



(10) 授权公告号 CN 110582280 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 19

(21) 申请号 201880028993.X

(22) 申请日 2018.03.30

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110582280 A

(43) 申请公布日 2019.12.17

(30) 优先权数据  
62/479,930 2017.03.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.10.31

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2018/025394 2018.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/183842 EN 2018.10.04

(73) 专利权人 小利兰·斯坦福大学托管委员会  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 瑞秋·琳恩 克里斯托·麦考尔  
埃文·温伯 桑杰·马尔霍特拉

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363  
专利代理师 郭放 许伟群

(51) Int.Cl.  
A61K 31/497 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2015140071 A1,2015.05.21  
W0 2016011264 A1,2016.01.21  
W0 2016111645 A1,2016.07.14  
W0 2017025638 A1,2017.02.16  
CN 106535925 A,2017.03.22  
Schade, AE et al..Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation.《BLOOD 》.2008,第111卷(第3期),第1366-1377页.

审查员 肖愿

权利要求书1页 说明书25页  
序列表12页 附图25页

(54) 发明名称

通过抑制或调节T细胞受体信号传导来治疗  
T细胞耗竭的方法

(57) 摘要

本文提供了用于预防或逆转T细胞耗竭的组合物和方法。特别地,本发明涉及通过使经历T细胞耗竭的T细胞暴露于特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)或通过特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增遗传工程化的T细胞来预防或逆转T细胞耗竭的方法。

1. 达沙替尼或普纳替尼与遗传工程化的T细胞群体的组合在制备用于预防和/或逆转人类受试者中的所述遗传工程化的T细胞群体的T细胞耗竭的药物中的应用,其中所述遗传工程化的T细胞群体包括表达遗传工程化的TCR或CAR的T细胞,并且其中所述达沙替尼或普纳替尼抑制工程化TCR信号传导或工程化CAR信号传导,从而预防和/或逆转所述遗传工程化的T细胞群体耗竭。

2. 如权利要求1所述的应用,其中所述达沙替尼或普纳替尼增加所述受试者中所述遗传工程化的T细胞群体对IL-2的分泌。

3. 如权利要求1所述的应用,其中所述达沙替尼或普纳替尼减少所述受试者中所述遗传工程化的T细胞群体的细胞凋亡。

4. 如权利要求1所述的应用,其中所述达沙替尼或普纳替尼降低选自由PD-1、TIM-3和LAG-3组成的组的至少一种T细胞耗竭标记物的表达。

5. 如权利要求1所述的应用,其中所述达沙替尼或普纳替尼增加CD62L或CCR7的表达。

6. 如权利要求1所述的应用,其中所述人类受试者患有慢性感染或癌症。

7. 一种产生适用于过继性T细胞疗法的方法,所述方法包括:

体外扩增遗传工程化的T细胞的初始群体,其中所述遗传工程化的T细胞表达遗传工程化的TCR或CAR,其中在体外扩增期间,所述遗传工程化的T细胞短暂暴露于达沙替尼或普纳替尼,以及其中所述达沙替尼或普纳替尼能够抑制工程化TCR信号传导或工程化CAR信号传导,从而生成适用于过继性T细胞疗法的T细胞群体。

8. 权利要求7所述的方法所生成的T细胞群体在制备用于治疗免疫系统相关疾患或疾病的药物中的应用,其中治疗免疫系统相关疾患或疾病包括向受试者施用有效量的T细胞群体。

9. 如权利要求8所述的应用,其用于制备用于过继性T细胞疗法的药物。

10. 如权利要求9所述的应用,其中所述过继性T细胞疗法是CAR T细胞疗法。

11. 如权利要求8所述的应用,其中所述免疫系统相关疾患或疾病为癌症或自身免疫性疾病或疾患。

## 通过抑制或调节T细胞受体信号传导来治疗T细胞耗竭的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年3月31日提交的美国临时申请序列号62/479,930的权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本文提供了用于预防或逆转T细胞耗竭的组合物和方法。特别地,本发明涉及通过使经历T细胞耗竭的T细胞暴露于特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)或通过特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增遗传工程化的T细胞来预防或逆转T细胞耗竭的方法。

### 背景技术

[0004] T细胞是在与抗原接合后经由T细胞受体(TCR)信号传导变得活化的免疫细胞。通过T细胞受体的生理活化使T细胞能够介导有效的抗肿瘤或抗感染作用。在急性炎症应答消退期间,活化的效应T细胞的亚群分化成长寿命记忆细胞。相比之下,在患有慢性感染或癌症的患者中,T细胞很少经历朝向功能障碍状态的病理分化,其一直被称为T细胞耗竭。T细胞耗竭的特征在于代谢功能、转录编程、效应子功能丧失(例如,细胞因子分泌、杀伤能力)以及多种表面抑制性受体的共表达的显著变化。T细胞耗竭的根本原因是持续抗原暴露,从而导致持续的TCR信号传导。T细胞耗竭的预防或逆转长期以来一直被寻求作为增强癌症或慢性感染患者中的T细胞有效性的手段。

[0005] 本发明解决了这一紧急需求。

### 发明内容

[0006] 免疫细胞对外来抗原的存在具有广泛范围的应答,包括预先形成的和新形成的介质的分泌、颗粒的吞噬作用、内吞作用、针对靶细胞的细胞毒性以及细胞增殖和/或分化。T细胞是细胞的亚组,其与其他免疫细胞类型(例如,多形核、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、B细胞和NK细胞)一起构成免疫系统的细胞组分(参见例如,美国专利号6,057,294;美国专利申请20050070478)。在生理条件下,T细胞在免疫监视和消除外来抗原中起作用。但是,在病理条件下,存在令人信服的证据表明T细胞在疾病的病因和传播中起主要作用。在这些病症中,中枢或外周T细胞免疫耐受性的破坏是导致自身免疫性疾病的基本过程。

[0007] 众所周知,T细胞受体(TCR)接合和共刺激信号传导提供了调控T细胞活化、增殖和细胞溶解功能的关键信号。T细胞经由由配体结合的T细胞受体(TCR)二硫键连接的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基(或 $\gamma$   $\delta$ T细胞中的 $\gamma$ 和 $\delta$ 亚基)组成的多肽复合物对抗原作出反应,所述亚基每个亚基具有单跨膜(TM)跨度和小的细胞内尾部,并与异二聚体(CD3  $\gamma$   $\epsilon$ 和CD3 $\delta$   $\epsilon$ )和同二聚体( $\zeta$   $\zeta$ )信号传导亚基非共价结合(参见例如,Cambier J.C.Curr Opin Immunol 1992;4:257-64)。CD3 $\epsilon$ 、 $\delta$ 和 $\gamma$ 链具有单个Ig家族细胞外结构域、单个大概 $\alpha$ -螺旋TM跨度和40-60个残基的固

有无序的细胞内结构域,而每个 $\zeta$ 亚基具有携带亚基间二硫键的小的细胞外区(9个残基)、每个亚基单个大概 $\alpha$ -螺旋TM跨度以及大约110个残基的大的固有无序的细胞质结构域。因此,对TCR介导的TM信号转导和随后的T细胞活化(导致T细胞增殖和分化)的过程的理解对于健康和疾病两者均至关重要。TCR信号传导的紊乱可导致炎症和其他T细胞相关病症。

[0008] 由于受体簇集,以高水平表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞经历强直性、不依赖抗原的信号传导。此类T细胞由于T细胞耗竭而功能不佳,如由高水平的PD-1、TIM-3、LAG-3、抗原诱导的细胞因子产生减少以及过度的程序性细胞死亡所证明。可通过将CAR相关的TCR信号传导蛋白(例如TCR $\zeta$ )瞬时降低至低于强直性信号传导所需的阈值的水平来预防强直性信号传导。

[0009] 在开发本发明的实施方案的过程期间进行的实验表明,用抑制T细胞受体信号传导的特定酪氨酸激酶抑制剂(例如,Lck酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼)) (例如,Src家族酪氨酸激酶抑制剂)进行治疗)减少T细胞耗竭标记物的表达并改善T细胞记忆的形成。因此,本发明涉及通过瞬时抑制T细胞受体(TCR)信号传导以用特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)恢复T细胞功能来预防或逆转T细胞耗竭的方法。

[0010] 另外的实验确定,在达沙替尼或普纳替尼存在下与肿瘤细胞共培养的CAR T细胞表现出减弱的活化和脱粒、不能分泌细胞因子并且展示响应于肿瘤抗原的杀伤减弱。

[0011] 另外的实验确定,达沙替尼可有效抑制CAR交联后CAR CD3z以及远端信号传导蛋白的磷酸化。

[0012] 另外的实验确定,在达沙替尼存在下扩增的强直性信号传导CAR T细胞以剂量依赖的方式表现出经典耗竭标记物表达的减少、保留形成记忆的能力、展示增强的响应于肿瘤抗原的细胞因子分泌并且展示增强的细胞毒性。

[0013] 另外的实验确定,体内达沙替尼治疗遏制耗竭标记物表达、增强记忆形成并促进细胞存活/增殖。

[0014] 因此,本文提供了用于预防或逆转T细胞耗竭的组合物和方法。特别地,本发明涉及通过使经历T细胞耗竭的T细胞暴露于特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)或通过在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增遗传工程化的T细胞来预防或逆转T细胞耗竭的方法。

[0015] 在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗受试者以减轻T细胞耗竭的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂。此类实施方案不限于特定的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导和/或CAR信号传导。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Lck激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Fyn抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Src家族酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。在一些实施方案中,所述治疗是预防性的。

[0016] 此类方法不限于治疗所述受试者的T细胞耗竭的特定方式。在一些实施方案中,治疗增加所述受试者中T细胞对IL-2的分泌。在一些实施方案中,治疗减少所述受试者中T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中,治疗降低选自由PD-1、TIM-3和LAG-3组成的组的至少一种T细胞耗竭标记物的表达。在一些实施方案中,治疗增加CD62L或CCR7的表达。

[0017] 此类方法不限于特定的施用方式。在一些实施方案中,向所述受试者施用多个治

疗周期。在一些实施方案中,间歇地施用所述酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,施用所述酪氨酸激酶抑制剂持续足以恢复至少部分T细胞功能的一段时间,然后停止。在一些实施方案中,口服施用所述酪氨酸激酶抑制剂。

[0018] 此类方法不限于特定类型或种类的受试者。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者患有慢性感染或癌症。

[0019] 在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗受试者中的免疫系统相关疾患或疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用遗传工程化的T细胞和治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂。此类实施方案不限于特定的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导和/或CAR信号传导。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Lck激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Fyn抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Src家族酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。在一些实施方案中,所述治疗是预防性的。在一些实施方案中,同时和/或在不同时间点施用所述酪氨酸激酶抑制剂和所述遗传工程化的T细胞。

[0020] 此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞,和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0021] 此类方法不限于治疗特定的免疫系统相关疾患或疾病。在一些实施方案中,所述免疫系统相关疾患或疾病选自癌症或自身免疫性疾病或疾患。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供了用于预防和/或逆转与施用至受试者的遗传工程化的T细胞相关的毒性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂。此类实施方案不限于特定的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导和/或CAR信号传导。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Lck激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Fyn抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Src家族酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。

[0023] 此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞,和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0024] 此类方法不限于特定类型或种类的过继性T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是CAR T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是转导T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法。

[0025] 此类方法不限于与施用至受试者的遗传工程化的T细胞相关的特定类型或种类的毒性。在一些实施方案中,所述与施用至受试者的遗传工程化的T细胞相关的毒性是细胞因子释放综合征。在一些实施方案中,所述与施用至受试者的遗传工程化的T细胞相关的毒性是中靶脱肿瘤(on-target off tumor)毒性或脱靶脱肿瘤(off-target off-tumor)毒性。

[0026] 在某些实施方案中,本发明提供了包含遗传工程化的T细胞群体的组合物,其中所

述遗传工程化的T细胞群体在酪氨酸激酶抑制剂存在下扩增。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导和/或CAR信号传导抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。

[0027] 在某些实施方案中,本发明提供了产生对T细胞耗竭具有抗性的遗传工程化的T细胞群体的方法,所述方法包括在酪氨酸激酶抑制剂存在下扩增遗传工程化的T细胞群体。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导和/或CAR信号传导抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞,和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。此类方法不限于特定的扩增技术,因为此类技术是本领域中众所周知的。

[0028] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗经历过继性T细胞疗法的受试者中的免疫系统相关疾患或疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用在酪氨酸激酶抑制剂存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂能够抑制TCR信号传导抑制剂和/或CAR信号传导。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Lck激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Fyn抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是Src家族酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼或普纳替尼。在一些实施方案中,所述免疫系统相关疾患或疾病选自癌症或自身免疫性疾病或疾患。

[0029] 此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞,和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0030] 此类方法不限于特定类型或种类的过继性T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是CAR T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是转导T细胞疗法。在一些实施方案中,所述过继性T细胞疗法是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法。

[0031] 本发明考虑使用遗传工程化的T细胞群体和包含特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物使患有癌症(例如,和/或癌症相关病症)的动物(例如,人)暴露于过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法)将完全抑制癌细胞或支持细胞的生长和/或使此类细胞作为群体更容易受到癌症治疗药物或放射疗法的诱导细胞死亡的活性的影响。在此类实施方案中,所述方法产生改善的治疗结果,因为此类特定酪氨酸激酶抑制剂能够1) 调节遗传工程化的T细胞群体内的TCR信号传导(例如,降低PD-1、TIM-3和LAG-3中的一者或多者的表达;增加记忆标记物(例如,CD62L或CCR7)的表达;增加IL-2和其他细胞因子的分泌),以及2) 预防和/或逆转所述遗传工程化的T细胞群体内的T细胞耗竭。因此,本发明提供了用于在受试者中使用过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法)治疗癌症(例如,和/或癌症相关病症)的方法,所述方法包括向所述受试者(例如,同时和/或在不同时间点)施用遗传工程化的T细胞、特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和另

外的癌症治疗药物或放射疗法。

[0032] 本发明考虑使用在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体使患有癌症(例如,和/或癌症相关病症)的动物(例如,人)暴露于过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法)将完全抑制癌细胞或支持细胞的生长和/或使作为群体的此类细胞更容易受到癌症治疗药物或放射疗法的诱导细胞死亡的活性的影响。在此类实施方案中,所述方法产生改善的治疗结果,因为此类遗传工程化的T细胞群体对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭。因此,本发明提供了用于在受试者中使用过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法)治疗癌症(例如,和/或癌症相关病症)的方法,所述方法包括向所述受试者(例如,同时和/或在不同时间点)施用在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体和另外的癌症治疗药物或放射疗法。

[0033] 本发明考虑此类方法(例如,使用遗传工程化的T细胞群体和包含特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物的过继性T细胞疗法)(例如,使用在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的过继性T细胞疗法)当作为单一疗法施用或当与另外的剂(诸如其他诱导细胞死亡或扰乱细胞周期的癌症治疗药物或放射疗法)呈时间关系(组合疗法)施用时满足用于治疗多种癌症类型的未满足的需求,从而与仅用单独癌症治疗药物或放射疗法治疗的动物中相应比例的细胞相比,使更大比例的癌细胞或支持细胞更易执行细胞凋亡程序。

[0034] 在本发明的某些实施方案中,用此类方法(例如,使用遗传工程化的T细胞群体和包含特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物的过继性T细胞疗法)(例如,使用在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的过继性T细胞疗法)组合治疗动物与用单独抗癌药物/放射治疗的那些动物相比,在此类动物中产生更大的肿瘤应答和临床益处。由于所有批准的抗癌药物和放射治疗的剂量都是已知的,因此本发明考虑用此类方法将它们进行各种组合。

[0035] 癌症(例如,和/或癌症相关病症)的非限制性示例性列表包括但不限于胰腺癌(pancreatic cancer)、乳腺癌(breast cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、淋巴瘤、皮肤癌、结肠癌(colon cancer)、黑素瘤、恶性黑素瘤、卵巢癌、脑癌、原发性脑癌、头颈癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌、膀胱癌(bladder cancer)、非小细胞肺癌、头部或颈部癌、乳腺癌(breast carcinoma)、卵巢癌、肺癌、小细胞肺癌、维尔姆斯肿瘤(Wilms'tumor)、宫颈癌、睾丸癌、膀胱癌(bladder carcinoma)、胰腺癌(pancreatic carcinoma)、胃癌、结肠癌(colon carcinoma)、前列腺癌(prostatic carcinoma)、泌尿生殖系统癌、甲状腺癌、食管癌、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、肾上腺癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、恶性胰腺胰岛瘤、恶性类癌、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、恶性高钙血症、宫颈增生、白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、毛细胞白血病、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、卡波济氏肉瘤、真性红细胞增多症、特发性血小板增多症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、成骨肉瘤、原发性巨球蛋白血症和成视网膜细胞瘤等、T和B细胞介导的自身免疫性疾病;炎性疾病;感染;过度增生性疾病;AIDS;退行性疾患、血管疾病等。在一些实施方案中,被治疗的癌

细胞是转移性的。在其他实施方案中,被治疗的癌细胞对抗癌剂具有抗性。

## 附图说明

[0036] 图1:GD2.28z.FKBP CAR的表征。在活化后第1天,用编码GD2.28z.FKBP CAR的慢病毒转导T细胞,且随后在生长培养基中用各种浓度的shield-1培养。在第7天,经由FACS定量CAR表达。

[0037] 图2:从培养基中除去S1产生T细胞耗竭标记物表面表达的逆转。

[0038] 图3:从培养基中除去S1使得维持CD62L表达并防止细胞凋亡。

[0039] 图4:从培养基中除去S1产生功能T细胞耗竭的逆转。

[0040] 图5:与PD-1/PDL-1阻滞相比,除去表面CAR使得更有效地预防T细胞耗竭。

[0041] 图6:在仅4天后,除去表面CAR挽救PD-1/TIM-3/LAG-3三阳性CAR T细胞的耗竭。

[0042] 图7:达沙替尼抑制CAR T细胞响应于肿瘤抗原的细胞因子分泌。

[0043] 图8:达沙替尼逆转耗竭标记物表达和共表达。

[0044] 图9:达沙替尼处理使得维持CD62L表达。

[0045] 图10:达沙替尼处理产生响应于肿瘤抗原增强的IL-2和IFN  $\gamma$  分泌。

[0046] 图11:在达沙替尼或普纳替尼存在下与肿瘤细胞共培养的CAR T细胞表现出减弱的活化和脱粒。如图所示,将CD19.28z CAR T细胞在存在或不存在各种浓度的达沙替尼或普纳替尼的情况下培养至少48小时。然后将CAR T细胞与带有CD19的Nalm6肿瘤细胞一起共培养6小时。随后经由FACS评估CD69和CD107a表面表达。图展示在CD8+CAR+群体上调控的细胞。此类结果证明,响应于肿瘤,80%的CD19.28z CAR T细胞变得活化(表面CD69是活化的替代物)并脱粒(表面CD107a是脱粒的替代物)。但是,达沙替尼和普纳替尼剂量依赖性地抑制CAR T细胞以这种方式对肿瘤作出反应的能力。

[0047] 图12:在达沙替尼或普纳替尼存在下与肿瘤细胞共培养的CAR T细胞不能分泌细胞因子。如图所示,将高亲和力GD2.28z (HA-GD2.28z) CAR T细胞在存在或不存在各种浓度的达沙替尼或普纳替尼的情况下与过表达GD2的nalm6一起共培养24小时。然后收集上清液并经由ELISA对IL-2和IFN $\gamma$ 进行分析。这些结果表明,使用HA-GD2.28zCAR、达沙替尼和普纳替尼抑制CAR T细胞响应于肿瘤对IL-2和IFN $\gamma$ 的分泌。

[0048] 图13:在达沙替尼存在下培养的CAR T细胞展示响应于肿瘤抗原的减弱的杀伤。进行incucyte测定,其中在1 $\mu$ M达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下将CD19.BBz CAR T细胞与表达GFP报告基因的nalm6肿瘤细胞一起共培养72小时。随时间推移测量肿瘤GFP荧光。将GFP值标准化至第一时间点的荧光强度。这些结果证明,达沙替尼使CD19.28z CAR杀死肿瘤细胞的能力减弱。图11、12和13证明达沙替尼或普纳替尼可充当在给定患者中具有有害作用的CAR T细胞的快速且可逆的安全性“关闭”开关。

[0049] 图14:达沙替尼有效抑制CAR交联后CAR CD3z以及远端信号传导蛋白的磷酸化。在活化后第10天,将在1 $\mu$ M达沙替尼或媒介物中培养的2E6 HA-GD2.28z CAR T细胞从培养物中除去。然后将独特型第一抗体和交联第二抗体以5 $\mu$ g/mL添加至细胞中,以起始通过CAR的信号传导。如此处所示,达沙替尼有效抑制CAR上CD3z结构域的交联诱导的磷酸化,以及远端信号传导激酶Akt和ERK1/2的磷酸化。这是n=3个独立实验的代表性印迹。

[0050] 图15:在达沙替尼存在下扩增的强直性信号传导CAR T细胞以剂量依赖性方式表

现出经典耗竭标记物表达的减少。使HA-GD2.28z CAR T细胞在各种浓度的达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下扩增。在活化后第14天,将细胞从培养物中移除,染色,并经由FACS分析它们的耗竭表型。来自3个独立实验的代表性印迹。图15A:CAR+T细胞经典耗竭标记物表达。图15B:CAR+CD4+ (左) 或CAR+CD8+ (右) 耗竭标记物共表达。这些结果证明,HA-GD2.28z CAR在不存在抗原的情况下强直性地发出信号,其最终诱导如由多种抑制性受体的表达、记忆形成的缺乏和效应子功能降低所定义的T细胞耗竭。图14证明在达沙替尼存在下扩增HA-GD2.28z CAR T细胞剂量依赖性地减弱耗竭标记物单一表达(a) 或共表达(b)。

[0051] 图16:在达沙替尼存在下扩增的强直性信号传导CAR T细胞保留形成记忆的能力。使CD19.28z or HA-GD2.28z在存在或不存在1uM达沙替尼或媒介物(DMSO)的情况下扩增。在活化后第14天,将细胞从培养物中移除用于FACS分析。这一代表性图显示出CAR+T细胞。红色框突出显示CD45RA低、CCR7高群体,所述群体对应于中心记忆样T细胞。这些结果证明,在达沙替尼中扩增强直性信号传导HA-GD2.28z CAR T细胞也增强记忆形成,此处通过CD45RA低、CCR7高群体(其对应于中心记忆样表型)的明显增加所证明。

[0052] 图17:在达沙替尼存在下扩增的强直性信号传导CAR T细胞展示响应于肿瘤抗原增强的细胞因子分泌。使HA-GD2.28z CAR T细胞在存在或不存在各种浓度的达沙替尼或普纳替尼的情况下扩增。在与过表达GD2的nal6m6肿瘤细胞共培养前24小时从T细胞中除去药物,以使T细胞恢复响应于肿瘤信号传导的能力。在24小时后,收集上清液并经由ELISA评估IL-2和IFN $\gamma$ 分泌。图11、12、13、15和16证明达沙替尼和普纳替尼可抑制CAR T细胞信号传导和功能。图17示出在这些药物存在下强直性信号传导HA-GD2.28z CAR T细胞的扩增、然后在与肿瘤细胞共培养之前除去药物使得IL-2和IFN $\gamma$ 增加。

[0053] 图18:在达沙替尼存在下扩增的强直性信号传导CAR T细胞展示增强的细胞毒性。使HA-GD2.28z CAR T细胞在存在或不存在达沙替尼或媒介物(DMSO)的情况下扩增96小时。在活化后第14天,在incucyte测定之前24小时从T细胞中除去达沙替尼,在所述测定中,将T细胞与过表达GD2的nal6m6肿瘤以1:8的E:T比例共培养。随时间推移测量肿瘤GFP荧光。将GFP值标准化至第一时间点的荧光强度。这些结果证明,通过在扩增期间在培养基中包含达沙替尼、然后在共培养之前除去达沙替尼来抑制HA-GD2.28z CAR T细胞的强直性信号传导挽救这些CAR T细胞杀死肿瘤的能力。

[0054] 图19:在存在和不存在达沙替尼的情况下,过表达GD2的Na1m6。将0.5E6 143B肿瘤细胞肌肉内植入小鼠腿部。在植入后第3天,将在达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下扩增的10E6 GD2.BBz CAR T细胞静脉内输注到小鼠中。左图展示平均腿部面积 $\pm$  SEM(n=5只小鼠)。图19和20概括在体内环境中来自图14、15、16和17的发现。在达沙替尼中培养不同类型的CAR(GD2.BBz、HA-GD2.28z)且然后在体内输注它们增强其抗肿瘤功能。

[0055] 图20A:将0.5E6 143B肿瘤细胞肌肉内植入小鼠腿部。在植入后第3天,将在达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下扩增的10E6 HA-GD2.28z CAR T细胞静脉内输注到小鼠中。上图展示平均腿部面积 $\pm$  SEM(n=5只小鼠)。图19和20概括在体内环境中来自图14、15、16和17的发现。在达沙替尼中培养不同类型的CAR(GD2.BBz、HA-GD2.28z)且然后在体内输注它们增强其抗肿瘤功能。

[0056] 图20B:将过表达1E6 GD2的nal6m6肿瘤细胞静脉内植入小鼠中。在植入后第3天,将在达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下扩增的2E6 CAR+HA-GD2.28z CAR T细胞静脉内输注到

小鼠中。上图展示平均肿瘤荧光 $\pm$ SEM ( $n=5$ 只小鼠)。图19和20概括在体内环境中来自图14、15、16和17的发现。在达沙替尼中培养不同类型的CAR (GD2.BBz、HA-GD2.28z) 且然后在体内输注它们增强其抗肿瘤功能。

[0057] 图21:将过表达1E6 GD2的na1m6肿瘤细胞静脉内植入小鼠中。在植入后第3天,将在达沙替尼或媒介物(DMSO)存在下扩增的2E6 HA-GD2.28z CAR T细胞静脉内输注到小鼠中。在植入后第17天,从每只小鼠中采集血液样品并与计数珠混合。进行FACS分析,并计算每只小鼠的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞的数量。此图展示每只小鼠的平均CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞 $\pm$ SEM ( $n=5$ 只小鼠)。图21示出达沙替尼增强功能的机制之一。在将达沙替尼处理的CAR T细胞输注到小鼠中后,采集血液样品并分析循环CAR T细胞的数量,所述数量是响应于肿瘤体内CAR T细胞增殖的典型读数。媒介物HA-GD2.28z CAR T细胞并未表现出比模拟T细胞显著更多的体内增殖,因为这些细胞在它们最初输注到小鼠中时很可能耗竭。然而,在达沙替尼中扩增的CAR T细胞保留其抗肿瘤功能并且因此在体内稳健地增殖。

[0058] 图22A、22B、22C、22D、22E:体内达沙替尼处理遏制耗竭标记物表达、增强记忆形成并促进细胞存活/增殖。经由静脉内注射向小鼠植入过表达1E6 GD2的na1m6肿瘤细胞。在植入后第4天,将2E6 HA-GD2.28z CAR T细胞静脉内输注到小鼠中。在肿瘤植入后第21-23天经由腹膜内注射向小鼠给予50mg/kg达沙替尼。在第23天达沙替尼给药后5小时,处死1只接受媒介物的小鼠和1只接受达沙替尼的小鼠,并且收获脾脏/血液、进行表面染色并经由FACS进行表型分析。A和C)与媒介物对照相比,在用达沙替尼处理的小鼠中,CAR<sup>+</sup>T细胞占总循环细胞(A)或总脾细胞(C)的百分比更高。B和D)与用媒介物(红色)处理的小鼠相反,在达沙替尼处理的小鼠(蓝色)中循环或脾CD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>T细胞表现出与未活化或静息T细胞一致的表型,从而表明达沙替尼在体内遏制CAR T细胞活化并诱导记忆形成(即,更高的CD62L表达)。E)在肿瘤植入后第27-29天,1只小鼠每天接受50mg/kg达沙替尼,并且不同的小鼠接受媒介物对照。在第30-32天,未处理小鼠。在第32天,评估肿瘤发光。3天的达沙替尼给药足以诱导抗肿瘤应答的稳健恢复(蓝色)。这些数据表明达沙替尼的重复给药可在体内恢复耗竭的T细胞。

[0059] 图23:CD19.28z (FMC63 scFv)的核酸和氨基酸序列。

[0060] 图24:CD19.BBz (FMC63 scFv)的核酸和氨基酸序列。

[0061] 图25:GD2.BBz (14G2a scFv)的核酸和氨基酸序列。

[0062] 图26:HA-GD2.28z (高亲和力14G2a scFv)的核酸和氨基酸序列。

[0063] 定义

[0064] 必须注意,如在本说明书以及所附权利要求书中所使用的,除非上下文明确地另外指明,否则单数形式“一个/种(a/an)”以及“所述”包括复数个指示物。因此,例如,提及“T细胞”包括两个或更多个T细胞等。

[0065] 尤其有关给定量的术语“约”意指涵盖加或减5%的偏差。

[0066] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指被工程化以在免疫效应细胞上表达并特异性地结合抗原的人工T细胞受体。CAR可用作使用过继性细胞转移的疗法。从患者中取出T细胞并进行修饰,以使得它们表达对特定形式的抗原具有特异性的受体。例如,在一些实施方案中,已经以对肿瘤相关抗原的特异性表达了CAR。CAR也可包含细胞内活化结构域、跨膜结构域以及包含肿瘤相关抗原结合区的细胞外结构域。CAR设计的特异性可源自

受体(例如肽)的配体。在一些实施方案中,CAR可通过重定向表达对肿瘤相关抗原具有特异性的CAR的T细胞的特异性来靶向癌症。

[0067] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可任选地包含在本发明的组合物中并且不会引起对患者的显著有害毒理学作用的赋形剂。

[0068] “药学上可接受的盐”包括但不限于氨基酸盐;用无机酸制备的盐,如氯化物、硫酸盐、磷酸盐、二磷酸盐、溴化物和硝酸盐;或由前述中任一者的相应无机酸形式制备的盐,例如盐酸盐等;或用有机酸制备的盐,如苹果酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙基琥珀酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、对甲苯磺酸盐、双羧萘酸盐(palmoate)、水杨酸盐和硬脂酸盐,以及依托酸盐(estolates)、葡萄糖酸盐 and 乳糖醛酸盐。类似地,含有药学上可接受的阳离子的盐包括但不限于钠、钾、钙、铝、锂以及铵(包括取代的铵)。

[0069] 术语“T细胞”是指如本领域中定义的T淋巴细胞,并且意图包括胸腺细胞、未成熟的T淋巴细胞、成熟的T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或活化的T淋巴细胞。T细胞可以是CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>细胞。T细胞还可以是T辅助细胞,如T辅助1 (TH1) 细胞或T辅助2 (TH2) 细胞或TH17细胞,以及细胞毒性T细胞,调控性T细胞、自然杀伤T细胞、初始T细胞、记忆T细胞或  $\gamma \delta$  T细胞。

[0070] T细胞可以是纯化的T细胞群体,或者可替代地T细胞可处于具有不同类型的细胞如B细胞和/或其他外周血细胞的群体中。T细胞可以是T细胞亚群(如CD4<sup>+</sup>T细胞)的纯化的群体,或者它们可以是包含不同T细胞亚群的T细胞群体。在本发明的另一个实施方案中,T细胞是已经在培养物中维持延长的时间段的T细胞克隆。T细胞克隆可被不同程度地转化。在一个具体实施方案中,T细胞是在培养物中无限增殖的T细胞克隆。

[0071] 在一些实施方案中,T细胞是原代T细胞。术语“原代T细胞”意图包括从个体获得的T细胞,与已经在培养物中维持延长的时间段的T细胞相反。因此,原代T细胞特别是获自受试者的外周血T细胞。原代T细胞的群体可主要由T细胞的一个亚群组成。或者,原代T细胞的群体可由T细胞的不同亚群组成。

[0072] T细胞可来自先前储存的血液样品、来自健康个体或者可替代地来自患有疾患的个体。所述疾患可以是感染性疾病,如由病毒感染、细菌感染或任何其他微生物的感染引起的疾患;或过度增生性疾病,如癌症,像黑色素瘤。在本发明的另一个实施方案中,T细胞是来自患有或易患自身免疫性疾病或T细胞病理的受试者。T细胞可具有人起源、鼠起源或任何其他哺乳动物物种。

[0073] “T细胞耗竭”是指T细胞功能丧失,其可由于感染或疾病而发生。T细胞耗竭与PD-1、TIM-3和LAG-3的表达增加、细胞凋亡以及细胞因子分泌减少相关。

[0074] TCR信号传导抑制剂(例如达沙替尼)的“治疗有效剂量或量”意指当如本文所述施用时在T细胞耗竭的治疗中产生积极治疗应答(如恢复的T细胞功能)的量。改善的T细胞功能可包括PD-1、TIM-3和LAG-3的表达降低,记忆标记物(例如,CD62L或CCR7)的维持,细胞凋亡的预防以及IL-2和其他细胞因子的分泌增加。所需要的精确量将根据受试者的种类、年龄和总体状况、所治疗的疾患的严重性、所采用的一种或多种特定药物、施用方式等而因受试者而异。任一个体病例中的适当“有效”量可由本领域的普通技术人员基于本文提供的信息使用常规实验来确定。

[0075] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用并且是指任何脊椎动物受试者,包括但不限于人和其他灵长类动物,包括非人灵长类动物如黑猩猩以及其他类人猿和猴物种;农场动物如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物如狗和猫;实验室动物,包括啮齿动物如小鼠、大鼠和豚鼠;鸟类,包括家养、野生以及猎鸟,如鸡、火鸡和其他鸡类鸟、鸭子、鹅等。所述术语不指示特定年龄。因此,预期将涵盖成年以及新生个体。

## 具体实施方式

[0076] 本发明是基于以下发现:人T细胞中TCR信号传导和/或CAR信号传导的短暂抑制或调节可预防或逆转T细胞耗竭并恢复T细胞功能。本发明人已经表明,表达GD2-CAR的T细胞发展功能性耗竭,其由PD-1、TIM-3和LAG-3耗竭标记物的表达表现。停止强直性信号传导恢复T细胞响应于肿瘤抗原而分泌IL-2的能力。本发明人进一步表明,用达沙替尼(一种抑制T细胞受体信号传导的Lck酪氨酸激酶抑制剂)治疗降低了T细胞耗竭标记物的表达并改善了T细胞记忆的保存。

[0077] 蛋白酪氨酸激酶是催化三磷酸腺苷的末端磷酸酯向蛋白质底物中的酪氨酸残基转移的酶家族。蛋白质底物上酪氨酸残基的磷酸化导致细胞内信号的转导,所述信号调控多种细胞内过程,如免疫系统细胞(例如T细胞)的生长和活化。由于T细胞活化牵涉于免疫系统的多种炎症疾患和其他病症(例如自身免疫性疾病)中,所以蛋白酪氨酸激酶活性的调节似乎是控制炎症疾病的有吸引力的途径。已经鉴定出大量蛋白酪氨酸激酶,所述蛋白酪氨酸激酶可以是受体蛋白酪氨酸激酶,例如胰岛素受体,或非受体蛋白酪氨酸激酶。

[0078] 已经发现Src家族的蛋白酪氨酸激酶对于与炎症应答有关的细胞内信号转导特别重要(参见例如,D.Okutani等人,Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.291,2006,第L129-L141页;CA.Lowell,Mol.Immunol.41,2004,第631-643页)。而Src家族蛋白酪氨酸激酶中的一些(例如Src、Yes和Fyn)在多种细胞类型和组织中表达,其他的表达则限于特定细胞类型,例如造血细胞。因此,蛋白酪氨酸激酶Lck几乎完全在T细胞中表达作为将在T细胞受体下游活化的第一信号传导分子,并且它的活性对于T细胞信号转导至关重要。在成熟单核细胞和巨噬细胞中,诸如LPS的炎症刺激增加Hck、Lyn和Fgr的表达。同样,如果主要B细胞Src家族激酶(即Lyn、Fyn和Btk)的基因表达被破坏,则未成熟的B细胞被阻止发育为成熟B细胞。Src家族激酶也一直被鉴定为对单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞的募集和活化至关重要,并且参与组织细胞的炎症应答。

[0079] 如所述,受体酪氨酸激酶是介导细胞间通信的信号转导途径的重要组成部分,并且它们充当信号传导途径的中继点。它们在控制细胞增殖和分化、调控细胞生长和细胞代谢并且促进细胞存活和凋亡的众多过程中起关键作用。Lck(p56<sup>lck</sup>或淋巴细胞特异性激酶)是在T细胞和自然杀伤(NK)细胞中表达的Src家族的细胞质酪氨酸激酶。来自敲除小鼠和人突变的遗传证据表明,Lck激酶活性对于T细胞受体(TCR)介导的信号传导至关重要,从而产生正常的T细胞发育和活化。因此,Lck的选择性抑制可用于治疗T细胞介导的自身免疫性和炎症病症和/或器官移植排斥。

[0080] 本发明进一步基于以下发现:Lck激酶抑制剂达沙替尼和受体酪氨酸激酶抑制剂普纳替尼具有解决过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法)领域目前所面临的若干重要挑战的潜力。首先,这些药物显示出有效地抑制CAR信号传导,这提供了用于调控CAR活性的方

法且因此减轻CAR T细胞毒性,同时保留一旦毒性消退就继续治疗的选择,因为达沙替尼和普纳替尼对CAR T细胞功能的抑制作用是可逆的。其次,在达沙替尼或普纳替尼存在下CAR T细胞的扩增显示可阻止CAR强直性信号传导且进而增强CAR T细胞的功能能力。最后,经由重复药物给药在体内提供短期的CAR T细胞“静息”显示是可预防或逆转CAR T细胞耗竭和/或可诱导记忆的一种方法。

[0081] 因此,本文提供了用于预防或逆转T细胞耗竭的组合物和方法。特别地,本发明涉及通过使经历T细胞耗竭的T细胞暴露于特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)或通过在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增遗传工程化的T细胞来预防或逆转T细胞耗竭的方法。

[0082] 如此,本发明考虑使正在进行使用遗传工程化的T细胞群体的过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法)的动物(例如,人)暴露于包含特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物将产生改善的治疗结果,因为此类特定酪氨酸激酶抑制剂能够1)调节所述遗传工程化的T细胞群体内的TCR信号传导(例如,降低PD-1、TIM-3和LAG-3中的一者或多者的表达;增加记忆标记物(例如,CD62L或CCR7)的表达;增加IL-2和其他细胞因子的分泌),以及2)预防和/或逆转所述遗传工程化的T细胞群体内的T细胞耗竭。实际上,本发明考虑在过继性T细胞疗法中使用特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)(例如,Src家族激酶抑制剂)(例如,Lck抑制剂)满足了未满足的需求,因为此类疗法的有效性经常被经历T细胞耗竭的此类T细胞群体折衷。因此,本发明提供了用于治疗受试者中的免疫系统相关疾患或疾病(例如,癌症)的方法,所述方法包括向所述受试者(例如,同时和/或在不同的时间点)施用遗传工程化的T细胞和特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞,和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0083] 此类酪氨酸激酶抑制剂可通过任何合适的施用方式施用,但是通常口服施用。可向受试者施用多个治疗周期。在某些实施方案中,根据每日给药方案或间歇性地施用酪氨酸激酶抑制剂。在另一个实施方案中,施用所述酪氨酸激酶抑制剂持续足以恢复至少部分T细胞功能的一段时间,然后停止。

[0084] 本发明考虑用特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)离体扩增T细胞群体将产生对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭的T细胞群体。因此,本发明提供了包含在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)(例如,Src家族激酶抑制剂)(例如,Lck抑制剂)存在下扩增的T细胞群体的组合物。因此,本发明提供了通过在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增此类T细胞来扩增T细胞群体以产生对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭的T细胞群体的方法。因此,本发明提供了药盒,所述药盒包括在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的T细胞群体和另外的剂(例如,可用于扩增T细胞的另外的剂)(例如,可用于过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的另外的剂)。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中,所述遗传工程化的T

细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞, 和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0085] 本发明考虑用特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) (例如, Src家族激酶抑制剂) (例如, Lck抑制剂) 离体扩增遗传工程化的T细胞群体 (例如, 遗传工程化以在过继性T细胞疗法 (例如, CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法中使用) 将产生对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭的遗传工程化的T细胞。因此, 本发明提供了包含在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) 存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的组合物。因此, 本发明提供了通过在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) 存在下扩增此类T细胞来扩增遗传工程化的T细胞群体以产生对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭的遗传工程化的T细胞群体的方法。因此, 本发明提供了包括在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) 存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的药盒。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中, 所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞, 和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0086] 本发明考虑正在使用在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) 存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的过继性T细胞疗法 (例如, CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法) 的动物 (例如, 人) 的暴露将产生改善的治疗结果, 因为此类遗传工程化的T细胞群体对T细胞耗竭具有抗性和/或不太易于T细胞耗竭。因此, 本发明提供了治疗受试者中的免疫系统相关疾患或疾病 (例如, 癌症) 的方法, 所述方法包括施用在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) (例如, Src家族激酶抑制剂) (例如, Lck抑制剂) 存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中, 所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞, 和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0087] 此类实施方案不限于特定类型或种类的免疫系统相关疾患或疾病。

[0088] 例如, 在一些实施方案中, 免疫系统相关疾患或疾病是自身免疫性疾病或疾患 (例如, 获得性免疫缺陷综合症 (AIDS)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病 (AIED)、自身免疫性淋巴组织增生综合征 (ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、白塞氏病、心肌病、乳糜性疱疹样口炎性腹泻、慢性疲劳免疫功能障碍综合症 (CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (CIPD)、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、肢端硬皮综合征、克罗恩氏病、德戈斯病 (Degos' disease)、幼年型皮肌炎、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病 (Graves' disease)、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome)、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖性糖尿病、幼年型慢性关节炎 (斯蒂尔氏病 (Still's disease))、幼年型类风湿性关节炎、美尼尔氏病 (Meniere's disease)、混合性结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、恶性贫血、

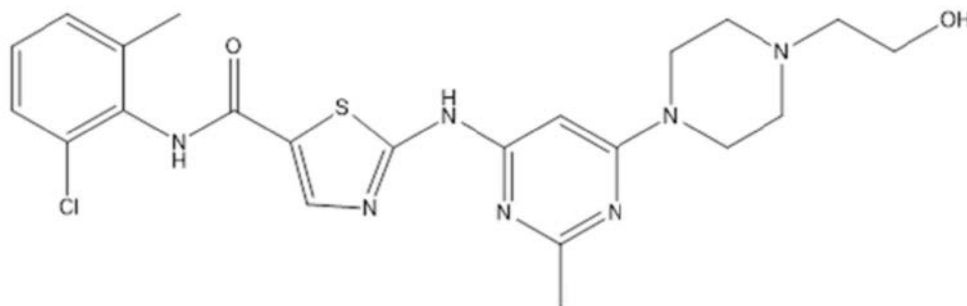
结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病性关节炎、雷诺氏现象 (Raynaud's phenomena)、赖特尔氏综合征 (Reiter's syndrome)、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病 (进行性全身性硬化症 (PSS), 也称为全身性硬化症 (SS))、舍格伦氏综合征 (Sjogren's syndrome)、僵人综合征、全身性红斑狼疮、高安氏动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风、韦格纳氏肉芽肿病以及它们的任何组合)。

[0089] 例如, 在一些实施方案中, 免疫系统相关疾患或疾病是癌症 (例如, 乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌以及甲状腺癌)。

[0090] 本发明考虑在过继性T细胞疗法 (例如, CAR T细胞疗法、转导T-细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法) 中使用在特定酪氨酸激酶抑制剂 (例如达沙替尼、普纳替尼) 存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体满足了未满足的需求, 因为此类疗法经常被经历T细胞耗竭的此类T细胞群体折衷。此类方法不限于特定类型或种类的遗传工程化的T细胞。在一些实施方案中, 所述遗传工程化的T细胞包括但不限于CAR T细胞、遗传工程化的表达TCR的T细胞、被配置用于肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 疗法的遗传工程化的T细胞、被配置用于转导T细胞疗法的遗传工程化的T细胞, 和/或用TCR或CAR重新工程化的病毒特异性T细胞。

[0091] 本发明的实施方案不限于特定类型的酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中, 酪氨酸激酶抑制剂是Lck酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中, 酪氨酸激酶抑制剂是Src家族激酶抑制剂 (例如, Src激酶抑制剂、Yes激酶抑制剂、Fyn激酶抑制剂、Fgr激酶抑制剂、Lck激酶抑制剂、Hck激酶抑制剂、Blk激酶抑制剂、Lyn激酶抑制剂)。在一些实施方案中, 酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼

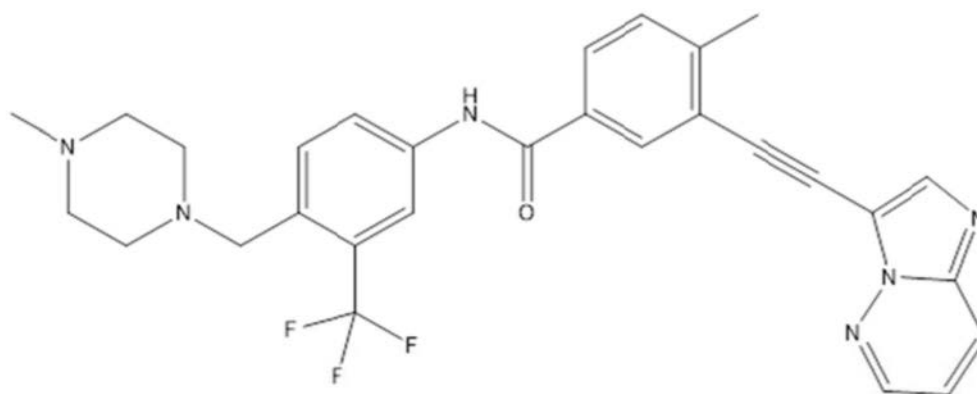
[0092]



*N*-(2-氯-6-甲基苯基)-2-(6-(4-(2-羟乙基)嘧啶-1-基)-2-甲基嘧啶-4-(基氨基)噻唑-5-甲酰胺

( ),

或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前药。在一些实施方案中, 酪氨酸激酶抑制剂是普纳替尼



3-(咪唑并[1,2-b]哒嗪-3-基乙炔基)-4-甲基-N-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)-3-(三氟甲基)苯基)苯甲酰胺  
(或其药学上可接受的盐、溶剂合物或前药)。

[0093] 本发明的一些实施方案提供了施用此类方法(例如,使用遗传工程化的T细胞群体和包含特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物的过继性T细胞疗法)(例如,使用在特定酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)存在下扩增的遗传工程化的T细胞群体的过继性T细胞疗法)与有效量的至少一种另外的治疗剂(包括但不限于化疗抗肿瘤药、细胞凋亡调节剂、抗微生物剂、抗病毒剂、抗真菌剂和抗炎剂)和/或治疗技术(例如,外科手术干预和/或放射疗法)的组合。在特定实施方案中,另外的治疗剂是抗癌剂。

[0094] 酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)可被配制成药物组合物,所述药物组合物任选地包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。示例性赋形剂包括但不限于碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱以及它们的组合。适用于注射组合物的赋形剂包括水、醇、多元醇、甘油、植物油、磷脂和表面活性剂。碳水化合物,诸如糖、衍生化糖(诸如糖醇、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物)可作为赋形剂存在。具体的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖,如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及醛糖醇,如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、吡喃糖基山梨糖醇、肌醇等。赋形剂还可包括无机盐或缓冲剂,如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及它们的组合。

[0095] 表面活性剂可作为赋形剂存在。示例性表面活性剂包括:聚山梨酯,如“Tween 20”和“Tween 80”以及普朗尼克,如F68和F88(BASF, Mount Olive, New Jersey);山梨聚糖酯;脂质,如磷脂,如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(尽管优选不呈脂质体形式)、脂肪酸和脂肪酯;类固醇,如胆固醇;螯合剂,如EDTA;;以及锌和其他此类合适的阳离子。

[0096] 酸或碱可作为赋形剂存在于药物组合物中。可使用的酸的非限制性实例包括选自以下组成的组的那些酸:盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸以及它们的组合。适合的碱的实例包括但不限于选自以下组成法人组的碱:氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾以及它们的组合。

[0097] 药物组合物中酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的量(例如当包含在药物递送系统中时)将取决于许多因素而变化,但是当组合物呈单位剂型或在容器(例如小

瓶)中时将最佳地是治疗有效剂量。治疗有效剂量可通过重复施用渐增量的组合物以便确定哪个量产生临床上所需的终点来以实验方式确定。

[0098] 药物组合物中任何单独赋形剂的量将根据赋形剂的性质和功能以及组合物的特定需要而变化。典型地,任何单独赋形剂的最佳量通过常规实验确定,即通过制备含有不同量的赋形剂(范围从低到高)的组合物、检查稳定性和其他参数且然后确定在没有显著不利作用的情况下获得最佳性能的范围。然而,总体上,赋形剂将在组合物中以按重量计约1%至约99%、优选按重量计约5%至约98%、更优选按赋形剂的重量计约15%至约95%的量存在,其中浓度最优选是小于按重量计30%。这些前述的药物赋形剂连同其他赋形剂一起描述于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”,第19版., Williams & Williams, (1995); “Physician’s Desk Reference”,第52版, Medical Economics, Montvale, NJ (1998) 以及 Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000 中。

[0099] 药物组合物涵盖所有类型的制剂,且尤其是适于注射的那些制剂,例如在使用前可用溶剂重构以及准备好用于注射溶液或悬浮液的粉末或冻干粉剂,用于在使用前与媒介物组合的干燥不溶性组合物以及在施用前稀释的乳剂和液体浓缩物。用于在注射前重构固体组合物的合适的稀释剂的实例包括注射用抑菌水、水中的5%右旋糖、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水以及它们的组合。关于液体药物组合物,设想了溶液和悬浮液。其他优选的组合物包括用于口服、眼部或局部递送的那些。

[0100] 根据预期的递送方式和用途,本文的药物制剂也可容纳在注射器、植入装置等中。优选地,本文所述的包含一种或多种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的药物组合物呈单位剂型,意指适合于呈预先测量或预先包装形式的单剂量的本发明的缀合物或组合物的量。

[0101] 本文的药物组合物可任选地包含一种或多种另外的剂,或可与一种或多种另外的剂组合,所述另外的剂是诸如用于治疗T细胞耗竭的其他药物(例如,抗PD-1检查点抑制剂,如纳武单抗)或用于治疗受试者的与T细胞耗竭相关的感染或疾病的其他药物(例如,抗病毒剂、抗生素或抗癌药物和疗法,包括过继性T细胞疗法)。可使用包含至少一种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和一种或多种其他剂(如用于治疗T细胞耗竭或与T细胞耗竭相关的感染或疾病的其他药物)的复合制剂。或者,此类剂可包含在与包含酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物不同的组合物中,并且可在包含酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的组合物同时、之前或之后共同施用。

[0102] 将使用酪氨酸激酶抑制剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼))的至少一个治疗有效的治疗周期施用至受试者以治疗T细胞耗竭。“治疗有效的治疗周期”意指治疗周期,当施用关于治疗个体的T细胞耗竭产生积极治疗应答的治疗周期。特别感兴趣的是当如本文所述短暂施用恢复T细胞功能的使用酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的治疗周期。例如,治疗有效剂量或量的酪氨酸激酶抑制剂可降低PD-1、TIM-3和LAG-3的表达、改善记忆标记物(例如CD62L或CCR7)的维持、防止细胞凋亡并增加IL-2和其他细胞因子的分泌。

[0103] 在某些实施方案中,将施用多个治疗有效剂量的药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和/或一种或多种其他治疗剂,

如用于治疗T细胞耗竭的其他药物(例如,抗-PD-1检查点抑制剂,如纳武单抗)或用于治疗受试者的与T细胞耗竭相关的感染或疾病的其他药物(例如,抗病毒剂、抗生素或抗癌药物和疗法,包括过继性T细胞疗法)。本发明的药物组合物通常但并非必须地口服、经由注射(皮下、静脉内或肌内)、通过输注或局部施用。还考虑了另外的施用方式,如局部、病灶内、脑内、脑室内、实质内、肺、直肠、透皮、透粘膜、鞘内、心包、动脉内、眼内、腹膜内等。

[0104] 药物制剂可在施用前即刻呈液体溶液或悬浮液的形式,但是也可采取另一种形式,如糖浆、乳膏、软膏、片剂、胶囊、粉末、凝胶、基质、栓剂等。可根据本领域已知的任何医学上可接受的方法,使用相同或不同的施用途径来施用包含一种或多种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和其他剂的药物组合物。

[0105] 在另一个实施方案中,预防性地施用包含一种或多种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和/或其他剂的药物组合物,例如以预防T细胞耗竭。这种预防性用途对于患有慢性感染或癌症、处于发展T细胞耗竭的风险的受试者将具有特别价值。

[0106] 在本发明的另一个实施方案中,包含一种或多种酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)和/或其他剂的药物组合物呈持续释放制剂形式,或使用持续释放装置施用的制剂形式。此类装置在本领域中是众所周知的,并且包括例如透皮贴剂和微型可植入泵,其可以各种剂量以连续、稳态的方式随时间推移提供药物递送,以在非持续释放药物组合物的情况下实现持续释放效应。

[0107] 本发明还提供了一种用于向患有对用包含在缀合物或组合物中的酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)治疗有反应的疾患的患者施用如本文提供的包含酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)的缀合物的方法。所述方法包括通过本文所述的任何方式施用治疗有效量的缀合物或药物递送系统,优选作为药物组合物的一部分提供。施用方法可用于治疗对用酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)治疗有反应的任何疾患。更具体地,本文的药物组合物可有效治疗T细胞耗竭。

[0108] 本领域的普通技术人员将了解酪氨酸激酶抑制剂(例如达沙替尼、普纳替尼)可有效治疗哪些疾患。待施用的实际剂量将根据受试者的年龄、体重和一般状况,以及所治疗的疾患的严重程度,健康专家的判断以及所施用的缀合物而变化。治疗有效量可由本领域技术人员确定,并将根据每种特定情况的特定要求进行调整。

[0109] 通常,治疗有效量将在每天约0.50mg至5克酪氨酸激酶抑制剂、更优选每天约5mg至2克、甚至更优选每天约7mg至1.5克的范围内。优选地,此类剂量在10-600mg每日四次(QID)、200-500mg QID、25-600mg每日三次(TID)、25-50mg TID、50-100mg TID、50-200mg TID、300-600mg TID、200-400mg TID、200-600mg TID、100至700mg每日两次(BID)、100-600mg BID、200-500mg BID或200-300mg BID的范围内。所施用化合物的量将取决于酪氨酸激酶抑制剂的效力以及所需的程度或作用以及施用途径。

[0110] 纯化的酪氨酸激酶抑制剂(再次,优选作为药物制剂的一部分提供)可单独施用或与以下各项组合施用:一种或多种其他治疗剂,如用于治疗T细胞耗竭的其他药物(例如,抗PD-1检查点抑制剂,如纳武单抗)或用于治疗受试者的与T细胞耗竭相关的感染或疾病的其他药物(例如,抗病毒剂、抗生素或抗癌药物);或过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法、转导T细胞疗法和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法);或取决于临床医生的判断、患者的需求等根据各种给药方案用于治疗特定疾患或疾病的其他药物。具体给药方案将是本领域的普

通技术人员已知的或可使用常规方法以实验方式确定。示例性的给药方案包括但不限于：施用每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次以及它们的任何组合。优选的组合物是要求每天给药不超过一次的组合物。

[0111] 酪氨酸激酶抑制剂可在其他药剂或疗法之前、同时或之后施用。如果与其他剂或疗法同时提供，则一种或多种酪氨酸激酶抑制剂可提供在同一或不同的组合物中。因此，可通过同步疗法的方式将一种或多种酪氨酸激酶抑制剂和其他剂提供给个体。“同步疗法”意指施用至受试者，以使得在进行治疗的受试者中引起物质的组合的治疗作用。例如，同步疗法可通过施用一定剂量的包含酪氨酸激酶抑制剂的药物组合物和一定剂量的包含至少一种其他剂（如用于治疗T细胞耗竭的另一种药物）的药物组合物来实现，所述药物组合物组合包含根据特定给药方案的治疗有效剂量。类似地，可以至少一个治疗剂量施用一种或多种酪氨酸激酶抑制剂和一种或多种其他治疗剂。分开的药物组合物或疗法的施用可同时进行或在不同的时间进行（即依次、按任何顺序、在同一天或在不同天），只要在经受疗法的受试者中产生这些物质的组合的治疗作用。

[0112] 本发明还提供了包含一个或多个容器的药盒，所述容器容纳包含至少一种酪氨酸激酶抑制剂（例如达沙替尼、普纳替尼）和任选的一种或多种用于治疗T细胞耗竭的其他剂的组合物。组合物可呈液体形式或可被冻干。所述组合物的适合容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可由多种材料（包括玻璃或塑料）形成。容器装可具有无菌入口（例如，所述容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶）。

[0113] 药盒还可包括第二容器，所述第二容器包括药学上可接受的缓冲液，如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液或右旋糖溶液。它还可包括对最终使用者有用的其他材料，包括其他药学上可接受的配制溶液如缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器或其他递送装置。递送装置可预先填充有组合物。

[0114] 药盒还可包括包装插页，所述包装插页含有使用包含至少一种酪氨酸激酶抑制剂（例如达沙替尼、普纳替尼）的组合物治疗受试者的T细胞耗竭的方法的书面说明书。所述包装插页可以是未被批准的草拟包装插页，或者可以是被食品与药物管理局（FDA）或其他监管机构批准的包装插页。

[0115] 本领域普通技术人员将容易认识到，前述内容仅表示对本发明的某些优选实施方案的详细描述。上述组合物和方法的各种修改和改变可使用本领域中可获得的专业知识容易地实现并且在本发明的范围内。

[0116] 实施例

[0117] 以下实施例是本发明的化合物、组合物和方法的说明性但非限制性的实施例。对临床治疗中通常遇到的并且对于本领域技术人员而言显而易见的各种条件和参数的其他合适的修改和改编在本发明的精神和范围内。

[0118] 实施例I. 通过抑制或调节TCR信号传导来预防或逆转T细胞耗竭的方法

[0119] 引言

[0120] 先前已报告，表达GD2-CAR的T细胞在培养10天内发展功能性耗竭，并且其特征在于抑制性受体的共表达、无法响应于肿瘤抗原分泌细胞因子以及异常代谢功能（Long等人，Nat Med 2015）。对照培养物包括未转导的T细胞（模拟物）和表达CD19-CAR的T细胞，它们在

体外不表现出强直性信号传导或发展耗竭。先前的工作还证明,在这种系统中耗竭需要 $\zeta$ 链,其中CD28信号传导增强信号传导刺激物在诱导耗竭中的效力。使用这种模型系统,现在已经优化了稳健、可操作且可复制的体外T细胞耗竭人模型,以评价预防或逆转T细胞耗竭的方法。

#### [0121] 结果

[0122] 对与FKBP12突变去稳定结构域融合的GD2.28z CAR进行了工程化(Banaszynski等人,Ce11 2006)(GD2.28z.FKBP),这使它对CAR不稳定并且诱导快速蛋白质降解。观察到,通过在培养基中添加或减去稳定化霉素类似物(rapalog) shield-1 (S1),可快速且剂量依赖性地调控表面表达(图1)。使用大肠杆菌DHFR突变体(GD2.28z.DHFR,未示出)也可实现CAR表达的类似可调控性,其可通过甲氧苄啶(一种在临床上常用的抗生素)进行调控。

[0123] 由于强直性信号传导高度依赖于GD2-CAR受体水平,因此对CAR表达水平的精确控制也可精确调控强直性信号传导的水平。对CAR表达水平的药物调控的控制因此也允许调节GD2.28z强直性信号传导的持续时间和强度。使用这种系统,证明了在CAR信号传导停止后,与耗竭相关的表型和功能变化被逆转。如图2中所示,从培养基中除去S1药物且随后在活化后第7天除去表面CAR到第10天时使经典耗竭标记物表达逆转至对照水平(图2,n=3)。通过测量PD-1/TIM-3/LAG-3三重表达细胞的水平可很好地说明这一点,所述细胞对功能异常的耗竭T细胞具有高度特异性。证明,第10天清除诱导三重表达耗竭细胞的水平增加,但在第7天除去S1到第10天产生这些水平的正常化。对于在第7天或第10天从培养基中除去S1的细胞,在第14天获得了类似的结果(未示出)。

[0124] 此外,与在整个培养持续时间中接受S1的T细胞(S1)相比,在第7天或第10天除去S1允许CAR蛋白的瞬时降解,使得到第14天维持记忆标记物(例如CD62L)且防止细胞凋亡(即膜联蛋白V染色)(图3)。

[0125] 由于表型标记物可能无法完全预测T细胞的功能,因此还对在培养中提供短暂药物暴露的CAR T细胞进行了功能性实验。将CAR T细胞洗涤,重悬于含有S1的培养基中,并以1:1的比例与稳定表达表面GD2的Na1m6白血病细胞混合。大约24小时后收获培养物上清液,并鲸鱼ELISA评价细胞因子水平。与缺少去稳定结构域并因此具有持续高水平的CAR信号传导的GD2.28z CAR相似,表达GD2.28z.FKBP CAR的经历连续药物处理的细胞(图4,灰色条)在活化后第10天和第14天分泌最少量的IL-2,与T细胞耗竭一致。或者,在培养过程中未暴露于药物且因此未经历强直性信号传导的CAR T细胞(黑色条)展示如通过IL-2产生测量的显著生物活性。最后,在培养的最初7或10天过程中暴露于药物且因此获得T细胞耗竭的表型和功能证据、但在第7天或第10天从培养基中除去药物(分别蓝色条和红色条)的CAR T细胞展示响应于肿瘤抗原而分泌IL-2的能力恢复。值得注意的是,在第10天(灰色柱,第10天ELISA)耗竭的T细胞可通过从培养基中除去S1且仅“静息”4天来恢复活力(红色条,第14天ELISA)。还观察到在从培养基中除去S1的条件下,类似但不太显著的IFN  $\gamma$  分泌增加。这些功能数据可能不能归因于差异CAR表面表达,因为在此共培养测定结束时,所有组均表现出类似的表面CAR水平(未示出)。

[0126] 然后比较了通过除去表面CAR来预防或逆转T细胞耗竭是比用良好表征的抗PD-1检查点抑制剂纳武单抗(Nivo)处理效力更高还是更低。用连续S1(且因此表现出连续的强直性信号传导)、连续S1+纳武单抗或不使用S1处理CAR T细胞直到共培养测定的时间。令人

感兴趣的是,纳武单抗处理在第10天仅产生中等IL-2分泌增加,所述增加持续直到第14天,从而表明纳武单抗仅部分地阻止这种系统中T细胞耗竭的发生(图5)。相反,培养不含S1的CAR T细胞、然后就在共培养测定之前将其添加回至培养基中(左图,蓝色条)产生耗竭的远远优异的预防,因为与经历连续S1的CAR T细胞(黑色条)相比IL-2分泌增加了5-10倍。此外,与经历连续S1的CAR T细胞和经历连续S1并同时用S1处理的CAR T细胞相比,通过从培养基中除去S1在第7天除去强直性信号传导也产生优异的IL-2分泌。总的来说,这些数据证明,与PD-1阻滞相比,调节强直性信号传导在预防或逆转耗竭方面表现出更有效的作用。

[0127] 包括我们的实验室在内的若干小组进行的功能研究证实,PD-1、TIM-3和LAG-3(三阳性,TP)的共表达指示高度功能异常的耗竭细胞亚群。因此,试图分析在这种细胞亚群中停止强直性信号传导是否能够逆转其表型并恢复其响应于肿瘤抗原而分泌IL-2的能力。将GD2.28z CAR的高亲和力型式(HA-GD2.28z)(其表现出甚至更显著的耗竭表型)融合至FKBP12突变体去稳定结构域以控制其表面表达。在活化后第10天,对经历了连续S1处理的HA-GD2.28z.FKBP CAR T细胞进行分选,以分离纯PD-1/TIM-3/LAG-3耗竭群体。然后在有或没有S1的情况下重新培养“三阳性”耗竭细胞,以测试除去强直性信号传导是否能够恢复其功能。在4天后进行FACS和共培养测定。

[0128] S1的除去产生耗竭表型的显著逆转。在培养基中在没有S1的情况下仅4天后,预分选的三阳性细胞在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CAR T细胞中均表现出极低的耗竭标记物表达(图6)。重要的是,这些表型变化还赋予IL-2分泌的功能增强,因为与从10-14天接受连续S1处理的三阳性细胞相比,S1的除去使得IL-2分泌增加2倍(图6)。

[0129] 假设能够通过简单地抑制TCR信号传导途径中也是CAR信号传导必不可少的激酶来恢复除去表面CAR、且由此强直性信号传导的效应。一种这样的激酶是Lck,其用于响应于TCR或CAR连接而磷酸化CD3 $\zeta$ 。达沙替尼(一种有效的受体酪氨酸激酶抑制剂和BCR/ABL拮抗剂)也已显示出通过结合至并抑制低浓度的Lck来抑制T细胞活化、增殖和细胞因子分泌(Schade等人,Blood,2008和Lee等人,Leukemia,2010)。

[0130] 在100nM和1 $\mu$ M下,在活化后第14天达沙替尼有效地抑制CD19.28z CAR T细胞响应于肿瘤抗原的细胞因子分泌(图7),从而证明达沙替尼破坏CAR信号传导。

[0131] 然后询问通过在活化后第10-14天用达沙替尼处理HA-GD2.28z CAR T细胞,短暂达沙替尼暴露是否能够逆转T细胞耗竭。将细胞用达沙替尼处理4天,然后从培养基中彻底冲洗药物,并且将细胞再培养另外24小时,之后经由FACS和肿瘤共培养测定检查它们的表型和功能。令人感兴趣的是,用达沙替尼进行的4天处理以剂量依赖性方式逆转了耗竭标记物表达和共表达(图8)。

[0132] 此外,达沙替尼处理通过以剂量依赖性方式维持CD62L表达而产生T细胞记忆的保存(图9)。

[0133] 最后,类似于表面CAR的除去,达沙替尼处理以功能上显著方式使耗竭T细胞恢复活力,因为与从未接受达沙替尼的那些相比,经达沙替尼处理的CAR T细胞响应于肿瘤抗原分泌更多的IL-2(并且在更低的程度分泌IFN  $\gamma$ ) (图10)。

[0134] 总体而言,这些数据证明,选择性抑制或调节TCR信号传导可显著增强在癌症或慢性感染背景下经历连续抗原暴露的耗竭T细胞的功能。在未来的研究中,将进行体内研究,以评估在这种情况下耗竭逆转的可行性,以及这种逆转是否能够增强鼠模型中的抗肿瘤作

用。

[0135] 实施例II.

[0136] 嵌合抗原受体 (CAR) 是将细胞外肿瘤靶向结构域与模拟内源性TCR信号传导的细胞内结构域 (例如, 1-2个共刺激结构域, 如CD28或4-1BB, 以及CD3 $\zeta$ 结构域) 组合在一起的合成受体 (参见例如, Lim&June. *Cell* 168, 724-740 (2017))。当表达CAR的T细胞遇到表达抗原的肿瘤细胞时, CAR T细胞形成免疫突触并通过CAR起始下游信号传导, 从而产生有效的T细胞活化、细胞毒性可溶性因子脱粒、细胞因子释放和增殖。尽管CAR T细胞疗法在许多患有血液系统恶性肿瘤的患者中取得了空前的临床成功, 但在这种疗法可扩展到其他肿瘤类型或作为一线疗法提供之前, 存在必须解决的若干关键挑战。

[0137] 一种挑战是CAR毒性, 其通常以细胞因子释放综合征 (CRS) 或中靶脱肿瘤活性的形式表现, 两者在临床试验中均已观察到并且在一些情况下导致患者死亡 (参见例如, Gust等人 *Cancer discovery* (2017). doi:10.1158/2159-8290.cd-17-0698; Xu&Tang. *Cancer Letters* 343, 172-178 (2014); D' Aloia, 等人 *Cell Death&Disease* 9, 282 (2018))。用于抵消CAR毒性的当前方法在很大程度上限于介导CAR T细胞凋亡的药物可诱导的自杀开关 (即, 诱导型半胱天冬酶9) (参见例如, Gargett&Brown. *Frontiers in Pharmacology* 5, 235 (2014))。尽管通常被认为是有效的安全机制, 但由于CAR T细胞不再具有活力, 因此利用这种方法消除了毒性事件消退后继续治疗的选择。

[0138] 用于改善CAR T细胞疗法的功效的第二个关键挑战是预防CAR T细胞耗竭。T细胞耗竭由在慢性病毒感染或癌症的背景下连续抗原暴露引起, 并且其特征在于效应子功能逐渐丧失、多种抑制性受体 (例如, PD-1、TIM-3、LAG-3) 的持续性共表达、增殖能力减弱以及细胞凋亡增加 (参见例如, Wherry&Kurachi. *Nature Reviews Immunology* 15, nri3862 (2015))。存在CAR T细胞疗法中的T细胞耗竭的充分证据。到输注后第60天, 几乎所有施用的CD19.28z CAR T细胞都消失 (参见例如, Lee等人 *Long-term outcomes following CD19 CAR T cell therapy for B-ALL are superior in patients receiving a fludarabine/cyclophosphamide preparative regimen and post-CAR hematopoietic stem cell transplantation.* (2016))。CD19.BBz CAR T细胞 (其被认为对T细胞耗竭具有更高抗性) 也表现出耗竭的特征, 并且在接受这种疗法的大约30%的患者中不可检测, 因此增加CD19阳性复发的风险 (参见例如, Turtle等人 *Journal of Clinical Investigation* 126, 2123-2138 (2016); Maude等人 *The New England Journal of Medicine* 371, 1507-1517 (2014))。最后, 在组成型表达CAR的T细胞中也观察到耗竭, 所述T细胞表现出scFv聚集诱导的强直性信号传导, 这两者均在没有肿瘤抗原的情况下发生。高CAR表达的这种意想不到的结果最终通过在体内和体外耗竭CAR T细胞来限制其有效性 (参见例如, Long等人 *Nature Medicine* 21, 581-590 (2015); Gomes-Silva等人 *Cell Reports* 21, 17-26 (2017))。

[0139] 在开发本发明的实施方案的过程中进行的实验通过利用FDA批准的小分子酪氨酸激酶抑制剂来调节CAR T细胞活性而解决了这两个挑战。已显示若干BCR-Ab1抑制剂与T细胞活化所需的信号激酶具有交叉反应性 (参见例如, Banaszynski, 等人 *Nature medicine* 14, 1123-7 (2008); Banaszynski, 等人 *Cell* 126, 995-1004 (2006); Iwamoto, 等人 *Chemistry&Biology* 17, 981-988 (2010))。达沙替尼通过抑制Lck和Fyn两者来有效抑制T细胞活化和效应子功能。类似地, 普纳替尼可结合至并抑制Lck, 但不影响Fyn或Src激酶的功能。

能,从而表明这种药物还可抑制T细胞效应子功能以及同样CAR T细胞功能。

[0140] 为了检验这种假设,将表达CD19靶向CAR (CD19.28z)的T细胞与各种浓度的达沙替尼和普纳替尼一起孵育至少24小时。接下来将CAR T细胞在存在或不存在达沙替尼/普纳替尼的情况下与带有抗原的肿瘤细胞共培养6小时,且随后经由CD69和CD107a共表达评估CAR T细胞活化和脱粒。在与肿瘤共培养后,将近80%的对照CAR T细胞是CD69+/CD107a+ (图11a)。相反,纳摩尔浓度的达沙替尼和普纳替尼以剂量依赖性方式有效地抑制CAR T细胞的活化和脱粒 (图11b)。这些药物还有效地抑制响应于肿瘤的CAR T细胞IL-2和IFN $\gamma$ 分泌 (图12)。最后,当在1 $\mu$ M达沙替尼存在下将CAR T细胞与肿瘤细胞共培养时,观察到对CAR T细胞细胞毒性的有效抑制 (图13)。

[0141] 为了评估达沙替尼是否通过破坏CAR信号传导来抑制CAR T细胞效应子功能,进行了实验,其中表面CAR在CAR T细胞上瞬时交联,以便瞬时起始CAR下游信号传导。在对照条件下,使CAR交联5分钟诱导CAR CD3 $\zeta$ 结构域的磷酸化,以及远端信号传导激酶Akt和Erk1/2的磷酸化 (图14)。相反,当在达沙替尼存在下使CAR T细胞交联时,它们类似于非交联的对照,从而表明达沙替尼有效地破坏CAR特异性细胞内信号传导。这些实验共同表明,达沙替尼和普纳替尼两者均抑制CAR T细胞活性并且提供间接证据表明Lck和/或Fyn对CAR信号传导至关重要。这些实验还表明,达沙替尼或普纳替尼可在临床上用于破坏CAR T细胞活性以减轻CAR T细胞毒性。

[0142] 如先前所提及,在体外扩增过程中,许多组成型表达的CAR在不存在抗原的情况下表现出强直性信号传导,从而驱动它们趋向于T细胞耗竭 (参见例如,Long等人Nature Medicine 21,581-590 (2015))。额外的实验假设在达沙替尼或普纳替尼存在下扩增CAR T细胞将减轻强直性信号传导且因此产生更健康、更有效的CAR T细胞。为了测试这一点,在不同浓度的达沙替尼存在下扩增表达强直性信号传导亲和力GD2.28z CAR (HA-GD2.28z)的T细胞。然后从培养物中取出细胞用于经由FACS进行表型分析。对照HA-GD2.28z CAR T细胞表现出稳健的单一标记物表达和多种经典耗竭标记物的共表达 (图15)。相反,达沙替尼中的扩增降低了耗竭标记物共表达细胞的频率以及以剂量依赖性方式表达这些耗竭标记物的程度 (图15)。在达沙替尼存在下的CAR T细胞扩增也增加了T细胞记忆的形成,因为与在达沙替尼不存在下培养的耗竭的CAR T细胞相比,观察到中心记忆样T细胞 (CD45RA低,CCR7高) 频率的近6倍增加以及效应记忆样T细胞 (CD45RA低,CCR7低) 频率的大于2倍降低。

[0143] 接下来的实验假设当通过达沙替尼或普纳替尼减轻强直性信号传导时观察到的显著表型变化可能与T细胞功能增强相一致。为了测试这一点,实验首先在各种浓度的达沙替尼或普纳替尼存在或不存在下扩增强直性信号传导CAR T细胞。接下来的实验从培养物中除去药物,以使CAR T细胞恢复能力来起作用。在除去药物后18-24小时,将差异扩增的CAR T细胞与带有抗原的肿瘤细胞共培养24小时,且随后经由ELISA评估细胞因子释放,或共培养72小时并经由incucyte测定评估细胞毒性。在不存在达沙替尼或普纳替尼的情况下培养的强直性信号传导CAR T细胞响应于肿瘤分泌低水平的细胞因子 (图17) 并表现出受损的细胞毒性 (图18),从而表明这些细胞在功能上耗竭。或者,在达沙替尼或普纳替尼存在下CAR T细胞的扩增剂量依赖性地增加CAR T细胞的细胞因子分泌 (图17),并且还允许更强的细胞毒性应答 (图18),从而证实在用这些药物进行CAR T细胞扩增过程中强直性信号传导的减轻赋予深远的功能益处。

[0144] 进行了实验,所述实验测试在体外对CAR强直性信号传导的预防是否增强体内抗肿瘤应答。在有或没有1uM达沙替尼的情况下扩增CAR T细胞,且然后将其输注到植入了带有抗原的肿瘤的NSG小鼠中。在使用143B骨肉瘤细胞系的实体瘤模型中,在不存在达沙替尼的情况下生长的GD2.BBz和HA-GD2.28z CAR T细胞两者均未能控制肿瘤生长(分别图19和20)。但是,在达沙替尼中扩增的CAR T细胞允许肿瘤的几乎完全并持久根除(图19和20)。在过表达GD2的NALM6白血病模型中观察到相同的效应,其中在CAR T细胞输注时肿瘤负荷更加确定(图21)。

[0145] 接下来进行实验以确定更大的CAR T细胞增殖和/或持久性是否是达沙替尼中的体外扩增增强抗肿瘤应答的若干关键机制。为了测试这一点,将CAR T细胞输注到已经植入了带有抗原的肿瘤的小鼠中。在输注后第14天,从小鼠中采集血液样品,并经由FACS计数珠评估循环的CAR T细胞的数量。在不存在达沙替尼的情况下扩增的强直性信号传导HA-GD2.28z CAR T细胞未扩增和/或以高于输注有模拟未转导T细胞的小鼠的水平持续存在(图22)。相反,在存在1uM达沙替尼的情况下生长的CD4+和CD8+CAR T细胞在体内均发生了深刻的扩增并持续存在(图22)。总体而言,这些数据表明通过在体外在达沙替尼中扩增CAR T细胞来限制CAR强直性信号传导通过增加CAR T细胞扩增和持续存在的能力来增强体内抗肿瘤应答。

[0146] 接下来进行了实验,所述实验询问达沙替尼的体内施用是否能够改变CAR T细胞表型和功能。作为概念验证实验,将CAR T细胞输注到植入了带有抗原的肿瘤的小鼠中,且然后连续3天服用达沙替尼。然后处死小鼠,并在血液和脾脏中评估CAR T细胞频率和表型。与用媒介物处理的小鼠相比,达沙替尼处理的小鼠在两种组织中均表现出更高的CAR T细胞频率(图22a、22c),从而表明体内达沙替尼处理诱导原位增殖或持久性。此外,与媒介物处理的小鼠相比,从达沙替尼处理的小鼠中回收的CAR T细胞表现出耗竭标记物PD-1和LAG-3的表达降低、CD69的表达降低(即较低的活化状态)以及记忆标记物CD62L的较高表达(图22b、22d),这全部与在用达沙替尼体外处理时观察到的表型变化(图15、16)一致。这些结果表明,达沙替尼的体内施用减轻CAR T细胞耗竭表型并改善记忆形成,并且表明体内达沙替尼给药在体内提供功能性益处。

[0147] 实验假设,达沙替尼的选择性体内施用将通过瞬时“静息”经历慢性抗原刺激的CAR T细胞来预防CAR T细胞耗竭。为了测试这一点,将CAR T细胞书主导表现出高肿瘤负荷的小鼠中。在肿瘤植入后第27天,连续3天向小鼠给与达沙替尼或媒介物,然后不进行治疗持续另外3天。在这种处理方案之后,评估肿瘤负荷并观察到达沙替尼处理的小鼠中肿瘤大小的显著减小(图22e)。相反,媒介物处理的小鼠中的肿瘤负荷继续增加,从而表明抗肿瘤应答的增强是达沙替尼处理所特有的。

[0148] 总之,达沙替尼和普纳替尼具有解决过继性T细胞疗法(例如,CAR T细胞疗法)领域目前所面临的若干重要挑战的潜力。首先,这些药物显示出有效地抑制CAR信号传导,这提供了用于调控CAR活性的方法且因此减轻CAR T细胞毒性,同时保留一旦毒性消退就继续治疗的选择,因为达沙替尼和普纳替尼对CAR T细胞功能的抑制作用是可逆的。其次,在达沙替尼或普纳替尼存在下CAR T细胞的扩增显示可阻止CAR强直性信号传导且进而增强CAR T细胞的功能能力。最后,经由重复药物给药在体内提供短期的CAR T细胞“静息”显示是可预防或逆转CAR T细胞耗竭和/或可诱导记忆的一种方法。

[0149] 实施例III.

[0150] 此实施例描述了实施例II的材料和方法。

[0151] 细胞和培养条件

[0152] 在RPMI-1640中培养NALM6-GL (急性成淋巴细胞性白血病系,用GFP和荧光素酶稳定地转染)和NALM6-GL-GD2 (稳定地转染以过表达GD2合成酶)细胞系。在DMEM (Life Technologies)中培养293T和143B细胞系。DMEM和RPMI-1640补充有10%热灭活的FBS (Gibco,Life Technologies)、10mM HEPES、100U/mL青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素和2mM L-谷氨酰胺 (Gibco,Life Technologies)。

[0153] 使用Pan T细胞阴性选择试剂盒 (Miltenyi Biotec) 从健康供体血沉棕黄层获得原代人T细胞。然后将供体T细胞等分并储存在液氮中的Cryostor (StemCell Technologies)中。在补充有5%热灭活的FBS、10mM HEPES、1%glutamax (Gibco,Life Technologies)和100u/uL重组人IL-2 (Peprotech)的AimV (Gibco,Life Technologies)中培养T细胞。除非另有说明,否则将达沙替尼 (Sigma Aldrich和Adooq Biosciences)或普纳替尼 (SelleckChem)以1 $\mu$ M培养。

[0154] 逆转录病毒产生和T细胞转导

[0155] 所有逆转录病毒上清液都是经由293GP细胞系的瞬时转染产生的。简言之,经由Lipofectamine 2000 (Life Technologies)用编码CAR和RD114包膜蛋白的质粒转染293GP细胞。在转染后48和72小时收集上清液,等分并储存在-80C。

[0156] 在解冻后,使用涂有抗CD3/抗CD28的磁珠 (Dynabeads,Thermo Fisher)以1x10<sup>6</sup>个细胞/mL的浓度以3:1的珠:细胞比例活化T细胞。在活化后第2天和第3天,用编码CAR的逆转录病毒转导T细胞。简言之,首先将逆转录病毒以3000rpm的离心到涂有重组纤维连接蛋白 (retroectin)的板上持续2小时,然后将T细胞转移至板。在活化后第4天,从培养物中除去磁珠,且此后每天以0.5x10<sup>6</sup>个细胞/mL培养T细胞。每两天更换补充有IL-2和药物的培养基。所有CAR的转导效率通常为70%-90%。

[0157] 流式细胞术

[0158] 使用LSR Fortessa (BD Bioscience)或Cytoflex (Beckman Coulter)分析所有样品,并使用FlowJo分析数据。将细胞用PBS洗涤两次,并在PBS中以1x10<sup>6</sup>个细胞/mL染色进行标记,然后用FACS缓冲液 (补充有2% FBS和0.4%0.5M EDTA的PBS)洗涤两次。用14g2a抗独特型抗体1A7检测到GD2 CAR。用FMC63抗独特型抗体136.20.1检测到CD19 CAR。经由以下评价T细胞表型:CD4 (OKT4,Biolegend)、CD8 (SK1,Biolegend)、PD-1 (eBioJ105,eBioscience)、TIM-3 (F38-2E2,Biolegend)、LAG-3 (3DS223H,eBioscience)、CD45RA (L48,BD Biosciences)、CCR7 (150503,BD Biosciences)、CD62L (DREG-56,BD Biosciences)、CD69 (FN50,Biolegend)和CD107a (H4A3,eBioscience)。对于评估CD107a的共培养测定,将肿瘤细胞和CAR T细胞在1:1000的莫能菌素 (eBioscience)和抗CD107a的存在下共培养至少6小时。所有显示CAR T细胞表型数据的FACS图都在CAR+细胞上预先门控。对于模拟转导的T细胞,将整个T细胞群体用于分析。

[0159] Incucyte测定

[0160] 将50,000个NALM6-GL或NALM6-GL-GD2肿瘤细胞与T细胞以1:8的E:T比率在200uL的无IL-2补充的完全AimV培养基中在96孔板的每个孔中共培养。将板负载到incucyte中,

并且每2小时获取488nm荧光图像持续48-72小时。通过大小和荧光强度掩模来鉴定GFP+肿瘤细胞,并对每个单独孔定量所有计数的肿瘤细胞的总整合GFP强度。将值标准化至 $t=0$ ,并且将重复孔求平均值用于数据显示。

[0161] 对于在达沙替尼存在下扩增HA-GD2.28z T细胞的实验,在一些情况下,在测定前18-24小时将药物从培养基中除去,以使CAR T细胞在肿瘤抗原存在下起作用。

[0162] 细胞因子释放测定

[0163] 将50,000个NALM6-GL-GD2肿瘤细胞与T细胞以1:1的E:T比率在200uL的无IL-2补充的完全AimV培养基中在96孔板的每个孔中共培养。在24小时后,除去上清液并储存在-20C。经由ELISA(Biolegend)评估IL-2和IFN $\gamma$ 分泌。

[0164] 对于在达沙替尼存在下扩增HA-GD2.28z T细胞的实验,在一些情况下,在测定前18-24小时将药物从培养基中除去,以使CAR T细胞在肿瘤抗原存在下起作用。

[0165] 蛋白质印迹

[0166] 将 $2 \times 10^6$ 个CAR T细胞从培养物中移除,沉淀并且重悬于100uL的补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的RIPA溶解缓冲液(10mM Tris-Cl pH 8.0、1mM EDTA、1% Triton X-100、0.1%脱氧胆酸钠、0.1% SDS、140mM NaCl)中(Thermo Fisher)。在4C下孵育30分钟后,通过在4C下以14,000RPM离心20分钟来清除上清液。通过比色反应(BioRad)测量澄清的溶解产物中的蛋白质浓度。

[0167] 将15ug的蛋白质溶解产物与6x负载缓冲液混合,并负载到组装到小型protean电泳系统(BioRad)中的10% SDS-PAGE凝胶上。在tris-甘氨酸-SDS缓冲液(BioRad)中以100V进行电泳20分钟,且然后增加至150V持续50分钟。将蛋白质转移至Immobilon-FL PVDF膜中在tris-甘氨酸缓冲液(BioRad#1610771)中在100V下进行1小时。使用靶向CD3- $\zeta$  (Cell signaling)、pY142-CD3- $\zeta$  (Cell Signaling)、p44/42MAPK (Erk1/2, Cell Signaling)、p-p44/42MAPK (p-ERK1/2, Cell Signaling)、pSer473-Akt (D9E, Cell Signaling)和pan Akt (40D4, Cell Signaling)的第一抗体。使用Odyssey (LI-COR) 成像系统、LI-COR缓冲液和LI-COR第二抗体(山羊抗小鼠IgG抗体800CW缀合的和山羊抗兔IgG抗体680LT缀合的)进行蛋白质检测。

[0168] 为了CAR交联,在37C将CAR T细胞在5ug/mL抗独特型(克隆1A7)加5ug/mL山羊抗小鼠Fab第二抗体(Jackson Immunoresearch)中或单独第二抗体中孵育5分钟。然后将细胞在冰冷的PBS中淬灭,在4C下沉淀5分钟,然后溶解以进行蛋白质印迹分析。

[0169] 体内实验

[0170] 经由静脉内注射向6-8周大的NSG小鼠植入 $1 \times 10^6$ 个NALM6-GL-GD2白血病细胞。在植入后第4天,静脉内输注 $2 \times 10^6$ 个HA-GD2.28z CAR+T细胞。使用Xenogen IVIS Lumina (Caliper Life Sciences)评价NALM6-GL-GD2的肿瘤负荷。首先向小鼠腹膜内注射3mg D-荧光素(Caliper Life Sciences)且然后在4分钟后以30秒的曝光时间成像,或者在30秒导致信号饱和的情况下,选择“自动”曝光。使用Living Image软件(Caliper Life Sciences)分析发光图像。

[0171] 向6-8周龄的NSG小鼠肌肉内植入 $0.5 \times 10^6$ 个143B骨肉瘤细胞。在植入后第3天,静脉内输注 $10 \times 10^6$ 个GD2.BBz或HA-GD2.28z。经由二维腿部面积测量植来定量骨肉瘤负荷。

[0172] 用达沙替尼(Adooq Biosciences)处理的小鼠以50mg/kg的浓度腹膜内注射水+

10%Kolliphor HS 15(Sigma Aldrich)。用媒介物处理的小鼠注射相等体积的水+10%Kolliphor HS 15。

[0173] 经由眼眶后抽血采集血液样品,并短暂地储存在涂有EDTA的微量采血管(Kent Scientific)中。通过穿过70- $\mu$ m过滤器(BD Biosciences)来机械地分解脾脏。将血液和脾脏两者在ACK溶解缓冲液(Fisher Scientific)中溶解5分钟,且随后用表面标记物抗体染色以进行FACS分析。

[0174] CAR载体的构建

[0175] 将所有CAR序列插入MSGV逆转录病毒主链中。每个CAR包括信号肽、单链可变片段(scFv)、细胞外铰链区、跨膜结构域、细胞内共刺激结构域和细胞内CD3 $\zeta$ 结构域。

[0176] 序列

[0177] CD19.28z(FMC63 scFv)的核酸和氨基酸序列提供于图23。

[0178] CD19.BBz(FMC63 scFv)的核酸和氨基酸序列提供于图24。

[0179] GD2.BBz(14G2a scFv)的核酸和氨基酸序列提供于图25。

[0180] HA-GD2.28z(高亲和力14G2a scFv)的核酸和氨基酸序列提供于图26。

[0181] 现已充分描述本发明,本领域技术人员应了解在不影响本发明或其任何实施方案的范围的情况下,可以广泛且等效范围的条件、制剂和其他参数来执行本发明。本文中引用的所有专利、专利申请和公布完全以引用的方式整体并入本文。

[0182] 以引用的方式并入

[0183] 本文中所引用的每个专利文献和科技文章的全部公开内容出于所有目的以引用的方式并入。

[0184] 等效物

[0185] 本发明可在不偏离其精神或实质特征的情况下以其他具体形式来实施。因此前述实施方案应当在所有方面视为是说明性的而不是限制本文所述的发明。因此,本发明的范围是由随附权利要求而非由上述描述所指示,且因此属于权利要求的等效性含义和范围内的所有变化都意图包括在其中。

[0001]	SEQUENCE LISTING
[0002]	<110> 小利兰·斯坦福大学托管委员会 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY)
[0003]	<120> METHODS OF MITIGATING T CELL EXHAUSTION BY MODULATING OR
[0004]	INHIBITING T CELL RECEPTOR SIGNALING AND/OR CHIMERIC ANTIGEN
[0005]	RECEPTOR SIGNALING
[0006]	<130> STDU2-36278/WO-1/ORD
[0007]	<150> US 62/479,930
[0008]	<151> 2017-03-31
[0009]	<160> 8
[0010]	<170> PatentIn version 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 1794
[0013]	<212> DNA
[0014]	<213> Artificial Sequence
[0015]	<220>
[0016]	<223> synthetic
[0017]	<400> 1
[0018]	atgacaagag ttactaacag cccctctctc caagctcact tacaggctct ctacttagtc 60
[0019]	cagcacgaag tctggagacc tctggcggca gcctaccaag aacaactgga ccgaccggtg 120
[0020]	gtacctcacc cttaccgagt cggcgacaca gtgtgggtcc gccgacacca gactaagaac 180
[0021]	ctagaacctc gctggaaagg accttacaca gtctgtctga ccacccccac cgccctcaaa 240
[0022]	gtagacggca tcgcagcttg gatacacgcc gccacgtga aggctgccga ccccgggggt 300
[0023]	ggaccatcct ctgactgct cgagatgctt ctctgttgta caagccttct gctctgtgag 360
[0024]	ttaccacacc cagcattcct cctgatccca gacatccaga tgacacagac tacatcctcc 420
[0025]	ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgca gggcaagtca ggacattagt 480
[0026]	aaatatttaa attggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct gatctacat 540
[0027]	acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagt gtagtgggtc tggaacagat 600
[0028]	tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatatg ccacttactt ttgccaacag 660
[0029]	ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg gggactaagt tggaaataac aggctccacc 720
[0030]	tctggatccg gcaagcccgg atctggcgag ggatccacca agggcgaggt gaaactgcag 780
[0031]	gagtcaggac ctggcctggt ggcgccctca cagagcctgt ccgtcacatg cactgtctca 840
[0032]	gggtctcat taccgacta tgggtgtaagc tggattgcc agcctccacg aaagggtctg 900
[0033]	gagtggctgg gagtaatatg gggtagtga accacatact ataattcagc tctcaaatcc 960
[0034]	agactgacca tcatcaagga caactccaag agccaagttt tcttaaaaat gaacagtctg 1020
[0035]	caaactgatg acacagccat ttactactgt gccaaacatt attactacgg tggtagctat 1080
[0036]	gctatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctcagcggc cgcaattgaa 1140
[0037]	gttatgtatc ctctcctta cctagacaat gagaagagca atggaacct tatccatgtg 1200
[0038]	aaagggaac acctttgtcc aagtccccta tttccggac cttctaagcc cttttgggtg 1260
[0039]	ctgggtggtg ttgggggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 1320
[0040]	atcttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 1380

[0041]	ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc	1440
[0042]	gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgag acgccccgc gtaccagcag	1500
[0043]	ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg	1560
[0044]	gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag	1620
[0045]	gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg	1680
[0046]	atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca	1740
[0047]	gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa	1794
[0048]	<210>	2
[0049]	<211>	597
[0050]	<212>	PRT
[0051]	<213>	Artificial Sequence
[0052]	<220>	
[0053]	<223>	synthetic
[0054]	<400>	2
[0055]	Met Thr Arg Val Thr Asn Ser Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala	
[0056]	1 5 10 15	
[0057]	Leu Tyr Leu Val Gln His Glu Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr	
[0058]	20 25 30	
[0059]	Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly	
[0060]	35 40 45	
[0061]	Asp Thr Val Trp Val Arg Arg His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg	
[0062]	50 55 60	
[0063]	Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys	
[0064]	65 70 75 80	
[0065]	Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala	
[0066]	85 90 95	
[0067]	Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser Ser Arg Leu Leu Glu Met Leu Leu Leu	
[0068]	100 105 110	
[0069]	Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu	
[0070]	115 120 125	
[0071]	Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser	
[0072]	130 135 140	
[0073]	Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser	
[0074]	145 150 155 160	
[0075]	Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu	
[0076]	165 170 175	
[0077]	Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	
[0078]	180 185 190	
[0079]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu	
[0080]	195 200 205	
[0081]	Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu	
[0082]	210 215 220	

[0083]	Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr		
[0084]	225	230	235 240
[0085]	Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu		
[0086]		245	250 255
[0087]	Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser		
[0088]		260	265 270
[0089]	Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly		
[0090]		275	280 285
[0091]	Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly		
[0092]	290	295	300
[0093]	Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser		
[0094]	305	310	315 320
[0095]	Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys		
[0096]		325	330 335
[0097]	Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys		
[0098]		340	345 350
[0099]	His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0100]		355	360 365
[0101]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro		
[0102]		370	375 380
[0103]	Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val		
[0104]	385	390	395 400
[0105]	Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys		
[0106]		405	410 415
[0107]	Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser		
[0108]		420	425 430
[0109]	Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg		
[0110]		435	440 445
[0111]	Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro		
[0112]		450	455 460
[0113]	Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe		
[0114]	465	470	475 480
[0115]	Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
[0116]		485	490 495
[0117]	Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
[0118]		500	505 510
[0119]	Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
[0120]		515	520 525
[0121]	Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
[0122]		530	535 540
[0123]	Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
[0124]	545	550	555 560

[0125]	Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln	
[0126]	565	570 575
[0127]	Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln	
[0128]	580	585 590
[0129]	Ala Leu Pro Pro Arg	
[0130]	595	
[0131]	<210> 3	
[0132]	<211> 1482	
[0133]	<212> DNA	
[0134]	<213> Artificial Sequence	
[0135]	<220>	
[0136]	<223> synthetic	
[0137]	<400> 3	
[0138]	atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg	60
[0139]	atccagacac tccagatgac acagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga	120
[0140]	gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attagtaaatt atttaaattg gtatcagcag	180
[0141]	aaaccagatg gaactgttaa actcctgata taccatacat caagattaca ctcaggagtc	240
[0142]	ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg	300
[0143]	gagcaagaag atattgccac ttacttttgc caacagggtg atacgcttcc gtacacgttc	360
[0144]	ggagggggga ctaagttgga aataacaggc tccacctctg gatccggcaa gcccggtatc	420
[0145]	ggcgagggat ccaccaaggc cgaggtgaaa ctgcaggagt caggacctgg cctggtggcg	480
[0146]	ccctcacaga gcctgtccgt cacatgcact gtctcagggt tctcattacc cgactatggt	540
[0147]	gtaagctgga ttccgagcc tccacgaaag ggtctggagt ggctgggagt aatatggggt	600
[0148]	agtgaacca catactataa ttacgtctc aaatccagac tgaccatcat caaggacaac	660
[0149]	tccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgcaaa ctgatgacac agccatttac	720
[0150]	tactgtgcca aacattatta ctacggtggt agctatgcta tggactactg ggggtcaagga	780
[0151]	acctcagtca ccgtctctc agcgcccgca accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca	840
[0152]	ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg	900
[0153]	gcggggggcg cagtgcacac gagggggtg gacttcgcct gtgatataca catctgggcg	960
[0154]	cccttgccg ggacttgtg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcacct ttactgcaaa	1020
[0155]	cggggcagaa agaaactcct gtatatattc aaacaaccat ttatgagacc agtataaact	1080
[0156]	actcaagagg aagatggctg tagctgccga tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa	1140
[0157]	ctgagagtga agttcagcag gagcgagac gccccgcgt acaagcaggc ccagaaccag	1200
[0158]	ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gagagtagc atgttttgga caagagacgt	1260
[0159]	ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac	1320
[0160]	aatgaactgc agaaagataa gatggcgag gcctacagt agattgggat gaaaggcgag	1380
[0161]	cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac	1440
[0162]	acctacagc cccttcacat gcagggcctg cccctcgt aa	1482
[0163]	<210> 4	
[0164]	<211> 493	
[0165]	<212> PRT	
[0166]	<213> Artificial Sequence	

[0167]	<220>
[0168]	<223> synthetic
[0169]	<400> 4
[0170]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0171]	1 5 10 15
[0172]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
[0173]	20 25 30
[0174]	Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
[0175]	35 40 45
[0176]	Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
[0177]	50 55 60
[0178]	Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
[0179]	65 70 75 80
[0180]	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
[0181]	85 90 95
[0182]	Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
[0183]	100 105 110
[0184]	Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0185]	115 120 125
[0186]	Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
[0187]	130 135 140
[0188]	Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
[0189]	145 150 155 160
[0190]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
[0191]	165 170 175
[0192]	Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
[0193]	180 185 190
[0194]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
[0195]	195 200 205
[0196]	Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
[0197]	210 215 220
[0198]	Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
[0199]	225 230 235 240
[0200]	Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
[0201]	245 250 255
[0202]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
[0203]	260 265 270
[0204]	Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
[0205]	275 280 285
[0206]	Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
[0207]	290 295 300
[0208]	Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala

[0209]	305	310	315	320
[0210]	Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr			
[0211]		325	330	335
[0212]	Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln			
[0213]		340	345	350
[0214]	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser			
[0215]		355	360	365
[0216]	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys			
[0217]		370	375	380
[0218]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln			
[0219]		385	390	395
[0220]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu			
[0221]		405	410	415
[0222]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg			
[0223]		420	425	430
[0224]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met			
[0225]		435	440	445
[0226]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly			
[0227]		450	455	460
[0228]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp			
[0229]		465	470	475
[0230]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0231]		485	490	
[0232]	<210> 5			
[0233]	<211> 1479			
[0234]	<212> DNA			
[0235]	<213> Artificial Sequence			
[0236]	<220>			
[0237]	<223> synthetic			
[0238]	<400> 5			
[0239]	atgctgctgc tcgtgacatc tctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg	60		
[0240]	atccccgata tcctgctgac ccagaccctt ctgagcctgc ctgtgtctct gggcgatcag	120		
[0241]	gccagcatca gctgcagatc cagccagagc ctggtgcacc ggaacggcaa cacctacctg	180		
[0242]	cactggtatc tgcagaagcc cggccagagc cccaagctgc tgattcaca ggtgtccaac	240		
[0243]	cggttcagcg gcgtgcccga cagattttct ggcagcggct ccggcaccga cttcacctg	300		
[0244]	aagatcagcc ggggtggaagc cgaggacctg ggcgtgtact tctgcagcca gtccaccac	360		
[0245]	gtgccccccc tgacatttgg cgccggaaca aagctggaac tgaagggcag cacaagcggc	420		
[0246]	agcggcaagc ctggatctgg cgagggaagc accaagggcg aagtgaagct gcagcagagc	480		
[0247]	ggccccctctc tgggtggaacc tggcgccctc gtgatgatct cctgcaagc cagcggcagc	540		
[0248]	tccttcaccg gctacaacat gaactgggtg cgccagaaca tcggcaagag cctggaatgg	600		
[0249]	atcggcgcca tcgacccta ctacggcggc accagctaca accagaagt caagggcaga	660		
[0250]	gccaccctga ccgtggacaa gacagctcc accgctaca tgcacctgaa gtcctgacc	720		

[0251]	agcgaggaca gcgccgtgta ctactgcgtg tccggcatgg aatactgggg ccagggcaca	780
[0252]	agcgtgaccg tgctctctgc ggccgcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg	840
[0253]	gcgcccacca tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg	900
[0254]	gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc	960
[0255]	ttggccggga cttgtggggt ctttctctcg tcaactgtta tcacccttta ctgcaaacgg	1020
[0256]	ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact	1080
[0257]	caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg	1140
[0258]	agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc	1200
[0259]	tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc	1260
[0260]	cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	1320
[0261]	gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	1380
[0262]	cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	1440
[0263]	tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgctaa	1479
[0264]	<210>	6
[0265]	<211>	492
[0266]	<212>	PRT
[0267]	<213>	Artificial Sequence
[0268]	<220>	
[0269]	<223>	synthetic
[0270]	<400>	6
[0271]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro	
[0272]	1 5 10 15	
[0273]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser	
[0274]	20 25 30	
[0275]	Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser	
[0276]	35 40 45	
[0277]	Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu	
[0278]	50 55 60	
[0279]	Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn	
[0280]	65 70 75 80	
[0281]	Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr	
[0282]	85 90 95	
[0283]	Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val	
[0284]	100 105 110	
[0285]	Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala	
[0286]	115 120 125	
[0287]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro	
[0288]	130 135 140	
[0289]	Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser	
[0290]	145 150 155 160	
[0291]	Gly Pro Ser Leu Val Glu Pro Gly Ala Ser Val Met Ile Ser Cys Lys	
[0292]	165 170 175	

[0293]	Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln
[0294]	180 185 190
[0295]	Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr
[0296]	195 200 205
[0297]	Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr
[0298]	210 215 220
[0299]	Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Lys Ser Leu Thr
[0300]	225 230 235 240
[0301]	Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp
[0302]	245 250 255
[0303]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr
[0304]	260 265 270
[0305]	Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
[0306]	275 280 285
[0307]	Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
[0308]	290 295 300
[0309]	His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
[0310]	305 310 315 320
[0311]	Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
[0312]	325 330 335
[0313]	Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
[0314]	340 345 350
[0315]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
[0316]	355 360 365
[0317]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
[0318]	370 375 380
[0319]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu
[0320]	385 390 395 400
[0321]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
[0322]	405 410 415
[0323]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
[0324]	420 425 430
[0325]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
[0326]	435 440 445
[0327]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
[0328]	450 455 460
[0329]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
[0330]	465 470 475 480
[0331]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0332]	485 490
[0333]	<210> 7
[0334]	<211> 2217

[0335]	<212>	DNA	
[0336]	<213>	Artificial Sequence	
[0337]	<220>		
[0338]	<223>	synthetic	
[0339]	<400>	7	
[0340]	atggaattcg	gcctgagctg	gctgttcctg gtggccatcc tgaaggcggt gcagtgcagc 60
[0341]	agatatatcc	tgctgacca	gacccctctg agcctgcctg tgtctctggg cgatcaggcc 120
[0342]	agcatcagct	gcagatccag	ccagagcctg gtgcaccgga acggcaacac ctacctgcac 180
[0343]	tggtatctgc	agaagcccgg	ccagagcccc aagctgctga tccacaaggt gtccaaccgg 240
[0344]	ttcagcggcg	tgcccgcacag	attttctggc agcggctccg gcaccgactt caccctgaag 300
[0345]	atcagccggg	tggaagccga	ggacctgggc gtgtacttct gcagccagtc caccacagt 360
[0346]	ccccccctga	catttggcgc	cggaacaaag ctggaactga aggggggagg cggatctggc 420
[0347]	ggcggaggaa	gtggcggagg	gggatctgaa gtgaagctgc agcagtccgg cccagcctg 480
[0348]	gtggaacctg	gcgcctctgt	gatgatctcc tgcaaggcca gcggcagctc cttcaccggc 540
[0349]	tacaacatga	actgggtgcg	ccagaacatc ggcaagagcc tggaatggat cggcgccatc 600
[0350]	gacccctact	acggcggcac	cagctacaac cagaagttca agggcagagc caccctgacc 660
[0351]	gtggacaaga	gcagcagcac	cgcctacatg cacctgaagt ccctgaccag cgaggacagc 720
[0352]	gccgtgtact	actgcgtgtc	cggcatgaag tactggggcc agggcacaag cgtgaccgtg 780
[0353]	tctagcgcca	agaccacccc	ccctagcgtg tacggaagag tgacagtgtc ctctgccgag 840
[0354]	cccaagagct	gcgacaagac	ccacacctgt ccccttgtc ctgcccctga gctgctggga 900
[0355]	ggcccttcg	tgttcctgtt	ccccccaaag cccaaggaca cactgatgat cagcagaacc 960
[0356]	cccgaagtga	cctgcgtggt	ggtggacgtg tcccacgagg acccagaagt gaagttcaat 1020
[0357]	tggtacgtgg	acggcgtgga	agtgcacaac gccaaagaca agcccagaga ggaacagtac 1080
[0358]	aacagcacct	accgggtggt	gtccgtgctg accgtgctgc atcaggattg gctgaacggc 1140
[0359]	aaagagtaca	agtgcaaagt	gtccaacaag gccctgcctg ccccatcga gaaaaccatc 1200
[0360]	agcaaggcca	agggccagcc	ccgcgaaccc caggtgtaca cactgcccc tagcagggac 1260
[0361]	gagctgacca	agaaccaggt	gtccctgaca tgccctgtga agggcttcta cccctccgat 1320
[0362]	atgccgtgg	aatgggagag	caacggccag cccgagaaca actacaagac aaccctccc 1380
[0363]	gtgctggaca	gcgacggctc	attcttctctg tacagcaagc tgacagtgga taagtcccg 1440
[0364]	tggcagcagg	gcaacgtgtt	cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1500
[0365]	accagaaaa	gcctgtccct	gagccccggc aagaaggacc ccaaagctag cttcgaaatt 1560
[0366]	gaagttatgt	atcctcctcc	ttacctagac aatgagaaga gcaatggaac cattatccat 1620
[0367]	gtgaaaggga	aacacctttg	tccaagtccc ctatttcccg gaccttctaa gcccttttgg 1680
[0368]	gtgctggtgg	tggttggggg	agtcctggct tgctatagct tgctagtaac agtggccttt 1740
[0369]	attattttct	gggtgaggag	taagaggagc aggcctctgc acagtgacta catgaacatg 1800
[0370]	actccccgcc	gccccgggcc	cacccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgcgac 1860
[0371]	ttcgcagcct	atcgtccag	agtgaagtgc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtacaag 1920
[0372]	cagggccaga	accagctcta	taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 1980
[0373]	ttggacaaga	gacgtggccg	ggacctgag atggggggaa agccgagaag gaagaacct 2040
[0374]	caggaaggcc	tgtacaatga	actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgaatt 2100
[0375]	gggatgaaag	gcgagcgccg	gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt 2160
[0376]	acagccacca	aggacaccta	cgacgccctt cacatgcagg cctgcccc tcgctaa 2217

[0377]	<210>	8														
[0378]	<211>	738														
[0379]	<212>	PRT														
[0380]	<213>	Artificial Sequence														
[0381]	<220>															
[0382]	<223>	synthetic														
[0383]	<400>	8														
[0384]	Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
[0385]	1				5					10					15	
[0386]	Val	Gln	Cys	Ser	Arg	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu
[0387]				20					25					30		
[0388]	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln
[0389]			35					40					45			
[0390]	Ser	Leu	Val	His	Arg	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln
[0391]		50					55					60				
[0392]	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Lys	Val	Ser	Asn	Arg
[0393]	65					70				75					80	
[0394]	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
[0395]				85					90					95		
[0396]	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr
[0397]			100						105				110			
[0398]	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly
[0399]			115					120					125			
[0400]	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
[0401]		130					135					140				
[0402]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu
[0403]	145					150					155				160	
[0404]	Val	Glu	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Met	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser
[0405]				165					170					175		
[0406]	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Asn	Ile	Gly	Lys
[0407]			180						185				190			
[0408]	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Ser
[0409]		195					200					205				
[0410]	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
[0411]		210					215					220				
[0412]	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
[0413]	225					230				235					240	
[0414]	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ser	Gly	Met	Lys	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0415]				245					250					255		
[0416]	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Gly
[0417]			260						265				270			
[0418]	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	Hi

[0419]	275	280	285
[0420]	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
[0421]	290	295	300
[0422]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0423]	305	310	315
[0424]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
[0425]	325	330	335
[0426]	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0427]	340	345	350
[0428]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0429]	355	360	365
[0430]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0431]	370	375	380
[0432]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
[0433]	385	390	395
[0434]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0435]	405	410	415
[0436]	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0437]	420	425	430
[0438]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0439]	435	440	445
[0440]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0441]	450	455	460
[0442]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0443]	465	470	475
[0444]	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0445]	485	490	495
[0446]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys		
[0447]	500	505	510
[0448]	Asp Pro Lys Ala Ser Phe Glu Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr		
[0449]	515	520	525
[0450]	Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys		
[0451]	530	535	540
[0452]	His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp		
[0453]	545	550	555
[0454]	Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val		
[0455]	565	570	575
[0456]	Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu		
[0457]	580	585	590
[0458]	Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr		
[0459]	595	600	605
[0460]	Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr		

---

[0461]	610	615	620
[0462]	Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys		
[0463]	625	630	635 640
[0464]	Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu		
[0465]	645	650	655
[0466]	Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly		
[0467]	660	665	670
[0468]	Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		
[0469]	675	680	685
[0470]	Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		
[0471]	690	695	700
[0472]	Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		
[0473]	705	710	715 720
[0474]	Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		
[0475]	725	730	735
[0476]	Pro Arg		

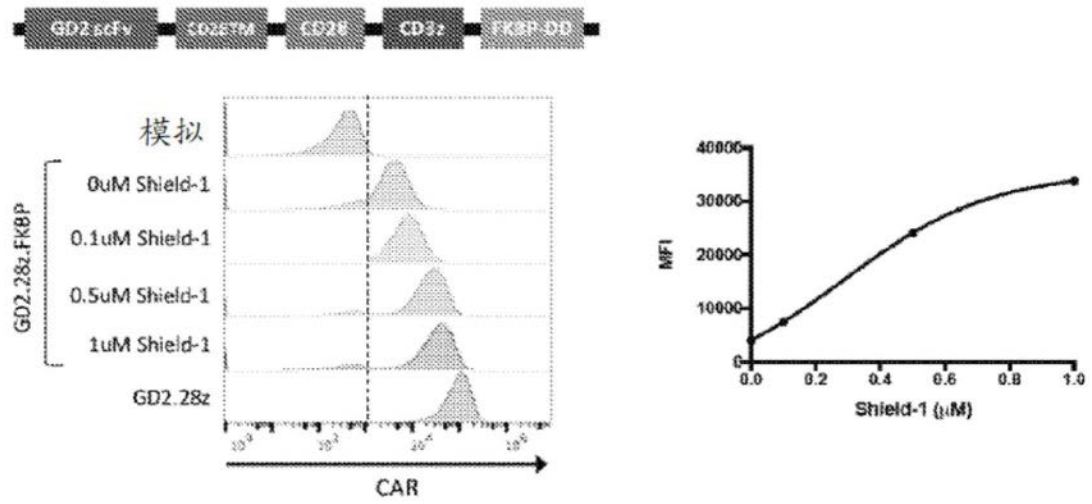
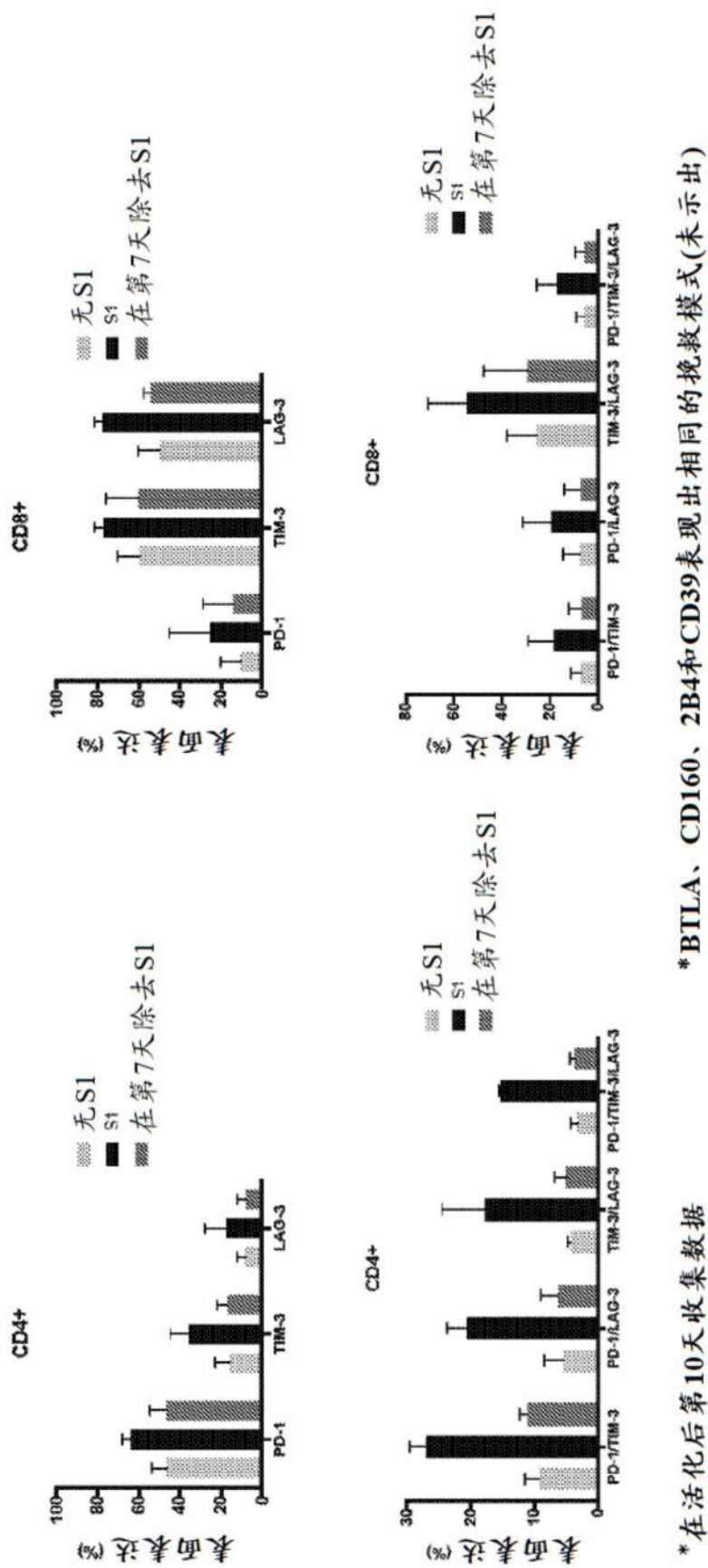


图1



\*在活化后第10天收集数据

\*BTLA、CD160、2B4和CD39表现出相同的挽救模式(未示出)

图2

\*在第14天收集的数据，在CD8+上同控

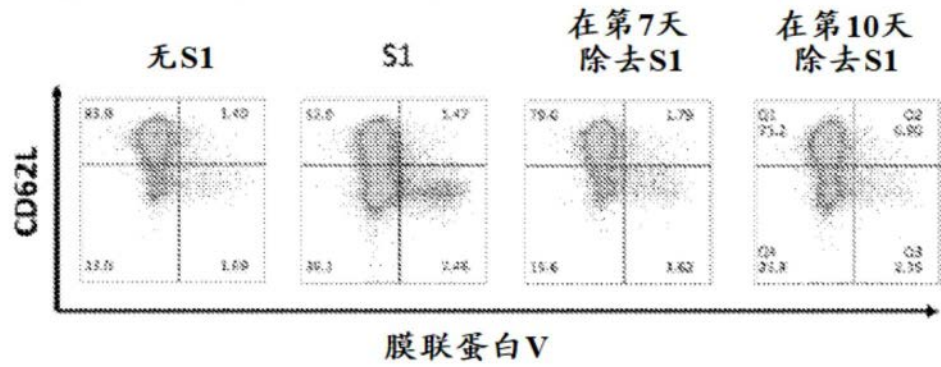


图3

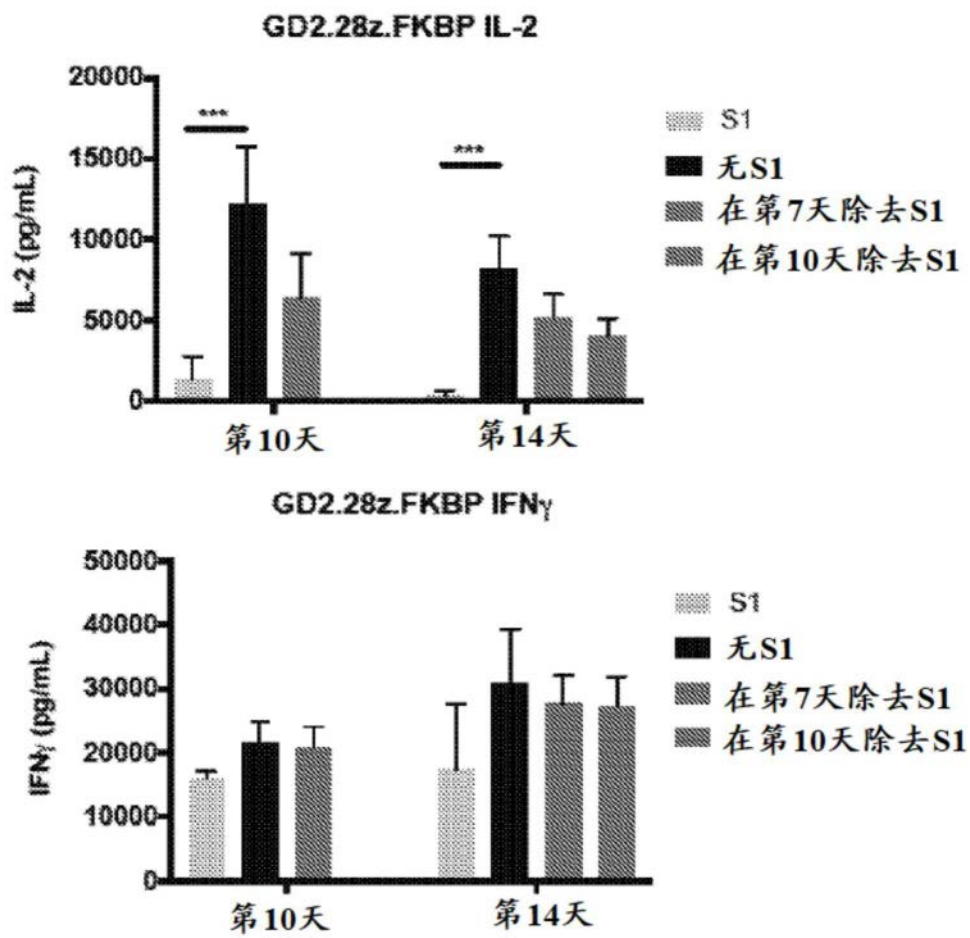


图4

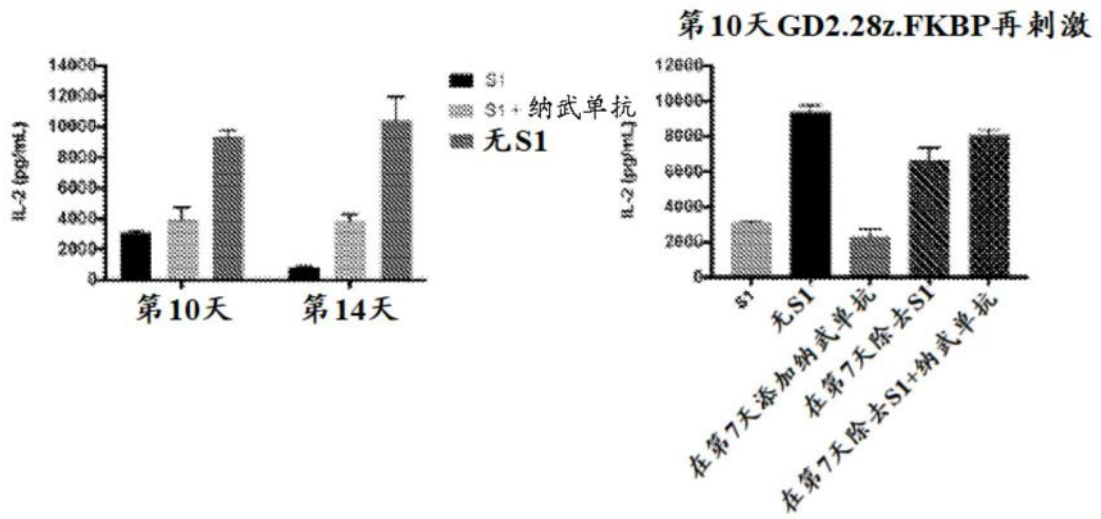


图5

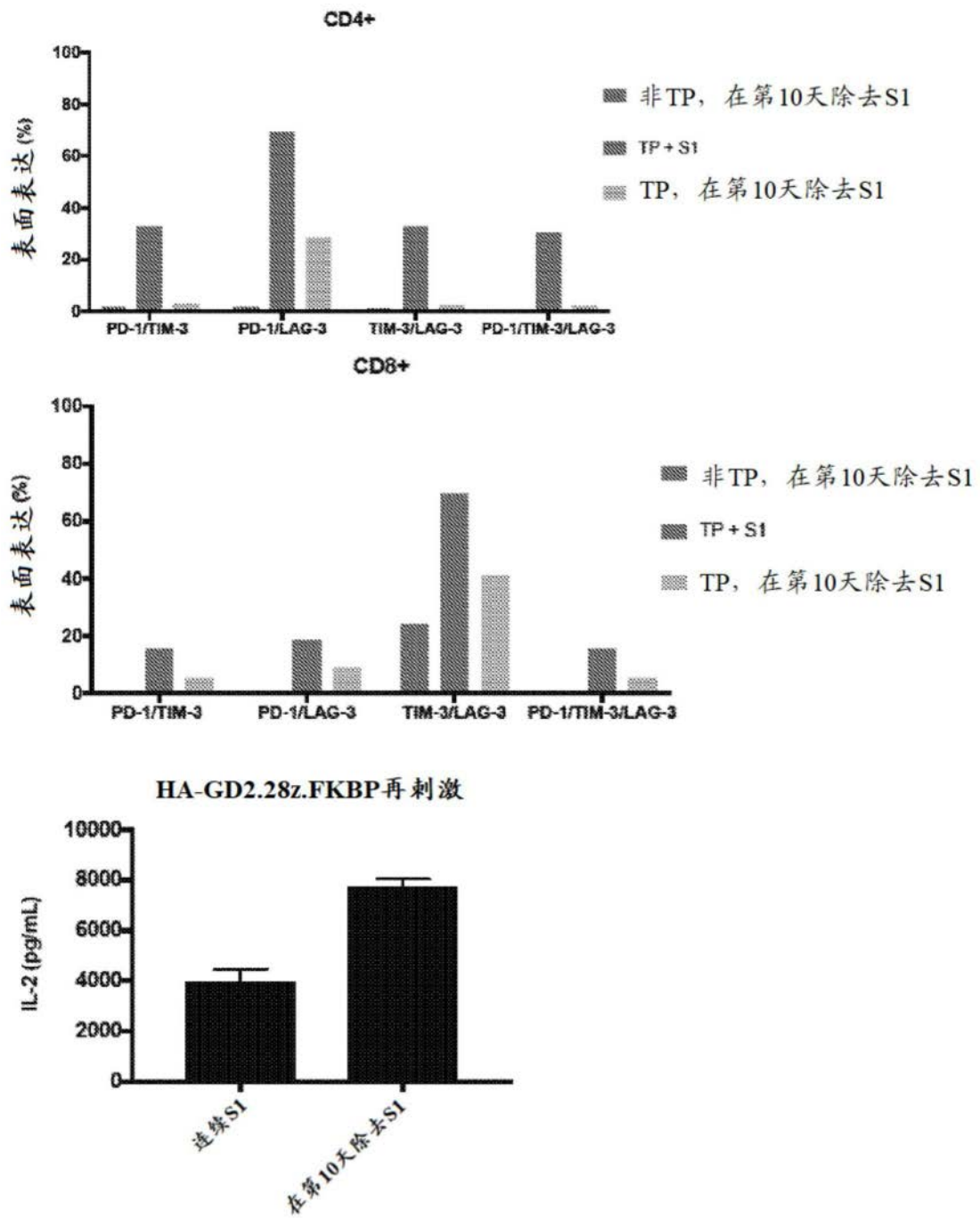


图6

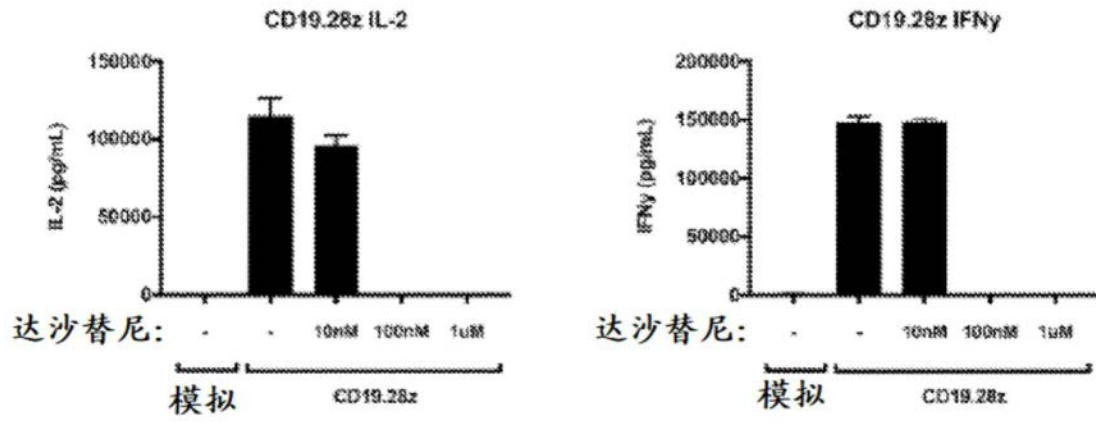


图7

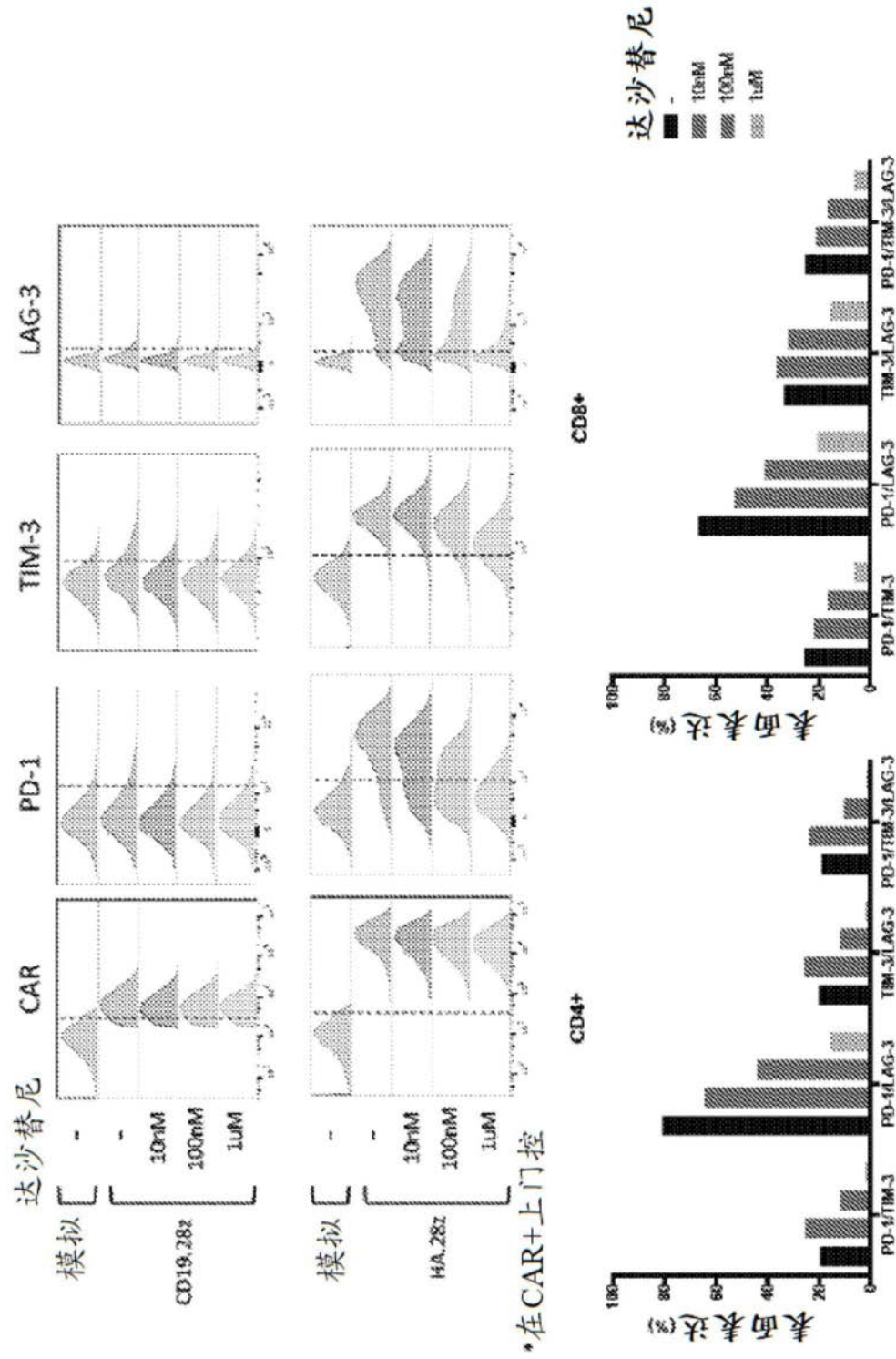


图8

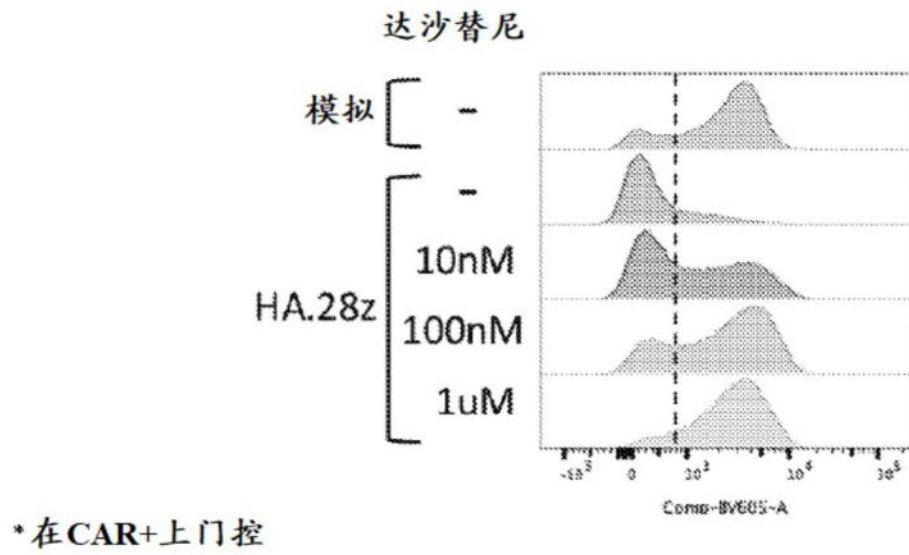


图9

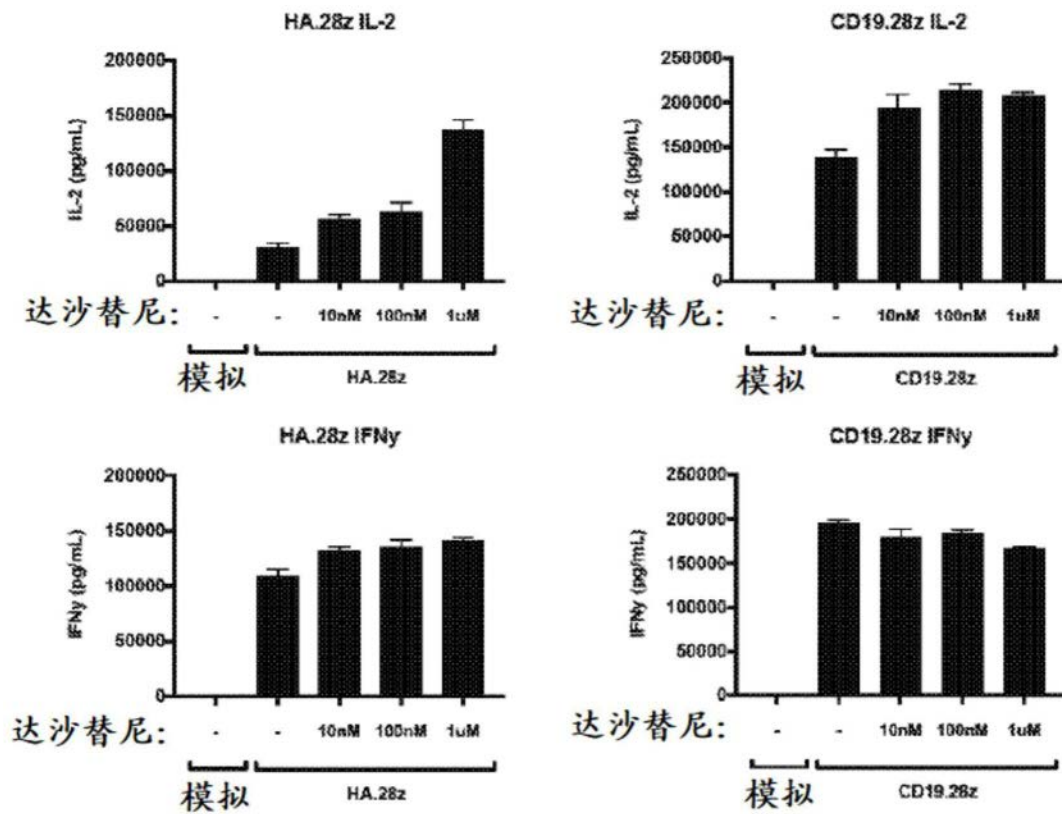


图10

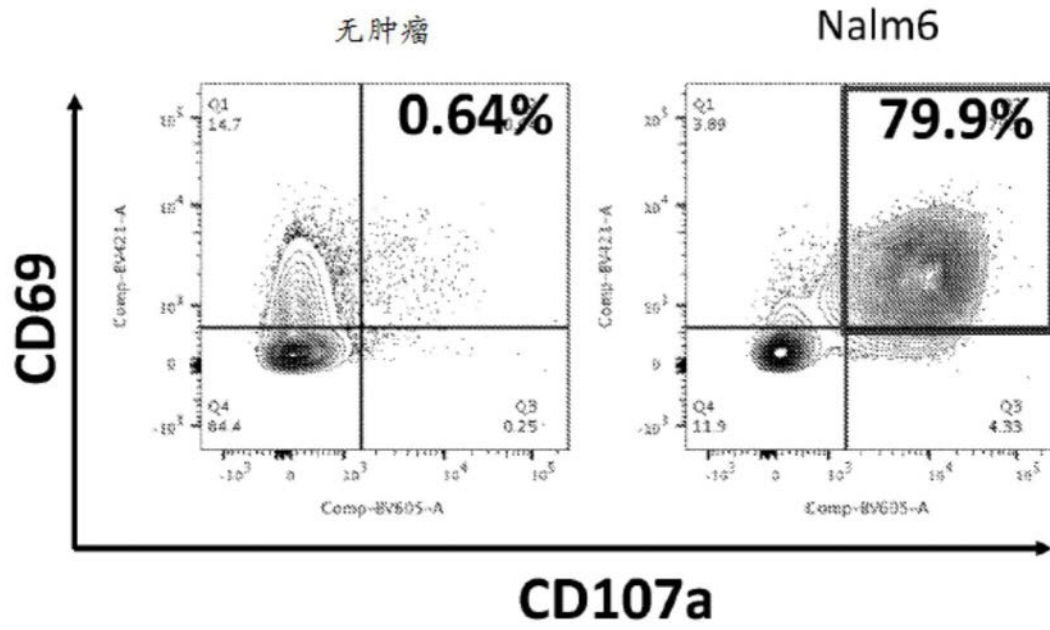


图11A

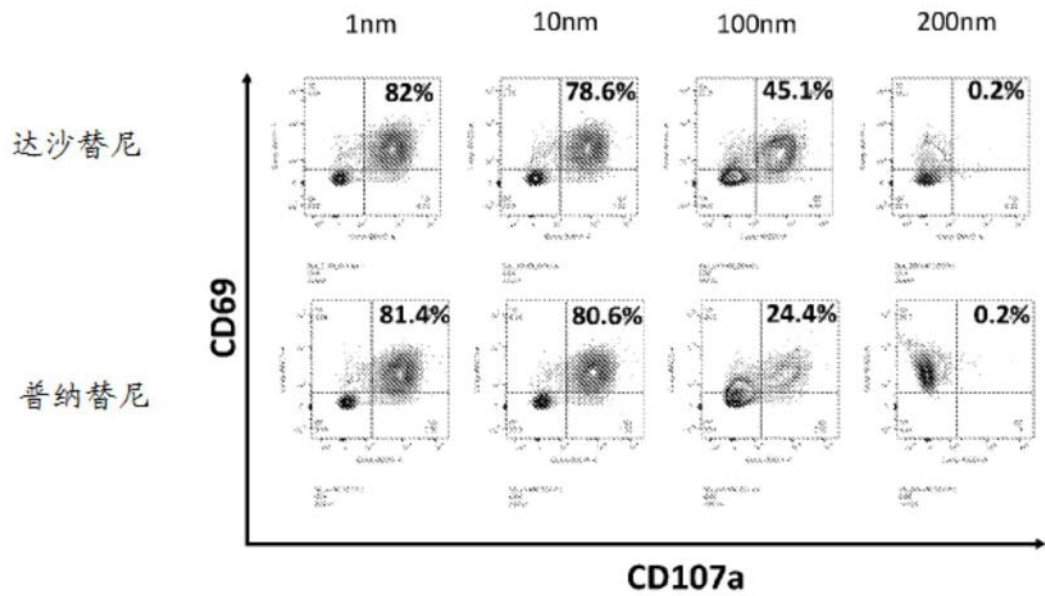


图11B

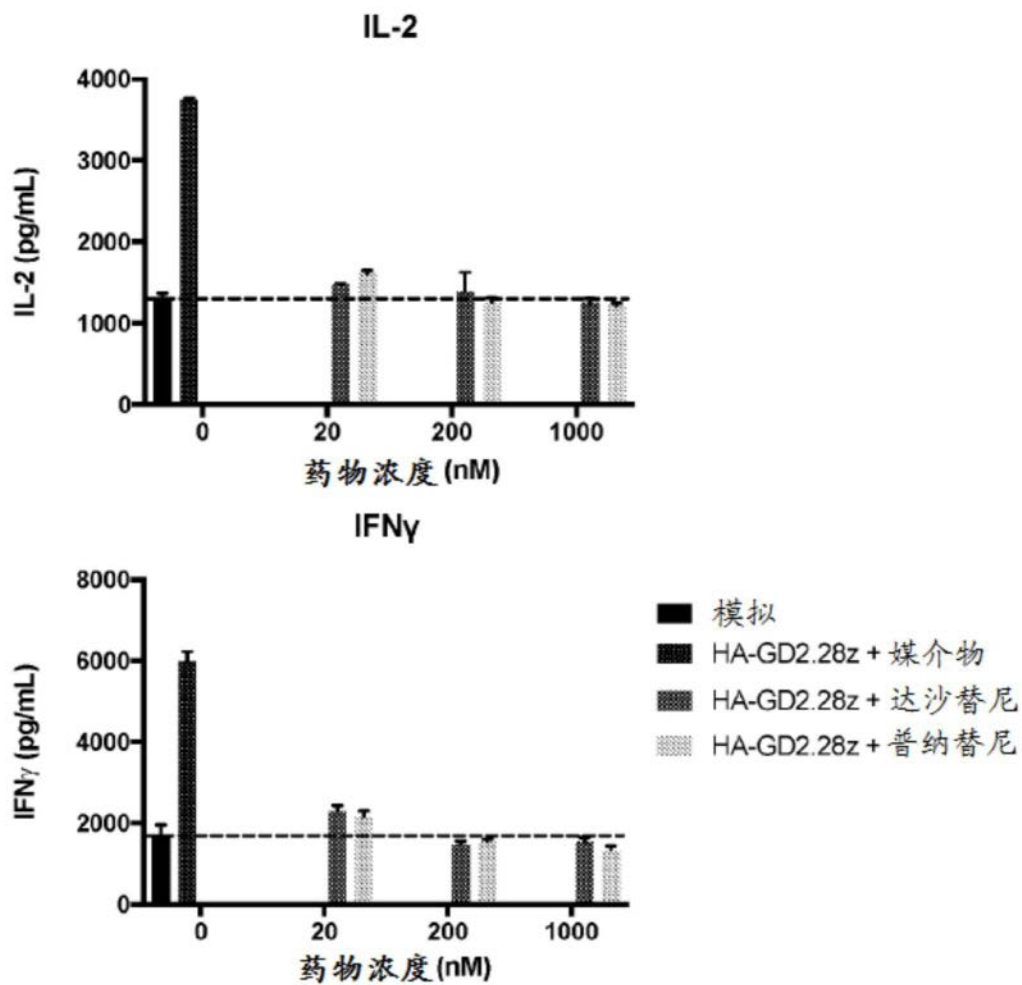


图12

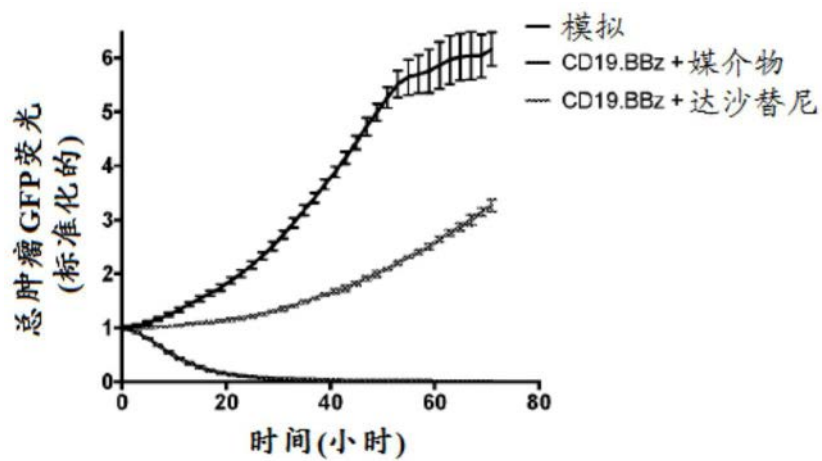


图13

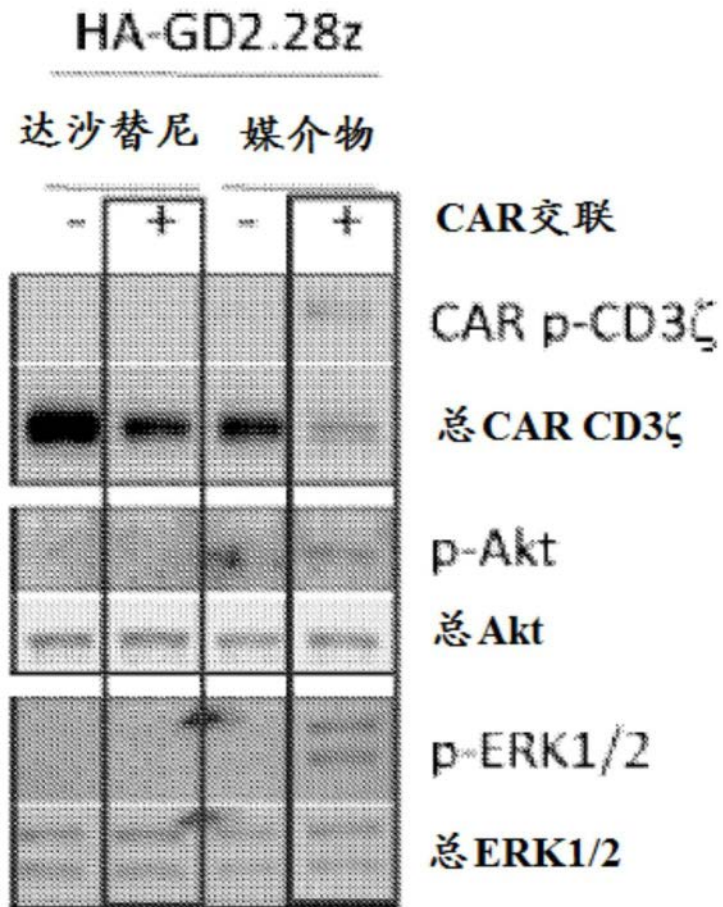


图14

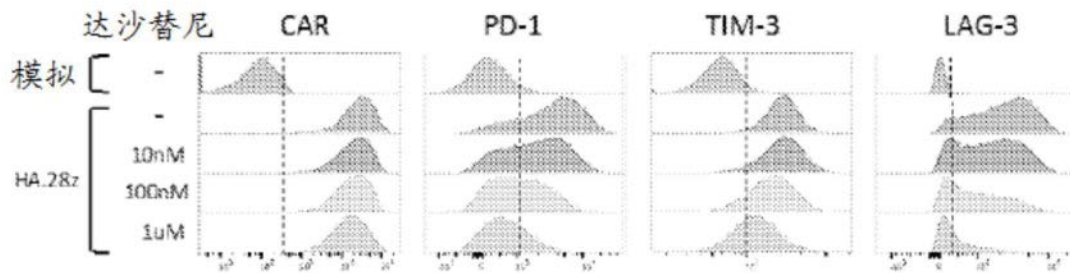


图15A

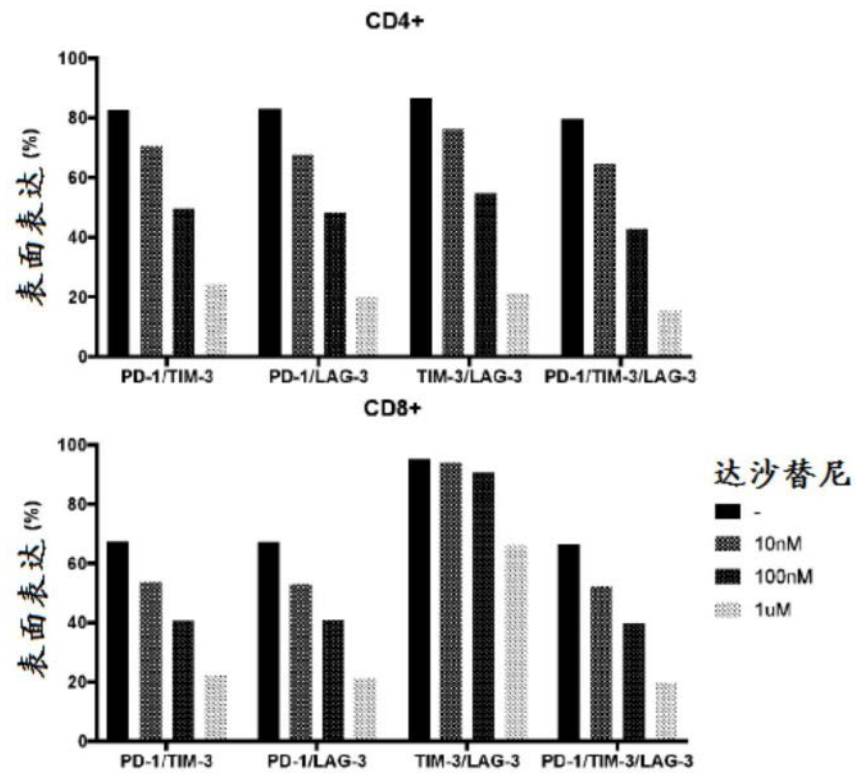


图15B

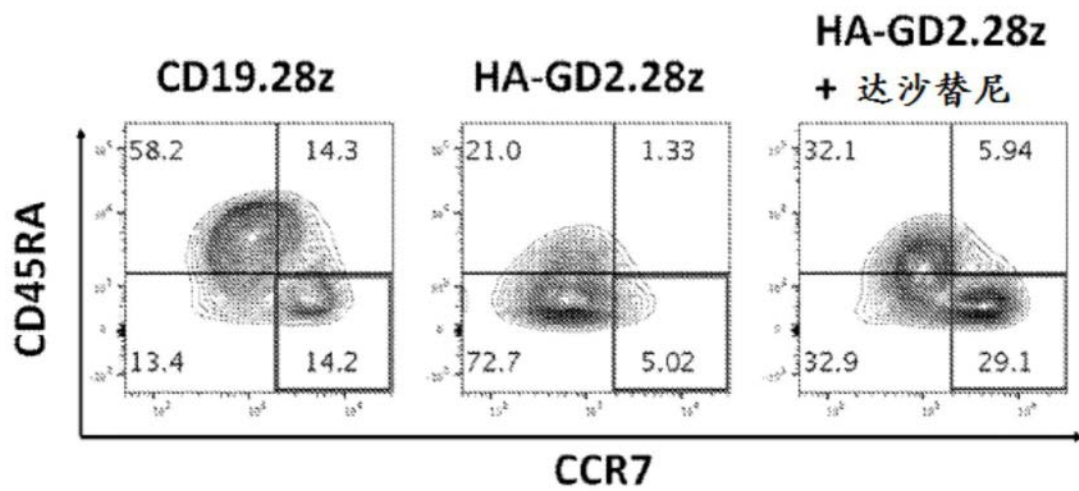


图16

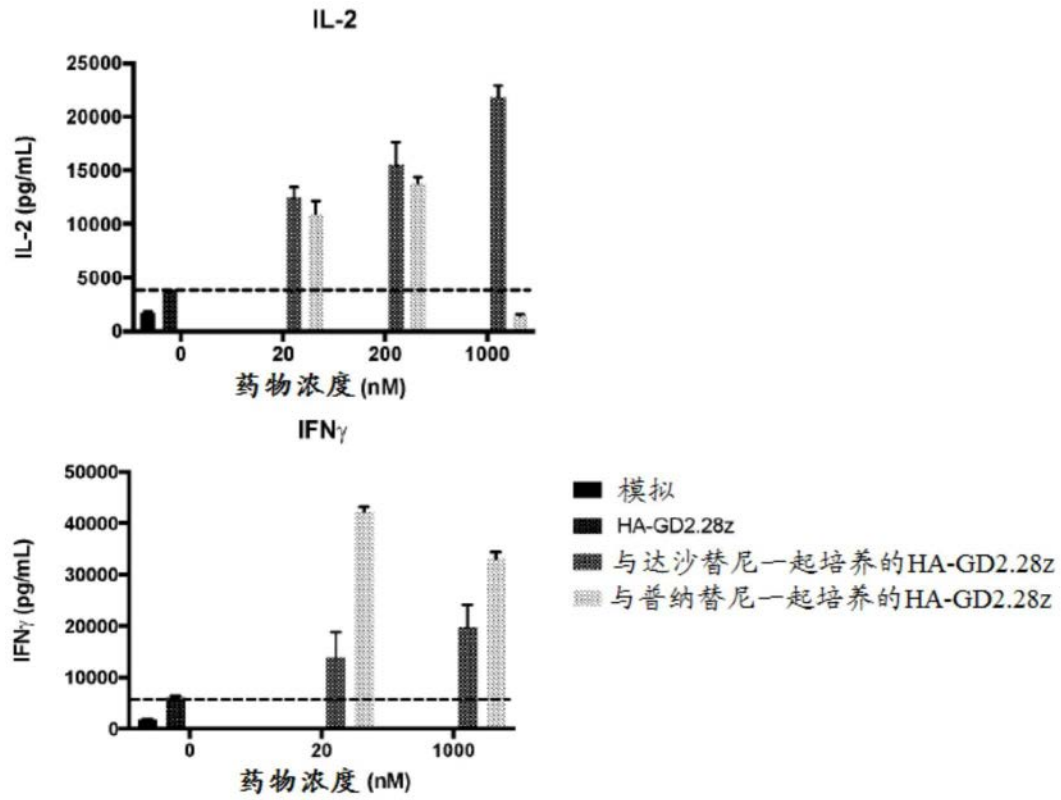


图17

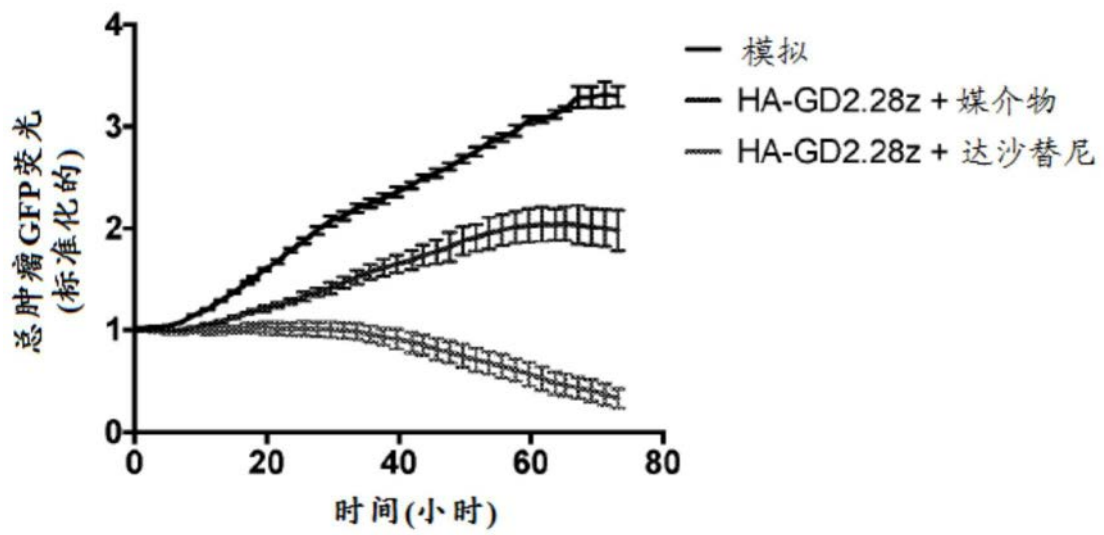


图18

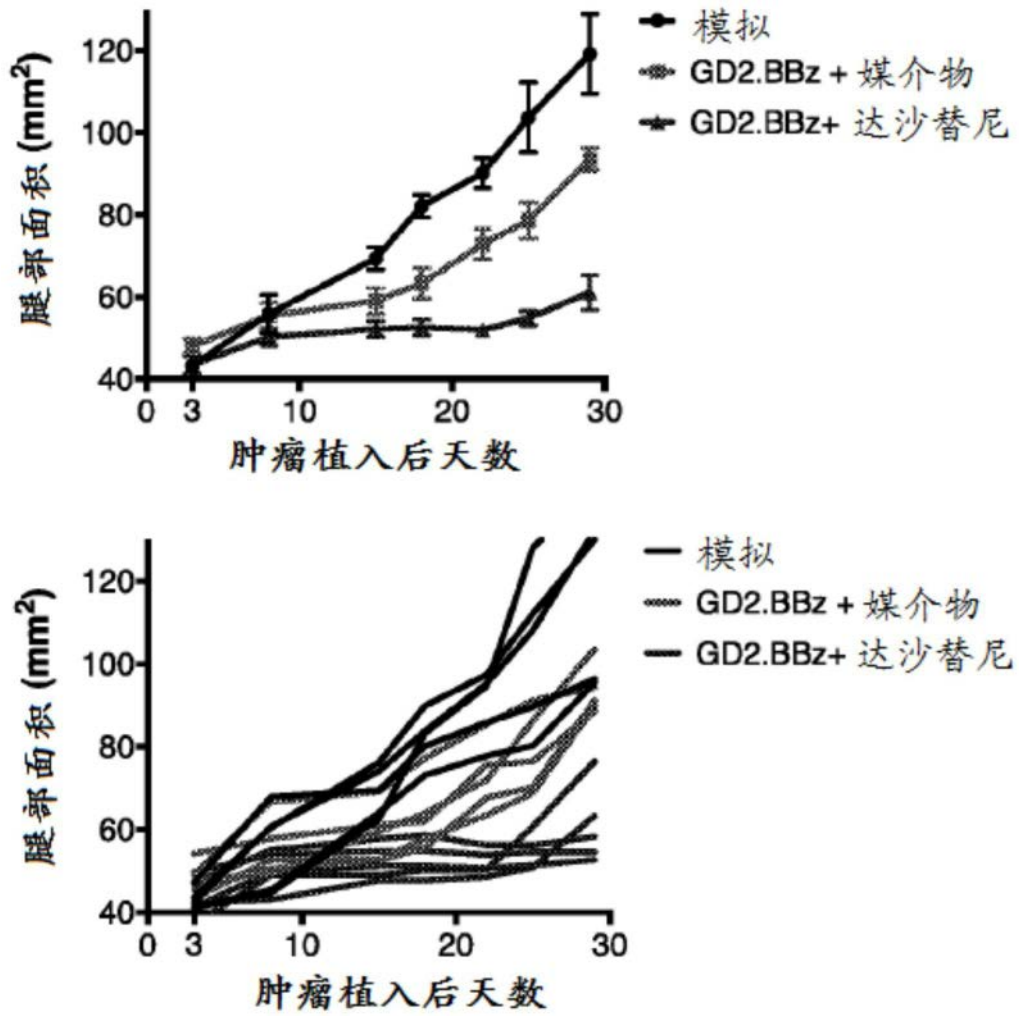


图19

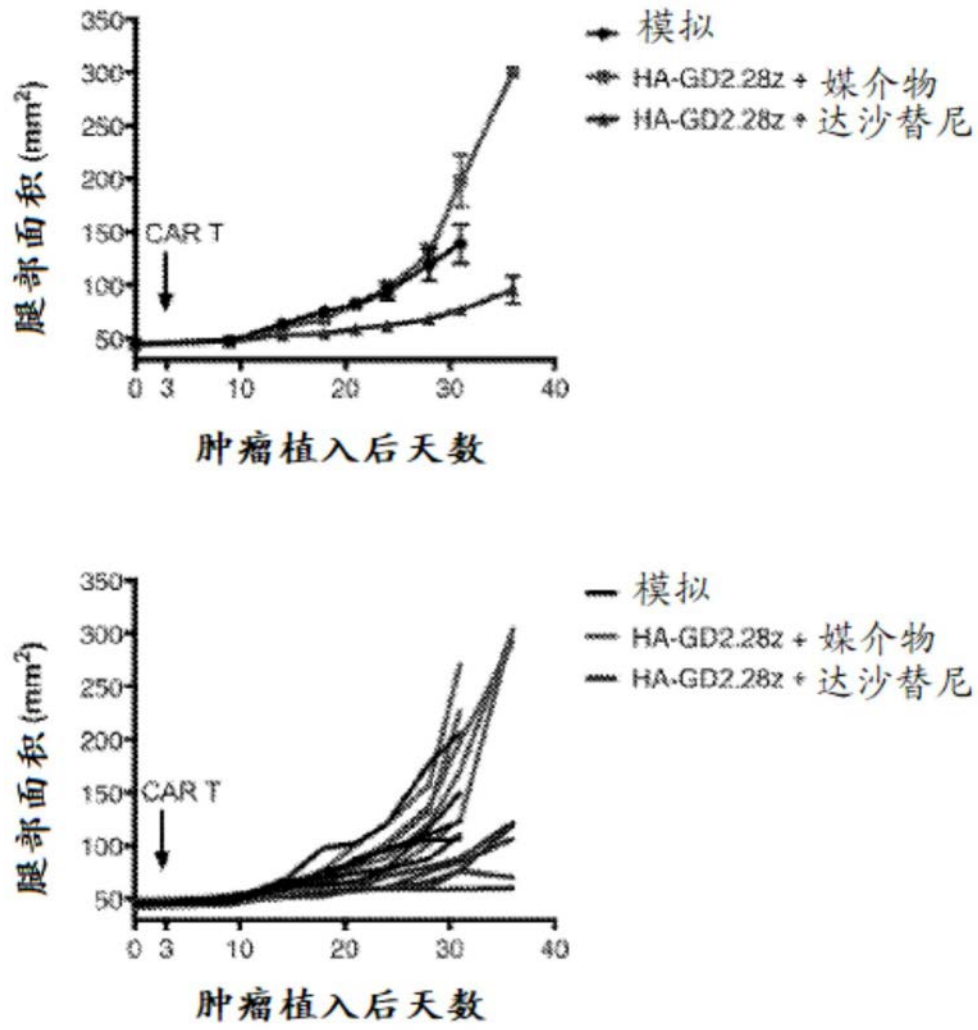


图20A

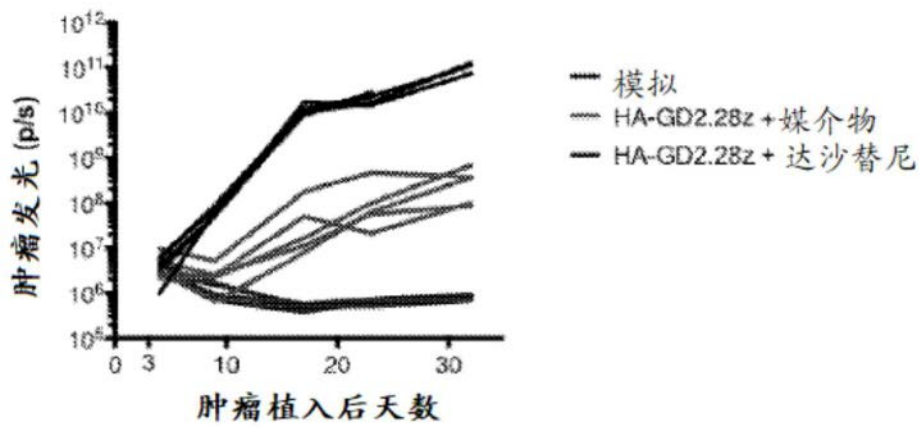
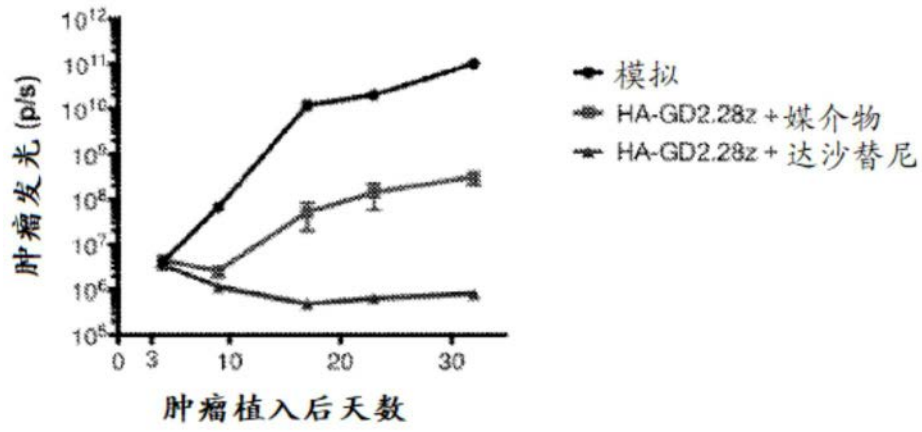


图20B

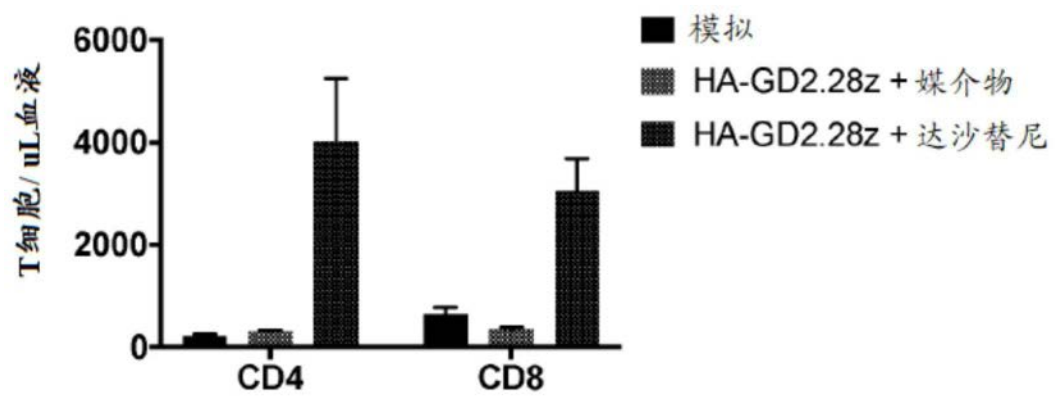


图21

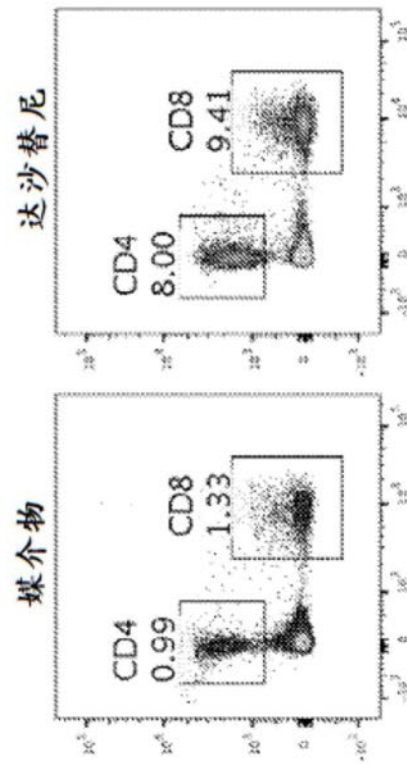


图22A

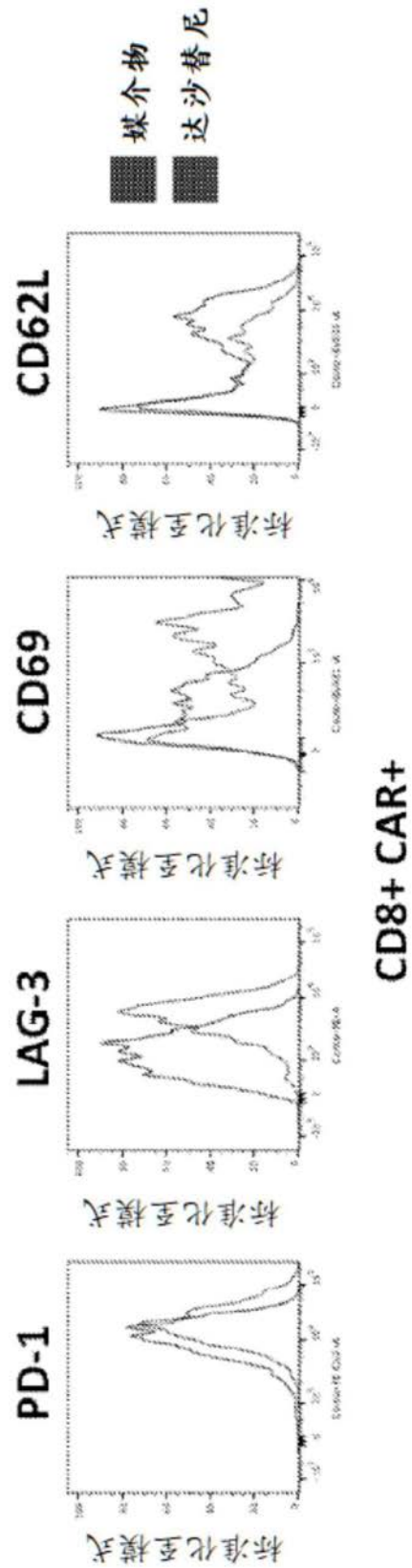


图22B

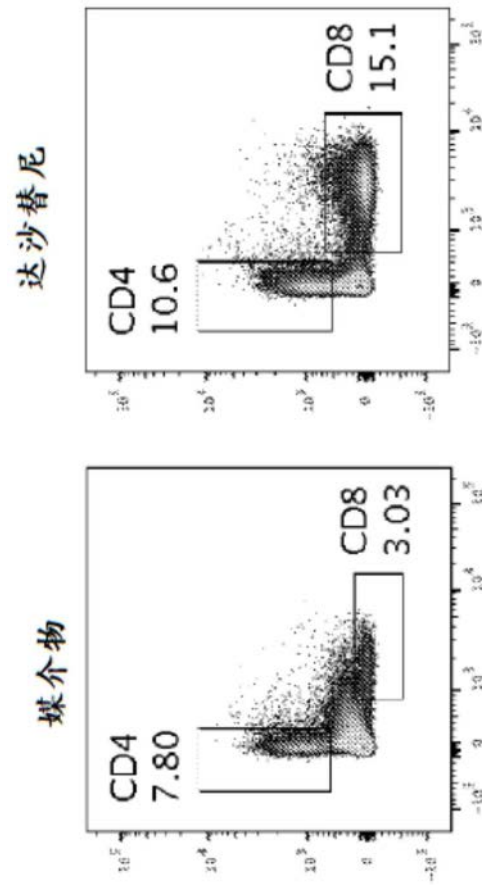


图22C

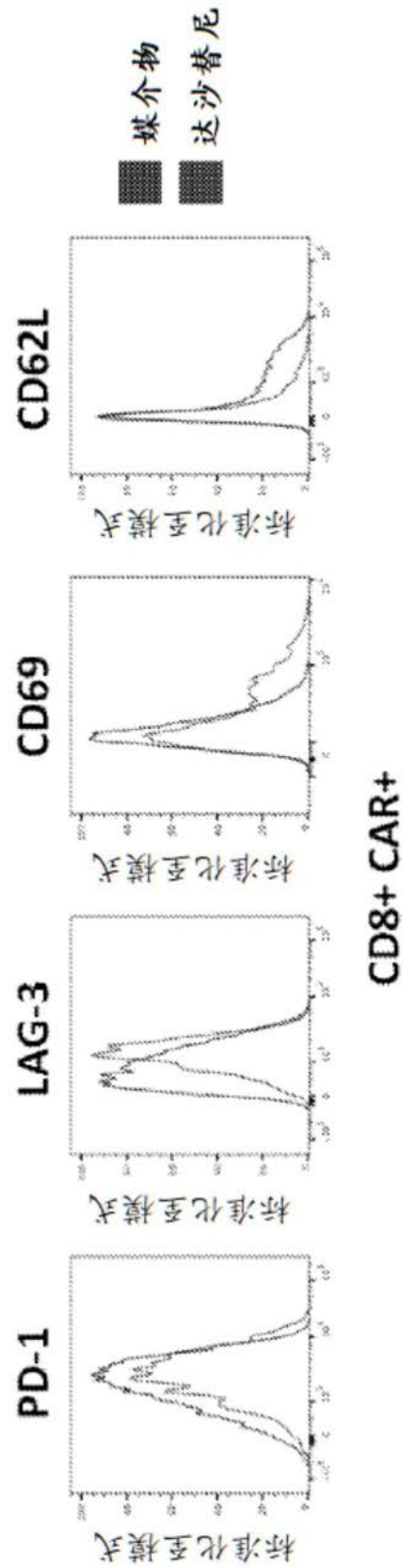


图22D

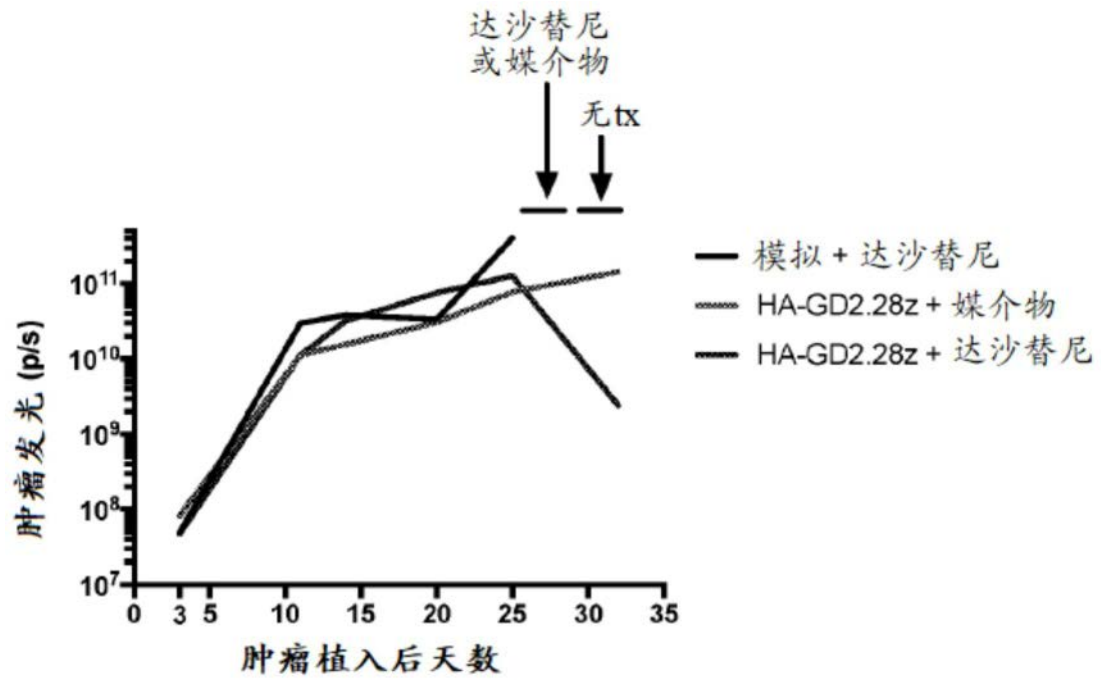


图22E

**CD19.28z (FMC63 scFv)****核酸序列 (SEQ ID NO:1)**

ATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCAC  
GAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCC  
TTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGA  
AAGGACCTTACACAGTCTGTGACACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGG  
ATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCTCGAGAT  
GCTTCTCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCTGATCCCAGAC  
ATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCAACATCAGTTGC  
AGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAA  
ACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC  
TGGAACAGATTATTCTCTACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCA  
ACAGGGTAATACGCTTCCGTACAGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCACCT  
CTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGTCA  
GGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATT  
CCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCCGACGCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAAT  
ATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAAGTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACA  
ACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACT  
GTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA  
CCGTCTCTCAGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCTCTCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCA  
ATGGAACCATATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTA  
AGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG  
CCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGA  
CTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG  
CCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAAC  
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  
CCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA  
CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG  
GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT  
CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

**氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)**

MTRVTNSPSLQAHQLALYLQHEVWRPLAAAYQEQLDRPVVPHPYRVGDTVWVRRHQTKNLEPRW  
KGPYTVLLTPTALKVDGIAAWIHAHVKAADPGGGPSSRLLEMLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQM  
TQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT  
ISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSL  
VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD  
DTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFL  
PGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD  
FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN  
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR\*

图23

**CD19.BBz (FMC63 scFv)****核酸序列 (SEQ ID NO:3)**

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCTCTGATCCAG  
ACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTT  
GCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTT  
AAACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGG  
TCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGC  
CAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGCTCCAC  
CTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAAACTGCAGGAGT  
CAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCAT  
TACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCCGCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTA  
ATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGAC  
AACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAATGATGACACAGCCATTTACTAC  
TGTGCAACACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC  
ACCGTCTCCTCAGCGGCCGCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCAT  
CGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACA  
CGAGGGGGCTGGACTTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCC  
TTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCA  
AACAAACATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA  
GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT  
ACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT  
TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGG  
AAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA  
AGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG  
GACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

**氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)**

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI  
YHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLTPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSG  
EGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSA  
LKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGSTSVTVSSAAATTPAP  
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL  
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD  
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKD  
TYDALHMQALPPR\*

图24

**GD2.BBz (14G2a scFv)****核酸序列 (SEQ ID NO:5)**

ATGCTGCTGCTCGTGACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATCCCCG  
ATATCTGCTGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGCCTGTGTCTCTGGGCGATCAGGCCAGCATCAGCT  
GCAGATCCAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACGGCAACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAA  
CCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATTACAAGGTGTCCAACCGGTTACGCGGCGTGCCCCGACAG  
ATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACC  
TGGGCGTGTAATTCTGCAGCCAGTCCACCCACGTGCCCCCCTGACATTTGGCGCCGGAACAAAGC  
TGGAAGTGAAGGGCAGCACAAAGCGGCAGCGGAAGCCTGGATCTGGCGAGGGAAGCACCAAGGG  
CGAAGTGAAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTCTCTGGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGATGATCTCCTG  
CAAGGCCAGCGGCAGCTCCTTACCGGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAGAACATCGGCCAAGA  
GCCTGGAATGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGCACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAG  
GGCAGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCTCCACCGCCTACATGCACCTGAAGTCCCTGAC  
CAGCAGGACCGCGGTGTACTACTGCTGTCCGGCATGGAATACTGGGGCCAGGGCAGCAAGCG  
TGACCGTGTCTCTGCGGCCGCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACC  
ATCGCGTCGAGCCCCGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCA  
CACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT  
CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTC  
AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC  
AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG  
TACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGT  
TTTGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAG  
GAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA  
AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAA  
GGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

**氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)**

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDILLTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSP  
KLLIHKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKGSTSGS  
GKPGSGEGSTKGEVKLQSGPSLVEPGA SVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIKSLEWIG AIDPYYG  
GTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSVTVSSAAATTTAPR  
PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  
YIFKQPFMRPVQTTQEEFGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV  
LDKRRGRDP E MGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR\*

图25

**HA-GD2.28z (高亲和力4G2a scFv)****核酸序列 (SEQ ID NO:7)**

ATGGAATTCGGCTGAGCTGGCTGTTCTTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCAGCAGAGA  
TATCCTGCTGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGCCTGTGTCTCTGGGCGATCAGGCCAGCATCAGCTG  
CAGATCCAGCCAGAGCCTGGTGCACCGGAACGGCAACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGC  
CCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCCACAAGGTGTCCAACCGGTTACAGCGGCGTGCCCGACAGA  
TTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAGCCGAGGACCT  
GGGCGTGTACTTCTGCAGCCAGTCCACCCACGTGCCCCCCTGACATTTGGCGCCGGAACAAAGCT  
GGAACCTGAAGGGGGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGGGGATCTGAAGTGAAAG  
CTGCAGCAGTCCGGCCCCAGCCTGGTGGAACTGGCGCCTCTGTGATGATCTCCTGCAAGGCCAGC  
GGCAGCTCCTTACCGGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAGAACATCGGCAAGAGCCTGGAATG  
GATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGCACCACTACAACCAAGATTCAAGGGCAGAGCCA  
CCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCACCTGAAGTCCCTGACCAGCGAGGAC  
AGCGCGTGTACTACTGCGTGTCCGGCATGAAGTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTG  
TAGCGCCAAGACCACCCCTAGCGTGTACGGAAGAGTGACAGTGTCTCTGCCGAGCCCAAGA  
GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCCCTGAGCTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGT  
TCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACACTGATGATCAGCAGAACCCCGAAGTGACCTGCGTG  
GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT  
GCACAACGCCAAGACAAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG  
CTGACCGTGTGTCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGC  
CCTGCGTGCCTCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCAACCCAGGTGT  
ACACACTGCCCCCTAGCAGGGACGAGTGAACCAAGAACAGGTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAG  
GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACATAAA  
GACAACCCCTCCCGTGTGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGATAA  
GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT  
ACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAGAAGGACCCCAAAGCTAGCTTCGAAATTGAA  
GTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATATCCATGTGAAAGGG  
AAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG  
GGGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTA  
AGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC  
AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGC  
AGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG  
ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG  
CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG  
CCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA  
GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTA  
A

**氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)**

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIILLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWY LQKPGQS  
PKLLIHKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKG GGS  
GGGSGGGGSEVKLQQSGPSLVEPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWVRQNIKGSLEWIG AIDPY YGGT  
SYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMKYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYGRV  
TVSSAEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP  
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKASFEIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL C  
PSPLFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPY  
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE  
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR\*

图26