



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108884164 B

(45) 授权公告日 2022.12.27

(21) 申请号 201780012682.X

(22) 申请日 2017.02.24

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108884164 A

(43) 申请公布日 2018.11.23

(30) 优先权数据  
16020057.2 2016.02.25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/019301 2017.02.24

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/147383 EN 2017.08.31

(73) 专利权人 细胞医学瑞士公司

地址 瑞士,施利伦

专利权人 北卡罗来纳大学教堂山分校

(72) 发明人 G·多蒂 E·兰多尼  
A·沙姆谢夫 T·克雷兹施玛  
M·德罗斯特 D·菲利普斯

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 王永伟 赵蓉民

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 35/17 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)

审查员 丁海

权利要求书3页 说明书28页  
序列表22页 附图13页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的经修饰细胞

(57) 摘要

本发明涉及表达如T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 等抗原受体以及靶向PD-L1的抗体的工程化免疫细胞。还提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的相关核酸、载体、组合物和方法。

1. 一种工程化免疫细胞,其表达:
  - i) 抗原受体,以及
  - ii) 结合PD-L1的抗体;其中所述抗体包括:
  - i) SEQ ID NO:2的可变重链(VH),和
  - ii) SEQ ID NO:1的可变轻链(VL)。
2. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体抑制PD-L1与CD80和PD-1两者的相互作用。
3. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体是人源化的。
4. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述免疫细胞是T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、或自然杀伤(NK)细胞。
5. 根据权利要求4所述的工程化免疫细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T淋巴细胞、炎性T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。
6. 根据权利要求4所述的工程化免疫细胞,其中所述T细胞是CD4+细胞或CD8+细胞或CD4+细胞和CD8+细胞的混合群体。
7. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗原受体是CAR,所述CAR包括胞浆域、跨膜域以及胞外域。
8. 根据权利要求7所述的工程化免疫细胞,其中所述跨膜域是CD3 $\zeta$ 跨膜域、CD4跨膜域、CD28跨膜域、CD8 $\alpha$ 跨膜域、或4-1BB跨膜域。
9. 根据权利要求7所述的工程化免疫细胞,其中所述CAR另外包括一个或多个共刺激域。
10. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗原受体是TCR,并且其中所述TCR是内源TCR或工程化TCR。
11. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗原受体是重组表达的。
12. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体是全长免疫球蛋白。
13. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体包括功能Fc域。
14. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体包括Fc域,所述Fc域被修饰为使其不诱导细胞毒性免疫应答或补体活化。
15. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体不包括Fc域。
16. 根据权利要求15所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体是选自由以下组成的群组的抗体片段:scFv和Fv片段。
17. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体以低于100pM的KD结合人类PD-L1。
18. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体包括SEQ ID NO:9。
19. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗体由所述细胞分泌或在所述细胞的表面上表达。
20. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞另外表达一种或多种细胞因

子,其中所述细胞因子是人类细胞因子,并且其中所述人类细胞因子是IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21和/或MIP-1 $\alpha$ 。

21. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述抗原受体结合到由肿瘤或病原体表达或源自于肿瘤或病原体的抗原,其中所述抗原是GD2。

22. 一种对根据前述权利要求中任一项所述的抗原受体和抗体进行编码的核酸。

23. 一种表达载体,其包括对根据权利要求1所述的抗体进行编码的核酸。

24. 根据权利要求23所述的表达载体,所述表达载体是慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、质粒载体、转座子载体、或人工染色体载体。

25. 根据权利要求23所述的表达载体,所述表达载体是多顺反子载体,其中所述多顺反子载体是双顺反子载体。

26. 根据权利要求25所述的表达载体,其包括至少一个IRES序列和/或至少一个自切割序列,其中所述自切割序列是2A序列。

27. 根据权利要求26所述的表达载体,其另外包括安全开关,其中所述安全开关是诱导性自杀开关。

28. 一种包括根据权利要求22所述的核酸的克隆载体。

29. 一种产生根据权利要求1到21中任一项所述的免疫细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供免疫细胞,

(b) 将至少一个对所述抗原受体进行编码的核酸和至少一个对所述抗体进行编码的核酸引入到所述细胞中;以及

(c) 通过所述细胞表达所述核酸。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中步骤(b)包括将根据权利要求23-27所述的表达载体引入到所述细胞中。

31. 根据权利要求29所述的方法,其另外包括以下步骤:

(i) 将至少一个与根据权利要求29所述的抗原受体具有不同抗原特异性的其它抗原受体引入到所述细胞中;和/或将至少一个与根据权利要求29所述的抗体具有不同抗原特异性的其它抗体引入到所述细胞中。

32. 一种药物组合物,其包括:

i) 有效量的根据权利要求1到21中任一项所述的工程化免疫细胞或根据权利要求23到27中任一项所述的表达载体,以及

ii) 药学上可接受的赋形剂。

33. 根据权利要求32所述的药物组合物,其用于疗法中。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物,其中疗法与选自由以下组成的群组的一种或多种疗法组合:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法以及放射疗法。

35. 根据权利要求1至21中任一项所述的工程化免疫细胞、权利要求23至27中任一项所述的表达载体或权利要求32所述的药物组合物在制造治疗癌症恶化前或恶性癌症病况的药物中的应用。

36. 一种用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包括

根据权利要求1到21中任一项所述的工程化免疫细胞或根据权利要求23到27中任一项所述的表达载体,以及  
书面使用说明。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其另外包括安全开关的诱导剂,其中所述安全开关的诱导剂是诱导性自杀开关。

38. 根据权利要求9所述的工程化免疫细胞,其中所述CAR另外包括一个或多个共刺激域,其中所述共刺激域是CD28、4-1BB (CD137)、ICOS或OX40 (CD134)。

## 用于免疫疗法的经修饰细胞

### 技术领域

[0001] 本公开总体上涉及表达抗原受体和阻断PD-L1的抗体的工程化细胞以及使用所述工程化细胞治疗癌症和其它障碍的方法。

### 背景技术

[0002] 使用如T细胞、NK细胞或NKT细胞等抗原特异性免疫细胞进行的免疫疗法提供了用于治疗不同类型的疾病、例如癌症的一种有前景的方式。

[0003] 一种治疗策略是通过将免疫细胞工程化以表达嵌合抗原受体 (CAR), 所述CAR特异性地靶向肿瘤细胞并且通常包括源自于例如T细胞受体CD3- $\zeta$ 链的细胞外抗原识别域、跨膜域以及细胞内信号传导域。信号传导域可以链接到一个或多个共刺激分子胞内域。

[0004] 仍另一种方式是将具有指定特异性的抗原特异性T细胞受体 (TCR) 转移到免疫细胞中。

[0005] 由于这种基因修饰后免疫细胞能够流通到疾病位点、能够扩增并且甚至是在单剂量施用之后能够持续, 所以基于细胞的免疫疗法相比于当前可获得的基于单克隆抗体的免疫疗法具有主要优势。

[0006] 癌症细胞利用各种途径以避免免疫系统。PD-L1经常在肿瘤细胞上表达并且保护肿瘤细胞免于通过与PD-1结合进行的T细胞介导破坏。PD-L1的水平上调与肿瘤侵袭性增加以及死亡风险增加相关。

[0007] 动物研究表明, 通过单克隆抗体阻断PD-L1:PD-1相互作用提高了T细胞活化并且降低了肿瘤进展。在临床环境中, 阻断PD-1或PD-L1的单克隆抗体已经在宽泛的一组癌症子类型中展现出了令人印象深刻的活性, 甚至是在疾病晚期和转移期 (Maute等人 (2015年), 24, 第112卷, 第47期, 第E6506到E6514页)。

[0008] 因此, 组合抗PD-L1抗体使用抗原特异性免疫细胞的治疗方式是有前景的。表达如TCR和/或CAR等抗原受体和针对PD-L1的抗体两者的免疫细胞的产生是特别有吸引力的, 因为在免疫细胞的作用位点处进行的抗体分泌将保护其免于灭活。此外, 这种局部抗体递送治疗方式相比于全身性方式具有的优势在于待施用的药物量以及潜在副作用。

[0009] W02014134165描述了嵌合抗原受体 (CAR) 和抗小鼠PD-1scFv在小鼠T细胞中的共表达。scFv源自于如US7,858,746中描述的亚美尼亚仓鼠抗PD-1抗体克隆J43。scFv构建体被克隆到表达靶向人类CD 19或人类MUC-CD的CAR的逆转录病毒主链中。使用对应构建体对原代小鼠T细胞进行了转导。

[0010] Suarez E. 等人,《肿瘤靶向 (Oncotarget)》, 2016年6月7日, 第7卷, 第23期, 第34341到34355页以及W02016100985两者均描述了靶向人类抗碳酸酐酶IX (CAIX) 并且分泌人类抗PD-L1抗体的装甲CART细胞。在肿瘤位点处进行的局部抗体递送导致了对免疫检查点途径的显著抑制。在小鼠模型中, 相比于单独的抗CAIX CAR T细胞, 肿瘤生长降低了5倍并且肿瘤重量降低了50%到80%。抗体属于IgG1同种型并且因此能够介导ADCC, 这导致了人类NK细胞在体内模型中募集到肿瘤位点。然而, 由于治疗剂尚未商业化, 所以仍然存在显

著的未被满足的医疗需求,即提供涉及到表达抗原受体和针对免疫检查点抑制剂的抗体两者的免疫细胞的有效组合疗法。

### 发明内容

[0011] 因此,一方面,本发明提供了一种工程化细胞,所述工程化细胞表达:

[0012] i) 抗原受体,以及

[0013] ii) 结合并阻断PD-L1的抗体。

[0014] 这种抗体可以是人源化抗体或完全人类抗体。在一些实施例中,所述抗体可以包括至少一个如SEQ ID NO:3、4、5、6、7和8中阐述的CDR序列或其变体。

[0015] 所述抗体优选地结合到PD-L1上的表位,使得PD-L1与CD80和PD-1两者的相互作用得到抑制。另外,对于PD-1,PD-L1结合到在T细胞和B细胞上表达的膜受体CD80,但是PD-L1对CD80的结合亲和力远低于PD-1。PD-L1结合到PD-1或CD80向T淋巴细胞传输抑制信号,从而抑制T细胞迁移、增殖以及细胞毒性介体的分泌并且降低肿瘤细胞杀伤。然而,在PD-1/PD-L1相互作用驱动T细胞耗尽的同时,PD-L1/CD80相互作用驱动T细胞无能。这些是独特的过程,因为耗尽在几周或几个月的时期内是进行性的并且取决于慢性抗原刺激,而无能是在不存在适当共刺激的情况下在抗原刺激之后迅速诱导的。

[0016] 优选地,所述细胞是治疗细胞。适当的细胞可以例如是T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、人类胚胎干细胞、或造血干细胞(HSC)或诱导性多能干细胞(iPS)。本文提供了表达抗原受体和抗体的工程化免疫细胞。

[0017] 在一个实施例中,所述细胞是T细胞。这种T细胞可以是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T淋巴细胞、炎性T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞或者 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。

[0018] 在一个实施例中,所述细胞是NKT细胞。

[0019] 在一个实施例中,所述细胞起源于人类。在一个实施例中,所述细胞是自体的;在一个实施例中,所述细胞是同种异体的。

[0020] 在一个实施例中,所述抗原受体特定于癌症抗原,例如仅在癌症细胞上表达且在癌症细胞上调的抗原。

[0021] 在一个实施例中,所述抗原受体是T细胞受体,例如原生T细胞受体(例如,被刺激成特定于抗原或针对其对抗原的特异性而被选择)或工程化T细胞受体。

[0022] 在一个实施例中,所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[0023] 在一个实施例中,所述抗原受体是膜锚定的。

[0024] 在一个实施例中,根据本公开的免疫细胞可以包括TCR和CAR,例如原生TCR和CAR(特别是特定于癌症抗原)。可替代地,本公开的免疫细胞(如NK细胞)可以包括工程化TCR和CAR。

[0025] 本文所述的示例性工程化免疫细胞相比于仅表达抗原受体的工程化免疫细胞显示出增强的肿瘤杀伤活性。例如,相比于仅对抗原受体进行编码的细胞,对抗原受体和抗PD-L1抗体两者进行编码的相应免疫细胞可以在更长的时间段内杀死癌症细胞。因此,根据本公开的细胞较不容易遭受耗尽,特别是在肿瘤微环境中。

[0026] 进一步提供了一种对如本文所述的抗原受体和抗体进行编码的核酸,以及包括这种核酸的载体。

- [0027] 还提供了产生如本文所述的免疫细胞的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0028] (a) 提供免疫细胞,
- [0029] (b) 将至少一个对所述抗原受体进行编码的核酸和至少一个对所述抗体进行编码的核酸引入到所述细胞中;以及
- [0030] (c) 通过所述细胞表达所述核酸。
- [0031] 另外提供了药物组合物,所述药物组合物包括:
- [0032] i) 本文所述的工程化免疫细胞或表达载体的有效量,以及
- [0033] ii) 药学上可接受的赋形剂。
- [0034] 还提供了如本文所述的工程化免疫细胞、表达载体或药物组合物在疗法中的用途。另外提供了治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括:
- [0035] (a) 提供如本文所述的重组免疫细胞;
- [0036] (b) 将所述免疫细胞施用给所述受试者。
- [0037] 相比于如对工程化免疫细胞和纯化检查点抑制剂抗体的组合使用等替代方案,本发明提供了大量益处。在试图组合检查点抑制剂抗体使用工程化免疫细胞时,熟练的从业者将认识到抗体递送的定时是一个关键因素。此外,抗体的局部浓度也很重要。当在抗原受体表达细胞(效应细胞)与其靶细胞之间、例如在肿瘤位点处建立细胞接触时,应当存在提供保护功能的抗体。对于医疗从业者来说,实际上不可能确定例如通过输注对传统抗体配制品的全身性抗体施用的精确定时以在必要的癌症位置提供抗体。此外,全长抗体通常不能够跨过血脑屏障。因此,对传统(即,全长)抗体配制品的全身性递送通常将不会到达脑中的癌症。因此,以高剂量全身性地施用抗体,由此增加了副作用的可能性。相比而言,即时治疗方式提供了在作用位点处对抗体的受控释放,由此改进了抗肿瘤疗效疗法并且降低了受试者副作用的可能性。
- [0038] 本发明的疗法或治疗方法可以与选自由以下组成的群组的一种或多种疗法组合:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法、以及放射疗法。
- [0039] 另外提供了用于治疗癌症、病原体感染和/或自身免疫障碍的试剂盒,所述试剂盒包括如本文所述的工程化免疫细胞或表达载体以及书面使用说明。

## 附图说明

[0040] 图1示出了具有8510bp的scFv抗PD-L1逆转录病毒构建体SFG.scFv.抗PD-L1(I)eGFP的设计。5'末端处的NcoI限制位点、3'末端处的SphI限制位点以及TGA终止密码子通过PCR而添加到scFv抗PD-L1DNA中。PCR产物被克隆到逆转录病毒载体SFG(I)eGFP中以获得最终载体SFG.scFv.抗PD-L1(I)eGFP。在IRES上表达的报告基因eGFP用于评估转导效率。LTR:长末端重复;SD:剪接供体;PS:包装信号;TGG:截短gagpol;SA:剪接受体;SP:信号肽;VL:scFv的可变轻链;L:接头;VH:scFv的可变重链;IRES:内部核糖体进入位点;eGFP:增强型绿色荧光蛋白。

[0041] 图2示出了可以在不改变CD4/CD8比率的情况下使用scFv抗PD-L1逆转录病毒构建体转导CD4和CD8T细胞。SFG.scFv.抗PD-L1(I)eGFP载体的转导效率被示出为表达eGFP的CD4(图2A)或CD8(图2B)T细胞的百分比。图2C:T细胞的CD4/CD8比率。根据配对t检验示出了

平均值和标准差 (n=4项独立实验) \*P<0.1。NT:非转导T细胞-PD-L1:仅使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体转导的T细胞;CAR.28PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对CD28胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞;CAR.BB PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞。图3示出了T细胞在双逆转录病毒转导时共表达GD2.CAR和eGFP抗PD-L1。图3A:SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体的转导效率。示出了eGFP阳性T细胞的百分比。图3B:对CD28胞内域或4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR的转导效率。

[0042] 图3C:GD2.CAR的表达,被示出为RFI (相对荧光强度)。图3D:使用GD2.CAR和scFv抗PD-L1逆转录病毒载体共转导的T细胞的百分比。图3E:在T细胞起始后的第10天的T细胞的代表性绘图。根据配对t检验示出了平均值和标准差 (n=6项独立实验) \*P<0.1,\*\*P<0.01。NT:非转导T细胞,CAR.28:仅使用对CD28胞内域进行编码的GD2.CAR转导的T细胞;CAR.BB:仅使用对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR转导的T细胞;-PD-L1:仅使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体转导的T细胞;CAR.28PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对CD28胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞;CAR.BB PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞。一并考虑,这些结果表明可以使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和GD2.CAR载体来共转导T细胞并且使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体进行的转导并不更改GD2.CAR的表达水平。图4示出了使用scFv抗PD-L1进行的转导并不影响T细胞增殖。T细胞的成倍增加被计算为活化之后的第6天(图4A)和第12天(图4B)的T细胞数量除以转导之前的第2天的T细胞数量。示出了平均值和标准差 (n=6项独立实验)。NT:非转导T细胞,CAR.28:仅使用对CD28胞内域进行编码的GD2.CAR转导的T细胞;CAR.BB:仅使用对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR转导的T细胞;-PD-L1:仅使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体转导的T细胞;CAR.28PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对CD28胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞;CAR.BB PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1 (I) eGFP载体和对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞;

[0043] 图5示出了抗PD-L1scFv的表达不影响T细胞亚群组成。图5A:通过CD62L、CD45RA和CD95的表达确定的T淋巴细胞亚群方案[原初(TN) CD62L+CD45RA+CD95-,干细胞记忆(TSCM) CD62L+CD45RA+CD95+,中枢记忆(TCM) CD62L+CD45RA-,效应子记忆(TEM) CD62L-CD45RA-,效应子T细胞(Teff) CD62L-CD45RA+]。使用固定的抗CD3/CD28进行刺激之后第10天的T细胞亚群组成(图5B);CD27(图5C)、CD28(图5D)以及PD-1(图5E)阳性细胞的百分比。示出了平均值和标准差 (n=4项独立实验)。图6示出了抗PD-L1scFv由转导后T细胞释放。图6A:在具有10%的FBS的细胞培养基中对从非转导T细胞(NT)和抗PD-L1scFv转导后T细胞(scFv PD-L1)释放的抗PD-L1scFv的定量测定。接种了T细胞并且使用固定的抗CD3/CD28抗体使其活化。18小时之后收集了上清液,并且通过特异性夹心ELISA对抗PD-L1scFv进行了定量测定。图6B:由转导后T细胞分泌的抗PD-L1scFv与PD-L1结合。对非转导T细胞(NT)和抗PD-L1转导后T细胞(scFv PD-L1)的细胞培养上清液与重组人类PD-L1的结合性进行了测试。大肠杆菌中产生的抗PD-L1scFv被用作参考对照物(scFv对照物)。

[0044] 图7示出了相比于不分泌scFv抗PD-L1的具有4-1BB胞内域的GD2.CAR T细胞,使用抗PD-L1scFv转导的具有4-1BB胞内域的GD2.CAR T细胞在共培养的第二周期中显示出对肿瘤细胞的较好杀伤。图7A示出了在抗原刺激的第一周期(7天)中,对4-1BB进行编码的

GD2.CAR-T有效地消除了肿瘤细胞,并且所分泌的抗PD-L1scFv的存在并未显示出对GD2.CAR-T细胞毒性功能的任何损害。在第二周期(14天)期间,相比于不具有抗PD-L1scFv的GD2.CAR T细胞,使用抗PD-L1scFv转导的具有4-1BB胞内域的GD2.CAR T细胞显示出对肿瘤细胞的增强杀伤。在共培养的第一周期(培养的7天,图7B)和第二周期(培养的14天,图7C)结束时的T细胞的代表性绘图(分别地,T细胞被标识为CD3+,并且肿瘤细胞CHLA-255被标识为GD2+细胞)。E:T比率1:5。CHLA:肿瘤细胞;T细胞:仅不具有肿瘤细胞的T细胞;Tc NT:非转导T细胞;Tc PD-L1:仅使用SFG.scFv.抗PD-L1(I) eGFP载体转导的T细胞;Tc CAR-41BB:仅使用对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR转导的T细胞;Tc CAR-41BB PD-L1:使用SFG.scFv.抗PD-L1(I) eGFP载体和对4-1BB胞内域进行编码的GD2.CAR来共转导的T细胞。

[0045] 图8示出了在抗原刺激的第一周期(7天)中,对4-1BB进行编码的GD2.CAR-T有效地释放了IFN $\gamma$ ,并且所分泌的抗PD-L1scFv的存在并未显示出对GD2.CAR-T功能(IFN $\gamma$ 释放)的任何损害。在第二周期(14天)期间,相比于不具有抗PD-L1scFv的GD2.CAR T细胞,使用抗PD-L1scFv转导的具有4-1BB的GD2.CAR T细胞显示出对IFN $\gamma$ 的增强释放;用于定量测定在第一(培养的7天,图8A)和第二(培养的14天,图8B)肿瘤特异性刺激之后的前24小时中产生的IFN $\gamma$ 的IFN $\gamma$  ELISA测定。

[0046] 如贯穿附图所使用的,“CAR.BB”是指“CAR.41BB”以及“CAR.4-1BB”。

### 具体实施方式

[0047] 除非另有定义,否则在说明书、附图和权利要求书中使用的所有其它科学术语和技术术语具有所属领域的普通技术人员普遍理解的普通含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或相当的方法和材料可以用于实践和测试本文公开的工程化细胞、抗体、抗原受体、核酸、载体、组合物、方法和用途,但是以下描述了适当的方法和材料。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文并入本文。在发生冲突的情况下,应以本说明书(包括定义)为准。这些材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0048] 如本文所使用的术语“工程化免疫细胞”是指经遗传修饰以表达本文所描述的蛋白质的免疫细胞。

[0049] 如本文所使用的,术语“抗原受体”是指能够响应抗原结合而激活免疫细胞的受体。示例性抗原受体可以是内源性(即天然)或重组T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。TCR是在免疫细胞上表达的膜锚定的异二聚体蛋白质。在与抗原呈递细胞呈递的抗原分子结合后,免疫细胞被激活。尽管一些TCR包括可变 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链,但其它TCR包括 $\gamma$ 链和 $\delta$ 链,所述链被表达为具有不变CD3链分子的复合物的一部分。 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链中的每一个可以包括可变区和恒定区,两者均位于胞外,其中每个可变域具有三个互补决定区(CDR),所述三个CDR使TCR能够与肽/MHC复合物结合。 $\beta$ 链的可变区具有附加高变区HV4,所述附加高变区HV4通常不接触抗原并且因此不被认为是CDR(参见例如,Richman,S.A.等人,《分子免疫学(Mol Immunol.)》2009;第46卷,第5期,第902到916页)。

[0050] CAR通常包括胞外域(胞膜外域)、跨膜域和胞浆域(胞内域)。胞外域提供抗原识别并且是最常见的scFv,但也可以使用其它抗体格式。scFv经由间隔区连接到跨膜域,所述跨膜域然后连接到胞内域。第一代CAR具有包括CD3- $\zeta$ 的简单结构化胞内域。在抗原结合后,受

体簇和激活信号传递给细胞。为了增加激活信号,第二代CAR进一步包含共刺激域,如CD28、OX40和/或4-1BB,并且第三代CAR包含两个或更多个共刺激域(Maus MV等人(2014)《血液(Blood)》,第123期,第2625到2635页)。除CD3- $\zeta$ 外,还研究了包含IgE-y域的Fc受体的其它含ITAM的域。

[0051] 在一些实施例中,抗原与抗原受体的结合通过诱导信号转导或改变免疫细胞中的蛋白质表达来活化免疫细胞,这导致免疫应答开始。

[0052] 术语“内源性”是指在缺乏重组工程的情况下细胞或组织中通常表达的核酸或多肽。

[0053] 如本文所使用的,“PD-L1”是指也被称为“程序性细胞死亡配体1”、“分化簇274(即CD274)”或“B7同源物1(即B7-H1)”的蛋白质。天然蛋白质包括两个胞外域、跨膜域和胞浆域。所述术语涵盖全长和/或未加工的PD-L1以及由细胞中的加工产生的任何中间体。PD-L1可以作为跨膜蛋白质或作为可溶性蛋白质存在;因此,如本文所使用的术语可以指蛋白质的全长或胞外域。所述术语还涵盖天然存在的PD-L1变体,例如,剪接变体或等位基因变体。蛋白质另外可以含有标签,如his标签或Fc标签。示例性人全长PD-L1蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP-054862下找到。术语“hPD-L1”是指人PD-L1并且包括天然hPD-L1和重组人rhPD-L1。“rPD-L1”是指重组PD-L1。重组PD-L1可以具有或不具有氨基末端甲硫氨酸残基,这取决于其制备方法。“rPD-L1”是指重组人PD-L1。同样地,PD-L1还可以通过从人或非人来源的生物样品中分离而获得。rhPD-L1可以例如从美国RnD Systems公司目录号156-B7获得或者从美国Peprtech公司目录号310-35获得。“猴PD-L1”是指恒河猴(猕猴)的PD-L1。示例性猴PD-L1蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP-001077358下找到。猴PD-L1可以例如从中国义翘神州科技有限公司(Sino Biological)目录号90251-C02H获得。“大鼠PD-L1”是指褐家鼠(挪威鼠)的PD-L1。示例性大鼠PD-L1蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP-001178883下找到。大鼠PD-L1可以例如从中国义翘神州科技有限公司目录号80450-R02H获得。“小鼠PD-L1”是指小家鼠的PD-L1。示例性小鼠PD-L1蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP\_068693下找到。

[0054] 小鼠PD-L1可以例如从中国义翘神州科技有限公司目录号50010-M03H获得或者从美国RnD Systems公司目录号1019-B7-100获得。

[0055] “Pd-1”是程序性细胞死亡蛋白质1,也被称为CD279,其是PD-L1的细胞表面受体。PD-1结合两种配体PD-L1和PD-L2。Pd-1是跨膜蛋白质,所述跨膜蛋白质包含胞外域,随后是跨膜区和胞内域。所述术语涵盖全长和/或未加工的PD-1以及由细胞中的加工产生的任何中间体。Pd-1可以作为跨膜蛋白质或作为可溶性蛋白质存在;因此,如本文所使用的术语可以指蛋白质的全长或胞外域。所述术语还涵盖天然存在的PD-1变体,例如,剪接变体或等位基因变体。蛋白质另外可以含有标签,如his标签或Fc标签。示例性人PD-1蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP-005009下找到。术语“hPD-1”是指人PD-1并且包括其天然形式(hPD-1)以及重组人形式(rhPD-1)。“rPD-1”是指重组PD-1。

[0056] “CD80”是指分化簇80,也被称为B7-1、B7.1、BB1、CD28LG、CD28LG1、LAB7。它是CD28和CTLA-4以及PD-L1的膜受体,并且包括胞外域,随后是跨膜区和胞内域。所述术语涵盖全长和/或未加工的CD80以及由细胞中的加工产生的任何中间体。CD80可以作为跨膜蛋白质

或作为可溶性蛋白质存在；因此，如本文所使用的术语可以指蛋白质的全长或胞外域。所述术语还涵盖天然存在的CD80变体，例如，剪接变体或等位基因变体。蛋白质另外可以含有标签，如his标签或Fc标签。示例性人CD80蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP—005182下找到，CD80可以例如从美国RnD Systems公司目录号9050-B1-100获得。术语“hCD80”是指人CD80并且包括其天然形式(hCD80)以及重组人形式(rhCD80)。“rCD80”是指重组CD80。

[0057] “PD-L2”是指也被称为“程序性细胞死亡1配体T\“B7-DC”，或“CD273”（分化簇273）的蛋白质。如本文所使用的术语涵盖全长和/或未加工的PD-L2以及由细胞中的加工产生的任何中间体。PD-L2可以作为跨膜蛋白质或作为可溶性蛋白质存在；因此，如本文所使用的术语可以指蛋白质的全长或胞外域。所述术语还包含天然存在的PD-L2变体，例如，剪接变体或等位基因变体。蛋白质另外可以含有标签，如his标签或Fc标签。示例性人全长PD-L2蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP—079515下找到。PD-L2可以例如从美国RnD Systems公司目录号1224-PL获得。术语“rhPD-L2”是指重组人PD-L2。“B7-H3”是指也被称为CD276（分化簇276）的蛋白质。如本文所使用的术语包含全长和/或未加工的B7-H3以及由细胞中的加工产生的任何中间体。B7-H3可以作为跨膜蛋白质或作为可溶性蛋白质存在；因此，如本文所使用的术语可以指蛋白质的全长或胞外域。所述术语还涵盖天然存在的B7-H3变体，例如，剪接变体或等位基因变体。蛋白质另外可以含有标签，如his标签或Fc标签。示例性人全长B7-H3蛋白质的氨基酸序列可以例如在NCBI蛋白质数据库登录号NP—079516下找到。B7-H3可以例如从美国RnD Systems公司目录号1027-B3获得。术语“rhB7-H3”是指重组人B7-H3。

[0058] 如本文所采用的T细胞耗尽是在许多慢性病毒感染、自身免疫和癌症期间出现的T细胞功能障碍的状态。其特征在于效应子功能差、抑制性受体的持续表达以及与功能性效应子或记忆T细胞不同的转录状态。耗尽阻止对感染状况和肿瘤的最佳控制，即特别是在慢性环境中。因为抗肿瘤T细胞在肿瘤微环境下持续暴露于抗原，所以它们特别容易耗尽。耗尽是导致癌症患者T细胞功能障碍的可能机制。因此，已经报道了黑素瘤患者以及患有卵巢癌和肝细胞癌的患者耗尽的T细胞。耗尽的T细胞表达包含PD-1和LAG-3的多种抑制性受体，并且逐渐丧失细胞毒性和增殖潜力。最终，它们可能驱使细胞凋亡。高水平抑制性受体的表达包含程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白域和粘蛋白域蛋白3(TIM-3)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、带T淋巴细胞衰减剂(BTLA)和T细胞免疫球蛋白以及基于免疫受体酪氨酸的抑制基元域(TIGIT)。耗尽的T细胞的另一个主要特征是它们表达效应子细胞因子的能力的逐渐丧失。通常，白细胞介素-2(IL-2)产生和离体杀伤能力在耗尽的早期阶段丧失。在中间阶段，肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )产生丧失。最后，在耗尽的晚期阶段，干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和颗粒酶B(GzmB)产生丧失。连接耗尽的T细胞与肿瘤微环境的第一个证据是程序性细胞死亡配体1过表达。参见例如肿瘤微环境中的T细胞耗尽的综述，Jiang等人，《细胞死亡与疾病(Cell Death and Disease)》第2015卷，第6期，e1 792。

[0059] 尽管T细胞耗尽是慢性过度刺激的结果，但T细胞无反应性通常是指(i)在没有通过CD28充分伴随的共刺激的情况下或(ii)在存在高共抑制分子信号传导的情况下通过触发TCR诱导的低反应状态。其结果是，IL-2没有被有效转录，但反而如GRAIL等无反应性关联

的基因被表达,所述无反应性关联的基因通过负反馈使受损的TCR信号起作用。

[0060] 术语“分离的”指示如肽、核酸分子或细胞等物质已经从其正常生理环境例如天然来源中去除,或肽或核酸是合成的。术语“分离的”的使用指示天然存在的序列已经从其正常细胞(例如,染色体或细胞)环境中去除。因此,序列可以在无细胞溶液中或置于不同的细胞环境中。关于多肽或核酸分子的“分离的”是指彼此偶联的氨基酸(2个或更多个氨基酸)或核苷酸的聚合物,所述聚合物包含从天然来源分离或合成的多肽或核酸分子。术语“分离的”并不意味着序列是唯一存在的氨基酸链或核苷酸链,但基本上不含例如分别与其天然相关联的非氨基酸材料和/或非核酸材料。“分离细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0061] “变体”是指通过添加(包括插入)、删减、修饰和/或替代一个或多个氨基酸残基或核碱基而不同于亲本序列同时保留本文公开的亲本序列的至少一种期望活性的氨基酸或核酸序列。在抗体的情况下,这种期望活性可以包含特异性抗原结合。类似地,当与亲本序列相比时,变体核酸序列可以通过添加、删减和/或替代一个或多个核碱基来修饰,但编码的抗体保留如上文所描述的期望活性。变体可以是天然存在的,如等位基因或剪接变体,或者可以是人工构建的。

[0062] 如本文所使用的,术语“同一性”是指两种蛋白质或核酸之间的序列匹配。待比较的蛋白质或核酸序列在比较窗口上进行比对以最大程度地对应,例如使用生物信息学工具,如EMBOSS Needle(成对比对;可在www.ebi.ac.uk获得)或通过手动比对和目视检查。当待比较的序列中的相同位置被相同的核碱基或氨基酸残基占据时,则对应分子在那个恰好位置处是相同的。因此,“百分比同一性”是匹配位置数除以相对位置数并且乘以100%的函数。例如,如果10个序列位置中的6个是相同的,那么同一性是60%。比对序列以最大程度地对应可能需要引入缺口。两个蛋白质序列之间的百分比同一性可以例如使用已经结合到EMBOSS Needle中的Needleman和Wunsch算法(Needleman SB.和Wunsch C D,一种适用于寻找两种蛋白质的氨基酸序列中的相似性的通用方法,《分子生物学期刊(J.Mol.Biol.)》1970,第48卷,第443页)、使用BLOSUM62矩阵、“缺口开放罚分”10、“缺口延伸罚分”0.5、假“末端缺口罚分”、“末端缺口开放罚分”10以及“末端缺口延伸罚分”0.5或可以使用以使同一性最大化的方式比对手动引入的缺口的方法来确定。不管任何化学和/或生物学修饰,具有相同的一级氨基酸或核酸序列的两个分子是相同的。例如,根据这个定义,具有相同的一级氨基酸序列但具有不同糖基化模式的两种抗体是相同的。在核酸的情况下,根据这个定义,例如具有相同序列但具有不同连接组分的两个分子,如硫代磷酸酯而不是磷酸盐,是相同的。类似地,根据这个定义,仅由于环外修饰而不同的核碱基例如胞嘧啶和5-甲基1-胞嘧啶是相同的。

[0063] 如果给出了比较窗口上的序列同一性,则序列比本文提供的任何序列长,例如因其包括几个可变域或一个或多个恒定域,然而仍应与本文公开的参考序列相同。如本文所使用的比较窗口包含所请求保护的整个序列。

[0064] 术语“CDR”是指抗体的高变区,所述高变区主要有助于抗原结合。通常,抗原结合位点包含嵌入构架支架中的六个CDR。在本文中,VL的CDR被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,而VH的CDR被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。如KABAT,E.A.等人《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》第5版,由美国卫生及公共

服务部编辑,NIH出版物,1991,第91到3242页所描述的,可以对这些进行鉴定。然而,如本文所使用的CDR-H1与Kabat定义的不同之处在于它从位置27开始并且在位置36之前结束(AHo位置28到42包括在内)。

[0065] 如本文所使用的,用于鉴定抗体的VH和VL中的氨基酸残基位置的编号系统对应于Honegger A.和Pluckthun A所描述的“AHo”-系统。然而用于免疫球蛋白可变域的另一编号方案:自动建模和分析工具。《分子生物学期刊》2001,第309卷,第657页。所述出版物进一步提供AHo与Kabat系统之间的换算表(Kabat E.A.等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》第5版,由美国卫生及公共服务部编辑,NIH出版物,1991,第91到3242页)。

[0066] 术语“构架”(FR)是指嵌入对应的CDR的可变抗体域、可变轻链(VL)或可变重链(VH)的支架。VL和/或VH构架通常包含位于CDR区侧翼的四个构架区段FR1、FR2、FR3和FR4。因此,如本领域已知的,VL具有通用结构:(FR-L1)-(CDR-L1)-(FR-L2)-(CDR-L2)-(FR-L3)-(CDR-L3)-(FR-L4),而VH具有通用结构:(FR-H1)-(CDR-H1)-(FR-H2)-(CDR-H2)-(FR-H3)-(CDR-H3)-(FR-H4)。在以下子章节中更详细地描述本公开的各个方面。应理解,可以按照意愿组合各个实施例、优选方案和范围。进一步地,取决于具体实施例,所选择的定义、实施例或范围可能不适用。

[0067] 在第一方面,本发明提供了一种工程化免疫细胞,其表达:

[0068] i) 抗原受体,以及

[0069] ii) 阻断PD-L1的抗体。

[0070] 这种免疫细胞可以例如是T细胞、天然杀伤T(NKT)细胞、天然杀伤(NK)细胞、人胚胎干细胞、造血干细胞(HSC)或诱导多能干细胞(iPS)。

[0071] 所述T细胞可以是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T淋巴细胞、炎性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。另外地或可替代地,所述T细胞是CD4+或CD8+或CD4+和CD8+细胞的混合群体。

[0072] 在一些实施例中,抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。如上文所解释的,CAR包括充当胞内信号传导域的胞浆域、跨膜域和用于抗原识别的胞外域。所述胞外域可以与信号肽连接以指导域向细胞表面转运。所述信号肽可以是可裂解的。

[0073] 通常,间隔区或铰链区存在于跨膜域与胞外域之间。这种铰链区可以例如选自由CD8a铰链、IgG1铰链或Fc $\gamma$ R11铰链组成的组。

[0074] 在一些实施例中,CAR包括CD3 $\zeta$ 、CD4、CD28、CD8 $\alpha$ 或4-1BB跨膜域。

[0075] 另外,CAR可以包括例如分别选自由CD28、4-1BB(CD137)、ICOS或OX40(CD134)共刺激域或其功能片段组成的组的一个或多个共刺激域。在优选的实施例中,CAR包括4-1BB共刺激域或其功能片段。CD28和4-1BB共刺激域的示例性序列分别在SEQ ID NO:49和47中提供。

[0076] 通常,胞浆域包括CD3 $\zeta$ 信号传导域。CD3 $\zeta$ 信号传导域的示例性序列在SEQ ID NO:48中给出。

[0077] 相应的序列是本领域熟知的和可获得的。信号肽、铰链区、跨膜域的示例性序列在W02016/034666的图1中提供,其通过引用结合在此。还可以使用所述序列的变体。其它信号肽、铰链区、跨膜域、共刺激域和/或信号传导域也可以在本发明的范围内使用。

[0078] 在一些实施例中, CAR构架如图1中所示的Heczey A. 等人,《血液 (Blood)》2014年10月30日, 第124卷, 第18期, 第2824到2833页, 其通过引用结合在此。

[0079] 在一些实施例中, CAR包括靶向GD2的胞外域, 如14g2a scFv或包括14g2a可变域的抗体或包括14g2a scFv的CDR或其对应变体的抗体、CD3 $\zeta$ 信号传导域和CD28共刺激域。在一些实施例中, CAR包括靶向GD2的胞外域, 如14g2a scFv、包括14g2a可变域的抗体或包括14g2a scFv的CDR或其对应变体的抗体、CD3 $\zeta$ 信号传导域和4-1BB共刺激域。14g2a scFv的VH和VL序列可以例如分别在登录号4TU0 A和4TU0 B的PDB数据库中找到(另见SEQ ID NO: 13和14)。还考虑使用14g2a衍生序列的变体, 特别是具有构架突变的变体, 如可变轻链和/或重链中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个突变。优选的是抗GD2-CAR, 其包括SEQ ID NO: 13和14中示出的至少一个、优选地所有CDR序列, 即SEQ ID NO: 16到21中的至少一个、优选地所有CDR序列。在Heczey A. 等人,《血液 (Blood)》2014年10月30日, 第124卷, 第18期, 第2824到2833页、在Pule, M.A. 等人,《分子疗法 (Mol Ther)》, 第12卷, 第5期, 2005年11月, 第933到941页(不同受体的跨膜和胞内域的氨基酸序列参见图1)以及在W02012033885中描述了示例性GD2特异性CAR构建体, 所有这三项通过引用结合在此。

[0080] 在一些实施例中, CAR包括靶向CSPG4的胞外域。优选地, 这种CAR包括SEQ ID NO: 22到27中的至少一个、优选地所有CDR。在一些实施例中, 这种CAR包括SEQ ID NO: 28的VL序列和/或SEQ ID NO: 29的VH序列。示例性CSPG4特异性CAR构建体在W02015/080981中描述, 其通过引用结合在此。

[0081] 在一些实施例中, CAR包括靶向GPC3的胞外域。优选地, 这种CAR包括SEQ ID NO: 30到35中的至少一个、优选地所有CDR。在一些实施例中, 这种CAR包括SEQ ID NO: 36的VL序列和/或选自SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38组成的组的VH序列。示例性GPC3特异性CAR构建体在W02016/049459中描述, 其通过引用结合在此。

[0082] 在一些实施例中, CAR包括靶向5T4的胞外域。优选地, 这种CAR包括SEQ ID NO: 39到44中的至少一个、优选地所有CDR。在一些实施例中, 这种CAR包括SEQ ID NO: 45的VL序列和/或SEQ ID NO: 46的VH序列。示例性5T4特异性CAR构建体在W02016/034666中描述, 其通过引用结合在此。

[0083] 另外地或可替代地, 抗原受体是T细胞受体 (TCR)。TCR可以是内源性(或天然的)TCR或工程化TCR。例如, 可以选择内源性TCR的抗原特异性。

[0084] 在一个实施例中, 工程化TCR是天然TCR, 其序列在免疫细胞中重组表达。在一些实施例中, 工程化TCR衍生自天然TCR, 但包括点突变。在一个实施例中, 工程化TCR包括恒定区中的二硫键, 例如如在W02006/000830中所公开的, 其通过引用结合在此。具体地讲, 结合了恒定区中二硫键的特定位置。

[0085] 在一个实施例中, 如在W02006/170320中所描述的, 修饰工程化TCR以增加表面表达, 其通过引用结合在此。例如, TCR包括下列氨基酸残基中的至少一种:

[0086]  $\alpha$ 链的L96;  $\beta$ 链的R9;  $\beta$ 链的Y10;  $\alpha$ 链的T24;  $\alpha$ 链的V19;  $\alpha$ 链的T20;  $\alpha$ 链的M50;  $\alpha$ 链的T5;  $\alpha$ 链的Q8;  $\alpha$ 链的S86;  $\alpha$ 链的F39;  $\alpha$ 链的D55;  $\beta$ 链的R43;  $\alpha$ 链的A66;  $\beta$ 链的V19;  $\beta$ 链的L21;  $\beta$ 链的L103;  $\alpha$ 链的T3;  $\alpha$ 链的S7;  $\alpha$ 链的P9;  $\alpha$ 链的M11;  $\alpha$ 链的A16;  $\alpha$ 链的T18;  $\alpha$ 链的L21;  $\alpha$ 链的S22;  $\alpha$ 链的D26;  $\alpha$ 链的F40;  $\alpha$ 链的S47;  $\alpha$ 链的R48;  $\alpha$ 链的Q49;  $\alpha$ 链的151;  $\alpha$ 链的L52;  $\alpha$ 链的V53;  $\alpha$ 链的T67;  $\alpha$ 链的E68;  $\alpha$ 链的N74;  $\alpha$ 链的F76;  $\alpha$ 链的N79;  $\alpha$ 链的Q81;  $\alpha$ 链的A83;  $\alpha$ 链的K90;  $\alpha$ 链的S92;  $\alpha$

链的D93;以及 $\alpha$ 链的M101。优选地,所述至少一个氨基酸残基不存在于相应的种系构架TCR氨基酸序列中。

[0087] 在一个实施例中,工程化TCR包括非人恒定区,例如鼠恒定区。

[0088] 在一个实施例中,如NKT细胞的内源性TCR等TCR能够结合肿瘤相关联的巨噬细胞。

[0089] 在一个实施例中,TCR对存活素有特异性。在W02016/070119中公开了对存活素肿瘤抗原有特异性但不具有“脱靶效应”毒性的示例性TCR。这种存活素特异性TCR优选地包括SEQ ID NO:50和51的CDR。优选地,TCR包括SEQ ID NO:50的 $\beta$ 链和/或SEQ ID NO:51的 $\alpha$ 链。

[0090] 在一个实施例中,TCR对WT-1有特异性。WT-1特异性的示例性TCR在W02005056595中公开。WT-1特异性TCR优选地包括选自自由SEQ ID NO:52、53、54、55、56、57、58和59组成的组的至少一个CDR。在一个实施例中, $\alpha$ 链包括SEQ ID NO:52、53和54。在一个实施例中, $\alpha$ 链包括SEQ ID NO:52、53和55。在一个实施例中, $\beta$ 链包括SEQ ID NO:56、57和58。在一个实施例中, $\beta$ 链包括SEQ ID NO:56、57和59。这种TCR可以包括SEQ ID NO:60或62的 $\alpha$ 链:另外地或可替代地,这种TCR可以包括SEQ ID NO:61或63的 $\beta$ 链。因此,在一个实施例中,TCR包括SEQ ID NO:60和61。在一个实施例中,TCR包括SEQ ID NO:60和63。在一个实施例中,TCR包括SEQ ID NO:62和61。在一个实施例中,TCR包括SEQ ID NO:62和63。

[0091] 在优选的实施例中,所述抗原受体是重组表达的。因此,用对所述抗原受体进行编码的载体转导或转染免疫细胞。

[0092] 抗原受体结合的抗原优选地由肿瘤或病原体表达或衍生。在一些实施例中,特别当使用CAR时,抗原受体可以结合多于一种靶。还考虑了表达两种或更多种,如三种、四种或五种不同重组抗原受体的免疫细胞。抗原受体结合的示例性抗原可以包含但不限于GD2、WT-1、5T4、GPC3、CSPG4、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CDS、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD133、CD138、CD123、如pp65或IE-1等巨细胞病毒(CMV)蛋白、如E6或E7等人乳头瘤病毒(HPV)蛋白、如EBNA-1、LMP-1、LMP-2或BARF-1等爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)蛋白、ADV蛋白、如六邻体蛋白、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、erb-B3、erb-B4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD3、Her-1、HER-2、HER2-HER3组合或HER1-HER2组合、hTERT、IL-13R-a2、K-轻链、DR、LeY、LI细胞粘附分子、MAGE-A1、MAGE-A4、MAGE-A10、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、EGFR、EGFRvIII、突变的p53、突变的ras、突变的raf、突变的RAC1、bcr/abl融合、c-Met、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、前列腺特异性抗原、黑素瘤相关抗原、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、meothelin、HERV-K或ERBB2。

[0093] 抗体可以是全长免疫球蛋白或抗体衍生物。在过去的几十年中,已经解剖了全长免疫球蛋白,并且模块已经用于产生单价衍生物、二价衍生物或多价衍生物以及单特异性衍生物、双特异性衍生物或多特异性衍生物。最初,通过蛋白水解产生较小的抗原结合片段,并且随后通过基因工程产生人工构建体。因此,抗体衍生物是重组分子,所述重组分子包含可能是多拷贝的功能部分或全长免疫球蛋白的全部。示例性抗体衍生物包含但不限于Fab、Fab<sup>5</sup>、scFab、scFv、Fv片段、纳米抗体、VHH、最小识别单位、双抗体、单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、BiTE(或串联di-scFv或串联scFv)、DART、串联tri-scFv、三(a)体、双特异性Fab2、二微型抗体、四聚体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-Fc融合体、二抗体、DVD-Ig、CrossMab、Duobody、scFab-Fc、

scFab-Fc-scFab、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合体(如例如bsAb、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、TslAb、Ts2A)b、杵臼(Knob-into-Holes)(KiHs)、DuoBody,(参见例如Holliger P和Hudson J.工程化抗体片段和单域的兴起,《自然生物技术(Nature Biotechnol.)》2005,第23卷,第9期,第1126页,Dimasi N.等人(2009),《JMB 393》,第672到692页)。

[0094] 抗体衍生物的亚组是抗体片段。如本文所使用的,术语“抗体片段”是指(i)单价抗体衍生物和单特异性抗体衍生物,所述单价抗体衍生物和单特异性抗体衍生物包括抗体的可变重链和/或轻链或功能片段并且缺少Fc部分;以及(ii)BiTE(串联scFv)、DART、双抗体和单链双抗体(scDb)。因此,抗体片段是例如选自由以下组成的组:Fab、Fab'、scFab、scFv、Fv片段、纳米抗体、VHH、dAb、最小识别单位、单链双抗体(scDb)、BiTE以及DART。所述抗体片段具有低于60kDa的分子量。在一个实施例中,抗体衍生物是抗体片段,优选地人源化抗体片段。

[0095] 在一个实施例中,抗体包括能够介导细胞毒性免疫应答的Fc域。包含Fc域的抗体的非限制性实例是全长免疫球蛋白、DVD-Ig、scFv-Fc和scFv-Fc.scFv融合体、IgG-scFab、scFab-Fc、scFab-Fc-scFab、Fv2-Fc、IgG-scFv融合(如例如bsAb、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、TslAb、Ts2Ab)、DuoBody和CrossMab。

[0096] 在一个实施例中,抗体包括Fc域,所述域被修饰成使得其不诱导细胞毒性免疫应答和/或不激活补体。在一个实施例中,抗体衍生物缺乏Fc域。缺乏Fc域的示例性抗体衍生物是Fab、Fab<sup>5</sup>、scFab、scFv、Fv片段、纳米抗体、VHH、最小识别单位、双抗体、单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、BiTE(也被称为串联di-scFv或串联scFv)、串联三-scFv、三(a)体、双特异性Fab2、二微型抗体、双抗体、scFab-dsscFv或DART。在一个实施例中,抗体包括使用杵臼(KiHs)技术工程化Fc域。

[0097] Fc部分介导细胞毒性免疫应答,如ADCC、ADCP和/或CDC;然而,当靶向PD-1:PD-L1轴时,这种Fc介导的作用不是必需的或者甚至是不希望的,因为两种蛋白质都在抗肿瘤细胞毒性T细胞的表面上表达。因此,施用具有功能性Fc部分的全长单克隆抗体可能导致它们旨在激活的非常淋巴细胞的耗尽。发现用抗PD-1抗体治疗与患者中较低的循环T细胞数相关。PD-L1也在非肿瘤细胞上表达,并且不希望靶向这些细胞和介导ADCC、ADCP和/或CDC。

[0098] 在一些实施例中,抗体衍生物具有约60kDa或更低的分子量,如约55kDa、50kDa、45kDa、40kDa、35kDa、30kDa或27kDa或更低。实体瘤具有实质性的物理屏障,所述物理屏障通常阻止全长免疫球蛋白渗透到中心,这导致治疗效果降低(Christiansen, J. 和 Rajasekaran, A.K. (2004),《分子癌症治疗学(Mol. Cancer Ther.)》第3期,第1493到1501页)。相比之下,较小的抗体衍生物可以更深地渗透到肿瘤中。具有约60kDa或更低分子量的示例性抗体衍生物是抗体片段,包含但不限于Fab、Fab<sup>5</sup>、scFab、scFv、Fv片段、纳米抗体、VHH、dAb、最小识别单位、单链双抗体(scDb)或DART。

[0099] 抗体的大小和/或构架对其半衰期具有影响。为了减少治疗环境中的副作用,使用半衰期短的抗体可能是有利的。这可以例如通过使用缺乏Fc部分的抗体衍生物、更优选地具有低分子量的抗体衍生物,如约60kDa或更低,如约55kDa、50kDa、45kDa、40kDa、35kDa、30kDa或27kDa或更低来实现。

[0100] 具有这些特征的优选的抗体衍生物是例如Fab、Fab'、scFab、scFv、Fv片段、纳米抗体、VHH、dAb、最小识别单位、单链双抗体 (scDb) 、BiTE或DART。

[0101] 抗体因此可以是单价的或多价的,即具有一个或多个抗原结合位点。单价抗体,特别是抗体衍生物,的非限制性实例包含但不限于scFv、Fv片段、Fab、scFab、dAb、VHH、纳米抗体或最小识别单位。多价抗体可以具有两个、三个、四个或更多个抗原结合位点。全长免疫球蛋白、F(ab')<sub>2</sub>片段、单链双抗体 (scDb) 、串联scDb (Tandab) 、线性二聚体scDb (LD-scDb) 、环状二聚体scDb (CD-scDb) 、BiTE (或串联di-scFv或串联scFv) 、DART、串联tri-scFv、三(a)体、双特异性Fab<sub>2</sub>、二微型抗体、四聚体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-Fc融合体、双抗体、DVD-Ig、CrossMab、Duobody、scFab-Fc、scFab-Fc-scFab、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv<sub>2</sub>-Fc、IgG-scFv融合体、双抗体、三抗体和四抗体是多价抗体的非限制性实例;示例性多价抗体包括两个结合位点,即抗体是二价的。

[0102] 在一些实施例中,抗体,特别是抗体衍生物,是双特异性的,即抗体衍生物针对一个靶分子上的两个不同靶或两个不同表位。在一些实施例中,抗体衍生物是多价的并且包括分别针对三个或四个不同抗原的多于两个例如三个或四个不同的结合位点。这种抗体是多价的和多特异性的,具体地分别为三特异性或四特异性的。

[0103] 优选地,上述抗体衍生物是scFv(“单链可变片段”或“单链抗体”)。scFv是包含通过接头连接的抗体的VH和VL域的融合蛋白。因此,它缺乏存在于全长抗体中的恒定Fc区。VH和VL域可以通过柔性接头以任一取向、VL-接头-VH或VH-接头-VL连接。在优选的实施例中,取向是VL-接头-VH,即轻链可变区位于N末端并且重链可变区位于多肽的C-末端。接头可以具有SEQ ID NO:10的序列,然而,还可以使用SEQ IDNO:10更短或更长的接头或变体。

[0104] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的T细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的T细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的T细胞。

[0105] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的天然杀伤T(NKT)细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的NKT细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的NKT细胞。

[0106] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的天然杀伤(NK)细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的NK细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的NK细胞。

[0107] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的人胚胎干细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的人胚胎干细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的人胚胎干细胞。

[0108] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的造血干细胞(HSC)。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的造血干细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细

胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的造血干细胞。

[0109] 因此,在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR的诱导性多能干细胞(iPS)。

[0110] 在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种TCR的诱导性多能干细胞。在一个实施例中,本文提供的所述细胞是根据本公开的表达scFv阻断PD-L1和至少一种CAR以及至少一种TCR的诱导性多能干细胞。

[0111] 具有如本文所使用的构架的抗体已经以scFv的格式被描述为非常稳定的(参见例如,W0/2009/155726或Borrás等人《生物化学期刊(JBC)》,第285卷,第12号,2010年3月9日,第9054到9066页)。因此,抗体优选地包括SEQ ID NO:1和/或2中包括的构架序列或其变体。变体可以例如包含如W02014/206561中所描述的修饰,具体包含W02014/206561的VL构架序列SEQ ID NO:15到22。

[0112] 抗体是优选地人源化的以避免针对蛋白质的免疫应答。“人源化”抗体是指包含非人亲本抗体或其变体或合成CDR中的一个或多个,通常全部六个CDR区的抗体,并且其构架是例如(i)人构架,可能包含非人亲本抗体的一个或多个构架残基,或(ii)来自非人抗体的构架,所述非人抗体被修饰以增加与天然产生的人构架的相似性。人源化抗体的方法是本领域已知的,参见例如由Wood C.London编辑:Leger O.和Saldanha J.《抗体药物发现(Antibody Drug Discovery)》,帝国学院出版社(Imperial College Press),2011,ISBN 1848166281,第1到23页。

[0113] 在一些实施例中,抗体是完全人的。

[0114] 在优选的实施例中,抗体结合PD-L1上的表位,使得PD-L1与CD80和PD-1的相互作用被阻断。由于PD-L1与PD-1结合驱动T细胞耗尽并且PD-L1与CD80结合驱动T细胞无反应性,因此同时阻断PD-L1与CD80和PD-1的结合防止无反应性并且恢复耗尽。

[0115] 在优选的实施例中,抗体包括:

[0116] i) 如分别在SEQ ID NO:6、7以及8中阐述的可变重链(VH)CDR序列CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3中的至少一个或其变体,

[0117] ii) 如分别在SEQ ID NO:3、4以及5中阐述的可变轻链(VL)CDR序列CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3中的至少一个或其变体。

[0118] 优选地,所述抗体包括:

[0119] i) SEQ ID NO:2的VH序列中的至少一个,和/或

[0120] ii) 对应的SEQ ID NO:1的至少一个VL序列或其变体。

[0121] 在一些实施例中,所述抗体是包括SEQ ID NO:9的scFv或其变体。

[0122] 在一些实施例中,变体可以是在其氨基酸序列的一个、两个、三个、四个、五个或更多个位置中与给定抗体不同的抗体。这种差异可以例如是替代、添加、修饰或删减。在一个实施例中,变体对于本文所公开的序列,特别是SEQ ID NO:1、2或9,具有至少85%、更优选地90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、最优选100%的序列同一性。

[0123] 可以通过将适当的修饰引入对抗体进行编码的核酸序列中来制备本文提供的抗体的变体。可以对构架或对CDR进行删减、替代、添加、修饰和插入的任何组合,条件是所产生的抗体具有可以使用适当方法筛选的所希望的特征。特别感兴趣的是替代、优选地保守替代。

[0124] 如本文所使用的,“保守替代”是指在物理上、生物学上、化学上和/或功能上维持关于相应参考的特性的修饰和替代。包含具有保守替代的序列的分子例如可以具有相似的大小、形状、电荷、化学特性,包含形成共价键或氢键和/或相当极性的相当能力。这种保守修饰包含但不限于一个或多个核碱基和氨基酸替代、添加和删减。

[0125] 例如,保守氨基酸替代包含用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的那些氨基酸替代。例如,可以用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换关于与抗原结合的非必需氨基酸残基,例如,丝氨酸可以替代苏氨酸。氨基酸残基通常基于共同的、相似的侧链特性分为家族,如:

[0126] 1. 非极性侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸),

[0127] 2. 不带电荷的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、脯氨酸、半胱氨酸、色氨酸),

[0128] 3. 碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸、脯氨酸),

[0129] 4. 酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸),

[0130] 5.  $\beta$ -支化侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及

[0131] 6. 芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0132] 保守替代可以被认为是上述六组中的一组内的第一个氨基酸被六个组中相同组内的另外的氨基酸替代。优选的保守替代包含:

[0133] 1. 用缬氨酸(V)替代丙氨酸(A);

[0134] 2. 用赖氨酸(K)替代精氨酸(R);

[0135] 3. 用谷氨酰胺(Q)替代天冬酰胺(N);

[0136] 4. 用谷氨酸(E)替代天冬氨酸(D);

[0137] 5. 用丝氨酸(S)替代半胱氨酸(C);

[0138] 6. 用天冬氨酸(D)替代谷氨酸(E);

[0139] 7. 用丙氨酸(A)替代甘氨酸(G);

[0140] 8. 用精氨酸(R)或赖氨酸(K)替代组氨酸(H);

[0141] 9. 用亮氨酸(L)替代异亮氨酸(I);

[0142] 10. 用亮氨酸(L)替代蛋氨酸(M);

[0143] 11. 用酪氨酸(Y)替代苯丙氨酸(F);

[0144] 12. 用苏氨酸(T)替代丝氨酸(S);

[0145] 13. 用酪氨酸(Y)替代色氨酸(W);

[0146] 14. 用色氨酸(W)替代苯丙氨酸(F);和/或

[0147] 15. 用亮氨酸(L)替代缬氨酸(V)

[0148] 反之亦然。其它替代,如用丙氨酸(A)替代脯氨酸(P),也是允许的,并且可以凭经验确定或符合其它已知的保守或非保守替代。保守替代还可以涉及非天然氨基酸的使用。

[0149] 本文描述的抗体可以包括这种保守替代中的一种或多种,如两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种。

[0150] 在另一个实施例中,将非保守替代引入本文公开的任何序列中以产生变体。在一个实施例中,抗体包括这种非保守替代中的一种或多种,如两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种。

[0151] 特别优选的变体类型是用一个或多个整个CDR替换的变体。通常,CDR-H3和CDR-L3对抗原结合的贡献最大。例如,整个CDR-L1、CDR-L2、CDR-H1和/或CDR-H2可以被天然或人工来源的不同CDR替换。在一些实施例中,一个或多个CDR被丙氨酸盒替换。

[0152] 在一些实施例中,变体未示出对亲本抗体的任何改进。在一些实施例中,如本文所描述的变体抗体

[0153] (i) 保持与PD-L1,特别是hPD-L1,的特异性结合,优选地阻断PD-L1与PD-1之间的相互作用;和/或

[0154] (ii) 具有针对如由 KinExA®测量的低于500pM、优选地低于250pM、100pM、75pM、50pM、40pM、30pM、20pM、更优选低于10pM的人PD-L1的KD;和/或

[0155] (iv) 与本文公开的抗体竞争结合PD-L1;和/或

[0156] (v) 具有针对本文公开的序列的至少80%、优选地至少85%、90%、95%或97%的序列同一性。

[0157] 在一些实施例中,抗体对PD-L1具有高亲和力并且将hPD-L1与低于100pM如低于约75pM、50pM、25pM或10pM的KD结合。例如,抗体是二价的并且将PD-L1与如由 KinExA®测量的低于10pM的KD结合,优选地低于5pM、更优选地约3pM,例如2.9pM、2.8pM或2.7pM。在一些实施例中,这种二价抗体是全长免疫球蛋白。

[0158] 在一些实施例中,本文提供的所述抗体是单价的并且将人PD-L1与如由 KinExA®测量的低于50pM的KD结合。所述KD优选地低于约10pM,如约9pM,例如9.0pM、8.9pM、8.8pM或8.7pM。在一些实施例中,所述单价抗体是scFv。

[0159] 在一些实施例中,本文提供的所述抗体是单价的并且将猴PD-L1与如由 KinExA®测量的低于50pM的KD结合。如由 KinGxA®所测量的,所述KD优选地低于约10pM、更优选低于约5pM、如例如约3.4pM、3.3pM或3.2pM。

[0160] 这种 KinExA®.测量优选地在室温下进行,更优选地在如实例1中所描述的条件下进行。

[0161] 虽然在其靶位点处存在少量工程化免疫细胞,但是高亲和力抗体可能有利于提供保护作用,因此表达有限量的抗体。

[0162] 还提供了如上文所描述的工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞表达与人PD-L1以及猴PD-L1结合的抗体。优选地,对猴PD-L1的亲和力至少是对人PD-L1的亲和力的两倍。在一些实施例中,单价抗体,优选地scFv,对猴PD-L1的亲和力KD为如由 KinExA®测量的约3.3pM,例如如在室温下测量的,优选地在实例1中指示的条件下测量的。

[0163] 进一步提供与B7家族的其它成员没有交叉反应性的抗体,如PD-L2和B7-H3。

[0164] 进一步考虑的是如上文所描述的工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞表达与本文公开的抗体竞争结合PD-L1的抗体。

[0165] 本文所描述的工程化免疫细胞可以在其表面上分泌抗体和/或表达抗体。在优选的实施例中,抗体是分泌的。

[0166] 在一些实施例中,细胞可以另外重组地表达至少一种另外的蛋白质化合物,如第二抗体或细胞因子。细胞因子例如选自由IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21或MIP-1 $\alpha$ 组成的组,并且优选地是人来源,即hIL-2、hIL-4、hIL-7、hIL-15、hIL-21或hMIP-1 $\alpha$ 。在一些实

施例中,这种细胞表达hIL-15。已经描述了改善CAR NKT细胞的体内持久性和抗肿瘤活性的IL-15(参见W02013/040371)。这种第二抗体可以例如靶向免疫抑制分子,如转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ (3)、IL-10、Fas、CD47、CTLA-4、Tim-3、LAG-3或其配体。

[0167] 在一些实施例中,工程化免疫细胞表达抗原受体、如本文所描述的抗体和另外的IL-15,所述抗原受体是包括4-1BB共刺激域的CAR。在一些实施例中,工程化免疫细胞表达抗原受体、如本文所描述的抗体和另外的IL-15,所述抗原受体是包括CD28共刺激域的CAR。

[0168] 因此,提供了具有天然TCR、嵌合抗原受体(特别是对肿瘤抗原特异)的NKT细胞和根据本公开的PD-L1抗体,特别是scFv。NKT细胞进一步对如IL-15等细胞因子进行编码。

[0169] 进一步考虑的是对本文所描述的抗原受体和/或抗体进行编码的核酸。蛋白质可以由多个核酸序列编码。在一些实施例中,蛋白质由单个核酸序列编码。通常,核酸是分离的核酸。

[0170] 已知抗体和/或抗原受体的序列,对对应多肽序列进行编码的cDNA可以通过本领域熟知的方法产生,例如通过基因合成。可以通过标准克隆和诱变技术将这些cDNA克隆到如表达载体或克隆载体等合适的载体中。因此,进一步考虑的是对如本文所描述的抗原受体和/或抗体进行编码的cDNA。

[0171] 基于所选择的克隆策略,基因构建体可以生成在N末端或C末端处具有一个或多个额外残基的抗体和/或抗原受体。因此,应理解本文公开的抗体包含所公开的序列而不是由它们组成。

[0172] 标准克隆、诱变和分子生物学技术的基本方案在例如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)》(Green M.和Sambrook,《分子克隆期刊:实验室手册(J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual)》第4版,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),2012,ISBN 1936113422)中描述。

[0173] 进一步考虑的是在严格条件下与本文描述的核酸杂交的分离的核酸。

[0174] 还提供了包括本文提供的核酸的载体,如表达载体或克隆载体。对本文所描述的抗原受体和抗体进行编码的一种、两种或更多种核酸可以包括在载体中,所述载体可以是相同的载体(双顺反子或多顺反子)或分开的载体。表达载体可以是例如使用内部核糖体进入位点(IRES)、2A样序列或双启动子的多顺反子载体,如双顺反子载体。

[0175] 表达载体可以例如是慢病毒、逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。表达载体还可以是非病毒载体,包含质粒、转座子、插入序列或人工染色体。

[0176] 在一些实施例中,核酸分子可以定义表达盒。表达盒是能够指导特定核苷酸序列在合适的宿主细胞中表达的核酸分子。表达盒包含可操作地连接到感兴趣的核苷酸序列的启动子,所述启动子可操作地连接到一个或多个终止信号。它还可以包含核苷酸序列的恰当转译所需的序列。编码区可以对感兴趣的多肽进行编码。表达盒中的核苷酸序列的表达可以在组成型启动子或诱导型启动子的控制之下,所述组成型启动子或诱导型启动子只有当宿主细胞暴露于一些特定的外部刺激时才引发转录。在一些实施例中,抗体处于逆转录病毒的5'末端LTR的控制之下。对抗原受体进行编码的核酸和/或对抗体进行编码的核酸可以各自可操作地连接到启动子,所述启动子可以是相同或不同的启动子。

[0177] 核酸和/或载体可以进一步包括信号肽。通常,信号肽是附接到待分泌的蛋白质的N-末端的5个到30个氨基酸肽并且被附接以增加蛋白质分泌。在优选的实施例中,信号肽是

人信号肽。在一些实施例中,信号肽是hIgG1。在一些实施例中,信号肽包括SEQ ID NO:15。

[0178] 另外地或可替代地,抗体是膜锚定的。这种膜锚定抗体可以包括跨膜域。在一些实施例中,膜锚定抗体不包括无信号传导域。在一个实施例中,抗体是分泌的并且还以膜锚定的形式提供。

[0179] 基因工程免疫细胞可以包括如自杀开关等安全开关。如果出现严重的副作用,则这种开关会抑制细胞的活性,或者如果细胞攻击健康组织,则这种开关会使细胞自毁。通常,这种开关是可控的,并且因此在细胞上需要额外的受体或其它靶。通过向受试者施用第二种药物来控制这种安全开关。因此,在一些实施例中,载体包括对安全开关,优选地自杀开关,进行编码的核酸序列。

[0180] 本发明还提供了一种产生如本文所描述的免疫细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0181] (a) 提供免疫细胞,

[0182] (b) 将至少一个对所述抗原受体进行编码的核酸和至少一个对所述抗体进行编码的核酸引入到所述细胞中;以及

[0183] (c) 通过所述细胞表达所述核酸。

[0184] 在一些实施例中,步骤(b)包括将如上文所描述的表达载体引入到所述细胞中。

[0185] 所述方法可以包括以下附加步骤:

[0186] (i) 将具有与步骤(b)的抗原受体不同的抗原特异性的至少一种其它抗原受体引入到所述细胞中;和/或将具有与步骤(b)的抗体不同的抗原特异性的至少一种其它抗体引入到所述细胞中。

[0187] 本发明还涉及一种药物组合物,所述药物组合物包括:

[0188] i) 有效量的本文所描述的工程化免疫细胞或本文所描述的表达载体,和

[0189] ii) 药学上可接受的赋形剂。

[0190] 合适的“赋形剂”包含但不限于:(i) 缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐或其它有机酸;(ii) 抗氧化剂,如抗坏血酸和生育酚;(iii) 防腐剂,如3-戊醇、六甲基氯化铵、苯扎氯铵、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯、儿茶酚或环己醇;(iv) 氨基酸,如例如组氨酸、精氨酸;(v) 肽,优选地多达10个如聚赖氨酸等残基;(vi) 蛋白质,如牛或人血清白蛋白;(vii) 亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;

[0191] (viii) 单糖、二糖、多糖和/或其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖、蔗糖、甘露糖醇、海藻糖、山梨糖醇、氨基葡聚糖或聚酰氨基胺;

[0192] (ix) 螯合剂,例如EDTA;(x) 成盐离子,如钠、钾和/或氯化物;(xi) 金属配合物(例如Zn-蛋白质配合物);(xii) 离子和非离子表面活性剂,如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG);(xiii) 冷冻保护剂,如二甲基亚砜(DMSO)。

[0193] 本文所描述的工程化免疫细胞、本文所描述的表达载体和/或本文所描述的的药物组合物可用于疗法。因此,进一步提供的是在治疗中使用的本文所描述的工程化免疫细胞、本文所描述的表达载体和/或本文所描述的的药物组合物。

[0194] 还提供了一种治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括:

[0195] (a) 提供本文所描述的工程化免疫细胞;以及

[0196] (b) 将所述免疫细胞施用给所述受试者。

[0197] 另外地或可替代地,治疗方法涉及提供和施用本文所描述的表达载体和/或本文所描述的药物组合物。

[0198] 如本文所使用的,术语“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”包含防御性或预防性措施,所述防御性或预防性措施具有治疗效果和/或预防、减缓(减轻)或至少部分地缓解或消除异常,所述异常包含受试者的生物体内的病理、状况。根据本公开的治疗涉及将如本文所描述的药学上有效量的分子、核酸、载体、药物组合物和/或工程化免疫细胞,即尤其本文所公开的细胞、载体或组合物,施用给有此需要的受试者以预防、治愈、延迟发病和/或进展、降低待治疗的状况的一种或多种症状的严重性、稳定、调节、治愈或减轻所述一种或多种症状。需要治疗的那些受试者包含那些已经患有障碍的受试者以及那些易患所述障碍的受试者或那些需要预防所述障碍的受试者。通常,治疗减少、稳定或抑制与疾病或病理状况的存在和/或进展相关联的症状的进展。

[0199] 需要治疗的所述受试者可以是人或非人动物。通常,所述受试者是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔子、仓鼠、狗、猫、猴子、猿、山羊、绵羊、马、鸡、豚鼠或猪。在典型的实施例中,所述受试者被诊断患有癌症和/或PD-L1相关障碍或可能获得这种障碍。在动物模型的情况下,可以对动物进行基因工程以发展这种障碍。

[0200] 通常,有效量的本文公开的细胞、载体或组合物被施用于受试者。“有效量”是所应用的剂量方案产生所希望的治疗效果,即达到某种治疗目标,的量-作为单剂量或作为一系列剂量的一部分,。治疗有效量通常是足以在相关病理状况的治疗或管理中提供治疗益处或延迟或最小化与状况的存在相关联的一种或多种症状的量。剂量将取决于各种因素,包含患者和临床因素(例如,年龄、体重、性别、患者的临床病史、障碍的严重程度和/或对治疗的应答)、所治疗障碍的性质、待施用的特定组合物、施用途径和其它因素。

[0201] 如本文所使用的,术语“施用”是指将本文所描述的如细胞、载体或组合物等物质转移、递送、引入或转运到受试者的任何模式。可以在局部或全身施用给药。施用的优选模式包含但不限于肠胃外施用,例如静脉内施用或全身施用。与如一种或多种治疗剂等另外的物质“组合”施用包含以任何顺序同步(同时)施用和连续施用。

[0202] 将细胞、载体或组合物一次或多次施用于所述受试者。

[0203] 细胞、载体或组合物可以与选自抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法和放射疗法的组中的一种或多种疗法组合施用。本发明的疗法可以在其它药剂治疗之前或之后以数分钟到数周的间隔进行。

[0204] 细胞可以源自于受试者或源自于相同物种的另一个体,即它们是自体的或同种异体的。自体的过继转移需要提取患者的细胞、对它们进行例如如上文所描述的基因修饰并且在将它们返回同一患者之前在体外对所述细胞进行培养。每个新患者的这种个体制备限制了细胞免疫疗法在治疗癌症中的应用。然而,作为现成的产品,来自健康供体的同种异体T细胞携带将患者的身体识别为异质的风险,这可能导致被称为移植物抗宿主病(GvHD)的严重的副作用。基于在来自健康供体的大容量中产生的CAR修饰的NKT细胞的现成疗法提供了很大的希望。虽然赋予了像常规T细胞一样强大的杀癌特性,但不变的NKT细胞表达与GvHD无关的特殊T细胞受体。因此,同种异体NKT细胞可以用于治疗多个癌症患者,GvHD风险最小。

[0205] 需要治疗的受试者可能具有病况,但不限于恶化前或恶性癌症病况,如NSCLC(非

小细胞肺癌)、尿路上皮癌、黑素瘤、肾细胞癌、霍奇金淋巴瘤、头颈鳞状细胞癌、卵巢癌、胃结肠癌、肝细胞癌、胶质瘤、乳腺癌、淋巴瘤、小细胞肺癌、骨髓增生异常综合征、前列腺癌、膀胱癌、宫颈癌、非透明细胞肾癌、结直肠癌、肉瘤、结肠癌、肾癌、肺癌、胰腺癌或胃癌、皮肤癌、子宫癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、头颈癌、白血病、癌、Merkel细胞癌或肾细胞癌(RCC)、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤;病原体感染、自身免疫病症。

[0206] 本发明进一步提供了一种用于治疗癌症、病原体感染、自身免疫障碍的试剂盒,所述试剂盒包括本文所描述的工程化免疫细胞、本文所描述的表达载体或本文所描述的药物组合物以及书面使用说明。

[0207] 在一些实施例中,所述试剂盒可以进一步包括安全开关的诱导器。

[0208] 序列

[0209] 本文公开的序列为:

[0210] SEQ ID NO:1-VL of scFv

[0211] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEDIYSLLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGA  
AEFTLTISLQPDFFATYYCQGNYGSSSSSSSYGAVFGQGTKLTVLGSEQ ID NO:2-VH of scFv

[0212] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSYTMGWVRQAPGKGLEWVGIISSGGRTYYASWAKGRFTI  
SRDTSKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARGRYTGYPYFALWGQGTLLVTVSS

[0213] SEQ ID NO:3-CDR-L1 of scFv

[0214] QASEDIYSLLA

[0215] SEQ ID NO:4-CDR-L2 of scFv

[0216] DASDLAS

[0217] SEQ ID NO:5-CDR-L3 of scFv

[0218] QGNYGSSSSSSYGAV

[0219] SEQ ID NO:6-CDR-H1 of scFv

[0220] IDLSSYTMG

[0221] SEQ ID NO:7-CDR-H2 of scFv

[0222] IISSGGRTYYASWAKG

[0223] SEQ ID NO:8-CDR-H3 of scFv

[0224] GRYTGYPYFAL

[0225] SEQ ID NO:9-scFv

[0226] EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEDIYSLLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGA  
EFTLTISLQPDFFATYYCQGNYGSSSSSSSYGAVFGQGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV  
QPGGSLRLSCTVSGIDLSSYTMGWVRQAPGKGLEWVGIISSGGRTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYVYLMNSLRAED  
TAVYYCARGRYTGYPYFALWGQGTLLVTVSS

[0227] SEQ ID NO:10-接头

[0228] GGGSGGGGSGGGSGGGG

[0229] SEQ ID NO:11-正向引物

[0230] TAACCATGGAGTTTGGGCTGAG

[0231] SEQ ID NO:12-反向引物

- [0232] GACGCATGCTCAGCTCGACACGGTGACC
- [0233] SEQ ID NO:13-14g2a scFv的VL序列
- [0234] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKR
- [0235] (以粗体突出显示的CDR序列)
- [0236] SEQ ID NO:14-14g2a scFv的VH序列
- [0237] EVQLLQSGPELEKPGASVMISCKASGSSFTGYNMNWRQNIQKSLWIGRIDPYYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSS
- [0238] (以粗体突出显示的CDR序列)
- [0239] SEQ ID NO:15-h1gG1信号肽
- [0240] MEFGLSWLFLVAILKGVQ
- [0241] SEQ ID NO:16-抗GD2-CAR的CDR-L1
- [0242] RSSQSLVHRNGNTYLH
- [0243] SEQ ID NO:17-抗GD2-CAR的CDR-L2
- [0244] KVSNRFS
- [0245] SEQ ID NO:18-抗GD2-CAR的CDR-L3
- [0246] SQSTHVPPLT
- [0247] SEQ ID NO:19-抗GD2-CAR的CDR-H1
- [0248] SSFTGYNMN
- [0249] SEQ ID NO:20-抗GD2-CAR的CDR-H2
- [0250] AIDPYYGGTSYNQKFKG
- [0251] SEQ ID NO:21-抗GD2-CAR的CDR-H3
- [0252] GMEY
- [0253] SEQ ID NO:22-抗CSPG4CAR的CDR-L1
- [0254] RASQTIYKNLH
- [0255] SEQ ID NO:23-抗CSPG4CAR的CDR-L2
- [0256] YGSDSIS
- [0257] SEQ ID NO:24-抗CSPG4CAR的CDR-L3
- [0258] LQGYSTPWT
- [0259] SEQ ID NO:25-抗CSPG4CAR的CDR-H1
- [0260] YTFTDYSMH
- [0261] SEQ ID NO:26-抗CSPG4CAR的CDR-H2
- [0262] WINTATGEPTYADDFKG
- [0263] SEQ ID NO:27-抗CSPG4CAR的CDR-H3
- [0264] YYDY
- [0265] SEQ ID NO:28-抗CSPG4CAR的VL序列
- [0266] LDIKLTQSPSILSVTPGETVSLSCRASQTIYKNLHWYQQKSHRSPRLLIKYGSDSISGIPSRFTGSGSGTDYTLNINSVKPEDEGIYYCLQGYSTPWTFGGGTKLEIKR
- [0267] SEQ ID NO:29-抗CSPG4CAR的VH序列

- [0268] QVKLKESGPPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHVVKKTPGKGLKWLGWINTATGEPTYADDFKGRFA  
ISLETSARTVYLVQINNLRNEDTATYFCFSYYDYWGQGTTVTVSS
- [0269] SEQ ID NO:30-抗GPC3CAR的CDR-L1
- [0270] RSSQSLVHSNRNTYLH
- [0271] SEQ ID NO:31-抗GPC3CAR的CDR-L2
- [0272] KVSNRFS
- [0273] SEQ ID NO:32-抗GPC3CAR的CDR-L3
- [0274] SQNTHVPPT
- [0275] SEQ ID NO:33-抗GPC3CAR的CDR-H1
- [0276] YTFTDYEMH
- [0277] SEQ ID NO:34-抗GPC3CAR的CDR-H2
- [0278] ALDPKTGDTAYSQKFKG
- [0279] SEQ ID NO:35-抗GPC3CAR的CDR-H3
- [0280] FYSYTY
- [0281] SEQ ID NO:36-抗GPC3CAR的VL
- [0282] DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTNHPPTFGQGTKLEIKR
- [0283] SEQ ID NO:37-抗GPC3CAR的VH
- [0284] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVT  
LTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGTTLVTVSS
- [0285] SEQ ID NO:38-抗GPC3CAR的VH
- [0286] QVQLVQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLKWIGALDPKTGDTAYSQKFKGKAT  
LTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRFYSYTYWGQGTTLVTVSA
- [0287] SEQ ID NO:39-抗5T4CAR的CDR-L1
- [0288] YSFTGYMH
- [0289] SEQ ID NO:40-抗5T4CAR的CDR-L2
- [0290] RINPNNGVTLYNQKFKD
- [0291] SEQ ID NO:41-抗5T4CAR的CDR-L3
- [0292] STMITNYVMDY
- [0293] SEQ ID NO:42-抗5T4CAR的CDR-H1
- [0294] KASQSVSNDVA
- [0295] SEQ ID NO:43-抗5T4CAR的CDR-H2
- [0296] YTSSRYA
- [0297] SEQ ID NO:44-抗5T4CAR的CDR-H3
- [0298] QQDYNSPPT
- [0299] SEQ ID NO:45-抗5T4CAR的VL
- [0300] SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPPTLLISYTSRYAGVPDRFIGSGYGT  
DFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGQGTKLEIKR
- [0301] SEQ ID NO:46-抗5T4CAR的VH

- [0302] EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYIMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGVTLYNQKFKDKAI  
LTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMQYWGQVTSVTVSS
- [0303] SEQ ID NO:47-41BB共刺激域
- [0304] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
- [0305] SEQ ID NO:48-CD3 $\zeta$ 胞内域
- [0306] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE  
AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0307] SEQ ID NO:49-CD28共刺激域
- [0308] RSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
- [0309] SEQ ID NO:50-存活素特异性TCR、 $\beta$ 链
- [0310] DAMVIQNPQYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQSRRP  
NTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCASTRGDSTAEPQHFGDGTLSIL
- [0311] SEQ ID NO:51-存活素特异性TCR、 $\alpha$ 链
- [0312] GESVGLHLPTLSVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNMDKRQGRVTVLLNKT  
VKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAETVTDSWGKLGAGTQVVVTPD
- [0313] SEQ ID NO:52-WT-1特异性TCR、CDR1 $\alpha$
- [0314] SSYSPS
- [0315] SEQ ID NO:53-WT-1特异性TCR、CDR2 $\alpha$
- [0316] YTSAATL
- [0317] SEQ ID NO:54-WT-1特异性TCR、CDR3 $\alpha$
- [0318] WSPFSGGGADGLT
- [0319] SEQ ID NO:55-WT-1特异性TCR、CDR3 $\alpha$
- [0320] SPFSGGGADGLT
- [0321] SEQ ID NO:56-WT-1特异性TCR、CDR1 $\beta$
- [0322] DFQATT
- [0323] SEQ ID NO:57-WT-1特异性TCR、CDR2 $\beta$
- [0324] SNEGSKA
- [0325] SEQ ID NO:58-WT-1特异性TCR、CDR3 $\beta$
- [0326] SARDGGEG
- [0327] SEQ ID NO:59-WT-1特异性TCR、CDR3 $\beta$
- [0328] RDGGEGSETQY
- [0329] SEQ ID NO:60-WT-1特异性TCR、 $\alpha$ 链
- [0330] MLLLLVPVLEVIIFTLGGTRAQSVTQLDSHVSVSEGTPVLLRCNYSSSYSPSLFWYVQHPNKGLQLLLKY  
TSAATLVKINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCVVSPPFSGGGADGLT
- [0331] SEQ ID NO:61-WT-1特异性TCR、 $\beta$ 链
- [0332] MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPVWICKSGTXVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSK  
ATYEQVVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAARDGGEG
- [0333] SEQ ID NO:62-WT-1特异性TCR、 $\alpha$ 链
- [0334] MLLLLVPVLEVIIFTLGGTRAQSVTQLDSHVSVSEGTPVLLRCNYSSSYSPSLFWYVQHPNKGLQLLLKY

TSAATLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCVVSPPFSGGGADGLT

[0335] SEQ ID NO:63-WT-1特异性TCR、β链

[0336] MLLLLLLLPGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSK  
ATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARDGGEGSETQY

[0337] 以下是展示本文公开的方法和组合物的实例。应理解,可以实践给出上文提供的一般性说明的各种其它实施例。

[0338] 实例

[0339] 细胞系

[0340] 293T细胞从ATCC获得,而神经母细胞瘤肿瘤细胞系CHLA-255由贝勒医学院(Baylor College of Medicine)(休斯顿,德克萨斯州)的Leonid Metelitsa博士友情提供。在37°C下含5%CO<sub>2</sub>的潮湿气氛下,细胞被维持在具有含10%FBS(即将)、1%GlutaMAX和1%青霉素/链霉抗生物素蛋白(Gibco)的293T的IMDM(Gibco)或CHLA-255的RPMI 1640(Gibco)的培养菌中。

[0341] 实例1-scFv的表征

[0342] 人PD-L1的中和

[0343] 抗PD-L1scFv(参见SEQ ID NO:9)是包括兔CDR的人源化蛋白质。通过竞争ELISA来测试其抑制PD-L1与PD-1结合的能力。简而言之,将rhPD-L1Fc融合物涂覆到96孔微孔板上。封闭后,将scFv的连续稀释液添加到板中并且在室温下孵育1小时。用生物素化的PD-1Fc融合物替换一半scFv稀释液,并且用链霉抗生物素蛋白-HRP检测结合的PD-1。

[0344] 类似地,通过使用rhCD80-His竞争ELISA来测试抑制PD-L1与CD80结合的能力。封闭后,用恒定浓度的50nM rhPD-L1Fc融合物制备scFv的连续稀释液。将这种混合物与CD80涂覆的板在室温下孵育2小时。在不存在任何PD-L1-Fc的情况下,通过包含稀释系列的scFv1来确定对应于不结合PD-L1与CD80的背景水平。用山羊抗人IgGfc-HRP来检测结合的PD-L1Fc融合物。在这个测定中,PD-L1与CD80相互作用的能力生成吸光度信号,所述吸光度信号通过scFv有效地中和到背景水平。总之,这些结果指示scFv阻断PD-L1与PD-1和CD80的相互作用。

[0345] 稳定性

[0346] 可以观察到,两种不同的过程可能影响scFv的稳定性。首先,scFv可能易于二聚化,通常随后是低聚反应以及进一步的聚集和沉淀。其次,随着时间的推移,可能发生scFv降解从而导致较小的片段。

[0347] 研究了在不同温度条件(4°C、22°C、37°C和-20°C)下储存时在10mg/mL浓度下在pH 7.2的PBS下配制的scFv的稳定性。在4°C、22°C和37°C下储存2周后,仅观察到少量的scFv二聚化或高分子量分子的形成。在37°C下储存1或2周后,scFv分别形成1.8%和2.7%的二聚体。

[0348] 通过差示扫描荧光测定法(DSF)在实时PCR装置(Corbett、Rotor-Gene)中评估热稳定性。使用Rotor-Gene 6000系列软件1.7计算的scFv的中点熔解温度(T<sub>m</sub>)为81.5°C。

[0349] 蛋白质生物制剂可能在制造、储存和运输过程中暴露于冻/融应激,这可能导致聚集和降解。为了评估抗PD-L1scFv在冻/融周期期间的稳定性,在1.5mL聚丙烯管中在10mg/mL下在pH 7.2的PBS下进行配制。将小瓶浸入液氮中,然后在室温下于水浴中孵育。离心后,

通过SE-HPLC分析上清液。在10次冻/融周期后几乎100%的scFv保持单体,并且没有观察到蛋白质损失或沉淀。

[0350] 通过ELISA评估抗PD-L1scFv在人血清(Sigma-Aldrich,目录号H4522)中的稳定性。在37°C下与人血清孵育长达20小时后,scFv的结合活性没有丧失。

[0351] scFv和全长抗体的动力学排除测定

[0352] 单价抗体和二价抗体对PD-L1的亲合力通过动力学排除测定(KinExA®)和KinExA3200(Sapidyne Instruments,美国,目录号5001)确定。KinExA®测量溶液中未修饰分子之间的平衡结合亲和力和动力学。测量需要将一个相互作用配偶体固定在固相上以用作探针来确定溶液中相应结合配偶体的浓度。

[0353] a) 单价抗体

[0354] 在室温下于pH7.4的PBS中以0.02%叠氮化钠确定scFv对PD-L1-Fc融合物的亲合力。测量两条曲线,一条使用20pM scFv1,孵育时间为5小时,并且另一条曲线为10pMscFv1,孵育时间为9小时。使用KinExA® Pro软件版本4.1.9或4.2.10的“n曲线分析”计算的scFv的KD值为8.8pM。

[0355] b) 二价抗体

[0356] 将scFv重新格式化为IgG格式,并且在最初从ATCC接收的适应悬浮的CHO K1细胞中表达,并且适应于在悬浮培养菌中的无血清生长。通过蛋白A层析纯化IgG抗体,然后进行大小排阻层析。使用两条曲线在室温下于pH7.4的PBS中以0.02%叠氮化钠计算结合PD-L1-His的KD。一条曲线使用100pM的IgG,孵育时间为5小时,并且另一条曲线使用10pM的IgG,孵育时间为10小时。计算IgG与人PD-L1结合的KD值为2.77pM。结果表明IgG结合PD-L1的亲合力比scFv与PD-L1的亲合力强约3倍。

[0357] 选择性

[0358] 使用来自人(RnD Systems,美国,目录号156-B7)、大鼠(义翘神州科技有限公司,中国,目录号80450-R02H)或

[0359] 猴(义翘神州科技有限公司,中国,目录号90251-C02H),通过ELISA来确定scFv与来自其它物种的PD-L1的交叉反应性。结果指示scFv特异性结合人PD-L1和猴PD-L1,但不与大鼠PD-L1结合。使用KinExA®进一步研究抗PD-L1scFv与猴PD-L1的交叉反应性。使用两条曲线在室温下于pH7.4的PBS中以0.02%叠氮化钠计算KD值。一条曲线使用50pM的scFv,孵育时间为6小时,另一条曲线使用10pM的scFv,孵育时间为16小时。针对scFv计算的KD值为3.3pM。结果表明scFv与猴PD-L1结合的亲合力比与人PD-L1结合的亲合力大约2.7倍。

[0360] 使用rhPD-L1Fc融合物(RnD Systems,美国,目录号156-B7)、rhPD-L2Fc融合物(RnD Systems,美国,目录号1224-PL)或rhB7-H3Fc融合物(RnD Systems,美国,目录号1027-B3),通过ELISA确定scFv与共享类似于PD-L1的序列的重组人蛋白的交叉反应性。结果指示scFv特异性结合人PD-L1,与人PD-L2或B7-H3无交叉反应。

[0361] 与细胞表面PD-L1结合

[0362] 通过ES-2细胞的胞外FACS染色(ATCC,美国,目录号CRL-1978)来确定scFv与细胞表面上的PD-L1结合的能力。结果表明scFv能够特异性地识别在细胞表面上表达的PD-L1的天然形式。

[0363] 使用KinExA®在室温下于pH7.4的PBS中以0.02%叠氮化钠进一步研究scFv与细胞表面PD-L1的结合。使用50pM scFv和5小时的孵育时间构建一条曲线。与ES-2细胞上表达的PD-L1的细胞表面结合的scFv的计算KD值为12.8pM。

[0364] 实例2-对抗PD-L1scFv进行编码的逆转录病毒构建体的生成和逆转录病毒产生

[0365] 用以下引物通过PCR扩增对抗PD-L1scFv进行编码的DNA：正向：5'-T A A C C A T G G A G T T T G G G C T G A G - 3' (SEQ ID NO:11) 和反向：5'-G A C G C A T G C T C A G C T C G A C A C G G T G A C C - 3' (SEQ ID NO:12) 以在5'末端(正向引物)处添加NcoI限制性位点和在3'末端(反向引物)处添加终止密码子TGA和限制性位点SphI。用NcoI和SphI消化PCR产物和逆转录病毒骨架SFG(I) eGFP并且进行连接。对插入物进行测序以确认在克隆过程中没有发生突变。最终的载体被命名为SFG.scFv.抗PD-L1(I) eGFP(参见图1)。在IRES上表达的报告基因GFP用于评估转导效率。通过用逆转录病毒载体和分别对gag-pol和RDF包膜进行编码的的两种质粒转染293T细胞来制备瞬时逆转录病毒上清液。48小时收集的上清液用于转导与健康供体分离的活化的T细胞。先前描述了对靶向包含CD28(CAR.CD28或CAR.28)或4-1BB(CAR.41BB或CAR.BB)胞内域的GD2抗原(GD2.CAR)的CAR进行编码的逆转录病毒载体(Heczey A.等人,《血液(Blood)》2014年10月30日;第124卷,第18期,第2824到2833页)。所述CAR包括SEQ ID NO:16到21的CDR序列。

[0366] 实例3-产生抗PD-L1scFv的CAR T细胞的产生和扩增

[0367] 通过Lymphoprep(Fresenius)密度梯度离心法来分离来自健康人供体的外周血单核细胞(PBMC)。在存在IL-7(10ng/mL)和IL-15(5ng/mL)(来自PeproTech)的情况下,原代T细胞在含有44%Click's培养基(Irvine Scientific)、44%RPMI1640(Hyclone)、10%FBS(Hyclone)、1%谷氨酰胺和1%青霉素/链霉素/抗生物素蛋白的完整T细胞培养基中进行培养。在没有细胞因子的T细胞培养基中,以 $0.5 \times 10^6$ 细胞/mL的浓度在24孔板中用固定化抗CD3(1mcg/mL)(Miltenyi,目录号:130-093-387)和抗CD28(1mcg/mL)(BD Biosciences,目录号:555725)激活T细胞。刺激后二十四小时,将IL-7和IL-15添加到培养基中。到第2天,用逆转录病毒上清液SFG.scFv.抗PD-L1(I) eGFP和/或GD2.CAR(在纤维连接蛋白涂覆的24孔板中的1mL/孔的逆转录病毒上清液)转导T细胞。为了产生表达GD2.CAR和释放抗PD-L1scFv的T细胞,已经进行了与两种逆转录病毒构建体的共转导(1mL/孔的GD2.CAR上清液加1mL/孔的抗PD-L1scFv)。将非转导(NT)T细胞以相同浓度( $0.25 \times 10^6$ 细胞/mL)接种于涂覆有纤维连接蛋白的非组织培养板中。转导后七十二小时,洗涤T细胞、计数并且悬浮在 $1 \times 10^6$ 细胞/mL下IL-7/IL-15的完全T细胞培养基中。将T细胞体外扩增5天,并且然后通过流式细胞术分析以评估转导效率和T细胞组分。在起始后十一天到十二天,在功能测定中测试T细胞。

[0368] 实例4-用GD2.CAR和SFG.scFv.抗PD-L1载体共转导的T细胞表达GD2.CAR和抗PD-L1 scFv两者

[0369] 使用针对CD3、CD4、CD8、CD60L、CD45RA、CD95、CD27、CD2、PD-L1(BDBioscience或Biolegend)的mAb评估T细胞的表型。使用抗独特型1A7mAb检测GD2.CAR表达,然后用次级大鼠抗小鼠-IgG1-PE mAb(BD Bioscience)染色。通过测量GFP表达来评估SFG.scFv.抗PD-L1(I) eGFP载体的转导效率。GD2.CAR相对荧光强度(RFI)被计算为CAR T细胞的平均荧光强度(MFI)除以未转导的T细胞的MFI。如图2所示,在不改变CD4/CD8比例的情况下,用实例2的抗PD-L1scFv逆转录病毒构建体成功地转导CD4T细胞和CD8T细胞。T细胞在双逆转录病毒转导

后共表达GD2.CAR和eGFP抗PD-L1(图3)。用抗PD-L1scFv的转导不影响T细胞增殖(图4)。此外,抗PD-L1 scFv的表达不影响T细胞亚群组成(图5)。这个实例表明了共表达抗GD2CAR和抗PD-L1scFv的CAR T细胞的产生。

[0370] 实例5-用SFG.scFv.抗PD-L1载体转导的T细胞在通过内源性TCR/CD3复合物活化后释放功能活性的抗PD-L1 scFv

[0371] 为了测试T细胞是否能够分泌抗PD-L1scFv,通过内源性TCR刺激细胞。将未转导的T细胞或抗PD-L1scFv转导的T细胞接种于未涂覆的或用固定化抗CD3(1ug/ml,Miltenyi)和抗CD28(1ug/ml,BD Biosciences)抗CD3/CD28抗CD3/CD28抗体在以2mL/孔的T细胞具有10%FBS的 $0.5 \times 10^6$ 细胞/mL的浓度下涂覆的组织培养物处理的24孔板中。18小时后,收集1mL上清液以使用特异性夹心ELISA测定量化通过T细胞释放的抗PD-L1scFv。小鼠来源的一对匹配的抗scFv单克隆抗体用于这个夹心ELISA。如图6A所示,在用固定的抗CD3/抗CD28抗体刺激后,通过转导的T细胞来释放抗PD-L1scFv。这些T细胞表达其天然内源性TCR/CD3复合物。结果表明,通过内源性TCR/CD3复合物活化的转导的T细胞足以诱导抗PD-L1scFv的合成和胞外分泌。定量ELISA示出了大量分泌的抗PD-L1scFv(图6A)。未转导的细胞不分泌scFv。由于抗PD-L1scFv在逆转录病毒载体的组成性活性5'LTR的控制下,因此接种于未涂覆的孔上的转导的T细胞释放基础水平的抗PD-L1scFv,然而所述抗PD-L1scFv明显地增加了T细胞活性。

[0372] 由活化的T细胞产生的抗PD-L1scFv能够结合固定的PD-L1(图6B)。简而言之,将重组人PD-L1-Fc(R&D Systems)以2ug/mL的浓度固定在PBS中的微孔板上。之后,用5%脱脂奶粉阻断,添加增加浓度的scFv,并且通过蛋白质L-HRP(Sigma-Aldrich)来检测。图6B示出了T细胞产生的抗PD-L1scFv与PD-L1结合,大肠杆菌中产生的抗PD-L1 scFv被同样用作参考对照物。这些数据表明转导的T细胞在通过内源性TCR活化后大量释放功能活性的抗PD-L1scFv。这些数据还表明,当转导的T细胞通过遗传修饰的TCR并且通过CAR活化时,所述转导的T细胞将容易地分泌抗PD-L1scFv。

[0373] 实例6-用GD2.CAR-4-1BB和SFG.scFv.抗PD-L1载体共转导的T细胞具有增强的肿瘤杀伤活性

[0374] 在没有外源细胞因子的情况下,在24孔板中以效应子:靶(E:T)比率1:5将转导的和未转导的T细胞( $0.5 \times 10^5$ 细胞/孔)与肿瘤细胞系CHLA-255( $2.5 \times 10^5$ 细胞/孔)共培养。共培养7天后,收获T细胞并且进行计数。如果残留肿瘤细胞的百分比为<5%(通过流式细胞术评估),则以相同的1:5E:T比率将T细胞与新鲜肿瘤细胞重新接种以进行第二次共培养周期。经过额外的7天到8天后,然后收集细胞并且通过流式细胞术分析以计数T细胞和残留的肿瘤细胞。具体地,CD3和GD2抗体分别用于染色T细胞和肿瘤细胞。CountBright珠(Invitrogen)用于通过流式细胞术进行细胞计数。培养24小时后还收集上清液以根据制造商的说明通过ELISA(R&D System)测量IFN $\gamma$ 释放。

[0375] 具有用抗PD-L1scFv转导的4-1BB胞内域的GD2.CAR T细胞示出在共培养的第二周期(培养14天)中更好地杀伤肿瘤细胞(图7)并且与没有抗PD-L1scFv的GD2.CAR T细胞相比,在与肿瘤细胞共培养(培养14天)的第二周期(图8)中产生更高水平的IFN $\gamma$ 。因此,在4-1BB共刺激的情况下,重复接合肿瘤细胞的GD2.CAR T细胞耗尽发生,而在存在抗PD-L1scFv的情况下,保护CAR T细胞免于耗尽,并且可以在体内提供延长的抗肿瘤活性并且防止肿瘤复

发。

[0376] 尽管示出并描述了本发明的当前优选的实施例,但是应当理解的是,本发明不限于此,而可以以其它方式不同地实践并且在以下权利要求的范围内进行实践。由于本发明的许多修饰和替代性实施例对于本领域技术人员而言将是显而易见的,因此这个说明将仅被解释为说明性的并且出于教导本领域技术人员的目的是实现本发明的最佳模式。因此,可以认为所有合适的修饰和等同物都落入以下权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 细胞医学瑞士公司
- [0003] 北卡罗来纳大学教堂山分校
- [0004] <120> 用于免疫疗法的经修饰细胞
- [0005] <130> P1702WOF
- [0006] <150> EP16020057.2
- [0007] <151> 2016-02-25
- [0008] <160> 63
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 114
- [0012] <212> PRT
- [0013] <213> 人工序列
- [0014] <220>
- [0015] <223> scFv的VL
- [0016] <400> 1
- [0017] Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0018] 1                    5                    10                    15
- [0019] Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Leu
- [0020]                    20                    25                    30
- [0021] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
- [0022]                    35                    40                    45
- [0023] Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
- [0024]                    50                    55                    60
- [0025] Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
- [0026] 65                    70                    75                    80
- [0027] Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ser Ser Ser
- [0028]                    85                    90                    95
- [0029] Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val
- [0030]                    100                    105                    110
- [0031] Leu Gly
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 120
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <220>
- [0037] <223> scFv的VH
- [0038] <400> 2



[0078] <212> PRT  
 [0079] <213> 家兔  
 [0080] <400> 6  
 [0081] Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 [0082] 1 5  
 [0083] <210> 7  
 [0084] <211> 16  
 [0085] <212> PRT  
 [0086] <213> 家兔  
 [0087] <400> 7  
 [0088] Ile Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 [0089] 1 5 10 15  
 [0090] <210> 8  
 [0091] <211> 12  
 [0092] <212> PRT  
 [0093] <213> 家兔  
 [0094] <400> 8  
 [0095] Gly Arg Tyr Thr Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Ala Leu  
 [0096] 1 5 10  
 [0097] <210> 9  
 [0098] <211> 254  
 [0099] <212> PRT  
 [0100] <213> 人工序列  
 [0101] <220>  
 [0102] <223> scFv  
 [0103] <400> 9  
 [0104] Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0105] 1 5 10 15  
 [0106] Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Leu  
 [0107] 20 25 30  
 [0108] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0109] 35 40 45  
 [0110] Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0111] 50 55 60  
 [0112] Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0113] 65 70 75 80  
 [0114] Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Tyr Gly Ser Ser Ser  
 [0115] 85 90 95  
 [0116] Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val

[0117]	100	105	110
[0118]	Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
[0119]	115	120	125
[0120]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly		
[0121]	130	135	140
[0122]	Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly		
[0123]	145	150	155
[0124]	Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
[0125]	165	170	175
[0126]	Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr		
[0127]	180	185	190
[0128]	Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser		
[0129]	195	200	205
[0130]	Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0131]	210	215	220
[0132]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Thr Gly Tyr Pro Tyr Tyr		
[0133]	225	230	235
[0134]	Phe Ala Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0135]	245	250	
[0136]	<210> 10		
[0137]	<211> 20		
[0138]	<212> PRT		
[0139]	<213> 人工序列		
[0140]	<220>		
[0141]	<223> 连接子		
[0142]	<400> 10		
[0143]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
[0144]	1	5	10
[0145]	Gly Gly Gly Ser		
[0146]	20		
[0147]	<210> 11		
[0148]	<211> 22		
[0149]	<212> DNA		
[0150]	<213> 人工序列		
[0151]	<220>		
[0152]	<223> 正向引物		
[0153]	<400> 11		
[0154]	taaccatgga gtttgggctg ag 22		
[0155]	<210> 12		

[0156] <211> 28  
 [0157] <212> DNA  
 [0158] <213> 人工序列  
 [0159] <220>  
 [0160] <223> 反向引物  
 [0161] <400> 12  
 [0162] gacgcatgct cagctcgaca cggtgacc 28  
 [0163] <210> 13  
 [0164] <211> 114  
 [0165] <212> PRT  
 [0166] <213> 人工序列  
 [0167] <220>  
 [0168] <223> 14g2a scFv的VL序列  
 [0169] <400> 13  
 [0170] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0171] 1 5 10 15  
 [0172] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg  
 [0173] 20 25 30  
 [0174] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0175] 35 40 45  
 [0176] Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0177] 50 55 60  
 [0178] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0179] 65 70 75 80  
 [0180] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0181] 85 90 95  
 [0182] Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 [0183] 100 105 110  
 [0184] Lys Arg  
 [0185] <210> 14  
 [0186] <211> 113  
 [0187] <212> PRT  
 [0188] <213> 人工序列  
 [0189] <220>  
 [0190] <223> 14g2a scFv的VH序列  
 [0191] <400> 14  
 [0192] Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala  
 [0193] 1 5 10 15  
 [0194] Ser Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Gly Tyr

[0195]	20	25	30
[0196]	Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile		
[0197]	35	40	45
[0198]	Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0199]	50	55	60
[0200]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0201]	65	70	75
[0202]	Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0203]	85	90	95
[0204]	Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser		
[0205]	100	105	110
[0206]	Ser		
[0207]	<210> 15		
[0208]	<211> 18		
[0209]	<212> PRT		
[0210]	<213> 人工序列		
[0211]	<220>		
[0212]	<223> hIgG1信号肽		
[0213]	<400> 15		
[0214]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly		
[0215]	1	5	10
[0216]	Val Gln		
[0217]	<210> 16		
[0218]	<211> 16		
[0219]	<212> PRT		
[0220]	<213> 人工序列		
[0221]	<220>		
[0222]	<223> 抗GD2-CAR的CDR-L1		
[0223]	<400> 16		
[0224]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His		
[0225]	1	5	10
[0226]	<210> 17		
[0227]	<211> 7		
[0228]	<212> PRT		
[0229]	<213> 人工序列		
[0230]	<220>		
[0231]	<223> 抗GD2-CAR的CDR-L2		
[0232]	<400> 17		
[0233]	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser		

[0234] 1 5  
 [0235] <210> 18  
 [0236] <211> 10  
 [0237] <212> PRT  
 [0238] <213> 人工序列  
 [0239] <220>  
 [0240] <223> 抗GD2-CAR的CDR-L3  
 [0241] <400> 18  
 [0242] Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Leu Thr  
 [0243] 1 5 10  
 [0244] <210> 19  
 [0245] <211> 9  
 [0246] <212> PRT  
 [0247] <213> 人工序列  
 [0248] <220>  
 [0249] <223> 抗GD2-CAR的CDR-H1  
 [0250] <400> 19  
 [0251] Ser Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn  
 [0252] 1 5  
 [0253] <210> 20  
 [0254] <211> 17  
 [0255] <212> PRT  
 [0256] <213> 人工序列  
 [0257] <220>  
 [0258] <223> 抗GD2-CAR的CDR-H2  
 [0259] <400> 20  
 [0260] Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 [0261] 1 5 10 15  
 [0262] Gly  
 [0263] <210> 21  
 [0264] <211> 4  
 [0265] <212> PRT  
 [0266] <213> 人工序列  
 [0267] <220>  
 [0268] <223> 抗GD2-CAR的CDR-H3  
 [0269] <400> 21  
 [0270] Gly Met Glu Tyr  
 [0271] 1  
 [0272] <210> 22

[0273] <211> 11  
[0274] <212> PRT  
[0275] <213> 人工序列  
[0276] <220>  
[0277] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-L1  
[0278] <400> 22  
[0279] Arg Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Lys Asn Leu His  
[0280] 1 5 10  
[0281] <210> 23  
[0282] <211> 7  
[0283] <212> PRT  
[0284] <213> 人工序列  
[0285] <220>  
[0286] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-L2  
[0287] <400> 23  
[0288] Tyr Gly Ser Asp Ser Ile Ser  
[0289] 1 5  
[0290] <210> 24  
[0291] <211> 9  
[0292] <212> PRT  
[0293] <213> 人工序列  
[0294] <220>  
[0295] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-L3  
[0296] <400> 24  
[0297] Leu Gln Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
[0298] 1 5  
[0299] <210> 25  
[0300] <211> 9  
[0301] <212> PRT  
[0302] <213> 人工序列  
[0303] <220>  
[0304] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-H1  
[0305] <400> 25  
[0306] Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His  
[0307] 1 5  
[0308] <210> 26  
[0309] <211> 17  
[0310] <212> PRT  
[0311] <213> 人工序列

[0312] <220>  
 [0313] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-H2  
 [0314] <400> 26  
 [0315] Trp Ile Asn Thr Ala Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 [0316] 1 5 10 15  
 [0317] Gly  
 [0318] <210> 27  
 [0319] <211> 4  
 [0320] <212> PRT  
 [0321] <213> 人工序列  
 [0322] <220>  
 [0323] <223> 抗CSPG4 CAR的CDR-H3  
 [0324] <400> 27  
 [0325] Tyr Tyr Asp Tyr  
 [0326] 1  
 [0327] <210> 28  
 [0328] <211> 109  
 [0329] <212> PRT  
 [0330] <213> 人工序列  
 [0331] <220>  
 [0332] <223> 抗CSPG4 CAR的VL序列  
 [0333] <400> 28  
 [0334] Leu Asp Ile Lys Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Val Thr Pro  
 [0335] 1 5 10 15  
 [0336] Gly Glu Thr Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Lys  
 [0337] 20 25 30  
 [0338] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Arg Ser Pro Arg Leu Leu  
 [0339] 35 40 45  
 [0340] Ile Lys Tyr Gly Ser Asp Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Thr  
 [0341] 50 55 60  
 [0342] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Lys  
 [0343] 65 70 75 80  
 [0344] Pro Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ser Thr Pro  
 [0345] 85 90 95  
 [0346] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 [0347] 100 105  
 [0348] <210> 29  
 [0349] <211> 113  
 [0350] <212> PRT



- [0390] <212> PRT  
[0391] <213> 人工序列  
[0392] <220>  
[0393] <223> 抗GPC3 CAR的CDR-L3  
[0394] <400> 32  
[0395] Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr  
[0396] 1 5  
[0397] <210> 33  
[0398] <211> 9  
[0399] <212> PRT  
[0400] <213> 人工序列  
[0401] <220>  
[0402] <223> 抗GPC3 CAR的CDR-H1  
[0403] <400> 33  
[0404] Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His  
[0405] 1 5  
[0406] <210> 34  
[0407] <211> 17  
[0408] <212> PRT  
[0409] <213> 人工序列  
[0410] <220>  
[0411] <223> 抗GPC3 CAR的CDR-H2  
[0412] <400> 34  
[0413] Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys  
[0414] 1 5 10 15  
[0415] Gly  
[0416] <210> 35  
[0417] <211> 6  
[0418] <212> PRT  
[0419] <213> 人工序列  
[0420] <220>  
[0421] <223> 抗GPC3 CAR的CDR-H3  
[0422] <400> 35  
[0423] Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr  
[0424] 1 5  
[0425] <210> 36  
[0426] <211> 113  
[0427] <212> PRT  
[0428] <213> 人工序列

[0429] <220>  
 [0430] <223> 抗GPC3 CAR的VL  
 [0431] <400> 36  
 [0432] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [0433] 1 5 10 15  
 [0434] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 [0435] 20 25 30  
 [0436] Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0437] 35 40 45  
 [0438] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0439] 50 55 60  
 [0440] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0441] 65 70 75 80  
 [0442] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
 [0443] 85 90 95  
 [0444] Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0445] 100 105 110  
 [0446] Arg  
 [0447] <210> 37  
 [0448] <211> 115  
 [0449] <212> PRT  
 [0450] <213> 人工序列  
 [0451] <220>  
 [0452] <223> 抗GPC3 CAR v的VH  
 [0453] <400> 37  
 [0454] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0455] 1 5 10 15  
 [0456] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0457] 20 25 30  
 [0458] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0459] 35 40 45  
 [0460] Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 [0461] 50 55 60  
 [0462] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0463] 65 70 75 80  
 [0464] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0465] 85 90 95  
 [0466] Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0467] 100 105 110

[0468] Val Ser Ser  
 [0469] 115  
 [0470] <210> 38  
 [0471] <211> 115  
 [0472] <212> PRT  
 [0473] <213> 人工序列  
 [0474] <220>  
 [0475] <223> 抗GPC3 CAR的VH  
 [0476] <400> 38  
 [0477] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 [0478] 1 5 10 15  
 [0479] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 [0480] 20 25 30  
 [0481] Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile  
 [0482] 35 40 45  
 [0483] Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 [0484] 50 55 60  
 [0485] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0486] 65 70 75 80  
 [0487] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0488] 85 90 95  
 [0489] Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0490] 100 105 110  
 [0491] Val Ser Ala  
 [0492] 115  
 [0493] <210> 39  
 [0494] <211> 9  
 [0495] <212> PRT  
 [0496] <213> 人工序列  
 [0497] <220>  
 [0498] <223> 抗5T4 CAR的CDR-L1  
 [0499] <400> 39  
 [0500] Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His  
 [0501] 1 5  
 [0502] <210> 40  
 [0503] <211> 17  
 [0504] <212> PRT  
 [0505] <213> 人工序列  
 [0506] <220>

[0507] <223> 抗5T4 CAR的CDR-L2  
 [0508] <400> 40  
 [0509] Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 [0510] 1 5 10 15  
 [0511] Asp  
 [0512] <210> 41  
 [0513] <211> 11  
 [0514] <212> PRT  
 [0515] <213> 人工序列  
 [0516] <220>  
 [0517] <223> 抗5T4 CAR的CDR-L3  
 [0518] <400> 41  
 [0519] Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr  
 [0520] 1 5 10  
 [0521] <210> 42  
 [0522] <211> 11  
 [0523] <212> PRT  
 [0524] <213> 人工序列  
 [0525] <220>  
 [0526] <223> 抗5T4 CAR的CDR-H1  
 [0527] <400> 42  
 [0528] Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala  
 [0529] 1 5 10  
 [0530] <210> 43  
 [0531] <211> 7  
 [0532] <212> PRT  
 [0533] <213> 人工序列  
 [0534] <220>  
 [0535] <223> 抗5T4 CAR的CDR-H2  
 [0536] <400> 43  
 [0537] Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala  
 [0538] 1 5  
 [0539] <210> 44  
 [0540] <211> 9  
 [0541] <212> PRT  
 [0542] <213> 人工序列  
 [0543] <220>  
 [0544] <223> 抗5T4 CAR的CDR-H3  
 [0545] <400> 44

[0546] Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr  
 [0547] 1 5  
 [0548] <210> 45  
 [0549] <211> 108  
 [0550] <212> PRT  
 [0551] <213> 人工序列  
 [0552] <220>  
 [0553] <223> 抗5T4 CAR的VL  
 [0554] <400> 45  
 [0555] Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
 [0556] 1 5 10 15  
 [0557] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 [0558] 20 25 30  
 [0559] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile  
 [0560] 35 40 45  
 [0561] Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly  
 [0562] 50 55 60  
 [0563] Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ala  
 [0564] 65 70 75 80  
 [0565] Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro  
 [0566] 85 90 95  
 [0567] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 [0568] 100 105  
 [0569] <210> 46  
 [0570] <211> 120  
 [0571] <212> PRT  
 [0572] <213> 人工序列  
 [0573] <220>  
 [0574] <223> 抗5T4 CAR的VH  
 [0575] <400> 46  
 [0576] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0577] 1 5 10 15  
 [0578] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 [0579] 20 25 30  
 [0580] Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 [0581] 35 40 45  
 [0582] Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0583] 50 55 60  
 [0584] Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

[0585]	65	70	75	80
[0586]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0587]		85	90	95
[0588]	Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
[0589]		100	105	110
[0590]	Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0591]		115	120	
[0592]	<210> 47			
[0593]	<211> 42			
[0594]	<212> PRT			
[0595]	<213> 人工序列			
[0596]	<220>			
[0597]	<223> 41BB共刺激域			
[0598]	<400> 47			
[0599]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met			
[0600]	1	5	10	15
[0601]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe			
[0602]		20	25	30
[0603]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
[0604]		35	40	
[0605]	<210> 48			
[0606]	<211> 112			
[0607]	<212> PRT			
[0608]	<213> 人工序列			
[0609]	<220>			
[0610]	<223> CD3 胞内域			
[0611]	<400> 48			
[0612]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly			
[0613]	1	5	10	15
[0614]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
[0615]		20	25	30
[0616]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
[0617]		35	40	45
[0618]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
[0619]		50	55	60
[0620]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			
[0621]	65	70	75	80
[0622]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
[0623]		85	90	95

[0624]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0625]	100                          105                          110
[0626]	<210> 49
[0627]	<211> 41
[0628]	<212> PRT
[0629]	<213> 人工序列
[0630]	<220>
[0631]	<223> CD28共刺激域
[0632]	<400> 49
[0633]	Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[0634]	1                          5                          10                          15
[0635]	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[0636]	20                          25                          30
[0637]	Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[0638]	35                          40
[0639]	<210> 50
[0640]	<211> 114
[0641]	<212> PRT
[0642]	<213> 人工序列
[0643]	<220>
[0644]	<223> 存活素特异性TCR、β链
[0645]	<400> 50
[0646]	Asp Ala Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr Gln Phe Gly
[0647]	1                          5                          10                          15
[0648]	Lys Pro Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His Asn Val Met
[0649]	20                          25                          30
[0650]	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu Leu Phe His
[0651]	35                          40                          45
[0652]	Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro Asp Asn Phe
[0653]	50                          55                          60
[0654]	Gln Ser Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp Ile Arg Ser
[0655]	65                          70                          75                          80
[0656]	Pro Gly Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Arg Gly
[0657]	85                          90                          95
[0658]	Asp Ser Thr Ala Glu Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Ser
[0659]	100                          105                          110
[0660]	Ile Leu
[0661]	<210> 51
[0662]	<211> 114

[0663] <212> PRT  
 [0664] <213> 人工序列  
 [0665] <220>  
 [0666] <223> 存活素特异性TCR、 $\alpha$ 链  
 [0667] <400> 51  
 [0668] Gly Glu Ser Val Gly Leu His Leu Pro Thr Leu Ser Val Gln Glu Gly  
 [0669] 1 5 10 15  
 [0670] Asp Asn Ser Ile Ile Asn Cys Ala Tyr Ser Asn Ser Ala Ser Asp Tyr  
 [0671] 20 25 30  
 [0672] Phe Ile Trp Tyr Lys Gln Glu Ser Gly Lys Gly Pro Gln Phe Ile Ile  
 [0673] 35 40 45  
 [0674] Asp Ile Arg Ser Asn Met Asp Lys Arg Gln Gly Gln Arg Val Thr Val  
 [0675] 50 55 60  
 [0676] Leu Leu Asn Lys Thr Val Lys His Leu Ser Leu Gln Ile Ala Ala Thr  
 [0677] 65 70 75 80  
 [0678] Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Glu Thr Val Thr Asp  
 [0679] 85 90 95  
 [0680] Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly Thr Gln Val Val Val Thr  
 [0681] 100 105 110  
 [0682] Pro Asp  
 [0683] <210> 52  
 [0684] <211> 6  
 [0685] <212> PRT  
 [0686] <213> 人工序列  
 [0687] <220>  
 [0688] <223> WT-1特异性TCR、CDR1 $\alpha$   
 [0689] <400> 52  
 [0690] Ser Ser Tyr Ser Pro Ser  
 [0691] 1 5  
 [0692] <210> 53  
 [0693] <211> 7  
 [0694] <212> PRT  
 [0695] <213> 人工序列  
 [0696] <220>  
 [0697] <223> WT-1特异性TCR、CDR2 $\alpha$   
 [0698] <400> 53  
 [0699] Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu  
 [0700] 1 5  
 [0701] <210> 54



[0741] <220>  
 [0742] <223> WT-1特异性TCR、CDR3 $\beta$   
 [0743] <400> 58  
 [0744] Ser Ala Arg Asp Gly Gly Glu Gly  
 [0745] 1 5  
 [0746] <210> 59  
 [0747] <211> 11  
 [0748] <212> PRT  
 [0749] <213> 人工序列  
 [0750] <220>  
 [0751] <223> WT-1特异性TCR、CDR1 $\beta$  v  
 [0752] <400> 59  
 [0753] Arg Asp Gly Gly Glu Gly Ser Glu Thr Gln Tyr  
 [0754] 1 5 10  
 [0755] <210> 60  
 [0756] <211> 124  
 [0757] <212> PRT  
 [0758] <213> 人工序列  
 [0759] <220>  
 [0760] <223> WT-1特异性TCR、 $\alpha$ 链  
 [0761] <400> 60  
 [0762] Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Leu Glu Val Ile Phe Thr Leu Gly  
 [0763] 1 5 10 15  
 [0764] Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser His Val Ser Val  
 [0765] 20 25 30  
 [0766] Ser Glu Gly Thr Pro Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Tyr  
 [0767] 35 40 45  
 [0768] Ser Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Gln  
 [0769] 50 55 60  
 [0770] Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn  
 [0771] 65 70 75 80  
 [0772] Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ser Glu Thr Ser Phe His Leu Thr  
 [0773] 85 90 95  
 [0774] Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Val Val  
 [0775] 100 105 110  
 [0776] Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr  
 [0777] 115 120  
 [0778] <210> 61  
 [0779] <211> 116

[0780] <212> PRT  
 [0781] <213> 人工序列  
 [0782] <220>  
 [0783] <223> WT-1特异性TCR、β链  
 [0784] <220>  
 [0785] <221> misc\_feature  
 [0786] <222> (32)..(32)  
 [0787] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 [0788] <400> 61  
 [0789] Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala  
 [0790] 1 5 10 15  
 [0791] Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Xaa  
 [0792] 20 25 30  
 [0793] Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe  
 [0794] 35 40 45  
 [0795] Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser  
 [0796] 50 55 60  
 [0797] Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys  
 [0798] 65 70 75 80  
 [0799] Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr  
 [0800] 85 90 95  
 [0801] Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Asp  
 [0802] 100 105 110  
 [0803] Gly Gly Glu Gly  
 [0804] 115  
 [0805] <210> 62  
 [0806] <211> 124  
 [0807] <212> PRT  
 [0808] <213> 人工序列  
 [0809] <220>  
 [0810] <223> WT-1特异性TCR、α链v  
 [0811] <400> 62  
 [0812] Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Leu Glu Val Ile Phe Thr Leu Gly  
 [0813] 1 5 10 15  
 [0814] Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser His Val Ser Val  
 [0815] 20 25 30  
 [0816] Ser Glu Gly Thr Pro Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Tyr  
 [0817] 35 40 45  
 [0818] Ser Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Gln

[0819]	50	55	60
[0820]	Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn		
[0821]	65	70	75 80
[0822]	Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ser Glu Thr Ser Phe His Leu Thr		
[0823]	85	90	95
[0824]	Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Val Val		
[0825]	100	105	110
[0826]	Ser Pro Phe Ser Gly Gly Gly Ala Asp Gly Leu Thr		
[0827]	115	120	
[0828]	<210> 63		
[0829]	<211> 121		
[0830]	<212> PRT		
[0831]	<213> 人工序列		
[0832]	<220>		
[0833]	<223> WT-1特异性TCR、β链v		
[0834]	<400> 63		
[0835]	Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala		
[0836]	1 5 10 15		
[0837]	Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser		
[0838]	20 25 30		
[0839]	Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe		
[0840]	35 40 45		
[0841]	Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser		
[0842]	50 55 60		
[0843]	Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys		
[0844]	65 70 75 80		
[0845]	Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr		
[0846]	85 90 95		
[0847]	Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Asp		
[0848]	100 105 110		
[0849]	Gly Gly Glu Gly Ser Glu Thr Gln Tyr		
[0850]	115 120		

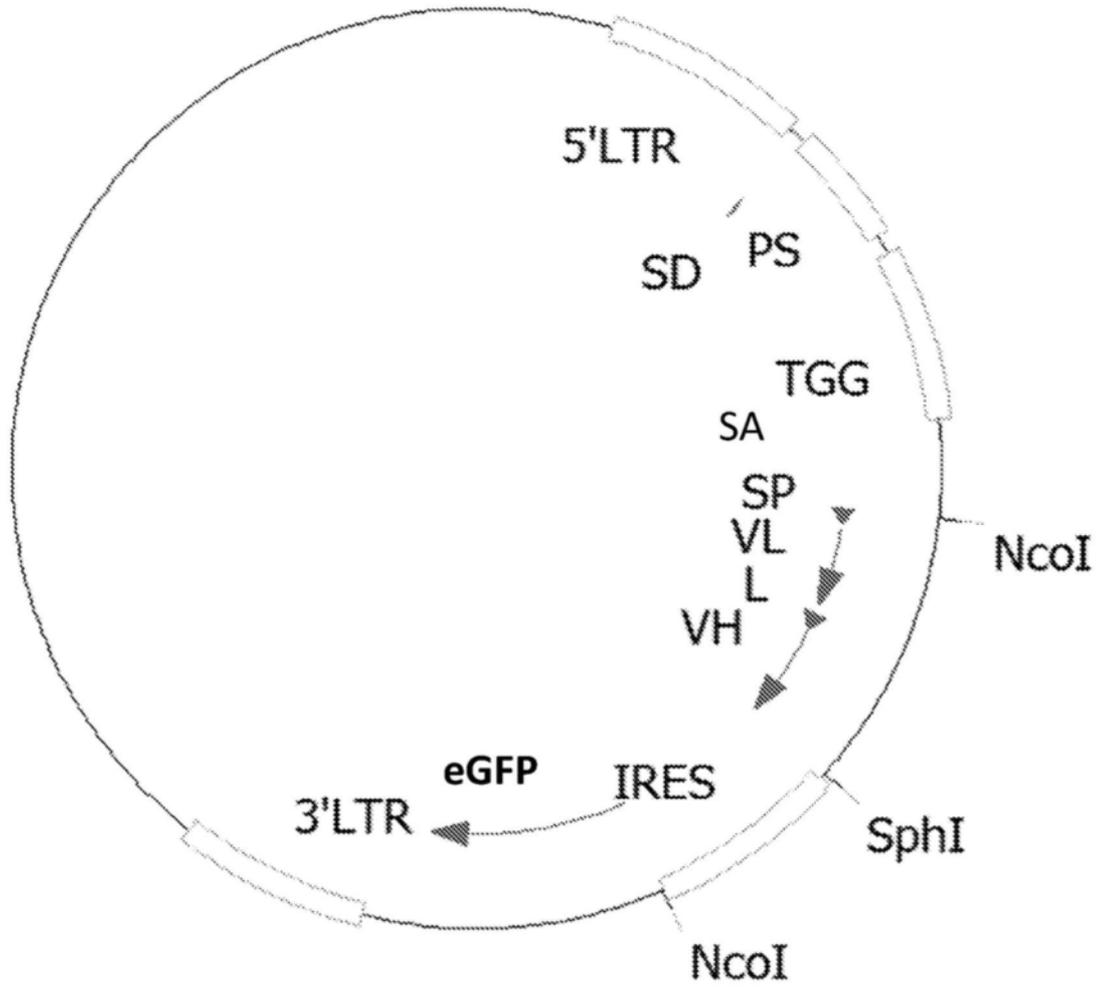


图1

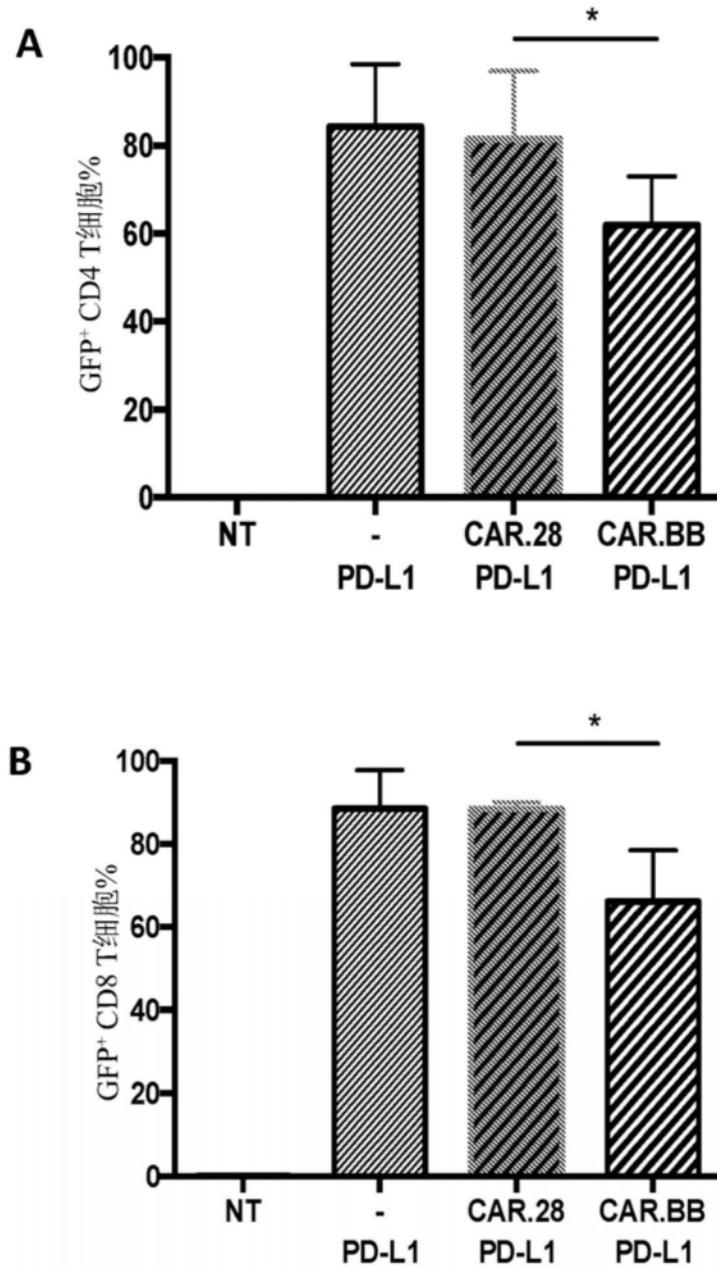


图2

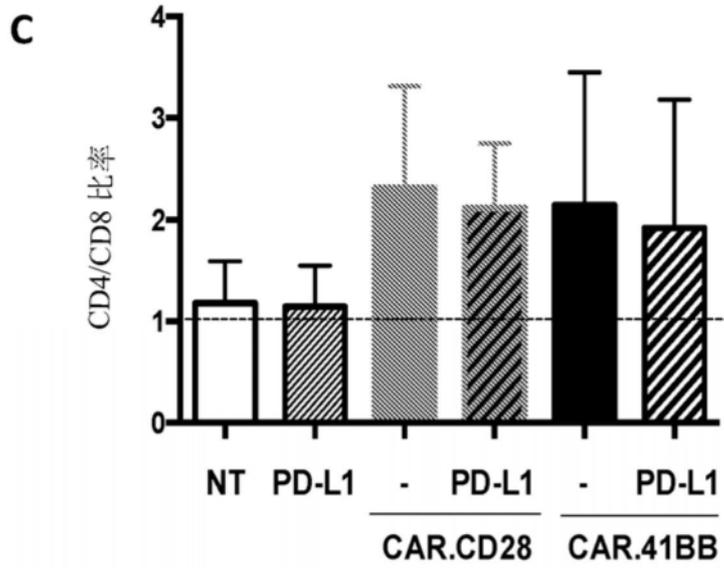


图2

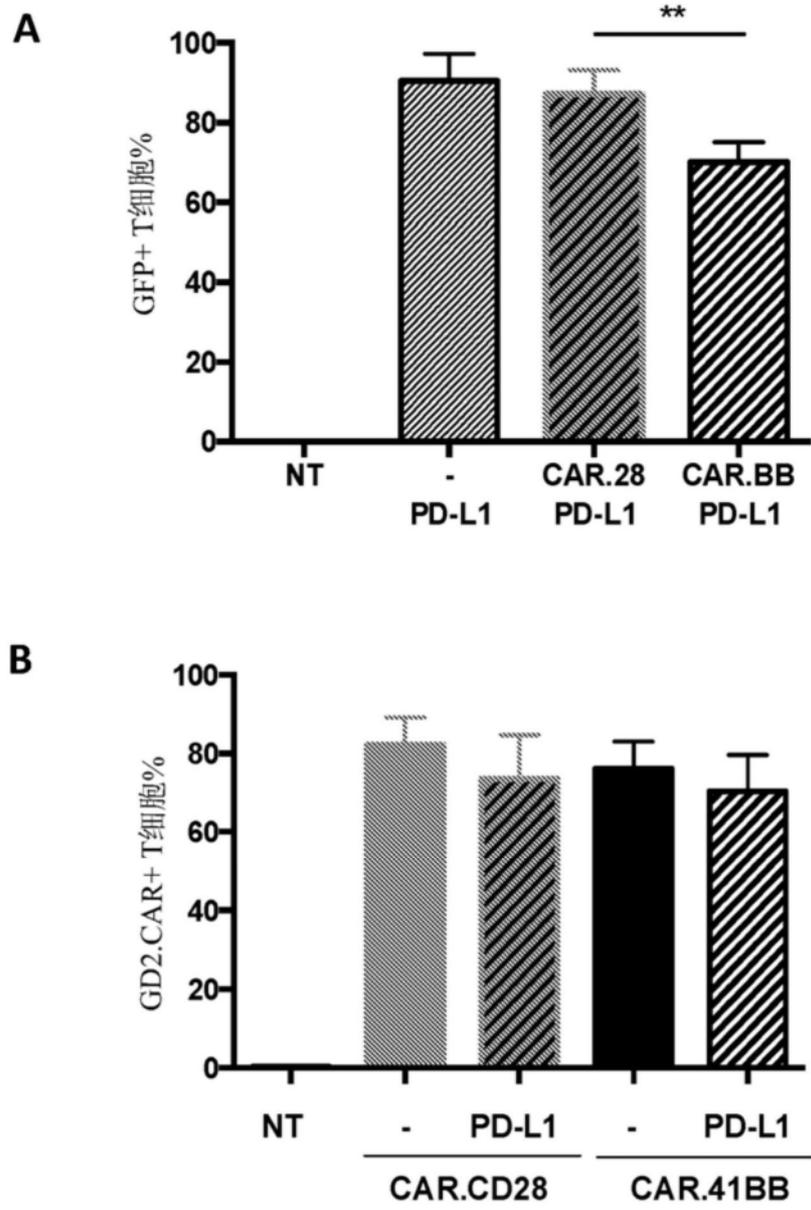


图3

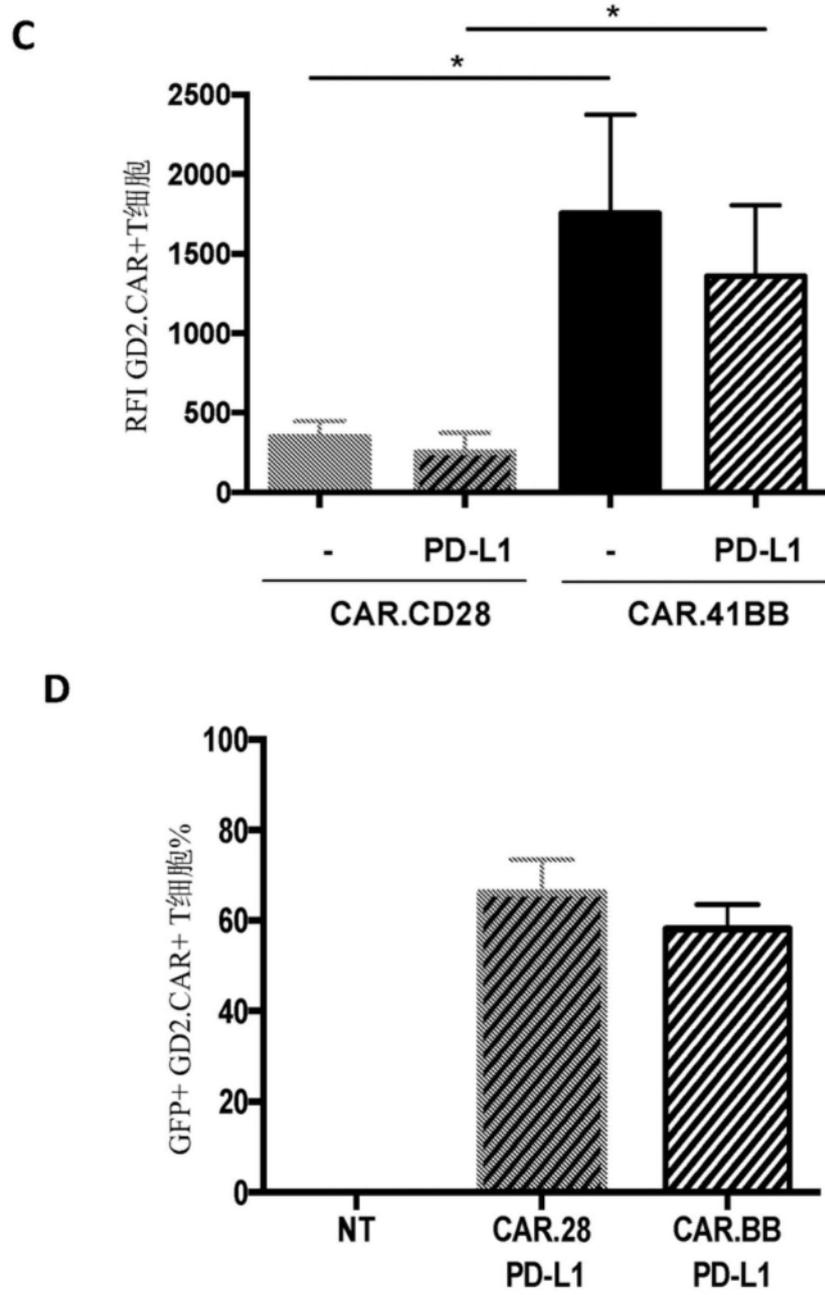


图3

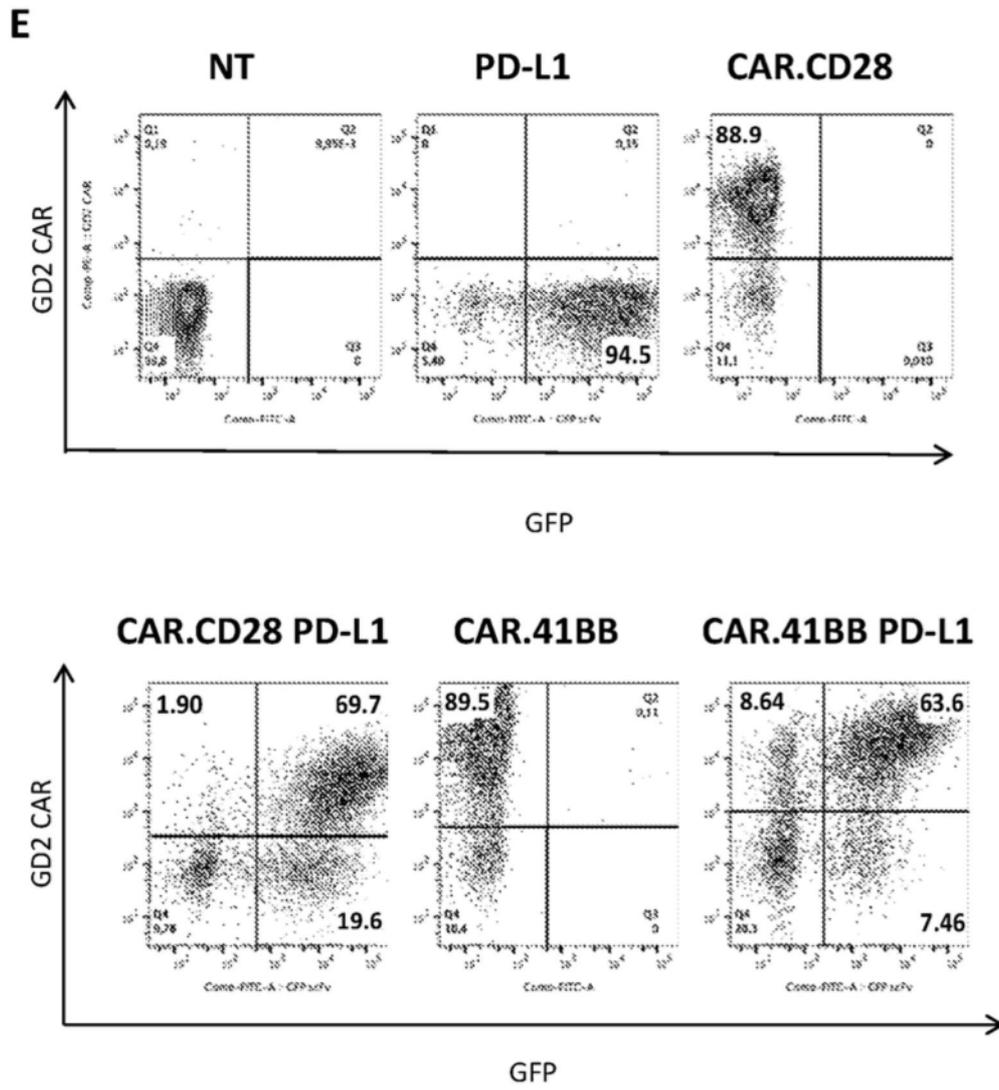


图3

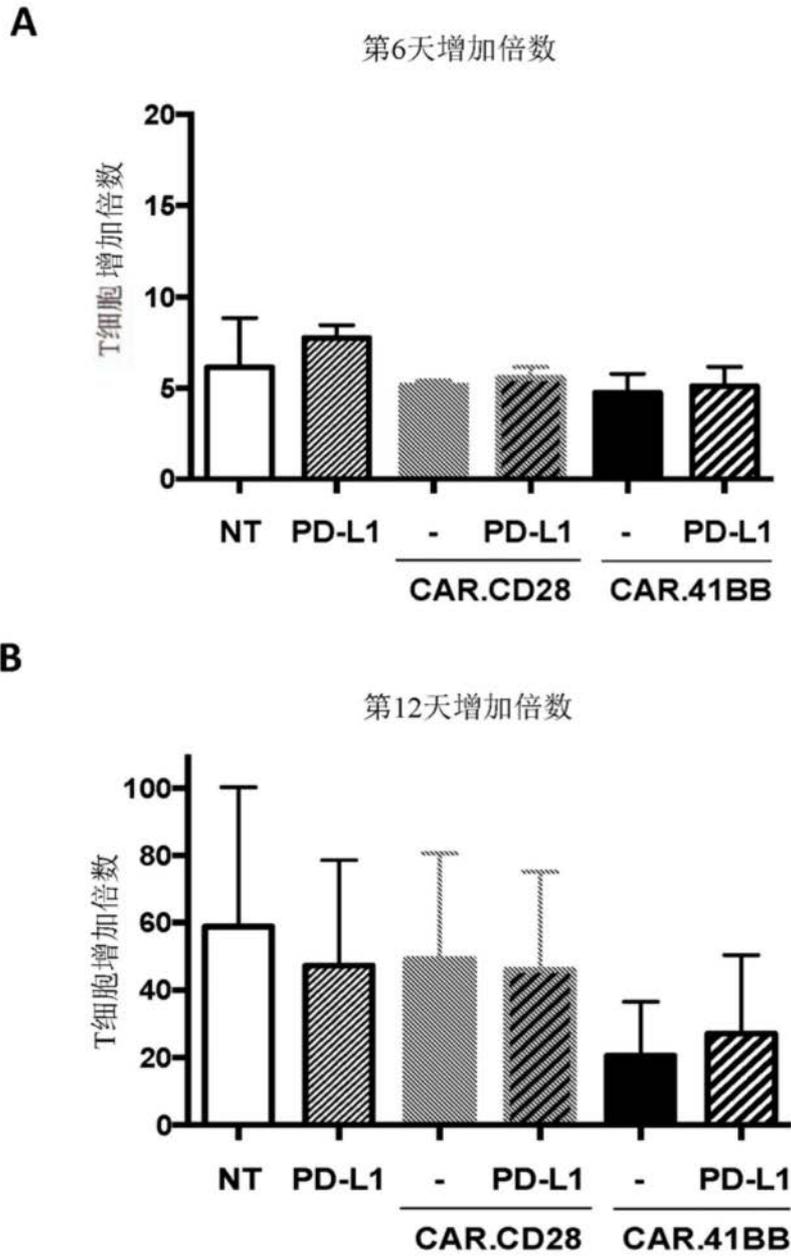


图4

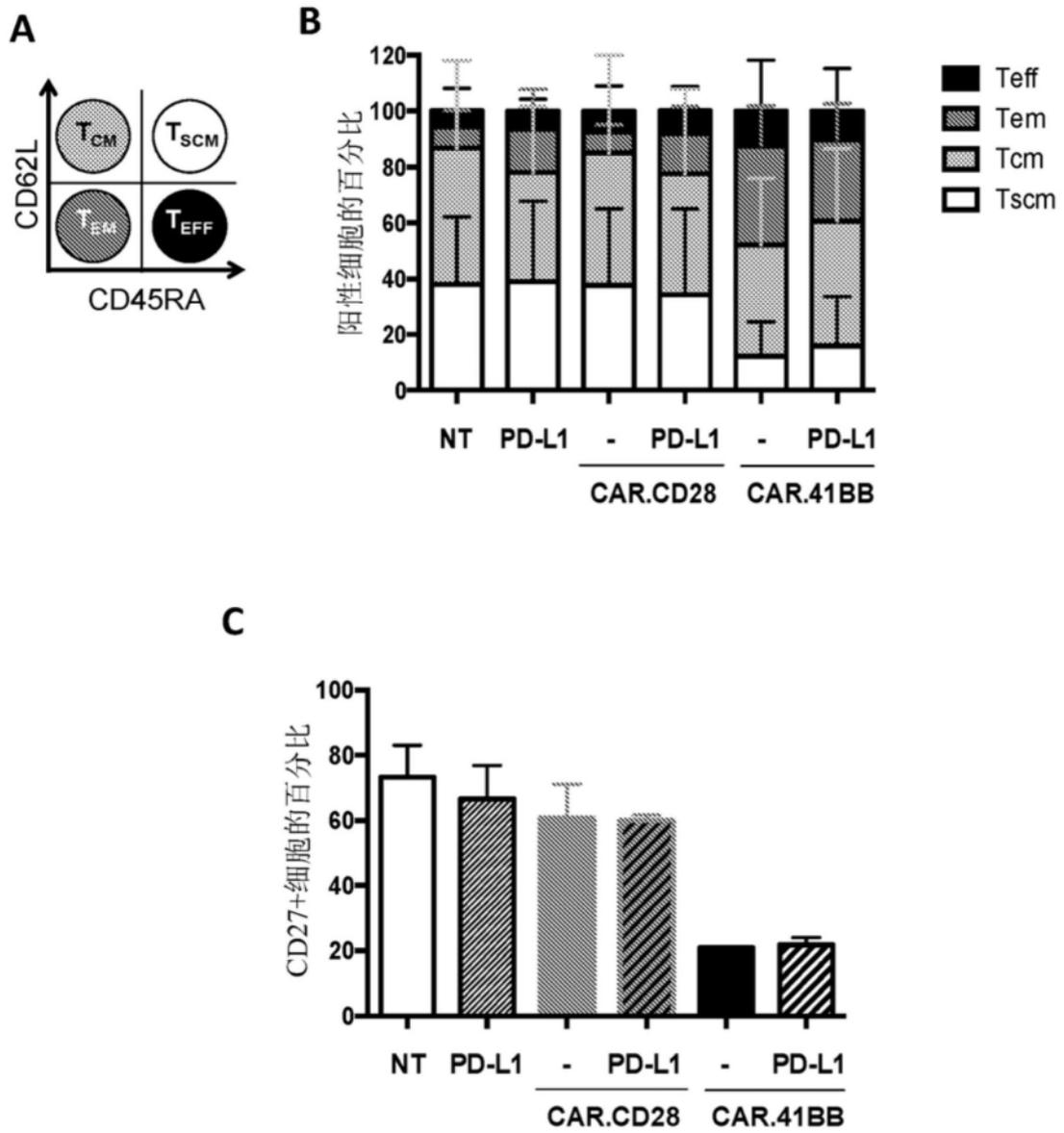
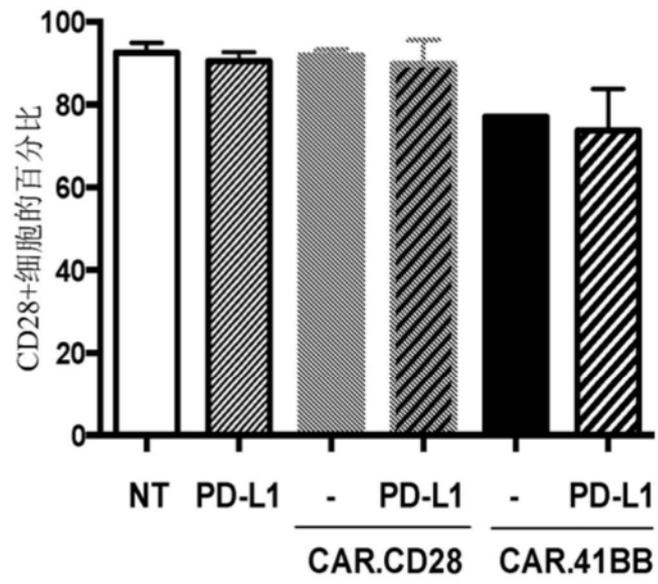


图5

D



E

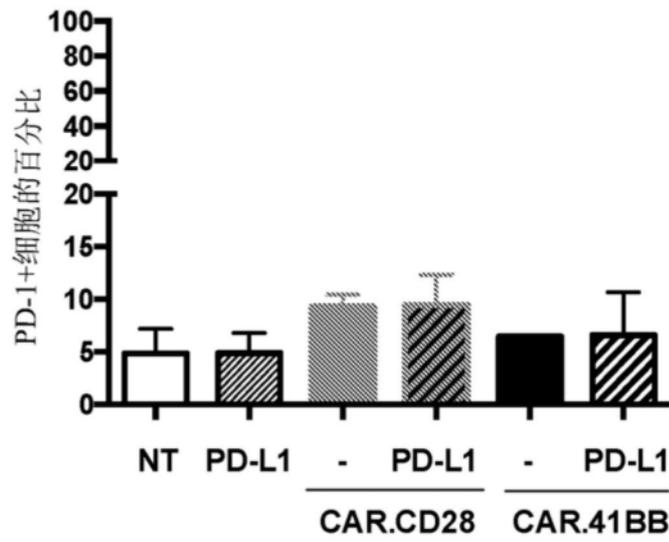


图5

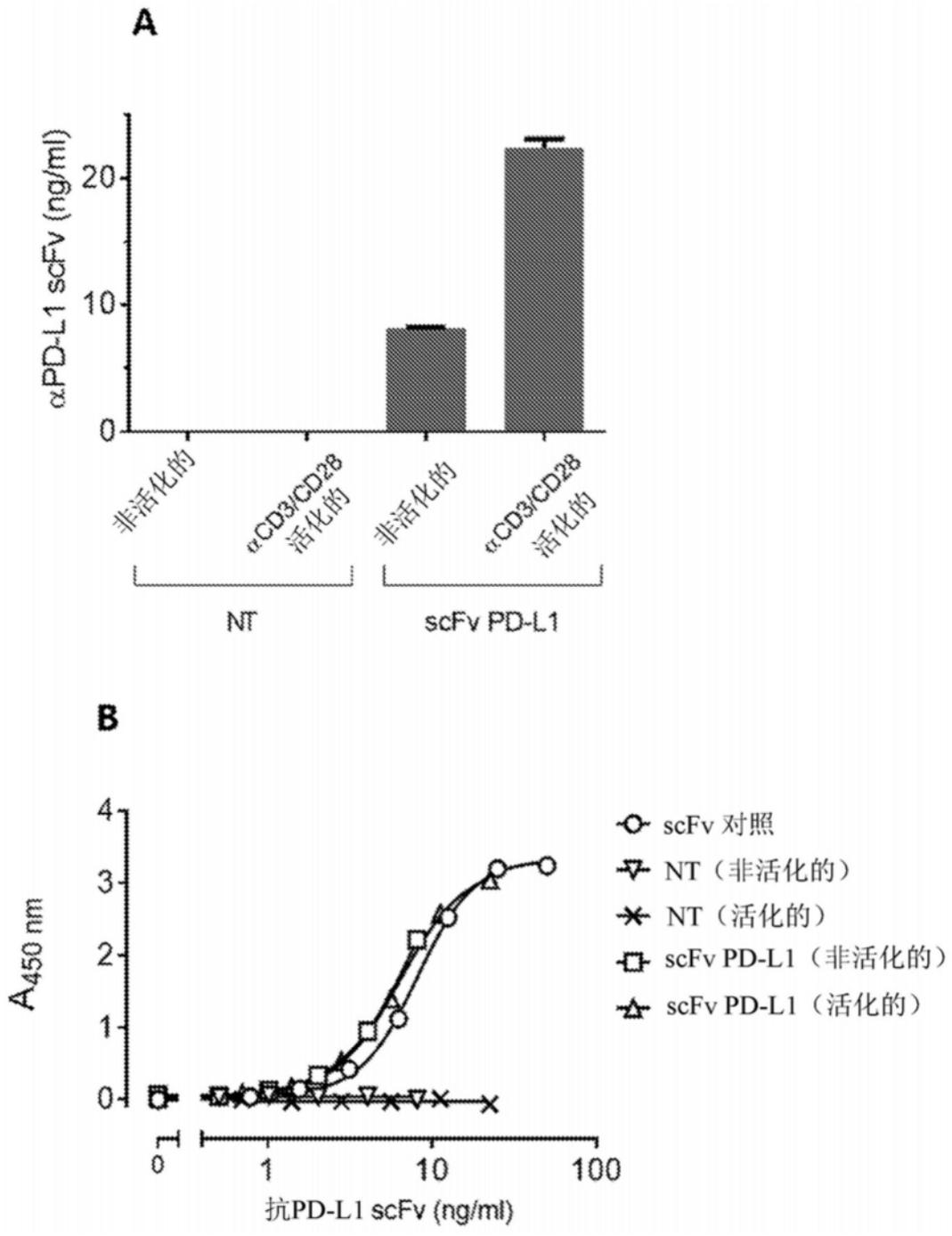


图6

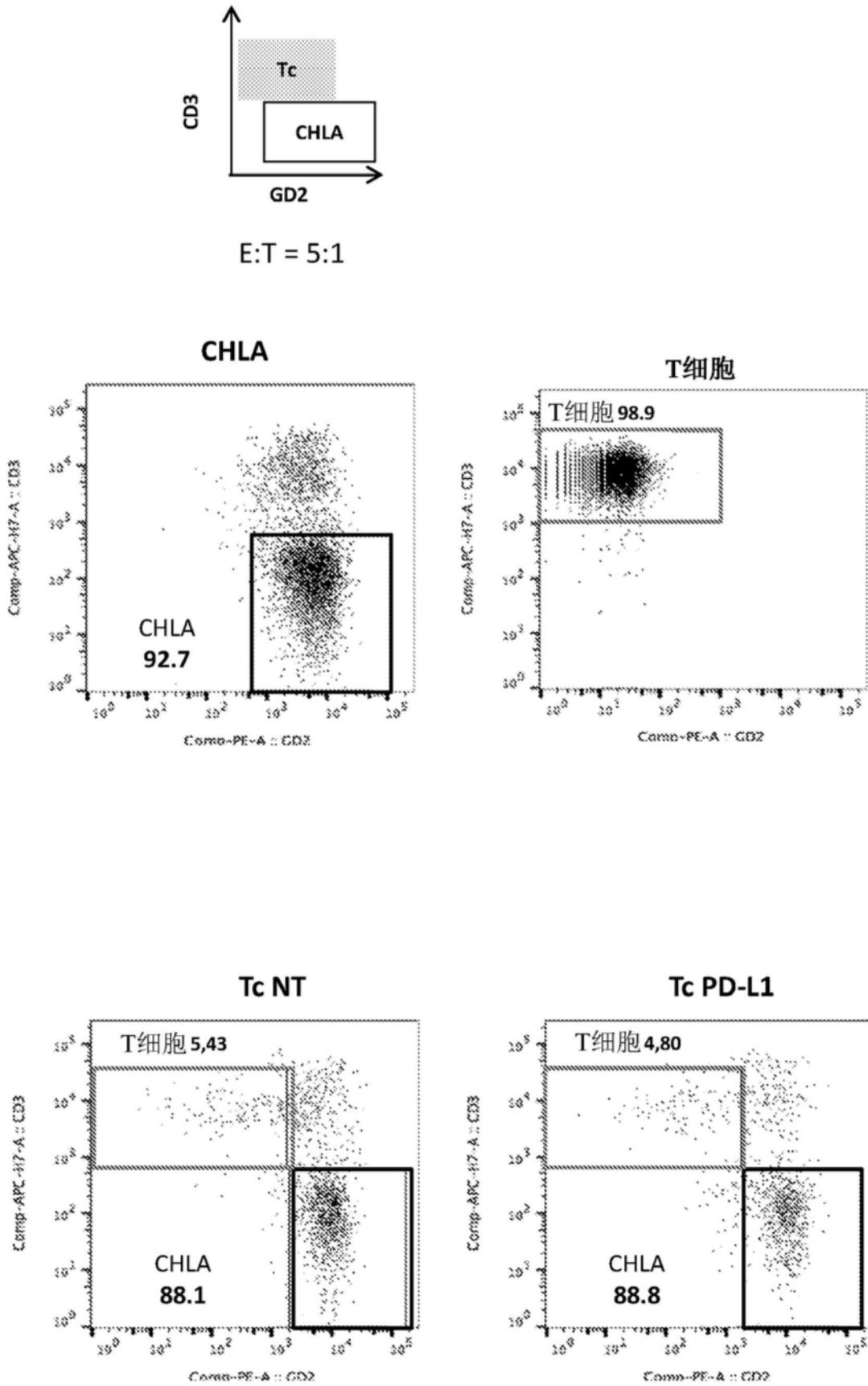


图7A

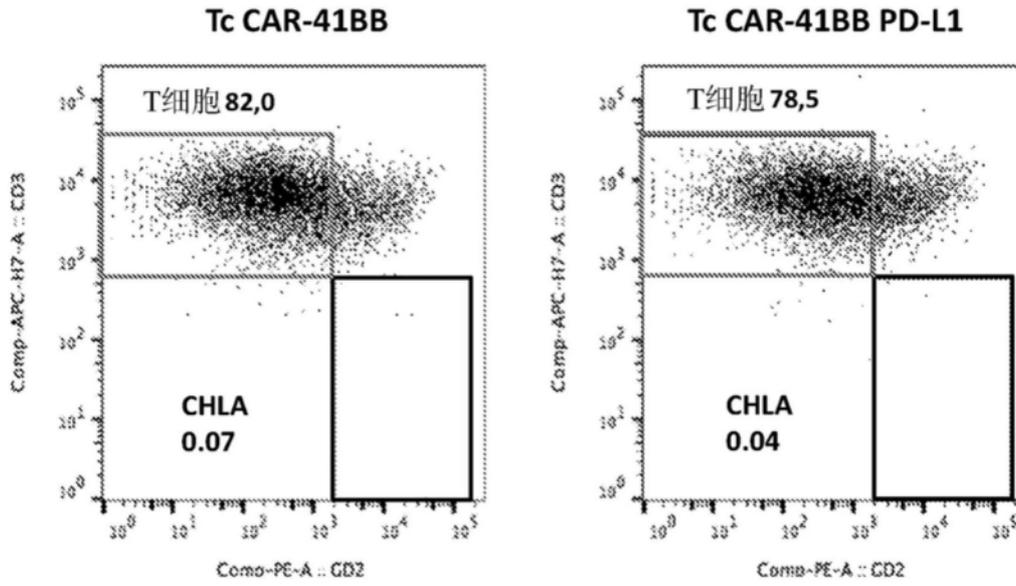


图7B

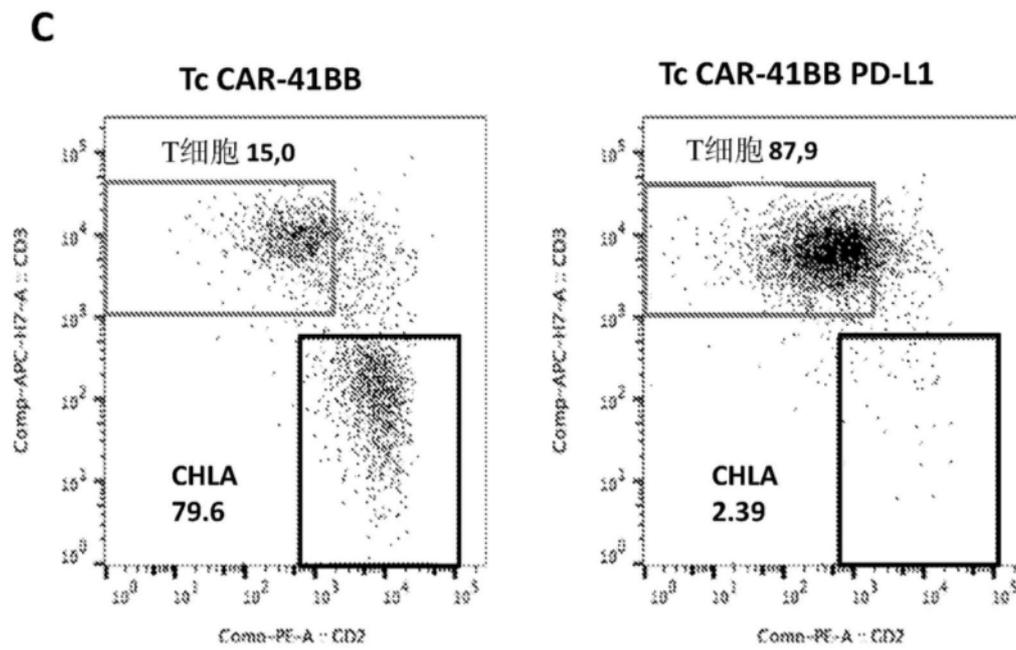


图7C

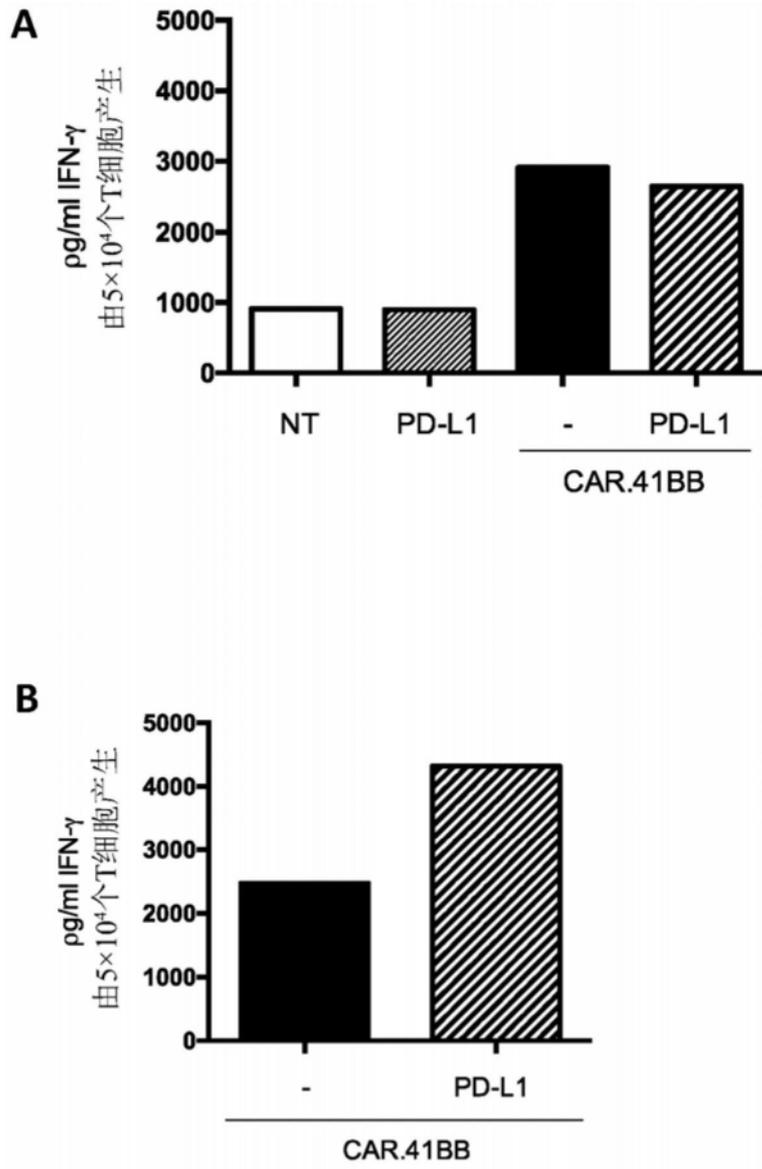


图8