



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118930653 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 12

(21) 申请号 202411248075.1

(22) 申请日 2019.08.13

(30) 优先权数据

1813178.9 2018.08.13 GB

(62) 分案原申请数据

201980053953.5 2019.08.13

(71) 申请人 奥托路斯有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 M·普勒 S·科多巴 S·托马斯

S·奥诺哈 A·W·基纳

M·费拉里

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书32页

序列表(电子公布) 附图34页

(54) 发明名称

包含抗CD33,抗CLL1和至少一个另外的抗
CD123和/或FLT3 CAR的CAR T细胞

(57) 摘要

本公开提供了细胞,其包含:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1CAR;和抗CD123和/或抗CAR FLT3CAR。该细胞可以用于疾病如急性髓样白血病(AML)的治疗中。

1. 结构域抗体 (dAb), 其结合CD123并包含以下互补决定区 (CDR):
 - (i) CDR1-GRSINTYA (SEQ ID No.24); CDR2-INYNSRYT (SEQ ID No.25); CDR3-AATSYYP TDYDVASRVATWPS (SEQ ID No.26);
 - (ii) CDR1-GISLNA (SEQ ID No.27); CDR2-IKIGGVS (SEQ ID No.28); CDR3-NTYPPYLN GMDY (SEQ ID No.29);
 - (iii) CDR1-GRSFNTDA (SEQ ID No.30); CDR2-ISWDGTRT (SEQ ID No.31); CDR3-AAEPQKAWPIGTSAAGFRS (SEQ ID No.32);
 - (iv) CDR1-GSSISV (SEQ ID No.33); CDR2-ISWSDGNT (SEQ ID No.34); CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.35);
 - (v) CDR1-GSSFSINV (SEQ ID No.36); CDR2-ISWSDGST (SEQ ID No.37); CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.38); 或
 - (vi) CDR1-GSIFRINA (SEQ ID No.39); CDR2-VNWIGGTT (SEQ ID No.40); CDR3-SATDKGGSSRY (SEQ ID No.41)。
2. 根据权利要求1的dAb, 其包含如SEQ ID No:42、43、44、45、46或47所示的序列中的一个。
3. 嵌合抗原受体 (CAR), 其具有包含根据权利要求1或2的dAb的抗原结合结构域。
4. 核酸序列, 其编码根据权利要求1或2的dAb或根据权利要求3的CAR。
5. 载体, 其包含根据权利要求4的核酸序列。
6. 细胞, 其表达根据权利要求3的CAR。
7. 用于制备根据权利要求6的细胞的方法, 其包括用根据权利要求5的载体转导或转染细胞的步骤。
8. 药物组合物, 其包含多个根据权利要求6的细胞。
9. 用于治疗癌症的方法, 其包括向受试者施用根据权利要求8的药物组合物的步骤。
10. 根据权利要求9的方法, 其中所述癌症为急性髓样白血病 (AML)。
11. 根据权利要求8的药物组合物, 其用于治疗癌症。
12. 根据权利要求6的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

包含抗CD33,抗CLL1和至少一个另外的抗CD123和/或FLT3 CAR的CAR T细胞

[0001] 本申请是基于申请日为2019年8月13日,优先权日为2018年8月13日,申请号为201980053953.5,发明名称为“包含抗CD33,抗CLL1和至少一个另外的抗CD123和/或FLT3 CAR的CAR T细胞”的专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及表达多种嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞。细胞靶向多种急性髓样白血病 (AML) 特征性的抗原。

发明背景

[0004] 急性髓样白血病

[0005] 急性髓样白血病 (AML) 是一种异质性疾病,其特征在于骨髓和血液中髓样前体的不受控制的克隆增殖,导致白血病母细胞的积累和正常造血的严重受损。AML是成人中最常见的急性白血病,在所有白血病中死亡率最高。在2015年,在美国估计有20830人被诊断患有AML,并且预计有10460例死于AML。在过去十年中,AML的长期生存率仍然较小。

[0006] 当前的诱导化学疗法可以在几乎70%的年轻成人患者中产生初始完全缓解。但是,有43%的患者最终会复发,而18%的患者在前线诱导治疗中从未达到完全缓解。首次复发后AML患者的5年总生存率在7%至12%的范围内。同种异体造血干细胞移植 (alloHSCT) 提供了治愈患有复发或难治性AML的患者的最佳机会。这是第二次缓解后的优选治疗途径,其可以在40%至50%的患者中实现5年无病生存。

[0007] 使用当前的治疗策略,在先前实现了持续长于6个月的完全缓解的复发患者中只有大约一半达到了第二次完全缓解率,并且在患有原发性难治性疾病的患者和初始完全缓解持续少于6个月的患者中只有20%或更少达到了第二次完全缓解率。另外,常规挽救性化学疗法的相当大的并发症可能使患者的表现状态和器官功能恶化,并降低成功进行alloHSCT的机会。

[0008] 因此,需要改善的治疗方法来治疗AML。

[0009] 嵌合抗原受体

[0010] 嵌合抗原受体 (CAR) 将单克隆抗体的特异性移植到T细胞的效应子功能上。针对CD19的CAR T细胞疗法在B细胞恶性肿瘤中高度有效,尽管CD19阴性逃逸是相当一部分患者复发的原因。

[0011] 针对AML的CAR T细胞疗法正在早期临床测试中。尽管有几项临床前研究表明各种靶向AML抗原的CAR T细胞具有细胞毒性潜力,但到转化到临床仍然很慢。这突显了开发针对AML患者的CAR相关治疗策略的固有挑战。迄今为止,已经通过早期临床试验用CAR T细胞免疫疗法治疗了少数患有复发/难治性AML的患者,如表1所示。

[0012] 表1: CAR T细胞免疫疗法用于患有复发/难治性AML的患者的当前I期临床试验

[0013]	AML 靶抗原	ClinicalTrials.gov 标识符	实施地点
	CD33	<u>NCT03126864</u>	美国MDACC
		<u>NCT01864902</u>	中国北京PLA医院
		<u>NCT02799680</u>	中国北京 AHCAMMS
	CD38	<u>NCT03222674</u>	中国深圳基因免疫 医学研究所
	CD56	<u>NCT03222674</u>	中国深圳基因免疫 医学研究所
	CD117	<u>NCT03222674</u>	中国深圳基因免疫 医学研究所
	CD123	<u>NCT02159495</u>	美国希望之城

附图说明

[0014] 图1-阐明人体中造血的示意图

[0015] 图2-嵌合抗原受体的不同结合结构域形式

[0016] (a) Fab CAR形式; (b) dAb CAR形式; (c) scFv CAR形式

[0017] 图3-在源自三个健康供体的原代T细胞上aCD33 CAR的表达。用RQR8标志物基因对用T细胞转导的CAR进行染色。通过使用eFluor780针对活细胞群体对FACS点图进行预门控。

[0018] 图4-在aCD123-VHH CAR筛选和验证测定法中使用的CAR构建体的转导表达。分别用抗CD34-PE抗体 (QBend10) 或与融合至2x StrepTag2的小鼠Fc融合的可溶性人CD123胞外域对PBMC染色 (Strep-PE二级染色)。使用活力染料 (FVD-eFluor780) 在活的单细胞上对所有点图进行预门控。

[0019] 图5-在aCLL1-VHH CAR筛选和验证测定法中使用的CAR构建体的转导表达。分别用抗CD34-PE抗体 (QBend10) 或与融合至2x StrepTag2的人Fc融合的可溶性人CLL1胞外域对PBMC染色 (Strep-PE二级染色)。使用活力染料 (FVD-eFluor780) 在活的单细胞上对所有图进行预门控。

[0020] 图6-用编码相关抗原的逆转录病毒载体转导的SupT1。A) CD123、CD33和CLL1转导的SupT1细胞上的抗原表达以蓝色绘制, 而红色峰对应相关的同种型对照。B) 通过流式细胞术使用Quantibrite™珠在每种转导的SupT1细胞内的平均抗原密度 (每细胞) 密度。

[0021] 图7-通过流式细胞术使用Quantibrite™珠对抗原密度的分析。A) 与相关同种型对照 (红色) 相比, 在用CD33、CD123和CLL1 (蓝色) 染色的靶细胞上的抗原表达。测量每种抗原的平均抗原密度 (每细胞)。

[0022] 图8-通过对于aCD33 CAR的SupT1 NT上使用抗CD3抗体将T细胞与靶细胞分离的实例。

[0023] 图9-使用所有aCD33 CAR对三个供体中的不同AML细胞进行细胞毒性测定。根据细胞在不同的时间间隔测量细胞毒性(HL-60:24小时), (SUPT1、MOLM和THP1:48小时)。12783 (aCD19 FMC63 scFv) 用作阴性对照,且27983(aCD33 scFv) 用作阳性对照。所有数据均相对于非转导对照进行标准化。

[0024] 图10-所有CD123-VHH-CAR T细胞构建体的24小时细胞毒性测定。每个条件至少用3个供体进行测试($n=3$), 并标出中位数。上排-SupT1 NT用作靶细胞,中排-SupT1细胞经工程化以表达高水平的CD123,下排-AML衍生的KG1 α 用作靶细胞系。所有数据均相对于非转导T细胞进行标准化,因为它们仅有助于抗原非依赖性细胞毒性。通过双向配对t检验比较CAR。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

[0025] 图11-所有CD123-VHH-CAR T细胞构建体的48小时细胞毒性测定。每个条件至少用3个供体进行测试($n=3$), 并标出中位数。从左至右,靶细胞系SupT1NT、THP1和Molm14用作靶细胞系。所有数据均相对于非转导T细胞进行标准化,因为它们仅有助于抗原非依赖性细胞毒性。

[0026] 图12-所有CLL1-VHH-CAR T细胞构建体的24小时细胞毒性测定。每个条件至少用3个供体进行测试($n=3$), 并标出中位数。上排-SupT1 NT用作靶细胞,下排-SupT1细胞经工程化以表达高水平的CLL1。所有数据均相对于非转导T细胞进行标准化,因为它们仅有助于抗原非依赖性细胞毒性。

[0027] 图13-所有C111-VHH-CAR T细胞构建体的48小时细胞毒性测定。每个条件至少用3个供体进行测试($n=3$), 并标出中位数。上排-SupT1 NT用作靶细胞,中排-THP1患者衍生的靶细胞,下排-KG1 α 患者衍生的靶细胞系。所有数据均相对于非转导T细胞进行标准化,因为它们仅有助于抗原非依赖性细胞毒性。通过双向配对t检验比较CAR。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, ns=无显著性。

[0028] 图14-在两个供体中以1:1E:T比率与靶细胞共培养的aCD33 CAR T细胞的IL-2分泌(未显示供体6的数据)。使用经工程化的SupT1细胞表达更高水平的CD33和AML衍生的细胞来测量IL-2的产生。

[0029] 图15-在两个供体中以1:1E:T比率在靶细胞中aCD33 CAR T细胞的IFN- γ 产生。

[0030] 图16a-16b-使用CD123-VHH-CAR T细胞构建体进行24和48小时细胞毒性测定后的细胞因子测量。以1:8比率对三个供体进行($n=3$)。A) IL-2测量B) IFN- γ 测量。通过双向配对t检验比较CAR。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, ns=无显著性。

[0031] 图17a-17b-使用CLL1-VHH-CAR T细胞构建体进行24和48小时细胞毒性测定后的细胞因子测量。以1:8比率对三个供体进行($n=3$)。A) IL-2测量B) IFN- γ 测量。通过双向配对t检验比较CAR。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, ns=无显著性。

[0032] 图18-对于不同细胞系,每种aCD33 CAR T细胞的增殖测定。12783 (aCD19 FMC63 scFv) 用作阴性对照,且27983(aCD33 scFv) 用作阳性对照。扩充倍数相对于非转导对照标准化。以1:1E:T比率建立测定6天。用2个供体在HL-60细胞中建立增殖测定。

[0033] 图19-所有CD123-VHH-CAR T细胞构建体的4天增殖测定。扩充倍数相对于CD3+非转导T细胞条件进行标准化。每个条件至少用3个供体进行测试($n=3$)。

[0034] 图20-所有CLL1-VHH-CAR T细胞构建体的4天增殖测定。扩充倍数相对于CD3+非转导T细胞条件进行标准化。每个条件至少用3个供体进行测试(n=3)。通过双向配对t检验比较CAR。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, ns=无显著性。

发明概述

[0036] 在第一方面,本发明提供了表达CAR的细胞,其靶向与急性髓样白血病(AML)有关的多重抗原。该细胞靶向以下抗原的三种或四种:CD33、CLL-1、CD123和FLT3。

[0037] 例如,细胞可以包含:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗CD123 CAR。

[0038] 细胞可以包含:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗FLT3CAR。

[0039] 细胞可以包含:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗CD123CAR;和抗FLT3 CAR。

[0040] 一个或多个,或所有CAR可以包含结构域抗体(dAb)抗原结合结构域。

[0041] 细胞可以包含一个或多个串联嵌合抗原受体(tanCAR)。该tanCAR或每个tanCAR可以包含结构域抗体(dAb)抗原结合结构域。

[0042] 具有结构域抗体(dAb)抗原结合结构域的抗CD33 CAR可以包含以下互补决定区:

[0043] (i) CDR1-GRTFSMHS (SEQ ID No.1); CDR2-VTWSGDTF (SEQ ID No.2); CDR3-KDDPYRPAYDY (SEQ ID No.3);

[0044] (ii) CDR1-GRTFSSYV (SEQ ID No.4); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAMELRGGSYNYASSRQYDY (SEQ ID No.6);

[0045] (iii) CDR1-EIAFSNFN (SEQ ID No.7); CDR2-ISSHGDTNY (SEQ ID No.8); CDR3-NANDPFLSVSDF (SEQ ID No.9);

[0046] (iv) CDR1-GSIFSINA (SEQ ID No.10); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAISGWGRSIRVGEREYDY (SEQ ID No.11);

[0047] (v) CDR1-GRTSSSST (SEQ ID No.12); CDR2-ITLSGGST (SEQ ID No.13); CDR3-AARRWSNNRGGYDRAGYDY (SEQ ID No.14);或

[0048] (vi) CDR1-GRTFSSYA (SEQ ID No.15); CDR2-ITWSGGST (SEQ ID No.16); CDR3-AMLLRGGLYDITYILYNY (SEQ ID No.17)。

[0049] 具有结构域抗体(dAb)抗原结合结构域的抗CD33 CAR可以包含如SEQ ID No.18、19、20、21、22或23所示的序列中的一个。

[0050] 具有结构域抗体(dAb)抗原结合结构域的抗CLL-1CAR可以包含以下互补决定区:

[0051] (i) CDR1-GFTFGNHD (SEQ ID No.48); CDR2-IDSGGNVI (SEQ ID No.49); CDR3-ATDLDSGAESLESVY (SEQ ID No.50);

[0052] (ii) CDR1-GFAFGSAD (SEQ ID No.51); CDR2-IDSGGNTQ (SEQ ID No.52); CDR3-TDLDPPTDSLEENVY (SEQ ID No.53);

[0053] (iii) CDR1-GRTFSAYF (SEQ ID No.54); CDR2-INWNGDSS (SEQ ID No.55); CDR3-AADTHGAVGLGSELYDY (SEQ ID No.56);

[0054] (iv) CDR1-GIGVSSTG (SEQ ID No.57); CDR2-IDRDGTT (SEQ ID No.58); CDR3-TVVGDIY (SEQ ID No.59);

[0055] (v) CDR1-GFIFGNVD (SEQ ID No.60); CDR2-ISSGGNDI (SEQ ID No.61); CDR3-

AADLDPGTDSLNIH (SEQ ID No.62) ;或

[0056] (vi) CDR1-GFTLDYYA (SEQ ID No.63) ;CDR2-ISSSDGST (SEQ IDNo.64) ;CDR3-AEAVYYAGVCVAMYDS (SEQ ID No.65) 。

[0057] 具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域的抗CLL-1CAR可以包含如SEQ ID No.66、67、68、69、70或71所示的序列中的一个。

[0058] 具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域的抗CD123 CAR可以包含以下互补决定区:

[0059] (i) CDR1-GRSINTYA (SEQ ID No.24) ;CDR2-INYNSRYT (SEQ ID No.25) ;CDR3-AATSYPTDYDVASRVATWPS (SEQ ID No.26) ;

[0060] (ii) CDR1-GISLNA (SEQ ID No.27) ;CDR2-IKIGGVS (SEQ ID No.28) ;CDR3-NTYPPYLNGMDY (SEQ ID No.29) ;

[0061] (iii) CDR1-GRSFNTDA (SEQ ID No.30) ;CDR2-ISWDGTRT (SEQ IDNo.31) ;CDR3-AAEPQKAWPIGTSAAGFRS (SEQ ID No.32) ;

[0062] (iv) CDR1-GSSISV (SEQ ID No.33) ;CDR2-ISWSDGNT (SEQ ID No.34) ;CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.35) ;

[0063] (v) CDR1-GSSF SIN V (SEQ ID No.36) ;CDR2-ISWSDGST (SEQ ID No.37) ;CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.38) ;或

[0064] (vi) CDR1-GSIFRINA (SEQ ID No.39) ;CDR2-VNWIGGTT (SEQ IDNo.40) ;CDR3-SATDKGGSSRY (SEQ ID No.41) 。

[0065] 具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域的抗CD123 CAR可以包含如SEQ ID No.42、43、44、45、46或47所示的序列中的一个。

[0066] 具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域的抗FLT3 CAR可以包含以下互补决定区:

[0067] (i) CDR1-GIFKTNY (SEQ ID No.72) ;CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.73) ;CDR3-YGLGH (SEQ ID No.74) ;

[0068] (ii) CDR1-GTISSIRY (SEQ ID No.75) ;CDR2-ITSSGNT (SEQ ID No.76) ;CDR3-YTMGY (SEQ ID No.77) ;

[0069] (iii) CDR1-GIFSTNY (SEQ ID No.78) ;CDR2-FTNDGGT (SEQ ID No.79) ;CDR3-CGLGH (SEQ ID No.80) ;

[0070] (iv) CDR1-GSISSIRY (SEQ ID No.81) ;CDR2-ITSSGST (SEQ ID No.82) ;CDR3-YTMGY (SEQ ID No.83) ;或

[0071] (v) CDR1-GIFSTNH (SEQ ID No.84) ;CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.85) ;CDR3-YGLGH (SEQ ID No.86) 。

[0072] 具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域的抗FLT3 CAR可以包含如SEQ IDNo.87、88、89、90或91所示的序列中的一个。

[0073] 在第二方面,本发明提供了编码多种CAR的核酸构建体。核酸构建体可以编码针对以下抗原的三种或所有四种的CAR:CD33、CLL-1、CD123和FLT3。例如,核酸构建体可以编码:抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ;抗CLL1CAR;和抗CD123 CAR。

[0074] 核酸构建体可以编码:抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ;抗CLL1 CAR;和抗FLT3 CAR。

[0075] 核酸构建体可以编码:抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ;抗CLL1 CAR;和抗CD123 CAR;和抗FLT3 CAR。

[0076] 在第三方面,本发明提供了用于制备根据本发明的第一方面的细胞的方法,其包括用根据本发明的第二方面的核酸构建体转导或转染细胞的步骤。

[0077] 在第四方面,本发明提供了载体,其包含根据本发明的第二方面的核酸构建体。

[0078] 在第五方面,提供了载体的试剂盒,其包含多个载体,每个载体编码针对靶抗原的CAR。试剂盒可以包含编码针对以下靶抗原的三种或所有四种的CAR的载体:CD33、CLL-1、CD123和FLT3。例如,试剂盒可以包含:

[0079] (i) 第一载体,其包含编码结合CD33的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;

[0080] (ii) 第二载体,其包含编码结合CLL1的CAR的核酸序列;和

[0081] (iii) 第三载体,其包含编码结合CD123的CAR的核酸序列。

[0082] 试剂盒可以包含:

[0083] (i) 第一载体,其包含编码结合CD33的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;

[0084] (ii) 第二载体,其包含编码结合CLL1的CAR的核酸序列;和

[0085] (iii) 第三载体,其包含编码结合FLT3的CAR的核酸序列。

[0086] 试剂盒可以包含:

[0087] (i) 第一载体,其包含编码结合CD33的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;

[0088] (ii) 第二载体,其包含编码结合CLL1的CAR的核酸序列;

[0089] (iii) 第三载体,其包含编码结合CD123的CAR的核酸序列;和

[0090] (iii) 第四载体,其包含编码结合FLT3的CAR的核酸序列。

[0091] 在第六方面,提供了药物组合物,其包含多个根据本发明的第一方面的细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0092] 在第七方面,提供了用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据本发明的第六方面的药物组合物的步骤。

[0093] 癌症可以为急性髓样白血病(AML)。

[0094] 方法还可以涉及随后向受试者施用同种异体移植物的步骤。

[0095] 在第八方面,提供了根据本发明的第六方面的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0096] 在第九方面,提供了根据本发明的第一方面的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0097] AML母细胞表型比急性淋巴母细胞性白血病(ALL)母细胞的表型更加异质性。髓细胞生成是由于干细胞驱动的,其是随机地并响应于补充其区室(compartment)或分化的提示。类似于正常的髓样干细胞,AML干细胞繁殖或分化,从而导致以一系列处于不同分化状态的细胞进行的骨髓替换。AML干细胞可以沿髓细胞生成的范围发生,并因此具有不同的表面抗原概况。此外,在给定的患者中,个体发生中不同点可能存在干细胞nexi或不同干细胞的层次结构,所有这些均导致疾病负担(图1)。

[0098] 为了治疗最大数量的患者,本发明人发现,通过嵌合抗原受体的AML靶向需要根据髓样谱系同时靶向多种抗原。

[0099] 本发明的或门(OR gate)提供了相对于以上表1中所示的用于患有复发/难治性AML的患者的CAR T细胞免疫疗法的当前I期临床试验的优势。靶向单一抗原可以无法消除与疾病相关的干细胞区室。但是,同时靶向多种髓样抗原意味着该治疗在AML中是通用的。使用靶向多种抗原的CAR-T细胞的免疫疗法根除疾病干细胞区室,而与干细胞区室的数量

和位置无关。靶向多种抗原还降低了抗原下调导致的逃逸的可能性。

[0100] 其它方面

[0101] 本发明还提供了包含表达CAR的细胞的细胞组合物,其表达多种CAR。

[0102] 细胞的组合物可以表达:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗CD123 CAR。

[0103] 细胞的组合物可以表达:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗FLT3 CAR。

[0104] 细胞的组合物可以表达:抗CD33嵌合抗原受体(CAR);抗CLL1 CAR;和抗CD123 CAR;和抗FLT3 CAR。

[0105] 该组合物的细胞可以各自表达一种CAR类型。例如,该组合物可以包含以下之一的混合物:

[0106] 表达CD33 CAR的细胞、表达CLL-1CAR的细胞和表达CD123 CAR的细胞;

[0107] 表达CD33 CAR的细胞、表达CLL-1CAR的细胞和表达FLT3 CAR的细胞;或

[0108] 表达CD33 CAR的细胞、表达CLL-1CAR的细胞、表达CD123 CAR的细胞和表达FLT3 CAR的细胞。

[0109] 或者,组合物的至少一些细胞可以表达超过一种CAR,例如,组合物可以包含以下的组合:

[0110] 表达CD33 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达CD123 CAR的细胞;

[0111] 表达CD33 CAR/CD123 CAR或门的细胞和表达CLL-1CAR的细胞;

[0112] 表达CD123 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达CD33 CAR的细胞;

[0113] 表达CD33 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达FLT3 CAR的细胞;

[0114] 表达CD33 CAR/FLT3 CAR或门的细胞和表达CLL-1CAR的细胞;

[0115] 表达FLT3 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达CD33 CAR的细胞;

[0116] 表达CD33 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达CD123 CAR/FLT3 CAR或门的细胞;

[0117] 表达CD123 CAR/CLL-1CAR或门的细胞和表达CD33 CAR/FLT3 CAR或门的细胞;或

[0118] 表达CD33 CAR/CD123 CAR或门的细胞和表达CLL-1CAR/FLT3 CAR或门的细胞。

[0119] 组合物的至少一些细胞可以表达tanCAR,如下所述。例如,组合物可以包含以下的组合:

[0120] 表达CD33/CLL-1tanCAR的细胞和表达CD123 CAR的细胞;

[0121] 表达CD33/CD123 tanCAR的细胞和表达CLL-1CAR的细胞;

[0122] 表达CD123/CLL-1tanCAR的细胞和表达CD33 CAR的细胞;

[0123] 表达CD33/CLL-1tanCAR的细胞和表达FLT3 CAR的细胞;

[0124] 表达CD33/FLT3 tanCAR的细胞和表达CLL-1CAR的细胞;

[0125] 表达FLT3/CLL-1tanCAR的细胞和表达CD33 CAR的细胞;

[0126] 表达CD33/CLL-1tanCAR的细胞和表达CD123/FLT3 tanCAR的细胞;

[0127] 表达CD123/CLL-1tanCAR的细胞和表达CD33/FLT3 tanCAR的细胞;或

[0128] 表达CD33/CD123 tanCAR的细胞和表达CLL-1/FLT3 tanCAR的细胞。

[0129] 下文描述的核酸序列、核酸构建体、载体和载体的试剂盒以及方法可以用于制备本发明该方面的细胞组合物的细胞。

[0130] 如下所述,细胞组合物可以用于治疗疾病的方法中。

[0131] 在以下编号的段落中概括了本发明的其它的方面：

[0132] A1. 结构域抗体 (dAb), 其结合CD33并包含以下互补决定区 (CDR) :

[0133] (i) CDR1-GRTFSMHS (SEQ ID No.1) ; CDR2-VTWSGDTF (SEQ ID No.2) ; CDR3-KDDPYRPAYDY (SEQ ID No.3) ;

[0134] (ii) CDR1-GRTFSSYV (SEQ ID No.4) ; CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5) ; CDR3-AAMELRGGSYNYASSRQYDY (SEQ ID No.6) ;

[0135] (iii) CDR1-EIAFSNFN (SEQ ID No.7) ; CDR2-ISSHGDTNY (SEQ ID No.8) ; CDR3-NANDPFLSVSDF (SEQ ID No.9) ;

[0136] (iv) CDR1-GSIFSINA (SEQ ID No.10) ; CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5) ; CDR3-AAISGWGRSIRVGERYEYDY (SEQ ID No.11) ;

[0137] (v) CDR1-GRTSSSST (SEQ ID No.12) ; CDR2-ITLSSGGST (SEQ ID No.13) ; CDR3-AARRWSNNRGGYDRAGYDY (SEQ ID No.14) ; 或

[0138] (vi) CDR1-GRTFSSYA (SEQ ID No.15) ; CDR2-ITWSGGST (SEQ ID No.16) ; CDR3-AMLLRGGLYDYTDYILYNY (SEQ ID No.17) 。

[0139] A2. 根据段落A1的dAb, 其包含如SEQ ID No.18、19、20、21、22或23所示的序列中的一个。

[0140] A3. 嵌合抗原受体 (CAR), 其具有包含根据段落A1或A2的dAb的抗原结合结构域。

[0141] A4. 核酸序列, 其编码根据段落A1或A2的dAb或根据段落A3的CAR。

[0142] A5. 载体, 其包含根据段落A4的核酸序列。

[0143] A6. 细胞, 其表达根据段落A3的CAR。

[0144] A7. 用于制备根据段落A6的细胞的方法, 其包括用根据段落A5的载体转导或转染细胞的步骤。

[0145] A8. 药物组合物, 其包含多个根据段落A6的细胞。

[0146] A9. 用于治疗癌症的方法, 其包括向受试者施用根据段落A8的药物组合物的步骤。

[0147] A10. 根据段落A9的方法, 其中所述癌症为急性髓样白血病 (AML) 。

[0148] A11. 根据段落A8的药物组合物, 其用于治疗癌症。

[0149] A12. 根据段落A6的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0150] B1. 结构域抗体 (dAb), 其结合CD123并包含以下互补决定区 (CDR) :

[0151] (i) CDR1-GRSINTYA (SEQ ID No.24) ; CDR2-INYNSRYT (SEQ ID No.25) ; CDR3-AATSYPTDYDVASRVATWPS (SEQ ID No.26) ;

[0152] (ii) CDR1-GISLNA (SEQ ID No.27) ; CDR2-IKIGGVS (SEQ ID No.28) ; CDR3-NTYPPYLNQMDY (SEQ ID No.29) ;

[0153] (iii) CDR1-GRSFNTDA (SEQ ID No.30) ; CDR2-ISWDGTRT (SEQ ID No.31) ; CDR3-AAEPQKAWPIGTSAAGFRS (SEQ ID No.32) ;

[0154] (iv) CDR1-GSSISV (SEQ ID No.33) ; CDR2-ISWSDGNT (SEQ ID No.34) ; CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.35) ;

[0155] (v) CDR1-GSSFSINV (SEQ ID No.36) ; CDR2-ISWSDGST (SEQ ID No.37) ; CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.38) ; 或

[0156] (vi) CDR1-GSIFRINA (SEQ ID No.39) ; CDR2-VNWIGGTT (SEQ ID No.40) ; CDR3-

SATDKGGSSRY (SEQ ID No.41)。

[0157] B2.根据段落B1的dAb,其包含如SEQ ID No:42、43、44、45、46或47所示的序列中的一个。

[0158] B3.嵌合抗原受体 (CAR),其具有包含根据段落B1或B2的dAb的抗原结合结构域。

[0159] B4.核酸序列,其编码根据段落B1或B2的dAb或根据段落B3的CAR。

[0160] B5.载体,其包含根据段落B4的核酸序列。

[0161] B6.细胞,其表达根据段落B3的CAR。

[0162] B7.用于制备根据段落B6的细胞的方法,其包括用根据段落B5的载体转导或转染细胞的步骤。

[0163] B8.药物组合物,其包含多个根据段落B6的细胞。

[0164] B9.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据段落B8的药物组合物的步骤。

[0165] B10.根据段落B9的方法,其中所述癌症为急性髓样白血病 (AML)。

[0166] B11.根据段落B8的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0167] B12.根据段落B6的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0168] 本发明提供了结构域抗体 (dAb),其结合FLT3并包含以下互补决定区:

[0169] C1.结构域抗体 (dAb),其结合FLT3并包含以下互补决定区 (CDR):

[0170] (i) CDR1-GIFKTNY (SEQ ID No.72);CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.73);CDR3-YGLGH (SEQ ID No.74);

[0171] (ii) CDR1-GTISSIRY (SEQ ID No.75);CDR2-ITSSGNT (SEQ ID No.76);CDR3-YTMGY (SEQ ID No.77);

[0172] (iii) CDR1-GIFSTNY (SEQ ID No.78);CDR2-FTNDGGT (SEQ ID No.79);CDR3-CGLGH (SEQ ID No.80);

[0173] (iv) CDR1-GSISSIRY (SEQ ID No.81);CDR2-ITSSGST (SEQ ID No.82);CDR3-YTMGY (SEQ ID No.83);或

[0174] (v) CDR1-GIFSTNH (SEQ ID No.84);CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.85);CDR3-YGLGH (SEQ ID No.86)。

[0175] C2.根据段落C1的dAb,其包含如SEQ ID No.87、88、89、90或91所示的序列中的一个。

[0176] C3.嵌合抗原受体 (CAR),其具有包含根据段落C1或C2的dAb的抗原结合结构域。

[0177] C4.核酸序列,其编码根据段落C1或C2的dAb或根据段落C3的CAR。

[0178] C5.载体,其包含根据段落C4的核酸序列。

[0179] C6.细胞,其表达根据段落C3的CAR。

[0180] C7.用于制备根据段落C6的细胞的方法,其包括用根据段落C5的载体转导或转染细胞的步骤。

[0181] C8.药物组合物,其包含多个根据段落C6的细胞。

[0182] C9.用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据段落C8的药物组合物的步骤。

[0183] C10.根据段落C9的方法,其中所述癌症为急性髓样白血病 (AML)。

[0184] C11.根据段落C8的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0185] C12.根据段落C6的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

- [0186] D1. 结构域抗体 (dAb), 其结合CLL1并包含以下互补决定区 (CDR):
- [0187] (i) CDR1-GFTFGNHD (SEQ ID No. 48); CDR2-IDS GGNVI (SEQ ID No. 49); CDR3-ATDLDSGAESLESVY (SEQ ID No. 50);
- [0188] (ii) CDR1-GFAFGSAD (SEQ ID No. 51); CDR2-IDS GGNVTQ (SEQ ID No. 52); CDR3-TDLDP TDSLE NVY (SEQ ID No. 53);
- [0189] (iii) CDR1-GRTFSAYF (SEQ ID No. 54); CDR2-INWNGDSS (SEQ ID No. 55); CDR3-AADTHGAVGLG SERLYDY (SEQ ID No. 56);
- [0190] (iv) CDR1-GIGVSSTG (SEQ ID No. 57); CDR2-IDRDGTT (SEQ ID No. 58); CDR3-TVVG DY Y (SEQ ID No. 59);
- [0191] (v) CDR1-GFIFGNYD (SEQ ID No. 60); CDR2-ISSGGNDI (SEQ ID No. 61); CDR3-AADLDPGTDSL DNIH (SEQ ID No. 62); 或
- [0192] (vi) CDR1-GFTLDYYA (SEQ ID No. 63); CDR2-ISSSDGST (SEQ ID No. 64); CDR3-AEAVYYAGV CVAMYDS (SEQ ID No. 65)。
- [0193] D2. 根据段落D1的dAb, 其包含如SEQ ID No. 66、67、68、69、70或71所示的序列中的一个。
- [0194] D3. 嵌合抗原受体 (CAR), 其具有包含根据段落D1或D2的dAb的抗原结合结构域。
- [0195] D4. 核酸序列, 其编码根据段落D1或D2的dAb或根据段落D3的CAR。
- [0196] D5. 载体, 其包含根据段落D4的核酸序列。
- [0197] D6. 细胞, 其表达根据段落D3的CAR。
- [0198] D7. 用于制备根据段落D6的细胞的方法, 其包括用根据段落D5的载体转导或转染细胞的步骤。
- [0199] D8. 药物组合物, 其包含多个根据段落D6的细胞。
- [0200] D9. 用于治疗癌症的方法, 其包括向受试者施用根据段落D8的药物组合物的步骤。
- [0201] D10. 根据段落D9的方法, 其中所述癌症为急性髓样白血病 (AML)。
- [0202] D11. 根据段落D8的药物组合物, 其用于治疗癌症。
- [0203] D12. 根据段落D6的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。
- [0204] 本发明还涉及以下实施方案:
- [0205] 1. 细胞, 其包含: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR); 抗CLL1 CAR; 和抗CD123CAR。
- [0206] 2. 细胞, 其包含: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR); 抗CLL1 CAR; 和抗FLT3CAR。
- [0207] 3. 根据实施方案1或2的细胞, 其包含: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR); 抗CLL1 CAR; 抗CD123 CAR; 和抗FLT3 CAR。
- [0208] 4. 根据前述实施方案中任一项的细胞, 其中一个或多个CAR包含结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域。
- [0209] 5. 根据实施方案1至3中任一项的细胞, 其中每个CAR包含结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域。
- [0210] 6. 根据实施方案1至3中任一项的细胞, 其包含一个或多个串联嵌合抗原受体 (tanCAR)。
- [0211] 7. 根据实施方案6的细胞, 其中所述tanCAR包含结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域。

[0212] 8.根据前述实施方案中任一项的细胞,其中所述抗CD33 CAR具有结构域抗体(dAb)抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含以下互补决定区:

[0213] (i) CDR1-GRTFSMHS (SEQ ID No.1); CDR2-VTWSGDTF (SEQ ID No.2); CDR3-KDDPYRPAYDY (SEQ ID No.3);

[0214] (ii) CDR1-GRTFSSYV (SEQ ID No.4); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAMELRGGSYNYASSRQYDY (SEQ ID No.6);

[0215] (iii) CDR1-EIAFSNFN (SEQ ID No.7); CDR2-ISSHGDTNY (SEQ ID No.8); CDR3-NANDPFLSVSDF (SEQ ID No.9);

[0216] (iv) CDR1-GSIFSINA (SEQ ID No.10); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAISGWGRSIRVGEREYDY (SEQ ID No.11);

[0217] (v) CDR1-GRTSSSST (SEQ ID No.12); CDR2-ITLSSGGST (SEQ ID No.13); CDR3-AARRWSNNRGGYDRAGYDY (SEQ ID No.14); 或

[0218] (vi) CDR1-GRTFSSYA (SEQ ID No.15); CDR2-ITWSGGST (SEQ ID No.16); CDR3-AMLLRGGLYDYTEYILYNY (SEQ ID No.17)。

[0219] 9.根据实施方案8的细胞,其中所述抗原结合结构域包含如SEQ ID No.18、19、20、21、22或23所示的序列中的一个。

[0220] 10.根据前述实施方案中任一项的细胞,其中所述抗CLL1 CAR具有结构域抗体(dAb)抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含以下互补决定区:

[0221] (i) CDR1-GFTFGNHD (SEQ ID No.48); CDR2-IDSGGNVI (SEQ ID No.49); CDR3-ATDLDSGAESLESVY (SEQ ID No.50);

[0222] (ii) CDR1-GFAFGSAD (SEQ ID No.51); CDR2-IDSGGNTQ (SEQ ID No.52); CDR3-TDLDPDTSLENVY (SEQ ID No.53);

[0223] (iii) CDR1-GRTFSAYF (SEQ ID No.54); CDR2-INWNGDSS (SEQ ID No.55); CDR3-AADTHGAVGLGSEYLYDY (SEQ ID No.56);

[0224] (iv) CDR1-GIGVSSTG (SEQ ID No.57); CDR2-IDRDGTT (SEQ ID No.58); CDR3-TVVGDIY (SEQ ID No.59);

[0225] (v) CDR1-GFIFGNYD (SEQ ID No.60); CDR2-ISSGGNDI (SEQ ID No.61); CDR3-AADLDPGTDSLDNIH (SEQ ID No.62); 或

[0226] (vi) CDR1-GFTLDYYA (SEQ ID No.63); CDR2-ISSSDGST (SEQ ID No.64); CDR3-AEAVYYAGVVCVAMYDS (SEQ ID No.65)。

[0227] 11.根据实施方案10的细胞,其中所述抗原结合结构域包含如SEQ ID No.66、67、68、69、70或71所示的序列中的一个。

[0228] 12.根据实施方案1的细胞,其中所述抗CD123 CAR具有包含以下互补决定区的结构域抗体(dAb)抗原结合结构域:

[0229] (i) CDR1-GRSINTYA (SEQ ID No.24); CDR2-INYNSRYT (SEQ ID No.25); CDR3-AATSYPTDYDVASRVATWPS (SEQ ID No.26);

[0230] (ii) CDR1-GISLNA (SEQ ID No.27); CDR2-IKIGGVS (SEQ ID No.28); CDR3-NTYPPYLNGMDY (SEQ ID No.29);

[0231] (iii) CDR1-GRSFNTDA (SEQ ID No.30); CDR2-ISWDGTRT (SEQ ID No.31); CDR3-

AAEPQKAWPIGTSAGFRS (SEQ ID No.32) ;

[0232] (iv) CDR1-GSSISV (SEQ ID No.33) ; CDR2-ISWSDGNT (SEQ ID No.34) ; CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.35) ;

[0233] (v) CDR1-GSSFSINV (SEQ ID No.36) ; CDR2-ISWSDGST (SEQ ID No.37) ; CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.38) ; 或

[0234] (vi) CDR1-GSIFRINA (SEQ ID No.39) ; CDR2-VNWIGGTT (SEQ ID No.40) ; CDR3-SATDKGGSSRY (SEQ ID No.41) 。

[0235] 13. 根据实施方案12的细胞, 其中所述抗原结合结构域包含如SEQ ID No.42、43、44、45、46或47所示的序列中的一个。

[0236] 14. 根据实施方案2的细胞, 其中所述抗FTL3 CAR具有结构域抗体 (dAb) 抗原结合结构域, 所述抗原结合结构域包含以下互补决定区:

[0237] (i) CDR1- (SEQ ID No.72) ; CDR2- (SEQ ID No.73) ; CDR3- (SEQ ID No.74) ;

[0238] (ii) CDR1- (SEQ ID No.75) ; CDR2- (SEQ ID No.76) ; CDR3- (SEQ ID No.77) ;

[0239] (iii) CDR1- (SEQ ID No.78) ; CDR2- (SEQ ID No.79) ; CDR3- (SEQ ID No.80) ;

[0240] (iv) CDR1- (SEQ ID No.81) ; CDR2- (SEQ ID No.82) ; CDR3- (SEQ ID No.83) ;

[0241] (v) CDR1- (SEQ ID No.84) ; CDR2- (SEQ ID No.85) ; CDR3- (SEQ ID No.86) ; 或

[0242] (vi) CDR1- (SEQ ID No.87) ; CDR2- (SEQ ID No.88) ; CDR3- (SEQ ID No.89) 。

[0243] 15. 根据实施方案14的细胞, 其中所述抗原结合结构域包含如SEQ ID No.90、91、92、93、94或95所示的序列中的一个。

[0244] 16. 核酸构建体, 其编码: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ; 抗CLL1 CAR; 和抗CD123 CAR。

[0245] 17. 核酸构建体, 其编码: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ; 抗CLL1 CAR; 和抗FLT3 CAR。

[0246] 18. 根据实施方案16或17的核酸构建体, 其编码: 抗CD33嵌合抗原受体 (CAR) ; 抗CLL1 CAR; 抗CD123 CAR; 和抗FLT3 CAR。

[0247] 19. 用于制备根据实施方案1的细胞的方法, 其包括用根据实施方案16的核酸构建体转导或转染细胞的步骤。

[0248] 20. 用于制备根据实施方案2的细胞的方法, 其包括用根据实施方案17的核酸构建体转导或转染细胞的步骤。

[0249] 21. 载体, 其包含根据实施方案16至18中任一项的核酸构建体。

[0250] 22. 载体的试剂盒, 其包含:

[0251] (i) 第一载体, 其包含编码结合CD33的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列;

[0252] (ii) 第二载体, 其包含编码结合CLL1的CAR的核酸序列; 和

[0253] (iii) 第三载体, 其包含编码结合CD123的CAR的核酸序列。

[0254] 23. 载体的试剂盒, 其包含:

[0255] (i) 第一载体, 其包含编码结合CD33的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列;

[0256] (ii) 第二载体, 其包含编码结合CLL1的CAR的核酸序列; 和

[0257] (iii) 第三载体, 其包含编码结合FLT3的CAR的核酸序列。

[0258] 24. 药物组合物, 其包含多个根据实施方案1至15中任一项的细胞, 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

- [0259] 25. 用于治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据实施方案24的药物组合物的步骤。
- [0260] 26. 根据实施方案25的方法,其中所述癌症为急性髓样白血病(AML)。
- [0261] 27. 根据实施方案26的方法,其还涉及随后向所述受试者施用同种异体移植物的步骤。
- [0262] 28. 根据实施方案24的药物组合物,其用于治疗癌症。
- [0263] 29. 根据实施方案1至15中任一项的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。

发明详述

[0265] 嵌合抗原受体

[0266] 本发明涉及在细胞表面表达多种嵌合抗原受体的细胞。

[0267] 经典嵌合抗原受体(CAR)是嵌合I型跨膜蛋白质,其将细胞外抗原识别结构域(结合物)连接至细胞内信号传导结构域(胞内域)。结合物通常是衍生自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv),但其可以基于包含抗体样抗原结合位点的其他形式。通常需要间隔区结构域以将结合物与膜分离并使其适当定向。使用的常见间隔区结构域是IgG1的Fc。取决于抗原,更紧凑的间隔区可以满足,例如来自CD8 α 的茎部,甚至单独的IgG1铰链。跨膜结构域将蛋白质锚定在细胞膜中并将间隔区连接至胞内域。

[0268] 早期的CAR设计具有衍生自Fc ϵ R1或CD3 ζ 的 γ 链的细胞内部分的胞内域。结果,这些第一代受体传输免疫信号1,其足够触发T细胞对关联靶细胞的杀伤,但不能完全活化T细胞以增殖或存活。为了克服这一限制,构建了复合胞内域:将T细胞共刺激分子的细胞内部分融合至CD3 ζ 的细胞内部分,产生了第二代受体,其可以在抗原识别后同时传输活化和共刺激信号。最通常使用的共刺激结构域是CD28的共刺激结构域。这提供了最强力的共刺激信号-即免疫信号2,其触发T细胞增殖。还已经描述了一些受体,其包括TNF受体家族胞内域,如紧密相关的OX40和41BB,其传输存活信号。现在已经描述甚至更强力的第三代CAR,其具有能够传输活化、增殖和存活信号的胞内域。

[0269] 当CAR结合靶抗原时,这导致活化信号传输至上面有其表达的T细胞。因此CAR将T细胞的特异性和细胞毒性引向表达靶向抗原的肿瘤细胞。

[0270] CAR通常包含:(i)抗原结合结构域;(ii)间隔区;(iii)跨膜结构域;和(iv)细胞内结构域,其包含信号传导结构域或与信号传导结构域缔合。

[0271] CAR可以具有以下一般结构:

[0272] 抗原结合结构域-间隔区结构域-跨膜结构域-胞内信号传导结构域(胞内域)。

[0273] 抗原结合结构域

[0274] 抗原结合结构域是嵌合受体识别抗原的部分。在经典CAR中,抗原结合结构域包含衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)(参见图2c)。还已经用结构域抗体(dAb)或VHH抗原结合结构域产生了CAR(参见图2b);或以Fab CAR形式(图2a)。FabCAR包含两条链:一条具有抗体样轻链可变区(VL)和恒定区(CL);且一条具有重链可变区(VH)和恒定区(CH)。一条链还包含跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。CL和CH之间的缔合引起受体的组装。

[0275] CAR的抗原结合结构域可以是单结构域结合物,也称为“dAb”、“VHH”、“结构域抗

体”或“纳米抗体”。

[0276] 常规的IgG分子由两条重链和两条轻链组成。重链包含三个恒定结构域和一个可变结构域(VH)；轻链包含一个恒定结构域和一个可变结构域(VL)。天然功能性抗原结合单位通过VH和VL结构域的非共价缔合形成。这种缔合是由疏水性框架区介导的。

[0277] 单域抗体是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。第一个单域抗体是从缺乏经典抗体的轻链和CH1结构域的骆驼科动物中发现的重链抗体工程化改造而来的。这些重链抗体包含单个抗原结合结构域,即VHH结构域。软骨鱼类也具有重链抗体(IgNAR,“免疫球蛋白新抗原受体”),可以从中获得称为VNAR片段的单域抗体。一种替代方法是将来自人或小鼠的共同免疫球蛋白G(IgG)的二聚体可变结构域分为单体。尽管目前对单域抗体的大多数研究都基于重链可变结构域,但也显示源自轻链的纳米抗体可以特异性结合靶表位。

[0278] 通过用期望的抗原对单峰骆驼、骆驼、美洲驼、羊驼或鲨鱼进行免疫,然后分离编码重链抗体的mRNA,可以获得单域抗体。通过逆转录和聚合酶链反应,可以产生单域抗体的基因文库。筛选技术如噬菌体展示和核糖体展示有助于鉴定结合抗原的克隆。或者,单域抗体可以由具有四条链的共同鼠或人IgG制成。

[0279] 本发明涉及对多种抗原的靶向。这可以通过多种方法来实现,包括或门和tanCAR(如以下更详细描述)。结构域抗体抗原结合结构域特别适合于此类方法,因为它们是离散的并且没有连接的趋势。它们也不太复杂,这意味着表达和折叠不太可能受到损害,并且编码此类CAR/tanCAR的序列在病毒载体基因组上所需的空间较小。

[0280] TANCAR

[0281] 本发明的细胞可以包含TanCAR。

[0282] 已经开发了称为串联CAR或TanCAR的双特异性CAR,以同时靶向两个或更多个癌症特异性标志物。在TanCAR中,细胞外结构域包含串联的两个抗原结合特异性,通过接头接合。因此,两个结合特异性(scFv)都与单个跨膜部分连接:一个scFv与膜并置,而另一个scFv在远端位置。当TanCAR结合任一个或两个靶抗原时,这导致激活信号传输至上面有其表达的细胞。

[0283] Grada等人(2013,Mol Ther Nucleic Acids 2:e105)描述了TanCAR,其包括CD19特异性scFv,接着是Gly-Ser接头,并且然后是HER2特异性scFv。HER2-scFv在近膜位置,而CD19-scFv在远端位置。显示TanCAR诱导针对两种肿瘤限制性抗原中的每一种的不同的T细胞反应性。选择这种布置因为HER2(632aa/125Å)和CD19(280aa,65Å)的各自的长度适合于该空间排列。还已知HER2 scFv结合HER2的最远端的4个环。

[0284] 本发明的细胞可以包含串联的包含两个抗原结合特异性的TanCAR。tanCAR可以结合以下抗原对的一个:CD33和CD123;CD33和CLL-1,CD33和FLT-3;CD123和CLL-1;CD123和FLT-3;C111和FLT-3。

[0285] 在这些抗原对的每一个中,抗原结合结构域在分子中可以是任意顺序。例如,对于靶抗原对CD33和CD123,结合CD33的抗原结合结构域可以与膜并置,而结合CD123的抗原结合结构域可以在膜的远端;或结合CD123的抗原结合结构域可以与膜并置,而结合CD33的抗原结合结构域可以在膜的远端。

[0286] 本发明的细胞可以包含tanCAR和具有单一抗原特异性的CAR如scFv-CAR或dAb CAR的组合。在这方面,细胞具有三种抗原特异性: TanCAR具有两种,且scFv或dAb CAR具有

一种。该细胞可以例如包含表2中所示的组合之一。

[0287] 表2

Tan CAR特异性	scFv/dAb CAR特异性
CD33/CLL-1	CD123
CD33/CD123	CLL-1
CLL-1/CD123	CD33
CD33/CLL-1	FLT3
CD33/FLT3	CLL1
CLL-1/FLT3	CD33

[0289] 本发明的细胞可以包含两个tanCAR。例如,该细胞可以包含如表3中所示的双重tanCAR。

[0290] 表3

TanCAR1特异性	TanCAR2特异性
CD33/CLL-1	CD123/FLT3
CD33/CD123	CLL-1/FLT3
CD33/FLT-1	CLL-1/CD123

[0292] 或门

[0293] “逻辑门 (Logic Gate)”CAR组合描述于W02015/075469、W02015/075470和W02015/075470中。CAR逻辑门是CAR组合,当其由细胞(如T细胞)表达时能够检测至少两种靶抗原的特定表达模式。如果将至少两种靶抗原任意指定为抗原A和抗原B,则三种可能的选项如下:

[0294] “或门 (OR GATE)”-当靶细胞上存在抗原A或抗原B时,T细胞触发

[0295] “与门 (AND GATE)”-仅当靶细胞上存在抗原A和B两者时,T细胞触发

[0296] “与非门 (AND NOT GATE)”-当靶细胞上抗原A单独存在时,T细胞触发,而在靶细胞上抗原A和B两者同时存在时,T细胞不触发

[0297] 可以基于两种或多种标志物的特定表达(或缺乏表达),将表达这些CAR组合的工程化T细胞定制为对癌细胞具有强特异性。

[0298] “或门”包含两个或更多个CAR,其各自针对由靶细胞表达的不同靶抗原。或门的优点在于靶细胞上的有效可靶向抗原增加,因为它实际上是抗原A+抗原B。这对于在靶细胞上以可变或低密度表达的抗原特别重要,因为单个抗原的水平可能低于CAR-T细胞有效靶向所需的阈值。而且,它避免了抗原逃逸的现象。例如,一些淋巴瘤和白血病在CD19靶向后变为CD19阴性:如果发生这种情况时,使用靶向CD19与另一抗原组合的或门则提供了“后备”抗原。

[0299] 本发明的细胞可以表达包含三个CAR的三重或门。例如,细胞可以表达:

[0300] 结合CD33的CAR,结合CLL-1的CAR;和结合CD123的CAR,或

[0301] 结合CD33的CAR,结合CLL-1的CAR;和结合FLT3的CAR。

[0302] 本发明的细胞可以表达包含四个CAR的四重或门。例如,细胞可以表达:结合CD33的CAR,结合CLL-1的CAR;结合CD123的CAR;和结合FLT3的CAR。

[0303] 在本发明的三重和四重或门中,一个或多个CAR可以是dAb CAR。具体而言,细胞的所有CAR可以是dAb CAR。

[0304] 靶抗原

[0305] CAR的抗原结合结构域或其中之一可以特异性结合以下靶抗原中的一个:CD33、CD123、CLL-1和FLT-3。

[0306] CD33

[0307] CD33是一种髓样分化抗原,其显示在一些正常的B细胞以及活化的T细胞和自然杀伤细胞上,但在多能造血干细胞或造血系统外部不表达。其发现于几乎所有急性髓样白血病(AML)中至少母细胞的亚组上。具有平均104个分子/白血病细胞,CD33丰度不高,但在各个患者中的水平差异很大。

[0308] CD33的细胞外部分含有两个免疫球蛋白结构域,而细胞内部分含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。人CD33的氨基酸序列可从Uniprot登录号P20138获得。

[0309] 已知几种针对CD33的市售抗体,如WM-53、P67.6、HIM3-4(Thermofisher)。

[0310] 本发明提供结合CD33并包含以下互补决定区的结构域抗体(dAb):

[0311] (i) CDR1-GRTFSMHS (SEQ ID No.1); CDR2-VTWSGDTF (SEQ ID No.2); CDR3-KDDPYRPAYDY (SEQ ID No.3);

[0312] (ii) CDR1-GRTFSSYV (SEQ ID No.4); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAMELRGGSYNYASSRQYDY (SEQ ID No.6);

[0313] (iii) CDR1-EIAFSNFN (SEQ ID No.7); CDR2-ISSHGDTNY (SEQ ID No.8); CDR3-NANDPFLSVSDF (SEQ ID No.9);

[0314] (iv) CDR1-GSIFSINA (SEQ ID No.10); CDR2-ISWSGGST (SEQ ID No.5); CDR3-AAISGWGRSIRVGEREYDY (SEQ ID No.11);

[0315] (v) CDR1-GRTSSSST (SEQ ID No.12); CDR2-ITLSGGST (SEQ ID No.13); CDR3-AARRWSNNRGGYDRAGYDY (SEQ ID No.14);或

[0316] (vi) CDR1-GRTFSSYA (SEQ ID No.15); CDR2-ITWSGGST (SEQ ID No.16); CDR3-AMLLRGGLYDYTDYILYNY (SEQ ID No.17)。

[0317] 抗CD33 dAb可以包含如SEQ ID No.18、19、20、21、22或23所示的序列中的一个。

[0318] SEQ ID No.18(CD33 dAb P1.E4-44738)

[0319] QVQLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSMHSWGFRQAPGKEREFVAA

[0320] VTWSGDTFAYADFKGRFTISRGIKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKD

[0321] DPYRPAYDYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.19(CD33 dAb P1.H3-44739)

[0322] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGFRQAPGKEREFVA

[0323] AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAM

[0324] ELRGGSYNYASSRQYDYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.20(CD33 dAb P1.G8-44742)

[0325] QVQLQESGGGLVQTGGSLTLSCAASEIAFSNFMGWYRQGSGKQRTLVAQ

[0326] ISSHGDTNYLDSMKGRFTISRDNKKTIVYLQMNAKLPEDTAVYYCNAND

- [0327] PFLSVSDFWGQGTQVTVSSSEQ ID No.21 (CD33 dAb P2.A7-46173)
- [0328] QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWFRQAPGKEREFVAA
- [0329] ISWGGSTYYADFKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLPEDTAIYYCAAISG
- [0330] WGRSIRVGEREYDYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.22 (CD33 dAb P2.B12-46174)
- [0331] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSSSTMAWFRQAPGKEREFVAA
- [0332] ITLSGGSTHYADSAKGRFTISRESAKNTVYLQMNSLPEDTADYYCAARR
- [0333] WSNRRGGYDRAGDYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.23 (CD33 dAb P2.F2-46176)
- [0334] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
- [0335] AITWGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLPEDTAVYYCAAM
- [0336] LLRGGLYDYTDYILYNYWGQGTQVTVSS
- [0337] 本发明还提供:
- [0338] CAR,其包含此类CD33 dAb作为抗原结合结构域;
- [0339] 核酸序列,其编码此类dAb或CAR。
- [0340] CD123
- [0341] CD123是白介素3受体 (IL-3Ra) 的跨膜亚基,它与CD131一起形成高亲和力IL-3R。结合IL-3后,IL-3R促进细胞增殖和存活。CD123通常在浆细胞样树突状细胞和嗜碱性粒细胞上以高水平表达。它在单核细胞、嗜酸性粒细胞和髓样树突状细胞上以低水平表达。人CD123的氨基酸序列可从NCBI参考序列NP_002174.1获得。
- [0342] 已知几种针对CD123的市售抗体,如6H6和5B11 (ThermoFisher)。
- [0343] 本发明提供结合CD123并包含以下互补决定区的结构域抗体 (dAb):
- [0344] (i) CDR1-GRSINTYA (SEQ ID No.24); CDR2-INYNSRYT (SEQ ID No.25); CDR3-AATSYPTDYDVASRVATWPS (SEQ ID No.26);
- [0345] (ii) CDR1-GISLNA (SEQ ID No.27); CDR2-IKIGGVS (SEQ ID No.28); CDR3-NTYPPYLNGMDY (SEQ ID No.29);
- [0346] (iii) CDR1-GRSFNTDA (SEQ ID No.30); CDR2-ISWDGTRT (SEQ ID No.31); CDR3-AAEPQKAWPIGTSAAGFRS (SEQ ID No.32);
- [0347] (iv) CDR1-GSSISV (SEQ ID No.33); CDR2-ISWSDGNT (SEQ ID No.34); CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.35);
- [0348] (v) CDR1-GSSFSINV (SEQ ID No.36); CDR2-ISWSDGST (SEQ ID No.37); CDR3-AVEPRGWPKGHRY (SEQ ID No.38); 或
- [0349] (vi) CDR1-GSIFRINA (SEQ ID No.39); CDR2-VNWIGGTT (SEQ ID No.40); CDR3-SATDKGGSSRY (SEQ ID No.41)。
- [0350] 抗CD123 dAb可以包含如SEQ ID No.42、43、44、45、46或47所示的序列中的一个。
- [0351] SEQ ID No.42 (CD123 dAb H11 45897)
- [0352] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRSINTYAMAWFRQAPGKEREFVASI
- [0353] NYNSRYTHYVDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLNRDITAVYYCAATSY
- [0354] YPTDYDVASRVATWPSWGQGTQVTVSSSEQ ID No.43 (CD123 dAb F8 45888)
- [0355] QVQLQESGGGLVQAGESLRLTCAVSGISLNAWGWYRQAPGKQLREWVAVI
- [0356] KIGGVSNYAVSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLPEDTGVYYCNYTPPYL

- [0357] NGMDYWGKGLTVTVSSSEQ ID No.44(CD123 dAb A7 45865)
- [0358] QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAFSGRSFNTDAVAWFRQAPGKEREFVAA
- [0359] ISWDGTRTYADSAKGRFTISRDNKNTVYVLQMNSLNSEDTAVYYCAAEP
- [0360] QKAWPIGTSAAGFRSWGQGTQVTVSSSEQ ID No.45(CD123 dAb B4 45868)
- [0361] QVQLQESGGSVQSGGSLRLSCAASGSSISVMGWFRQAPGKEREFVAAIS
- [0362] WSDGNTNYADSVNGRFSVSRDNTKNTVYVLQMNSLKPEDTAIYYCAVEPR
- [0363] GWPKGHRYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.46(CD123 dAb A10 45866)
- [0364] QVQLQESGGSSVQAGGSLRLSCAASGSSFSINVMGWFRQAPGKEREFVAA
- [0365] ISWSDGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAIYYCAVEPR
- [0366] GWPKGHRYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.47(CD123 dAb C11 45874)
- [0367] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFRINAMGWFRQAPGKEREFVTA
- [0368] VNWIGGTTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAIYFCSATD
- [0369] KGGSSRYWGQGTQVTVSS
- [0370] 本发明还提供：
- [0371] CAR,其包含此类CD123 dAb作为抗原结合结构域；
- [0372] 核酸序列,其编码此类dAb或CAR。
- [0373] FLT3

[0374] FMS样酪氨酸激酶3 (FLT3) 是一种受体酪氨酸激酶 (RTK),是具有固有酪氨酸激酶结构域的膜结合受体。FLT3由免疫球蛋白样细胞外配体结合结构域、跨膜结构域、近膜二聚化结构域和被激酶插入物打断的高度保守细胞内激酶结构域组成。FLT3属于RTK的III类亚家族,其包括结构相似的成员,如c-FMS、c-KIT和PDGF受体。FLT3主要在定型的髓样和淋巴样祖代中表达,在更成熟的单核细胞谱系中具有可变表达。

[0375] 已经在淋巴造血器官如肝、脾、胸腺和胎盘中描述了FLT3表达。在未刺激状态下,FLT3受体以具有无活性的激酶部分的单体、未磷酸化的形式存在。受体与FLT配体 (FL) 相互作用后,受体发生构象变化,导致受体解折叠和二聚结构域暴露,从而使受体-受体二聚化发生。该受体二聚化是酪氨酸激酶的活化的前奏,导致细胞内结构域中各个位点的磷酸化。人FLT3的氨基酸序列可从NCBI参考序列:NP_004110.2获得。

[0376] FLT3对某些AML病例的生物学很重要,其中FLT3中的突变是该疾病中最常见的突变之一。这些突变通常导致组成性激活。某些AML病例对FLT3的小分子抑制响应。

[0377] 已知几种针对FLT3的市售抗体,如A2F10和BV10A4H2 (ThermoFisher)。

[0378] 本发明提供结合FLT3并包含以下互补决定区的结构域抗体 (dAb) :

[0379] (i) CDR1-GIFKTN (SEQ ID No.72) ;CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.73) ;CDR3-YGLGH (SEQ ID No.74) ;

[0380] (ii) CDR1-GTISSIRY (SEQ ID No.75) ;CDR2-ITSSGNT (SEQ ID No.76) ;CDR3-YTMGY (SEQ ID No.77) ;

[0381] (iii) CDR1-GIFSTNY (SEQ ID No.78) ;CDR2-FTNDGGT (SEQ ID No.79) ;CDR3-CGLGH (SEQ ID No.80) ;

[0382] (iv) CDR1-GSISSIRY (SEQ ID No.81) ;CDR2-ITSSGST (SEQ ID No.82) ;CDR3-YTMGY (SEQ ID No.83) ;或

[0383] (v) CDR1-GIFSTNH (SEQ ID No.84); CDR2-FTNDGST (SEQ ID No.85); CDR3-YGLGH (SEQ ID No.86)。

[0384] 抗FLT3 dAb可以包含如SEQ ID No.87、88、89、90或91所示的序列中的一个。

[0385] SEQ ID No.87 (FLT3 dAb B5)

[0386] QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGIFKTNMAWYRQAPGKQRELVA

[0387] FTNDGSTLYGDSVKGRFTISRDDAKYTVSLQMNSLKPEDTAVYYCYGLGH

[0388] WGQGTQVIVSSEPKTPKPQAAADDDKEQKLISEEDLNAAHHHHHHG

[0389] AASEQ ID No.88 (FLT3 dAb G3)

[0390] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTISSIRYMNWYRQAPGKQREVVAY

[0391] ITSSGNTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDNLKPEDTAAYCYTMG

[0392] YWGQGTQVTVSSEPKIPQPQAAADDDKEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

[0393] GAASEQ ID No.89 (FLT3 dAb H5)

[0394] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIFSTNYMVWCRQAPGKQRELVA

[0395] FTNDGGTLYADSLKGRFSISQDNKNTVLLMNSLKPEDTAVYYCCGLGH

[0396] WGRGKTQVTVSSEPKIPQPQAAADDDKEQKLISEEDLNAAHHHHHHG

[0397] AASEQ ID No.90 (FLT3 dAb D12)

[0398] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSIRYMNWYRQAPGKQRESVAW

[0399] ITSSGSTNYADSVQGRFTISRDNKNTVYLQMDNLKPEDTAVYYCYTMGY

[0400] WGQGTQVTVSSEPKIPQPQAAADDDKEQKLISEEDLNAAHHHHHHG

[0401] AASEQ ID No.91 (FLT3 dAb F10)

[0402] QAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIFSTNHMAWYRQAPGKQRELV

[0403] AAFTNDGSTLYGDSVKGRFVISRDNAKYTVFLQMNSLKPEDTAVYYCYGL

[0404] GHWGQGTQVTVSSEPKTPKPQAAADDDKEQKLISEEDLNAAHHHHH

[0405] HGAA

[0406] 本发明还提供：

[0407] CAR,其包含此类FLT3 dAb作为抗原结合结构域；

[0408] 核酸序列,其编码此类dAb或CAR。

[0409] CLL1

[0410] 人C型凝集素样分子-1 (CLL-1、MICL或CLEC12A) 是II型跨膜糖蛋白,是参与免疫调节的C型凝集素样受体大家族的成员。CLL-1的细胞内结构域含有ITIM基序以及PI-3激酶的结合位点。CLL-1在造血细胞中的表达模式是受限的;其特别发现于源自外周血和骨髓的髓样细胞中。人CLL1的氨基酸序列可从Uniprot登录号Q5QGZ9获得。

[0411] 已经在例如W02009051974、W02013169625、W02016205200和W02016040868中描述了针对CLL-1的几种抗体。

[0412] 本发明提供结合CLL1并包含以下互补决定区的结构域抗体 (dAb) :

[0413] (i) CDR1-GFTFGNHD (SEQ ID No.48); CDR2-IDSGGNVI (SEQ ID No.49); CDR3-ATDLDSGAESLESVY (SEQ ID No.50);

[0414] (ii) CDR1-GFAFGSAD (SEQ ID No.51); CDR2-IDSGGNTQ (SEQ ID No.52); CDR3-TDLDP TTD SLENVY (SEQ ID No.53);

[0415] (iii) CDR1-GRTFSAYF (SEQ ID No.54); CDR2-INWNGDSS (SEQ ID No.55); CDR3-AADTHGAVGLGSRERLYDY (SEQ ID No.56);

[0416] (iv) CDR1-GIGVSSTG (SEQ ID No.57); CDR2-IDRDGTT (SEQ ID No.58); CDR3-TVVGDDY (SEQ ID No.59);

[0417] (v) CDR1-GFIFGNYD (SEQ ID No.60); CDR2-ISSGGNDI (SEQ ID No.61); CDR3-AADLDPGTDSLNIH (SEQ ID No.62); 或

[0418] (vi) CDR1-GFTLDYYA (SEQ ID No.63); CDR2-ISSSDGST (SEQ ID No.64); CDR3-AEAVYYAGVCVAMYDS (SEQ ID No.65)。

[0419] 抗CLL1 dAb可以包含如SEQ ID No.66、67、68、69、70或71所示的序列中的一个。

[0420] SEQ ID No.66 (CLL-1dAb 44548)

[0421] QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCVGSQFTFGNHDMSWVRQAPGKEVEFVA

[0422] GIDSGGNVIVYEEVVKGRFTISRDNKNTLYLQMDGLKPEDAGMYFCATD

[0423] LDSGAESLESVYHGQGTQVTVSSSEQ ID No.67 (CLL-1dAb 44544)

[0424] QVQLQESGGGLVESGGSLRISCTGFGFAFGSADMSWVRQAPGKEVEFVAG

[0425] IDSGGNTQTYEDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLQSEDAGVYFCATDL

[0426] DPTTDSLENVYHGQGTQVIVSSSEQ ID No.68 (CLL-1dAb 44538)

[0427] QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCVASGRFTFSAYFMGWFRQAPGKEREFVSA

[0428] INWNGDSSWYRDSVKGRFTVSRDNKNTVYLMNSLEPEDTAVYYCAA

[0429] DTHGAVGLGSRERLYDYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.69 (CLL-1dAb 44546)

[0430] QVQLQESGGGVVQAGGSLRLSCAVSGIGVSSTGMGWSRQTPGKQVELVA

[0431] LIDRDGTTNYADTVKGRFTISKDNSKNMVYLMNSLKPEDTALYHCTVVG

[0432] DYYWGQGTQVTVSSSEQ ID No.70 (CLL-1dAb 44545)

[0433] QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCVGSQFTFGNYDMSWVRQAPGKEVEFVA

[0434] GISSGGNDIVYEDAVKGRFSISRDNARNTVYLDMAVKPEDAGVYYCAAD

[0435] LDPGTDSLNIHHGQGTQVFVSSSEQ ID No.71 (CLL-1dAb 44536)

[0436] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSC

[0437] ISSSDGSTAYADSVKGRFTISRDNKNSVYLMNSLKPEDTAVYYCAEAVY

[0438] YAGVCVAMYDSWGQGTQVTVSS

[0439] 本发明还提供：

[0440] CAR, 其包含此类CD123 dAb作为抗原结合结构域；

[0441] 核酸序列, 其编码此类dAb或CAR。

[0442] 间隔区

[0443] 经典CAR包含间隔区序列以将抗原结合结构域和跨膜结构域连接, 并在空间上将抗原结合结构域与胞内域分开。柔性间隔区允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进结合。

[0444] 间隔区可以引起两条形成CAR的多肽链二聚化。两条多肽链可以例如包含一个或多个合适的半胱氨酸残基以形成二硫化物桥。常用的间隔区包括IgG1 Fc区、IgG1铰链或人CD8茎部。铰链间隔区可以包含如SEQ ID No.92所示的序列。

[0445] SEQ ID No.92 (铰链间隔区)

[0446] EPKSCDKTHTCPPCP

[0447] 可以选择间隔区以适合靶抗原,即,靶抗原上表位的位置和定向以及靶表位与靶细胞膜的距离。在或门中,可以使用不同的间隔区以适合靶表位的不同相对位置,并且还可以防止两个CAR之间的交叉配对。

[0448] 跨膜结构域

[0449] 跨膜结构域是跨越膜的CAR的部分。跨膜结构域可以是在膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。这通常是包含几个疏水残基的 α 螺旋。任何跨膜蛋白的跨膜结构域可以用于供应嵌合受体的跨膜部分。蛋白质的跨膜结构域的存在和跨度可以由本领域技术人员使用TMHMM算法(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)确定。或者,可以使用人工设计的TM结构域。

[0450] 胞内域

[0451] 胞内域是CAR的信号传输部分。它可以是CAR的细胞内结构域的一部分或与其相缔合。在抗原识别后,受体簇、天然CD45和CD148被排除在突触之外,并且信号被传输至细胞。最常用的胞内域组分是含有3个ITAM的CD3-zeta的胞内域组分。这在抗原结合后传输激活信号至T细胞。CD3-zeta可能不提供完全有能力的激活信号,且可能需要另外的共刺激信号传导。共刺激信号促进T细胞增殖和存活。共刺激信号有两种主要类型:属于Ig家族的共刺激信号(CD28、ICOS)和属于TNF家族的共刺激信号(OX40、41BB、CD27、GITR等)。例如,可以与CD3-Zeta一同使用嵌合CD28和OX40,以传输增殖/存活信号,或可以全部三个一起使用。

[0452] 胞内域可以包含:

[0453] (i) 含有ITAM的胞内域,如来自CD3 zeta的胞内域;和/或

[0454] (ii) 共刺激结构域,如来自CD28或ICOS的胞内域;和/或

[0455] (iii) 传输存活信号的结构域,例如TNF受体家族胞内域,如OX-40、4-1BB、CD27或GITR。

[0456] 已经描述了许多系统,其中抗原识别部分在与信号传输部分分开的分子上,如W0015/150771;W02016/124930好W02016/030691中描述的那些。因此,本发明的细胞可以表达包含抗原结合组分的CAR系统,其包含抗原结合结构域和跨膜结构域;其能够与包含信号传导结构域的分开的细胞内信号传导组分相互作用。

[0457] CAR可以包含信号肽,使得当它在细胞内表达时,新生蛋白被导向内质网,并随后被导向表达它的细胞表面。信号肽可以在分子的氨基末端处。

[0458] 自杀基因

[0459] 本发明的细胞还可以表达自杀基因。

[0460] 自杀基因是一种遗传编码的机制,其允许面对不可接受的毒性(如中靶肿瘤外毒性)、细胞因子释放综合征(CRS)或神经毒性选择性破坏过继转移的细胞(如T细胞)。

[0461] 当本发明的细胞用于治疗急性髓样白血病(AML)时,治疗可能引起患者的髓样发育不全,这可能是长期的或永久的。可以使用同种异体移植物,如同种异体造血干细胞移植(alloHSCT)以从这种状态拯救患者。如果使用移植物,则在表达CAR的细胞中掺入自杀基因还能够使表达CAR的细胞被删除,以防止CAR介导的移植物排斥。

[0462] 本发明的细胞可以包含先前在临床研究中测试的自杀基因之一,如单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)或诱导型胱天蛋白酶9(iCasp9)。

[0463] W02013/153391描述了包含CD20表位的紧凑型自杀基因,其使能够使用利妥昔单抗(Rituximab)选择性地杀伤表达该多肽的细胞。本发明的细胞可以表达具有如SEQ ID No.93所示的序列的自杀基因。

[0464] SEQ ID No.93

[0465] CPYSNPSLCSGGGSELPTQGTFSTNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGG

[0466] GSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG

[0467] TCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0468] W02016/135470描述了在二聚化化学诱导物(CID)如雷帕霉素或雷帕霉素类似物的存在下二聚化的自杀基因,其引起胱天蛋白酶介导的细胞凋亡。

[0469] 自杀基因可以具有以下结构:

[0470] Ht1-HT2-Casp

[0471] 其中:

[0472] Ht1和Ht2是异二聚化结构域,其中一个包含FK506结合蛋白(FKBP),另一个包含mTOR的FRB结构域;并且

[0473] Casp是胱天蛋白酶9结构域。

[0474] 自杀基因可以具有SEQ ID No.94所示的序列或其具有90、95或99%序列同一性的变体。

[0475] SEQ ID No.94(FRB-FKBP12-L3-dCasp9)

[0476] <-----FRB-----MASRILWH
EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR-----
FRB-----><L1-><--FKBP12-----DLMEAEQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFR
R I S K L E Y S G G G S L E G V Q V E T I S P G D G R - - - - -
FKBP12-----TFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDNRNPKFK
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAK-----><-----L3----->
<--dCasp9-LTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGGSGGGGSGGGGSGVDGFGDV
GA-----dCasp9-----LESLRGNADLAYIL
SMEPCGHCLIIINNPNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMV-----
dCasp9-----EVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQA
S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E - - - - -
dCasp9-----KIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVAST
S P E D E S P G S N P E P D A T P F Q E - - - - -
dCasp9-----GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGS
WYVETLDDIFEQWAHSEDLQ-----dCasp9----->

[0477] SLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS

[0478] 核酸构建体

[0479] 编码CAR的核酸序列可以具有以下结构:

[0480] AgB-spacer-TM-endo

[0481] 其中:

[0482] AgB是编码CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

- [0483] spacer是编码CAR的间隔区的核酸序列；
- [0484] TM是编码CAR的跨膜结构域的核酸序列；
- [0485] endo是编码CAR的胞内域的核酸序列。
- [0486] 编码tanCAR的核酸序列可以具有以下结构：
- [0487] AgB1-linker-AgB2-spacer-TM-endo
- [0488] 其中：
- [0489] AgB1是编码tanCAR的第一抗原结合结构域的核酸序列；
- [0490] linker是编码tanCAR的接头的核酸序列；
- [0491] AgB2是编码tanCAR的第二抗原结合结构域的核酸序列；
- [0492] spacer是编码tanCAR的间隔区的核酸序列；
- [0493] TM是编码tanCAR的跨膜结构域的核酸序列；
- [0494] endo是编码tanCAR的胞内域的核酸序列。
- [0495] 当在细胞中表达时,核苷酸序列编码在细胞表面处表达串联的第一和第二抗原结合结构域的多肽。
- [0496] 接头可以是Gly-Ser柔性接头或包含Gly-Ser柔性接头。
- [0497] CAR或tanCAR的抗原结合结构域可以是例如scFv或dAb。
- [0498] 本发明提供了编码包含三个CAR的三重或门的核酸构建体。
- [0499] 编码三重或门的核酸构建体可以具有以下结构：
- [0500] AgBD1-spacer1-TM1-endo1-coexpr1-AgBD2-spacer2-TM2-endo2-coexpr2-AgBD3-spacer3-TM3-endo3
- [0501] 其中：
- [0502] AgBD1是编码第一CAR的抗原结合结构域的核酸序列；
- [0503] Spacer1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列；
- [0504] TM1是编码第一CAR的跨膜结构域的核酸序列；
- [0505] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列；
- [0506] coexpr1和coexpr2,可以相同或不同,是使第一、第二和第三CAR能够共表达的核酸序列；
- [0507] AgBD2是编码第二CAR的抗原结合结构域的核酸序列；
- [0508] Spacer2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列；
- [0509] TM2是编码第二CAR的跨膜结构域的核酸序列；
- [0510] Endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列；
- [0511] AgBD3是编码第三CAR的抗原结合结构域的核酸序列；
- [0512] Spacer3是编码第三CAR的间隔区的核酸序列；
- [0513] TM3是编码第三CAR的跨膜结构域的核酸序列；并且
- [0514] Endo3是编码第三CAR的胞内域的核酸序列。
- [0515] 第一、第二和第三CAR的抗原结合结构域可以是例如scFv或dAb。特别地,所有三个CAR可以具有dAb抗原结合结构域。
- [0516] 本发明提供了编码四重或门的核酸构建体,其包含四个CAR。
- [0517] 编码四重或门的核酸构建体可以具有以下结构：

[0518] AgBD1-spacer1-TM1-endo1-coexpr1-AgBD2-spacer2-TM2-endo2-coexpr2-AgBD3-spacer3-TM3-endo3-coexpr3-AgBD4-spacer4-TM4-endo4

[0519] 其中:

[0520] AgBD1是编码第一CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0521] Spacer1是编码第一CAR的间隔区的核酸序列;

[0522] TM1是编码第一CAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0523] Endo1是编码第一CAR的胞内域的核酸序列;

[0524] coexpr1、coexpr2和coexpr3,可以相同或不同,是使第一、第二、第三和第四CAR能够共表达的核酸序列;

[0525] AgBD2是编码第二CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0526] spacer2是编码第二CAR的间隔区的核酸序列;

[0527] TM2是编码第二CAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0528] endo2是编码第二CAR的胞内域的核酸序列;

[0529] AgBD3是编码第三CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0530] spacer3是编码第三CAR的间隔区的核酸序列;

[0531] TM3是编码第三CAR的跨膜结构域的核酸序列;并且

[0532] endo3是编码第三CAR的胞内域的核酸序列;

[0533] AgBD4是编码第四CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0534] spacer4是编码第四CAR的间隔区的核酸序列;

[0535] TM4是编码第四CAR的跨膜结构域的核酸序列;并且

[0536] endo4是编码第四CAR的胞内域的核酸序列。

[0537] 第一、第二、第三和第四CAR的抗原结合结构域可以是例如scFv或dAb。特别地,所有四个CAR可以具有dAb抗原结合结构域。

[0538] 本发明还提供了编码scFv/dAb CAR和tanCAR的核酸构建体。在该实施方案中,核酸构建体可以具有以下结构:

[0539] AgB1-linker-AgB2-spacer1-TM1-endo1-coexpr-AgB3-spacer2-TM2-endo2

[0540] 其中:

[0541] AgB1是编码tanCAR的第一抗原结合结构域的核酸序列;

[0542] linker是编码tanCAR的接头的核酸序列;

[0543] AgB2是编码tanCAR的第二抗原结合结构域的核酸序列;

[0544] spacer1是编码tanCAR的间隔区的核酸序列;

[0545] TM1是编码tanCAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0546] endo1是编码tanCAR的胞内域的核酸序列;

[0547] coexpr是使CAR和tanCAR能够共表达的核酸序列;

[0548] AgB3是编码CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0549] spacer2是编码CAR的间隔区的核酸序列;

[0550] TM2是编码CAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0551] endo2是编码CAR的胞内域的核酸序列;

[0552] 或以下结构:

[0553] AgB1-spacer1-TM1-endo1-coexpr-AgB2-linker-AgB3-spacer2-TM2-endo2

[0554] 其中:

[0555] AgB1是编码CAR的抗原结合结构域的核酸序列;

[0556] spacer1是编码CAR的间隔区的核酸序列;

[0557] TM1是编码CAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0558] endo1是编码CAR的胞内域的核酸序列;

[0559] coexpr是使CAR和tanCAR能够共表达的核酸序列;

[0560] AgB2是编码tanCAR的第一抗原结合结构域的核酸序列;

[0561] linker是编码tanCAR的接头的核酸序列;

[0562] AgB3是编码tanCAR的第二抗原结合结构域的核酸序列;

[0563] spacer2是编码tanCAR的间隔区的核酸序列;

[0564] TM2是编码tanCAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0565] endo2是编码tanCAR的胞内域的核酸序列。

[0566] 本发明还提供了编码两个tanCAR的核酸构建体。在该实施方案中,核酸构建体可以具有以下结构:

[0567] AgB1-linker1-AgB2-spacer1-TM1-endo1-coexpr-AgB3-linker2-AgB4-spacer2-TM2-endo2

[0568] 其中:

[0569] AgB1是编码第一tanCAR的第一抗原结合结构域的核酸序列;

[0570] linker1是编码第一tanCAR的接头的核酸序列;

[0571] AgB2是编码第一tanCAR的第二抗原结合结构域的核酸序列;

[0572] spacer1是编码第一tanCAR的间隔区的核酸序列;

[0573] TM1是编码第一tanCAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0574] endo1是编码第一tanCAR的胞内域的核酸序列;

[0575] coexpr是使第一和第二tanCAR能够共表达的核酸序列;

[0576] AgB3是编码第二tanCAR的第一抗原结合结构域的核酸序列;

[0577] linker2是编码第二tanCAR的接头的核酸序列;

[0578] AgB4是编码第二tanCAR的第二抗原结合结构域的核酸序列;

[0579] spacer2是编码第二tanCAR的间隔区的核酸序列;

[0580] TM2是编码第二tanCAR的跨膜结构域的核酸序列;

[0581] endo2是编码第二tanCAR的胞内域的核酸序列。

[0582] 本发明的核酸构建体还可以包含编码自杀基因的核酸序列。

[0583] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0584] 本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。另外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响本文所述多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要在其中表达多肽的任何具体宿主生物体的密码子使用。

[0585] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是其中包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。对寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已

知的。这些包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主链,在分子的3' 和/或5' 末端处添加吡啶或聚赖氨酸链。出于本文所述用途的目的,应理解,可以通过本领域可用的任何方法修饰多核苷酸。可以进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0586] 关于核苷酸序列的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括从该序列或对该序列的一个(或多个)核酸进行的任何取代、变化、修饰、替换、缺失或添加。

[0587] 在以上结构中,“coexpr”是使作为独立实体的两个多肽能够共表达的核酸序列。其可以是编码切割位点的序列,使得核酸构建体产生通过切割位点接合的两个多肽。切割位点可以是自切割的,使得当产生多肽时,其立即切割成单独的肽而不需要任何外部切割活性。

[0588] 切割位点可以是能够使两个多肽分开的任何序列。

[0589] 术语“切割”在本文中为了方便而使用,但是切割位点可以通过除经典切割外的机制将肽分离成单独的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV) 2A自切割肽(参见下文),已经提出了各种模型来解释“切割”活性:由宿主-细胞蛋白酶的蛋白水解,自体蛋白水解或翻译效应(Donnelly et al (2001) J.Gen.Virol.82:1027-1041)。只要切割位点当位于编码蛋白质的核酸序列之间时导致蛋白质作为单独的实体表达,此类“切割”的确切机制对于本发明的目的并不重要。

[0590] 切割位点可以是例如弗林蛋白酶(furin)切割位点、烟草蚀刻病毒(TEV)切割位点或编码自切割肽。

[0591] “自切割肽”是指下述肽,该肽发挥功能使得当包含蛋白质和自切割肽的多肽产生时,其立即被“切割”或分离成不同的且离散的第一和第二多肽,而不需要任何外部切割活性。

[0592] 自切割肽可以是来自口蹄病毒或心脏病毒的2A自切割肽。口蹄病毒和心脏病毒的主要2A/2B切割由在其自身C端“切割”的2A介导。在口蹄病毒如口蹄疫病毒(FMDV)和马鼻炎A型病毒中,2A区域是约18个氨基酸的短区段,其与蛋白2B的N端残基(保守的脯氨酸残基)一起代表了能够在其自身C端介导“切割”的自主元件(Donnelly et al (2001),如上文)。

[0593] 已经在除口蹄病毒或心脏病毒外的小核糖核酸病毒、“小核糖核酸病毒样”昆虫病毒、C型轮状病毒、锥虫属物种中的重复序列和细菌序列中发现了“2A样”序列(Donnelly et al (2001),如上文)。

[0594] 切割位点可以包含如SEQ ID No.95所示的2A样序列。

[0595] SEQ ID No.95:

[0596] RAEGRGSLLTCDVEENPGP

[0597] 载体

[0598] 本发明还提供了载体或载体的试剂盒,其包含一个或多个编码本发明的细胞的一个或多个嵌合抗原受体的核酸序列。此类载体可以用于将核酸序列引入到宿主细胞中,使得其表达该CAR或每个CAR。

[0599] 载体可以是例如质粒或病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体,或基于转座子的载体或合成的mRNA。

[0600] 载体可以能够转染或转导细胞,例如T细胞或NK细胞。

[0601] 细胞

[0602] 本发明提供了细胞,其包含多个嵌合抗原受体。

[0603] 细胞可以是细胞裂解性免疫细胞,如T细胞或NK细胞。

[0604] T细胞或T淋巴细胞是在细胞介导的免疫中发挥中心作用的淋巴细胞类型。通过细胞表面上T细胞受体(TCR)的存在,它们可以与其他淋巴细胞如B细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)区分开来。存在多种类型的T细胞,如下文所总结。

[0605] 辅助性T辅助细胞(TH细胞)在免疫学过程中辅助其他白细胞,包括B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及激活细胞毒性T细胞和巨噬细胞。TH细胞在其表面表达CD4。当TH细胞通过抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC II类分子呈递肽抗原时,它们得以活化。这些细胞可以分化成几种亚型之一,包括TH1、TH2、TH3、TH17、Th9或TFH,其分泌不同的细胞因子以促进不同类型的免疫应答。

[0606] 细胞裂解性T细胞(TC细胞或CTL)破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且也涉及移植排斥。CTL在其表面表达CD8。这些细胞通过与存在于所有有核细胞表面上的MHC I类缔合的抗原结合而识别其靶标。通过调节性T细胞分泌的IL-10、腺苷和其他分子,可以使CD8+细胞失活至无能力状态,这防止自身免疫性疾病,如实验性自身免疫性脑脊髓炎。

[0607] 记忆T细胞是在感染已经解决之后长期持续的抗原特异性T细胞的亚组。它们在再次暴露于其同源抗原后迅速扩充为大量效应T细胞,从而为免疫系统提供针对过去感染的“记忆”。记忆T细胞包含三种亚型:中央记忆T细胞(TCM细胞)和两种类型的效应记忆T细胞(TEM细胞和TEMRA细胞)。记忆细胞可以是CD4+或CD8+。记忆T细胞通常表达细胞表面蛋白CD45RO。

[0608] 以前称为抑制性T细胞的调节性T细胞(Treg细胞)对于维持免疫耐受性至关重要。它们的主要作用是关闭T细胞介导的免疫以朝向免疫反应的结束,和抑制逃逸胸腺中阴性选择过程的自身反应性T细胞。

[0609] 已经描述了两种主要类型的CD4+Treg细胞,即天然存在的Treg细胞和适应性Treg细胞。

[0610] 天然存在的Treg细胞(也称为CD4+CD25+FoxP3+Treg细胞)出现在胸腺中,并且已经与发育中的T细胞和已经用TSLP激活的髓样(CD11c+)和浆细胞样(CD123+)树突状细胞两者之间的相互作用相关。天然存在的Treg细胞可以通过称为FoxP3的细胞内分子的存在与其他T细胞区分开来。FOXP3基因的突变可以阻止调节性T细胞发育,导致致命的自身免疫性疾病IPEX。

[0611] 适应性Treg细胞(也称为Tr1细胞或Th3细胞)可以在正常免疫应答期间起源。

[0612] 细胞可以是自然杀伤细胞(或NK细胞)。NK细胞形成先天免疫系统的一部分。NK细胞以不依赖于MHC的方式对来自病毒感染细胞的先天信号提供快速应答。

[0613] NK细胞(属于先天性淋巴样细胞的组)定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),并构成从生成B和T淋巴细胞共同淋巴样祖代分化的第三种细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾、扁桃体和胸腺中分化和成熟,在那里它们进入循环。

[0614] 本发明的细胞可以是上述任何细胞类型。

[0615] 根据本发明第一方面的T或NK细胞可以从患者自己的外周血(第一方)离体创建,或在来自供体外周血的造血干细胞移植(第二方)的环境中创建,或来自不相关供体的外周血(第三方)。

[0616] 或者,根据本发明第一方面的T或NK细胞可以衍生自诱导型祖细胞或胚胎祖细胞离体分化为T或NK细胞。或者,可以使用保留其裂解功能并且可以充当治疗剂的永生化T细胞系。

[0617] 在所有这些实施方案中,通过包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染的许多方式之一引入编码嵌合多肽的DNA或RNA来生成表达嵌合多肽的细胞。

[0618] 本发明的细胞可以是来自受试者的离体T或NK细胞。T或NK细胞可以来自外周血单个核细胞(PBMC)样品。可以在用编码提供根据本发明第一方面的嵌合多肽的分子的核酸转导之前活化和/或扩充T或NK细胞,例如通过用抗CD3单克隆抗体处理。

[0619] 本发明的T或NK细胞可以通过以下制备:

[0620] (i) 从受试者或上文列出的其他来源分离含有T或NK细胞的样品;和

[0621] (ii) 用本发明的核酸构建体、载体或载体的试剂盒转导或转染T或NK细胞。

[0622] 然后可以纯化T或NK细胞,例如通过基于抗原结合多肽的抗原结合结构域的表达进行选择来进行。

[0623] 药物组合物

[0624] 本发明还涉及含有多个根据本发明的细胞的药物组合物。

[0625] 药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。此类配制剂可以是例如适合用于静脉内输注的形式。

[0626] 治疗方法

[0627] 本发明提供了用于治疗疾病的方法,其包括将本发明的细胞(例如在如上文所述的药物组合物中)施用于受试者的步骤。

[0628] 用于治疗疾病的方法涉及本发明细胞的治疗性用途。在本文中,可以对患有现有疾病或病况的受试者施用细胞以减轻、降低或改善至少一种与疾病相关的症状和/或减缓、降低或阻断疾病的进展。

[0629] 方法可以包括以下步骤:

[0630] (i) 分离含有T或NK细胞的样品;

[0631] (ii) 用本发明提供的核酸序列或载体转导或转染此类细胞;

[0632] (iii) 对受试者施用来自(ii)的细胞。

[0633] 可以从受试者或从其他来源分离含有T或NK细胞的样品,例如如上所述。T或NK细胞可以从患者自己的外周血(第一方)分离,或在来自供体外周血的造血干细胞移植(第二方)的环境中分离,或从来自不相关供体的外周血(第三方)分离。

[0634] 方法可以涉及以下步骤:

[0635] (i) 将本发明的第一方面的细胞施用于受试者;

[0636] (ii) 将同种异体造血干细胞移植(alloHSCT)施用于受试者。

[0637] 例如,方法可以涉及以下步骤:

[0638] (i) 将本发明的第一方面的细胞施用于受试者;

[0639] (ii) 监测受试者的髓样发育不全;

[0640] (ii) 如果检测到髓样发育不全,则将同种异体造血干细胞移植(alloHSCT)施用于患者。

[0641] 髓系化生(myeloid metaplasia)是一种临床和病理综合征,其特征在于脾中不断发生髓外造血并在肝中几乎总是发生髓外造血,脾肿大且通常肝肿大,以及贫血,其中外周血中有未成熟的红细胞和白细胞。

[0642] 本发明提供了本发明的细胞,其用于治疗和/或预防疾病。

[0643] 本发明还涉及本发明的细胞在制备用于治疗/或预防疾病的药物中的用途。

[0644] 通过本发明的方法治疗的疾病可以是癌性疾病。特别地,疾病可以是急性髓样白血病(AML)。

[0645] 急性髓样白血病(AML)是髓样系血细胞的癌症,其特征不在于异常细胞的快速生长,这些异常细胞在骨髓和血液中积累并干扰正常血细胞。症状可能包括感到疲倦,呼吸急促,容易瘀伤和出血以及感染风险增加。诊断通常基于骨髓穿刺和血液检查。作为急性白血病,AML进展迅速,并且若不予治疗,通常在数周或数月内致命。

[0646] 本发明的细胞可以能够杀伤靶细胞,如癌细胞。靶细胞的特征可以在于一种或多种靶抗原的表达,如以下一种、两种、三种或全部四种:CD33、CD123、CLL-1和FLT3。

[0647] 本发明的细胞和药物组合物可以用于治疗和/或预防上述疾病。

[0648] 现在将通过实施例进一步描述本发明,这些实施例旨在帮助本领域的普通技术人员实施本发明,而不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0649] 实施例1-设计和生成表达单个CAR和三重或门的细胞

[0650] 如下生成一组编码CAR的核酸构建体:

[0651] RQR8-2A-V5CD123CAR-表达具有V5标签的CD123 CAR的单个CAR构建体

[0652] RQR8-2A-V5FLT3CAR-表达具有V5标签的FLT3 CAR的单个CAR构建体

[0653] RQR8-2A-HACD33CAR-表达具有HA标签的CD33 CAR的单个CAR构建体

[0654] RQR8-2A-FLAGCLL1CAR-表达具有FLAG标签的CLL1 CAR的单个CAR构建体

[0655] RQR8-2A-V5CD123CAR-2A-HACD33CAR-2A-FLAGCLL1CAR-表达具有V5标签的CD123 CAR;具有HA标签的CD33 CAR;和具有FLAG标签的CLL1 CAR的三重CAR构建体

[0656] RQR8-2A-V5FLT3CAR-2A-HACD33CAR-2A-FLAGCLL1CAR-表达具有V5标签的FLT3 CAR;具有HA标签的CD33 CAR;和具有FLAG标签的CLL1CAR的三重CAR构建体

[0657] 所有构建体共表达分选自杀基因RQR8,其在WO2013/153391中描述。

[0658] 所有CAR均为dAb CAR,其具有包含CD3 ζ 和4-1BB共刺激结构域的第二代胞内域。

[0659] 用构建体转导外周血来源的CD4⁺和CD8⁺T细胞。通过将T细胞与CAR特异性标签抗体(针对V5、HA或FLAG)和QBEND10(以检测RQR8的表达)共染色来检测单个CAR的表达。图3显示了aCD33 CAR的表达。图4显示了aCD123CAR的表达。图5显示了aCLL1 CAR的表达。

[0660] 通过将T细胞用所有三种CAR特异性标签抗体(针对V5、HA和FLAG)和QBEND10(以检测RQR8的表达)共染色来检测三重CAR的表达。

[0661] 实施例2-基于FACS的杀伤测定(FBK)

[0662] 使用基于FACS的杀伤测定研究了表达单个CAR的细胞杀伤表达单个抗原CD123、CLL1和CD33的靶细胞的能力。使用经工程化改造以表达所期望抗原的SupT1细胞系以及来自文献的人类患者衍生的细胞系(MoIm-14、KG1 α 、HL-60、K562和THP-1)进行了测定,它们在

使用前进行了均匀抗原表达的研究(图6和7)。

[0663] 将T细胞与靶细胞以1:1的比率共培养。该测定在96孔板中以0.2ml总体积进行,每孔使用 5×10^4 个经转导的T细胞,和比率为1:1、1:2、1:4或1:8的靶细胞。在对转导效率标准化后建立共培养物。温育24或48小时后进行FBK。

[0664] FBK的结果对于aCD33显示于图8和9中,对于aCD123显示于图10和11中,并且对于aCLL1显示于图12和13中。

[0665] 与阴性对照相比,所有单个aCD33 dab CAR对每种表达CD33的AML细胞均显示有效力的细胞毒活性。剂量反应杀伤如预期的那样,其中较高的效应物和靶标比率(1:1)导致较高的靶标杀伤。aCD19 FMC63 CAR在一些细胞中显示出一定水平的低背景细胞毒活性。在CD33单结构域CAR之间未观察到细胞毒性水平的重大显著差异。在所有细胞中即使以最低的E:T比率,也可以看到大约50-60%的杀伤反应。

[0666] 以1:2和1:4针对SupT1 CD123,CD123-VHH-CAR-2与CD123-VHH-CAR_1显示出显著差异(分别为 $p=0.0205$, $n=4$ 和 $p=0.0012$, $n=4$)。而仅以1:4针对SupT1 CD123可以看到CD123-VHH-CAR_2与CD123-VHH-CAR_3的显著差异($p=0.0194$, $n=4$)。对于其余的24小时共培养物,所有CD123 CAR均具有有效力的CD123比细胞毒活性,并且在所有比率中构建体之间均无显著差异(图10)。但是,仅对于处于1:1比率的CD123-/SupT1NT细胞观察到了显著的抗原非依赖性基础细胞毒性。如所预期的,剂量反应行为显示出随着E:T比率增加更大的靶标存活。在不存在基础抗原非依赖性细胞毒性的情况下,所有构建体均对SupT1 CD123和KG1a细胞系显示出70%的靶标裂解(E:T,1:2)。对于48小时的共培养物,以比率1:1和1:2,在所有构建体中均对SupT1 NT具有显著的非特异性细胞毒性。以1:8对于所有CAR构建体没有针对CD123-/SupT1 NT的显著基础细胞毒性,其中所有CAR构建体均实现了针对Molm14和THP1的70%靶标裂解(图11)。

[0667] 对于SupT1 CLL1,没有观察到显著差异,其中所有VHH结合物均显示出有效力的CLL1特异性细胞毒性(图12)。在所有E:T比率中均显示出这种趋势,没有单个VHH表现出增强的活性。对于以1:1比率与CLL1/SupT1细胞温育48小时的所有CAR,基础活性均显著,只有CLL1-VHH-CAR-3对于1:2E:T比率显示出显著的基础活性($p=0.0425$, $n=7$)。当与THP1和KG1a细胞温育时,所有CAR均显示CLL1特异性细胞毒性,而VHH-CAR_2和5显示出增强的VHH CAR杀伤(图13)。以1:2E:T比率,仅有的对THP1表现出显著的CLL1特异性细胞毒性的CAR是CAR-5相对于CAR-3($p=0.0133$, $n=7$)。在使用所有细胞系的所有比率中,CAR_2和5之间的CLL1特异性细胞毒性没有显著差异。

[0668] 实施例3-细胞因子释放

[0669] IL-2分泌是T细胞活化的指标,并通过使用细胞毒性共培养测定的上清液进行评估。分析了单个CAR与相关对照的细胞因子分泌,研究了作为T细胞活化的标志物的IL-2和IFN γ 的产生。通过ELISA检测IL-2和IFN γ 的产生。

[0670] 细胞因子释放测定的结果对于aCD33显示于图14和15中,对于aCD123显示于图16中,而对于aCLL1显示于图17中。

[0671] 当aCD33 CAR T细胞暴露于CD33阳性细胞时,观察到更高的IL-2分泌。与非转导和阴性对照相比,所有aCD33 sdAb CAR T细胞产生的IL-2相对较多。与aCD33 scFv阳性对照相比,IL-2分泌水平相对较低。与aCD33 scFv阳性对照相比,用FMC63阴性对照观察到相似

的IL-2产生水平。aCD33 CAR T细胞的IFN γ 产生显著高于阴性对照。在工程化的SupT1细胞和AML衍生细胞两者中,所有aCD33 sdAb CAR均产生相似水平的IFN- γ (图15)。sdAb CD33.6在所有细胞中均维持较高水平的IFN- γ 产生。而相比于所有其他sdAb CD33 CAR, sdAb CD33.2的IFN- γ 产生较低。

[0672] 当用THP1和MOLM14细胞攻击时,aCD33 scFv产生的IFN γ 水平较低。在工程化的SupT1和AML衍生细胞之间观察到的IFN- γ 产生差异不大。与aCD33scFv阳性对照对MOLM14细胞相比,FMC63 scFv阴性对照也表现出产生相同水平的IFN- γ (约10000pg/ml)。

[0673] 当暴露于CD123+细胞时,所有aCD123 CAR T细胞均产生IL-2,但VHH-CAR-T细胞构建体之间IL-2产生没有显著差异。使用Molm14,VHH-CAR-2和6产生最高水平的IL-2产生(平均约 1.77×10^4 和 1.63×10^4 pg/ml),并且使用THP1,VHH-CAR-4产生最低的IL-2产生(平均约 3.5×10^3 pg/ml)。与scFv CAR阳性对照相比,VHH-CAR-构建体在24小时和48小时时间过程中均显示出改善的IL-2产生,即使在细胞毒性测定中未见显著差异。

[0674] 针对SupT1 CD123和Molm14,所有aCD123 CAR产生相似水平的IFN γ (分别为平均约 3.4×10^3 和约 4.0×10^4 pg/ml)。在所有构建体中对于IFN γ 产生,CD123 CAR构建体之间没有显著差异。与IL-2产生一样,VHH-CAR-6在所有条件下均一致产生较高水平的细胞因子,尽管没有显著差异。scFv对照CAR产生的IFN γ 水平与VHH CAR相似,这与细胞毒性测定中所见靶标裂解的趋势一致。最高的IFN γ 产生是用Molm14的VHH-CAR-6(平均约 4.0×10^4 pg/ml),而最低的是用THP1的VHH-CAR-4(平均约 1.45×10^3 pg/ml)。

[0675] 对于用SupT1 CLL1和THP1的所有CLL1-VHH-CAR构建体,均观察到了抗原特异性的IL-2产生,但在构建体之间未观察到显著差异(图17,a)。然而,即使杀伤数据确实显示出抗原特异性的细胞毒性,对于与KG1a共培养的CAR也没有抗原特异性的IL-2产生。该观察结果可能与KG1a细胞的细胞表面上CLL1的极低表达水平有关(638/细胞,图7)。对于IFN γ 产生也观察到类似的趋势,其中对于SupT1 CLL1和THP1,所有CAR构建体均显示出抗原特异性IFN γ 产生,在构建体之间没有显著差异(图17,b)。同样,对于KG1a产生的IFN γ 水平相对较低,其中对细胞毒性测定表现良好CAR产生的细胞因子水平更高(VHH-CAR 2、4和5)。

[0676] 实施例4-增殖测定(PA)

[0677] 为了测量增殖,用染料Cell Trace Violet (CTV,一种被水解并保留在细胞内的荧光染料)标记实施例1中描述的同一组表达CAR的T细胞。它被405nm(紫色)激光激发,并可以在pacific blue通道中检测到荧光。将CTV染料在DMSO中重构至5mM。将T细胞以 2×10^6 个细胞/ml重悬于PBS中,并加入1 μ l/ml的CTV。将T细胞在37 $^{\circ}$ C下与CTV温育20分钟。随后,通过添加5V完全培养基淬灭细胞。5分钟温育后,洗涤T细胞并将其重悬于2ml完全培养基中。在室温下温育另外的10分钟,使乙酸盐水解并保留染料。

[0678] 将标记的T细胞与靶细胞共培养四天。该测定使用每孔 5×10^4 个转导的T细胞和等数目的靶细胞(比率1:1),在96孔板中以0.2ml总体积进行。在第四天的时间点,通过流式细胞术分析T细胞以测量CTV随着T细胞分裂的稀释度。计算在共培养结束时存在的T细胞数目,并表示为相比T细胞输入数目的增殖倍数。

[0679] 增殖测定的结果对于aCD33显示于图18中,对于aCD123显示于图19中,并且对于aCLL1显示于图20中。

[0680] 6天后观察到的aCD33 CAR T细胞的扩充倍数存在显著差异。与非转导对照和阴性

对照(FMC63 scFv)相比,aCD33 sdAb CAR T细胞观察到更高的扩充倍数。应当指出,在所有AML细胞中,与aCD33 sdAb CAR T细胞相比,阳性对照(aCD33 scFv)的增殖水平均更低。与其他细胞相比,用CD33人工转导的SupT1中CAR T细胞的扩充倍数显著更高。

[0681] 在所有条件下,所有CD123-VHH-CAR构建体之间均未观察到显著差异。

[0682] 使用CLL1+靶细胞系,对于所有CLL1-VHH-CAR构建体均观察到抗原特异性增殖,但是,使用SupT1 CLL1和THP1,增殖能力未观察到显著差异。对于KG1a共培养物,在所有比率,CLL1-VHH-CAR 2和5比CLL1-VHH-CAR 1、2和3具有显著的增殖优势(p值范围从<0.05至<0.01,n=7)。使用KG1a,CLL1-VHH-CAR-5比CLL1-VHH-CAR-2表现出显著的增殖优势(p=0.0445,n=7)。

[0683] 与阴性CAR对照(FMC63 scFv)相比,所有六个aCD33单dab CAR在所有增殖、细胞毒性和细胞因子产生测定中均表现出相似的对靶细胞的反应水平。sdAb CD123 CAR以剂量反应方式显示出针对工程化的SupT1 CD123细胞和其他AML衍生细胞(MOLM14、THP1、KG1a)的功效。sdAb CLL1 CAR对CLL1+细胞也有效。从研究的第一阶段获得的结果表明,每个单结构域结合物(CD123、CD33和CLL1)可以有效地作为针对AML的第二代CAR。

[0684] 以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,要求保护的本发明不应不适当地限制于此类具体的实施方案。实际上,对于分子生物学或相关领域的技术人员来说显而易见的是描述的用于实施本发明的方式的各种修改都旨在所附权利要求的范围内。

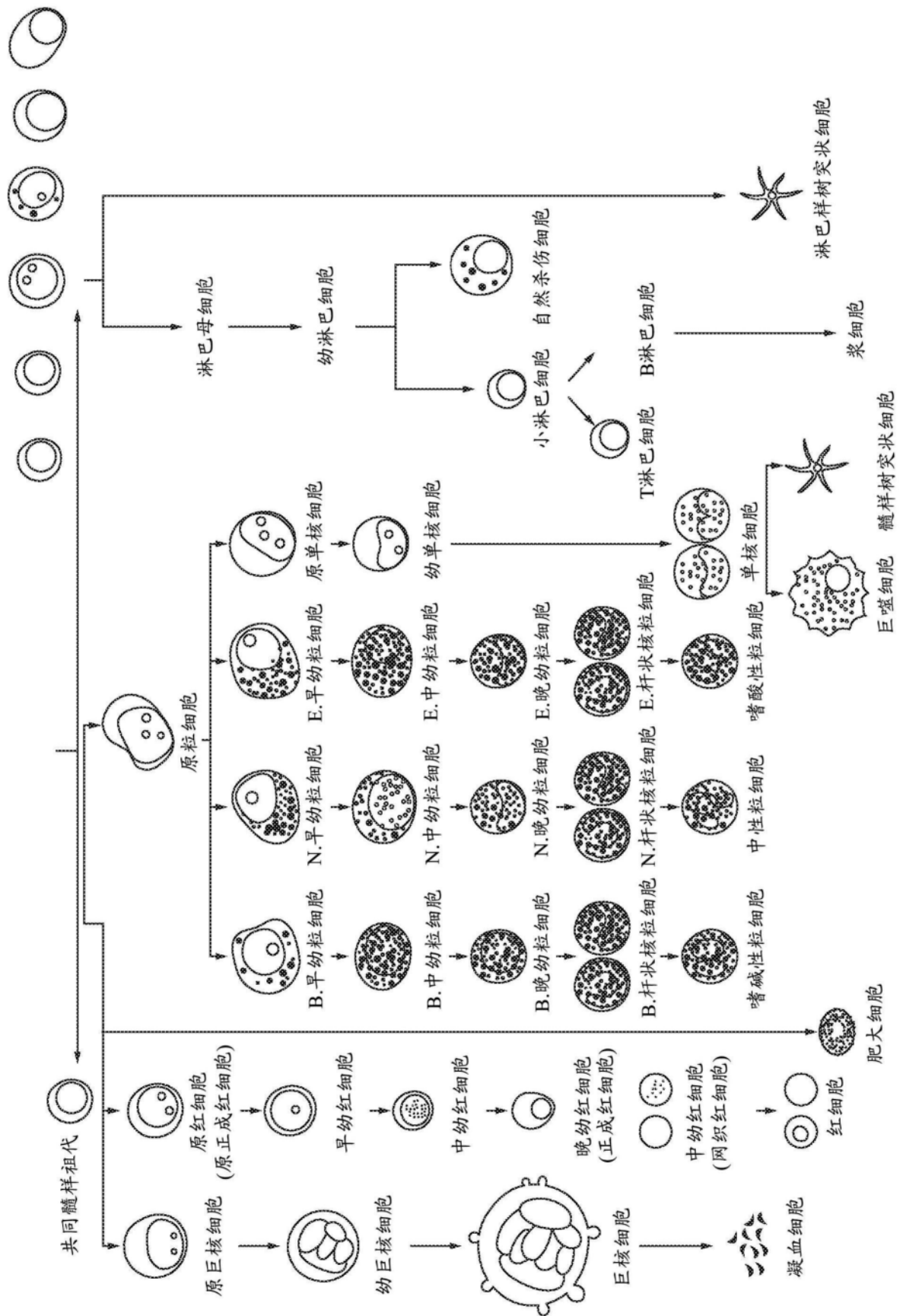


图1

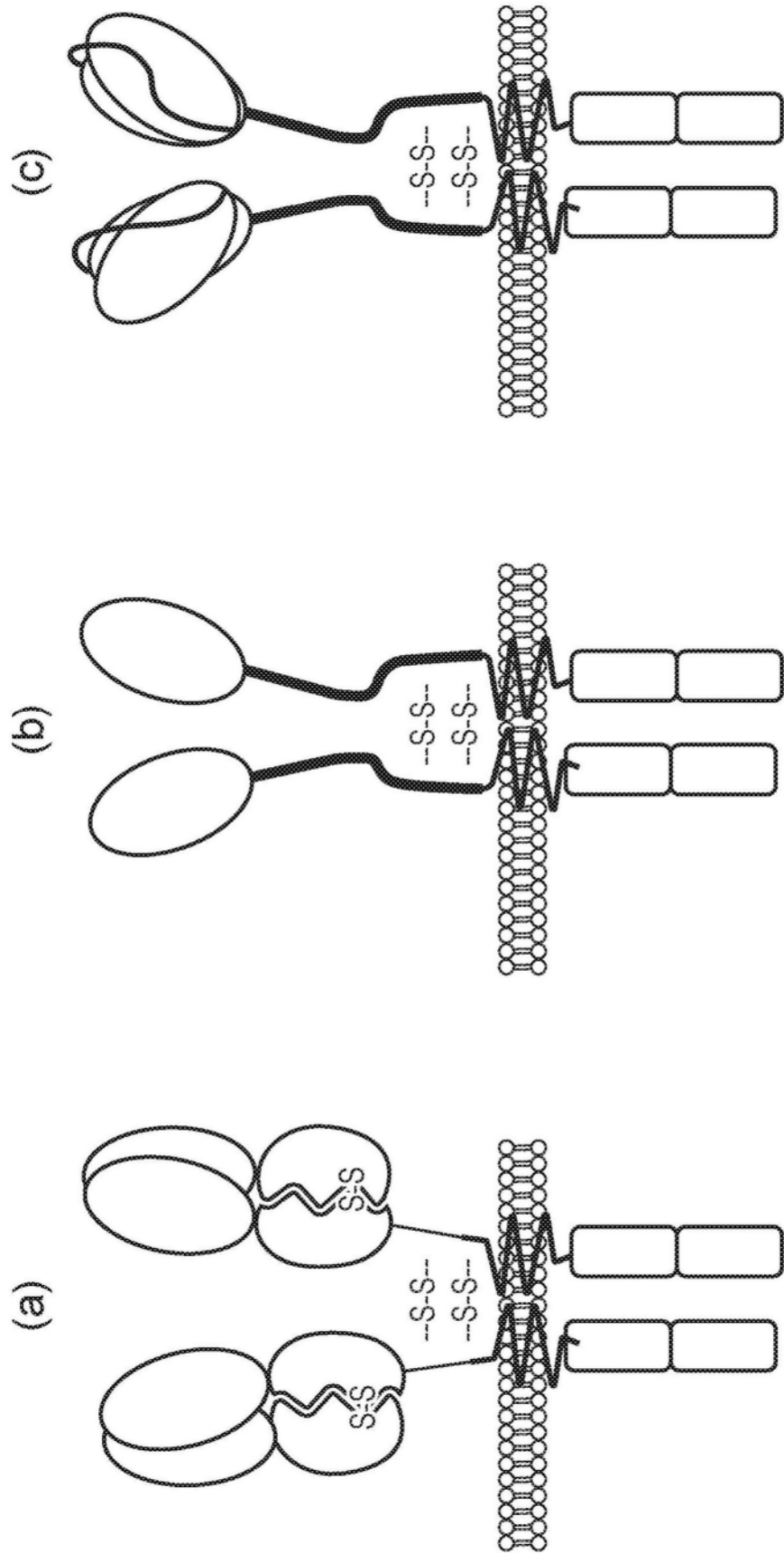


图2

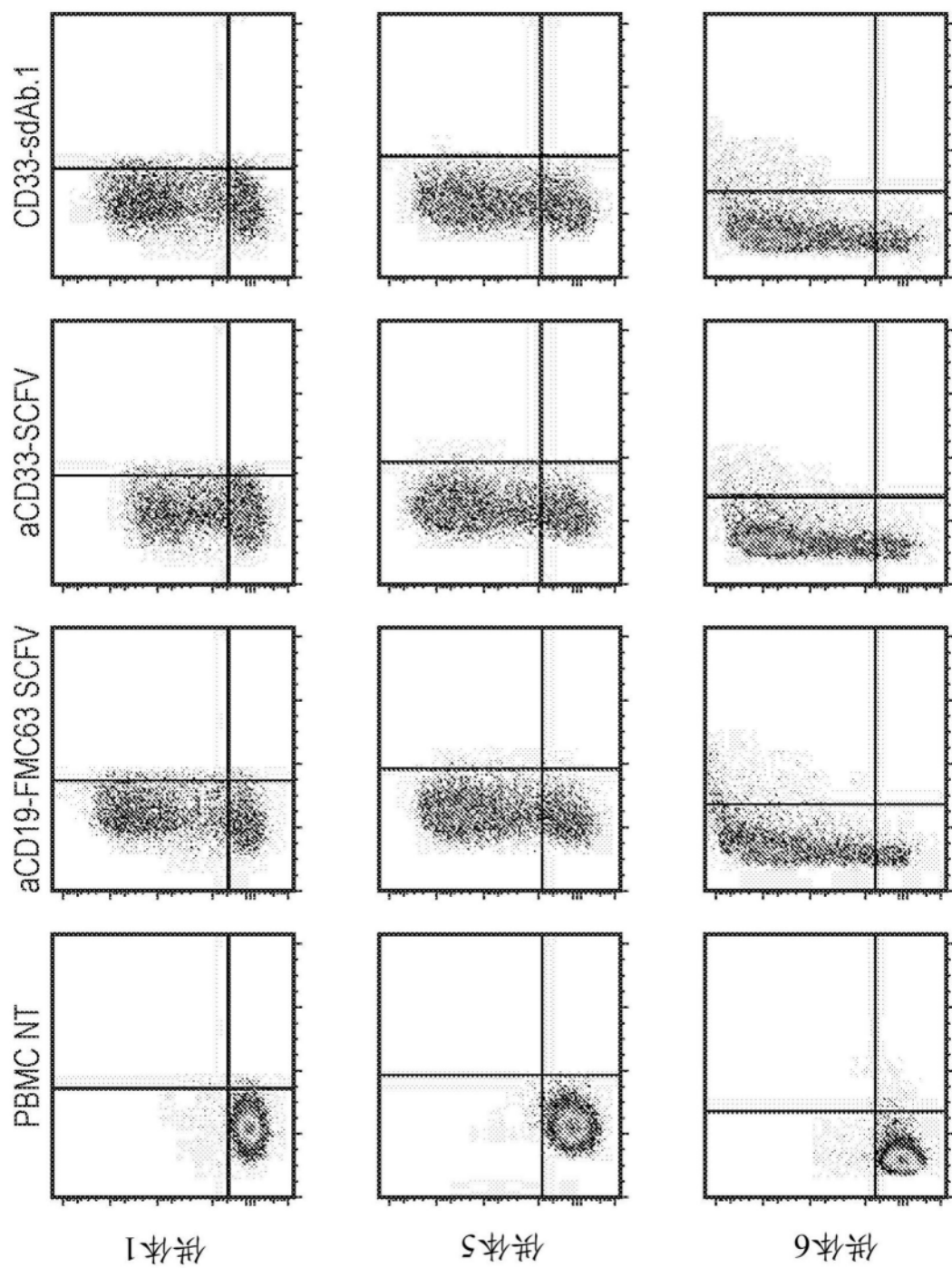


图3

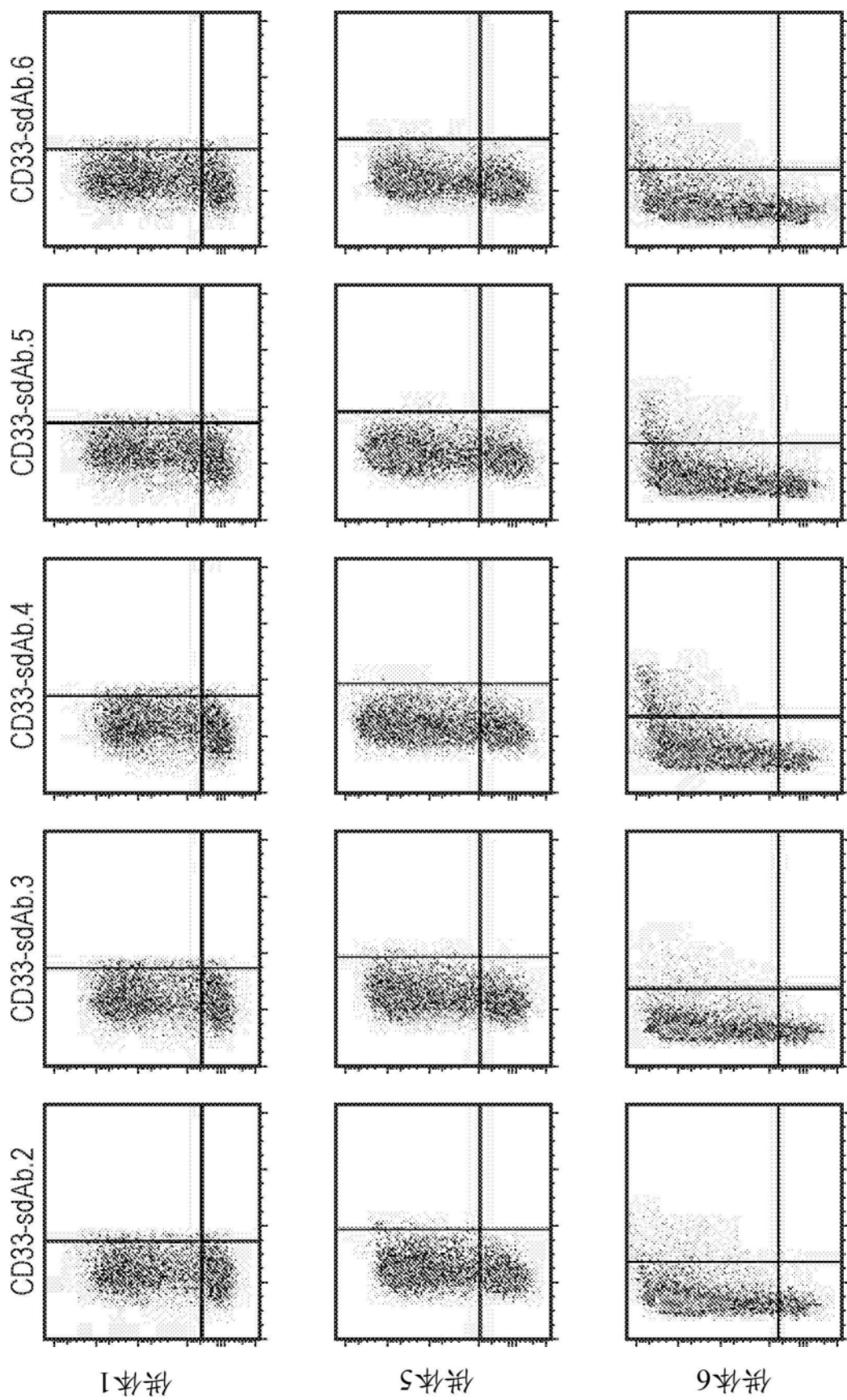


图3(续)

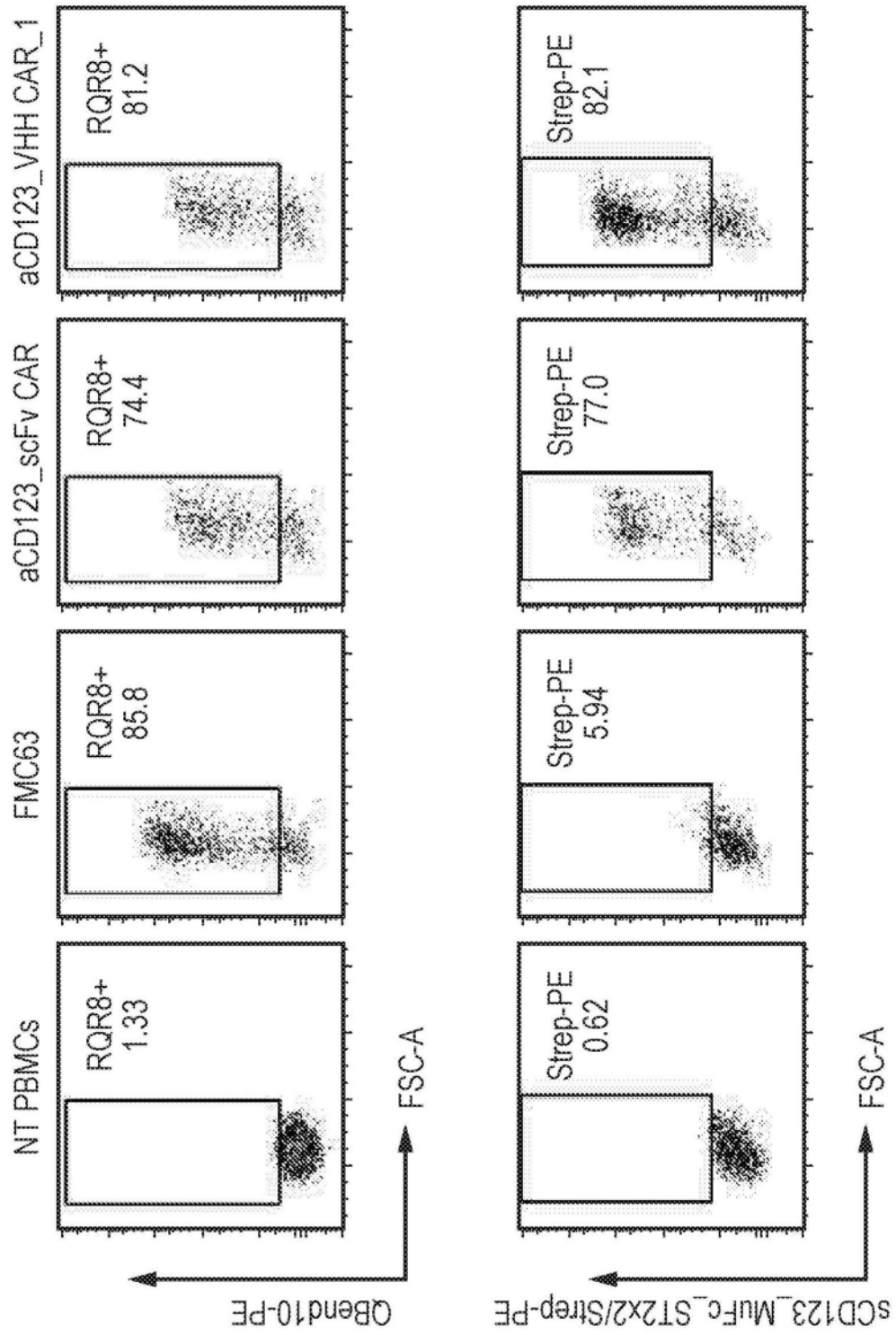


图4

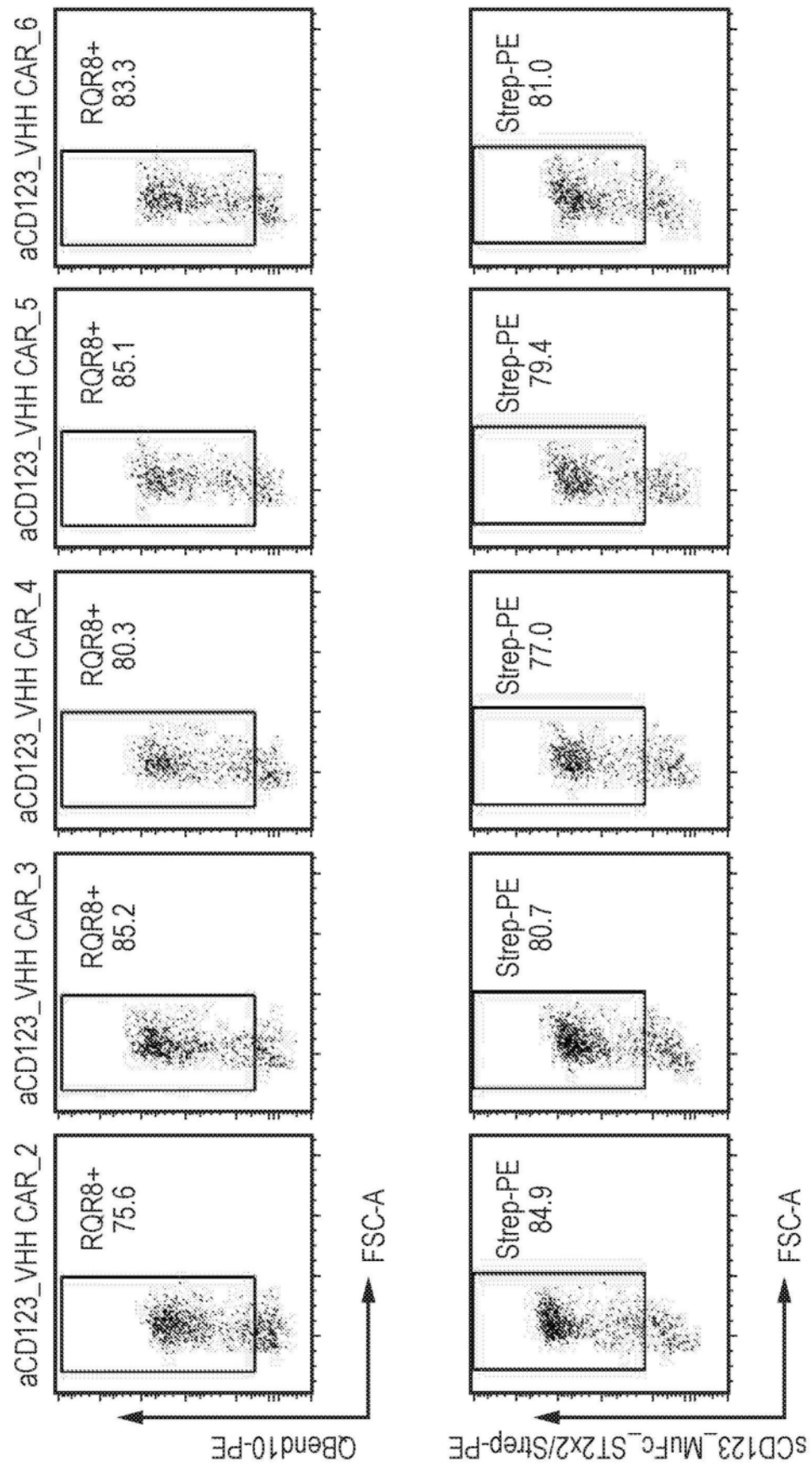


图4(续)

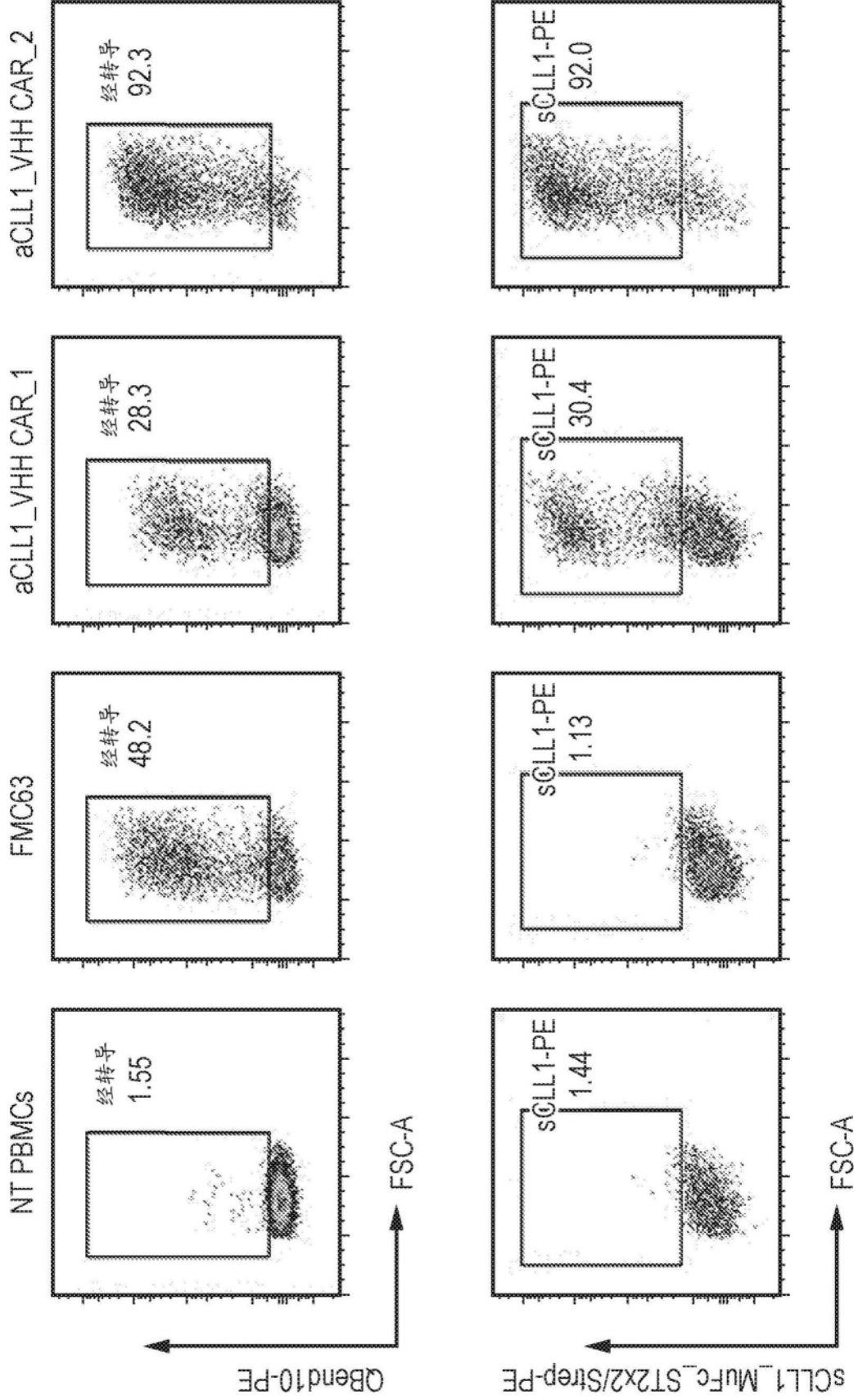


图5

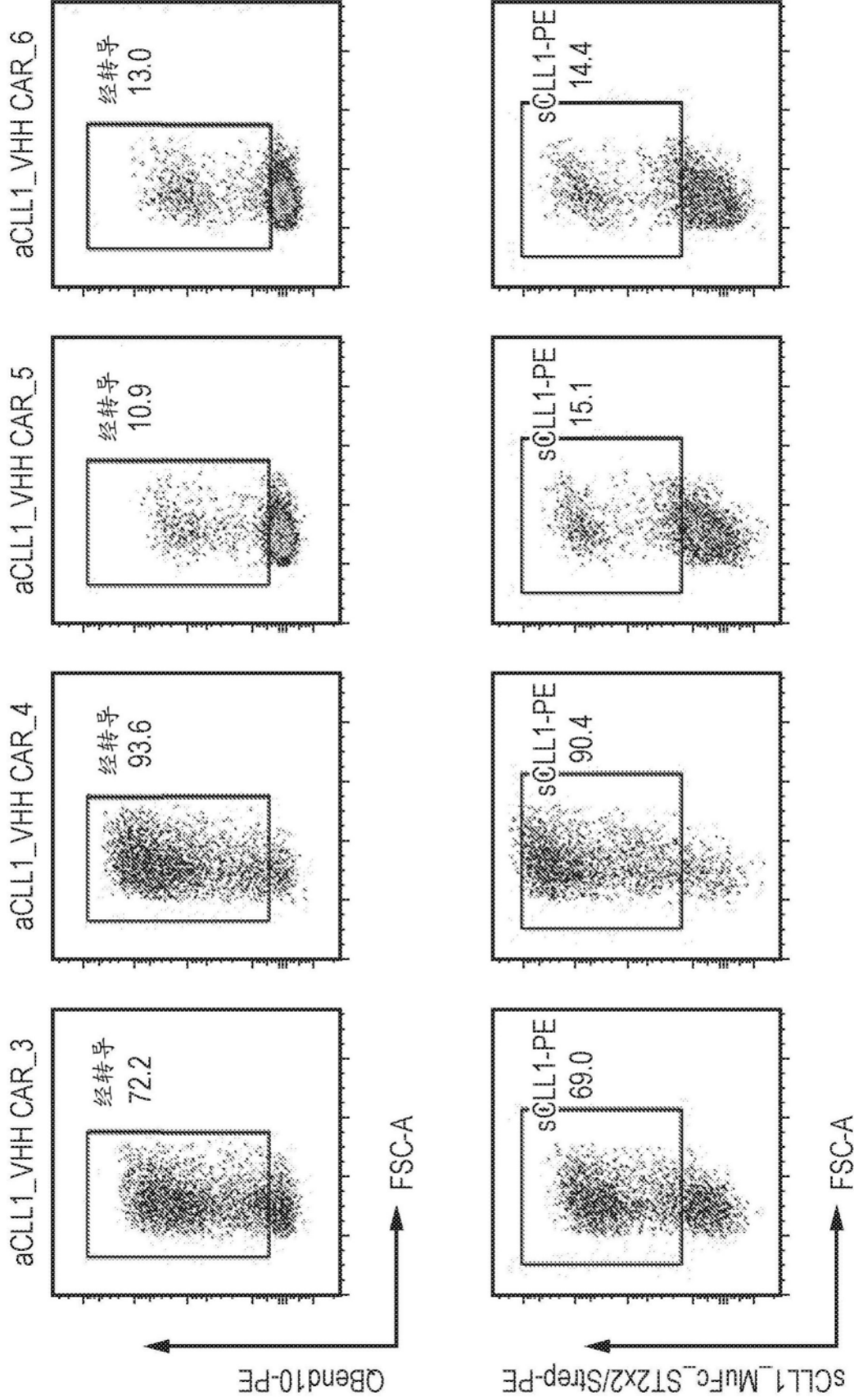


图5(续)

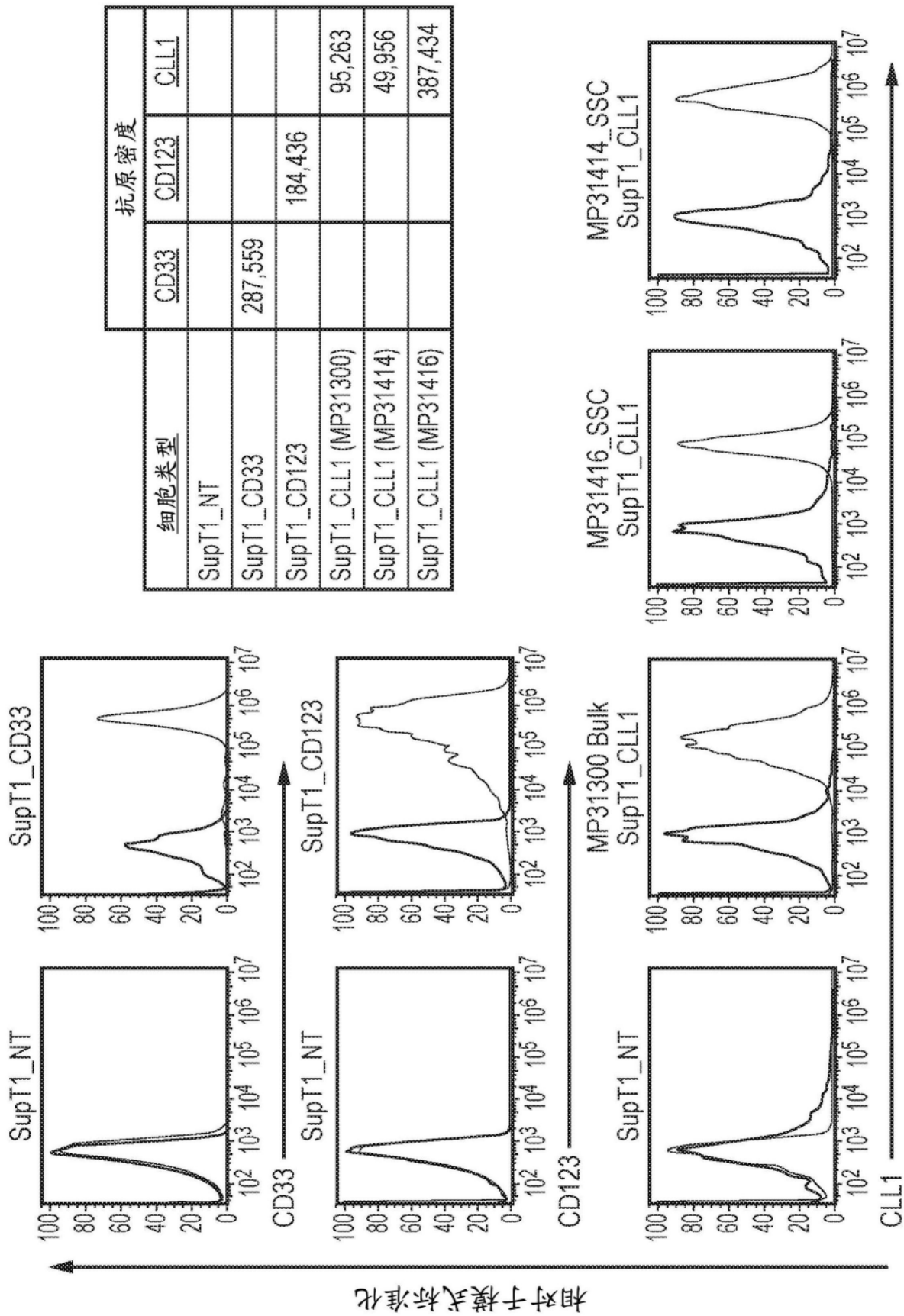


图6

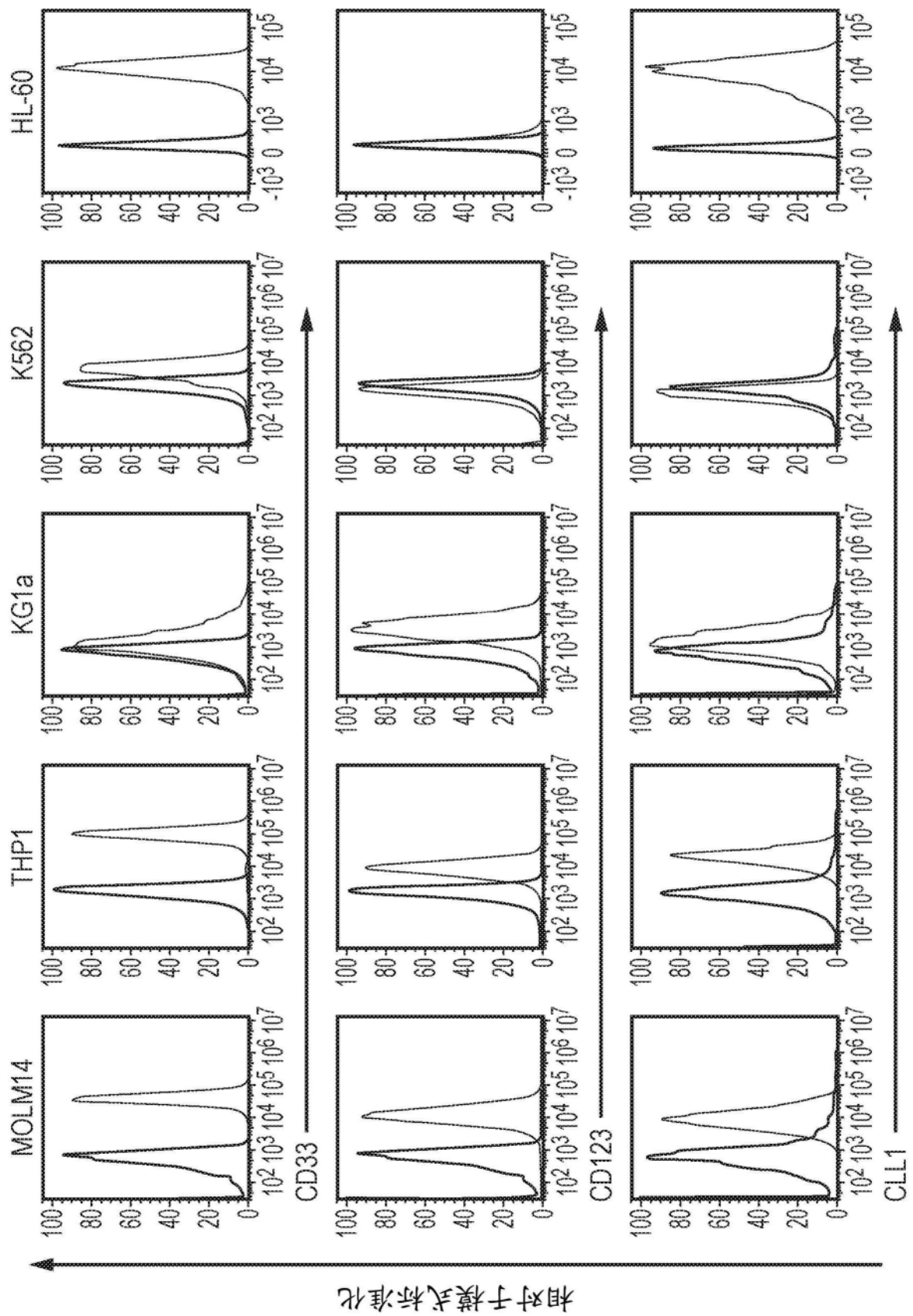


图7

	抗原密度(每细胞)		
细胞类型	CD33	CD123	CLL1
MOLM14	27027	7374	5807
THP1	59391	4959	12441
KG1a	487	2100	638
K562	2899	-	-
HL-60	29676	16	25696

图7(续)

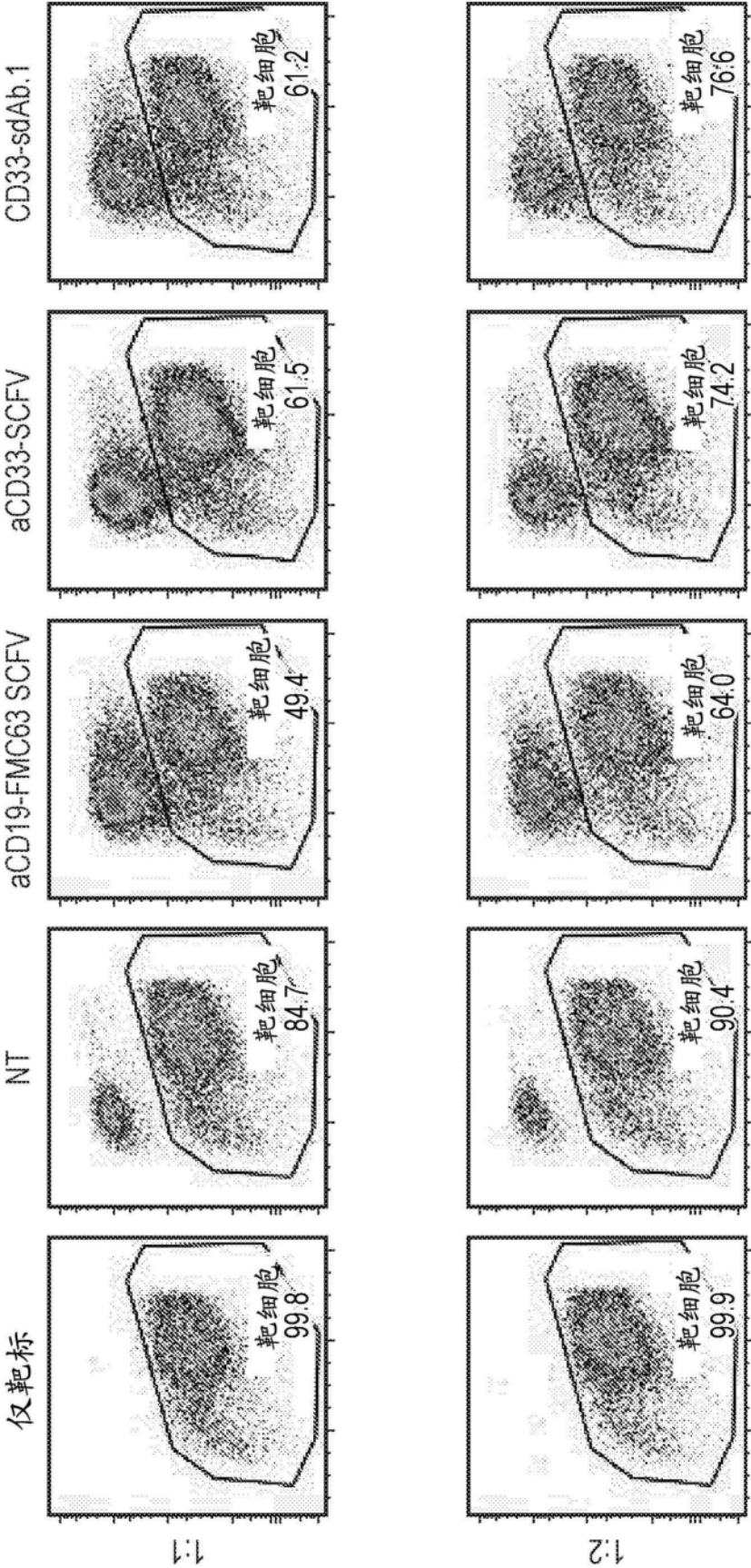


图8

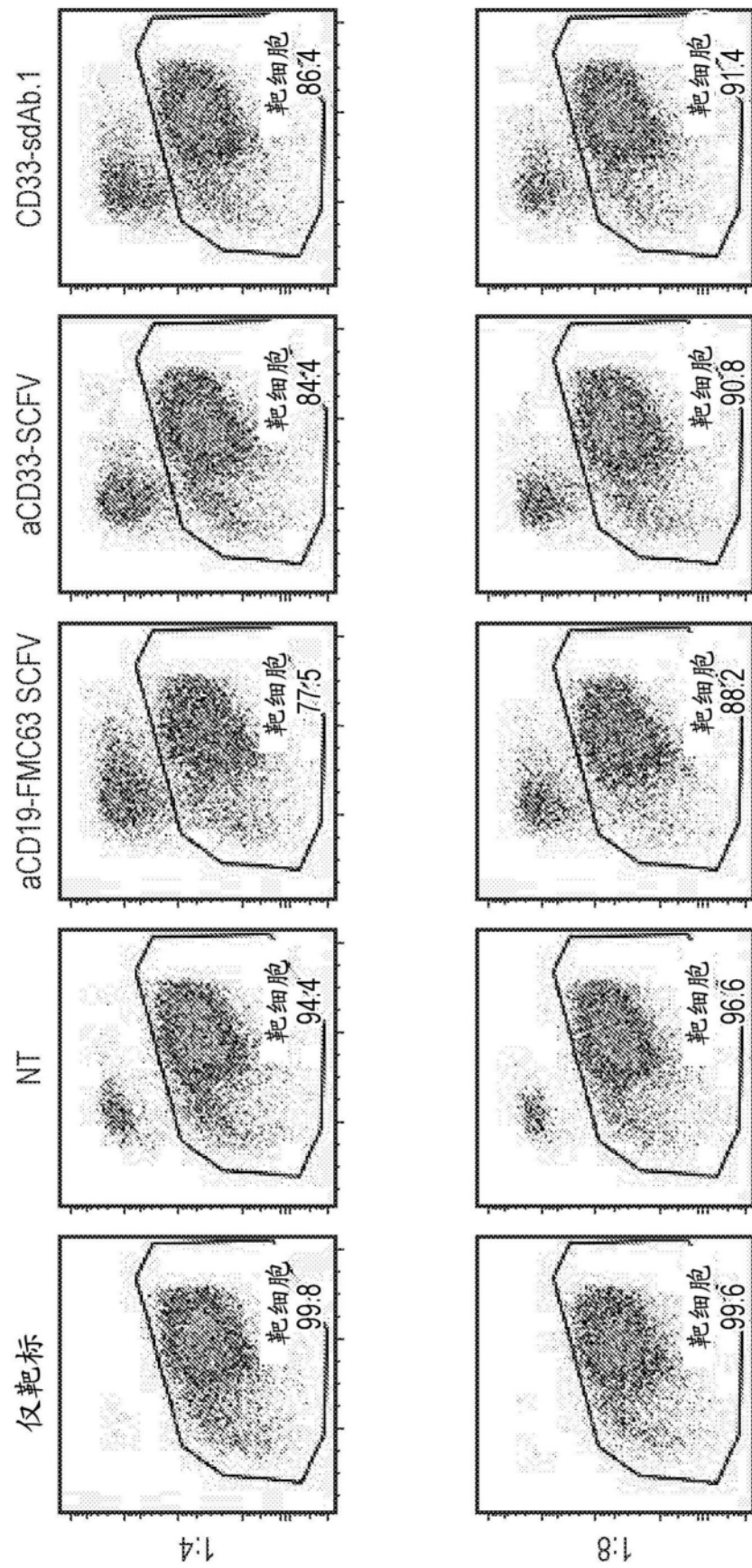


图8(续)

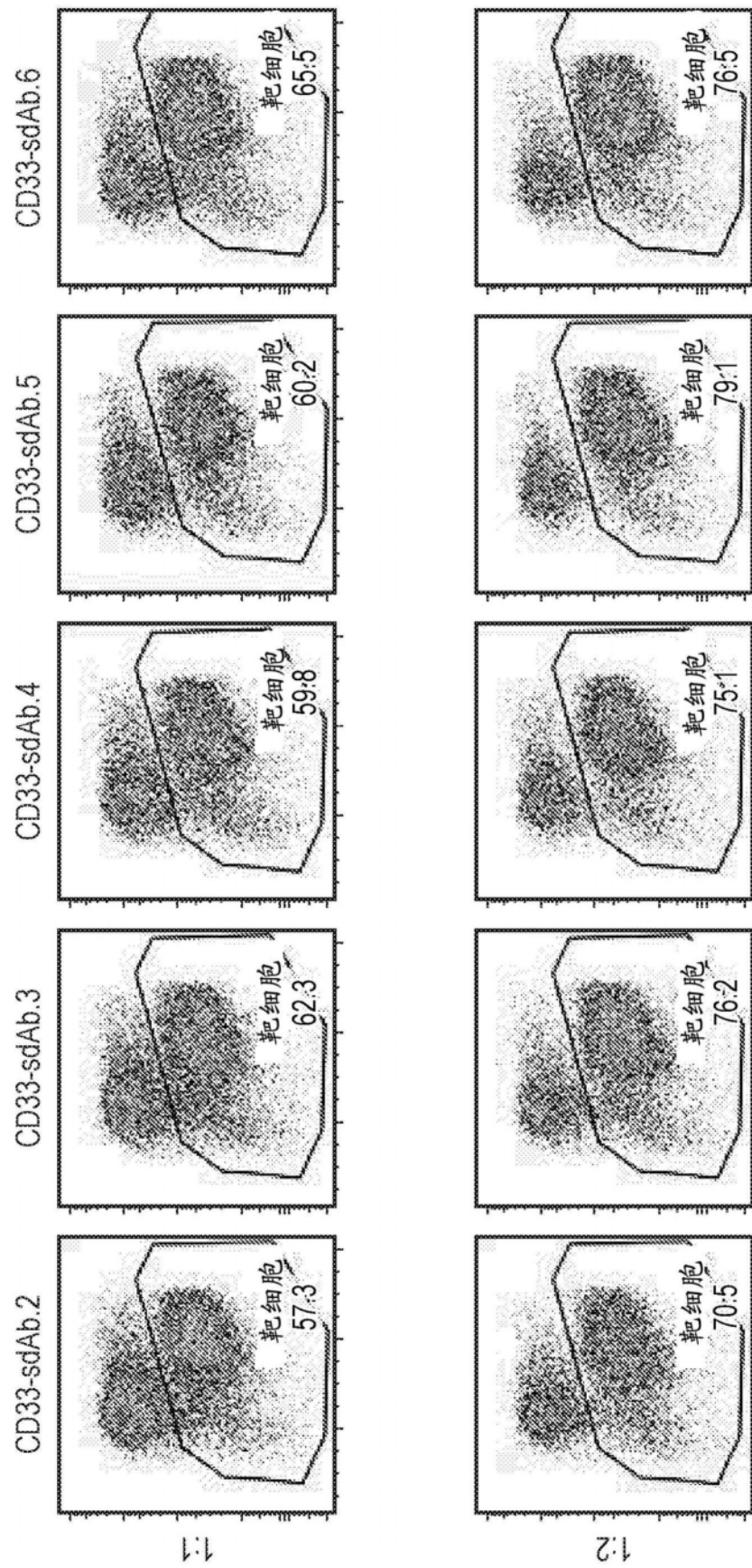


图8(续)

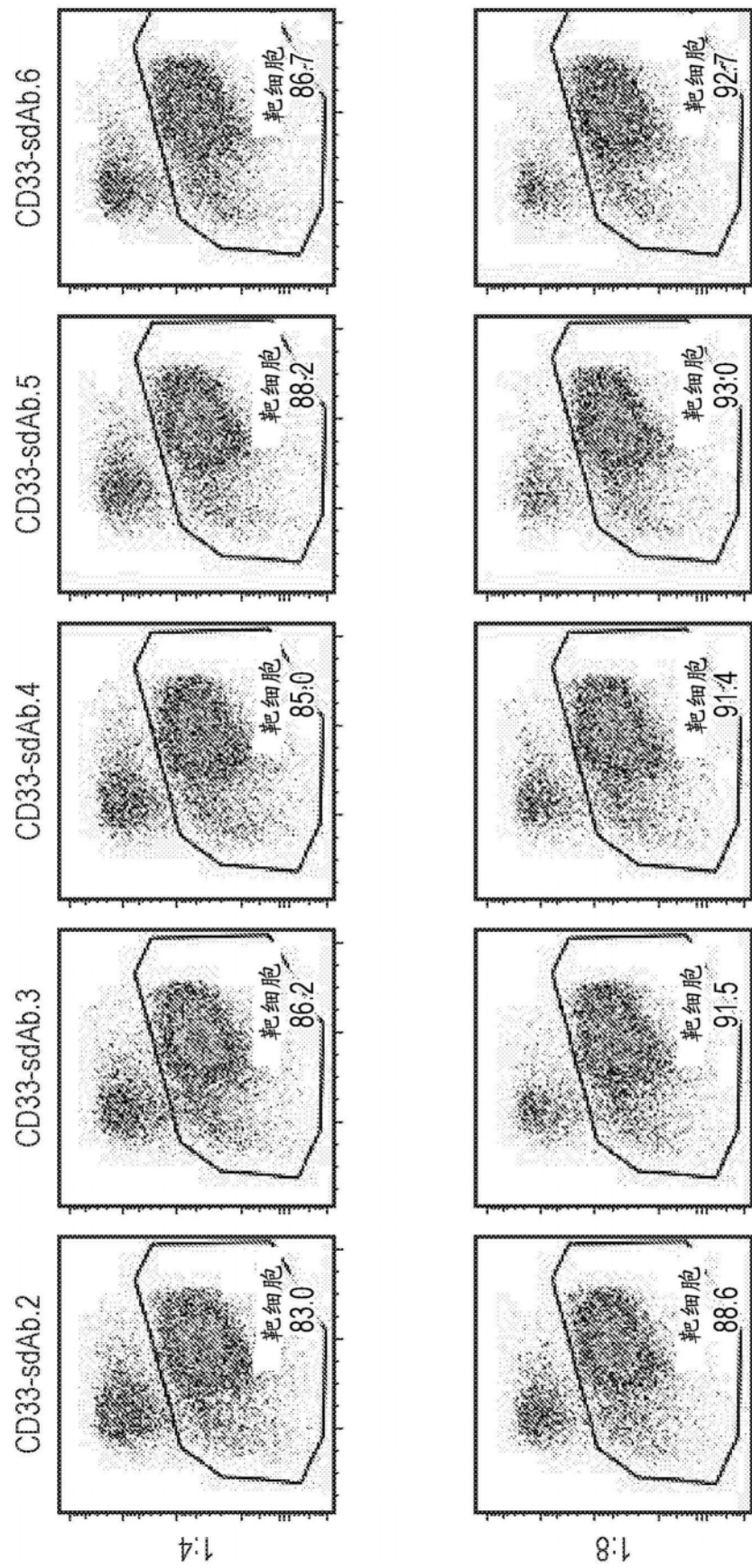


图8(续)

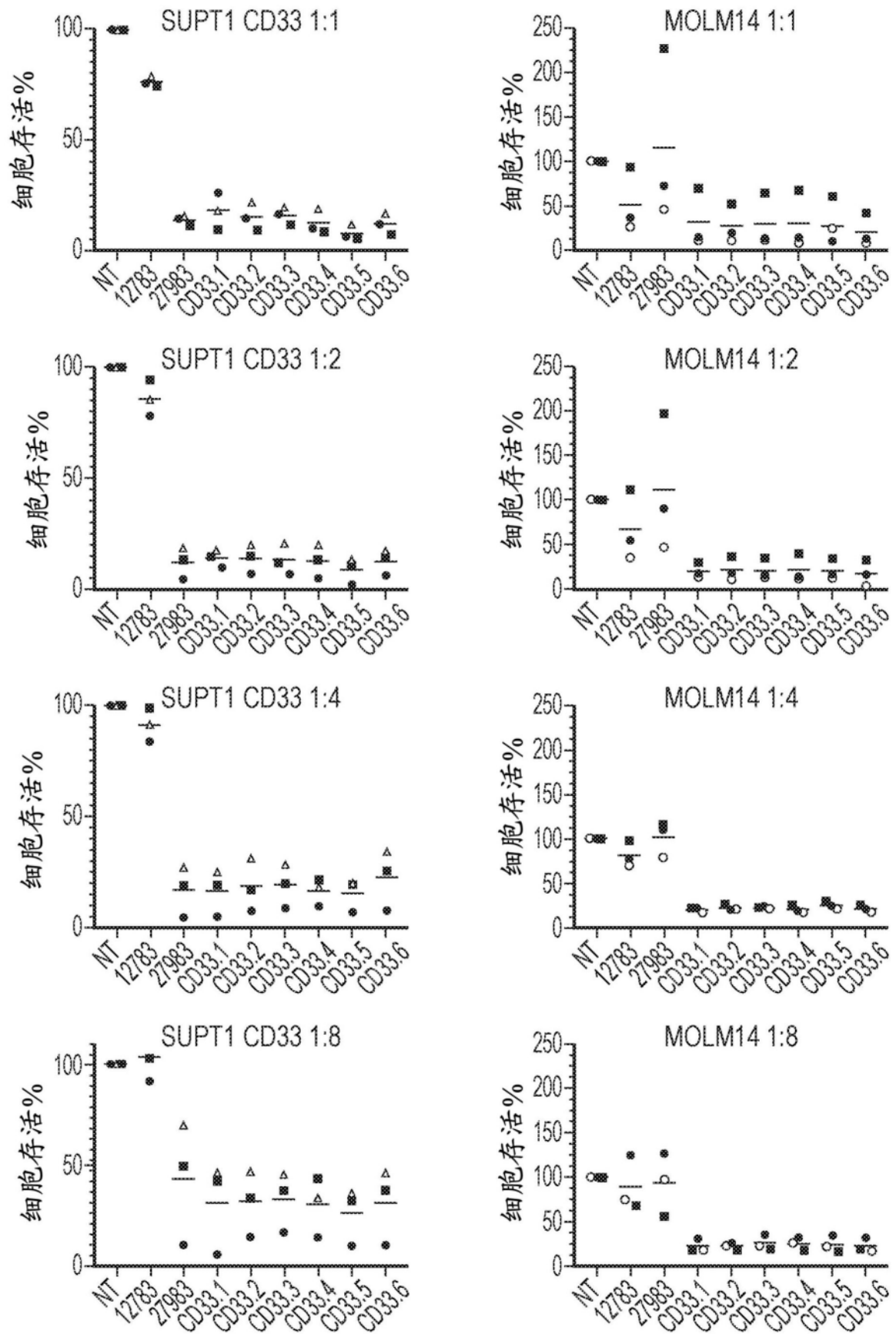


图9

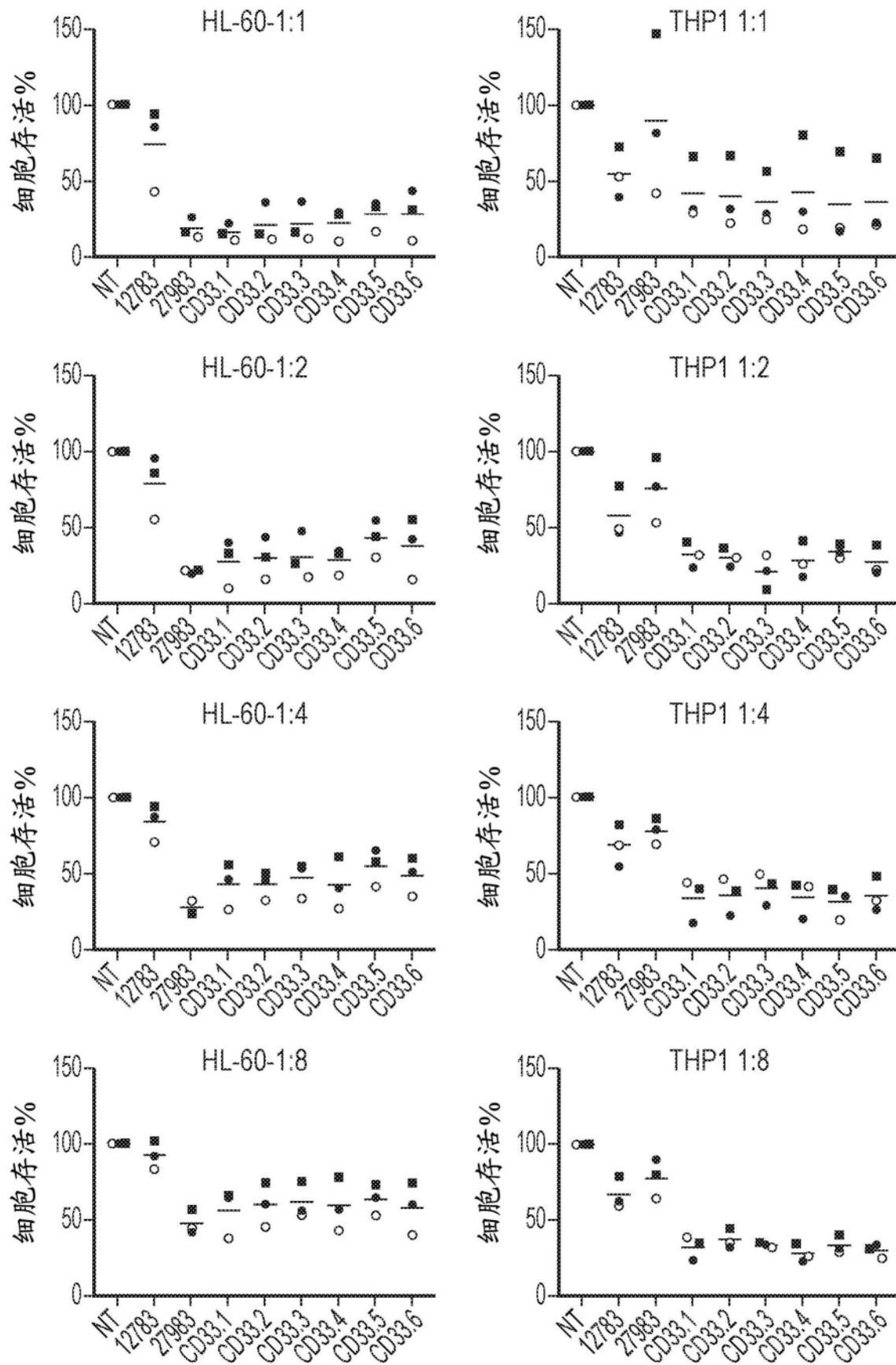


图9(续)

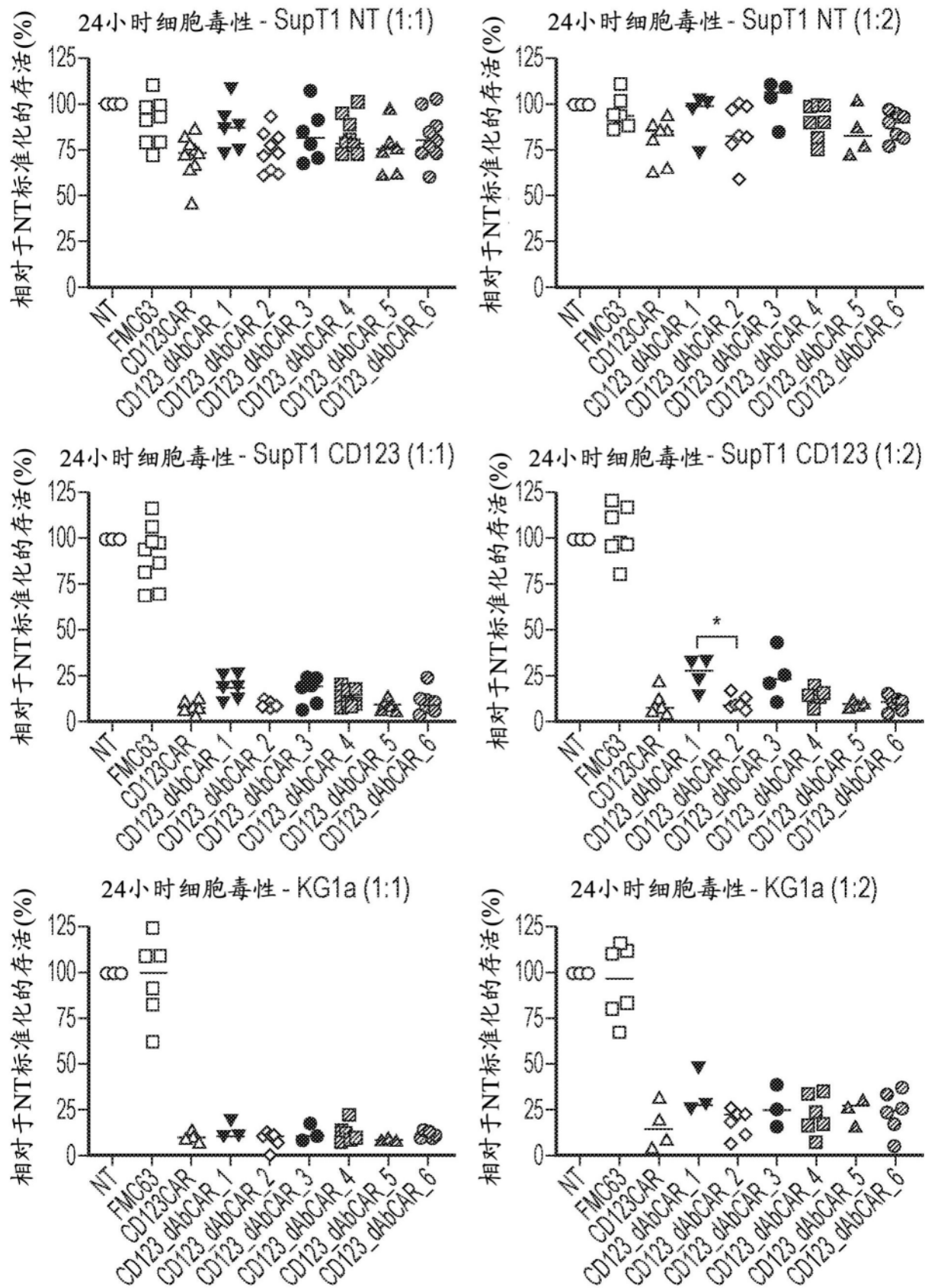


图10

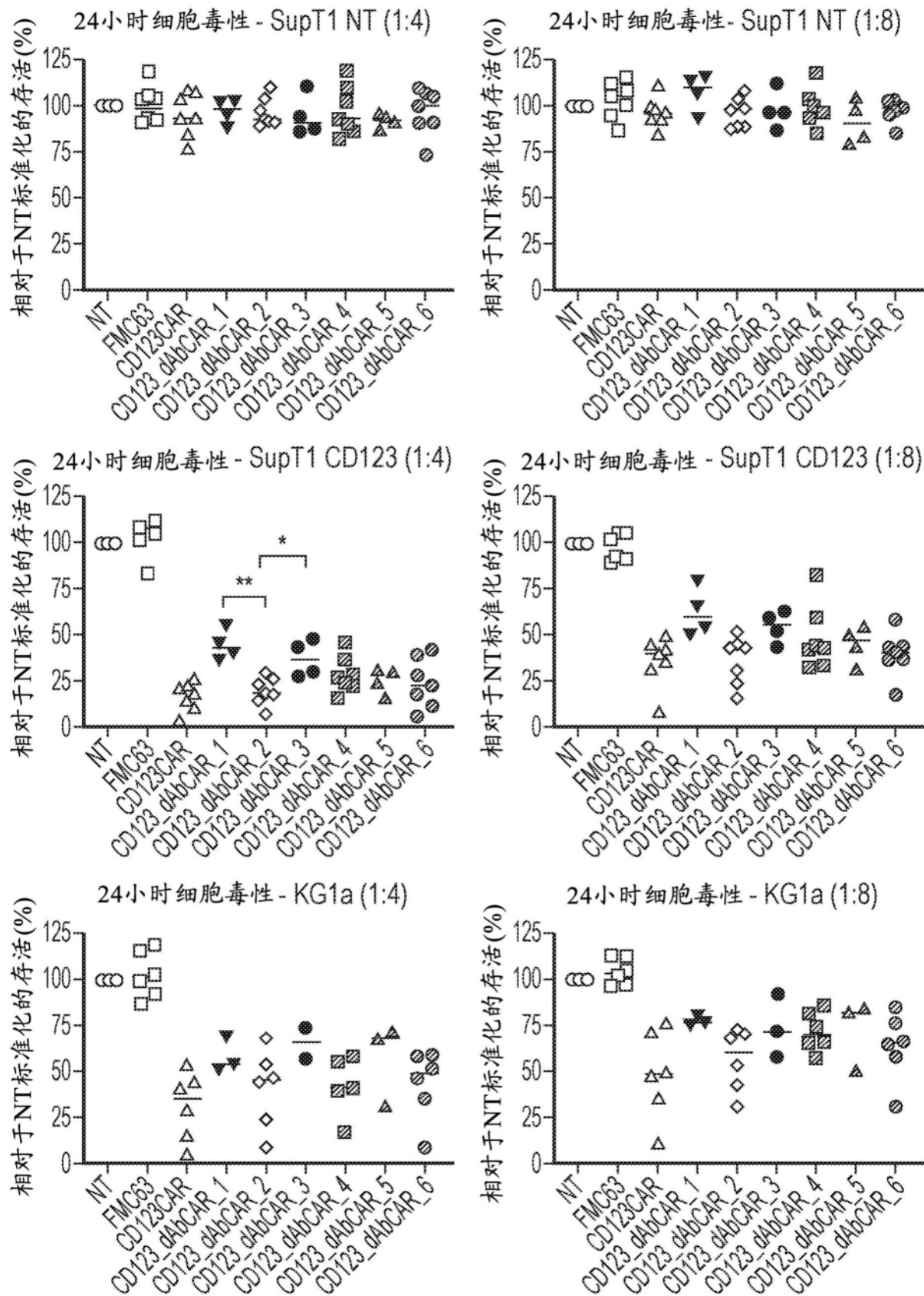


图10(续)

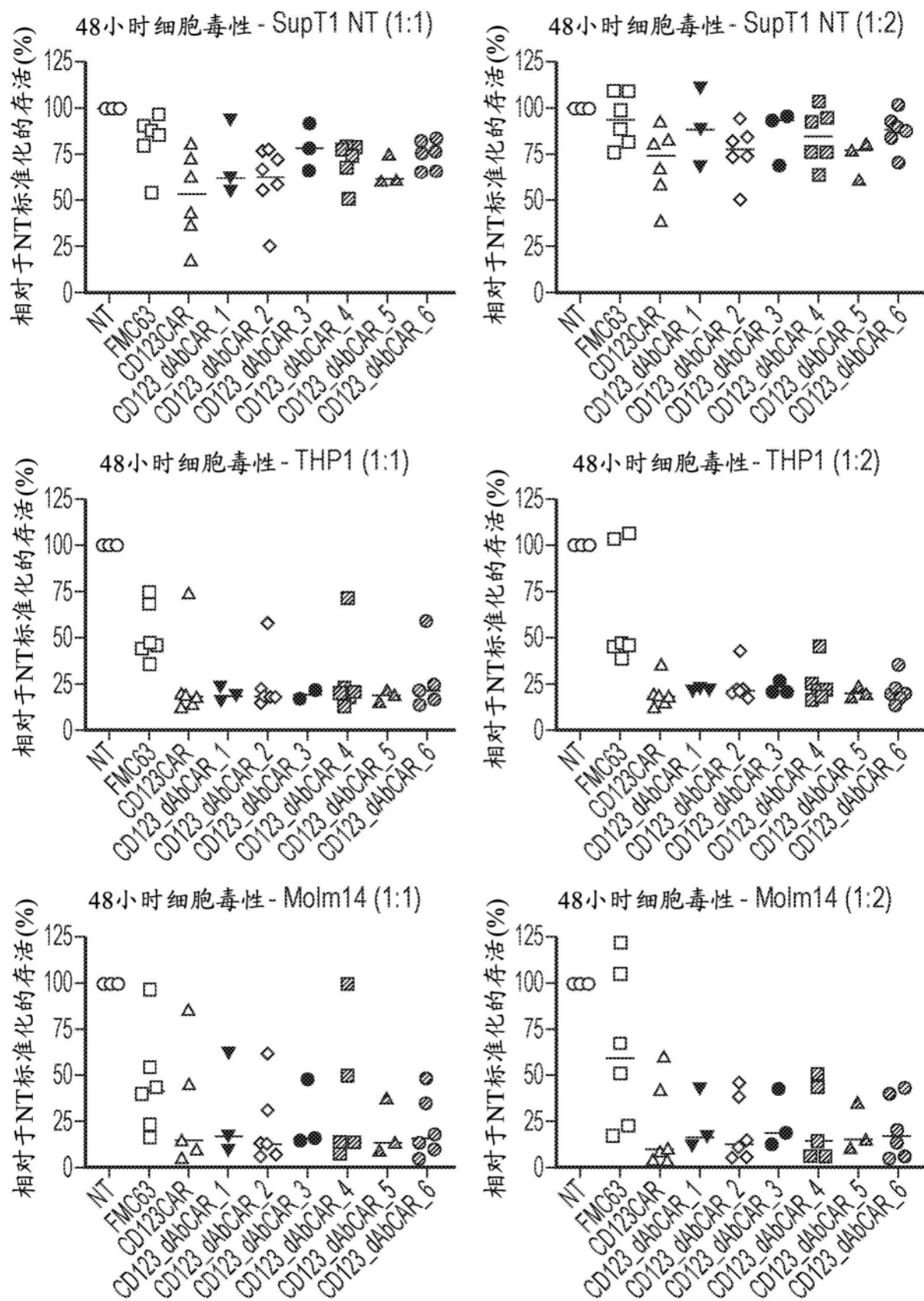


图11

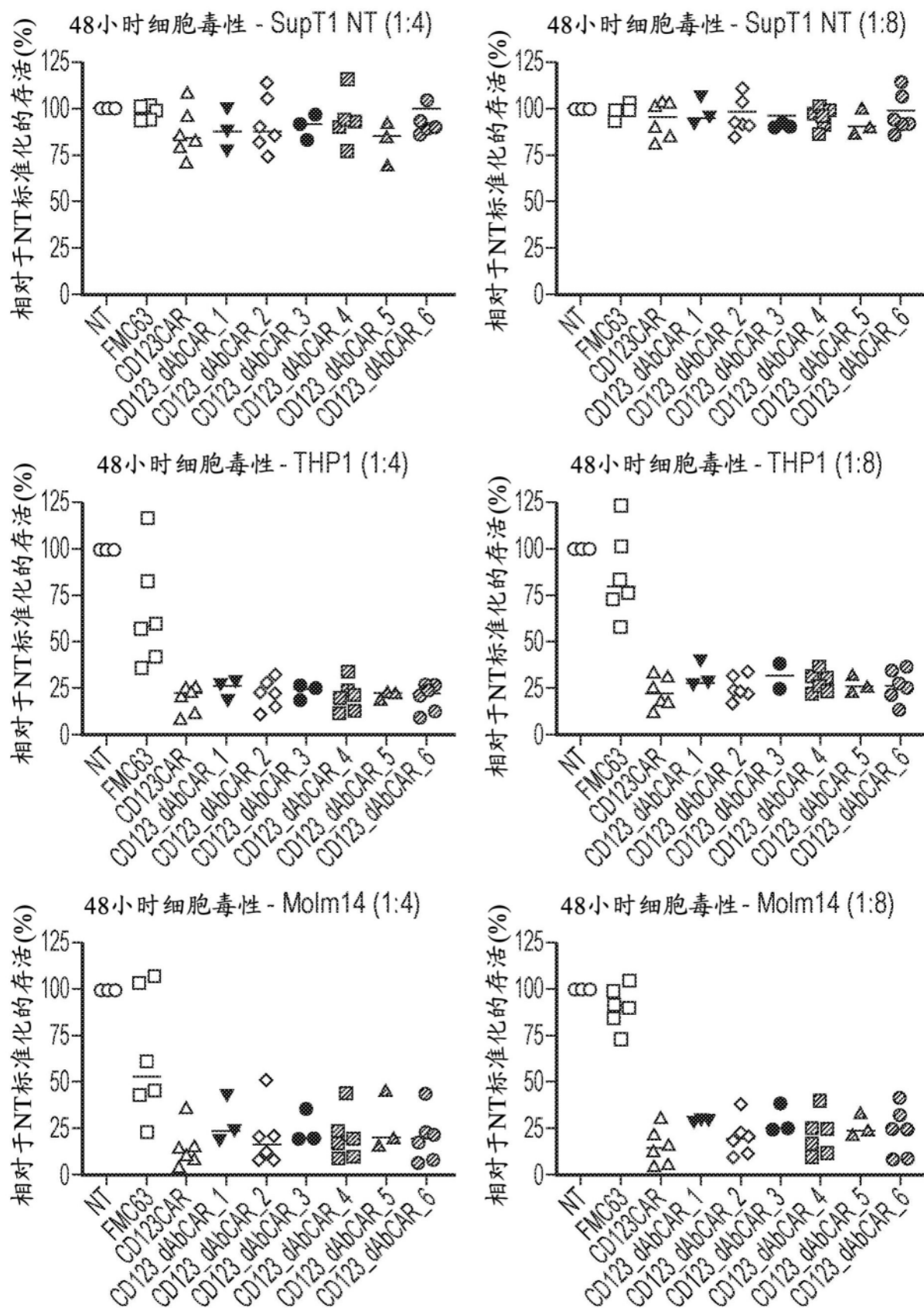


图11(续)

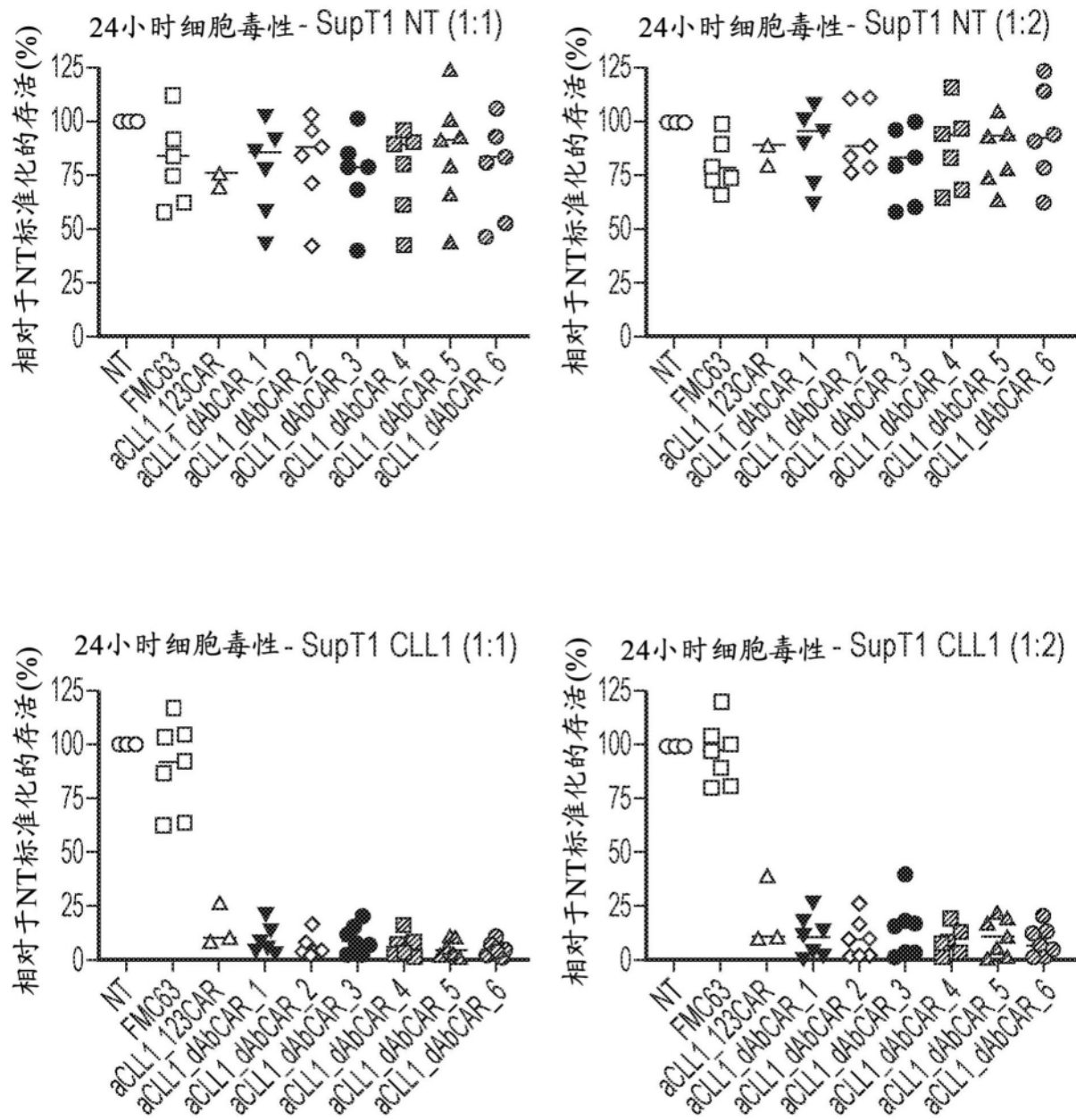


图12

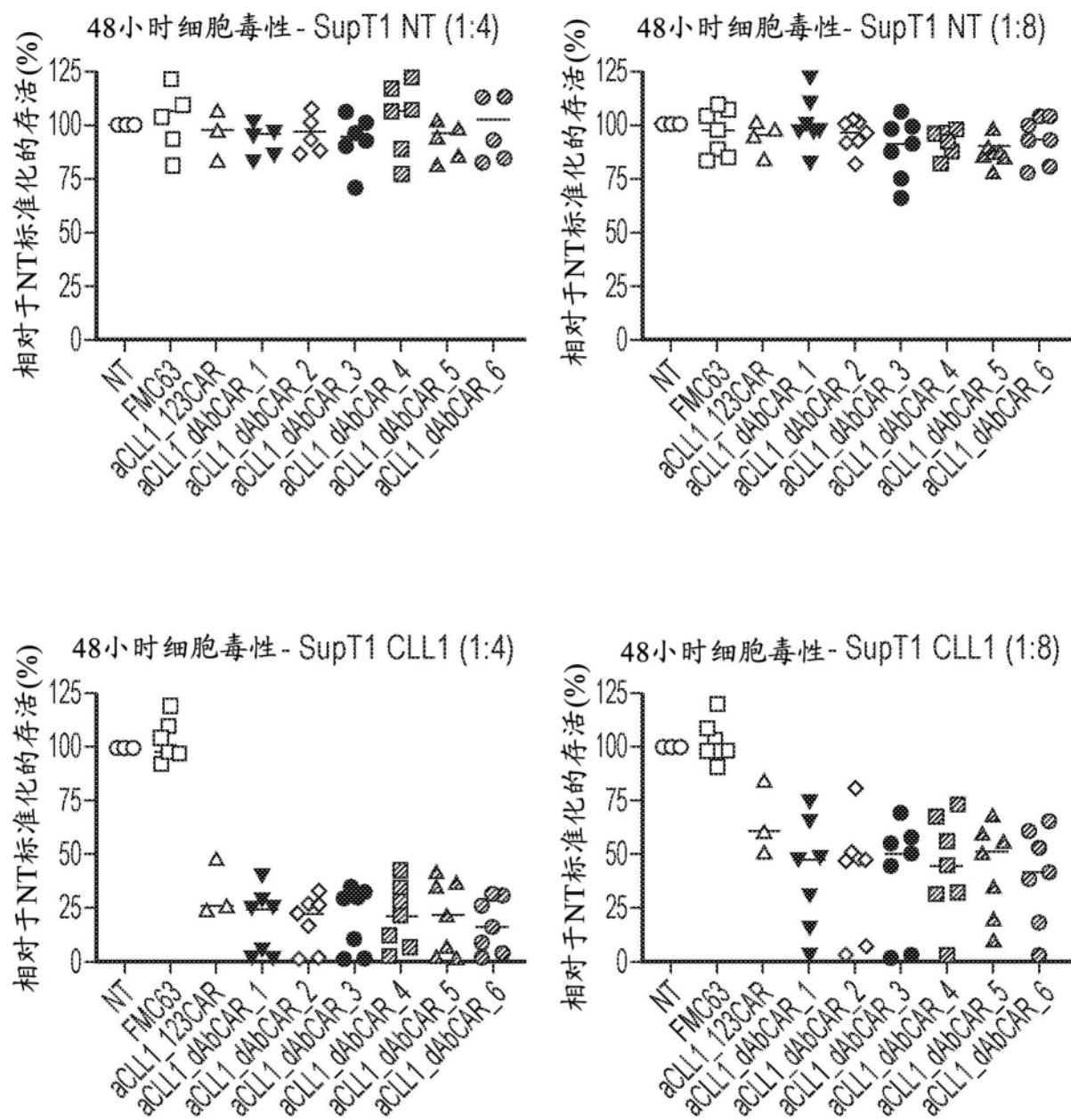


图12(续)

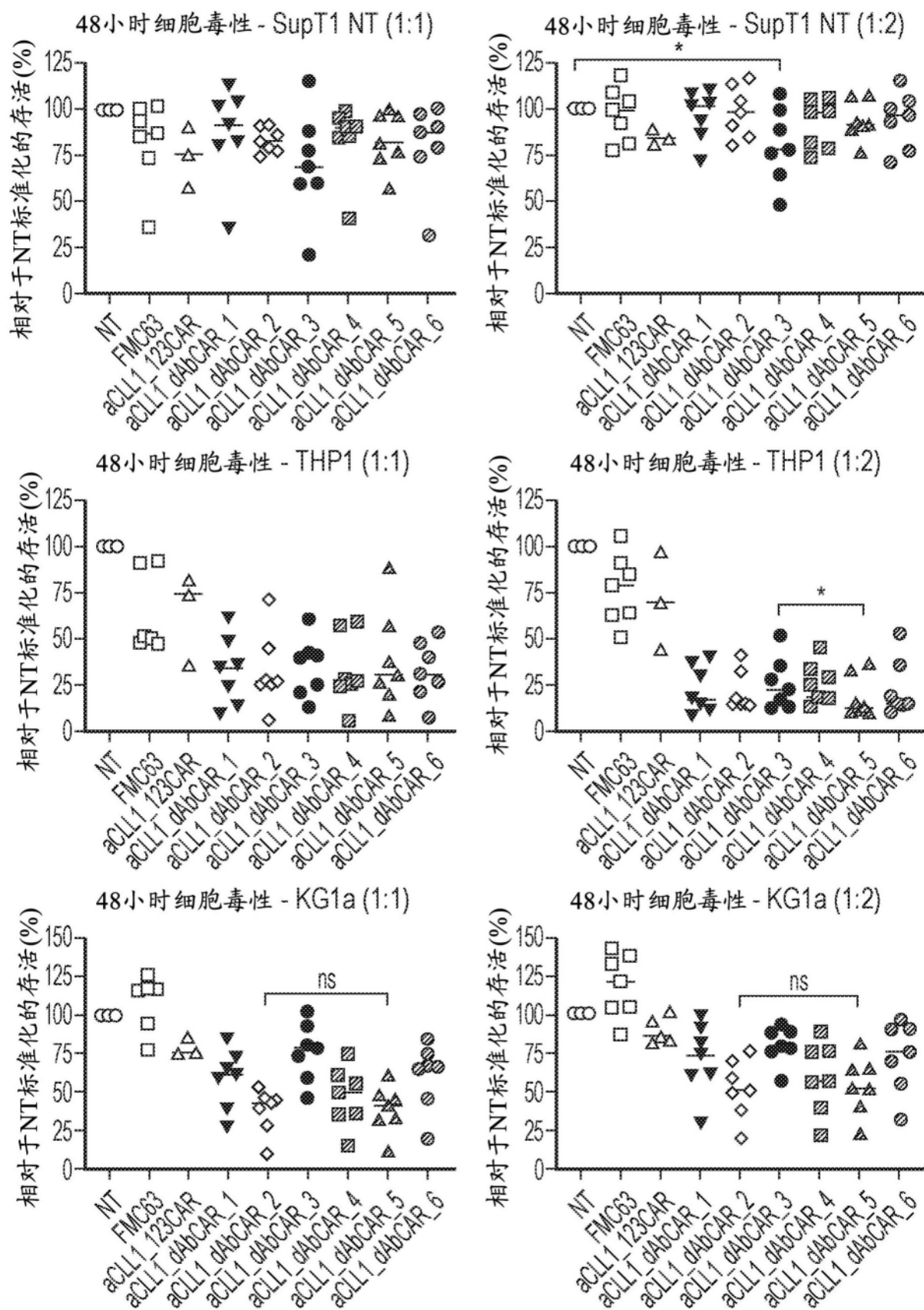


图13

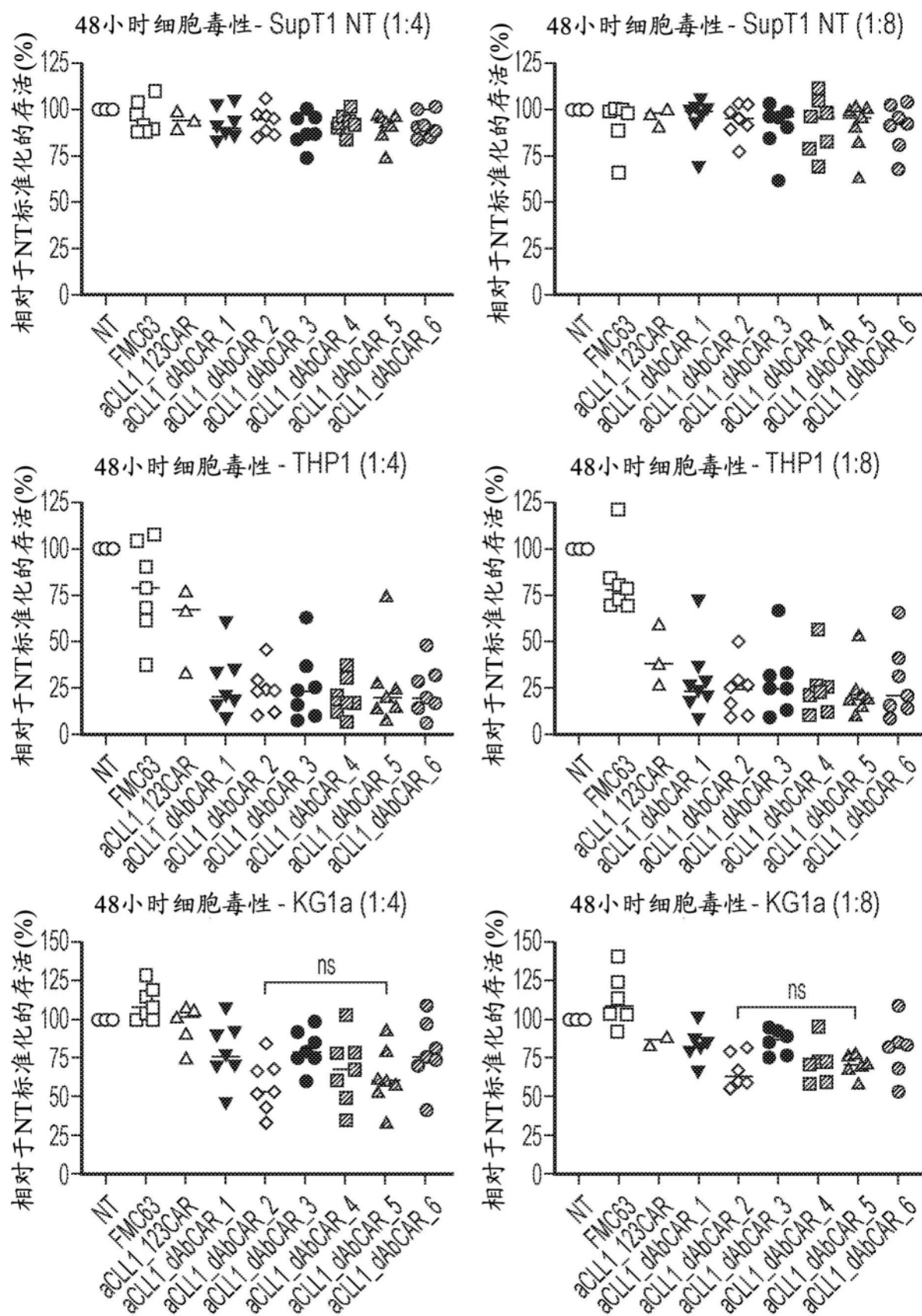


图13(续)

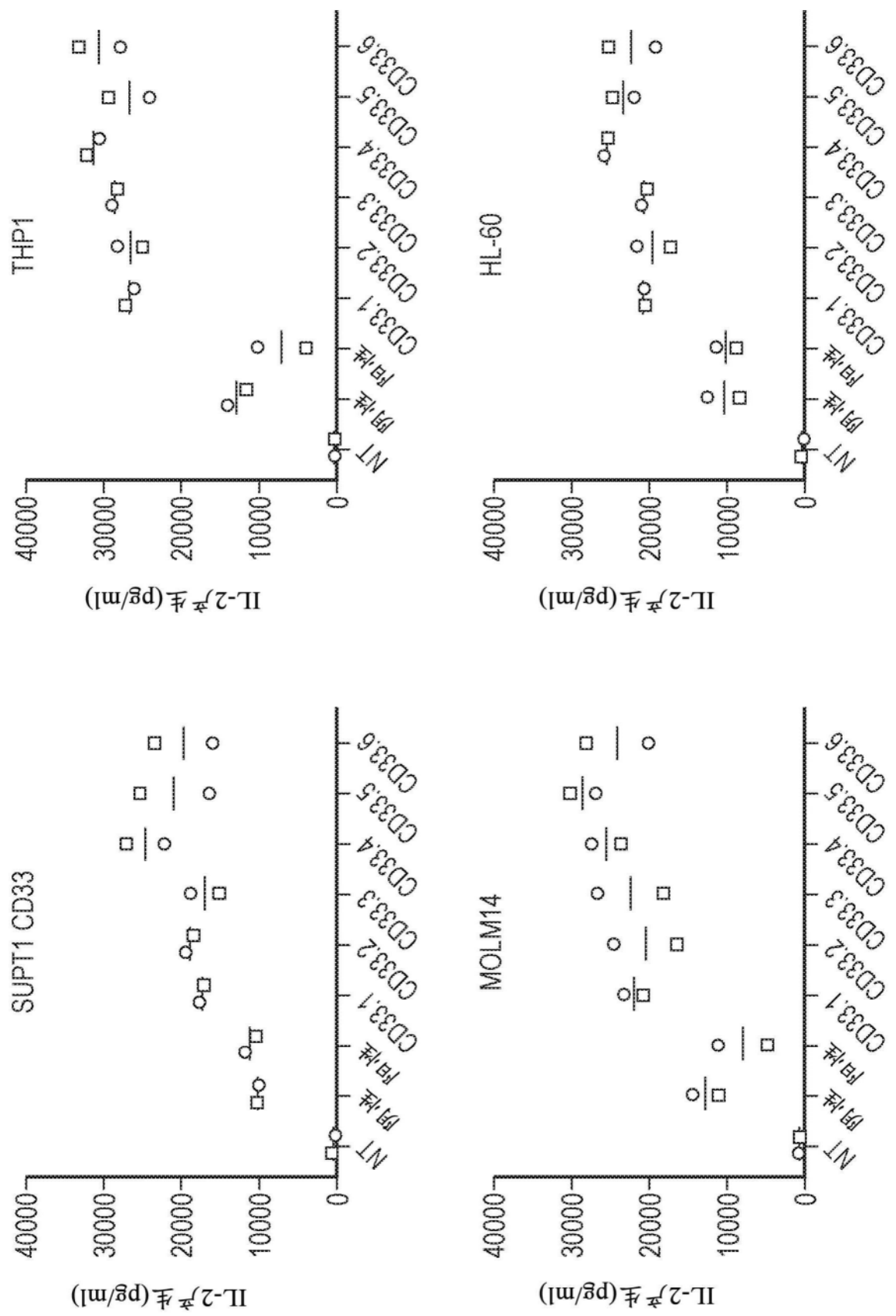


图14

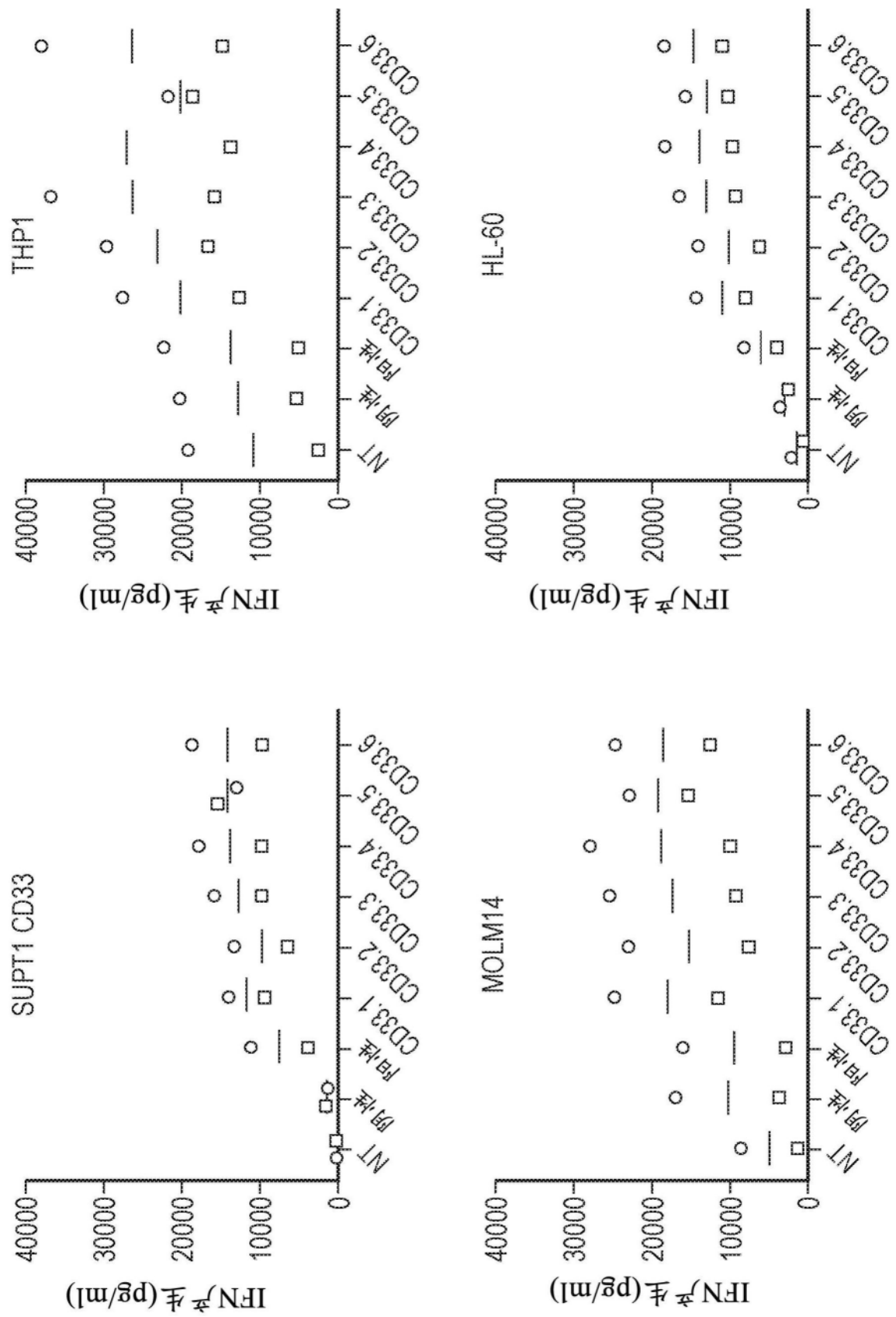


图15

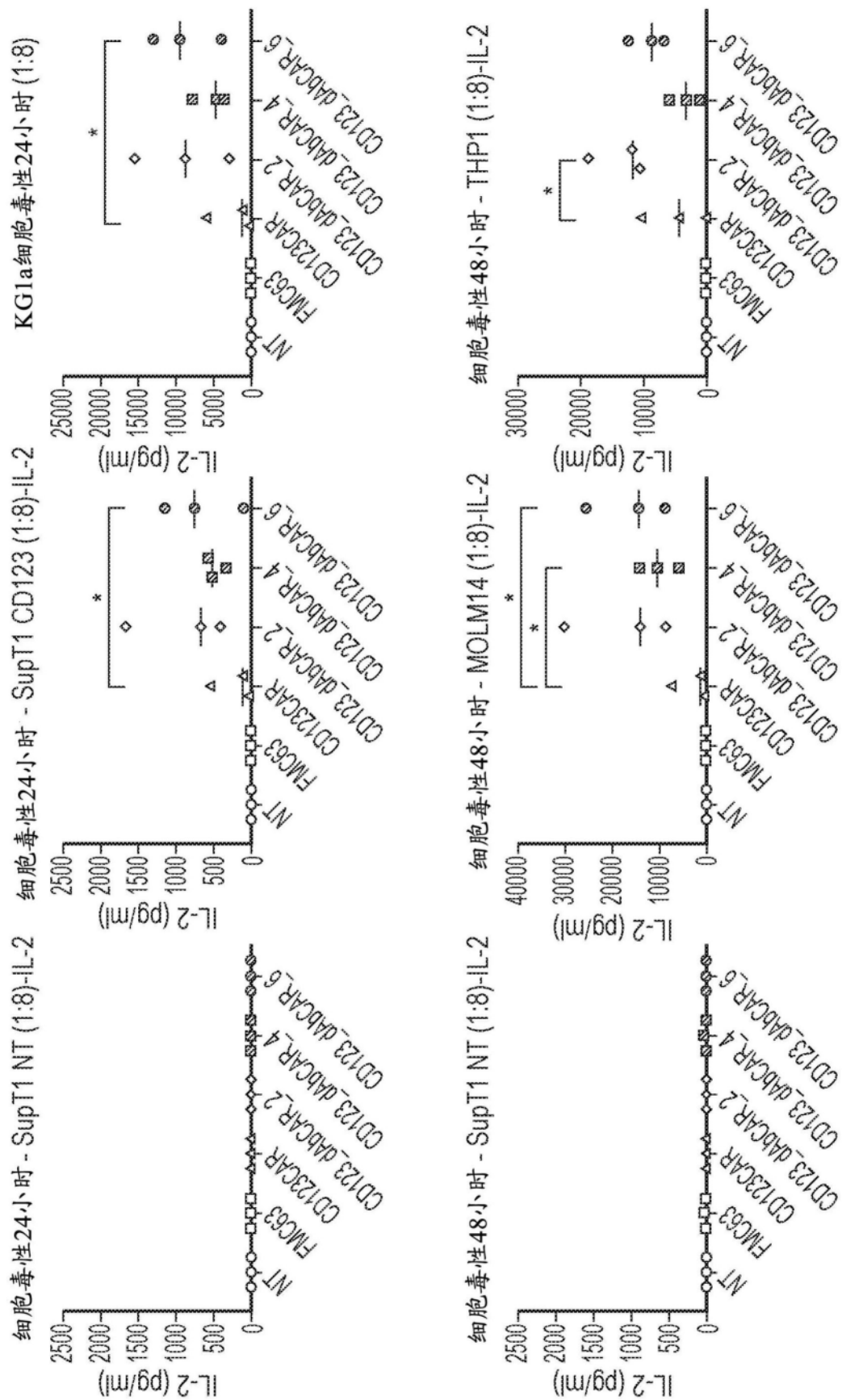


图16a

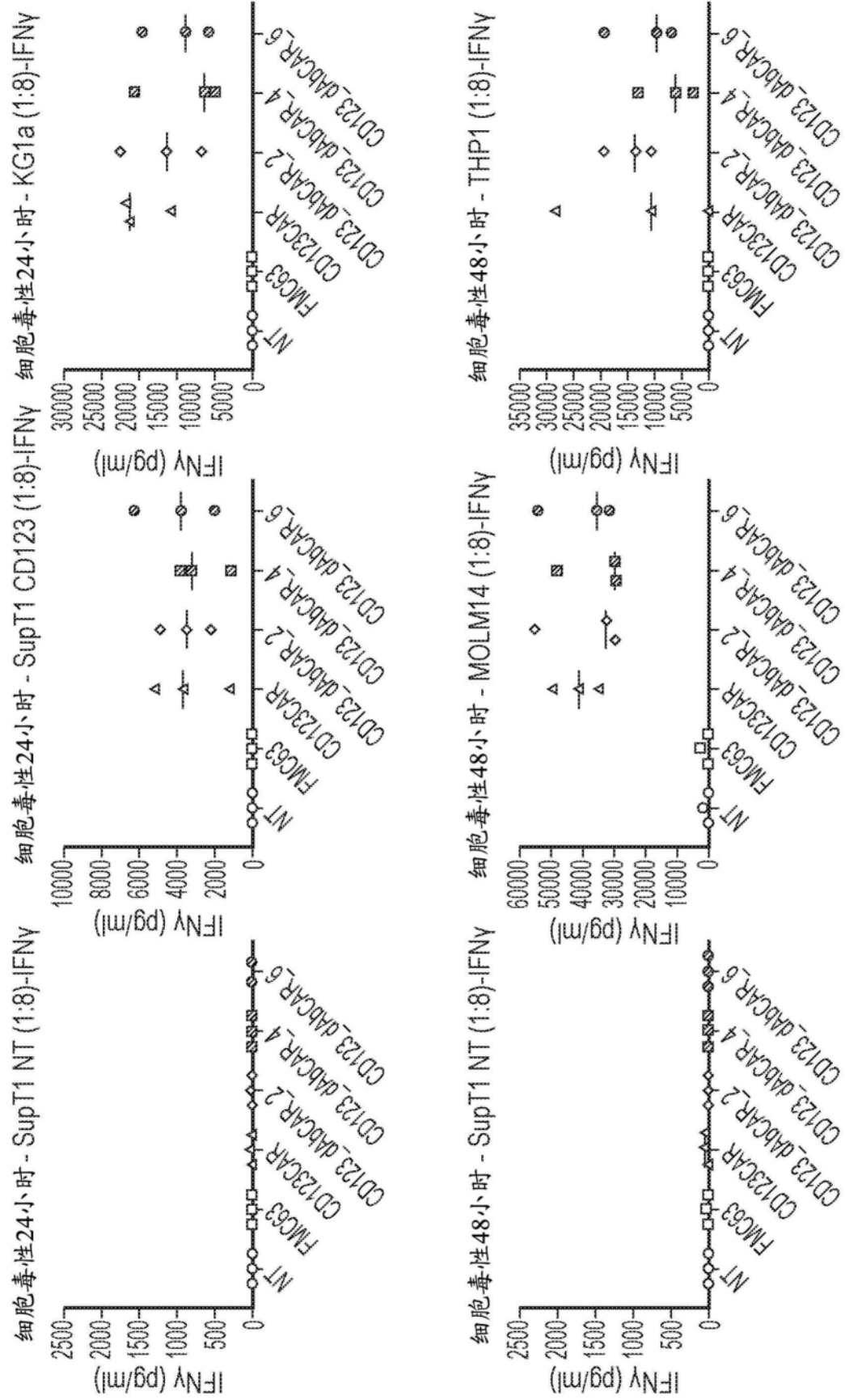


图16b

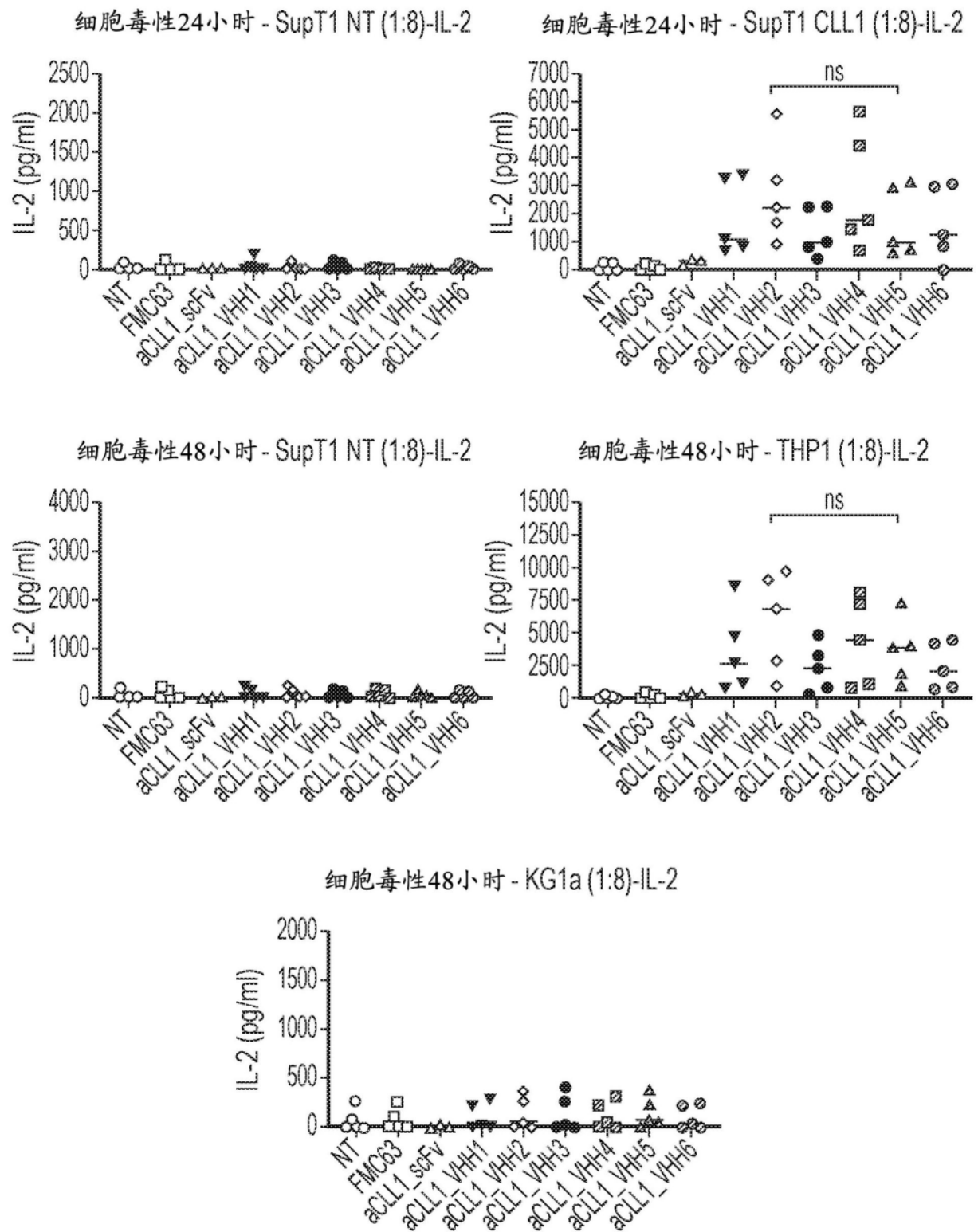


图17a

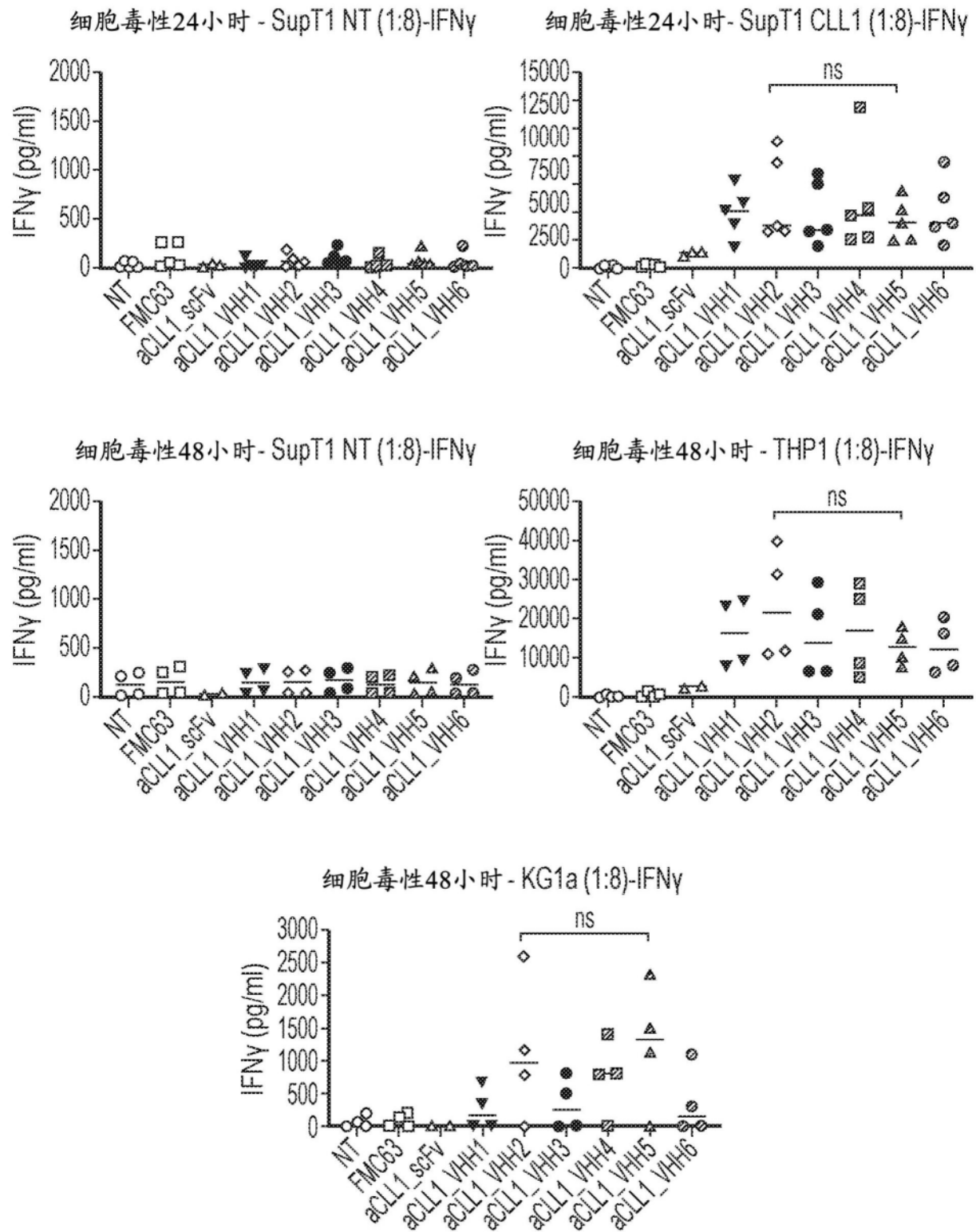


图17b

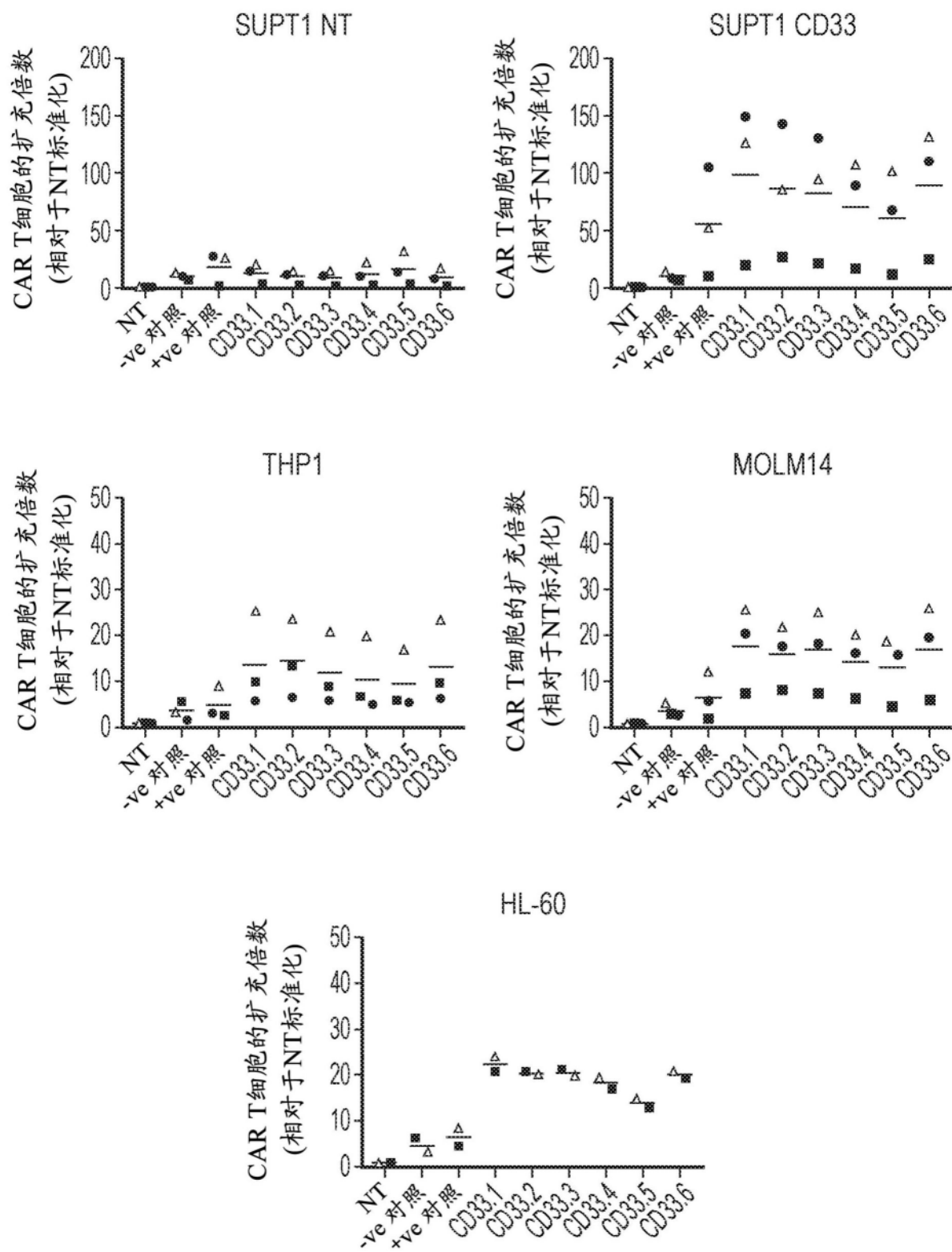


图18

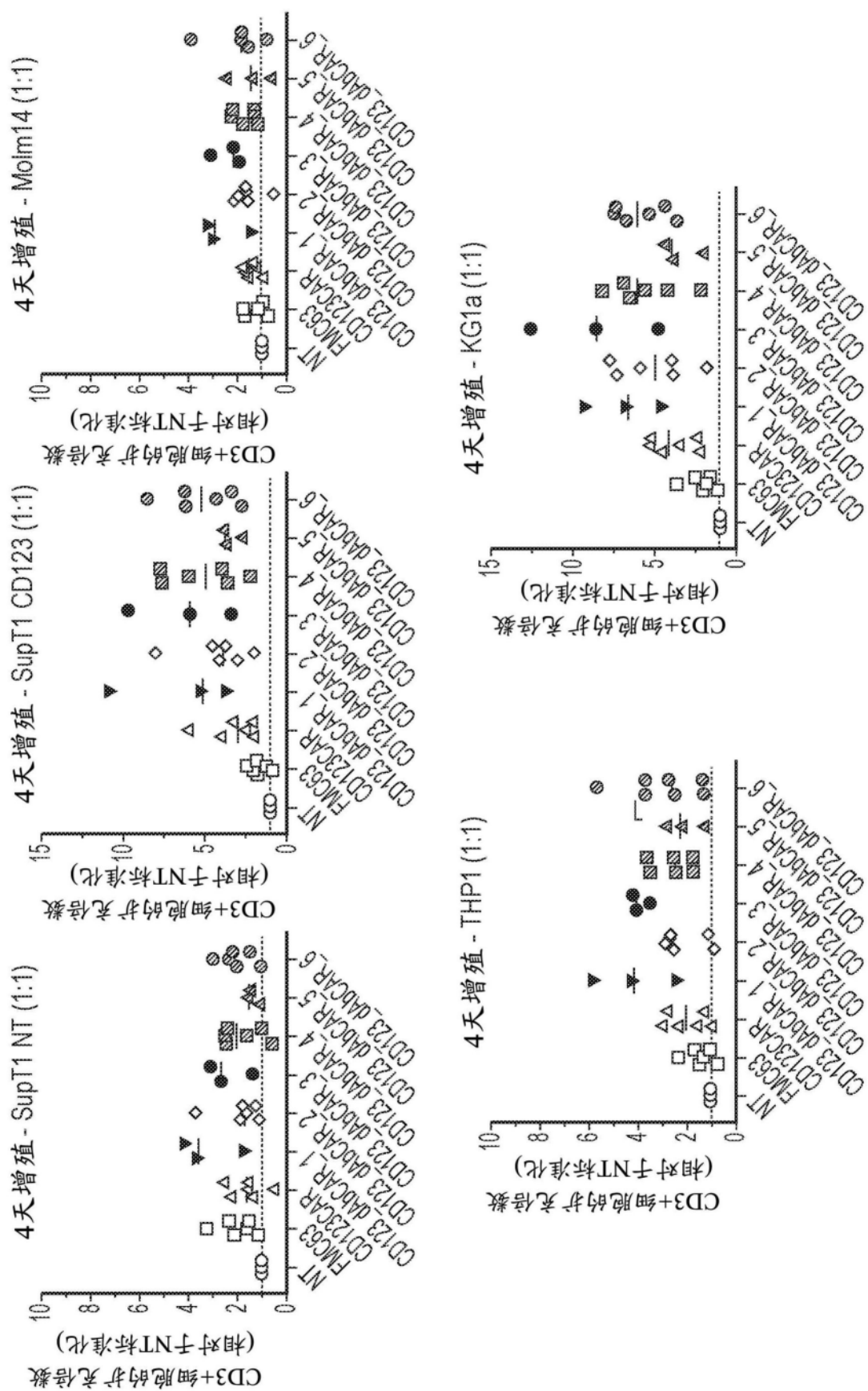


图19

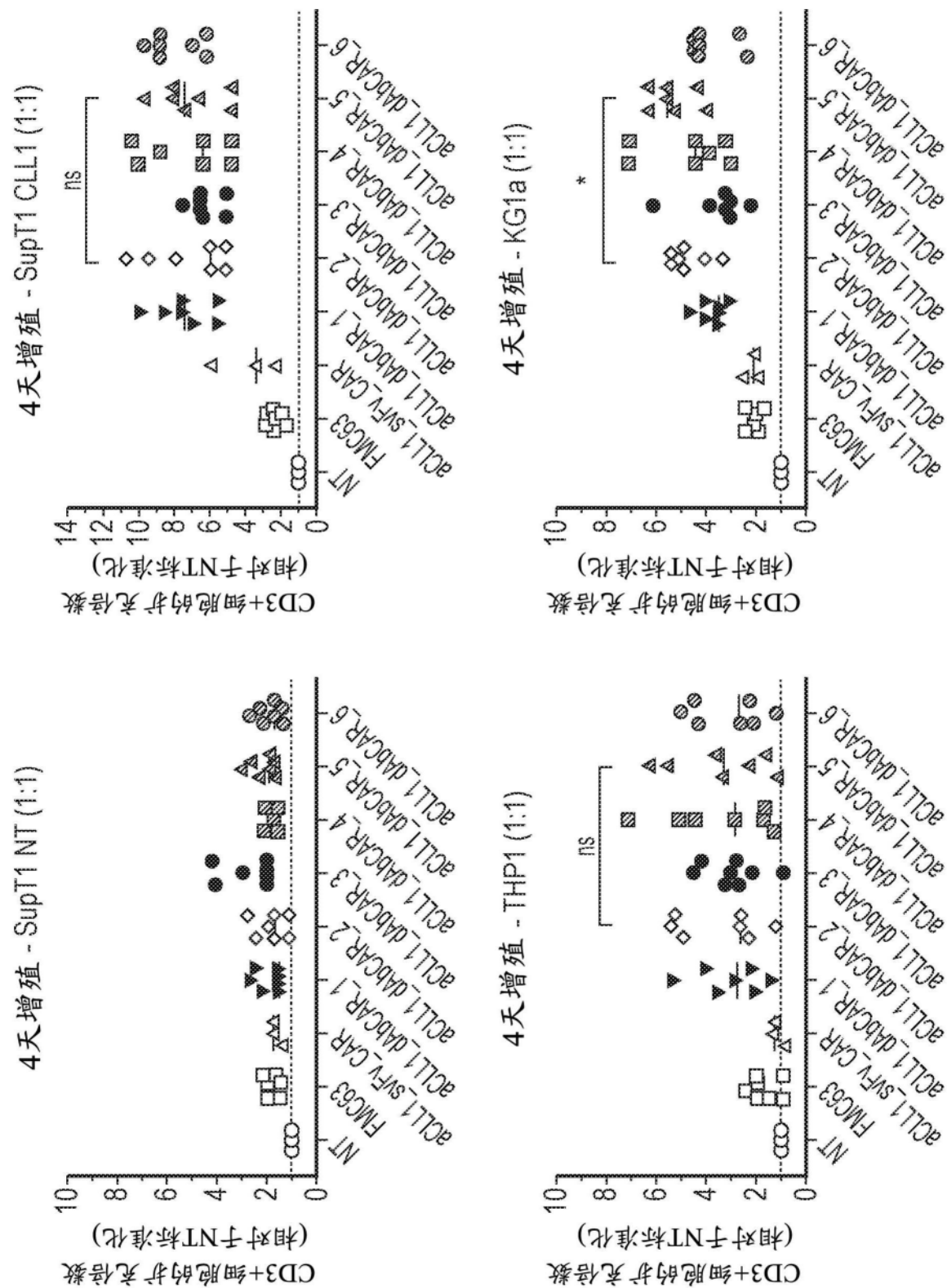


图20