中的任何一种方法都可用于本公开的目的,包括通过RIA,其例如用所关注的抗体的Fab型式及其抗原进行(Chen等人,1999,J.Mol Biol 293:865-81);通过生物层干涉度量法(BLI)或表面等离子体共振(SPR)测定法,其通过使用例如Octet®Red96系统的Octet®或通过使用例如Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000的Biacore®来进行。“结合速率(on-rate)”或“缔合的速率(rate of association)”或“缔合速率(association rate)”或“k结合”也可用上述相同的生物层干涉度量法(BLI)或表面等离子体共振(SPR)技术使用例如Octet®Red96、Biacore®TM-2000或Biacore®TM-3000系统来测定。

[0103] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD19单结构域抗体是VHH结构域。本文提供的示例性VHH结构域如下文第6节中所述的那样产生,并且也如下表2中所示,这些VHH结构域被称为VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157、LIC1159、huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和A592H4。

[0104] 因此,在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体包含VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157、LIC1159、huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和A592H4中的任一者的一个或多个CDR序列。在一些实施方案中,本文提供了与CD19结合的单结构域抗体,其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中所述CDR序列选VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157、LIC1159、huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和/或A592H4中的那些。

[0105] 表2. 示例性单结构域抗体

[0106]

	VHH		CDR1	CDR2	CDR3
VHH-083	SEQ ID NO: 43	ID	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
			SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
VHH-111	SEQ ID NO: 44	ID	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 16
			SEQ ID NO: 23 或 109	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 37
77LICA542	SEQ ID NO: 45	ID	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 17
			SEQ ID NO: 24 或 110	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 38
77LICA519	SEQ ID NO: 46	ID	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 18
			SEQ ID NO: 25 或 111	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 39
77LICA602	SEQ ID	ID	SEQ ID NO:	SEQ ID	SEQ ID

[0107]

	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
	NO: 47	5	NO: 12	NO: 19
		SEQ ID NO: 26 或 112	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 40
LIC1157	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 20
		SEQ ID NO: 27 或 113	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 41
LIC1159	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 21
		SEQ ID NO: 28 或 114	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 42
huVHH-773	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
huVHH-776	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
A592H1	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
A592H2	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 50
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
A592H3	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
A592H4	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 36
VHH131	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 15
		SEQ ID NO: 22 或 108	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 36

[0108] 在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:44的氨基酸序

列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的一个、两个或所有三个CDR的抗CD19单结构域抗体。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0109] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:43(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:43中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0110] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:44(例如,SEQ ID NO:16或37)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ

ID NO:44中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:44中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0111] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:45(例如,SEQ ID NO:17或38)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:45中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0112] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:46(例如,SEQ ID NO:18或39)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:46中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其

它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0113] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:47(例如,SEQ ID NO:19或40)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:47中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0114] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:48(例如,SEQ ID NO:20或41)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:48中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0115] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具

有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:49(例如,SEQ ID NO:21或42)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:49中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0116] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:51(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:51中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0117] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:52(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:52中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基

酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0118] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:53(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:53中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0119] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:54(例如,SEQ ID NO:50或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:54中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0120] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:55

中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:55(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:55中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0121] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:56(例如,SEQ ID NO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:56中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0122] 在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1,所述CDR1具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2,所述CDR2具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR2的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR3,所述CDR3具有如SEQ ID NO:104(例如,SEQ IDNO:15或36)中所示的CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR2,所述CDR1和CDR2具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1和CDR2的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1和CDR3,所述CDR1和CDR3具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR2和CDR3,所述CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:

104中所示的CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域抗体具有CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3具有如SEQ ID NO:104中所示的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。可以根据熟知的编号系统来确定CDR序列。在一些实施方案中,CDR是根据IMGT编号。在一些实施方案中,CDR是根据Kabat编号。在一些实施方案中,CDR是根据AbM编号。在其它实施方案中,CDR是根据Chothia编号。在其它实施方案中,CDR是根据Contact编号。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0123] 在一些实施方案中,本文提供了与CD19结合的单结构域抗体,其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中(i)所述CDR1包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:22或108、SEQ ID NO:23或109、SEQ ID NO:24或110、SEQ ID NO:25或111、SEQ ID NO:26或112、SEQ ID NO:27或113或SEQ ID NO:28或114的氨基酸序列;(ii)所述CDR2包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:103的氨基酸序列,和/或(iii)所述CDR3包含SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0124] 在其它实施方案中,本文提供了与CD19结合的单结构域抗体,其包含以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中(i)所述CDR1包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:22或108、SEQ ID NO:23或109、SEQ ID NO:24或110、SEQ ID NO:25或111、SEQ ID NO:26或112、SEQ ID NO:27或113或SEQ ID NO:28或114具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;(ii)所述CDR2包含与SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:103具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;和/或(iii)所述CDR3包含与SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:50具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0125] 在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ

ID NO:8的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0126] 在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0127] 在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0128] 在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:23或109的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CDR1包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0129] 在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0130] 在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:24或110的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0131] 在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0132] 在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:25或111的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0133] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0134] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:26或112的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0135] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0136] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:27或113的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ

ID NO:41的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0137] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0138] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:28或114的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0139] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;且所述CDR3包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0140] 在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:22或108的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列,且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列,且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在其它实施方案中,在本文提供的抗CD19 sdAb中,所述CDR1包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列,且所述CDR3包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是骆驼科的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体是人源化的。在一些实施方案中,所述抗CD19单结构域抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0141] 在一些实施方案中,单结构域抗体进一步包含VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157、LIC1159、huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和/或A592H4的一个或多个框架区。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:43的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:44的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:45的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:46的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于

包含SEQ ID NO:47的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:48的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:49的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:51的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:52的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:53的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:54的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:55的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:56的序列的VHH结构域的一个或多个框架。在一些实施方案中,所述单结构域抗体包含来源于包含SEQ ID NO:104的序列的VHH结构域的一个或多个框架。

[0142] 在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体是人源化单结构域抗体。在一些实施方案中,可使用下文第6节中所例示的方法或下节中描述的方法来产生人源化单结构域抗体。

[0143] 本文所述的构架区是基于CDR编号系统的边界确定的。换言之,如果通过例如Kabat、IMGT或Chothia确定CDR,则框架区是可变区中围绕CDR的氨基酸残基,格式为从N-末端到C-末端:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。例如,FR1被定义为如通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR1氨基酸残基的N-末端的氨基酸残基,FR2被定义为如通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR1与CDR2氨基酸残基之间的氨基酸残基,FR3被定义为如通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR2与CDR3氨基酸残基之间的氨基酸残基,且FR4被定义为如通过例如Kabat编号系统、IMGT编号系统或Chothia编号系统定义的CDR3氨基酸残基的C-末端的氨基酸残基。

[0144] 在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:51的氨

氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,提供了分离的抗CD19单结构域抗体,其包含具有SEQ ID NO:104的氨基酸序列的VHH结构域。在一些实施方案中,提供了包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的多肽。

[0145] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段包含相对于抗体VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157、LIC1159、huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和A592H4中的任一者具有一定百分比的同一性的氨基酸序列。

[0146] 可使用数学算法来确定两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的同一性百分比。用于比较两个序列的数学算法的一个非限制性实例是如Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5877(1993)中那样进行修改的Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268(1990)的算法。此种算法被并入到Altschul等人, J.Mol.Biol.215:403(1990)的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集(例如对于得分=100,字长=12)进行,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集(例如针对得分50,字长=3)进行,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带有空位的比对,可以如Altschul等人, Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997)中所述的那样利用Gapped BLAST。可替代地,PSI-BLAST可被用于执行检测分子之间的远距离关系的迭代搜索(同上)。当利用BLAST、Gapped BLAST和PSI-BLAST程序时,可以使用相应程序(例如, XBLAST和NBLAST的相应程序)的默认参数(参见例如万维网上的National Center for Biotechnology Information(NCBI), ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一非限制性实例是Myers和Miller, CABIOS 4:11-17(1998)的算法。此种算法被并入在ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。在允许或不允许空位的情况下,可使用与上面描述的技术类似的技术来确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常只计算精确匹配。

[0147] 在一些实施方案中,提供了包含与选自SEQ ID NO:43-49、51-56和104的氨基酸序列具有至少约75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一百分比的序列同一性的VHH结构域的抗CD19单结构

域抗体。在一些实施方案中,具有至少约75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一百分比的同一性的VHH序列相对于参考序列含有取代(例如,保守性取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗CD19单结构域抗体保留了与CD19结合的能力。在一些实施方案中,在选自SEQ ID NO:43-49、51-56和104的氨基酸序列中总共有1至10个氨基酸被取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,取代、插入或缺失发生在CDR之外的区域中(即,在FR中)。任选地,抗CD19单结构域抗体包含选自SEQ ID NO:43-49、51-56和104的氨基酸序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0148] 在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:46的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,

其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:56的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。在某些实施方案中,本文所述的单结构域抗体包含与SEQ ID NO:104的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的VHH结构域,其中所述单结构域抗体与CD19结合。

[0149] 在一些实施方案中,可例如通过组合丙氨酸扫描对功能性表位作图,以鉴定CD19蛋白中与本文提供的抗CD19单结构域抗体相互作用所必需的氨基酸。在一些实施方案中,与CD19结合的抗CD19单结构域抗体的构象和晶体结构可被用于鉴定表位。在一些实施方案中,本公开提供了与本文提供的任何抗CD19单结构域抗体特异性结合相同表位的抗体。例如,在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体结合相同表位的抗体。

[0150] 在一些实施方案中,本文提供了与本文所述的任一种抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗CD19抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,可使用ELISA测定法来确定竞争性结合。例如,在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了

与包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。在一些实施方案中,提供了与包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的抗CD19单结构域抗体竞争性地与CD19特异性结合的抗体。

[0151] 在一些实施方案中,本文提供了包含任一种上述抗CD19单结构域抗体的CD19结合蛋白。在一些实施方案中,CD19结合蛋白是单克隆抗体,包括骆驼科、嵌合、人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗CD19抗体是抗体片段,例如VHH片段。在一些实施方案中,抗CD19抗体是包含任何抗体类别或同种型(诸如IgG1或IgG4)的Fc区的全长仅重链抗体。在一些实施方案中,Fc区具有降低或最小化的效应子功能。在一些实施方案中,CD19结合蛋白是包含本文提供的抗CD19单结构域抗体的融合蛋白。在其它实施方案中,CD19结合蛋白是包含本文提供的抗CD19单结构域抗体的多特异性抗体。其它示例性CD19结合分子更详细地描述于以下章节中。

[0152] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗CD19抗体(诸如抗CD19单结构域抗体)或抗原结合蛋白可并入有如下文第5.2.2至5.2.7节中所述的单独的或呈组合的形式任何特征。

[0153] 5.2.2. 人源化单结构域抗体

[0154] 本文所述的单结构域抗体包括人源化单结构域抗体。用于将来自骆驼科物种的单结构域抗体人源化的一般策略已经被描述(参见例如,Vincke等人,J.Biol.Chem.,284(5):3273-3284(2009)),并且可用于产生如本文所公开的人源化VHH结构域。来自骆驼科物种的人源化单结构域抗体的设计可包括VHH中的标志残基,如残基11、37、44、45和47(残基根据Kabat编号)(Muyldermans,Reviews Mol Biotech74:277-302(2001))。

[0155] 也可使用本领域中已知的多种技术来产生人源化抗体,如本文公开的人源化单结构域抗体,这些技术包括但不限于CDR移植(欧洲专利号EP 239,400;国际公布号WO 91/09967;以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、镶饰(veneering)或表面重塑(resurfacing)(欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28

(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);和Roguska等人,PNAS 91:969-973(1994)、链改组(chain shuffling)(美国专利号5,565,332)以及例如以下中公开的技术:美国专利号6,407,213;美国专利号5,766,886;WO 9317105;Tan等人,J.Immunol.169:1119-25(2002);Caldas等人,Protein Eng.13(5):353-60(2000);Morea等人,Methods 20(3):267-79(2000);Baca等人,J.Biol.Chem.272(16):10678-84(1997);Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904(1996);Couto等人,Cancer Res.55(23增刊):5973s-5977s(1995);Couto等人,Cancer Res.55(8):1717-22(1995);Sandhu JS,Gene 150(2):409-10(1994);和Pedersen等人,J.Mol.Biol.235(3):959-73(1994)。还参见美国专利公布号US 2005/0042664A1(2005年2月24日),其中的每一者均以全文引用的方式并入本文。

[0156] 在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体可以是与CD19(包括人CD19)结合的人源化单结构域抗体。例如,本公开的人源化单链抗体可包含SEQ ID NO:43-49、51-56和104中所示的一个或多个CDR。用于将非人抗体人源化的各种方法是本领域中已知的。例如,人源化抗体可具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,该“输入”残基通常取自“输入”可变结构域。例如可以按照以下方法,通过用高变区序列取代人抗体的相应序列进行人源化:Jones等人,Nature 321:522-25(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-27(1988);和Verhoeyen等人,Science239:1534-36(1988)。在具体的实施方案中,如下文第6节中所述的那样进行本文提供的单结构域抗体的人源化。

[0157] 在一些情况下,通过CDR移植来构建人源化抗体,其中亲本非人抗体的CDR的氨基酸序列被移植到人抗体框架上。例如,Padlan等人确定,CDR中只有约三分之一的残基实际接触抗原,并将这些称为“特异性决定残基”或SDR(Padlan等人,FASEB J.9:133-39(1995))。在SDR移植的技术中,只有SDR残基被移植到人抗体框架上(参见例如Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005))。

[0158] 用于制备人源化抗体的人可变结构域的选择对于降低抗原性来说可能是很重要的。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选非人抗体的可变结构域的序列。可以选择与非人抗体最靠近的人序列作为人源化抗体的人框架(Sims等人,J.Immunol.151:2296-308(1993);和Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-17(1987))。另一种方法使用来源于轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定构架。相同的构架可被用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-89(1992);和Presta等人,J.Immunol.151:2623-32(1993))。在一些情况下,所述构架来源于最丰富的人亚类V_L6亚组I(V_L6I)和V_H亚组III(V_HIII)的共有序列。在另一种方法中,人种系基因用作构架区的来源。

[0159] 在称为超级人源化的基于CDR比较的替代范式中,FR同源性是无关紧要的。该方法由将非人序列与功能性人种系基因库进行比较组成。然后选择那些编码与鼠序列相同或密切相关的规范结构的基因。接下来,在与非人抗体共享规范结构的基因之内选择在CDR内具有最高同源性的基因作为FR供体。最后,将非人CDR移植到这些FR上(参见例如Tan等人,J.Immunol.169:1119-25(2002))。

[0160] 通常进一步期望在保留对抗原的亲合力和其它有利的生物学特性的情况下将抗

体人源化。为了实现这一目标,根据一种方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可用的,并且为本领域技术人员所熟悉。计算机程序可用于说明和显示选定候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。这些包括例如WAM(Whitelegg和Rees, *Protein Eng.* 13: 819-24 (2002))、Modeller(Sali和Blundell, *J. Mol. Biol.* 234: 779-815 (1993)) 和Swiss PDB Viewer(Guex和Peitsch, *Electrophoresis* 18: 2714-23 (1997))。对这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,例如分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从接受者和输入序列中选择和组合FR残基,从而实现所需的抗体特征,如对一种或多种靶抗原的亲和力增加。一般来说,高变区残基直接且最实质性地参与影响抗原结合。

[0161] 用于将抗体人源化的另一种方法是基于称为人串含量(Human String Content, HSC)的抗体人性度量。该方法将小鼠序列与人种系基因库进行比较,并将差异评分为HSC。然后通过最大化靶序列的HSC而不是使用全局同一性量度产生多种不同的人源化变体来使靶序列人源化(Lazar等人, *Mol. Immunol.* 44: 1986-98 (2007))。

[0162] 除了上述方法之外,经验方法可用于产生和选择人源化抗体。这些方法包括基于产生大型人源化变体文库和使用富集技术或高通量筛选技术选择最佳克隆的方法。抗体变体可以从噬菌体、核糖体和酵母展示文库以及通过细菌菌落筛选来分离(参见例如Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* 23: 1105-16 (2005); Dufner等人, *Trends Biotechnol.* 24: 523-29 (2006); Feldhaus等人, *Nat. Biotechnol.* 21: 163-70 (2003); 和Schlappschy等人, *Protein Eng. Des. Sel.* 17: 847-60 (2004))。

[0163] 在FR文库方法中,在FR中的特定位置引入一系列残基变体,随后筛选文库以选择最能支持所移植的CDR的FR。要取代的残基可包括一些或所有被鉴定为可能有助于CDR结构(参见例如, Foote和Winter, *J. Mol. Biol.* 224: 487-99 (1992)), 或来自Baca等人 *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84 (1997) 鉴定的更有限的一组靶残基的“游标(Vernier)”残基。

[0164] 在FR改组中,将整个FR与非人CDR组合,而不是创建选定残基变体的组合文库(参见例如Dall'Acqua等人, *Methods* 36: 43-60 (2005))。可使用一步FR改组过程。此种过程已被证明是有效的,因为所得抗体表现出改进的生物化学和物理化学性质,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性(参见例如Damschroder等人, *Mol. Immunol.* 44: 3049-60 (2007))。

[0165] “人工程化(humaneering)”方法基于对基本最小特异性决定簇(MSD)的实验鉴定,并基于将非人片段顺序替换到人FR文库中并评估结合。这种方法通常导致表位保留以及来自具有不同人V区段CDR的多个亚类的抗体的鉴定。

[0166] “人类工程化”方法包括通过对抗体的氨基酸序列进行特异性改变来改变非人抗体或抗体片段,从而产生在人中具有降低的免疫原性,但仍保留了原始非人抗体的期望结合特性的修饰抗体。通常,该技术涉及将非人抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中等风险”或“高风险”残基。使用全局风险/回报计算进行分类,该全局风险/回报计算评价进行特定取代的预测益处(例如,对于人中的免疫原性)与该取代将影响所得抗体折叠的风险。可以通过将来自非人抗体可变区的氨基酸序列与特定或共有人抗体序列的相应区域进行比对来选择在非人抗体序列的给定位置(例如,低风险或中等风险)处要被取代的特定人氨基酸残基。可以根据比对将非人序列中低风险或中等风险位置处的氨基酸残基用人抗体序列

中的相应残基取代。以下中更详细地描述了制备人工程化蛋白质的技术:Studnicka等人, *Protein Engineering* 7:805-14(1994); 5,766,886、5,770,196、5,821,123和美国专利号5,869,619;以及PCT公布WO 93/11794。

[0167] 可使用例如Composite Human Antibody™技术(Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom)产生复合人抗体。为了产生复合人抗体,以避开T细胞表位的方式由多个人抗体可变区序列的片段设计可变区序列,从而使所得抗体的免疫原性最小化。

[0168] 去免疫化抗体是其中已经去除了T细胞表位的抗体。已经描述了制备去免疫化抗体的方法。参见例如Jones等人, *Methods Mol Biol.* 525:405-23(2009), xiv和De Groot等人, *Cell. Immunol.* 244:148-153(2006)。去免疫化抗体包含T细胞表位耗尽的可变区和人恒定区。简单地说,克隆抗体的可变区,并随后通过在T细胞增殖测定中测试源自抗体可变区的重叠肽来鉴定T细胞表位。经由电脑模拟(*in silico*)方法鉴定T细胞表位以鉴定与人II类MHC结合的肽。在可变区中引入突变以消除与人II类MHC的结合。然后利用突变的可变区来产生去免疫化抗体。

[0169] 5.2.3. 单结构域抗体变体

[0170] 在一些实施方案中,考虑了与本文所述的CD19结合的单结构域抗体的一种或多种氨基酸序列修饰。例如,可能需要优化抗体的结合亲和力和/或其它生物学性质,包括但不限于特异性、热稳定性、表达水平、效应子功能、糖基化、降低的免疫原性或溶解度。因此,除了与本文所述的CD19结合的单结构域抗体之外,预期可以制备与本文所述的CD19结合的单结构域抗体的变体。例如,可通过将适当的核苷酸改变引入到编码DNA中以及/或者通过合成所需的抗体或多肽来制备单结构域抗体变体。本领域技术人员理解氨基酸变化可以改变单结构域抗体的翻译后过程。

[0171] 化学修饰

[0172] 在一些实施方案中,本文提供的单结构域抗体例如通过将任何类型的分子共价附接于单结构域抗体而被化学修饰。抗体衍生物可以包括例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质的键联、或一个或多个免疫球蛋白结构域(例如,Fc或Fc的一部分)的缀合进行化学修饰的抗体。多种化学修饰中的任一种都可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、配制、衣霉素(tunicamycin)的代谢合成等。另外,抗体可含有一种或多种非经典氨基酸。

[0173] 在一些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。通过改变氨基酸序列以便产生或去除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现抗体糖基化位点的添加或缺失。

[0174] 当本文提供的单结构域抗体与Fc区融合时,可以改变与其附接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖,其一般通过N键附接于Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等人, *TIBTECH* 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本文提供的结合分子中的寡糖进行修饰以产生具有某些改进特性的变体。

[0175] 在其它实施方案中,当本文提供的单结构域抗体与Fc区融合时,本文提供的抗体

变体可具有缺乏衔接(直接或间接)于所述Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,这类抗体中的岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。例如,如WO 2008/077546中所述,如通过MALDI-TOF质谱法所测量,通过相对于衔接于Asn 297的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量。Asn297是指位于Fc区中的约位置297(Fc区残基的Eu编号)处的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即在位置294与位置300之间。这类岩藻糖基化变体可具有改进的ADCC功能。参见例如美国专利公布号US 2003/0157108和US 2004/0093621。关于“脱岩藻糖基化的”或“缺乏岩藻糖的”抗体变体的出版物的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108;以及WO 2004/056312,尤其在实施例11);和敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);以及WO2003/085107)。

[0176] 包含本文提供的单结构域抗体的结合分子进一步提供有两分型寡糖(bisected oligosaccharide),例如其中衔接于Fc区的双触角寡糖通过GlcNAc两分。这类变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改良的ADCC功能。这类变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)、美国专利号6,602,684(Umana等人)和US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在衔接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的变体。这类变体可具有改进的CDC功能。这类变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0177] 在包含本发明的单结构域抗体和Fc区的分子中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入到Fc区中,由此产生Fc区变体。Fc区变体可包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0178] 在一些实施方案中,本申请涵盖具有一些但不是所有效应子功能的变体,这使得其成为如下应用的期望候选物,在该应用中结合分子的体内半衰期是重要的,但某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的减少/耗竭。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保结合分子缺乏Fc γ R结合(因此有可能缺乏ADCC活性),但是保留了FcRn结合能力。在美国专利号5,500,362中描述了用于评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替代地,可以采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI)。可用于这类测定的效

应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外,可以在体内,例如在如Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中评估所关注的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域已知的方法来进行FcRn结合和体内清除率/半衰期测定(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0179] 具有减少的效应子功能的结合分子包括Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个被取代的那些结合分子(美国专利号6,737,056)。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两处或更多处具有取代的Fc突变体,包括残基265和297被取代为丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0180] 描述了与FcR的结合提高或降低的某些变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0181] 在一些实施方案中,变体包含具有改进ADCC的一个或多个氨基酸取代,例如在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的取代的Fc区。在一些实施方案中,在Fc区中做出改变,引起改变的(即,提高或降低的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0182] US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述了具有延长的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的结合分子,FcRn负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。那些分子包含其中具有改善Fc区与FcRn结合的一个或多个取代的Fc区。这类Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一处或多处具有取代,例如Fc区残基434的取代的那些变体(美国专利号7,371,826)。关于Fc区变体的其它实例,还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及WO 94/29351。

[0183] 在一些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的抗体,其中抗体的一个或多个残基经半胱氨酸残基取代。在一些实施方案中,取代的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗体的可及位点处,并且可以用于将抗体与其它部分(例如药物部分或接头-药物部分)缀合,以产生免疫缀合物,如本文进一步所描述。

[0184] 取代、缺失或插入

[0185] 变异可以是编码单结构域抗体或多肽的一个或多个密码子的取代、缺失或插入,其导致与原始抗体或多肽相比氨基酸序列发生变化。用于取代诱变的所关注的位点包括CDR和FR。

[0186] 氨基酸取代可以是将一种氨基酸用具有类似结构和/或化学性质的另一种氨基酸替换的结果,如用丝氨酸替换亮氨酸,例如保守氨基酸替换。本领域技术人员已知的标准技

术可被用于在编码本文提供的分子的核苷酸序列中引入突变,该突变包括例如导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。插入或缺失可任选在约1至5个氨基酸的范围内。在某些实施方案中,相对于原始分子,取代、缺失或插入包括少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。在具体的实施方案中,取代是在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行的保守氨基酸取代。允许的变异可通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或取代并对所得变体测试亲本抗体表现出的活性来确定。

[0187] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。

[0188] 通过保守氨基酸取代产生的单结构域抗体包括在本公开中。在保守氨基酸取代中,氨基酸残基被具有带类似电荷的侧链的氨基酸残基替换。如上所述,本领域中已经定义了具有带类似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。可替代地,可以例如通过饱和诱变,沿全部或部分编码序列随机引入突变,并且可以针对生物活性筛选所得突变体以鉴定保留活性的突变体。在诱变之后,可以使编码的蛋白质表达,并且可以确定该蛋白质的活性。可以进行保守(例如,在具有类似性质和/或侧链的氨基酸基团内的)取代,以维持或不显著改变该性质。示例性取代示于下表3中。

[0189] 表3.氨基酸取代

原始残基	示例性取代	原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Met (M)	Leu; Phe; Ile
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Ser (S)	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Val; Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0191] 氨基酸可以根据其侧链性质的相似性进行分组 (参见例如 Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (第2版1975)): (1) 非极性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 不带电荷的极性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性: Asp (D)、Glu (E); 和 (4) 碱性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。可替代地, 天然存在的残基可基于共同的侧链性质分组: (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性: Asp、Glu; (4) 碱性: His、Lys、Arg; (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; (6) 芳族: Trp、Tyr、Phe。例如, 任何不参与维持单结构域抗体正确构象的半胱氨酸残基也可以用例如另一种氨基酸如丙氨酸或丝氨酸取代, 以提高分子的氧化稳定性并防止异常交联。非保守取代将需要将这些类别之一的成员换成另一类别。

[0192] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体 (例如, 人源化或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 被选择用于进一步研究的一种或多种所得变体相对于亲本抗体将具有某些生物学性质的改变 (例如, 改进) (例如, 增加的亲和力、降低的免疫原性) 以及/或者将具有实质上保留的亲本抗体的某些生物学性质。示例性的取代变体是亲和力成熟抗体, 该亲和力成熟抗体可以方便地例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术 (如本文所述的技术) 产生。简言之, 使一个或多个 CDR 残基突变, 并将变体抗体展示在噬菌体上, 并针对特定的生物学活性 (例如结合亲和力) 对该变体抗体进行筛选。

[0193] 可以在 CDR 中作出改变 (例如, 取代), 例如以改进抗体亲和力。可以在 CDR “热点”, 即由在体细胞成熟过程期间经历高频率突变的密码子编码的残基 (参见例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), 和/或 SDR (a-CDR) 中作出此类改变, 并对所得变

异抗体或其片段的结合亲和力进行测试。例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中已经描述了通过从二级文库构建和重新选择的亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中, 通过多种方法(例如, 易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变) 中的任何一种将多样性引入到被选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及CDR定向方法, 其中将几个CDR残基(例如, 一次4-6个残基) 随机化。可例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定参与抗原结合的CDR残基。以下章节中提供了关于亲和力成熟的更详细描述。

[0194] 在一些实施方案中, 取代、插入或缺失可以在一个或多个CDR内发生, 只要此类改变不实质性地降低抗体结合抗原的能力即可。例如, 可以在CDR中作出不实质性地降低结合亲和力的保守改变(例如, 如本文提供的保守取代)。在本文提供的变体VHH序列的一些实施方案中, 每个CDR是未改变的, 或者含有不超过一个、两个或三个的氨基酸取代。

[0195] 一种用于鉴定抗体中可以作为诱变靶标的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”, 如由Cunningham和Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989) 所述。在这一方法中, 鉴定残基或一组靶残基(例如, 带电荷的残基, 如Arg、Asp、His、Lys和Glu), 并且将该残基或一组靶残基用中性或带负电荷的氨基酸(例如, 丙氨酸或聚丙氨酸) 替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始取代展现出功能敏感性的氨基酸位置处引入进一步的取代。可替代地或另外地, 利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为用于取代的候选者被靶向或被消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需性质。

[0196] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合体, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-末端或C-末端与酶(例如, 对于ADEPT) 或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合。

[0197] 可使用本领域中已知的方法(如寡核苷酸介导的(定点) 诱变、丙氨酸扫描和PCR诱变) 作出变异。可以对克隆的DNA进行定点诱变(参见例如Carter, *Biochem J.* 237:1-7 (1986); 和Zoller等人, *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982))、盒式诱变(参见例如Wells等人, *Gene* 34:315-23 (1985)) 或其它已知的技术以产生单结构域抗体变体DNA。

[0198] 5.2.4. 体外亲和力成熟

[0199] 在一些实施方案中, 可通过体外亲和力成熟来制备与亲本抗体相比具有改进的性质(如亲和力、稳定性或表达水平) 的抗体变体。与天然原型一样, 体外亲和力成熟是基于突变和选择的原理。抗体文库展示在生物体(例如, 噬菌体、细菌、酵母或哺乳动物细胞) 的表面上或者与该抗体文库的编码mRNA或DNA缔合(例如, 共价或非共价)。所展示抗体的亲和力选择允许分离携带编码抗体的遗传信息的生物体或复合物。使用诸如噬菌体展示的展示方法进行两轮或三轮突变和选择通常会产生产亲和力在低纳摩尔范围内的抗体片段。亲和力成熟的抗体可以对靶抗原具有纳摩尔甚至皮摩尔的亲和力。

[0200] 噬菌体展示是用于展示和选择抗体的普遍方法。抗体作为与噬菌体外壳蛋白的融合体展示在Fd或M13噬菌体的表面上。选择涉及暴露于抗原以允许噬菌体展示的抗体结合其靶标, 这一过程被称为“淘选”。与抗原结合的噬菌体被回收, 并被用于感染细菌以产生用

于进一步的轮次的选择的噬菌体。有关综述,参见例如Hoogenboom, *Methods.Mol.Biol.*178:1-37(2002);以及Bradbury和Marks, *J.Immunol.Methods* 290:29-49(2004)。

[0201] 在酵母展示系统(参见例如,Boder等人, *Nat.Biotech.*15:553-57(1997);和Chao等人, *Nat.Protocols* 1:755-68(2006))中,抗体可与酵母凝集素蛋白Aga2p的粘附亚基融合,该亚基通过与Aga1p的二硫键附接至酵母细胞壁。经由Aga2p展示蛋白质将蛋白质从细胞表面投射开,从而最大限度地减少与酵母细胞壁上其它分子的潜在相互作用。磁分离和流式细胞术被用于筛选文库以选择具有改进的亲合力或稳定性的抗体。通过用生物素化抗原和与荧光团缀合的二级试剂(如链霉亲和素)标记酵母来确定与所关注的可溶性抗原的结合。可以通过免疫荧光标记侧接单链抗体(例如,scFv)的血凝素或c-Myc表位标签来测量抗体的表面表达的变化。表达已被证明与所展示的蛋白质的稳定性相关,因此可以针对改进的稳定性以及亲合力来选择抗体(参见例如Shusta等人, *J.Mol.Biol.*292:949-56(1999))。酵母展示的另外的优点是利用内质网伴侣蛋白和质量控制机制,所展示的蛋白质在真核酵母细胞的内质网中折叠。一旦成熟完成,就可以在展示于酵母表面上的同时方便地“滴定”抗体亲合力,从而消除了对每种克隆的表达和纯化的需要。酵母表面展示的理论限制是功能文库的大小可能比其它展示方法的小;然而,最近的方法使用酵母细胞的交配系统来产生大小估计为 10^{14} 的组合多样性(参见例如美国专利公布2003/0186374;和Blaise等人, *Gene* 342:211-18(2004))。

[0202] 在核糖体展示中,产生抗体-核糖体-mRNA (ARM) 复合物以在无细胞系统中进行选择。编码特定抗体文库的DNA文库与缺乏终止密码子的间隔序列进行基因融合。此间隔序列在被翻译时仍附接于肽基tRNA,并占据核糖体隧道,从而使所关注的蛋白质从核糖体中突出并折叠。由此产生的mRNA、核糖体和蛋白质的复合物可以与表面结合的配体结合,从而允许通过用配体进行亲和捕获同时分离抗体及其编码mRNA。然后核糖体结合的mRNA被逆转录回cDNA,然后可以经受诱变,并且被用于下一轮选择(参见例如Fukuda等人, *Nucleic Acids Res.*34:e127(2006))。在mRNA展示中,使用嘌呤霉素作为衔接分子在抗体与mRNA之间建立共价键(Wilson等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98:3750-55(2001))。

[0203] 由于这些方法完全在体外进行,因此它们与其它选择技术相比具有两个主要优势。首先,文库的多样性不受细菌细胞转化效率的限制,而仅受试管中存在的核糖体和不同mRNA分子的数目限制。其次,在每一轮选择之后例如通过非校对聚合酶可以很容易地引入随机突变,因为在任何多样化步骤之后都不需要转化文库。

[0204] 在一些实施方案中,可以使用哺乳动物展示系统。

[0205] 也可以以靶向方式或经由随机引入将多样性引入到抗体文库的CDR中。前一种方法包括经由高水平或低水平的诱变依次靶向抗体的所有CDR,或靶向孤立的体细胞超突变热点(参见例如Ho等人, *J.Biol.Chem.*280:607-17(2005))或基于实验或结构原因怀疑影响亲和力的残基。也可经由DNA改组或类似技术替换天然多样化的区域来引入多样性(参见例如Lu等人, *J.Biol.Chem.*278:43496-507(2003);美国专利号5,565,332和6,989,250)。替代技术靶向延伸到框架区残基中的高变环(参见例如Bond等人, *J.Mol.Biol.*348:699-709(2005)),在CDR中采用环缺失和插入,或使用基于杂交的多样化(参见例如美国专利公布号2004/0005709)。在CDR中产生多样性的额外方法公开于例如美国专利号7,985,840中。可用

于产生抗体文库和/或抗体亲和力成熟的进一步的方法公开于例如美国专利号8,685,897和8,603,930以及美国公布号2014/0170705、2014/0094392、2012/0028301、2011/0183855和2009/0075378中,其中的每一者以引用的方式并入本文。

[0206] 文库的筛选可通过本领域中已知的各种技术来完成。例如,单结构域抗体可以被固定在固体支持物、柱、针或纤维素/聚(偏二氟乙烯)膜/其它过滤器上,在附着于吸附板或用于细胞分选的宿主细胞上表达,或与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠粒捕获,或被用于任何其它淘选展示文库的方法中。

[0207] 有关体外亲和力成熟方法的综述,参见例如Hoogenboom, *Nature Biotechnology* 23:1105-16(2005); Quiroz和Sinclair, *Revista Ingeneria Biomedica* 4:39-51(2010); 以及其中的参考文献。

[0208] 5.2.5. 单结构域抗体的修饰

[0209] 单结构域抗体的共价修饰包括在本公开的范围内。共价修饰包括使单结构域抗体的目标氨基酸残基与能够与单结构域抗体的选定侧链或N-或C-末端残基反应的有机衍生剂反应。其它修饰包括谷氨酰胺和天冬酰胺残基分别脱酰胺成相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基;脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基甲基化(参见例如Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86(1983)); N-末端胺的乙酰化;以及任何C-末端羧基的酰胺化。

[0210] 包括在本公开范围内的单结构域抗体的其它类型的共价修饰包括如上所述改变抗体或多肽的天然糖基化模式(参见例如Beck等人, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482-501(2008); 以及Walsh, *Drug Discov. Today* 15:773-80(2010)), 并以例如美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中所述的方式将抗体连接到多种非蛋白质聚合物中的一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。本公开的与CD19结合的单结构域抗体也可与一个或多个免疫球蛋白恒定区或其部分(例如,Fc)基因融合或缀合,以延长半衰期和/或赋予已知的Fc介导的效应子功能。

[0211] 还可以修饰本公开的与CD19结合的单链抗体以形成包含与CD19结合的单链抗体的嵌合分子,该CD19与另一异源多肽或氨基酸序列例如表位标签(参见例如Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523-33(2003))或IgG分子的Fc区(参见例如Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42(Chamow和Ashkenazi编著,1999))融合。与CD19结合的单链抗体也可被用于产生CD19结合嵌合抗原受体(CAR),如下文更详细描述的那样。

[0212] 本文还提供了包含本公开的与CD19结合的单链抗体和异源多肽的融合蛋白。在一些实施方案中,与抗体进行基因融合或化学缀合的异源多肽可被用于将抗体靶向具有细胞表面表达的CD19的细胞。

[0213] 本文还提供了与CD19抗原结合的抗体组。在具体实施方案中,抗体组具有不同的缔合速率、不同的解离速率、对CD19抗原不同的亲和力和/或对CD19抗原不同的特异性。在一些实施方案中,这些组包含约10至约1000个或更多个抗体或由约10至约1000个或更多个抗体组成。抗体组可例如在96孔或384孔板中使用,以用于诸如ELISA的测定。

[0214] 5.2.6. 单结构域抗体的制备

[0215] 已经描述了制备单结构域抗体的方法。参见例如Els Pardon等人, *Nature Protocol*, 9(3):674(2014)。单结构域抗体(诸如VHH)可以使用本领域已知的方法获得,诸

如通过对骆驼科动物物种(诸如骆驼或美洲驼)进行免疫接种并从中获得杂交瘤,或通过使用本领域已知的分子生物学技术克隆单结构域抗体文库,随后通过ELISA利用未选择文库的单个克隆或通过使用噬菌体展示进行选择。

[0216] 本文提供的单结构域抗体可以通过培养用含有编码单结构域抗体的核酸的载体转化或转染的细胞来产生。可使用标准重组技术获得编码本公开的抗体的多肽组件的多核苷酸序列。可以从产生抗体的细胞,如杂交瘤细胞或B细胞中分离所需的多核苷酸序列并进行测序。可替代地,可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入到能够在宿主细胞中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可用和已知的许多载体可用于本公开的目的。适当载体的选择将主要取决于要插入载体中的核酸的大小以及要用该载体转化的特定宿主细胞。适合表达本公开的抗体的宿主细胞包括原核生物,例如古细菌(Archaeobacteria)和真细菌(Eubacteria),包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体;真核微生物,例如丝状真菌或酵母;无脊椎动物细胞,例如昆虫或植物细胞;和脊椎动物细胞,例如哺乳动物宿主细胞系。将宿主细胞用上述表达载体转化,并在经过适当修饰的常规营养培养基中培养,以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。使用如本领域已知的标准蛋白质纯化方法纯化宿主细胞产生的抗体。

[0217] 以下中进一步描述了包括载体构建、表达和纯化在内的抗体产生方法:Plückthun等人,Antibody Engineering:Producing antibodies in Escherichia coli:From PCR to fermentation 203-52(McCafferty等人编著,1996);Kwong和Rader,E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments,Current Protocols in Protein Science(2009);Tachibana和Takekoshi,Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli,Antibody Expression and Production(Al-Rubeai编著,2011);和Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic(An编著,2009)。

[0218] 当然可考虑采用本领域中熟知的替代方法来制备抗CD19单结构域抗体。例如,例如,可以通过使用固相技术进行直接肽合成来产生适当的氨基酸序列或其部分(参见例如,Stewart等人,Solid-Phase Peptide Synthesis(1969);和Merrifield,J. Am. Chem. Soc.85:2149-54(1963))。可采用手动技术或通过自动化进行体外蛋白质合成。可以单独地化学合成抗CD19抗体的各个部分,并采用化学或酶促方法组合该各个部分以产生所需的抗CD19抗体。可替代地,可以从转基因动物的细胞或体液如乳汁中纯化抗体,所述转基因动物被工程化成表达抗体,例如美国专利号5,545,807和5,827,690中所公开。

[0219] 具体地,可以通过使美洲驼免疫、进行单B细胞分选、进行V基因提取、克隆CD19结合剂如VHH-Fc融合体并然后进行小规模表达和纯化来产生本文提供的单结构域抗体或其它CD19结合剂。可以对单结构域抗体及与CD19结合的其他分子进行另外的筛选,包括针对ELISA阳性、BLI阳性和 K_D 小于100nM进行的选择中的一者或多者。这些选择标准可以如下文第6节中所述进行组合。另外,可以测定单独的VHH结合剂(及与CD19结合的其他分子)与表达CD19的细胞结合的能力。可以使用表达CD19的细胞进行FACS分析并测量荧光标记的VHH分子的平均荧光强度(MFI)来进行此类测定。下文更详细地描述上面提到的各个方面。

[0220] 多克隆抗体

[0221] 多克隆抗体通常通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物中

产生。可能有用的是使用双功能或衍生剂,例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和 R^1 独立地为低级烷基),将相关抗原与在要免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质缀合,该蛋白质例如为钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可以采用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)和MPL-TDM佐剂(单磷酸脂质A、合成海藻糖二克利霉菌酸酯(synthetic trehalose dicorynomycolate))。免疫方案可由本领域技术人员在不进行过度实验的情况下来选择。

[0222] 例如,通过将例如100 μg 或5 μg 蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合并将溶液皮内注射在多个部位来使动物对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用在弗氏完全佐剂中的1/5至1/10原始量的肽或缀合物对动物进行加强免疫。七至十四天后,对动物取血并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫,直到滴度趋于平稳。缀合物也可以在重组细胞培养物中被制成蛋白质融合物。此外,诸如明矾的聚集剂也适用于增强免疫反应。

[0223] 单克隆抗体

[0224] 单克隆抗体是从基本上同质的抗体群体中获得的,即,除了可能少量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)之外,构成该群体的个体抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”表明抗体的特征为不是离散抗体的混合物。

[0225] 例如,单克隆抗体可以通过由Kohler等人, *Nature*, 256:495 (1975) 首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(美国专利号4,816,567)制备。

[0226] 在杂交瘤方法中,使适当的宿主动物免疫以引发产生或能够产生特异性结合用于免疫接种的蛋白质的抗体的淋巴细胞。可替代地,可以在体外使淋巴细胞免疫。然后使用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0227] 免疫剂通常包括抗原蛋白或其融合变体。Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 第59-103页。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞。将由此制备的杂交瘤细胞接种并在合适的培养基中生长,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活物质。优选的永生化骨髓瘤细胞是那些有效融合、支持所选的产生抗体的细胞稳定地高水平产生抗体并且对培养基如HAT培养基敏感的细胞。

[0228] 对杂交瘤细胞在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的产生量。可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对所需抗原的单克隆抗体。这类技术和测定是本领域已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson等人, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) 的斯卡查德分析(Scatchard analysis)来确定。

[0229] 在鉴定出产生所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆并通过标准方法(Goding, 同上)生长。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内生长为肿瘤。

[0230] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法从培养基、腹水或血清中适当地分离。

[0231] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法例如美国专利号4,816,567中描述以及如上所述的那些重组方法制备。编码单克隆抗体的DNA容易分离并使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合至编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)进行测序。杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离,即可将DNA放入表达载体中,然后将该表达载体转染到宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以便在这类重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述文章包括Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.,5:256-262(1993)和Pliickthun,Immunol.Revs.130:151-188(1992)。

[0232] 在进一步的实施方案中,可以从使用以下中所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体:McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990);Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)。随后的出版物描述了通过链改组产生高亲和力(nM范围)人抗体(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方案。

[0233] 也可以通过以下方式修饰DNA:取代编码序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851(1984));或将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接到编码序列。这类非免疫球蛋白多肽可以被取代以产生嵌合二价抗体,所述嵌合二价抗体包含一个对抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对不同抗原具有特异性的抗原结合位点。

[0234] 嵌合或杂交抗体也可以使用合成蛋白质化学中的已知方法(包括那些涉及交联剂的方法)在体外制备。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸酯。

[0235] 原核细胞中的重组产生

[0236] 可以使用标准重组技术获得编码本公开的抗体的多核酸序列。可以从产生抗体的细胞如杂交瘤细胞中分离所需的多核酸序列并进行测序。可替代地,可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,将编码多肽的序列插入到能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可用和已知的许多载体可用于本公开的目的。适当载体的选择将主要取决于要插入载体中的核酸的大小以及要用该载体转化的特定宿主细胞。每种载体含有各种组件,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者兼而有之)及其与其所在的特定宿主细胞的相容性。载体组件通常包括但不限于复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物和转录终止序列。

[0237] 通常,源自与宿主细胞相容的物种的含有复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用。该载体通常携带一个复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如,大肠杆菌通常使用pBR322转化,pBR322是一种源自大肠杆菌物种的质粒。用于表达特定抗体的pBR322衍生物的实例详细地描述于Carter等人,美国专利号5,648,237中。

[0238] 此外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可用作与这些宿

主相关的转化载体。例如,噬菌体如GEMTM-11可用于制备可用于转化易感宿主细胞(如大肠杆菌LE392)的重组载体。

[0239] 本申请的表达载体可以包含编码所述多肽组分中的每个多肽组分的两个或更多个启动子-顺反子对。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调节序列。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是响应于培养条件的变化,例如营养物的存在或不存在或温度变化,启动在其控制下的顺反子转录水平增加的启动子。

[0240] 被多种潜在宿主细胞识别的大量启动子是众所周知的。选择的启动子可以通过经由限制酶消化从源DNA中去除启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中而与编码本发明抗体的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子均可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,利用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许表达的靶基因更大的转录和更高的产量。

[0241] 适于与原核宿主一起使用的启动子包括PhoA启动子、半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子,如tac或trc启动子。然而,在细菌中起作用的其它启动子(例如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核酸序列已经公开,从而使技术人员能够使用接头或衔接子将它们可操作地连结到编码靶肽的顺反子(Siebenlist等人,Cell 20:269(1980))以提供任何所需的限制性位点。

[0242] 一方面,重组载体内的每个顺反子包含指导表达的多肽跨膜易位的分泌信号序列组件。通常,信号序列可以是载体的组件,或者它可以是插入到载体中的靶多肽DNA的一部分。出于本发明的目的所选择的信号序列应该是由宿主细胞识别并加工(即,被信号肽酶切割)的信号序列。对于不能识别和加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞,可以用选自例如由以下组成的组的原核信号序列取代所述信号序列:碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。

[0243] 在一些实施方案中,根据本公开的抗体的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,因此不需要每个顺反子内都存在分泌信号序列。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许表达的蛋白质亚基进行正确的折叠和组装。

[0244] 适合表达本公开的抗体的原核宿主细胞包括古细菌和真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用的细菌的实例包括埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如,大肠杆菌)、杆菌(*Bacilli*) (例如,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))、肠杆菌、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种(例如,绿脓杆菌(*P. aeruginosa*))、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形杆菌(*Proteus*)、志贺氏菌(*Shigella*)、根瘤菌(*Rhizobia*)、透明颤菌(*Vitreoscilla*)或副球菌属(*Paracoccus*)。在一些实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中,大肠杆菌细胞用作宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219页; ATCC保藏号27, 325)和其衍生物,包括具有基因型W3110 AfhuA(AtonA)ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41kan^R的菌株33D3(美国专利号5,639,635)。其它菌株及其衍生物,如大肠杆菌294(ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌RV308(ATCC 31,608)也是合适的。这些实例是示例性的而非限制性的。构建具有确定基因型的任

何上述细菌的衍生物的方法是本领域已知的,并且描述于例如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)中。考虑到复制子在细菌细胞中的可复制性,通常需要选择合适的细菌。例如,当使用众所周知的质粒如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌或沙门氏菌物种可以适合用作宿主。

[0245] 通常,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且可能需要在细胞培养物中掺入另外的蛋白酶抑制剂。

[0246] 将宿主细胞用上述表达载体转化,并在经过适当修饰的常规营养培养基中培养,以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。转化意指将DNA引入原核宿主中,使得DNA可作为染色体外元件或通过染色体整合子(integrand)复制。根据所使用的宿主细胞,使用适合这类细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的又一种技术是电穿孔。

[0247] 用于产生本申请的抗体的原核细胞在本领域已知的培养基中生长,并适于培养所选择的宿主细胞。合适培养基的实例包括luria肉汤(LB)加上必要的营养补充剂。在一些实施方案中,培养基还含有基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞的生长。例如,将氨苄西林(ampicillin)添加到培养基中以使表达氨苄西林抗性基因的细胞生长。

[0248] 除了碳源、氮源和无机磷酸盐源之外,任何必要的补充剂也可以以单独引入或作为与另一种补充剂或培养基如复合氮源的混合物引入的适当的浓度被纳入。任选地,培养基可以含有一种或多种选自以下组成的组的还原剂:谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、硫代乙醇酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。原核宿主细胞在合适的温度和pH下培养。

[0249] 如果在本申请的表达载体中使用诱导型启动子,则在适合于该启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。在本申请的一个方面,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,转化的宿主细胞在用于诱导的磷酸盐限制培养基中培养。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基(参见例如Simmons等人,J.Immunol.Methods 263:133-147(2002))。如本领域已知的,根据所采用的载体构建体,可以使用多种其它诱导剂。

[0250] 本公开的表达的抗体被分泌到宿主细胞的周质中并从周质中回收。蛋白质回收通常涉及一般通过诸如渗透压休克、超声处理或溶解等方式来破坏微生物。一旦细胞被破坏,就可以通过离心或过滤去除细胞碎片或整个细胞。可以例如通过亲和树脂色谱法进一步纯化蛋白质。可替代地,可以将蛋白质转运到培养基中并在其中分离。可以从培养物中去除细胞,并过滤和浓缩培养物上清液以进一步纯化所产生的蛋白质。表达的多肽可以使用如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和蛋白质印迹(Western blot)测定法等众所周知的方法进一步分离和鉴定。

[0251] 可替代地,通过发酵过程大量产生蛋白质。各种大规模补料分批发酵程序可用于产生重组蛋白。为了提高本公开的抗体的产量和质量,可以修改各种发酵条件。例如,已证明伴侣蛋白有助于细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和溶解。Chen等人,J Bio Chem274:19601-19605(1999);美国专利号6,083,715;美国专利号6,027,888;Bothmann和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17100-17105(2000);Ramm和Pluckthun,J.Biol.Chem.275:17106-17113(2000);Arie等人,Mol.Microbiol.39:199-210(2001)。

[0252] 为了最大程度地减少表达的异源蛋白质(特别是那些对蛋白水解敏感的)的蛋白

水解,某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可用于本发明,如例如以下中所述:美国专利号5,264,365;美国专利号5,508,192;Hara等人, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72(1996)。缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株可用作编码本申请的抗体的表达系统中的宿主细胞。

[0253] 本文产生的抗体可以进一步纯化以获得基本上均质的制剂,用于进一步的测定和用途。可以采用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适纯化程序的示例:在免疫亲和或离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶上或阳离子交换树脂如DEAE上的色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和例如使用Sephadex G-75的凝胶过滤。在一些实施方案中,例如固定在固相上的蛋白A可以用于本公开的结合分子的免疫亲和纯化。固定蛋白A的固相优选是包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选是可控孔玻璃柱或硅胶柱。在一些实施方案中,柱已经涂有试剂,如甘油,以试图防止污染物的非特异性粘附。然后洗涤固相以去除与固相非特异性结合的污染物。最后,通过洗脱从固相中回收所关注的抗体。

[0254] 真核细胞中的重组产生

[0255] 对于真核表达,载体组件通常包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0256] 用于真核宿主的载体也可以是编码信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N-末端具有特定切割位点的其它多肽的插入物。所选异源信号序列优选为由宿主细胞识别并加工(即,被信号肽酶切割)的序列。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹gD信号)是可用的。将这类前体区域的DNA与编码本申请的抗体的DNA在阅读框架中连结。

[0257] 通常,对于哺乳动物表达载体来说并不需要复制起点组件(通常仅使用SV40起点,因为其包含早期启动子)。

[0258] 表达和克隆载体可含有选择基因,也称为可选择标志物。选择基因可编码这样的蛋白质,该蛋白质赋予对抗生素或其它毒素,例如氨苄西林、新霉素、甲氨蝶呤(methotrexate)或四环素的抗性;补充营养缺陷;或提供从复合培养基中无法获得的关键营养物质。

[0259] 选择方案的一个实例利用药物来遏制宿主细胞的生长。那些用异源基因成功转化的细胞产生赋予抗药性的蛋白质,并因此在选择方案中存活下来。这种显性选择的实例利用药物新霉素、麦考酚酸(mycophenolic acid)和潮霉素(hygromycin)。

[0260] 适用于哺乳动物细胞的可选择标志物的另一个实例是那些能够鉴定有能力吸收编码本申请的抗体的核酸的细胞的标志物。例如,首先通过在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有的转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。当采用野生型DHFR时,示例性的适当宿主细胞为缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。可替代地,可通过使细胞在含有针对可选择标记的选择剂(例如氨基糖苷类抗生素)的培养基中生长来选择用编码多肽的DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种可选择标志物(如氨基糖苷3'-磷酸转移酶,APH)转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源DHFR的野生型宿主)。

[0261] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物体识别并且可操作地连接至编码所需多肽序列的核酸的启动子。真核基因具有富含AT的区域,该区域位于转录起始位点上游约25至30个碱基处。可以包括见于许多基因的转录起始点上游70至80个碱基处的另一序列。大多

数真核细胞的3'端可以是用于将聚A尾添加至编码序列的3'端的信号。所有这些序列均可插入真核表达载体中。

[0262] 可例如通过启动子对哺乳动物宿主细胞中多肽自载体的转录进行控制,条件是这类启动子与宿主细胞系统相容,所述启动子可获自病毒基因组,如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40);异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子;热休克启动子。

[0263] 通常通过将增强子序列插入载体中来增加高等真核细胞对编码本公开的抗体的DNA的转录。现在已知许多来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。实例包括位于复制起点后侧的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件,还可参见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)。增强子可被剪接到载体中多肽编码序列的位置5'或3'处,但优选位于从启动子开始的位点5'处。

[0264] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还含有对终止转录和稳定mRNA来说所必需的序列。这类序列通常可得自真核或病毒DNA或cDNA的5'(有时为3')非翻译区。这些区含有在编码多肽的mRNA的非翻译部分中被转录为多腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组件为牛生长激素多腺苷酸化区。

[0265] 适用于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括本文所述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。使培养物(组织培养物)中的脊椎动物细繁殖胞已成为常规程序。有用哺乳动物宿主细胞系的实例为由SV 40转化的猴肾CV1细胞(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾细胞系(293细胞或进行亚克隆以在悬浮培养中生长的293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather, Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0266] 可以将宿主细胞用上述用于产生抗体的表达或克隆载体转化,并在常规营养培养基中进行培养,这些培养基经过适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0267] 用于产生本申请的抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售的培养基,如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基(MEM),Sigma)、RPMI-1640(Sigma)以及达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM),Sigma)适于培养宿主细胞。此外,以下中描述的任何培养基都可用作宿主细胞的培养基:Ham等人,Meth.Enz.58:44(1979);Barnes等人,Anal.Biochem.102:255(1980);美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re.30,985。这些培养基中的任何一种可根据需要补充有激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表

皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围内的最终浓度存在的无机化合物)以及葡萄糖或等效的能量源。还可以包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其它必需补充剂。培养条件如温度、pH等是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于普通技术人员来说将是显而易见的。

[0268] 当使用重组技术时,抗体可以在细胞内、周质空间中产生或直接分泌到培养基中。如果抗体是在细胞内产生的,则作为第一步,例如通过离心或超滤去除颗粒碎片,无论是宿主细胞还是溶解的片段。在抗体被分泌到培养基中的情况下,来自这类表达系统的上清液通常首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置进行浓缩。可以在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0269] 由细胞制备的蛋白质组合物可以使用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法进行纯化,亲和色谱法是优选的纯化技术。亲和配体所附接的基质通常是琼脂糖,但也可以使用其它基质。与琼脂糖相比,机械稳定的基质(如可控孔玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯)可实现更快的流速和更短的处理时间。还可以使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱法、肝素SEPHAROSETM上的色谱法、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀,这取决于要回收的抗体。在任何初步纯化步骤之后,可以对包含所关注的抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用色谱法。

[0270] 5.2.7. 包含单结构域抗体的结合分子

[0271] 另一方面,本文提供了包含本文提供的单结构域抗体(例如,针对CD19的VHH结构域)的结合分子。除了下文第5.3节所描述的本文提供的嵌合抗原受体(CAR)之外,在一些实施方案中,本文提供的针对CD19的单结构域抗体是其它结合分子的一部分。本文描述了本公开的示例性结合分子。

[0272] 融合蛋白

[0273] 在各种实施方案中,本文提供的单结构域抗体可以与另一种剂,例如基于蛋白质的实体进行基因融合或化学缀合。单结构域抗体可以与该剂化学缀合,或以其它方式与该剂非共价缀合。该剂可以是肽或抗体(或其片段)。

[0274] 因此,在一些实施方案中,本文提供了与异源蛋白质或多肽(或其片段,例如,与约10个、约20个、约30个、约40个、约50个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约150个、约200个、约250个、约300个、约350个、约400个、约450个或约500个氨基酸或超过500个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(共价或非共价缀合)的单结构域抗体(例如,VHH结构域),以及其用途。特别地,本文提供了包含本文提供的单结构域抗体的抗原结合片段(例如,CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白。

[0275] 此外,本文提供的抗体可以与标志或“标签”序列,如肽融合,以促进纯化。在具体实施方案中,标志或标签氨基酸序列是六组氨酸肽、血凝素(“HA”)标签和“FLAG”标签。

[0276] 用于使部分(包括多肽)与抗体融合的方法是已知的(参见例如Arnon等人, Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56(Reisfeld等人编著,1985);

Hellstrom等人, *Antibodies for Drug Delivery, Controlled Drug Delivery* 623-53 (Robinson等人编著, 第2版, 1987); Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475-506 (Pinchera等人编著, 1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303-16 (Baldwin等人编著, 1985); Thorpe等人, *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982); 美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、5,723,125、5,783,181、5,908,626、5,844,095和5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT公布WO 91/06570、WO 96/04388、WO 96/22024、WO 97/34631和WO 99/04813; Ashkenazi等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10535-39 (1991); Traunecker等人, *Nature*, 331:84-86 (1988); Zheng等人, *J. Immunol.* 154:5590-600 (1995); 以及Vil等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-41 (1992)。

[0277] 例如, 可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)来产生融合蛋白。DNA改组可用于改变如本文提供的单结构域抗体的活性, 包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的抗体(参见例如美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458; Patten等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33 (1997); Harayama, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998); Hansson等人, *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999); 以及Lorenzo和Blasco, *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998)。抗体或编码的抗体可在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其它方法进行随机诱变而改变。编码本文提供的抗体的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、节段、部分、结构域、片段等重组。

[0278] 在一些实施方案中, 本文提供的单结构域抗体(例如, VHH结构域)与第二抗体缀合以形成抗体杂缀合物。

[0279] 在各种实施方案中, 将单结构域抗体与剂基因融合。基因融合可以通过在单结构域抗体与剂之间放置接头(例如, 多肽)来实现。接头可以是柔性接头。

[0280] 在各种实施方案中, 单结构域抗体与治疗分子基因缀合, 其中铰链区将该单结构域抗体与该治疗分子连接。

[0281] 本文还提供了制备本文提供的各种融合蛋白的方法。上文第5.2.6节中描述的各种方法也可用于制备本文提供的融合蛋白。

[0282] 在具体实施方案中, 本文提供的融合蛋白是重组表达的。本文提供的融合蛋白的重组表达可能需要构建含有编码该蛋白质或其片段的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本文提供的蛋白质或其片段的多核苷酸, 即可使用本领域众所周知的技术通过重组DNA技术产生用于产生该分子的载体。因此, 本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可以使用本领域技术人员众所周知的方法构建含有编码序列和适当转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制载体, 其包含编码本文提供的融合蛋白或其片段或CDR的核苷酸序列, 该核苷酸序列可操作地连接至启动子。

[0283] 可以通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞, 然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本文提供的融合蛋白。因此, 本文还提供了含有编码本文提供的融合蛋白或其片

段的多核苷酸的宿主细胞,该多核苷酸可操作地连接至异源启动子。

[0284] 多种宿主表达载体系统可被用于表达本文提供的融合蛋白。这类宿主表达系统不仅代表了可以产生和随后纯化所关注的编码序列的媒介物,而且还代表了当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文提供的融合蛋白的细胞。这些表达系统包括但不限于微生物,如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(*Saccharomyces Pichia*));用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒、CaMV、烟草花叶病毒、TMV)感染或用含有编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或具有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BHK、293、NS0和3T3细胞),该重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组(例如,金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子。细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞,特别是用于表达完整的重组抗体分子的这些细胞,可用于表达重组融合蛋白。例如,与诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件的载体结合的诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的哺乳动物细胞是抗体或其变体的有效表达系统。在具体实施方案中,编码本文提供的融合蛋白的核苷酸序列的表达由组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0285] 在细菌系统中,根据所表达的融合蛋白的预期用途,可以有利地选择多种表达载体。例如,当要产生大量这种融合蛋白以产生融合蛋白的药物组合物时,可能需要指导容易纯化的高水平融合蛋白产物的表达的载体。这类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO 12:1791(1983)),其中编码序列可以单独连结到载体中,与lacZ编码区同框,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke和Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等等。pGEX载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,这类融合蛋白是可溶的并且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从溶解细胞中纯化。pGEX载体被设计成包括凝血酶或Xa因子蛋白酶切割位点,以便克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0286] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,所关注的编码序列可以连结到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后通过体外或体内重组将该嵌合基因插入到腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区域(例如,E1或E3区域)中插入将产生一种重组病毒,该病毒是活的并且能够在受感染的宿主中表达融合蛋白(例如参见Logan和Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359(1984))。插入的编码序列的有效翻译还可能需特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源,既有天然的也有合成的。可以通过包括适当的转录增强子元件、转录终止子等来提高表达效率(参见例如Bittner等人,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。

[0287] 此外,可以选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞品系。蛋白质产物的这类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)可能对蛋白质的功

能很重要。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物进行翻译后加工和修饰的特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保正确地修饰和加工所表达的外源蛋白质。为此,可以使用具有用于适当加工初级转录物、糖基化和基因产物磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。

[0288] 为长期高产量地产生重组蛋白,可以利用稳定表达。例如,可以将稳定表达融合蛋白的细胞系工程化。宿主细胞可以用由适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点等)控制的DNA和可选择标志物来转化,而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外源DNA后,可以允许工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后将该细胞切换到选择性培养基。重组质粒中的可选择标志物赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定地整合到它们的染色体中并生长形成焦点,进而可以克隆并扩展到细胞系中。这一方法可以有利地用于将表达融合蛋白的细胞系工程化。这类工程化细胞系在筛选和评价与结合分子直接或间接相互作用的组合物方面可能特别有用。

[0289] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11:223(1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska和Szybalski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202(1992))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,Cell 22:8-17(1980))基因,可以分别用于tk⁻、hgprt⁻或aprt⁻细胞。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,它赋予甲氨蝶呤抗性(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA 77:357(1980));O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527(1981));gpt,它赋予麦考酚酸抗性(Mulligan和Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072(1981));neo,它赋予氨基糖苷G-418抗性(Wu和Wu, Biotherapy 3:87-95(1991));Tolstoshev, Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596(1993);Mulligan,Science 260:926-932(1993);以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62:191-217(1993);May,TIB TECH 11(5):155-215(1993));以及hygro,它赋予潮霉素抗性(Santerre等人,Gene 30:147(1984))。重组DNA技术领域通常已知的方法可以常规用于选择所需的重组克隆,并且这类方法在例如以下中有所描述:Ausubel等人(编著),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);以及第12和13章,Dracopoli等人(编著),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colberre-Garapin等人,J.Mol.Biol.150:1(1981),全部内容以引用的方式并入本文中。

[0290] 融合蛋白的表达水平可以通过载体扩增来提高(综述参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达融合蛋白的载体系统中的标记可扩增时,增加宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平将增加标志基因的拷贝数。由于扩增区域与融合蛋白基因相关,因此融合蛋白的产量也会增加(Crouse等人,Mol.Cell.Biol.3:257(1983))。

[0291] 宿主细胞可以与本文提供的多种表达载体共转染。载体可以含有相同的可选择标记,这些标记能够使相应的编码多肽同等地表达。可替代地,可以使用编码并能够表达多种

多肽的单一载体。编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

[0292] 一旦本文提供的融合蛋白已经通过重组表达产生,则它可以通过本领域已知的用于纯化多肽(例如,免疫球蛋白分子)的任何方法进行纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法(特别是蛋白A后对特定抗原的亲合力)、尺寸柱色谱法和Kappa选择亲和色谱法)、离心、差异溶解度或任何其它用于纯化蛋白质的标准技术。此外,本文提供的融合蛋白分子可以与本文所述或本领域另外已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0293] 免疫缀合物

[0294] 在一些实施方案中,本公开还提供了免疫缀合物,其包含与一种或多种细胞毒性剂缀合的本文所述的任何抗体(如抗CD19单结构域抗体),所述细胞毒性剂为诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白质毒素、细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素。

[0295] 在一些实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于美登素(maytansinoid)(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0425 235B1);奥瑞他汀(auristatin),如单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588和7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);以及Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环霉素(anthracycline),如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic& Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.& Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);以及美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane),例如多西他赛(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他赛(larotaxel)、替司他赛(tesetaxel)和奥他赛(ortataxel);单端孢霉烯(trichothecene);以及CC1065。

[0296] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓杆菌)、蓖麻毒素A链、相思子毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素、依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯。

[0297] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于产生放射性缀合物。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,其可以包含用于闪烁照相研究的放射性原子,例如tc99m或I123,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记,例如再次碘-123、碘-131、钷-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0298] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,该双功能蛋白偶联剂为诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双官能衍生物(如己二酸二甲酯HCl)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述的那样制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。

[0299] 接头可以是促进被缀合的剂在细胞中的释放的“可切割接头”,但本文也考虑不可切割接头。用于本公开缀合物的接头包括但不限于酸不稳定接头(例如,脲接头)、含二硫键的接头、肽酶敏感接头(例如,包含氨基酸的肽接头,如缬氨酸和/或瓜氨酸,如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、光不稳定接头、二甲基接头、硫醚接头或设计用于逃避转运蛋白介导的多药耐药性的亲水接头。

[0300] 本文中的免疫缀合物或ADC考虑但不限于这类用交联试剂制备的缀合物,该交联试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯),它们是市售的(例如,来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.)。

[0301] 在其它实施方案中,本文提供的抗体与例如诊断分子缀合或重组融合。这类诊断和检测可以例如通过将抗体与可检测物质偶联来完成,这些可检测物质包括但不限于各种酶,如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,如但不限于链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素;荧光材料,如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,如但不限于鲁米诺;生物发光材料,如但不限于荧光素酶、荧光素或水母发光蛋白;化学发光材料,如 ^{225}Ac γ 发射、Auger发射、 β 发射、 α 发射或正电子发射放射性同位素。

[0302] 5.3. 嵌合抗原受体

[0303] 另一方面,本文提供了包含细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),所述细胞外抗原结合结构域包含本文提供的与CD19结合的单结构域抗体(例如,VHH)。举例说明了包含本发明VHH结构域的示例性CAR(即,基于VHH的CAR),并将其与包含scFv的常规CAR(即,基于scFv的CAR)进行比较,如下文第6节中所述。

[0304] 在一些实施方案中,本文提供的嵌合抗原受体(CAR)包含多肽,所述多肽包含:(a)细胞外抗原结合结构域,其包含如本文提供的与CD19特异性结合的单结构域抗体(sdAb)和任选一个或多个另外的结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。下面更详细地描述每个组分和另外的区域。

[0305] 5.3.1. 细胞外抗原结合结构域

[0306] 本文所述的CAR的细胞外抗原结合结构域包含一种或多种(如1种、2种、3种、4种、5种、6种或更多种中的任一者)单结构域抗体。单结构域抗体可以直接经由肽键或经由肽接头彼此融合。

[0307] 单结构域抗体

[0308] 本公开的CAR包含:包含一种或多种单结构域抗体的细胞外抗原结合结构域。sdAb可以具有相同或不同的来源,并且具有相同或不同的大小。示例性sdAb包括但不限于来自仅有重链的抗体的重链可变结构域(例如,V_HH或V_{NAR})、天然缺乏轻链的结合分子、来源于常规4-链抗体的单结构域(如V_H或V_L)、人源化的仅有重链的抗体、由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人单结构域抗体,以及工程化结构域和除来源于抗体的单结构域支架之外的单结构域支架。本领域中已知或通过本公开开发的任何sdAb(包括本公开中上面描述的单结构域抗体)可被用于构建本文所述的CAR。sdAb可来源于任何物种,包括但不限于小鼠、大鼠、人、骆驼、美洲驼、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。本文考虑的单结构域抗体还包括来自除骆驼科和鲨鱼之外的物种的天然存在的单结构域抗体分子。

[0309] 在一些实施方案中,sdAb来源于称为缺乏轻链的重链抗体(本文中也称为“仅有重链的抗体”)的天然存在的单结构域抗原结合分子。例如WO 94/04678和Hamers-Casterman, C.等人,Nature 363:446-448(1993)中公开了此类单结构域分子。为清楚起见,来源于天然缺乏轻链的重链分子的可变结构域在本文中被称为V_HH,以将其与四链免疫球蛋白的常规V_H区别开来。此种V_HH分子可来源于在骆驼科物种(例如骆驼、美洲驼、骆马、单峰骆驼、羊驼和原驼)中产生的抗体。除骆驼科以外的其它物种可产生天然缺乏轻链的重链分子,并且此类V_HH在本公开的范围。此外,V_HH的人源化形式以及其它修饰和变体也被考虑并且在本公开的范围。

[0310] 来自骆驼科动物的V_HH分子比IgG分子小约10倍。它们是单一多肽,并且可以是非常稳定的,能抵抗极端的pH和温度条件。此外,它们可以抵抗蛋白酶的作用,而常规4-链抗体则不然。此外,V_HH的体外表达产生高产量、正确折叠的功能性V_HH。此外,在骆驼科动物中产生的抗体可以识别除了由通过使用抗体文库或经由对除骆驼科动物以外的哺乳动物进行免疫而在体外产生的抗体所识别的表位之外的表位(参见例如W09749805)。因此,包含一个或多个V_HH结构域的多特异性或多价CAR可以比包含来源于常规4-链抗体的抗原结合片段的多特异性或多价CAR更高效地与靶标相互作用。由于已知V_HH结合到“不寻常”的表位(如腔或沟)中,因此包含此类V_HH的CAR的亲和力可能比常规多特异性多肽更适合用于治疗性治疗。

[0311] 在一些实施方案中,sdAb来源于在软骨鱼中所见的免疫球蛋白的可变区。例如,sdAb可来源于在鲨鱼血清中所见的被称为新型抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型。WO 03/014161和Streltsov,Protein Sci.14:2901-2909(2005)中描述了产生来源于NAR(“IgNAR”)的可变区的单结构域分子的方法。

[0312] 在一些实施方案中,sdAb是重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼化的、去免疫的和/或体外产生的(例如,通过噬菌体展示选择)。在一些实施方案中,框架区的氨基酸序列可通过框架区中特定氨基酸残基的“骆驼化”而改变。骆驼化是指将来自常规4-链抗体的(天然存在的)V_H结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基用在重链抗体的V_HH结构域中一个或多个相应位置处存在的氨基酸残基中的一个或多个氨基酸残基替换或取代。这可以按本领域中已知的方式进行,这对于本领域技术人员是清楚的。这类“骆驼化”取代优选被插入在形成V_H-V_L界面和/或存在于所述界面的氨基酸位置,和/或在所谓的骆驼科标志残基处,如本文所定义(参见例如WO 94/04678;Davies和Riechmann FEBS Letters 339:285-

290(1994);Davies和Riechmann,Protein Engineering 9(6):531-537(1996);Riechmann,J.Mol.Biol.259:957-969(1996);以及Riechmann和Muyldermans,J.Immunol.Meth.231:25-38(1999))。

[0313] 在一些实施方案中,sdAb是由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人单结构域抗体。参见例如US20090307787、美国专利号8,754,287、US20150289489、US20100122358和W02004049794。在一些实施方案中,sdAb是亲和力成熟的。

[0314] 在一些实施方案中,针对特定抗原或靶标的天然存在的VHH结构域可获自骆驼科VHH序列的(原初或免疫)文库。此类方法可涉及或可不涉及使用所述抗原或靶标或其至少一部分、片段、抗原决定簇或表位,使用本领域中已知的一种或多种筛选技术来筛选此类文库。W0 99/37681、W0 01/90190、W0 03/025020和W0 03/035694中描述了此类文库和技术。可替代地,可以使用来源于(原初或免疫)VHH文库的改进的合成或半合成文库,如通过诸如随机诱变和/或CDR改组的技术获自(原初或免疫)VHH文库的VHH文库,例如W0 00/43507中所述。

[0315] 在一些实施方案中,单结构域抗体由常规四链抗体产生。参见例如EP 0 368 684;Ward等人,Nature,341(6242):544-6(1989);Holt等人,Trends Biotechnol.,21(11):484-490(2003);W0 06/030220;以及W0 06/003388。

[0316] 在一些实施方案中,本文提供的细胞外抗原结合结构域包含至少一个结合结构域,并且所述至少一个结合结构域包含如本文提供的与CD19结合的单结构域抗体,例如上文第5.2节中所述的抗CD19单结构域抗体。

[0317] 在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CAR,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb是如上文第5.2节中所述的抗CD19 sdAb,包括例如表2中的VHH结构域和具有表2中的那些VHH结构域中任一者中的一个、两个或所有三个CDR的那些。在一些实施方案中,所述抗CD19 sdAb是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。

[0318] 在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CAR,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在其它实施方案中,本文提供了包含多肽的CAR,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0319] 在其它实施方案中,细胞外抗原结合结构域包含两个或更多个抗原结合结构域。在这两个或更多个抗原结合结构域当中,至少一个是如本文提供的与CD19结合的VHH,以及与一种或多种另外的抗原结合的一个或多个另外的结合结构域,例如靶向一种或多种另外

的抗原的1个、2个、3个、4个或更多个另外的单结构域抗体结合区(sdAb)。

[0320] 因此,在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的多特异性(如双特异性和三特异性)CAR,所述多肽包含:(a)包含与CD19特异性结合的第一单结构域抗体(sdAb)的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含与第二抗原(如第二肿瘤抗原)特异性结合的第二单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含与第二抗原(如第二肿瘤抗原)特异性结合的第二单结构域抗体(sdAb),以及与第三抗原(如第三肿瘤抗原)特异性结合的第三单结构域抗体(sdAb)。

[0321] 在一些实施方案中,被本公开的CAR靶向的另外的抗原是细胞表面分子。可以选择单结构域抗体以识别充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的抗原。在一些实施方案中,所述抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原与B细胞恶性肿瘤相关。肿瘤表达许多可用作免疫反应(特别是T细胞介导的免疫反应)的靶抗原的蛋白质。被CAR靶向的抗原可以是单个患病细胞上的抗原,或是在各自都会促成疾病的不同细胞上表达的抗原。被CAR靶向的抗原可直接或间接参与疾病。

[0322] 肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的蛋白质,该蛋白质可引发免疫反应,特别是T细胞介导的免疫反应。本公开的另外的被靶向抗原的选择将取决于要治疗的癌症的特定类型。示例性肿瘤抗原包括但不限于神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CAIX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、前列腺素、PSMA、HER2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrinB2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0323] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包含一种或多种与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达许多可作为免疫攻击的靶抗原的蛋白质。这些分子包括但不限于组织特异性抗原,如黑色素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和gp100,以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。其它靶分子属于转化相关分子(诸如癌基因HER2/Neu/ErbB-2)的组。又一组靶抗原是癌胚胎抗原,如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成了真正的肿瘤特异性免疫球蛋白抗原,该肿瘤特异性免疫球蛋白抗原是单个肿瘤所独有的。除了CD19之外,B细胞分化抗原如CD20和CD37也是B细胞淋巴瘤中的靶抗原的其它候选者。

[0324] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA对于肿瘤细胞是独特的,并且在身体内的其它细胞上不会出现。TAA相关抗原不是肿瘤细胞所独有的,而是也在不能诱导对抗原的免疫耐受状态的情况下在正常细胞上表达。该抗原在肿瘤上的表达可发生在使免疫系统能够对抗原作出反应的条件下。TAA可以是在胎儿发育过程中,当免疫系统不成熟且无法响应时在正常细胞上表达的抗原,或者它们可以是正常细胞上通常以极低水平存在但以高得多的水平在肿瘤细胞上表达的抗原。

[0325] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括:分化抗原,如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原,如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,如CEA;过表达的致癌基因和突变的肿瘤抑制基

因,如p53、Ras、HER2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原;如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,如艾巴氏病毒(Epstein Barr virus)抗原EBVA和人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。

[0326] 其它基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23HI、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS 1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0327] 在一些更具体的实施方案中,所述一种或多种另外的抗原选自由CD20、CD22、CD33、CD38、BCMA、CS1、ROR1、GPC3、CD123、IL-13R、CD138、c-Met、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3和糖脂F77组成的组。

[0328] 在具体的实施方案中,本文提供的CAR包含与CD19结合的VHH和与CD20结合的VHH。在另一具体实施方案中,本文提供的CAR包含与CD19结合的VHH和与CD22结合的VHH。

[0329] 在一些实施方案中,本文提供的sdAb是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。

[0330] 除了本文提供的一个或多个抗原结合结构域之外,本文提供的CAR可进一步包含以下中的一者或多者:接头(例如,肽接头)、跨膜结构域、铰链区、信号肽、细胞内信号传导结构域、共刺激信号传导结构域,它们中的每一者在下文中有更详细的描述。

[0331] 例如,在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于CD137。在一些实施方案中,所述CD19 CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,所述CD19 CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域和来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CD19 CAR是单特异性的。在一些实施方案中,CD19 CAR是单价的。

[0332] 肽接头

[0333] 本文所述的多特异性或多价CAR中的各种单结构域抗体可经由肽接头彼此融合。在一些实施方案中,单结构域抗体直接彼此融合而没有任何肽接头。连接不同单结构域抗体(例如,VHH)的肽接头可以是相同或不同的。CAR的不同结构域也可经由肽接头彼此融合。

[0334] CAR中的每个肽接头可具有相同或不同的长度和/或序列,这取决于单结构域抗体和/或各种结构域的结构和/或功能特征。可以独立地选择并优化每个肽接头。CAR中使用的一个或多个肽接头的长度、柔性程度和/或其它性质可能对包括但不限于对一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力在内的性质有一些影响。例如,可以选择较长的肽接头以确保两个相邻的结构域不会在空间上相互干扰。在一些实施方案中,短肽接头可设

置在CAR的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些实施方案中,肽接头包含柔性残基(如甘氨酸和丝氨酸),以使得相邻结构域可相对于彼此自由移动。例如,甘氨酸-丝氨酸双联体可以是合适的肽接头。

[0335] 肽接头可具有任意合适的长度。在一些实施方案中,肽接头的长度为至少约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、50个、75个、100个或更多个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头的长度不超过约100个、75个、50个、40个、35个、30个、25个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个或更少氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头的长度为约1个氨基酸至约10个氨基酸、约1个氨基酸至约20个氨基酸、约1个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约25个氨基酸、约5个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约30个氨基酸、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸或约1个氨基酸至约100个氨基酸中的任一者。

[0336] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如,来源于仅有重链的抗体的铰链区的序列可用作接头。参见例如W01996/34103。在一些实施方案中,肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括但不限于甘氨酸聚合物($(G)_n$)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 和 $(GGGGS)_n$,其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域中已知的其它柔性接头。示例性肽接头列于下表中。

[0337] 表4. 示例性肽接头

序列	SEQ ID NO
$(GS)_n$, n 是包括例如 1、2、3、4、5 和 6 的整数。	SEQ ID NO: 79
$(GSGGS)_n$, n 是包括例如 1、2、3、4、5 和 6 的整数。	SEQ ID NO: 80
$(GGGS)_n$, n 是包括例如 1、2、3、4、5 和 6 的整数。	SEQ ID NO: 81
GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 82
$(GGGGS)_n$, n 是包括例如 1、2、3、4、5 和 6 的整数。	SEQ ID NO: 83
DGGGS	SEQ ID NO: 84

序列	SEQ ID NO
TGEKP	SEQ ID NO: 85
GGRR	SEQ ID NO: 86
GGGGSGGGGSGGGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 87
EGKSSGSGSESKVD	SEQ ID NO: 88
KESGSVSSEQLAQFRS	SEQ ID NO: 89
GGRRGGGS	SEQ ID NO: 90
LRQRDGERP	SEQ ID NO: 91
LRQKDGGGSERP	SEQ ID NO: 92
LRQKDGGGSGGGSERP	SEQ ID NO: 93
GSTSGSGKPGSGEGST	SEQ ID NO: 94
GSTSGSGKSSEGGK	SEQ ID NO: 95
KESGSVSSEQLAQFRSLD	SEQ ID NO: 96

[0340] 例如,如以下中所述的本领域已知的其它接头也可以包括在本文提供的CAR中: W02016014789、W02015158671、W02016102965、US20150299317、W02018067992、US7741465;

Colcher等人, J.Nat.Cancer Inst.82:1191-1197 (1990) 和Bird等人, Science 242:423-426 (1988) 中所述, 上述中的每一者的公开内容以引用的方式并入本文。

[0341] 5.3.2. 跨膜结构域

[0342] 本公开的CAR包含可直接或间接与细胞外抗原结合结构域融合的跨膜结构域。该跨膜结构域可来源于天然来源或合成来源。如本文所用, “跨膜结构域”是指在细胞膜、优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。适用于本文所述的CAR的跨膜结构域可以从天然存在的蛋白质中获得。可替代地, 其可以是合成的非天然存在的蛋白质区段, 例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

[0343] 跨膜结构域基于跨膜结构域的三维结构进行分类。例如, 跨膜结构域可形成 α 螺旋、多于一个 α 螺旋的复合物、 β -桶状结构或能够跨越细胞的磷脂双层的任何其它稳定结构。此外, 跨膜结构域也可以或可替代地基于跨膜结构域拓扑结构(包括跨膜结构域穿过膜的次数和蛋白质的取向)进行分类。例如, 单程膜蛋白穿过细胞膜一次, 多程膜蛋白穿过细胞膜至少两次(例如, 2、3、4、5、6、7或更多次)。膜蛋白可以被定义为I型、II型或III型, 这取决于它们的末端和一个或多个穿膜区段相对于细胞内部和外部的拓扑结构。I型膜蛋白具有单个跨膜区, 并且被定向成使得蛋白质的N-末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧, 而蛋白质的C-末端存在于细胞质侧。II型膜蛋白也具有单个跨膜区, 但被定向成使得蛋白质的C-末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧, 而蛋白质的N-末端存在于细胞质侧。III型膜蛋白具有多个跨膜区段, 并且可基于跨膜区段的数目以及N-末端和C-末端的位置进一步细分。

[0344] 在一些实施方案中, 本文所述的CAR的跨膜结构域来源于I型单程膜蛋白。在一些实施方案中, 来自多程膜蛋白的跨膜结构域也可适用于本文所述的CAR。多程膜蛋白可包含复合(至少2、3、4、5、6、7个或更多) α 螺旋或 β 折叠结构。在一些实施方案中, 多程膜蛋白的N-末端和C-末端存在于脂质双层的相对侧上, 例如, 蛋白质的N-末端存在于脂质双层的细胞质侧上, 且蛋白质的C-末端存在于细胞外侧上。

[0345] 在一些实施方案中, CAR的跨膜结构域包含选自由以下组成的组的跨膜结构域的跨膜结构域: T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链; CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244, 2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CDI00 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A, Ly108)、SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C。在一些实施方案中, 跨膜结构域来源于选自由以下组成的组的分子: CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1。

[0346] 在一些具体实施方案中, 跨膜结构域来源于CD8 α 。在一些实施方案中, 跨膜结构域是包含SEQ ID NO: 74的氨基酸序列的CD8 α 的跨膜结构域。

[0347] 用于本文所述的CAR的跨膜结构域还可以包含合成的非天然存在的蛋白质区段的至少一部分。在一些实施方案中, 跨膜结构域是合成的非天然存在的 α 螺旋或 β 折叠。在一些

实施方案中,蛋白质区段是至少近似20个氨基酸,例如至少18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸。合成跨膜结构域的实例是在本领域中,例如在美国专利号7,052,906和PCT公布号WO 2000/032776中已知的,所述美国专利和PCT公布的相关公开内容以引用的方式并入本文。

[0348] 本文提供的跨膜结构域可包含跨膜区和位于跨膜结构域的C-末端侧的细胞质区。跨膜结构域的胞质区可包含三个或更多个氨基酸,并且在一些实施方案中,有助于在脂质双层中对跨膜结构域进行定向。在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的跨膜区中。在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的细胞质区中。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区包含带正电荷的氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

[0349] 在一些实施方案中,跨膜结构域的跨膜区包含疏水性氨基酸残基。在一些实施方案中,本文提供的CAR的跨膜结构域包含人工疏水序列。例如,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可存在于跨膜结构域的C末端。在一些实施方案中,跨膜区主要包含疏水性氨基酸残基,如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一些实施方案中,跨膜区是疏水性的。在一些实施方案中,跨膜区包含聚亮氨酸-丙氨酸序列。蛋白质或蛋白质区段的亲水性或疏水性或亲水性特征可以通过本领域已知的任何方法,例如Kyte和Doolittle亲水性分析来进行评估。

[0350] 5.3.3. 细胞内信号传导结构域

[0351] 本公开的CAR包含细胞内信号传导结构域。细胞内信号传导结构域负责激活表达CAR的免疫效应细胞的正常效应子功能中的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的特殊功能。例如,T细胞的效应子功能可以是溶细胞活性或包括分泌细胞因子在内的辅助活性。因此术语“细胞质信号传导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特殊功能的蛋白质部分。虽然通常可以采用整个细胞质信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整条链。就使用细胞质信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应子功能信号即可。因此术语细胞质信号传导结构域意在包括足以转导效应子功能信号的细胞质信号传导结构域的任何截短部分。

[0352] 在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含基本上由免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域组成的细胞内信号传导结构域。“初级细胞内信号传导结构域”是指以刺激方式起作用以诱导免疫效应子功能的细胞质信号传导序列。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域含有称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM的信号传导基序。如本文所用,“ITAM”是通常存在于在许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部的保守蛋白质基序。所述基序可包含由6-8个氨基酸分隔的氨基酸序列YxxL/I的两个重复序列,其中每个x独立地是产生保守基序YxxL/I_x (6-8) YxxL/I的任何氨基酸。信号传导分子内的ITAM对于细胞内的信号转导很重要,这至少部分由信号传导分子激活后ITAM中酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM还可以用作其它参与信号传导通路的蛋白质的对接位点。示例性的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列包括来源于CD3 ζ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (Fc ϵ Rib)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。

[0353] 在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方

案中,细胞内信号传导结构域由CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域组成。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域是野生型CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。在一些实施方案中,野生型CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域是含有一种或多种突变(诸如Q65K)的CD3 ζ 的胞质信号传导结构域的功能突变体。

[0354] 5.3.4. 共刺激信号传导结构域

[0355] 许多免疫效应细胞除了刺激抗原特异性信号外还需要共刺激,以促进细胞增殖、分化和存活,以及激活细胞的效应子功能。在一些实施方案中,CAR包含至少一个共刺激信号传导结构域。如本文所用的术语“共刺激信号传导结构域”是指介导细胞内的信号转导以诱导诸如效应子功能的免疫反应的蛋白质的至少一部分。本文所述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,该细胞质信号传导结构域转导信号并调节由免疫细胞如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞介导的反应。“共刺激信号传导结构域”可以是共刺激分子的细胞质部分。术语“共刺激分子”是指免疫细胞(如T细胞)上的同源结合配偶体,该同源结合配偶体与共刺激配体特异性结合,从而介导免疫细胞的共刺激反应,如但不限于增殖和存活。

[0356] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含单个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个(如约2个、3个、4个或更多个中的任一者)共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个相同的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含来自不同共刺激蛋白的两个或更多个共刺激信号传导结构域,如本文所述的任何两种或更多种共刺激蛋白。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含初级细胞内信号传导结构域(如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)和一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,一个或多个共刺激信号传导结构域和初级细胞内信号传导结构域(如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)经由任选的肽接头彼此融合。初级细胞内信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域可以按任意合适的顺序排列。在一些实施方案中,一个或多个共刺激信号传导结构域位于跨膜结构域与初级细胞内信号传导结构域(如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)之间。多个共刺激信号传导结构域可提供累加或协同的刺激作用。

[0357] 宿主细胞(例如,免疫细胞)中的共刺激信号传导结构域的激活可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬性质、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激分子的共刺激信号传导结构域适用于本文所述的CAR中。基于诸如将表达效应分子的免疫效应细胞的类型(例如,T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)和所需免疫效应子功能(例如,ADCC效应)的因素选择共刺激信号传导结构域的一种或多种类型。用于CAR的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,所述共刺激蛋白包括但不限于B7/CD28家族的成员(例如,B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6);TNF超家族的成员(例如,4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-

α /TNF- β 、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 和TNF RII/TNFRSF1B)；SLAM家族的成员(例如,2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150)；以及任何其它共刺激分子,如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I类、HLA-DR、Ikaros、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)和NKG2C。

[0358] 在一些实施方案中,所述一个或多个共刺激信号传导结构域选自由以下组成的组:CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、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。

[0359] 在一些实施方案中,本公开的CAR中的细胞内信号传导结构域包含来源于CD137的共刺激信号传导结构域(即,4-1BB)。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域和CD137的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD137的包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的共刺激信号传导结构域。

[0360] 也在本公开的范围内的是本文所述的任何共刺激信号传导结构域的变体,使得共刺激信号传导结构域能够调节免疫细胞的免疫反应。在一些实施方案中,与野生型对应共刺激信号传导结构域相比,所述共刺激信号传导结构域包含最多10个氨基酸残基变异(例如,1个、2个、3个、4个、5个或8个)。包含一个或多个氨基酸变异的这类共刺激信号传导结构域可以被称为变体。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可能导致信号转导增加和免疫反应刺激增强。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域,共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导减少和免疫反应刺激减弱。

[0361] 5.3.5. 铰链区

[0362] 本公开的CAR可以包含位于细胞外抗原结合结构域与跨膜结构域之间的铰链结构域。铰链结构域是通常见于蛋白质的两个结构域之间的氨基酸区段,并且可允许该蛋白质的柔性以及该结构域中的一者或两者相对于彼此的移动。可以使用提供此种柔性以及细胞外抗原结合结构域相对于效应分子的跨膜结构域的任何氨基酸序列。

[0363] 铰链结构域可含有约10-100个氨基酸,例如约以下中的任一者:15-75个氨基酸、20-50个氨基酸或30-60个氨基酸。在一些实施方案中,铰链结构域的长度可以是至少约以下中的任一者:10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个或75个氨基酸。

[0364] 在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域已知的包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分,并且赋予嵌合受体柔性。在一些实施方案中,所述铰链结构域来源于CD8 α 。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8 α 的铰链结构域的一部分,例如,含有CD8 α 的铰链结构域的至少约15个(例如,20个、25个、30个、35个或40个)连续氨基酸的片段。在一些实施方案中,CD8 α 的铰链结构域包含SEQ ID

NO:73的氨基酸序列。

[0365] 抗体(如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体)的铰链结构域也适用于本文所述的pH依赖性嵌合受体系统。在一些实施方案中,铰链结构域是联接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域是抗体的,并且包含所述抗体的铰链结构域和所述抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和所述抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和所述抗体的CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中,所述抗体是IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中,所述抗体是IgG抗体。在一些实施方案中,所述抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0366] 非天然存在的肽也可用作本文所述的嵌合受体的铰链结构域。在一些实施方案中,在Fc受体的细胞外配体结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域是肽接头,如(GxS)_n接头,其中x和n独立地可以为3与12之间的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。

[0367] 5.3.6. 信号肽

[0368] 本公开的CAR可以在多肽的N-末端包含信号肽(也称为信号序列)。一般来说,信号肽是使多肽靶向细胞中所需位点的肽序列。在一些实施方案中,信号肽使效应分子靶向细胞的分泌通路,并将允许效应分子整合和锚定到脂质双层中。本领域技术人员将显而易见适用于本文所述的CAR中的包括天然存在的蛋白质的信号序列或合成的非天然存在的信号序列的信号肽。在一些实施方案中,信号肽源自选自由CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。在一些实施方案中,所述信号肽来源于CD8 α 。在一些实施方案中,CD8 α 的信号肽包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0369] 5.3.7. 示例性CAR

[0370] 如下文第6节中所示的那样产生示例性单价CAR,如VHH-083CAR、VHH-111CAR、VHH-131CAR、77LICA542 CAR、77LICA519CAR、77LICA602 CAR、huVHH-773CAR和huVHH-776CAR。

[0371] 在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列或由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由SEQ ID NO:59的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列或由SEQ ID NO:60的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列或由SEQ ID NO:61的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列或由SEQ ID NO:62的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列或由SEQ ID NO:63的氨基酸序列组成的CAR。在一些实施方案中,本文提供了包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列或由SEQ ID NO:105的氨基酸序列组成的CAR。

[0372] 在某些实施方案中,本文提供的CAR包含相对于下文第6节中例示的CAR中的任何一种CAR具有一定百分比同一性的氨基酸序列。

[0373] 在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:58的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:59的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:61的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19 CAR,所述多肽与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,本文提供了包含多肽的CD19CAR,所述多肽与SEQ ID NO:105的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0374] 在一些实施方案中,本文提供了编码本文提供的任何CD19 CAR的分离的核酸。下面提供关于核酸序列和载体的更详细的描述。

[0375] 5.4. 工程化免疫效应细胞

[0376] 在又一方面,本文提供了包含本文所述的任一种CAR的宿主细胞(如免疫效应细胞)。

[0377] 因此,在一些实施方案中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb是如上文第5.2节中所述的抗CD19 sdAb,包括例如表2中的VHH结构域和具有表2中的那些VHH结构域中任一者中的一个、两个或所有三个CDR的那些。在一些实施方案中,所述抗CD19 sdAb是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。在一些实施方案中,跨膜结构域选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨

膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域和来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0378] 在一些实施方案中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗CD19sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域和来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0379] 在一些实施方案中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述CAR包含选自由SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供了包含CAR的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述CAR包含与选自由SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。

[0380] 在其它实施方案中,提供了包含多特异性(如双特异性或三特异性)嵌合抗原受体(CAR)的工程化免疫效应细胞(如T细胞),所述嵌合抗原受体包含多肽,所述多肽包含:(a)包含与CD19特异性结合的第一单结构域抗体(sdAb)和一个或多个另外的抗原结合结构域的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述另外的抗原结合结构域与选自由CD20、CD22、CD33、CD38、BCMA、CS1、ROR1、GPC3、CD123、IL-13R、CD138、c-Met、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3和糖脂F77组成的组的抗

原结合。在一些实施方案中,所述第一sdAb和/或所述另外的sdAb是骆驼科的、嵌合的、人的或人源化的。在一些实施方案中,所述第一单结构域抗体和所述另外的单结构域抗体经由肽键或肽接头彼此融合。在一些实施方案中,肽接头的长度不超过约50个(如不超过约35、25、20、15、10或5个中的任一者)的氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152和PD1组成的组。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞(如T细胞)的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述初级细胞内信号传导结构域来源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导结构域来源于选自由CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83配体以及它们的组合组成的组的共刺激分子。在一些实施方案中,多特异性CAR进一步包含位于细胞外抗原结合结构域的C-末端与跨膜结构域的N-末端之间的铰链结构域(如CD8 α 铰链结构域)。在一些实施方案中,多特异性CAR进一步包含位于多肽的N-末端的信号肽(如CD8 α 信号肽)。在一些实施方案中,所述多肽从N-末端到C-末端包含:CD8 α 信号肽、细胞外抗原结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、来源于CD137的共刺激信号传导结构域和来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0381] 在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞。在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是自体的。在一些实施方案中,工程化免疫效应细胞是同种异体的。

[0382] 还提供了包含(或表达)两种或更多种不同CAR的工程化免疫效应细胞。本文所述的任何两种或更多种CAR可以组合表达。CAR可以靶向不同的抗原,从而提供协同或累加效应。两种或更多种CAR可以在相同的载体或不同的载体上编码。

[0383] 工程化免疫效应细胞可进一步表达一种或多种治疗性蛋白质和/或免疫调节剂,如免疫检查点抑制剂。参见例如国际专利申请号PCT/CN2016/073489和PCT/CN2016/087855,它们以全文引用的方式并入本文。

[0384] 5.4.1. 载体

[0385] 本公开提供了用于克隆和表达本文所述的CAR中的任何一种CAR的载体。在一些实施方案中,所述载体适合在真核细胞如哺乳动物细胞中复制和整合。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、牛痘载体、单纯疱疹病毒载体和它们的衍生物。病毒载体技术是本领域中熟知的,并且例如描述于Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)以及其它病毒学和分子生物学手册中。

[0386] 许多基于病毒的系统已被开发用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了方便的平台。可使用本领域中已知的技术将异源核酸插入到载体中,并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒,并在体外或离体地将该重组病毒递送至工程化哺乳动物细胞。许多逆转录病毒系统是本领域中已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域中已知的。在一些实施方案中,使用慢病毒载体。在一些实施方案中,使用自灭活慢病毒载体。例如,可用本领域中已知的方案来包装携带免疫调节剂(如免疫检查点抑制剂)编码序列的自灭活慢病毒载体和/或携带嵌合抗原

受体的自灭活慢病毒载体。可使用本领域中已知的方法将所得慢病毒载体用于转导哺乳动物细胞(如原代人T细胞)。来源于逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合以及该转基因在子代细胞中的繁殖。慢病毒载体还具有低免疫原性,并且可转导非增殖细胞。

[0387] 在一些实施方案中,所述载体包含编码本文所述的CAR的核酸中的任何一种核酸。可使用本领域中任何已知的分子克隆方法将核酸克隆到载体中,所述方法包括例如使用限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选择标记。在一些实施方案中,核酸与启动子可操作地连接。已经对用于使基因在哺乳动物细胞中表达的启动子种类进行了探索,并且本领域中已知的启动子中的任何一种启动子都可用于本公开。启动子可大致分类为组成型启动子或调控型启动子,如诱导型启动子。

[0388] 在一些实施方案中,编码CAR的核酸与组成型启动子可操作地连接。组成型启动子允许异源基因(也称为转基因)在宿主细胞中组成型地表达。本文考虑的示例性组成型启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、人延伸因子-1 α (hEF1 α)、泛素C启动子(UbiC)、磷酸甘油激酶启动子(PGK)、猿病毒40早期启动子(SV40)以及与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAGG)。这类组成型启动子在驱动转基因表达方面的效率已在大量研究进行了广泛比较。例如,Michael C. Milone等人比较了CMV、hEF1 α 、UbiC和PGK驱动原代人T细胞中的嵌合抗原受体表达的效率,并得出结论,即hEF1 α 启动子不仅诱导最高水平的转基因表达,而且还在CD4和CD8人T细胞中得到最佳保持(Molecular Therapy, 17 (8) :1453-1464 (2009))。在一些实施方案中,编码CAR的核酸与hEF1 α 启动子可操作地连接。

[0389] 在一些实施方案中,编码CAR的核酸与诱导型启动子可操作地连接。诱导型启动子属于调控型启动子类别。诱导型启动子可由一种或多种条件诱导,所述条件例如工程化免疫效应细胞的物理条件、微环境,或工程化免疫效应细胞的生理状态、诱导物(即,诱导剂)或它们的组合。

[0390] 在一些实施方案中,诱导条件不诱导工程化哺乳动物细胞中和/或接受药物组合物的受试者中的内源基因的表达。在一些实施方案中,诱导条件选自由以下组成的组:诱导物、辐照(如电离辐射、光)、温度(如热)、氧化还原状态、肿瘤环境和工程化哺乳动物细胞的激活状态。

[0391] 在一些实施方案中,载体还含有可选择的标志基因或报告基因以从通过慢病毒载体转染的宿主细胞群中选择表达CAR的细胞。可选择的标志物和报告基因均可侧接有适当的调控性序列,以能够在宿主细胞中表达。例如,载体可含有可用于调控核酸序列的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0392] 在一些实施方案中,载体包含多于一种编码CAR的核酸。在一些实施方案中,载体包含有包含编码第一CAR的第一核酸序列和编码第二CAR的第二核酸序列的核酸,其中第一核酸经由编码自切割肽的第三核酸序列与第二核酸可操作地连接。在一些实施方案中,自切割肽选自由T2A、P2A和F2A组成的组。

[0393] 5.4.2. 免疫效应细胞

[0394] “免疫效应细胞”是可以发挥免疫效应子功能的免疫细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞至少表达Fc γ RIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的免疫效应细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞、嗜中性粒细胞和

嗜酸性粒细胞。

[0395] 在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4+/CD8⁻、CD4⁻/CD8⁺、CD4+/CD8⁺、CD4⁻/CD8⁻或它们的组合。在一些实施方案中,T细胞在表达CAR并与靶细胞如CD19⁺肿瘤细胞结合后产生IL-2、TFN和/或TNF。在一些实施方案中,CD8⁺T细胞在表达CAR并与靶细胞结合后裂解抗原特异性靶细胞。

[0396] 在一些实施方案中,免疫效应细胞是NK细胞。在其它实施方案中,免疫效应细胞可以是已建立的细胞系,例如NK-92细胞。

[0397] 在一些实施方案中,免疫效应细胞从干细胞如造血干细胞、多能干细胞、iPS或胚胎干细胞分化而来。

[0398] 工程化免疫效应细胞是通过将CAR引入到免疫效应细胞(如T细胞)中来制备的。在一些实施方案中,通过转染上文所述的分离的核酸中的任何一种分离的核酸或者上文所述的载体中的任何一种载体将CAR引入到免疫效应细胞中。在一些实施方案中,通过将蛋白质插入到细胞膜中,同时使细胞通过微流体系统如CELLSQUEEZE[®](参见例如美国专利申请公布号20140287509)来将CAR引入到免疫效应细胞中。

[0399] 将载体或分离的核酸引入到哺乳动物细胞中的方法是本领域中已知的。可以通过物理、化学或生物学方法将所述载体转移到免疫效应细胞中。

[0400] 将载体引入到免疫效应细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域中熟知的。参见例如Sambrook等人(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。在一些实施方案中,通过电穿孔将载体引入到细胞中。

[0401] 将载体引入到免疫效应细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体已成为最广泛使用的将基因插入到哺乳动物(例如,人)细胞中的方法。

[0402] 将载体引入到免疫效应细胞中的化学方法包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统(包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体)。用作体外递送媒介物的示范性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。

[0403] 在一些实施方案中,可以通过常规方法(例如,体外转录)制备编码本文所述的CAR中的任何一种CAR的RNA分子,然后经由已知方法如mRNA电穿孔将该RNA分子引入到免疫效应细胞中。参见例如Rabinovich等人,Human Gene Therapy 17:1027-1035(2006)。

[0404] 在一些实施方案中,转导或转染的免疫效应细胞在引入载体或分离的核酸后离体增殖。在一些实施方案中,转导或转染的免疫效应细胞被培养成繁殖至少约以下中的任一者:1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天。在一些实施方案中,进一步评价或筛选转导或转染的免疫效应细胞以选择工程化哺乳动物细胞。

[0405] 报告基因可被用于鉴定潜在转染的细胞和评价调控性序列的功能性。一般来说,报告基因是这样的基因,该基因不存在于接受者生物体或组织中或不由接受者生物体或组织表达并且编码其表达能通过一些易于检测的性质(例如酶活性)显现出来的多肽。在已将DNA引入接受者细胞后,在合适的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可以包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌性碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白(GFP)基因(例如Ui-Tei等人,FEBS Letters 479:79-82(2000))。合适的表达系统是熟知的,并且可以采用已知技术制备或商购获得。确认工程化免疫效应细胞中存在编码CAR的核

酸的其它方法包括例如本领域技术人员众所周知的分子生物学测定,如Southern印迹和Northern印迹、RT-PCR和PCR;生化测定,如例如通过免疫学方法(如ELISA和蛋白质印迹)检测特定肽的存在或不存在。

[0406] 5.4.3. T细胞来源

[0407] 在一些实施方案中,在T细胞的扩增和遗传修饰之前,从受试者获得T细胞来源。T细胞可获自多种来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中,可以使用多种本领域可用的T细胞系。在一些实施方案中,可以使用多种本领域技术人员已知的技术例如Ficoll™分离从采集自受试者的血液单位获得T细胞。在一些实施方案中,通过单采血液成分术获得来自个体循环血液的细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施方案中,可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆级分,并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在一些实施方案中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺少钙,并且可以缺少镁,或者可以缺少许多(如果不是全部的话)二价阳离子。在没有钙的情况下的初始激活步骤可导致放大的激活。如本领域普通技术人员将容易理解的那样,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法,例如通过按照制造商的说明书使用半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)来完成。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如,不含Ca²⁺、不含Mg²⁺的PBS、PlasmaLyte A或其它含或不含缓冲剂的盐水溶液)中。可替代地,可以除去单采血液成分术样品中不需要的组分,并将细胞直接重悬在培养基中。

[0408] 在一些实施方案中,通过裂解红细胞并耗竭单核细胞,例如通过经由PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血淋巴细胞中分离T细胞。可以通过正选择或负选择技术进一步分离T细胞诸如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞的特定亚群。例如,在一些实施方案中,通过将T细胞与缀合有抗CD3/抗CD28(即,3×28)的珠粒,如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28T一起温育足以进行正选择所需T细胞的时间段来分离该T细胞。在一些实施方案中,所述时间段为约30分钟。在进一步的实施方案中,所述时间段的范围是30分钟至36小时或更长,以及介于其间的所有整数值。在另一实施方案中,所述时间段是至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时。在一些实施方案中,所述时间段是10至24小时。在一些实施方案中,温育时间段为24小时。为了从白血病患者中分离T细胞,使用较长的温育时间(如24小时)可增加细胞产量。在与其它细胞类型相比T细胞很少的任何情况下,可以使用更长的温育时间来分离T细胞,如从肿瘤组织或免疫受损个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。进一步地,使用较长的温育时间可提高捕获CD8⁺T细胞的效率。因此,在一些实施方案中,通过简单地缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠粒结合的时间和/或通过增加或减少珠粒与T细胞的比率,可以在培养开始时或在所述过程中的其它时间点优先选择或排除T细胞亚群。另外,通过增加或减少珠粒或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或其它所需时间点优先选择或排除T细胞亚群。技术人员将认识到也可以使用多轮选择。在一些实施方案中,可能需要执行选择程序,并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。也可对“未选择的”细胞进行更多轮的选择。

[0409] 通过负选择富集T细胞群可以用针对负选择的细胞特有的表面标志物的抗体组合

来完成。一种方法是经由使用针对负选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合液(cocktail)的负磁性免疫粘附或流式细胞术进行的细胞分选和/或选择。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合液通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可能需要富集或正选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的调控性T细胞。可替代地,在某些实施方案中,用缀合有抗C25的珠粒或其它类似的选择方法耗竭T调控性细胞。

[0410] 为了通过正选择或负选择分离所需的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,颗粒,如珠粒)的浓度。在某些实施方案中,可能需要显著减少珠粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/毫升的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/毫升的浓度。在进一步的实施方案中,使用大于1亿个细胞/毫升。在进一步的实施方案中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/毫升的浓度。在又一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/毫升的浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/毫升的浓度。使用高浓度可以引起细胞产量增加、细胞激活和细胞扩增。进一步地,高细胞浓度的使用可允许更高效地捕获可能微弱表达所关注的靶抗原的细胞,诸如CD28阴性T细胞,或来自存在许多肿瘤细胞的样品(即,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这类细胞群可具有治疗价值并且期望获得。在一些实施方案中,使用高浓度细胞允许更高效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0411] 在一些实施方案中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,颗粒,如珠粒)的混合物,使颗粒与细胞之间的相互作用最小化。这会选择表达大量要与颗粒结合的所需抗原的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达更高水平的CD28,并且在稀释浓度下比CD8⁺T细胞更高效地被捕获。在一些实施方案中,使用的细胞浓度为 5×10^6 /ml。在一些实施方案中,使用的浓度可以为约 1×10^5 /ml至 1×10^6 /ml,以及介于其间的任何整数值。

[0412] 在一些实施方案中,可将细胞在2-10°C下或室温下以不同的速度在旋转器上温育不同的时间长度。

[0413] 也可以在洗涤步骤后冷冻用于刺激的T细胞。不受理论的束缚,冷冻和随后的解冻步骤可通过除去细胞群中的粒细胞和一定程度上的单核细胞来提供更均一的产品。在除去血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域中已知的,并且在本上下文中是有用的,但一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO的培养基,或含有31.25% plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45% NaCl、10%葡聚糖40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO的培养基,或含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它合适的细胞冷冻介质。然后将细胞以1°/分钟的速度冷冻至-80°C并储存在液氮储存罐的蒸气相中。可使用其它受控冷冻方法以及立即在-20°C下或液氮中进行非受控冷冻。

[0414] 在一些实施方案中,如本文所述,将冷冻保存的细胞解冻和洗涤,并使其在室温下静置一小时,然后进行激活。

[0415] 本公开还考虑在可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采血液成分产物。因此,可以在任何必要的时间点收集要扩增的细胞来源,分

离和冷冻所需细胞,如T细胞,以供以后用于T细胞疗法,用于治疗多种将受益于T细胞疗法的疾病或病状,如本文所述的那些。在一个实施方案中,血液样品或单采血液成分取自一般健康受试者。在某些实施方案中,血液样品或单采血液成分取自有发展疾病的风险但尚未发展疾病的一般健康受试者,并分离和冷冻所关注的细胞以备后用。在某些实施方案中,T细胞可以被扩增、冷冻并在以后使用。在某些实施方案中,在如本文所述诊断出特定疾病后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在进一步的实施方案中,在多种相关治疗方式之前,从受试者的血液样品或单采血液成分中分离细胞,所述治疗方式包括但不限于用例如那他珠单抗(natalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、抗病毒剂、化学疗法、放射、免疫抑制剂(例如环孢菌素(cyclosporin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲氨蝶呤、麦考酚酸酯和FK506)、抗体或其它免疫消融剂,例如CAMPATH、抗CD3抗体、癌得星(cytosan)、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、麦考酚酸、类固醇、FR901228和辐照。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等人,Cell 66:807-815(1991);Henderson等人,Immun73:316-321(1991);Bierer等人,Curr.Opin.Immun.5:763-773(1993))。在进一步的实施方案中,将细胞分离用于患者以及冷冻用于以后与骨髓或干细胞移植、使用化学治疗剂如氟达拉滨的T细胞消融疗法、外部-射束放射疗法(XRT)、环磷酸胺或抗体如OKT3或CAMPATH结合(例如,在所述疗法之前、与其同时或在其之后)使用。在另一实施方案中,在B细胞消融疗法如与CD20反应的剂(例如利妥昔单抗(Rituxan))之前分离细胞,并可冷冻细胞以便以后在B细胞消融疗法之后用于治疗。

[0416] 在一些实施方案中,在治疗后直接从患者获得T细胞。在这方面,已经观察到在某些癌症治疗后,特别是使用损害免疫系统的药物进行治疗后,在患者通常从治疗中恢复期间的治疗后不久,所获得的T细胞的质量可能是最佳的或者其离体扩增的能力得到改进。同样,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可能处于用于增强植入和体内扩增的优选状态。因此,在本公开的上下文中考虑在该恢复阶段收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其它细胞。进一步地,在某些实施方案中,动员(例如,用GM-CSF的动员)和调理方案可用于在受试者中产生其中有利于特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增的条件,特别是在治疗后的限定时间窗期间。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其它细胞。

[0417] 5.4.4.T细胞的激活和扩增

[0418] 在一些实施方案中,在用本文所述的CAR对T细胞进行基因修饰之前或之后,T细胞通常可使用如例如美国专利号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和美国专利申请公布号20060121005中所述的方法进行激活和扩增。

[0419] 通常,T细胞可通过与其上附接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触来扩增。特别地,T细胞群可以如本文所述进行刺激,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,或者通过与蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)和钙离子载体结合来进行。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,可以在适合刺激T细胞增殖的条件下,将T细胞

群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD3抗体的实例包括UCHT1、OKT3、HIT3a (BioLegend, San Diego, US), 可以像本领域公知的其它方法一样使用(Graves J等人, J. Immunol. 146:2102 (1991); Li B等人, Immunology 116:487 (2005); Rivollier A等人, Blood 104:4029 (2004))。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besancon, 法国), 可以像本领域公知的其它方法一样使用(Berg等人, Transplant Proc. 30 (8) :3975-3977 (1998); Haanen等人, J. Exp. Med. 190 (9) :13191328 (1999); Garland等人, J. Immunol Meth. 227 (1-2) :53-63 (1999))。

[0420] 在一些实施方案中, T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以由不同方案提供。例如, 提供每种信号的剂可以在溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时, 所述剂可与同一个表面偶联(即, 呈“顺式”形态)或与分开的表面偶联(即, 呈“反式”形态)。可替代地, 一种剂可以与表面偶联, 而另一种剂在溶液中。在一个实施方案中, 提供共刺激信号的剂与细胞表面结合, 且提供初级激活信号的剂在溶液中或与表面偶联。在某些实施方案中, 两种剂都可以在溶液中。在另一个实施方案中, 所述剂可呈可溶形式, 然后被交联至表面, 诸如表达将与所述剂结合的Fc受体或抗体或其它结合剂的细胞。在这方面, 关于被考虑用于在本公开中某些实施方案中激活和扩增T细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC), 参见例如美国专利申请公布号20040101519和20060034810。

[0421] 在一些实施方案中, 将T细胞与剂包被的珠粒组合, 随后将珠粒与细胞分离, 然后培养细胞。在替代实施方案中, 在培养之前, 不分离剂包被的珠粒和细胞, 而是将它们一起培养。在进一步的实施方案中, 首先通过施加力如磁力而浓缩珠粒和细胞, 从而导致细胞表面标志物的连结增加, 从而诱导细胞刺激。

[0422] 举例来说, 可通过使附接有抗CD3和抗CD28的顺磁珠粒(3×28个珠粒)接触T细胞来连结细胞表面蛋白。在一个实施方案中, 在缓冲液, 优选PBS(不含诸如钙和镁的二价阳离子)中组合细胞(例如, 10⁴至4×10⁸个T细胞)和珠粒(例如, 推荐滴度为1:100的抗CD3/CD28MACSiBead颗粒)。本领域普通技术人员可以容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如, 靶细胞在样品中可能非常稀少, 并且仅占样品的0.01%, 或者整个样品(即, 100%)可能包含所关注的靶细胞。因此, 任何细胞数目都在本公开的上下文的范围内。在某些实施方案中, 可能需要显著减少颗粒和细胞混合在一起的体积(即, 增加细胞的浓度), 以确保细胞和颗粒的最大接触。例如, 在一个实施方案中, 使用约20亿个细胞/毫升的浓度。在另一实施方案中, 使用大于1亿个细胞/毫升。在进一步的实施方案中, 使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/毫升的浓度。在又一个实施方案中, 使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/毫升的浓度。在进一步的实施方案中, 可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/毫升的浓度。使用高浓度可以引起细胞产量增加、细胞激活和细胞扩增。进一步地, 使用高细胞浓度可允许更高效地捕获可能微弱表达所关注的靶抗原的细胞, 如CD28阴性T细胞。这类细胞群可具有治疗价值并且可期望在某些实施方案中获得。例如, 使用高浓度细胞允许更高效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0423] 在一些实施方案中, 可将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或介于其间的任何以小时计的整数值。在另一实施方案中, 可将混合物培养21天。在一个实施方案中, 将珠

粒和T细胞一起培养约八天。在另一实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养2-3天。也可能需要几个周期的刺激,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,最小基本培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15(Lonza)),其可含有增殖和成活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂,如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15和X-Vivo 20、优化剂,添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,不含血清或补充有适量的血清(或血浆)或确定的激素组,和/或足以使T细胞生长和扩增的量的一种或多种细胞因子。抗生素,例如青霉素和链霉素,仅包括在实验培养物中,而不包括在要输注到受试者中的细胞培养物中。在支持生长所需的条件,例如适当的温度(例如,37 $^{\circ}$ C)和气氛(例如,空气加5% CO₂)下维持靶细胞。暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如,典型的血液或单采血液成分术的外周血单核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制性T细胞群(TC,CD8)的辅助性T细胞群(TH,CD4⁺)。通过刺激CD3和CD28受体对T细胞进行的离体扩增在约第8-9天之前产生主要由TH细胞组成的T细胞群,而在约第8-9天之后,T细胞群包含越来越多的TC细胞群。因此,根据治疗目的,将主要包含TH细胞的T细胞群输注给受试者可能是有利的。类似地,如果已经分离出TC细胞的抗原特异性亚组,则将该亚组扩大至更大的程度可能是有益的。

[0424] 进一步地,除了CD4和CD8标志物之外,其它表型标志物也有显著差异,但在很大程度上,在细胞扩增过程中可重现。因此,这种可重现性使得能够为特定目的定制激活的T细胞产品。

[0425] 5.5. 多核苷酸

[0426] 在某些实施方案中,本公开提供了编码与CD19结合的单结构域抗体的多核苷酸和包含本文所述的与CD19结合的单结构域抗体的融合蛋白。本公开的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链(如果单链可以是编码链或非编码(反义)链)。在一些实施方案中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施方案中,多核苷酸是合成多核苷酸。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:43的序列的单结构域抗体的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:64。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:44的序列的单结构域抗体的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:65。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:45的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:46的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:47的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:48的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:49的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:51的序列的单结构域抗体的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:66。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:52的序列的单结构域抗体的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:67。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:53的

序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:54的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:55的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:56的序列的单结构域抗体的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:104的序列的单结构域抗体的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:106。

[0427] 在某些实施方案中,本公开提供了编码本文提供的CD19 CAR的多核苷酸。本公开的多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链或单链(如果单链可以是编码链或非编码(反义)链)。在一些实施方案中,多核苷酸是cDNA的形式。在一些实施方案中,多核苷酸是合成多核苷酸。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:57的序列的CAR的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:68。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:58的序列的CAR的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:69。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:59的序列的CAR的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:60的序列的CAR的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:61的序列的CAR的序列。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:62的序列的CAR的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:70。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:63的序列的CAR的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:71。在示例性实施方案中,本文提供的核酸分子包含编码具有SEQ ID NO:105的序列的CAR的序列。示例性核酸具有SEQ ID NO:107。

[0428] 本公开还涉及本文所述的多核苷酸的变体,其中所述变体编码例如本公开的结合CD19的单结构域抗体或CAR的片段、类似物和/或衍生物。在某些实施方案中,本公开提供了一种多核苷酸,所述多核苷酸包含具有与编码本公开的结合CD19的单结构域抗体或CAR的多核苷酸至少约75%同一、至少约80%同一、至少约85%同一、至少约90%同一、至少约95%同一并且在一些实施方案中至少约96%、97%、98%或99%同一的核苷酸序列的多核苷酸。如本文所用,短语“具有与参考核苷酸序列至少例如95%“同一”的核苷酸序列的多核苷酸”旨在表示该多核苷酸的核苷酸序列与参考序列是同一的,但该多核苷酸序列可包括最多五个点突变每100个参考核苷酸序列的核苷酸。换句话说,为了获得具有与参考核苷酸序列至少95%同一的核苷酸序列的多核苷酸,可以使参考序列中最多5%的核苷酸缺失或者将参考序列中最多5%的核苷酸用另一种核苷酸取代,或可以将占参考序列中总核苷酸最多5%的数目的核苷酸插入到参考序列中。参考序列的这些突变可以发生在参考核苷酸序列的5'或3'末端位置或这些末端位置之间的任何位置处,单独散布在参考序列中的核苷酸之间或散布在参考序列中的一个或多个连续基团中。

[0429] 多核苷酸变体可含有位于编码区、非编码区或两者中的改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失但不改变所编码多肽的性质或活性的改变。在一些实施方案中,多核苷酸变体包含不会引起多肽的氨基酸序列发生改变(由于遗传密码的简并性)的沉默取代。可以出于多种原因产生多核苷酸变体,例如,以优化特定宿主的密码子表达(即,将人mRNA中的密码子改变为细菌宿主(如大肠杆菌)偏好的密码子)。在一些实施方案中,多核苷酸变体在序列的非编码区或编码区中包含至少一个沉默突变。

[0430] 在一些实施方案中,产生多核苷酸变体以调节或改变所编码多肽的表达(或表达水平)。在一些实施方案中,生产多核苷酸变体以增加所编码多肽的表达。在一些实施方案中,生产多核苷酸变体以减少所编码多肽的表达。在一些实施方案中,与亲本多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有增加的所编码多肽的表达。在一些实施方案中,与亲本多核苷酸序列相比,多核苷酸变体具有减少的所编码多肽的表达。

[0431] 还提供了包含本文所述的核酸分子的载体。在一个实施方案中,可以将核酸分子掺入到重组表达载体中。本公开提供了包含本公开的核酸中的任何一种核酸的重组表达载体。如本文所用,术语“重组表达载体”意指经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且该载体在足以使该mRNA、蛋白质、多肽或肽在宿主细胞内表达的条件下与该细胞接触时,该构建体允许该细胞表达该mRNA、蛋白质、多肽或肽。本文所述的载体作为一个整体不是天然存在的;然而,该载体的各个部分可以是天然存在的。所描述的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,它们可以是单链或双链的、合成的或部分从天然来源获得的,并且可以含有天然、非天然或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的或非天然存在的核苷酸间键,或两种类型的键。非天然存在或改变的核苷酸或核苷酸间键不阻碍载体的转录或复制。

[0432] 在一个实施方案中,本公开的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括那些设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于这两者目的的载体,如质粒和病毒。该载体可选自由以下组成的组:pUC系列(Fermentas Life Sciences,Glen Burnie,Md.)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,Calif.)、pET系列(Novagen,Madison,Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,Calif.)。可以使用噬菌体载体,如 λ GT10、 λ GT11、 λ EMBL4和 λ NM1149、 λ ZapII(Stratagene)。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI01.2、pBI121、pBI101.3和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体,例如 γ 逆转录病毒载体。

[0433] 在一个实施方案中,使用例如Sambrook等人,同上和Ausubel等人,同上中描述的标准重组DNA技术制备重组表达载体。环状或线性的表达载体构建体可以被制备成含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可来源于例如ColE1、SV40、2 μ 质粒、 λ 、牛乳头状瘤病毒等。

[0434] 视情况而定并考虑载体是基于DNA还是基于RNA,重组表达载体可以包含调控性序列(诸如转录和翻译起始密码子和终止密码子),该调控性序列对载体将被引入到其中的宿主类型(例如,细菌、植物、真菌或动物)有特异性。

[0435] 重组表达载体可以包括一种或多种标志基因,该标志基因允许选择转化或转染的宿主。标志基因包括杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性;在营养缺陷型宿主中的用于提供原养型的互补(complementation),等等。用于所描述的表达载体的合适标志基因包括例如新霉素/G418抗性基因、组氨醇x抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0436] 重组表达载体可以包含与本公开的核苷酸序列可操作地连接的原生或规范启动

子。启动子(例如强启动子、弱启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子和发育特异性启动子)的选择在技术人员的普通技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技能范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、RSV启动子、SV40启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。

[0437] 重组表达载体可被设计用于瞬时表达、用于稳定表达或用于这两者目的。此外,重组表达载体可以被制备用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0438] 进一步地,重组表达载体可以被制备成包括自杀基因。如本文所用,术语“自杀基因”是指导致表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是这样的基因,该基因赋予表达该基因的细胞对剂(例如,药物)的敏感性,并且在该细胞与该剂接触或暴露于剂时导致该细胞死亡。自杀基因是本领域中已知的,并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0439] 在某些实施方案中,多核苷酸是经分离的。在某些实施方案中,多核苷酸是实质上纯的。

[0440] 还提供了包含本文所述的核酸分子的宿主细胞。宿主细胞可以是任何含有异源核酸的细胞。异源核酸可以是载体(例如,表达载体)。例如,宿主细胞可以是来自任何生物体的细胞,该细胞以任何方式被选择、修饰、转化、生长、使用或操纵,以由该细胞产生物质,例如由该细胞表达基因、DNA或RNA序列、蛋白质或酶。可以确定适当的宿主。例如,可基于载体骨架和所需结果来选择宿主细胞。举例来说,可以将质粒或粘粒引入到原核宿主细胞中以复制几种类型的载体。细菌细胞,如但不限于DH5 α 、JM109和KCB、SURE[®]感受态细胞和SOLOPACK Gold细胞,可用作用于载体复制和/或表达的宿主细胞。此外,细菌细胞如大肠杆菌LE392可用作噬菌体病毒的宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于酵母(例如,YPH499、YPH500和YPH501)、昆虫和哺乳动物。用于载体的复制和/或表达的哺乳动物真核宿主细胞的实例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、Saos、PC12、SP2/0(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, CRL-1581)、NS0(欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures, ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC号85110503)、F0(ATCC CRL-1646)和Ag653(ATCC CRL-1580)鼠细胞系。示例性人骨髓瘤细胞系是U266(ATCC CRL-TIB-196)。其它有用的细胞系包括源自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞系,如CHO-K1SV(Lonza Biologics, Walkersville, MD)、CHO-K1(ATCC CRL-61)或DG44。

[0441] 5.6. 药物组合物

[0442] 一方面,本公开进一步提供了药物组合物,其包含本公开的单结构域抗体、包含单结构域抗体的结合分子或治疗分子、或工程化免疫效应细胞。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的本公开的单结构域抗体、包含单结构域抗体的结合分子或治疗分子、或工程化免疫效应细胞和药学上可接受的赋形剂。

[0443] 在一些实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的本文提供的单结构域抗体和药学上可接受的赋形剂。

[0444] 在一些实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的包含本文提供的单结构域抗体的治疗分子(如融合蛋白、免疫缀合物和多特异性结合分子)和药学上可接受的赋形剂。

[0445] 在其它实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的包含本文提供的单结构域抗体的CAR和药学上可接受的赋形剂。

[0446] 在其它实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的本文提供的工程化免疫效应细胞和药学上可接受的赋形剂。

[0447] 在其它实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含例如在载体中的治疗有效量的本文提供的核酸,和药学上可接受的赋形剂,例如适用于基因疗法的药学上可接受的赋形剂。

[0448] 在具体的实施方案中,术语“赋形剂”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))、载剂或媒介物。药物赋形剂可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体赋形剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要的话,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放制剂等形式。Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.,Easton,PA中描述了合适的药物赋形剂的实例。这类组合物将含有防治或治疗有效量的本文提供的活性成分(诸如呈纯化形式的本文提供的活性成分),以及合适量的赋形剂,以便提供用于适当地施用给患者的形式。制剂应适合于施用方式。

[0449] 在一些实施方案中,赋形剂的选择部分地由特定细胞、结合分子和/或抗体,和/或施用方法决定。因此,有多种合适的制剂。

[0450] 通常,可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠在内的抗氧化剂;防腐剂、等渗剂、稳定剂、金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);螯合剂如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0451] 缓冲剂可被用于将pH值控制在优化治疗效果的范围内,特别是在稳定性取决于pH值的情况下。适用于本公开的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲剂可包含组氨酸和三甲胺盐,如Tris。

[0452] 可以添加防腐剂以阻止微生物生长。适用于本公开的防腐剂包括如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;卤化(例如,氯化、溴化、碘化)苯甲羟铵、氯化苄乙氧铵;硫柳汞、苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚。

[0453] 可以存在张力剂(有时称为“稳定剂”),以调节或维持组合物中液体的张力。当与大的带电荷的生物分子(如蛋白质和抗体)一起使用时,它们通常被称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电荷的基团相互作用,从而降低分子间和分子内相互作用的可能性。示例性张力剂包括多元糖醇,三元或更高级的糖醇,如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0454] 另外的示例性赋形剂包括:(1)填充剂,(2)溶解度增强剂,(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附到容器壁上的剂。这类赋形剂包括:多元糖醇(上面列举的);氨基酸,如丙氨酸、甘

氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等；有机糖或糖醇，如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌糖(myoinisitose)、肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇(例如，肌醇)、聚乙二醇；含硫还原剂，如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量蛋白质，如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其它免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；单糖(例如，木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖)；二糖(例如，乳糖、麦芽糖、蔗糖)；三糖，如棉子糖；以及多糖，如糊精或葡聚糖。

[0455] 可以存在非离子表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)，以帮助溶解治疗剂，并保护治疗性蛋白质免受搅拌诱导的聚集，这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不会导致活性治疗性蛋白质或抗体变性。合适的非离子表面活性剂包括例如聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯山梨醇单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)、聚桂醇400、硬脂酸聚炔氧40酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可使用的阴离子去污剂包括十二烷基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子去污剂包括苯扎氯铵或苜索氯铵。

[0456] 为了将药物组合物用于体内施用，它们优选是无菌的。可以通过无菌过滤膜过滤使药物组合物无菌。通常可将本文的药物组合物放到具有无菌进入端口的容器中，例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶中。

[0457] 施用途径是根据已知和公认的方法，如通过单次或多次团注(bolus)或以合适的方式长时间输注，例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径注射或输注，外用施用，吸入，或通过持续释放或延长释放方式施用。

[0458] 在另一实施方案中，药物组合物可以作为受控释放或持续释放系统提供。在一个实施方案中，可以使用泵来实现受控释放或持续释放(参见例如Sefton, Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201-40(1987);Buchwald等人,Surgery 88:507-16(1980);以及Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:569-74(1989))。在另一个实施方案中，聚合材料可用于实现本文提供的预防剂或治疗剂(例如，如本文所述的融合蛋白)或组合物的受控释放或持续释放(参见例如,Medical Applications of Controlled Release(Langer和Wise编著,1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance(Smolén和Ball编著,1984);Ranger和Peppas,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61-126(1983);Levy等人,Science 228:190-92(1985);During等人,Ann.Neurol.25:351-56(1989);Howard等人,J.Neurosurg.71:105-12(1989);美国专利号5,679,377、5,916,597、5,912,015、5,989,463和5,128,326;PCT公布号W0 99/15154和W0 99/20253)。用于持续释放制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方案中，用于持续释放制剂的聚合物是惰性的，不含可浸出杂质，储存稳定，无菌且可生物降解。在又一个实施方案中，受控或持续释放系统可以放置在特定靶组织，例如鼻部通道或肺的附近，因此只需要全身剂量的一小部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release第2卷,115-38(1984))。

例如Langer, Science 249:1527-33 (1990) 讨论了受控释放系统。本领域技术人员已知的任何技术都可用于产生包含一种或多种本文所述的剂的持续释放制剂(参见例如,美国专利号4,526,938;WO 91/05548和PCT公布号WO 96/20698;Ning等人, Radiotherapy&Oncology 39:179-89 (1996); Song等人, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97 (1995); Cleek等人, Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54 (1997); 以及Lam等人, Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60 (1997))。

[0459] 本文所述的药物组合物还可以含有正在被治疗的特定适用症所必需的多于一种活性化合物或剂。可替代地或另外地,组合物可包含细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。这类分子以有效达成预期目的的量适当地组合存在。

[0460] 活性成分还可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳液中。Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中公开了这类技术。

[0461] 各种组合物和递送系统是已知的,并且可以与本文提供的治疗剂一起使用,包括但不限于包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达本文提供的单结构域抗体或治疗分子的重组细胞中,构建作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸等。

[0462] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或防治有效量)的结合分子和/或细胞。在一些实施方案中,治疗或防治功效通过对所治疗的受试者的定期评估来监测。对于几天或更长时间内的重复施用(这取决于疾患),维持治疗直到疾病症状得到所需的抑制。然而,其它的给药方案是可用的,并且可以确定这些给药方案。

[0463] 5.7. 方法和用途

[0464] 在另一个方面,本文提供了包括抗CD19 VHH、嵌合抗原受体(CAR)和/或表达重组受体的工程化细胞在内的本文提供的CD19结合分子的使用方法和用途。

[0465] 5.7.1. 治疗方法和用途

[0466] 这类方法和用途包括例如涉及以下的治疗方法和用途:对患有表达CD19或与CD19表达相关和/或其中细胞或组织表达CD19的疾病、病状或病症的受试者施用所述分子、细胞或含有它们的组合物。在一些实施方案中,以有效实现所述疾病或病症的治疗的量施用所述分子、细胞和/或组合物。用途包括所述抗体和细胞在这类方法和治疗中的用途,以及在制备药物以实施这类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,通过对患有或怀疑患有所述疾病或病状的受试者施用所述抗体或细胞或包含它们的组合物来实施所述方法。在一些实施方案中,所述方法由此治疗所述受试者的疾病或病症。

[0467] 在一些实施方案中,本文提供的治疗使疾病或病症或与其相关的症状、副作用或结果或表型完全或部分改善或减轻。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓和症状、缩减疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或减缓疾病状态以及缓解或改进预后。该术语包括但不暗示疾病的完全治愈或任何症状的完全消除或对所有症状或结果的影响。

[0468] 如本文所用,在一些实施方案中,本文提供的治疗延迟疾病或病症的发展,例如延缓、阻碍、减慢、阻滞、稳定、抑制和/或推迟疾病(如癌症)的发展。这种延迟可能具有不同的

时间长度,这取决于病史和/或正在接受治疗的个体。正如本领域技术人员显而易见的,充分或显著的延迟实际上可涵盖预防,因为个体没有发展疾病或病症。例如,可以延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0469] 在其它实施方案中,本文提供的方法或用途预防疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是CD19相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述B细胞恶性肿瘤是B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是套细胞淋巴瘤(MCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是滤泡性淋巴瘤(FL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是伯基特淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性眼内淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是毛细胞白血病(HCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是前体B成淋巴细胞性白血病。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是高级B细胞淋巴瘤(HGBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是多发性骨髓瘤(MM)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是复发或难治性B细胞恶性肿瘤,如复发或难治性ALL(R/R ALL)。

[0470] 在其它实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性和炎性疾病,包括例如与不适当的或增高的B细胞数目和/或激活相关的那些。

[0471] 在一些实施方案中,所述方法包括过继细胞疗法,由此对受试者施用表达所提供的CD19靶向CAR的基因工程化细胞。这种施用可以按CD19靶向方式促进细胞的激活(例如,T细胞激活),使得所述疾病或病症的细胞被靶向破坏。

[0472] 在一些实施方案中,所述方法包括对受试者、组织或细胞(如患有所述疾病或病症、有患所述疾病或病症的风险或怀疑患有所述疾病或病症的受试者、组织或细胞)施用所述细胞或含有所述细胞的组合物。在一些实施方案中,例如经由过继细胞疗法(如过继T细胞疗法)对患有待治疗的特定疾病或病症的受试者施用所述细胞、群体和组合物。在一些实施方案中,对所述受试者(如患有所述疾病或病症或有患所述疾病或病症的风险的受试者)施用所述细胞或组合物。在一些实施方案中,所述方法由此治疗,例如改善所述疾病或病症的一种或多种症状,如通过减轻表达CD19的癌症中的肿瘤负担来治疗,例如改善所述疾病或病症的一种或多种症状。

[0473] 用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的,如例如以下文献中所描述:美国专利申请公布号2003/0170238;美国专利号4,690,915;Rosenberg,Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85(2011);Themeli等人,Nat Biotechnol.31(10):928-933(2013);Tsukahara等人,Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9(2013);和Davila等人,PLoS ONE 8(4):

e61338(2013)。这些方法可以与本文提供的方法和组合物结合使用。

[0474] 在一些实施方案中,通过自体转移进行细胞疗法(例如,过继T细胞疗法),其中从要接受细胞疗法的受试者或从来源于这种受试者的样品分离和/或以其他方式制备细胞。因此,在一些方面,该细胞来源于需要治疗的受试者,并且该细胞在分离和加工之后被施用给同一受试者。在其它实施方案中,通过同种异体转移进行细胞疗法(例如,过继T细胞疗法),其中从要接受或最终接受细胞疗法的受试者(例如,第一受试者)以外的受试者分离和/或以其它方式制备细胞。在这类实施方案中,然后对同一物种的不同受试者(例如,第二受试者)施用该细胞。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是类似的。在一些实施方案中,第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类别或超类型。

[0475] 在一些实施方案中,施用所述细胞、细胞群或组合物的受试者是灵长类动物,如人。受试者可以是男性或女性,并且可以是任意合适年龄的,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。在一些实施例中,受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果的经过验证的动物模型。

[0476] CD19结合分子如VHH和含有VHH的嵌合受体以及表达VHH的细胞可通过任意合适的方式施用,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下注射(subconjunctival injection)、结膜下注射(subconjunctival injection)、眼球筋膜下注射(sub-Tenon's injection)、眼球后注射、眼球周注射或后巩膜旁递送。在一些实施方案中,它们通过肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则通过病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0477] 可通过标准临床技术确定本文提供的防治或治疗剂的有效预防和/或治疗疾病或病状的量。可以由来源于体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线来外推有效剂量。对于疾病的预防或治疗,结合分子或细胞的适当剂量可取决于要治疗的疾病或病症的类型、结合分子的类型、疾病或病症的严重程度和病程、施用治疗剂是出于预防目的还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对剂的反应以及主治医师的判断。在一些实施方案中,一次或经一系列治疗将所述组合物、分子和细胞合适地施用给患者。

[0478] 例如,根据疾病的类型和严重程度,抗体的剂量可包括约10ug/kg至100mg/kg或更多。可以间歇地施用多个剂量。可以施用初始较高的负载剂量,接着是一个或多个较低的剂量。在其中所述药物组合物包含本文所述的任一种单结构域抗体的一些实施方案中,所述药物组合物以每天约10ng/kg直到约100mg/kg个体体重或更多的剂量,例如以约1mg/kg/天至10mg/kg/天施用,这取决于施用途径。文献中提供了关于特定剂量和递送方法的指导(参见例如美国专利号4,657,760、5,206,344和5,225,212号)。

[0479] 在含有结合分子的基因工程化细胞的背景下,在一些实施方案中,受试者可被施用约一百万至约1000亿个细胞和/或该量的细胞/千克体重。在其中药物组合物包含本文所述的工程化免疫细胞中的任何一种工程化免疫细胞的一些实施方案中,药物组合物以至少约 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或 10^9 个细胞/kg个体体重中的任一者的剂量施用。剂量可根据疾病或病症和/或患者和/或其它治疗的特定属性而变化。

[0480] 在一些实施方案中,单次施用药物组合物。在一些实施方案中,多次施用药物组合

物(如2、3、4、5、6次或更多次中的任一者)。在一些实施方案中,在给药周期中一次或多次施用药物组合物。给药周期可以是例如1、2、3、4、5周或更多周,或者1、2、3、4、5个月或更多个月。医学领域的技术人员可以通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗来确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0481] 在一些实施方案中,细胞或抗体作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗干预(如另一种抗体或工程化细胞或受体或剂,如细胞毒性剂或治疗剂)同时或按任何顺序依次施用。

[0482] 在一些实施方案中,细胞或抗体与一种或多种另外的治疗剂一起地或与另一种治疗干预相结合地同时或按任何顺序依次共同施用。在一些情形下,所述细胞与另一种疗法在时间上足够靠近地共同施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,反之亦然。在一些实施方案中,所述细胞或抗体在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用。在一些实施方案中,所述细胞或抗体在所述一种或多种另外的治疗剂之后施用。

[0483] 在某些实施方案中,一旦对哺乳动物(例如,人)施用所述细胞,则通过多种已知方法中的任何一种已知方法测量工程化细胞群和/或抗体的生物活性。用于评估的参数包括工程化或天然T细胞或其它免疫细胞与抗原在体内(例如,通过成像)或离体(例如,通过ELISA或流式细胞术)的特异性结合。在某些实施方案中,可使用本领域中已知的任何合适的方法(如在例如Kochenderfer等人, *J. Immunotherapy*, 32(7):689-702(2009)和Herman等人 *J. Immunological Methods*, 285(1):25-40(2004)中描述的细胞毒性测定法)来测量工程化细胞破坏靶细胞的能力。在某些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量所述细胞的生物活性。在一些方面,通过评估临床结果如肿瘤负担或负荷的减少来测量生物活性。

[0484] 在一些具体实施方案中,本文提供了治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括对受试者施用结合分子,所述结合分子包含如上文第5.2节中所述的与CD19结合的单结构域抗体,包括例如具有表2中的CDR的那些,包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列的那些;和包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的那些。在一些实施方案中,所述疾病或病症是CD19相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述B细胞恶性肿瘤是B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是套细胞淋巴瘤(MCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)。在另一具体实施方案中,所述

疾病或病症是滤泡性淋巴瘤(FL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是伯基特淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性眼内淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是毛细胞白血病(HCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是前体B成淋巴细胞性白血病。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是高级B细胞淋巴瘤(HGBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是多发性骨髓瘤(MM)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是复发或难治性B细胞恶性肿瘤,如复发或难治性ALL(R/R ALL)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性和炎性疾病,包括例如与不适当的或增高的B细胞数目和/或激活相关的那些。

[0485] 在其它实施方案中,本文提供了治疗疾病或病症的方法,其包括对受试者施用如第5.4节中提供的工程化免疫效应细胞(如T细胞),包括例如第5.3节中提供的包含CAR的细胞。在一些实施方案中,对受试者施用的工程化免疫细胞包含CAR,所述CAR包含多肽,所述多肽包含:(a)包含抗CD19 sdAb的细胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域,其中所述抗CD19 sdAb如上文第5.2节中所述,包括例如具有表2中的CDR的那些,包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104的氨基酸序列的那些;和包含与SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:104具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的那些。在一些实施方案中,对受试者施用的工程化免疫细胞包含CAR,所述CAR包含选自SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列;或包含与选自SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:105组成的组的氨基酸序列具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,所述疾病或病症是CD19相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述B细胞恶性肿瘤是B细胞白血病或B细胞淋巴瘤。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是边缘区淋巴瘤(例如,脾边缘区淋巴瘤)。在具体的实施方案中,所述疾病或病症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是套细胞淋巴瘤(MCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是B细胞幼淋巴细胞性白血病(B-PLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是滤泡性淋巴瘤(FL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是伯基特淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是原发性眼内淋巴瘤。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是慢性淋巴细胞性白

血病(CLL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是毛细胞白血病(HCL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是前体B成淋巴细胞性白血病。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是高级B细胞淋巴瘤(HGBL)。在另一具体实施方案中,所述疾病或病症是多发性骨髓瘤(MM)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是复发或难治性B细胞恶性肿瘤,如复发或难治性ALL(R/R ALL)。在其它实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性和炎性疾病,包括例如与不适当的或增高的B细胞数目和/或激活相关的那些。

[0486] 5.7.2. 诊断和检测方法及用途

[0487] 另一方面,本文提供涉及使用本文提供的结合分子,例如结合CD19的VHH和含有这类VHH的分子(如缀合物和复合物)的方法,其用于如通过检测CD19和/或它的由所述抗体识别的表位的存在来检测、预后、诊断、分期、确定特定治疗与一种或多种组织或细胞类型的结合以及/或者告知对受试者的治疗决定。

[0488] 在一些实施方案中,提供了用于诊断或检测方法的抗CD19抗体(如本文所述的任一种抗CD19单结构域抗体)。另一方面,提供了检测生物样品中CD19存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括检测生物样品中CD19蛋白的存在。在某些实施方案中,CD19是人CD19。在一些实施方案中,所述方法是与表达CD19的疾病或病症相关的诊断和/或预后方法。所述方法在一些实施方案中包括将生物样品与所述抗体一起温育以及/或者用所述抗体探测所述生物样品以及/或者将所述抗体施用给受试者。在某些实施方案中,生物样品包括细胞或组织或其部分,如肿瘤或癌组织或其活检或切片。在某些实施方案中,接触是在允许抗CD19抗体与样品中存在的CD19结合的条件下进行的。在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测抗CD19抗体与样品中的CD19之间是否形成复合物,如检测这种结合的存在或不存在或水平。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,抗CD19抗体被用于选择有资格用抗CD19抗体或工程化抗原受体治疗的受试者,例如其中CD19是用于选择患者的生物标志物。

[0489] 在一些实施方案中,使样品如细胞、组织样品、溶解产物、组合物或源自它们的其它样品与抗CD19抗体接触,并确定或检测所述抗体与样品(例如,样品中的CD19)之间的结合或复合物的形成。当与相同组织类型的参考细胞相比证实或检测到测试样品中的结合时,可能表明存在相关疾病或病症,和/或含有抗体的治疗剂将特异性结合于与该组织或细胞或样品来源的其它生物物质相同或类型相同的组织或细胞。在一些实施方案中,样品来自人体组织,并且可以来自病变组织和/或正常组织,例如来自患有要治疗的疾病或病症的受试者和/或来自与这种受试者相同物种但未患要治疗的疾病或病症的受试者。在一些情况下,正常组织或细胞来自患有要治疗的疾病或病症的受试者,但本身不是病变细胞或组织,如来自与给定受试者中存在的癌症相同或不同器官的正常组织。

[0490] 可以使用本领域已知的用于检测特异性抗体-抗原结合的各种方法。示例性免疫测定包括荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、浊度抑制免疫测定(NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。可以使用指示物部分或标记基团以满足该方法的各种用途的需要,这些用途通常由测定设备的可用性和相容的免疫测定程序决定。示例性标记包括放射性核素(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P 和/或铬(^{51}Cr)、钴

(⁵⁷Co)、氟(¹⁸F)、钆(¹⁵³Gd、¹⁵⁹Gd)、锗(⁶⁸Ge)、钬(¹⁶⁶Ho)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、碘(¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、镧(¹⁴⁰La)、镥(¹⁷⁷Lu)、锰(⁵⁴Mn)、钼(⁹⁹Mo)、钯(¹⁰³Pd)、磷(³²P)、镨(¹⁴²Pr)、钷(¹⁴⁹Pm)、铼(186Re、188Re)、铑(105Rh)、钌(97Ru)、钐(¹⁵³Sm)、钪(⁴⁷Sc)、硒(⁷⁵Se)、(⁸⁵Sr)、硫(³⁵S)、锝(⁹⁹Tc)、钛(²⁰¹Ti)、锡(¹¹³Sn、¹¹⁷Sn)、氦(3H)、氙(¹³³Xe)、镱(¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb)、钇(⁹⁰Y)、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶或β-半乳糖苷酶)、荧光部分或蛋白质(例如,荧光素、罗丹明、藻红蛋白、GFP或BFP)或发光部分(例如,由Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif.提供的Qdot™纳米颗粒)。用于进行上述各种免疫测定的各种通用技术是已知的。

[0491] 在某些实施方案中,提供了标记的抗体(如抗CD19单结构域抗体)。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记)以及间接检测(例如,通过酶促反应或分子相互作用)的部分,如酶或配体。在其它实施方案中,抗体没有被标记,并且可以使用与任何抗体结合的标记的抗体来检测其存在。

[0492] 5.8. 试剂盒和制品

[0493] 进一步提供了包含本文所述的单结构域抗体、嵌合抗原受体或工程化免疫效应细胞中的任一者的试剂盒、单位剂量和制品。在一些实施方案中,提供了含有任一种本文所述的药物组合物并优选提供其使用说明书的试剂盒。

[0494] 本申请的试剂盒采用合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装(例如,密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。试剂盒可任选提供另外的组成部分,如缓冲剂和解释性信息。本申请因此还提供了制品,该制品包括小瓶(如密封小瓶)、瓶子、广口瓶、软包装等。

[0495] 制品可包括容器和位于容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。所述容器可由诸如玻璃或塑料的各种材料制成。通常,容器装有有效治疗本文所述的疾病或病症(如癌症)的组合物,并且可具有无菌进入端口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装插页指示组合物用于治疗个体的特定病状。标签或包装插页将进一步包括对个体施用组合物的说明。标签可指示关于重构和/或使用的指导。容纳药物组合物的容器可以是多用途小瓶,该小瓶允许经重构制剂的重复施用(例如2-6次施用)。包装插页是指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,该说明书含有关于使用这类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。此外,制品可进一步包括第二容器,该第二容器包含药学上可接受的缓冲液,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。制品可进一步包括在商业和使用者看来所需的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0496] 试剂盒或制品可包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明书,其以足以在药房例如医院药房和配制药房中储存和使用的量包装。

[0497] 为了简明起见,本文使用某些缩写。一个实例是代表氨基酸残基的单字母缩写。氨基酸及其对应的三字母和单字母缩写如下:

[0498]	氨基酸	三字母	单字母	氨基酸	三字母	单字母
	丙氨酸	Ala	(A)	亮氨酸	Leu	(L)
	精氨酸	Arg	(R)	赖氨酸	Lys	(K)

天冬酰胺	Asn	(N)	甲硫氨酸	Met	(M)
天冬氨酸	Asp	(D)	苯丙氨酸	Phe	(F)
半胱氨酸	Cys	(C)	脯氨酸	Pro	(P)
谷氨酸	Glu	(E)	丝氨酸	Ser	(S)
谷氨酰胺	Gln	(Q)	苏氨酸	Thr	(T)
甘氨酸	Gly	(G)	色氨酸	Trp	(W)
组氨酸	His	(H)	酪氨酸	Tyr	(Y)
异亮氨酸	Ile	(I)	缬氨酸	Val	(V)

[0499] 本公开在本文中通常使用肯定性语言来描述众多实施方案来公开。本公开还具体包括全部或部分排除特定主题,例如物质或材料、方法步骤和条件、方案、程序、测定或分析的实施方案。因此,即使本公开在本文中通常未根据本公开不包括的内容来表达,但未明确包括在本公开中的方面仍然在本文中公开。

[0500] 已经描述了本公开的多个实施方案。然而,将要理解的是,在不脱离本公开的实质和范围的情况下可以进行各种修改。因此,以下实施例旨在说明但不限制权利要求中描述的公开范围。

[0501] 6. 实施例

[0502] 以下是对研究中使用的各种方法和材料的描述,并且是为了为本领域普通技术人员提供如何进行和使用本公开的完整公开和描述而提供的,并且不旨在限制发明人认为是其公开的范围,也不旨在表示执行了以下实验以及以下实验是可以执行的所有实验。要理解的是,不一定执行以现在时态撰写的示例性描述,而是可以执行这些描述以产生与本公开的教导相关联的数据等。已经努力确保关于所使用的数值(例如,量、百分比等)的准确性,但要考虑一些实验误差和偏差。

[0503] 6.1. 实施例1—抗CD19 VHH的制备

[0504] 为了开发对CD19抗原具有高结合亲和力的VHH,用人CD19蛋白使骆驼免疫。然后构建噬菌体展示文库以筛选VHH前导序列。基于特异性结合挑选出独特的克隆,并将其根据VHH互补决定区(CDR),特别是扩大抗原识别谱系和结合的CDR3进行排名。

[0505] 6.1.1. 细胞系构建

[0506] 按照下面简要描述的方法在内部开发K562.huCD19.Luc细胞系。合成人CD19编码序列(NM_001770.5)并将其亚克隆到pLVX-puro(Clontech,目录号632164)中的EcoRI与BamHI限制位点之间以获得质粒pLVX-huCD19.Luc.Puro。通过用含有psPAX2、pMD.2G和pLVX-huCD19.Luc.Puro的质粒的混合物瞬时转染Lenti-X 293T宿主细胞来包装慢病毒。通过用100 μ L的LV-huCD19.Luc.Puro慢病毒感染来转导 0.5×10^6 个K562细胞(ATCC#CRL-243)。每2-3天用嘌呤霉素选择培养基(补充有10% FBS和5 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI1640)选择和产生转导的K562.huCD19.Luc细胞。3轮选择后,通过离心收获细胞池。将收获的细胞等分并冷冻保存以备进一步使用。

[0507] 使用PE缀合的抗人CD19抗体(Miltenyi Biotec,目录号130-105-086)通过流式细胞术验证人CD19在K562.huCD19.Luc细胞系中的表达。简言之,将 2×10^5 个K562.huCD19.Luc细胞或K562细胞与PE缀合的抗人CD19抗体一起在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟,接着洗涤三次,并重悬于200 μ L含0.5% FBS的DPBS中,以在Attune NXT流式细胞术(Thermo

Fisher) 中进行FACS分析以检测人CD19抗原的表达水平。K562.huCD19.Luc的平均荧光强度(MFI)是K562细胞(阴性对照)的243.06倍。

[0508] 6.1.2. 动物免疫和免疫反应测试

[0509] 用人CD19蛋白(ACRO, 目录号CD9-H52H2)对一头成年雄性骆驼(双峰驼)间隔两周进行五次皮下免疫。在免疫前日(Pre)和最后免疫日(TB)收集血液。通过ELISA评估骆驼的免疫反应,其中测试了血清样品与固定化抗原之间的结合。在向动物注射CD19抗原后诱导了强烈的免疫反应,且血清滴度达到 $>1:243k$ 。此数据表明用CD19抗原免疫显著增加了抗体滴度。

[0510] 在最后免疫后三至五天,从颈静脉收集100mL血液作为生产性放血(production bleed)。根据淋巴细胞制备(lymphoprep)程序从血液中分离外周血淋巴细胞(PBL)。

[0511] 6.1.3. 抗体噬菌体文库构建

[0512] 根据制造商说明使用TRIZOL[®]试剂(Thermofisher, 目录号15596026)从分离的淋巴细胞中提取总RNA,并根据制造商方案使用PrimeScript[™]第1链cDNA合成试剂盒(Takara, 目录号6110A)用寡(dT)₂₀引物逆转录成cDNA。设计正向和反向特异性简并引物(参见中国专利CN105555310B)来扩增VHH片段,其中引入了两个SfiI限制位点。通过采用两步聚合酶链式反应(PCR)扩增VHH片段,并将第二PCR产物用SfiI消化并进行凝胶纯化,然后插入到噬菌粒载体-pFL249中,将该噬菌粒载体电转移到大肠杆菌细胞中以产生噬菌体展示VHH免疫文库。

[0513] 将一小部分转化的细胞稀释,并在补充有100 μ g/mL氨苄青霉素的2 \times YT板上划线。对菌落进行计数以计算文库大小。随机挑选阳性克隆并对该阳性克隆进行测序以评估文库的质量。将剩余的转化细胞划线到补充有100 μ g/mL氨苄青霉素和2%葡萄糖的245-mm平方的2 \times YT-琼脂培养皿上。从培养皿上刮下菌落的菌苔。将一小等份细胞用于文库质粒分离。然后给剩余的细胞补充甘油,并将其在-80 $^{\circ}$ C下作为储备液储存。

[0514] 6.1.4. 噬菌体展示淘选

[0515] 在用辅助噬菌体感染后,产生了在表面上展示VHH结构域作为基因III融合蛋白的重组噬菌体颗粒。根据标准方法制备噬菌体颗粒,并将该噬菌体颗粒在4 $^{\circ}$ C下过滤灭菌后储存用于进一步研究。噬菌体文库用于不同的淘选策略。在第一轮和第二轮淘选中,将生物素化的人CD19抗原(用Sulfo-NHS-LC-Biotin试剂盒进行标记的生物素)与噬菌体文库一起温育,随后在链霉亲和素Dynabead (Invitrogen)上捕获。接着进行充分洗涤,用三乙胺洗脱结合的噬菌体。经过两轮淘选后,观察到噬菌体富集。

[0516] 6.1.5. ELISA筛选

[0517] 接种单个文库克隆,并诱导该单个文库克隆在96孔深孔板中表达。进行ELISA筛选以筛选特异性识别人CD19抗原的VHH克隆。

[0518] 为了鉴定与抗原特异性细胞-K562.huCD19.Luc细胞结合的VHH克隆,将K562.huCD19.Luc细胞和K562.Luc细胞(阴性对照)在室温下用3% BSA缓冲液封闭1小时。从输出文库中随机挑选单个克隆,并将其在96深孔板中培养。当细菌培养物的OD600达到0.6-0.8时,添加IPTG以诱导表达过夜。通过离心收集细菌,然后在微孔板中接种。

[0519] 选择本公开的示例性抗CD19 VHH结构域(即,VHH-083、VHH-111、VHH-131、77LICA542、77LICA519、77LICA602、LIC1157和LIC1159)并对其进行测序。CDR(例如,如

Kabat或IMGT编号方案所定义)和VHH序列汇总于表2和本文提供的序列表中。

[0520] 6.2. 实施例2-VHH嵌合受体多肽的构建和免疫细胞表达

[0521] 6.2.1. CD19 VHH CAR的构建

[0522] 化学合成编码从N-末端到C-末端包含CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD137细胞质结构域和CD3 ζ 细胞质结构域的CAR主链多肽的核酸序列,并将其克隆到下游的预修饰慢病毒载体中,并与hEF1 α 启动子可操作地连接。该载体中的多克隆位点(MCS)允许插入包含Kozak序列(GCCGCCACC(SEQ ID NO:78))的核酸序列,且上游与CAR主链序列可操作地连接,所述Kozak序列与编码与一个或多个VHH片段的N-末端融合的CD8 α 信号肽的核酸序列可操作地连接)。

[0523] 为了使用CAR主链载体构建基于单价VHH的CAR,将编码抗CD19 VHH结构域的核酸序列与编码Kozak-CD8 α 信号肽的核酸序列的3'可操作地连接。化学合成融合核酸序列,并将其通过本领域中已知的分子克隆技术经由EcoRI(5'-GAATTC-3'(SEQ ID NO:97))和SpeI(5'-ACTAGT-3'(SEQ ID NO:98))限制位点克隆到CAR主链中。

[0524] 示例性CD19 VHH CAR构建体列于表5中。抗CD19 scFv(FMC63 scFv)(SEQ ID NO:99)构建体也被克隆到CAR主链中作为阳性对照,并且也列于表5中。

[0525] 表5. 示例性CD19 CAR构建体

示例性 CAR 代码	氨基酸序列	信号肽	细胞外抗原结合结构域	铰链和 TM	共刺激信号传导结构域	初级细胞内信号传导结构域
[0526] VHH-083 CAR	SEQ ID NO: 57	CD8 α	VHH-083	CD8 α	CD137	CD3 ζ
VHH-111 CAR	SEQ ID NO: 58	CD8 α	VHH-111	CD8 α	CD137	CD3 ζ

示例性 CAR 代码	氨基酸序列	信号肽	细胞外抗原结合结构域	铰链和 TM	共刺激信号传导结构域	初级细胞内信号传导结构域
[0527] VHH-131 CAR	SEQ ID NO: 105	CD8 α	VHH-131	CD8 α	CD137	CD3 ζ
CD19 scFv CAR	SEQ ID NO: 100	CD8 α	FMC63 scFv	CD8 α	CD137	CD3 ζ

[0528] VHH-083CAR、VHH-111CAR和VHH-131CAR的核酸序列分别为SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:107,如序列表中所示。在这些示例性CAR构建体中,来源于CD8 α 的信号肽具有SEQ ID NO:72的氨基酸序列;来源于CD8 α 的铰链具有SEQ ID NO:73的氨基酸序列;来源于CD8 α 的跨膜结构域具有SEQ ID NO:74的氨基酸序列;来源于CD137的共刺激信号传导结构域具有SEQ ID NO:75的氨基酸序列;且来源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

[0529] 6.2.2. 慢病毒载体的包装

[0530] 将含有pMDLg.pRRE(Addgene,#12251)、pRSV-REV(Addgene,#12253)和pMD2.G(Addgene,#12259)的慢病毒包装质粒混合物与表达CAR构建体的载体以预优化比率与聚醚

酰亚胺(PEI)预混合。然后将转染混合物滴加到HEK293T细胞中并轻轻混合,接着在6-8小时后更换培养基。在48小时和72小时收集含有病毒的上清液,然后将其在4℃下以3000g离心10分钟。慢病毒浓缩后,小心弃去上清液,并用D10培养基(DMEM、10% FBS、1mM丙酮酸钠和2mM L-谷氨酰胺)重悬病毒颗粒。将收获的病毒等分,并立即在-80℃下储存。通过CHO哺乳动物细胞转导效率评估和测定病毒滴度。CD19 CAR的LV滴度达到 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 的范围内。

[0531] 6.2.3. T细胞分离和激活

[0532] 从健康供体中收集人PBMC。使用Miltenyi Pan T细胞分离试剂盒(目录号130-096-535),根据如下所述制造商方案从PBMC中纯化人T细胞。对细胞数目进行计数,并将细胞悬液在4℃下以300g离心10分钟。然后吸出上清液,并将细胞团块重悬于每 10^7 个总细胞40μL的缓冲液中。每 10^7 个总细胞添加10μL的Pan T细胞生物素-抗体混合液,充分混合,并在4℃下温育5分钟。然后每 10^7 个总细胞添加30μL缓冲液。每 10^7 个细胞添加20μL的Pan T细胞微珠混合液。将细胞悬浮液混合物充分混合,并在4℃下再温育10分钟。磁分离需要500μL的最小体积(vol.)。在磁分离中,将LS柱置于合适的MACS分离器的磁场中。将LS柱用3mL缓冲液冲洗。然后将细胞悬液施加到柱上,并收集含有未标记细胞的流出物,这些细胞代表富集的T细胞级分。通过用3mL缓冲液洗涤柱并收集通过的未标记细胞来收集另外的T细胞。这些未标记的细胞再次代表了富集的T细胞,并将这些未标记的细胞与来自前一步骤的流出物组合在一起。然后将汇集的富集T细胞离心,并用T细胞培养基(RPMI1640、10%热灭活胎牛血清(FBS)和300IU/mL的IL-2)重悬。根据制造商方案,通过在T细胞培养基中添加抗CD3/CD28 MACSiBead颗粒(Miltenyi,目录号130-111-160)来激活新鲜分离的T细胞。

[0533] 6.2.4. CD19 VHH CAR-T细胞的产生

[0534] 基于通过RNA电穿孔产生并通过体外测定筛选的CD19 CAR-T细胞的初步结果,通过慢病毒转导选择、设计并产生CD19 CAR-T细胞以用于人原代T细胞中的功效分析。另外,将CD19 scFv CAR-T细胞作为阳性对照评估。将激活的T细胞以24孔板每孔 0.5×10^6 个在0.5mL培养基中的细胞培养。24小时后,当T细胞成为母细胞(blasting)时,添加0.5mL非浓缩或更少体积的浓缩病毒上清液;并通过在32℃下以1200g离心1.5小时,以15的感染复数(MOI)转导T细胞。然后将经转导的细胞转移到细胞培养物温育箱中,以用于在合适的条件下进行转基因表达。T细胞开始以对数生长模式分裂,这通过测量细胞数目(能成活的细胞/每mL)和成活率(%)来进行监测。每两天给T细胞培养物补充新鲜培养基。随着T细胞在大约7-9天后开始静息,它们就准备好了被收获并被冷冻保存以供以后分析。

[0535] 在冷冻保存之前,通过流式细胞术分析确定经转导的细胞(在T细胞表面上表达VHH结构域或scFv结构域)的百分比。将T细胞用LIVE/DEAD™可固定死细胞染色试剂盒(Invitrogen,目录号L34976)染色,将基于VHH的CAR-T细胞用山羊抗美洲驼IgG FITC缀合物(Bethyl,目录号A160-100F)染色,并将基于scFv的CAR-T细胞用FITC标记的重组蛋白L(Acro,目录号RPL-PF141)在4℃下染色30分钟,接着洗涤三次,并重悬于200μL含0.5% FBS的DPBS中,用于在NovoCyte流式细胞仪(ACEA Biosciences)上进行FACS分析。通过Novoexpress软件分析FACS数据。

[0536] 转导后九天,示例性的基于VHH的CAR-T细胞的CAR+表达水平(%)达到大约18%~27%(见图1)。使CD19 VHH CAR-T细胞扩增约50~70倍。CD19 VHH CAR-T细胞培养物的细胞

计数和成活率(92%~98%)表明,当与未经转导的T细胞(UnT)相比时,所述一种或多种VHH对T细胞增殖和扩增的能力没有可检测到的负面影响,如表6中所示。

[0537] 表6. CD19 CAR-T细胞的成活率和扩增

[0538] 示例性 CAR-T 细胞代码	CAR 阳性率 (CAR+ %)	细胞培养物(第 9 天)	
		成活率 (%)	扩增倍数
VHH-083 CAR-T 细胞	27.09	92	70
VHH-111 CAR-T 细胞	18.44	93.5	52
CD19 scFv CAR-T 细胞	15.55	97.7	62

[0539] 6.3. 实施例3-体外表达CD19嵌合受体多肽的免疫细胞的表征

[0540] 6.3.1. CD19、CD20和CD22抗原在细胞表面上的表达

[0541] 为了评价CD19、CD20和CD22在所评估的靶细胞表面上的表达水平,将每孔 5×10^5 个细胞分别与PE标记的抗CD19、抗CD20和抗CD22 mAb (BioLegend, 分别为目录号302208、目录号302306和目录号302506)一起温育,并用QUANTI-BRITE PE珠 (BD Bioscience, 目录号340495)通过流式细胞术进行评估。按照制造商的说明进行测定和数据分析。“每个细胞的受体数目”表示指示的细胞系中的每个细胞系上每个细胞的分子的近似绝对数目,并且示于表7中。

[0542] 表7. 每个靶细胞的CD19、CD20和CD22受体数目

[0543] 细胞系	每个细胞的 CD19 受体数目	每个细胞的 CD20 受体数目	每个细胞的 CD22 受体数目
K562.Luc	<10	<10	<50
K562-CD19.Luc	189789	不适用	不适用
K562-CD20.Luc	<10	28303	不适用
K562-CD22.Luc	<10	不适用	93339
Raji.Luc	77641	132614	34854
Daudi.Luc	49158	247729	39586
Nalm.6.Luc	32773	<10	10441

[0544] 6.3.2. CD19 CAR-T细胞的功效评价

[0545] 为了评估CD19 VHH CAR-T细胞对肿瘤细胞的细胞毒性,对如上所述的那样产生的细胞进行计数,并将该细胞与抗原特异性癌细胞共培养以读出杀伤效力。对照CD19 scFv CAR-T细胞用于所有测定中以比较测定差异和/或用作内部对照。将未经转导的T细胞(UnT)用作非靶向T细胞对照。针对CD19阳性细胞系-人淋巴瘤细胞系Raji (ATCC, #CCL-86)、Daudi (ATCC#CCL-213)、Nalm.6 (ATCC#CRL-3273)和K562-CD19(稳定过表达CD19基因)以及CD19阴性细胞系-K562-CD20(稳定过表达CD20基因)、K562-CD22(稳定过表达CD22基因)和K562 (ATCC#CCL-243)进行CAR-T细胞杀伤测定。所有细胞系都被工程化成表达作为细胞成活率/杀伤的报告子的萤火虫荧光素酶。用嘌呤霉素选择经转导的细胞,并且每2-3天用选择培养

基(补加有10% FBS和2 μ g/mL嘌呤霉素的伊格尔最低必需培养基)进行更新。在3轮选择后,收获选择的细胞克隆,并将其保存以供进一步使用以15:1、10:1、5:1或2:1的效应细胞与靶细胞比率(E:T)持续24小时测量CD19 VHH CAR-T细胞的细胞毒性。通过将相应数目的T细胞与恒定数目的靶细胞混合来启动测定。通过ONE-Glo荧光素酶测定(Promega,目录号E6110)评估每孔剩余的荧光素酶活性,以定量每孔剩余的能成活的靶细胞。

[0546] 构建CD19 VHH CAR-T细胞,并通过体外细胞毒性测定对这些细胞进行筛选。结果显示CD19 VHH CAR-T细胞对Raji.Luc、Daudi.Luc、Nalm.6.Luc和K562-CD19.Luc细胞表现出不同水平的细胞毒性(参见如图2A-2D中所示的示例性数据)。与UnT对照相比,没有检测到CD19 VHH CAR-T细胞对阴性细胞系有显著的细胞毒性作用(图2E-2G和图3E-3I)。

[0547] 一种示例性CD19 VHH CAR-T细胞(VHH-083CAR-T细胞)比CD19 scFv CAR-T细胞对Raji.Luc的效力低,并且它对Daudi.Luc、Nalm.6.Luc和K562-CD19的效力与CD19 scFv CAR-T细胞相当(图3A-3D)。一种示例性CD19 VHH CAR-T细胞(VHH-131CAR-T细胞)比CD19 scFv CAR-T细胞对Daudi.Luc和K562-CD19.Luc的效力高(见图3F-3G)。所有CD19 VHH CAR-T细胞和CD19 scFv CAR-T细胞对中靶细胞都显示出剂量依赖性杀伤作用(见图3A和3F)。

[0548] 观察结果表明,本文提供的CD19 VHH CAR经由特异性识别CD19表达细胞来诱导T细胞激活,激活T细胞内源性信号传导通路,诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的激活,并增强抗肿瘤反应。

[0549] 6.3.3.CD19 CAR-T细胞的IFN- γ 释放评价

[0550] 为了测量CD19 VHH CAR-T细胞响应于CD19表达细胞的细胞因子产生,将CAR-T细胞与CD19阳性细胞系-Raji.Luc、Daudi.Luc或Nalm.6.Luc或CD19阴性细胞系-K562-CD20.Luc或K562-CD22.Luc以15:1、10:1、5:1或2:1的E:T比率一起共培养24小时,之后收获培养基用于使用人IFN- γ 试剂盒(Cisbio,目录号62HIFNGPEG)的细胞因子分析以进行细胞因子定量。通过多模式微板读数器(Tecan Spark)读取每个孔的吸光度(每个测试制品重复三次)。

[0551] IFN- γ 释放数据显示,示例性CD19 VHH CAR-T细胞(VHH-083CAR-T细胞)在与Raji.Luc(E:T=15:1或10:1)一起共培养时比CD19scFv CAR-T细胞产生多得多的IFN- γ (参见图4C中所示的示例性数据),并且在与Daudi.Luc和Nalm.6.Luc一起共培养时,也比CD19 scFv CAR-T细胞产生更多的IFN- γ (参见图4A-4B)。相比之下,IFN- γ 释放在含有未经转导的T细胞或阴性对照细胞K562-CD20.Luc和K562-CD22.Luc的培养物中检测不到或者极低(参见图4C),证实CAR-T细胞的CD19特异性是对CD19表达细胞的反应性所必需的。

[0552] 6.4.实施例4-CD19 VHH CAR-T细胞在肿瘤异种移植小鼠中的体内功效

[0553] 在Raji异种移植NCG小鼠模型中对产生的CD19 VHH CAR-T细胞的抗肿瘤活性进行体内评估,并将CD19 scFv CAR-T细胞和未经转导的细胞(UnT)作为对照进行评价。

[0554] 细胞系:Raji(ATCC#CCL-86)是淋巴母细胞样细胞系,是Pulvertaft在1963年由11岁男性的伯基特淋巴瘤建立的。使Raji细胞在含有10%胎牛血清的RMPI培养基中生长。此细胞系在组织培养瓶中悬浮生长。当被静脉内植入时,此细胞系在小鼠中持续存在并扩增。Raji细胞已被修饰成表达荧光素酶,使得肿瘤细胞生长也可以通过对小鼠进行成像来监测。Raji模型内源性地表达高水平的CD19、CD20和CD22,并且因此可用于测试CD19导向的工程化T细胞的体内功效。

[0555] 小鼠:5-6周龄的NCG(NOD-Prkdcem26Cd52I12rgem26Cd22/Nju)雌性小鼠由南京大学的模型动物研究中心提供,体重相似(大约20g)。在实验之前使动物在动物设施中适应7天。按照ACUC条例和指南处置动物。

[0556] 6.4.1. CD19 VHH CAR-T细胞功效的体内测试和结果

[0557] 为了产生肿瘤异种移植物,给NCG小鼠静脉内注射Raji.Luc。在Raji.Luc肿瘤细胞植入后4天用T细胞处理小鼠。经由尾静脉给小鼠静脉内注射400 μ L的T细胞,剂量为每只小鼠 1×10^6 个T细胞。将每组中的四只小鼠用CD19 VHH CAR-T细胞或CD19 scFv CAR-T细胞处理,将400 μ L单独的HBSS和未经转导的T细胞(UnT)用作对照。所有T细胞均由同一供体平行制备。每周两次监测动物健康状态,包括体重测量。每周通过生物发光成像(BLI)监测肿瘤生长,直到动物达到终点。

[0558] 未接受任何T细胞的HBSS处理组(媒介物)在经静脉内注射的NCG小鼠中展现出基线Raji肿瘤生长动力学。UnT处理组接受非经转导的T细胞作为工程化T细胞的阴性对照。HBSS和UnT处理组在此项研究的整个过程中都展现出持续的侵袭性肿瘤进展,并在第16天被安乐死。当与UnT处理相比时,VHH-083CAR-T细胞显著抑制肿瘤生长,并且在35天的体内功效研究期间表现出完全的肿瘤抑制,如由平均生物发光和生物发光的图像所指示的(参见图5A和5B)。此外,在整个35天的体内研究中,每周两次监测的小鼠健康状况正常,并且在CD19 VHH CAR-T细胞处理组中体重增加(参见图5C)。

[0559] 6.5. 实施例5-抗CD19 VHH-huIgG1Fc单克隆抗体(mAb)结合和中靶/脱靶活性的体外表征

[0560] 6.5.1. 抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb与CD19受体阳性细胞的中靶结合和 EC_{50}

[0561] 将具有人IgG1 Fc片段序列(SEQ ID NO:77)的抗CD19 VHH序列克隆到哺乳动物表达载体-pcDNA3.4中以促进重组蛋白质表达。进一步优化DNA密码子以使其在哺乳动物宿主细胞-Expi293F中获得最佳表达。从细胞培养物的上清液中收获抗体,将其通过MabSelect SuRe LX一步纯化,并经由0.2 μ m过滤器灭菌。纯化的抗体浓度是通过A280测定的,并且达到2-3mg/mL,纯度为~90%。将包含SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102中所示的FMC63 VH-CH1和FMC63VL-CL的氨基酸序列的抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb用作细胞表面结合测定的阳性对照。将CD19阳性细胞系(Raji)和阴性细胞系(K562)重悬于完全培养基中,将细胞浓度稀释至 1×10^6 个细胞/mL,并以每孔 2×10^5 个细胞进行染色。将mAb从最大浓度开始连续稀释(减少3倍)并根据实验计划和方案添加该mAb。将该mAb和细胞一起在4 $^{\circ}$ C下共温育1小时。然后,将细胞用200 μ L的DPBS+0.5% FBS洗涤,并在4 $^{\circ}$ C下以300g旋转5分钟。将细胞用检测抗体-缀合有PE的小鼠抗人IgG1 Fc(BioLegend,目录号409304,1:100)在4 $^{\circ}$ C下染色40分钟。然后再次洗涤细胞,并将细胞用200 μ L的DPBS+0.5% FBS重悬,以用于在NovoCyte流式细胞仪(ACEA Biosciences)上进行流式细胞术分析。通过Novoexpress软件分析FACS数据,并且通过GraphPad PRISM 6.0版分析MFI(中值荧光强度)。

[0562] 细胞表面结合数据显示,示例性抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb(VHH-083-huIgG1Fc mAb和VHH-131-huIgG1Fc mAb)以剂量依赖性方式与CD19阳性细胞(即Raji)特异性结合,并且VHH-083-huIgG1Fc mAb在靶细胞上显示出比抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb更强的结合(参见图6A)。VHH-083-huIgG1Fc mAb的 EC_{50} 为0.14nM,且阳性对照-抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb的 EC_{50} 为0.45nM。VHH-083-huIgG1Fc mAb和抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb未显示出与阴性细胞

系-K562的显著结合(参见图6B)。VHH-131-huIgG1Fc mAb显示出的与Raji的结合与VHH-083-huIgG1Fc mAb相当(参见图6C)。术语“EC50”也称为半最大有效浓度,是指在指定的暴露时间后,诱导的反应在基线与最大值之间的一半处的抗体的浓度。

[0563] 6.5.2.抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb脱靶结合

[0564] 为了验证脱靶结合,通过采用上述方法用各种人细胞系评估抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb。示例性测试的细胞系列于表8中。将mAb与每孔 1×10^5 个细胞一起温育。对于测试的VHH-083-huIgG1Fc mAb和VHH-131-huIgG1Fc mAb,在与Raji细胞产生最大结合的浓度下没有观察到与脱靶细胞的非特异性结合(表8)。

[0565] 表8.抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb与脱靶细胞的结合

细胞系	ATCC ID	初级位点	CD19 表达水平	VHH-083-hu IgG1Fc mAb	VHH-131-huIg G1Fc mAb
Raji	CCL-86	淋巴样	+	+	+
Daudi	CCL-213	淋巴样	+	+	+
Nalm.6	CRL-3273	淋巴样	+	+	+
RPMI-8226	CCL-155	淋巴样	-	-	-
Jurkat	TIB-152	淋巴样	-	-	-
K562	CCL-243	骨髓	-	-	-
HL-60	CCL-240	外周血	-	-	-
THP-1	TIB-85	外周血	-	-	-
U87-MG	HTB-14	脑/神经元	-	-	-
IMR-32	CCL-127	脑/神经元	-	-	-
FaDu	HTB-43	咽	-	-	-
A-253	HTB-41	唾液腺	-	-	-
SK-BR-3	HTB-30	乳房	-	-	-
A549	CCL-185	肺	-	-	-
NCI-H446	HTB-171	肺	-	-	-
HepG2	HB-8065	肝	-	-	-
NCI-N87	CRL-5822	胃	-	-	-
HEK-293T	632180	肾	-	-	-
PANC-1	CRL-1469	胰腺	-	-	-
HCT 116	CCL-247	结直肠	-	-	-
SK-OV-3	HTB-77	卵巢	-	-	-
Hela	CCL-2	子宫颈	-	-	-
BeWo	CCL-98	胎盘	-	-	-
A375	CRL-1619	皮肤	-	-	-

[0566]

细胞系	ATCC ID	初级位点	CD19 表达水平	VHH-083-hu IgG1Fc mAb	VHH-131-huIg G1Fc mAb
U-2 OS	HTB-96	骨	-	-	-

[0567]

[0568] 6.5.3. 抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb表位分箱

[0569] 为了表征抗CD19 VHH与CD19抗原的结合,成对测试示例性抗CD19 VHH-huIgG1Fc

mAb和抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb以评估它们是否阻断彼此与CD19抗原的特异性位点的结合。将CD19抗原以0.5 μ g/mL的浓度、100 μ L/孔包被在96孔板上,包被缓冲液为PBS (pH7.4)。在最佳条件下将竞争mAb与生物素缀合,并进行滴定以找到用于mAb竞争测试的最佳浓度(最佳信噪比)。以链霉亲和素-HRP作为第二抗体,按照标准方案应用ELISA方法。数据显示示例性VHH-083-huIgG1Fc mAb阻断抗CD19 Fab-huIgG1Fc mAb与同一表位的结合,并且两种mAb被“分箱”在一起(参见表9中的示例性数据)。

[0570] 表9.抗CD19 VHH-huIgG1Fc mAb表位分箱

竞争 mAb	OD450	
	抗 CD19 VHH-huIgG1Fc mAb	抗 CD19 Fab-huIgG1Fc mAb
[0571] N.A.	1.242	1.310
抗 CD19 VHH-huIgG1Fc mAb	0.372	0.249
抗 CD19 Fab-huIgG1Fc mAb	0.694	0.178

[0572] 6.6. 实施例6-人源化CD19 VHH CAR的产生和表征

[0573] 6.6.1. 抗CD19 VHH抗体的人源化

[0574] 为了降低在人中的免疫原性,将骆驼科VHH抗体人源化,因为大部分免疫反应是针对非人抗体恒定区发生的。当不同的框架区与骆驼科CDR组合时,对同一抗原具有特异性的嵌合人和骆驼科抗体可引发不同的效应子功能,从而扩大它们的治疗益处。通过使用基于序列的方法和框架改组将单特异性骆驼科VHH人源化为最同源的人种系序列或相关支架。通过电脑模拟(in silico)CDR移植、同源结构建模(三级构象和折叠)、序列比对、基于结构的反向突变设计和重新引入来自骆驼科VHH抗体的关键构象残基解决了由非原生人框架支架支持的骆驼科CDR的不相容性和关键构象残基的消除。抗体人源化过程不仅消除空间冲突,而且还恢复与其抗原的结合亲和力有关的功能。

[0575] 基于序列同源性的人源化设计采用Cécile Vincke等人设计的通用人源化VHH框架h-NbBcII10FGLA(蛋白质数据库,PDB代码:3EAK,<https://www.rcsb.org/structure/3EAK>)。使用建模软件MODELLER进行骆驼科VHH的同源建模。根据与人种系基因的比对,选择IGHV3-64*04作为抗CD19 VHH的一种人受体。根据蛋白质的三维结构计算氨基酸的相对溶剂可及性。如果使VHH的氨基酸中的一种氨基酸暴露于溶剂中,则其将被原始氨基酸替换。本文产生的示例性人源化VHH结构域(即,huVHH-773、huVHH-776、A592H1、A592H2、A592H3和A592H4)示于表2中,且相应的序列提供于本文提供的序列表中。

[0576] 6.6.2. 人源化CD19 VHH CAR-T细胞的表征

[0577] 采用上述方法产生示例性人源化CD19 VHH CAR(包括huVHH-773CAR和huVHH-776CAR)。huVHH-773CAR的氨基酸序列为SEQ ID NO:62。VHH-776CAR的氨基酸序列为SEQ ID NO:63。huVHH-773CAR的核酸序列为SEQ ID NO:70。huVHH-776CAR的核酸序列为SEQ ID NO:

71。

[0578] 然后通过人原代T细胞中的慢病毒转导产生人源化CD19 VHH CAR-T细胞,并通过根据标准方法的体外功效研究对该细胞进行评估。转导的T细胞显示出与人源化CD19 VHH CAR不同的CAR表达水平(%)。在7天的培养物中,示例性人源化CD19 VHH CAR-T细胞的成活率为约86%~92%,CAR阳性(CAR+)为约14%~17%,且扩增倍数在17~20以内,表明当与未经转导的T细胞(UnT)相比时,人源化VHH对T细胞增殖和扩增的能力没有可检测到的负面影响。

[0579] 对如上所述的那样产生的人源化CD19 VHH CAR-T细胞进行计数,并将其与抗原特异性癌细胞系一起共培养以评估杀伤效力,将亲本骆驼科CD19 VHH CAR-T细胞和CD19 scFv CAR-T细胞用作对照,并将未经转导的T细胞(UnT)用作非靶向T细胞对照。对CD19阳性细胞系-Raji(ATCC#CCL-86)、NaIm.6(ATCC#CRL-3273)和K562-CD19以及阴性细胞系-K562(ATCC#CCL-243)进行人源化CD19 VHH CAR-T细胞杀伤测定。所有细胞系都在内部被工程化成表达作为细胞成活/杀伤的报告子的萤火虫荧光素酶。用嘌呤霉素选择经转导的细胞,并且每2-3天用选择培养基(补加有10% FBS和2 μ g/mL的嘌呤霉素的伊格尔最低必需培养基)进行更新。在三轮选择后,收获选择的细胞克隆,并将其保存以供进一步使用。在20:1、15:1、10:1、5:1或2.5:1的效应细胞与靶细胞比率(E:T)下持续24小时测量人源化CD19 VHH CAR-T细胞的细胞毒性。通过将相应数目的T细胞与恒定数目的靶细胞混合来启动测定。通过ONE-Glo荧光素酶测定(Promega,目录号E6110)评估每孔剩余的荧光素酶活性,以定量每孔剩余的能成活的靶细胞。

[0580] 人源化CD19 VHH CAR-T细胞(包括huVHH-773CAR-T细胞和huVHH-776CAR-T细胞)的数据显示,CAR-T细胞诱导抗原特异性靶细胞的裂解,并且对该靶细胞表现出较高的效力或者维持对该靶细胞的效力(参见图7A-7C中所示的示例性数据)。与UnT对照相比,没有检测到人源化CD19 VHH CAR-T细胞对阴性细胞系-K562.Luc有显著的细胞毒性作用(参见图7D)。

[0581] 本文引用的所有专利、公布的申请和参考文献的教导内容均以引用的方式全文并入。

[0582] 虽然已经具体示出和描述了示例实施方案,但本领域技术人员将要理解的是,在不脱离由所附权利要求涵盖的实施方案的范围的情况下,可以对其中的形式和细节进行各种改变。

[0583] 由前述内容将会理解的是,虽然本文为了说明的目的已经描述了具体实施方案,但在不脱离本文提供的实质和范围的情况下可以进行各种修改。上面提到的所有参考文献均以全文引用的方式并入本文。

序列表

- <110> 南京传奇生物科技有限公司 (NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.)
 <120> CD19结合分子及其用途
 <130> IDC220551
 <140>
 <141>
 <150> PCT/CN2020/102457
 <151> 2020-07-16
 <160> 114
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-083 (IMGT)或VHH-131 (IMGT)的CDR1
 <400> 1
 Gly Asn Ile Asn Ser Arg Asn Cys
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-111 (IMGT)的CDR1
 <400> 2
 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Lys Trp
 1 5
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA542 (IMGT)的CDR1
 <400> 3
 Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Gly Cys
 1 5
 <210> 4

<220>
<223> VHH-083 (IMGT)或VHH-131 (IMGT)的CDR2
<400> 8
Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser
1 5
<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VHH-111 (IMGT)的CDR2
<400> 9
Ile Arg Thr Asp His Ala Gly Thr
1 5
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 77LICA542 (IMGT)的CDR2
<400> 10
Ile Asp Ser Asp Gly Met Thr
1 5
<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 77LICA519 (IMGT)的CDR2
<400> 11
Ile Ser Thr Gly Ser Gly Gly Thr
1 5
<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 77LICA602 (IMGT)的CDR2
<400> 12

<210> 17
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA542 (IMGT)的CDR3
 <400> 17
 Ala Ala Asp Pro Asp Cys Tyr Tyr Ser Asp Tyr Ala Ile Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Phe Gly Tyr
 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA519 (IMGT)的CDR3
 <400> 18
 Ala Ala Gly Leu Arg Leu Pro Gly Arg Ala Cys Thr Thr Ser His Lys
 1 5 10 15
 Tyr Asn Tyr
 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA602 (IMGT)的CDR3
 <400> 19
 Ala Ala Arg Arg Trp Gly Trp Gly Glu Leu Pro Leu Thr Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Tyr Asn Asn
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1157 (IMGT)的CDR3
 <400> 20
 Ala Lys Arg Ala Pro Gly Asp Lys Val
 1 5

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1159 (IMGT)的CDR3
 <400> 21
 Ala Ala Asp Arg Thr Leu Gln Ala Thr Met Ser Glu Ile Ser Tyr
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-083 (Kabat)或VHH-131 (Kabat)的CDR1
 <400> 22
 Gly Asn Ile Asn Ser Arg Asn Cys Met Gly
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-111 (Kabat)的CDR1
 <400> 23
 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Lys Trp Met Gly
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA542 (Kabat)的CDR1
 <400> 24
 Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Gly Cys Met Gly
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA519 (Kabat)的CDR1
 <400> 25
 Gly Leu Pro Tyr Thr Gly Tyr Cys Met Gly
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA602 (Kabat)的CDR1
 <400> 26
 Gly Tyr Thr Ser Ser Tyr Ala Tyr Met Gly
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1157 (Kabat)的CDR1
 <400> 27
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Val Met Ser
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1159 (Kabat)的CDR1
 <400> 28
 Gly Arg Thr Phe Ser Ser Leu Ala Met Gly
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-083 (Kabat)的CDR2

<400> 29

Ala Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VHH-111 (Kabat)的CDR2

<400> 30

Thr Ile Arg Thr Asp His Ala Gly Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 77LICA542 (Kabat)的CDR2

<400> 31

Ala Ile Asp Ser Asp Gly Met Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 77LICA519 (Kabat)的CDR2

<400> 32

Ala Ile Ser Thr Gly Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 77LICA602 (Kabat)的CDR2

<400> 33

Ala Ile Gly Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1157 (Kabat)的CDR2
 <400> 34
 Asp Ile Ser Asn Gly Gly Ile Thr Arg Arg Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> LIC1159 (Kabat)的CDR2
 <400> 35
 Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-083 (Kabat)或VHH-131 (Kabat)的CDR3
 <400> 36
 Ala Pro Gly Cys Leu Leu Ser Ala Leu Arg Ser Ala Asp Tyr Arg Asn
 1 5 10 15
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-111 (Kabat)的CDR3
 <400> 37
 Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Phe Arg Tyr

<400> 44

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

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 77LICA542 (氨基酸)

<400> 45

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

	115	120	125
<210>	46		
<211>	126		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	77LICA519 (氨基酸)		
<400>	46		
Gln Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Pro Tyr Thr Gly Tyr			
	20	25	30
Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val			
	35	40	45
Ala Ala Ile Ser Thr Gly Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Asp Asn Ala Gly Asn Thr Met Phe			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Ala Gly Leu Arg Leu Pro Gly Arg Ala Cys Thr Thr Ser His Lys			
	100	105	110
Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	125

<210>	47		
<211>	125		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	77LICA602 (氨基酸)		
<400>	47		
Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ser Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Tyr Thr Ser Ser Tyr Ala			
	20	25	30
Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Leu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val			
	35	40	45
Ala Ala Ile Gly Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
	50	55	60

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

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> A592H2 (IMGT)的CDR3

<400> 50

Ala Lys Ala Pro Gly Cys Leu Leu Ser Ala Leu Arg Ser Ala Asp Tyr
 1 5 10 15

Arg Asn

<210> 51

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> huVHH-773 (氨基酸)

<400> 51

Gln 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 Asn Ile Asn Ser Arg Asn
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50	55	60																	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	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	Ala	Ala	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr				
			100					105						110					
Arg	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120						125					
<210>	52																		
<211>	125																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	huVHH-776 (氨基酸)																		
<400>	52																		
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	Asn	Ile	Asn	Ser	Arg	Asn				
			20					25					30						
Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Arg	Glu	Gly	Val				
			35					40					45						
Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val				
			50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	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	Ala	Ala	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr				
			100					105						110					
Arg	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120						125					
<210>	53																		
<211>	125																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	A592H1 (氨基酸)																		
<400>	53																		

Gln 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 Asn Ile Asn Ser Arg Asn
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu 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 Ala Ala Pro Gly Cys Leu Leu Ser Ala Leu Arg Ser Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 54
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> A592H2 (氨基酸)
 <400> 54
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Asn Ile Asn Ser Arg Asn
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu 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 Ala Pro Gly Cys Leu Leu Ser Ala Leu Arg Ser Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 55
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> A592H3 (氨基酸)
 <400> 55

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

<210> 56
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> A593H4 (氨基酸)
 <400> 56

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

65		70		75		80									
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr
			100					105						110	
Arg	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120						125		
<210>	57														
<211>	371														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	VHH-083-CAR (氨基酸)														
<400>	57														
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
			20					25					30		
Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Gly	Ala	Ser	Gly	Asn
			35				40						45		
Ile	Asn	Ser	Arg	Asn	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
		50				55					60				
Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Tyr
65				70						75				80	
Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ala
				85					90					95	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
			100						105					110	
Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu
			115						120					125	
Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr	Arg	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val
			130						135					140	
Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala
145					150					155					160
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg
				165						170				175	
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys
			180						185					190	
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu

195	200	205
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
210	215	220
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
225	230	235
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
245	250	255
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
260	265	270
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
275	280	285
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
290	295	300
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
305	310	315
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
325	330	335
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
340	345	350
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
355	360	365
Pro Pro Arg		
370		
<210> 58		
<211> 359		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> VHH-111-CAR (氨基酸)		
<400> 58		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser		
20	25	30
Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp		
35	40	45
Thr Leu Ser Asn Lys Trp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
50	55	60
Glu Arg Asp Trp Val Ala Thr Ile Arg Thr Asp His Ala Gly Thr Tyr		

<212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA542-CAR (氨基酸)
 <400> 59
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Tyr Ser Ser Gly Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Ala Lys
 50 55 60
 Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile Asp Ser Asp Gly Met Thr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys
 85 90 95
 Asn Thr Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Asp Cys Tyr Tyr Ser Asp Tyr Ala
 115 120 125
 Ile Ser Pro Ala Phe Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 145 150 155 160
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 165 170 175
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 180 185 190
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 195 200 205
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 210 215 220
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 245 250 255
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 260 265 270

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 275 280 285
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 290 295 300
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 305 310 315 320
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 325 330 335
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 340 345 350
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 355 360 365
 Pro Pro Arg
 370
 <210> 60
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA519-CAR (氨基酸)
 <400> 60
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu
 35 40 45
 Pro Tyr Thr Gly Tyr Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Ser Gly Gly Thr Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Asp Asn Ala
 85 90 95
 Gly Asn Thr Met Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Arg Leu Pro Gly Arg Ala Cys
 115 120 125
 Thr Thr Ser His Lys Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 165 170 175
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
 180 185 190
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
 195 200 205
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
 210 215 220
 Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
 225 230 235 240
 Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
 245 250 255
 Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 260 265 270
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 275 280 285
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 290 295 300
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 305 310 315 320
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 325 330 335
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 340 345 350
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 355 360 365
 Leu Pro Pro Arg
 370
 <210> 61
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA602-CAR (氨基酸)
 <400> 61
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Val Gln Ser Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Thr Ser Ser Tyr Ala Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Leu Gly Lys
 50 55 60
 Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile Gly Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys
 85 90 95
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Arg Trp Gly Trp Gly Glu Leu Pro Leu
 115 120 125
 Thr Pro Ser Glu Tyr Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 145 150 155 160
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 165 170 175
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 180 185 190
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 195 200 205
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 210 215 220
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 245 250 255
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 260 265 270
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 275 280 285
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 290 295 300
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 305 310 315 320
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

				325						330										335
Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu					
				340						345										350
Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu					
				355						360										365
Pro	Pro	Arg																		
				370																
<210>	62																			
<211>	371																			
<212>	PRT																			
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																			
<220>																				
<223>	huVHH-773 CAR (氨基酸)																			
<400>	62																			
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu					
1				5						10					15					
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu					
				20						25					30					
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn					
				35						40					45					
Ile	Asn	Ser	Arg	Asn	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys					
				50						55					60					
Gly	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Tyr					
65										70					75					80
Tyr	Val	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Asn	Ser					
										85					90					95
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr					
										100					105					110
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Cys	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu					
										115					120					125
Arg	Ser	Ala	Asp	Tyr	Arg	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val					
										130					135					140
Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala					
145										150					155					160
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg					
										165					170					175
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys					
										180					185					190
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu					

195	200	205
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu		
210	215	220
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln		
225	230	235
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly		
245	250	255
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
260	265	270
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
275	280	285
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
290	295	300
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
305	310	315
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
325	330	335
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
340	345	350
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
355	360	365
Pro Pro Arg		
370		
<210> 63		
<211> 371		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> huVHH-776 CAR (氨基酸)		
<400> 63		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val		
20	25	30
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn		
35	40	45
Ile Asn Ser Arg Asn Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
50	55	60
Gly Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr		

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

<210>	64		
<211>	375		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	VHH-083 (核酸)		
<400>	64		
caggtgcagc	tggtggagag	cggaggtggc	
tctgtgcagg	ctggtgggtc	gctcaggctg	60
tcatgcgggg	cgcccgcaa	cattaactcc	cgcaactgca
tgggctggtt	ccgtcaagcc		120
ccaggcaagg	agcgcgaggg	cgtagccgct	atcggtcagg
tcaccggccg	cagctactac		180
gtggattctg	ttaaaggccg	cttcaccatc	tcgttgaca
acgcaagaa	cacgctgtac		240
ctgcagatga	acacactgaa	gcccgaagac	accgcatgt
attactgtgc	tgcagccccg		300
gggtgtctgc	tgtccgctct	gcgctccgcg	gactaccgga
attggggcca	gggcaccag		360
gtcaccgtgt	ccagt		375
<210>	65		
<211>	354		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	VHH-111 (核酸)		
<400>	65		
gaggtgcagc	tggtggagag	cggaggggga	tccgtgcaag
ccggcggctc	cttgcgcctg		60
tcatgcgccg	cttccggtga	tactcttagc	aacaaatgga
tgggctggtt	ccgccaggcc		120
cccggcaagg	agcgcgattg	ggtcgcgacg	attcgtaccg
accacgccgg	gacctacgcg		180
gacagtgtga	agggccgctt	caccatctcg	cgggacaact
ttaagaatat	gatctacctg		240
cagatgaaca	acctgaagcc	tgaagacacc	gccatgtatt
actgtgctgc	tagctactcc		300
ggtgcaacca	ccttcagata	ctggggccag	ggcaccag
tcaccgtttc	ttct		354
<210>	66		
<211>	375		
<212>	DNA		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	huVHH-773 (核酸)		
<400>	66		
caggtgcagc	tggtggagag	cggaggcggg	ctggtgcagc
cgggcggctc	cctccgctg		60
tcatgcgccg	cttccggcaa	cattaattcc	cgcaactgca
tgggctggtt	ccgccaggcc		120
cccggcaagg	gcagggaggg	cgtggcggcc	atcggtcagg
tcaccggccg	cagctattac		180
gtggattctg	tgaagggacg	cttcaccatc	tctctggaca
actccaagaa	cacgctgtac		240
ctgcagatga	acagcctgcg	cgccgaggac	accgccgtgt
actactgtgc	cgcgcgcca		300

gggtgcctgc tgtccgccct gcgctcggcg gactacagga actggggcca gggcacctg	360
gttaccgtgt cctcc	375
<210> 67	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> huVHH-776 (核酸)	
<400> 67	
caggtgcagc tggtagagag cggaggcggg gtggtgcagc caggcgatc tcttcgcctg	60
tcatgcgccg cttccggcaa cattaattcc cgcaactgca tgggctggtt ccgccaggcc	120
cccggcaaaag gcagggaggg cgtggcgggc atcggtcagg tcaccggccg cagctattac	180
gtggattctg tgaagggccg cttcaccatc tctctggaca actccaagaa cacgctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgtgc tgcggctccc	300
gggtgcctgc tgtccgccct gcgctcggcg gactaccgga actggggcca gggcacctg	360
gtgaccgtgt cctcc	375
<210> 68	
<211> 1116	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> VHH-083 CAR (核酸)	
<400> 68	
atggcccttc ctgtgactgc gcttctgctg cccttggcac tectactcca cgccgcccga	60
cctcaggtgc agctggtgga gagcggaggt ggctctgtgc aggctggtgg gtcgctcagg	120
ctgtcatgcg gggcgtccgg caacattaac tcccgaact gcatgggctg gttccgtcaa	180
gccccaggca aggagcgcga gggcgtagcc gctatcggtc aggtcaccgg ccgagctac	240
tacgtggatt ctgttaaagg ccgcttcacc atctcgttgg acaacgcgaa gaacacgctg	300
tacctgcaga tgaacacact gaagcccga gacaccgcca tgtattactg tgctgcagcc	360
ccggggtgtc tgctgtccgc tctgcgctcc gcggactacc ggaattgggg ccagggcacc	420
caggtcaccg tgtccagtac tagtaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg	480
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg	540
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg	600
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc	660
agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	720
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	780
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat	840
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	900
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	960

ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg	1020
aggggcaagg ggcacgatgg ctttaccag ggtctcagta cagccacca ggcacacctac	1080
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgctaa	1116
<210> 69	
<211> 1095	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> VHH-111 CAR (核酸)	
<400> 69	
atggcgctgc cggtgactgc tctactgctg ccctggcgcc tectcttgca tgcagccagg	60
ccagaggtgc agctggtgga gagcggaggg ggatccgtgc aagccggcgg ctccctgctgc	120
ctgtcatgcg ccgcttccgg tgatactctt agcaacaat ggatgggctg gttccgccag	180
gccccggca aggagcgcga ttgggtcgcg acgattcgta ccgaccacgc cgggacctac	240
gcggacagtg tgaagggcgg cttcaccatc tcgcgggaca actttaagaa tatgatctac	300
ctgcagatga acaacctgaa gcctgaagac accgccatgt attactgtgc tgctagctac	360
tccggtgcaa ccacctcag aactggggc cagggcacc aggtcacctg ttcttctact	420
agtaccacga cgccagcgcc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc	480
ctgtccctgc gccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg	540
ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgcccttg ccgggacttg tggggtcctt	600
ctcctgtcac tggttatcac ctttactgc aaacggggca gaaagaaact cctgtatata	660
ttcaaacaac catttatgag accagtaca actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc	720
cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt gaactgagag tgaagttcag caggagcgc	780
gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga	840
agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag	900
ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	960
gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcggcgga ggggcaagg gcacgatggc	1020
ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctac acgcccttca catgcaggcc	1080
ctgccccctc gctaa	1095
<210> 70	
<211> 1116	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> huVHH-773 CAR (核酸)	
<400> 70	
atggcgctgc ccgtcactgc tetgetcttg ccctggccc tgctgcttca cgccgccagg	60
cctcaggtgc agctggtgga gagcggaggc gggctggtgc agccggcgg ctccctccgc	120
ctgtcatgcg ccgcttccgg caacattaat tcccgaact gcatgggctg gttccgccag	180

gccccggca agggcagga gggcgtggcg gccatcggtc aggtcaccgg ccgcagctat	240
tacgtggatt ctgtgaagg acgcttcacc atctctctgg acaactcaa gaacacgctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcgcgccgag gacaccgccg tgtactactg tgccgcggcg	360
ccaggggtgcc tgctgtccgc cctgcgctcg gcggactaca ggaactgggg ccagggcacc	420
ctggttaccg tgcctccac tagtaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg	480
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg	540
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gctgtgata tctacatctg ggcgcccttg	600
gccgggactt gtgggtcct tctctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc	660
agaaagaaac tcctgtatat attcaaacia ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	720
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	780
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat	840
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	900
gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	960
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcggg	1020
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac	1080
gacgcccttc acatgcagge cctgccccct cgctaa	1116

<210> 71

<211> 1116

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> huVHH-776 CAR (核酸)

<400> 71

atggcgtcc cggtgactgc tcttctgctg ccctggcgc tgctgctcca cgccgccagg	60
cctcaggtgc agctggtgga gagcggaggc ggtgtggtgc agccaggcg atctcttcgc	120
ctgtcatgcg ccgcttccgg caacattaat tcccgcaact gcatgggctg gttccgccag	180
gccccggca aaggcagga gggcgtggcg gccatcggtc aggtcaccgg ccgcagctat	240
tacgtggatt ctgtgaagg ccgcttcacc atctctctgg acaactcaa gaacacgctg	300
tacctgcaga tgaacagcct gcgcgccgag gacaccgccg tgtactactg tgctgcggct	360
cccggtgcc tgctgtccgc cctgcgctcg gcggactacc ggaactgggg ccagggcacc	420
ctggtgaccg tgcctccac tagtaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg	480
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg	540
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gctgtgata tctacatctg ggcgcccttg	600
gccgggactt gtgggtcct tctctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc	660
agaaagaaac tcctgtatat attcaaacia ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	720
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	780
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat	840
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	900
gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	960

ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1020
 aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1080
 gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgctaa 1116

<210> 72

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 信号肽(CD8 α)

<400> 72

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 73

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 铰链(CD8 α)

<400> 73

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> 74

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 跨膜结构域(CD8 α)

<400> 74

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> 75

<400> 77
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 78
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Kozak序列
 <400> 78
 gccgccacc

- <210> 79
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 示例性肽接头1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (2)
<223> 可以重复n次,其中n是整数,包括例如
1、2、3、4、5和6
<400> 79
Gly Ser
1
<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 示例性肽接头2
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 可以重复n次,其中n是整数,包括例如
1、2、3、4、5和6
<400> 80
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 示例性肽接头3
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (4)
<223> 可以重复n次,其中n是整数,包括例如
1、2、3、4、5和6

<223> 示例性肽接头15

<400> 93

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10 15

<210> 94

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 示例性肽接头16

<400> 94

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 示例性肽接头17

<400> 95

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 示例性肽接头18

<400> 96

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 97

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> EcoRI限制位点

<400> 97

	180		185		190
Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln					
	195		200		205
Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly					
	210		215		220
Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val					
225		230		235	240
Ser Ser					
<210>	100				
<211>	488				
<212>	PRT				
<213>	人工序列(Artificial Sequence)				
<220>					
<223>	CD19 scFv CAR				
<400>	100				
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu					
1	5		10		15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu					
	20		25		30
Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln					
	35		40		45
Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr					
	50		55		60
Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro					
65		70		75	80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile					
	85		90		95
Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly					
	100		105		110
Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr					
	115		120		125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu					
	130		135		140
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser					
145		150		155	160
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly					
	165		170		175
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly					
	180		185		190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 195 200 205
 Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 210 215 220
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
 325 330 335
 Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 340 345 350
 Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 355 360 365
 Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 370 375 380
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 385 390 395 400
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 405 410 415
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 435 440 445
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 450 455 460
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 465 470 475 480
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 101

<211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> FMC63 VH-CH1
 <400> 101
 Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 <210> 102
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>

<223> FMC63 VL-CL

<400> 102

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VHH-131 (Kabat)的CDR2

<400> 103

Gly Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly
 <210> 104
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-131 (氨基酸)
 <400> 104
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Asn Ile Asn Ser Arg Asn
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Gly Gln Val Thr Gly Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ala Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Pro Gly Cys Leu Leu Ser Ala Leu Arg Ser Ala Asp Tyr
 100 105 110
 Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 105
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-131-CAR (氨基酸)
 <400> 105
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Asn
 35 40 45
 Ile Asn Ser Arg Asn Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

370		
<210>	106	
<211>	375	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	VHH-131 (核酸)	
<400>	106	
caggtgcagc	tggtggagag	cggaggaggc tccgtgcagg ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcatgcgggg	cttccggcaa	cattaactcc cgcaactgca tgggctggtt ccgccaggcc 120
cccggcaagg	agcgcgaggg	cgtggctggc atcggtcagg tcaccggccg cagctactac 180
gcgacacgcg	tgaagggccg	cttcaccatc tctctggaca acgccaagaa catgctgtac 240
ctgcagatga	acacgctgaa	gcctgaagac accgcatgt attactgtgc cgcggctccc 300
gggtgcctgc	tgagcgcgct	ccgtagtgcg gactacagga attggggcca gggcaccag 360
gtcaccgtgt	cgccc	375
<210>	107	
<211>	1116	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	VHH-131 CAR (核酸)	
<400>	107	
atggcgctgc	cggtgactgc	tttgctgctg cccttgccc tgctgctcca cgccgctcgc 60
cctcaggtgc	agctggtgga	gagcggagga ggctccgtgc aggccggcgg ctccctgcgc 120
ctgtcatgcg	gggcttccgg	caacattaac tcccgaact gcatgggctg gttccgccag 180
gcccccgca	aggagcgcga	gggcgtggct ggcatcggtc aggtcaccgg ccgcagctac 240
tacgcggaca	gcgtgaaggg	ccgcttacc atctctctgg acaacgcaa gaacatgctg 300
tacctgcaga	tgaacacgct	gaagcctgaa gacaccgcca tgtattactg tgccgcggct 360
cccgggtgcc	tgctgagcgc	gctccgtagt gcggactaca ggaattgggg ccagggcacc 420
caggtcaccg	tgctgtccac	tagtaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 480
cccaccatcg	cgtcgcagcc	cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 540
ggcgcagtgc	acacgagggg	gctggacttc gctgtgata tctacatctg ggcgcccttg 600
gccgggactt	gtgggtcct	tctctgtca ctggttatea ccctttactg caaacggggc 660
agaaagaaac	tcctgtatat	attcaaacia ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 720
gaggaagatg	gctgtagctg	ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 780
gtgaagtcca	gcaggagcgc	agaccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 840
aacgagctca	atctaggacg	aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 900
gacctgaga	tggggggaaa	gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 960
ctgcagaaaag	ataagatggc	ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcggg 1020

aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1080
 gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgctaa 1116
 <210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-083和VHH-131 (具有5aa的Kabat)的CDR1
 <400> 108
 Arg Asn Cys Met Gly
 1 5
 <210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VHH-111 (具有5aa的Kabat)的CDR1
 <400> 109
 Asn Lys Trp Met Gly
 1 5
 <210> 110
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA542 (具有5aa的Kabat)的CDR1
 <400> 110
 Ser Gly Cys Met Gly
 1 5
 <210> 111
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 77LICA519 (具有5aa的Kabat)的CDR1
 <400> 111
 Gly Tyr Cys Met Gly
 1 5
 <210> 112

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 77LICA602 (具有5aa的Kabat)的CDR1
<400> 112
Tyr Ala Tyr Met Gly
1 5
<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> LIC1157 (具有5aa的Kabat)的CDR1
<400> 113
Asp Ala Val Met Ser
1 5
<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> LIC1159 (具有5aa的Kabat)的CDR1
<400> 114
Ser Leu Ala Met Gly
1 5

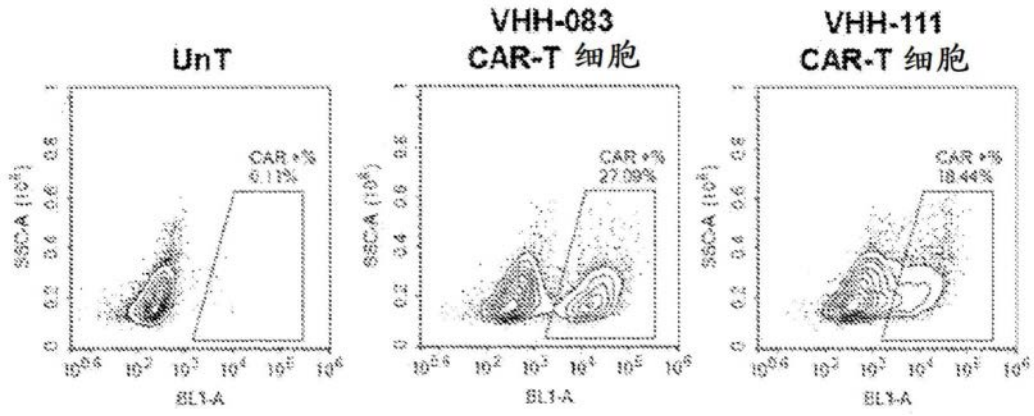


图1A

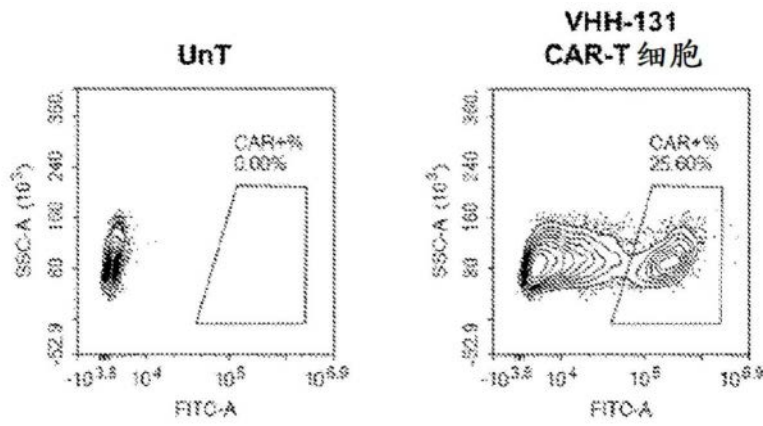


图1B

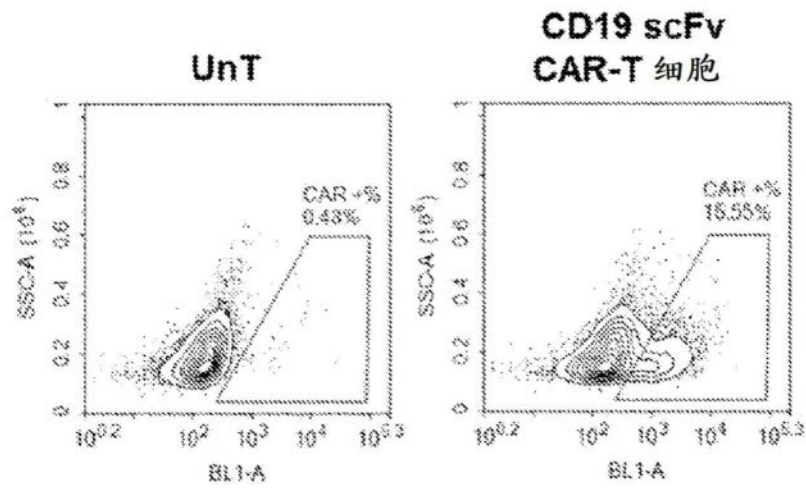


图1C

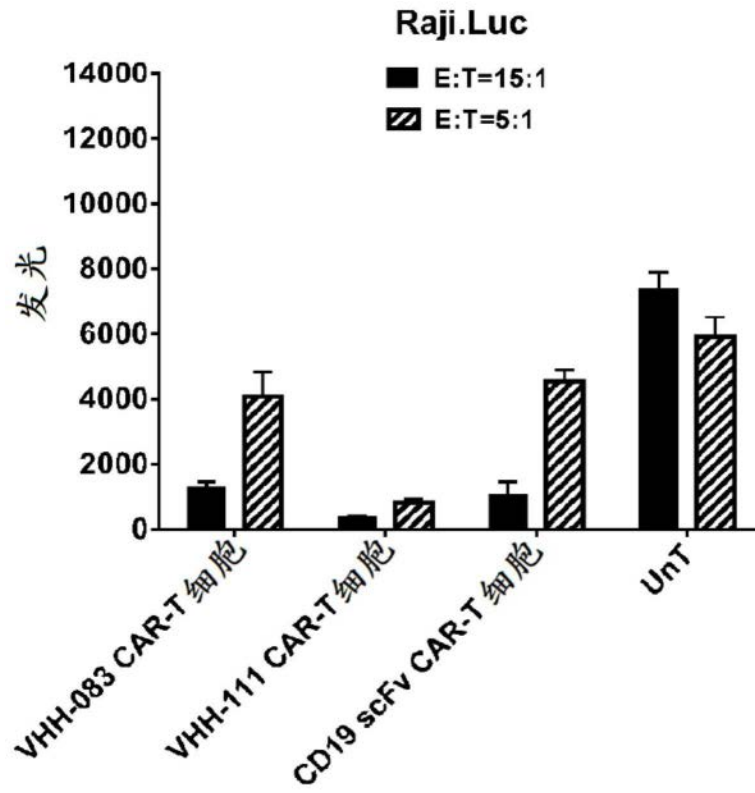


图2A

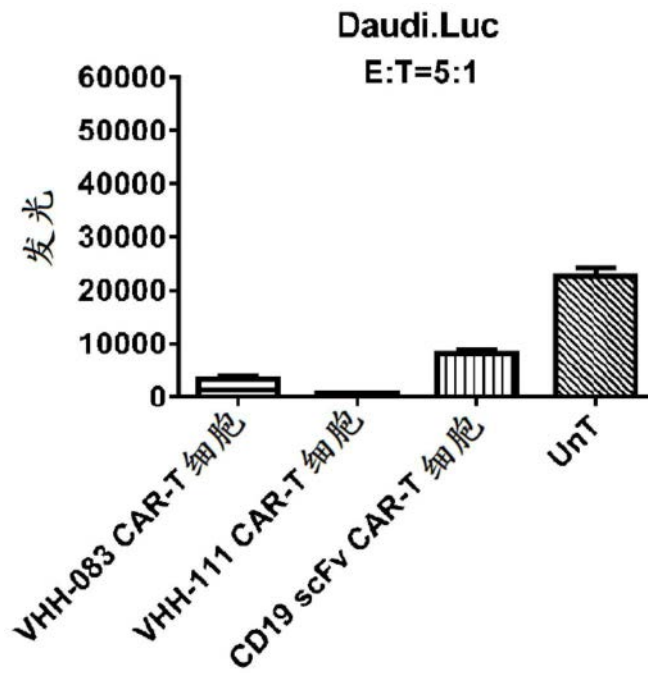


图2B

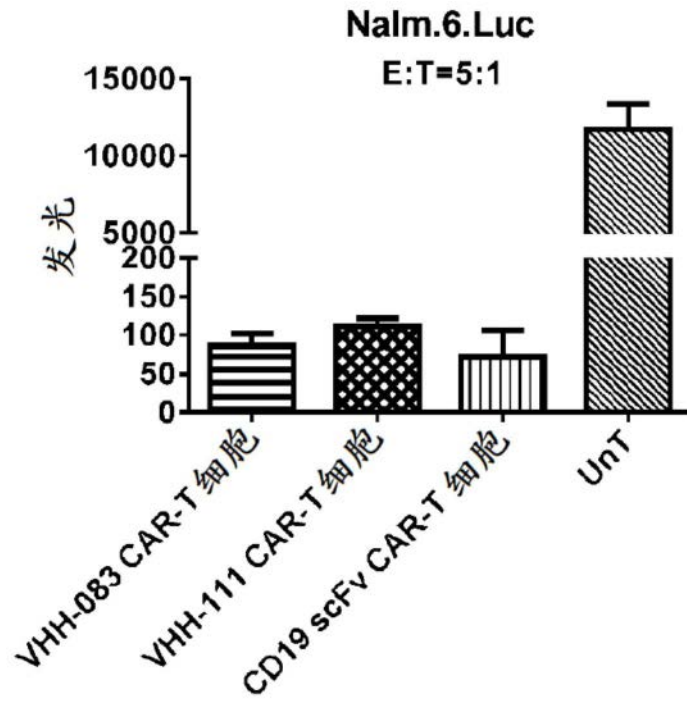


图2C

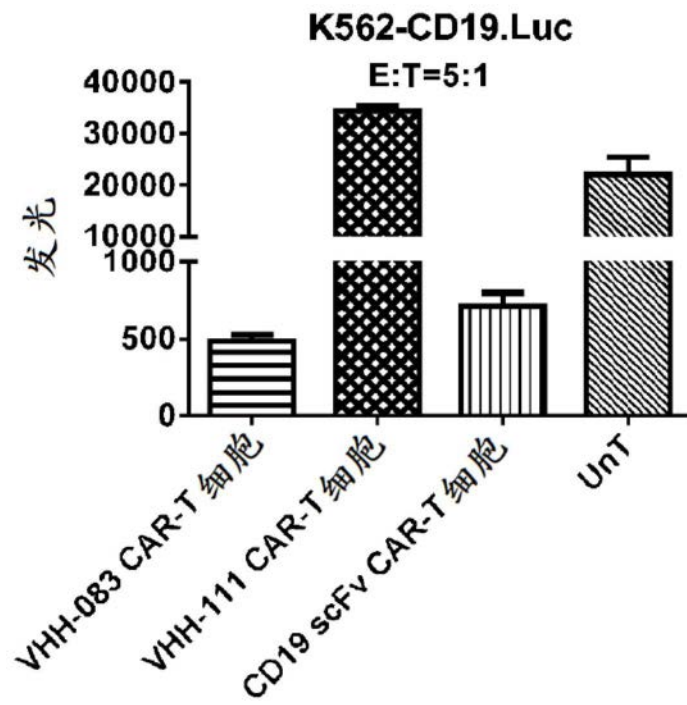


图2D

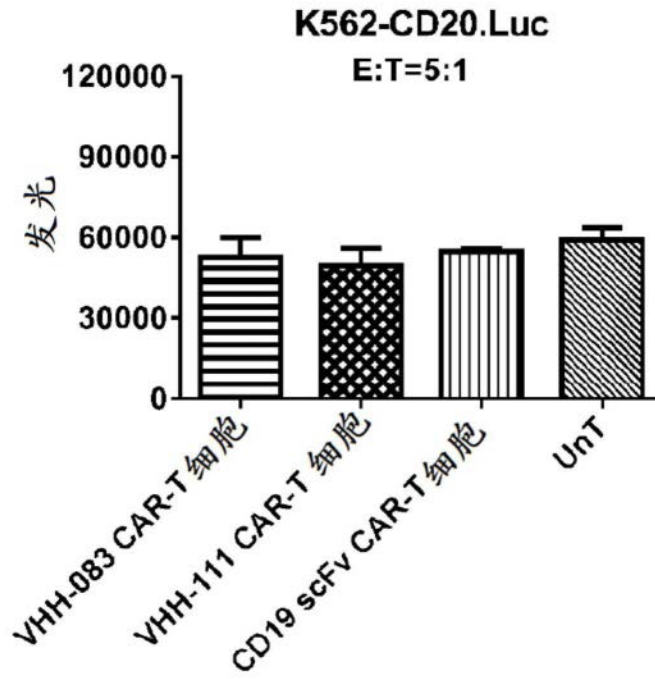


图2E

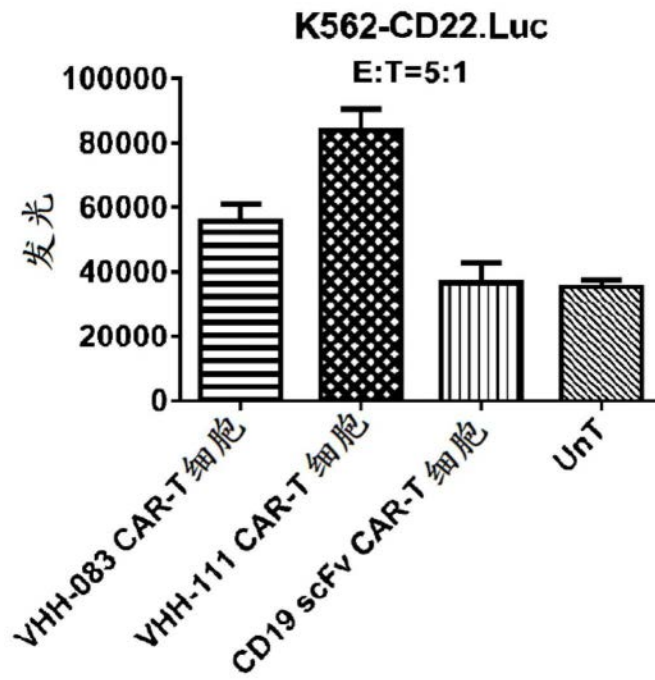


图2F

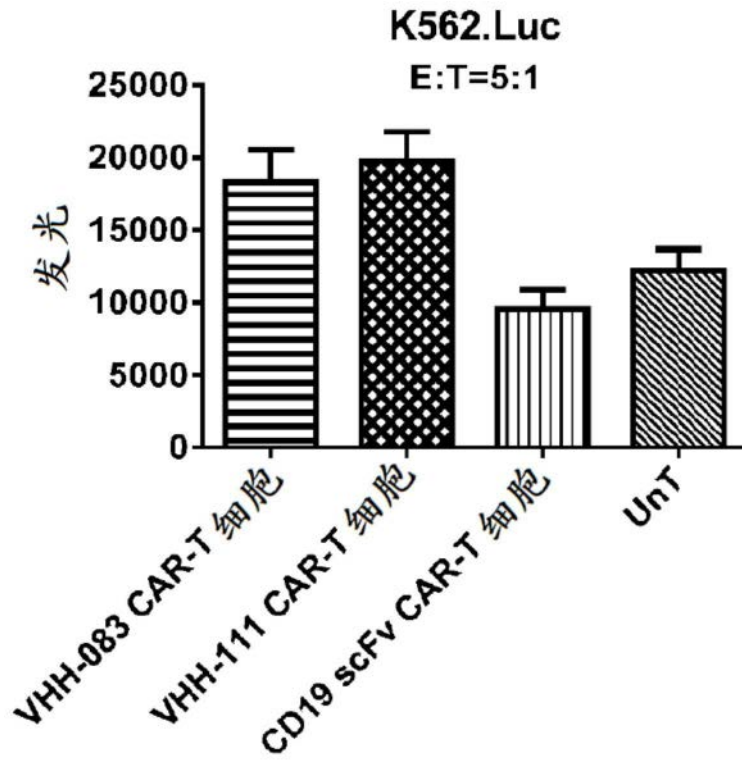


图2G

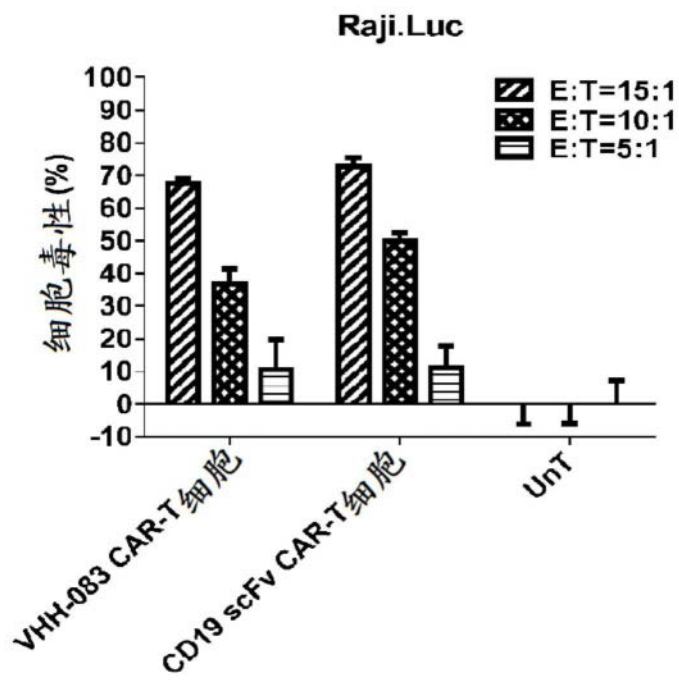


图3A

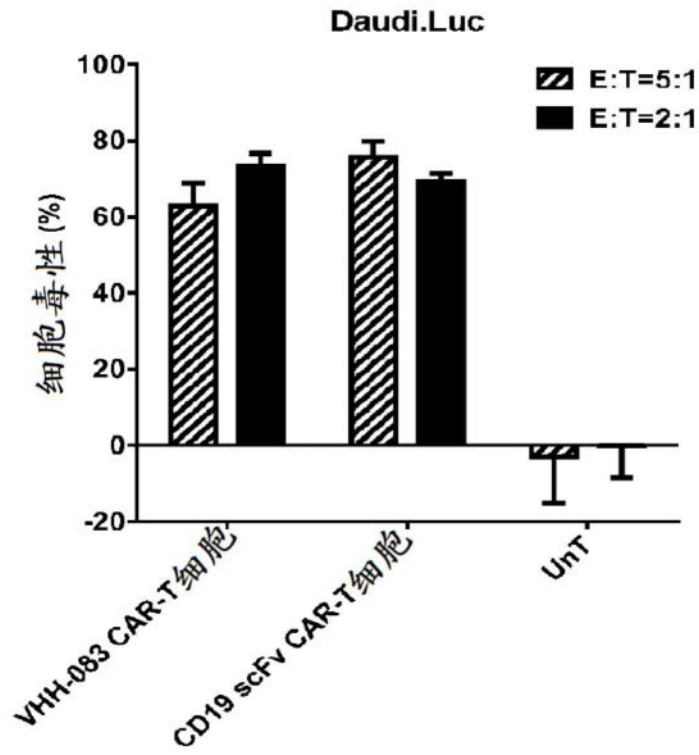


图3B

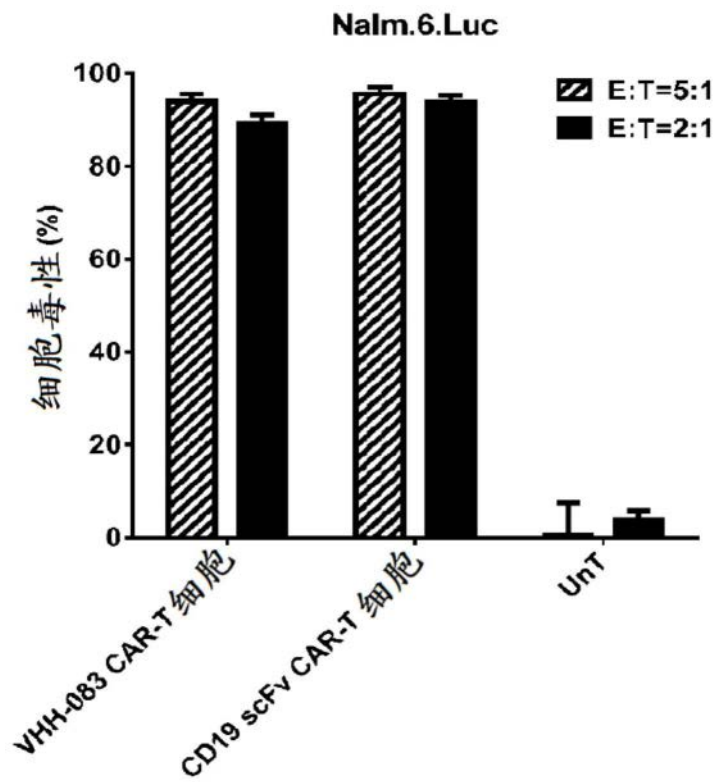


图3C

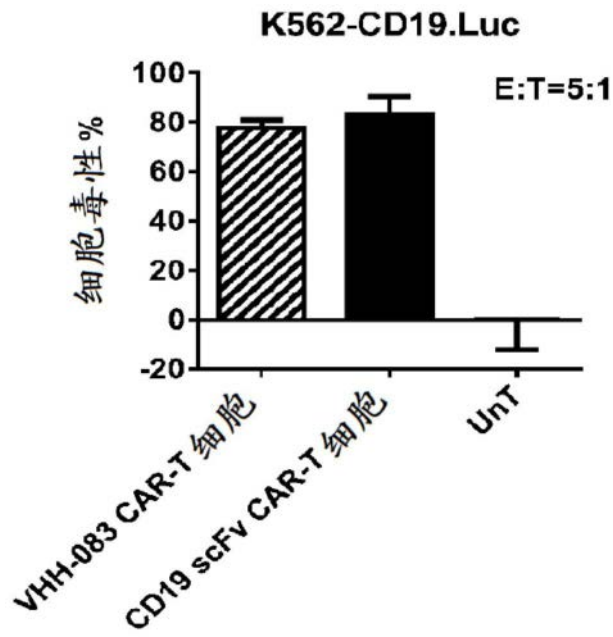


图3D

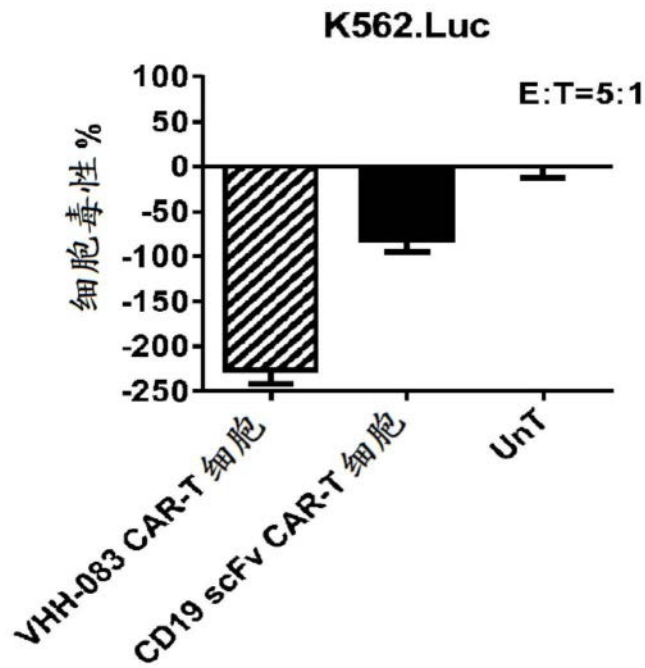


图3E

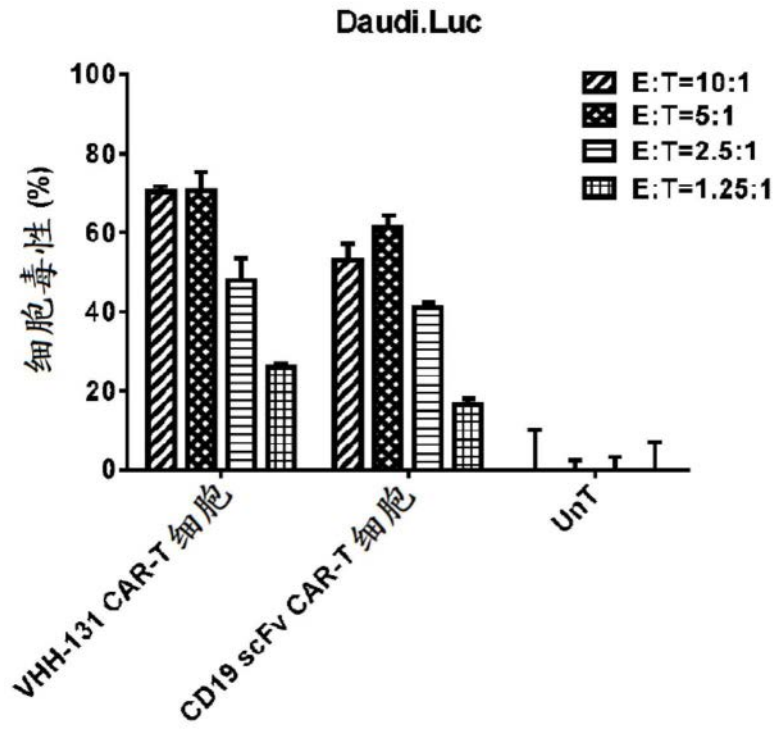


图3F

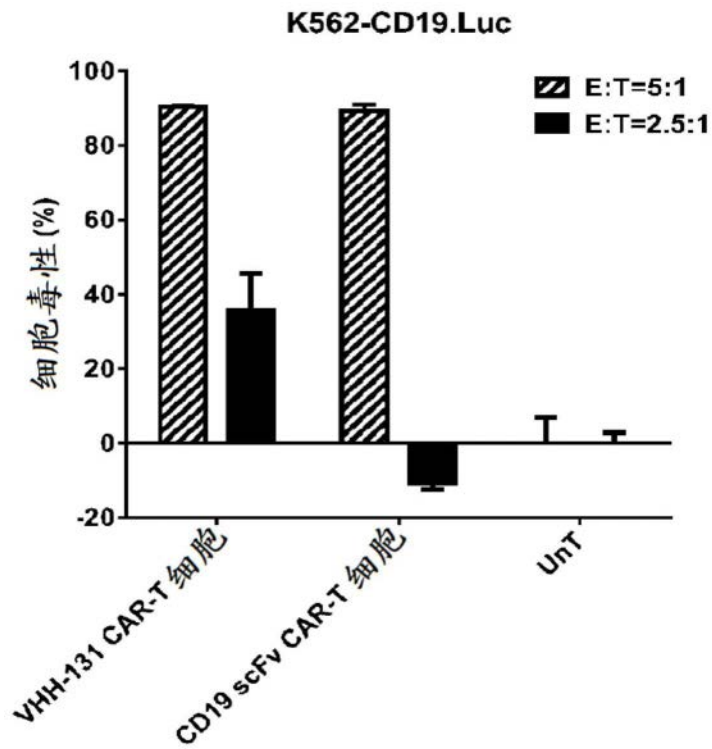


图3G

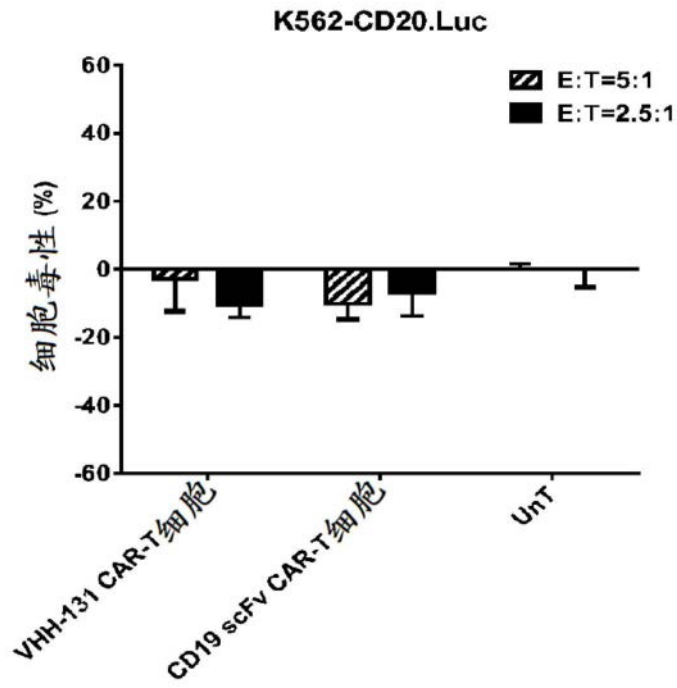


图3H

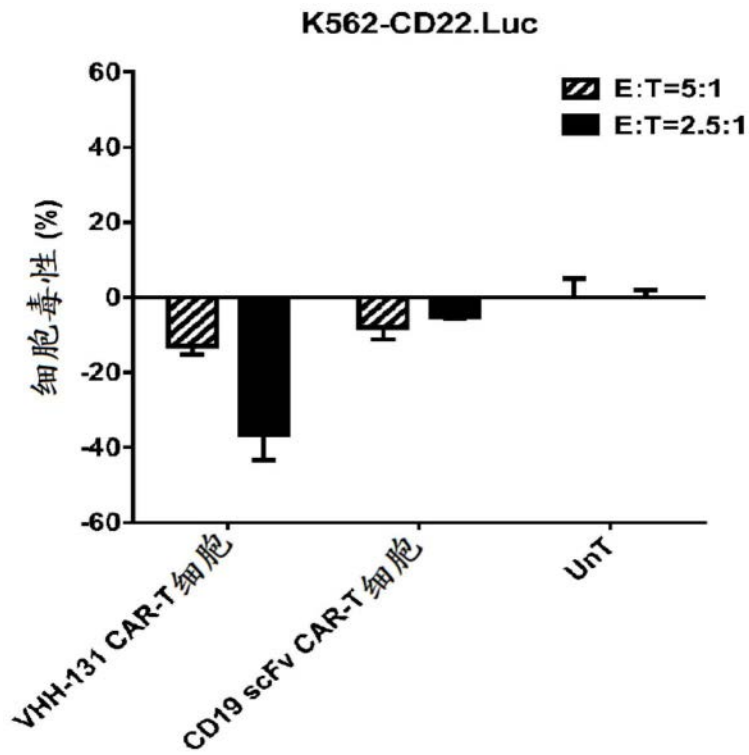


图3I

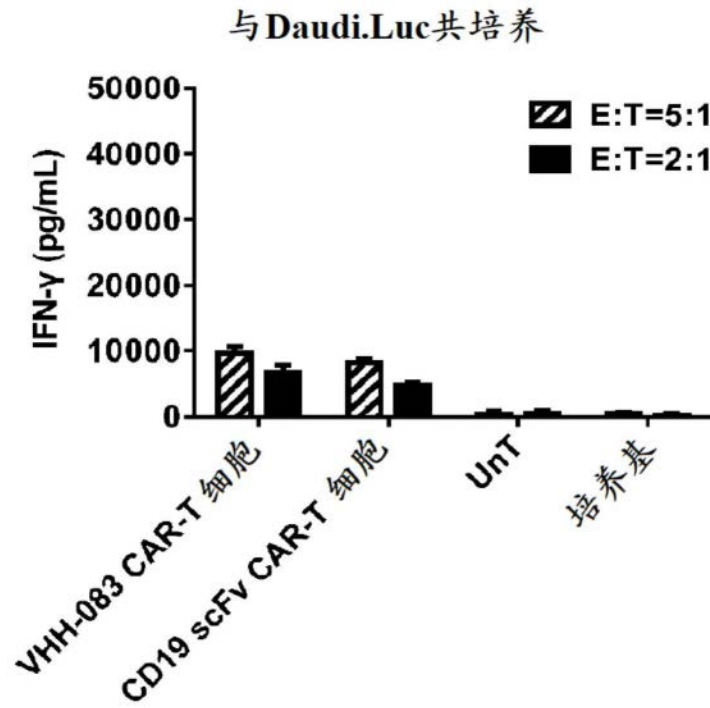


图4A

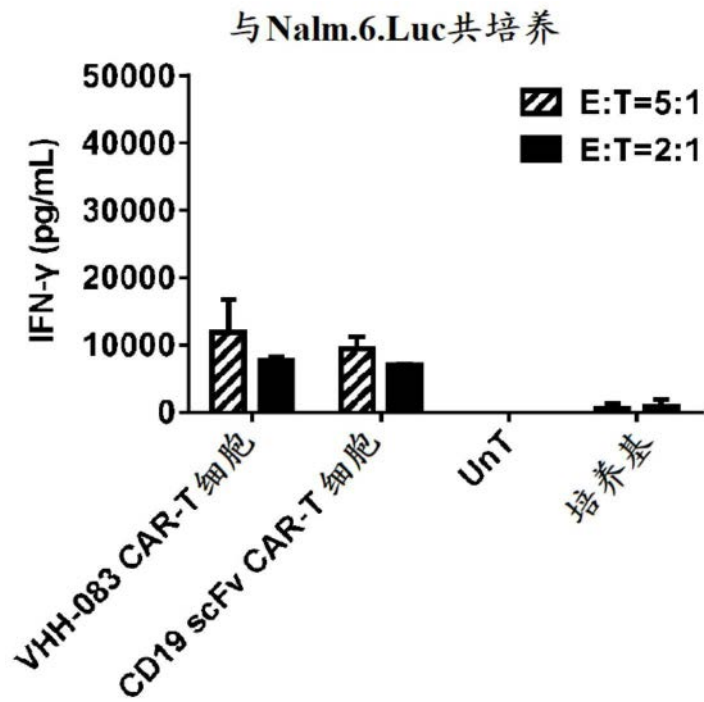


图4B

与不同的细胞共培养

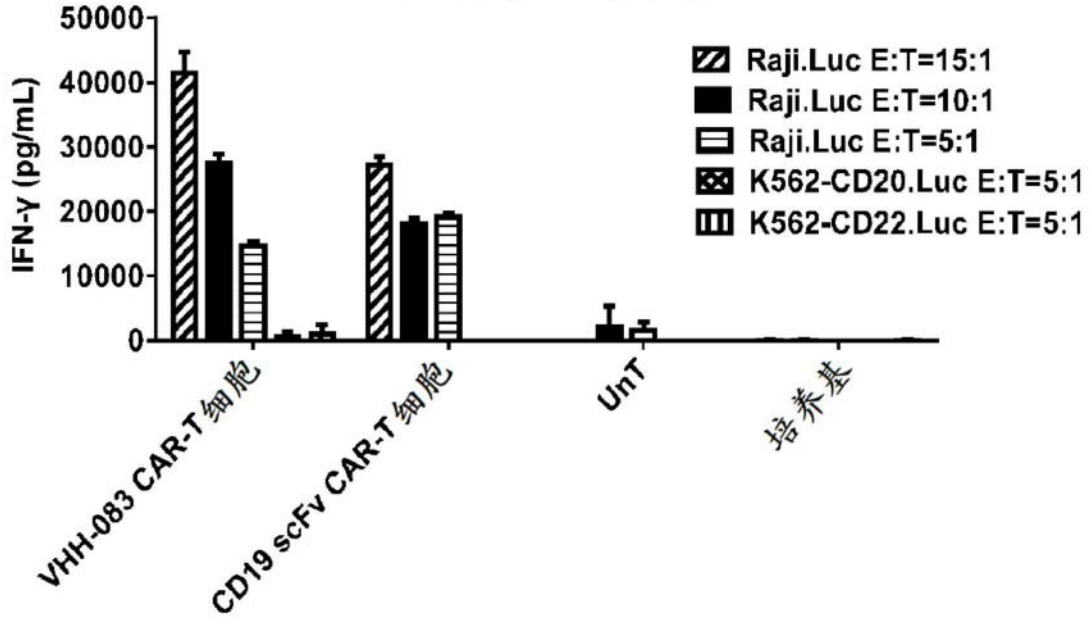


图4C

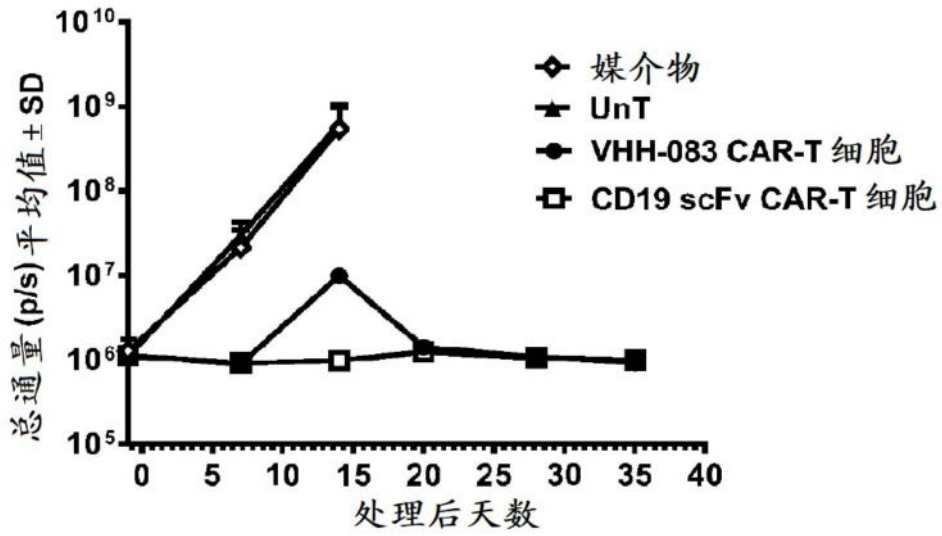


图5A

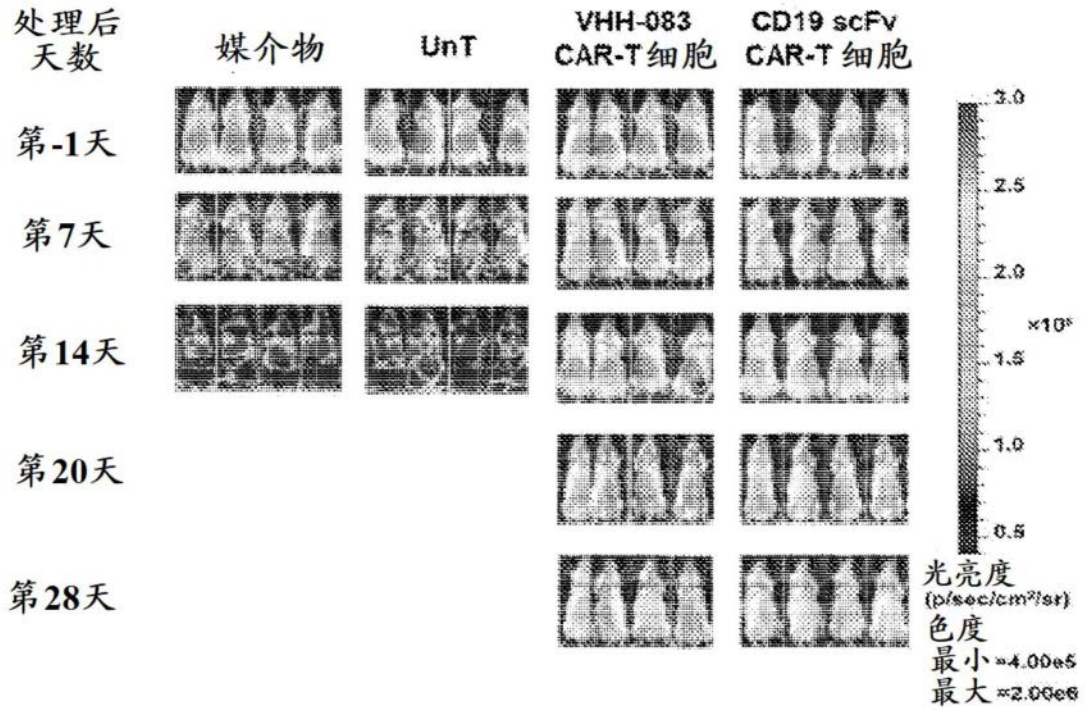


图5B

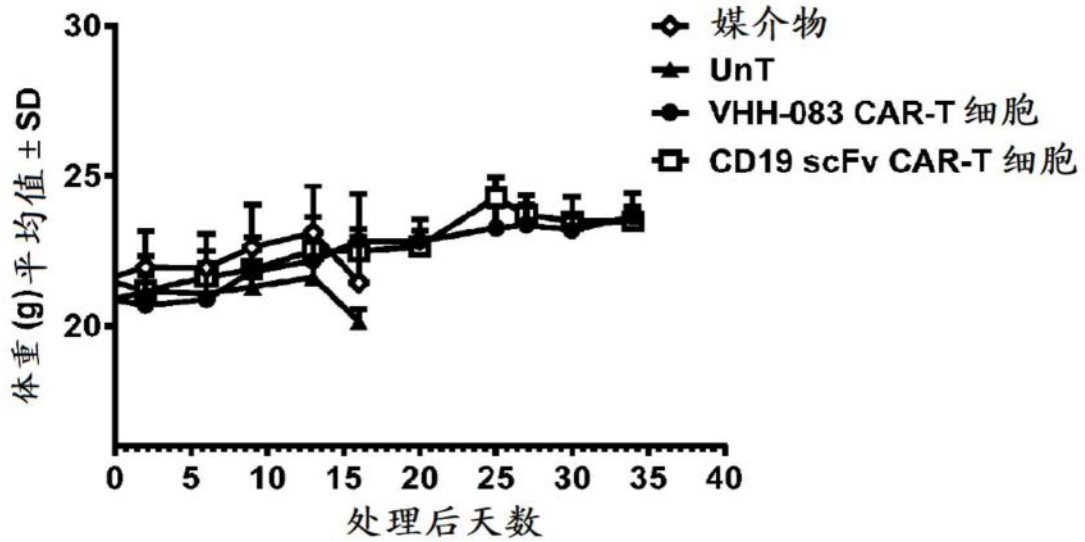


图5C

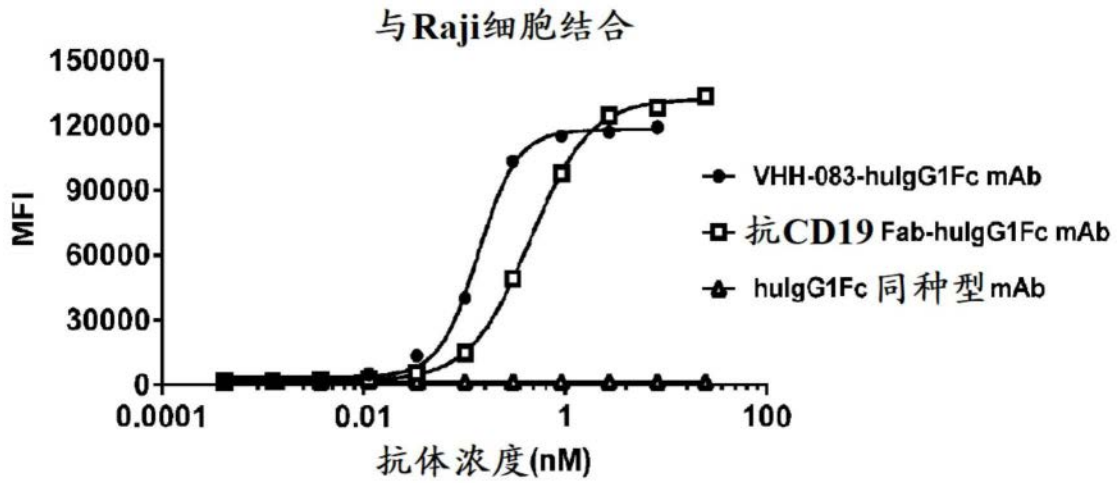


图6A

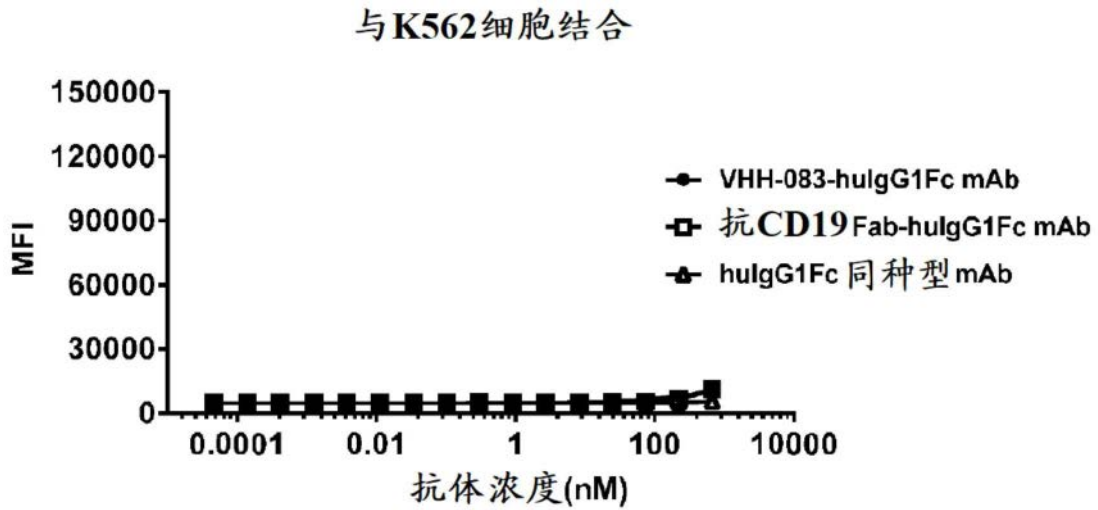


图6B

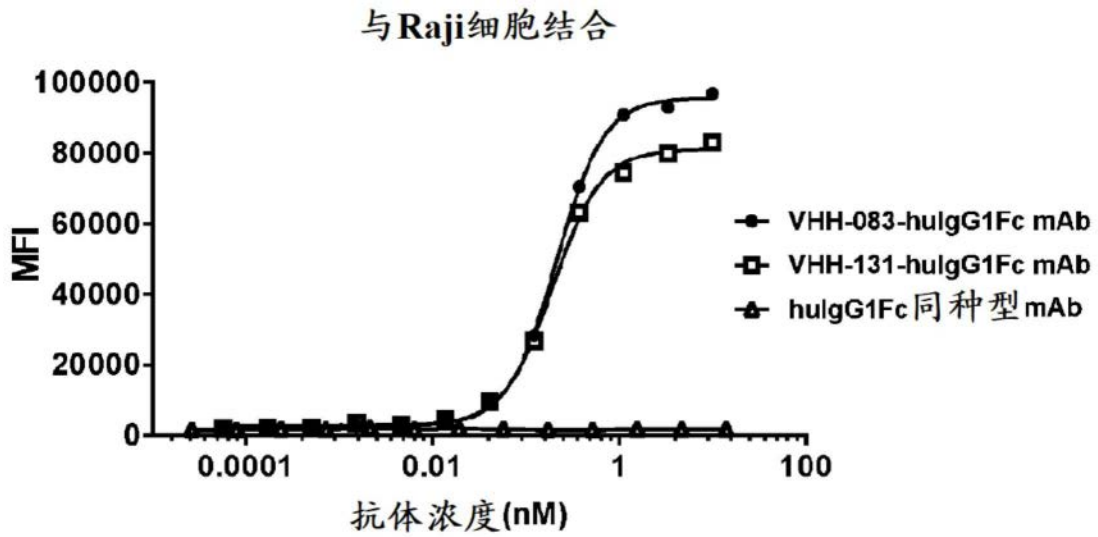


图6C

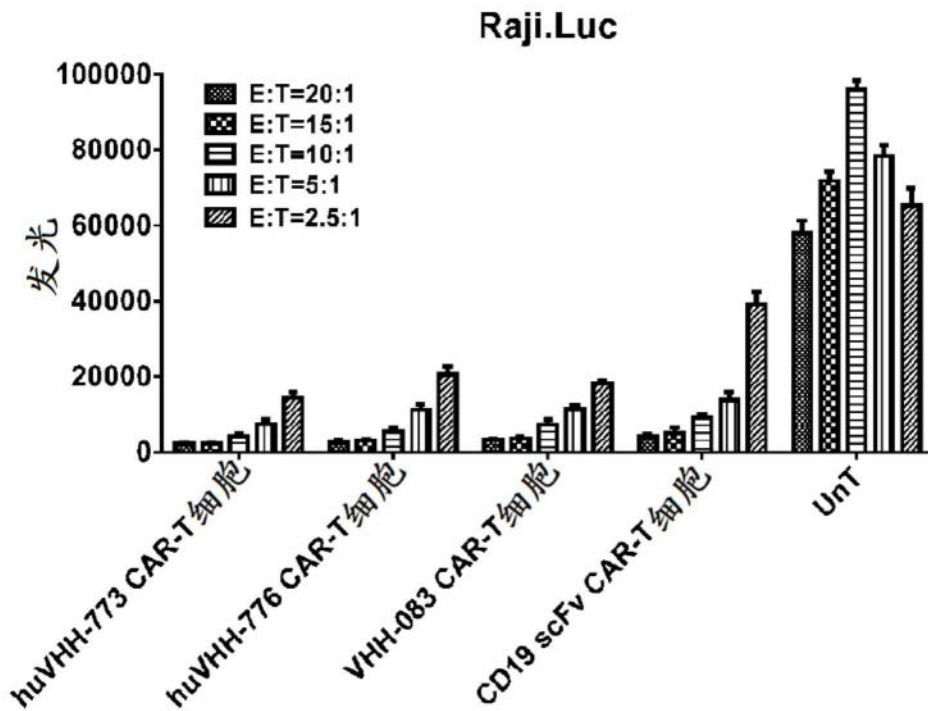


图7A

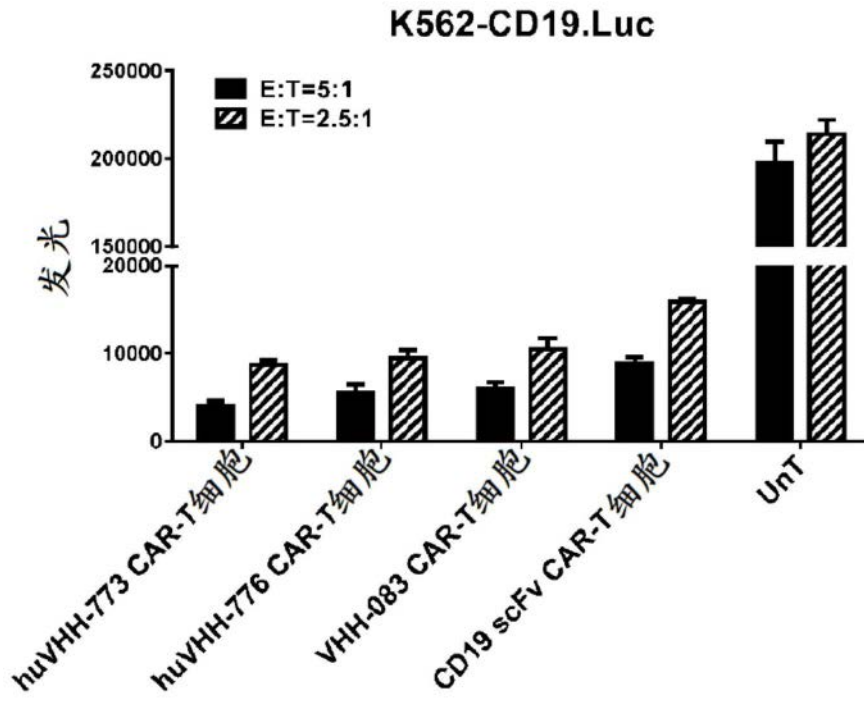


图7B

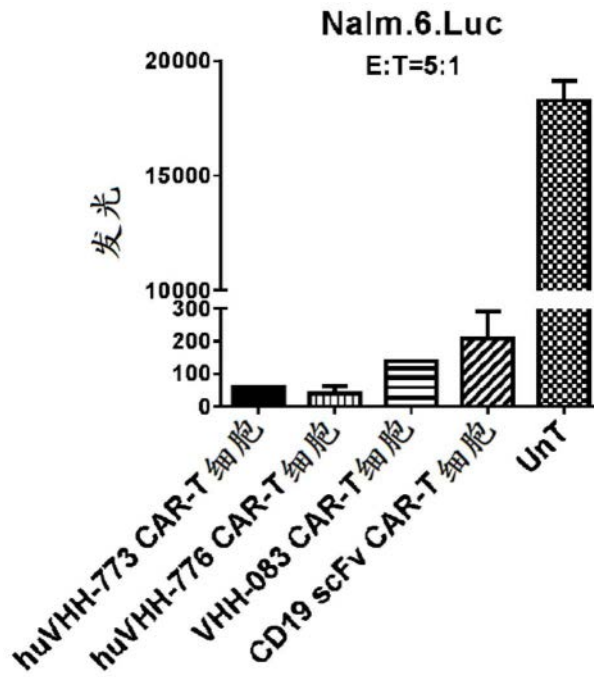


图7C

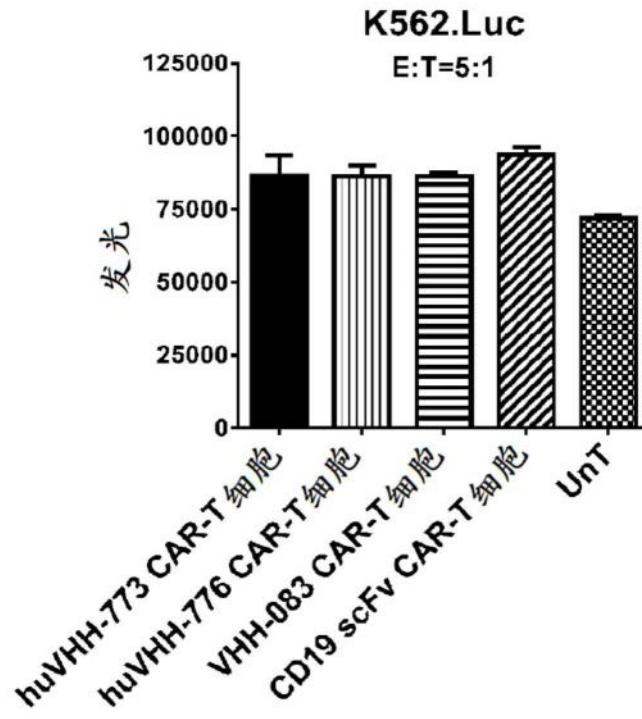


图7D