



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109906231 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 26

(21) 申请号 201780067227.X

(22) 申请日 2017.10.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109906231 A

(43) 申请公布日 2019.06.18

(30) 优先权数据
16196487.9 2016.10.29 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/077545 2017.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/078066 EN 2018.05.03

(73) 专利权人 美天施生物科技有限两合公司
地址 德国贝尔吉施格拉德巴赫

(72) 发明人 A·凯泽 J·米泰尔斯塔特
V·胡珀特 S·米尔泰伊

P·施莱格尔 C·塞茨 P·郎
R·汉德格雷庭格

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2015376296 A1, 2015.12.31
US 2016207989 A1, 2016.07.21
US 2016144026 A1, 2016.05.26
CN 105814083 A, 2016.07.27
US 2015320799 A1, 2015.11.12
WO 2016168769 A1, 2016.10.20

审查员 吕丽珊

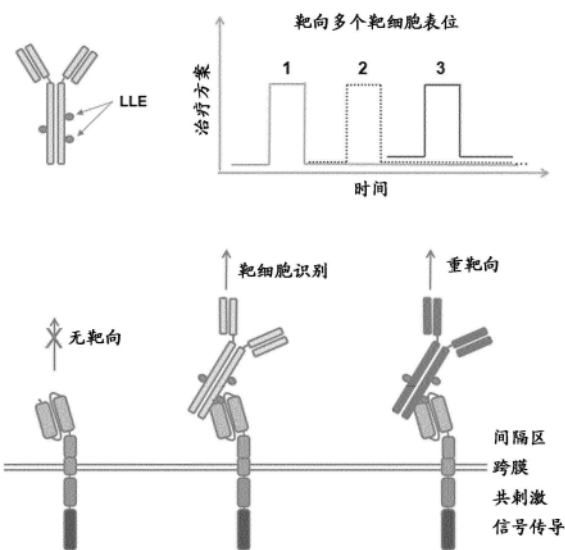
权利要求书1页 说明书29页
序列表34页 附图12页

(54) 发明名称

用于靶向多种抗原的适配体嵌合抗原受体
表达细胞

(57) 摘要

本发明提供一种细胞外抗接头/标记表位嵌合抗原受体(抗LLE CAR),其包含I)接头/标记表位(LLE)结合结构域,II)跨膜结构域,和III)信号转导结构域,其中所述细胞外LLE结合结构域结合靶细胞结合分子(TCBM),所述靶细胞结合分子包含i)抗原结合部分(ABM),其中所述ABM特异性结合靶细胞上表达的抗原,ii)标记部分(LaM),其中所述LaM是受试者中的天然存在的分子或其衍生物,iii)缀合所述ABM和所述LaM的接头部分(LiM),从而形成接头/标记表位(LLE),其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子更高的偏好结合所述LLE。



1. 一种组合物,其包含
 - a) 抗接头/标记表位嵌合抗原受体(抗LLE CAR),其包含
 - I) 细胞外接头/标记表位(LLE)结合结构域,
 - II) 跨膜结构域,和
 - III) 信号转导结构域,其中所述细胞外LLE结合结构域结合靶细胞结合分子(TCBM),
 - b) 所述靶细胞结合分子包含
 - i) 抗原结合部分(ABM),其中所述ABM特异性结合靶细胞上表达的抗原,
 - ii) 标记部分(LaM),其中所述LaM是生物素,其中所述生物素在所述受试者的循环系统中,
 - iii) 缀合所述ABM和所述LaM的接头部分(LiM),从而形成接头/标记表位(LLE),其中所述LiM是烷基链,其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述生物素更高的偏好结合所述LLE,其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述生物素高至少10倍的亲和力结合所述LLE。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞外LLE结合结构域与单体LLE和所述生物素之间的结合的 k_{off} 值高于与多聚LLE。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述LLE是位点特异性地产生的,从而形成包含所述LaM的一部分和所述LiM的一部分的表位。
4. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述LiM是6-(6-氨基己酰胺基)己酰基部分或6-氨基己酰基部分。
5. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述LiM是6-(6-氨基己酰胺基)己酰基部分或6-氨基己酰基部分并且其中所述细胞外LLE结合结构域包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。
6. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中被所述ABM结合的所述抗原在癌细胞的表面上表达。
7. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述抗原选自CD33(Siglec-3)、CD123(IL3RA)、CD135(FLT-3)、CD44V6、CD47、CD184(CXCR4)、CLEC12A(CLL1)、LeY、FR β 、MICA/B、CD305(LAIR-1)、CD366(TIM-3)、CD96(TACTILE)、CD133、CD56、CD29(ITGB1)、CD44(HCAM)、CD47(IAP)、CD66(CEA)、CD112(Nectin2)、CD117(c-Kit)、CD146(MCAM)、CD155(PVR)、CD171(LICAM)、CD221(IGF1)、CD227(MUC1)、CD243(MRD1)、CD246(ALK)、CD271(LNGFR)、CD19、CD20、GD2和EGFR。
8. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述ABM是抗体或其抗原结合片段。
9. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述抗LLE CAR包含SEQ ID NO:11的序列,并且其中所述细胞外LLE结合结构域结合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分。
10. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述抗LLE CAR在T细胞、NK细胞、NKT细胞、 γ/δ T细胞、Treg细胞或干细胞中表达。

用于靶向多种抗原的适配体嵌合抗原受体表达细胞

技术领域

[0001] 本发明一般涉及用于治疗癌症的在免疫细胞上表达的嵌合抗原受体 (CAR) 的领域,特别是适应于靶细胞的不同抗原的CAR。

背景技术

[0002] 通过表达转基因嵌合抗原受体将T细胞重定向至肿瘤抗原通过人白细胞抗原 (HLA) 依赖性识别利用了有效的细胞效应机制。最近在临床试验中证实了这种方法的潜力,其中将表达CAR的T细胞输注到患有B细胞恶性肿瘤、神经母细胞瘤和肉瘤的成人和儿科患者中。CAR是通常靶向表面分子的重组受体。CAR通常由通过间隔区/铰链和跨膜结构域连接至可以包含共刺激结构域和T细胞激活部分的细胞内信号传导结构域的细胞外抗原识别部分组成。CAR独立于其主要组织相容性抗原表达识别未加工的抗原,这与生理性T细胞受体 (TCR) 不同。因此,CAR T细胞可以规避肿瘤借以躲避主要组织相容性类别 (MHC) 限制性T细胞识别的主要机制中的一些,例如HLA表达下调或蛋白酶体抗原加工,这两种机制有助于肿瘤逃脱TCR介导的免疫力。CAR的另一个特征是它们不仅能够与蛋白质结合,还能与碳水化合物、神经节苷脂、蛋白多糖和高度糖基化的蛋白质结合,从而扩大了潜在靶标的范围。CAR通过抗原识别部分与靶标结合,所述抗原识别部分通常是衍生自抗体或Fab片段的单链可变片段 (scFv) (例如在Dai et al, 2016, J Natl Cancer Inst 108(7):djv439中综述)。

[0003] “通用”CAR系统允许使用相同的CAR来处理不同的抗原。在W02015058018A1中,在细胞表面处表达的CAR结合基序以非特异性方式结合期望的靶结合分子,其中所述CAR的结合基序是CD16,其是非特异性地结合免疫球蛋白G抗体的低亲和性Fc受体。该系统的缺点是,抗体体内充当被认为使得能够在CAR T细胞结合后实现特异性肿瘤靶标裂解的所施用的感兴趣的抗体的天然竞争者。

[0004] 在W02012082841A2中,公开了通用的但有适应性的抗标签嵌合抗原受体 (AT-CAR) 系统,其为T细胞提供识别和杀死已被标签抗体 (例如,FITC-或生物素标记的抗体) 标记的靶细胞 (例如肿瘤细胞) 的能力和特异性。这里,缺点是标记物对于待治疗的受试者而言或者是外来分子,例如FITC,因此有免疫原性,或者标记物与内源性分子 (例如生物素) 相同,导致内源性分子阻断CAR结合基序,这阻止CAR结合其预期的分子标记抗体,例如生物素化抗体。

[0005] 在W02013044225A1中公开了相同的通用CAR系统,其面临相同的缺点。

[0006] 在W02014100615A1中,公开了一种CAR系统,其利用靶向未由治疗的受试者的细胞产生或表达的部分的CAR。因此,该CAR系统允许将细胞毒性淋巴细胞集中靶向靶细胞,例如癌细胞。被靶向的部分是小缀合物分子 (SCM) 的一部分,其也包含肿瘤细胞受体的配体。因为通常使用小有机分子作为被靶向的部分,所以可以在约20分钟内实现SCM从血流清除。通过施用SCM以及表达CAR的细胞毒性淋巴细胞,淋巴细胞应答可以仅被靶向至那些表达肿瘤受体的细胞,从而减少脱靶毒性,并且淋巴细胞的激活由于SCM的快速清除而可以更容易地控制。表达CAR的淋巴细胞还可以用作“通用”细胞毒性细胞以靶向多种多样的肿瘤而无需

制备单独的CAR构建体。由于靶部分可以是例如FITC或生物素,该系统面临与W02012082841A2和/或W02013044225A1相同的缺点。

[0007] 在W02015057852A1中,公开了用于调节嵌合抗原受体效应细胞(CAR-EC)的活性的开关。该开关通常包含嵌合抗原受体相互作用结构域(CAR-ID)和靶相互作用结构域(TID)。CAR-ID可以是例如FITC或生物素。

[0008] 同样,该系统面临与W02012082841A2和/或W02013044225A1相同的缺点。

[0009] 在W02015057834A1中,公开了一种嵌合抗原受体-效应细胞开关,其包含:a)结合效应细胞上的嵌合抗原受体的肽抗原;和b)结合靶细胞上的细胞表面分子的靶向部分。所述肽抗原是基于或衍生自天然存在的肽或非天然存在的肽。

[0010] 该系统的缺点是衍生自人核蛋白的标签带来的高风险的自身免疫。

[0011] 在W02016030414A1中公开了通用嵌合抗原受体,其中所述受体包含三个结构域,其中第一结构域是标签结合结构域,第二结构域是包含细胞外铰链和跨膜结构域的连接肽链,并且第三结构域是信号转导结构域,其中标签结合结构域与衍生自任何人核蛋白的标签结合。特别地,合适的标签是来自核抗原的肽序列,其在生理条件下在天然蛋白质的上下文中不可以被相应的标签结合结构域接近和结合。该系统的缺点是标签只可以以共翻译方式加入,从而排除使用已建立的单克隆抗体作为带标签的抗原结合分子而无需事先重新设计编码所述抗原结合分子的基因。

[0012] 因此,本领域需要改进的或替代的通用(适应性)CAR系统。

发明内容

[0013] 本发明公开了控制表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞的功能的方法,例如表达嵌合抗原受体的免疫细胞的细胞毒性和/或免疫调节功能。如本文公开的适应性CAR系统包括CAR,所述CAR包含能够区分受试者中的天然存在的分子与靶细胞结合分子(TCBM)的细胞外结合结构域,所述靶细胞结合分子包含抗原结合分子(ABM)、标记部分(LaM)和接头部分(LiM),其中所述LiM缀合所述ABM和所述LaM(参见图1B)。所述标记部分(LaM)是所述受试者中的天然存在的分子或其衍生物。所述接头部分(LiM)与所述标记部分(LaM)偶联。所述嵌合抗原受体以比没有接头部分的内源性标记部分更高的亲和力结合具有LaM和某种LiM的TCBM,由此在可能存在内源性LaM的生理条件下具有提高的TCBM的识别/结合。

[0014] 该方法的益处在于允许适应性CAR系统的LaM是非免疫原性的,因为它是对于受试者为内源性的天然存在的分子。LaM是自身抗原,与LiM偶联的LaM是修饰的自身抗原,其构建新的表位,即接头/标记表位(LLE),并且LLE比受试者中的天然存在的分子更好地被本文公开的CAR的LLE结合结构域结合。使用纯自身抗原作为LaM与使用修饰的自身抗原(本文公开的LLE)相比具有更高的由表达CAR的免疫细胞触发的自身免疫的风险,所述CAR具有针对是自身抗原的LaM的抗原结合结构域。自身免疫的风险在如本文公开的CAR系统中降低,因为CAR以比修饰的自身抗原更低的偏好(例如以较低的亲和力)结合自身抗原。

[0015] 如本文公开的CAR系统仍然允许CAR免疫细胞有效募集至特异性地结合靶细胞(例如癌细胞)上表达的抗原的TCBM。天然存在的分子可以是存在于受试者的循环系统中的分子,但是以比TCBM更低的亲和力被本文公开的CAR结合。优先地,受试者中的天然存在的分子可以是细胞外分子或具有部分细胞外结构的分子,更优先地,受试者中的天然存在的分

子可以是人非核蛋白。因此,本发明提高了治疗功效,同时使使用免疫原性LaM/LiM的上述风险最小化。

[0016] 示例性的如本文公开的CAR系统显示具有是受试者中的天然存在的分子的生物素作为标记部分,具有6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分(LiM),并具有以比内源性生物素更高的偏好结合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分的抗接头/标记表位(抗LLE)CAR。TCBM的ABM可以是结合靶细胞上的感兴趣的抗原的任何ABM,例如肿瘤相关抗原。但并非旨在本发明受限于本实施例,因为该概念可以转移到以比并未偶联至接头部分的天然存在的分子(标记部分)更高的偏好结合与所述接头部分偶联的另外的天然存在的标记部分其他抗LLE CAR。

[0017] 本发明还公开了编码所述抗LLE CAR的分离的多核苷酸,包含所述多核苷酸的载体,包含所述抗LLE CAR的分离的细胞,包含所述TCBM和所述抗LLE CAR的组合物,以及在受试者中使用所述TCBM和所述抗LLE CAR治疗癌症的方法。

附图说明

[0018] 图1:(A)接头CAR概念。(B)由抗原结合部分(ABM)、接头部分(LiM)和标记部分(LaM)组成的TCBM的表示。(C)(B)的实例包含6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分(LiM)和生物素标记部分(LaM)和未定义的ABM。

[0019] 图2:测试的不同CAR形式的示意图(SEQ ID NO:11-20)。前导序列“L”衍生自人CD8,scFv衍生自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,铰链和间隔区“H”和“CH1”、“CH2”、“CH3”和“CD8”分别衍生自人IgG4或人CD8。跨膜结构域“TM”来自人CD8,而共刺激和信号传导结构域来自4-1BB和CD3z。所有CAR与通过2A元件连接的标志物基因LNGFR一起表达。

[0020] 图3:在不同CAR构建体(SEQ ID NO:17、15、19、11和13)的慢病毒载体基因转移后第8天,在原代T细胞上的LNGFR转基因表达。

[0021] 图4:在存在或不存在10ng/ml抗CD19-生物素(4G7-生物素)抗体的情况下,未转导的(模拟)、CD19 CAR转导的和LLE-CAR转导的(SEQ ID NO:17、15、19、11和13)T细胞的基于萤光素酶的细胞毒性测定。在所有情况下,效应物与靶细胞的比率为1:1。显示共培养24小时后的特异性裂解,n=4。

[0022] 图5:基于阻抗的实时细胞毒性测定(RTCA xCELLigence)。在存在10ng/ml抗GD2-mAB-生物素的情况下,对未转导的(模拟)T细胞(A)和抗LLE CAR转导的T细胞(B)(SEQ ID NO:17、15、19、11和13)相对于LS细胞进行测试。在存在10ng/ml抗CD19-生物素抗体的情况下,对未转导的(模拟)T细胞(C)和抗LLE CAR转导的T细胞(D)(SEQ ID NO:17、15、19、11和13)相对于MCF7-tCD19细胞进行测试。所有实验均在效应物:靶细胞比率为1:1下进行,n=3。

[0023] 图6:抗LLE CAR(SEQ ID NO:11)激活和裂解是抗体剂量依赖性的。(A)使用不同的抗GD2-mAB-生物素浓度在效应物:靶细胞比率为1:1下,抗LLE CAR相对于LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定(RTCA xCELLigence),n=3。(B)在不同的抗CD19-mAB-生物素浓度下,抗LLE CAR(SEQ ID NO:11)相比于NALM6的基于萤光素酶的细胞毒性测定。

[0024] 图7:抗LLE CAR激活和裂解是效应物:靶细胞比率依赖性的。(A)在存在10ng/ml抗GD2-mAB-生物素抗体的情况下在不同的效应物:靶细胞比率下,抗LLE CAR(SEQ ID NO:11)

相对于LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定 (RTCA xCELLigence), $n=3$ 。(B) 在10ng/ml抗CD19-mAB-生物素抗体下,在不同的效应物:靶细胞比率下,抗LLE CAR (SEQ ID NO:11) 相对于NALM6的基于萤光素酶的细胞毒性测定 (12h), $n=5$ 。

[0025] 图8:抗LLE CAR (SEQ ID NO:11) 激活和靶细胞裂解是抗原和生物素特异性的:在存在和不存在10ng/ml抗GD2-生物素 (ch14.18-生物素)、抗GD2 (ch14.18)、或靶细胞无关的抗-CD19-生物素 (4G7-生物素) 的情况下在效应物:靶细胞比率为1:1下,抗LLE CAR相对于LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定 (RTCA xCELLigence), $n=3$ 。

[0026] 图9:在存在抗CD19-生物素 (4G7-生物素)、抗-CD19 (4G7) 的情况下,或在存在靶细胞无关的抗-GD2-生物素 (ch14.18-生物素) 的情况下,在效应物:靶细胞比率为1:1下,抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 对NALM6靶细胞的特异性裂解,在24小时后通过基于萤光素酶的细胞毒性测定法测量, $n=4$ 。

[0027] 图10:超生理学的生物素浓度不干扰抗LLE CAR激活:在存在 (mAB) 或不存在 (无mAB) 10ng/ml抗GD2-生物素 (ch14.18-生物素) 抗体的情况下在不同浓度的游离生物素 (如所示) 下,抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 相对于LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定 (RTCA xCELLigence)。

[0028] 图11:在存在抗LLE CAR T细胞的情况下和在存在和不存在抗CD19-生物素 (4G7-生物素) 抗体和可变浓度的游离生物素或人AB血清的情况下,在12小时后测量的NALM6细胞的特异性裂解。

[0029] 图12: (A) 抗LLE CAR T细胞和通过CRISPR/Cas9技术产生的敲除TcR $\alpha\beta$ 的抗LLE CAR T细胞的流式细胞术分析 (抗TCR α/β -FITC, Miltenyi Biotec)。(B) 通过TIDE确认TcR $\alpha\beta$ 敲除。(C) 在存在 (mAB) 和不存在 (mAB) 10ng/ml抗GD2-生物素 (ch14.18-生物素) 抗体的情况下,抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID 11) 和TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 相对于LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定 (RTCA xCELLigence)。(D) 在存在和不存在10ng/ml抗-TcR $\gamma\delta$ -生物素mAB的情况下在效应物:靶细胞比率为1:1下,在48小时后通过基于萤光素酶的细胞毒性测定法测量的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID 11) 和TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 对MOLT14靶细胞的特异性裂解, $n=1$, 4个技术重复。(E) 在存在和不存在10ng/ml抗-TcR $\alpha\beta$ -生物素mAB的情况下在效应物:靶细胞比率为1:1下,在48小时后通过流式细胞术测量的与抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 和TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 一起孵育的JURKAT靶细胞的相对存活, $n=1$, 4个技术重复。

具体实施方式

[0030] 本发明提供了一种用于靶向靶细胞上不同的和变化的抗原的适应性CAR系统,其中所述CAR以比受试者中的自身抗原更高的偏好结合修饰的自身抗原,从而最小化在其中使用如本文公开的CAR系统的受试者的自身免疫的风险。

[0031] 在第一个方面,本发明提供了一种抗接头/标记表位嵌合抗原受体 (抗LLE CAR), 其包含

[0032] I) 细胞外接头/标记表位 (LLE) 结合结构域,

[0033] II) 跨膜结构域,和

[0034] III) 信号转导结构域,

[0035] 其中所述细胞外LLE结合结构域结合靶细胞结合分子(TCBM),所述靶细胞结合分子包含

[0036] i) 抗原结合部分(ABM),其中所述ABM特异性结合靶细胞上表达的抗原,

[0037] ii) 标记部分(LaM),其中所述LaM是在受试者中的天然存在的分子或其衍生物,

[0038] iii) 缀合所述ABM和所述LaM的接头部分(LiM),从而形成接头/标记表位(LLE),

[0039] 其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子更高的偏好结合所述LLE。

[0040] 所述抗LLE CAR,其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子高至少两倍的亲和力结合所述LLE。

[0041] 所述抗LLE CAR,其中所述细胞外LLE结合结构域与单体LLE和所述天然存在的分子之间的结合的k(解离)值高于与多聚LLE。

[0042] 所述抗LLE CAR,其中所述天然存在的分子是细胞外分子或具有部分细胞外结构的分子。

[0043] 所述抗LLE CAR,其中所述天然存在的分子是在所述受试者的循环系统中的分子。

[0044] 所述抗LLE CAR,其中所述LLE是位点特异性地产生的,从而形成包含所述LaM的一部分和所述LiM的一部分的表位。

[0045] 所述抗LLE CAR,其中所述LaM可以是所述受试者的自身抗原。

[0046] 所述抗LLE CAR,其中所述LaM可以选自氨基酸、肽、蛋白质、肌酐、生物素、生物胞素、脂质、激素、维生素、碳水化合物或其衍生物。所述脂质可以是类固醇脂质,例如胆固醇。所述碳水化合物可以是例如葡萄糖、半乳糖或岩藻糖。特别优选的LaM可以是生物素或其衍生物。

[0047] 所述抗LLE CAR,其中所述LiM是能够产生所述LLE的分子。

[0048] 所述抗LLE CAR,其中所述LiM选自肽、蛋白质、核酸、碳水化合物、聚羟基烷酸酯、烷基链、烷酸、羧酸、法呢基、聚乙二醇、脂质或其衍生物。所述羧酸可以是例如是,例如ε-氨基己酸(6-氨基己酸)或6-(6-氨基己酰胺基)己酸。

[0049] 特别优选的LiM可以是6-(6-氨基己酰胺基)己酰基部分,例如,衍生自6-(6-氨基己酰胺基)己酸或6-(6-氨基己酰胺基)己酸活性酯,或者6-氨基己酰基部分,例如,衍生自6-氨基己酸或6-氨基己酸活性酯。

[0050] 所述抗LLE CAR,其中所述LaM是生物素,并且所述LiM是6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分或6-氨基己酰基接头部分。

[0051] 所述抗LLE CAR,其中所述细胞外LLE结合结构域包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列,由此结合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分。

[0052] 所述抗LLE CAR,其中被所述ABM结合的所述抗原在癌细胞上表达。

[0053] 所述抗LLE CAR,其中所述抗原可以选自CD33(Siglec-3)、CD123(IL3RA)、CD135(FLT-3)、CD44(HCAM)、CD44V6、CD47、CD184(CXCR4)、CLEC12A(CLL1)、LeY、FRβ、MICA/B、CD305(LAIR-1)、CD366(TIM-3)、CD96(TACTILE)、CD133、CD56、CD29(ITGB1)、CD44(HCAM)、CD47(IAP)、CD66(CEA)、CD112(Nectin2)、CD117(c-Kit)、CD133、CD146(MCAM)、CD155(PVR)、CD171(LICAM)、CD221(IGF1)、CD227(MUC1)、CD243(MRD1)、CD246(ALK)、CD271(LNGFR)、CD19、CD20、GD2和EGFR。

[0054] 所述抗LLE CAR,其中所述ABM可以是抗体或其抗原结合片段。

[0055] 所述抗LLE CAR,其中所述抗LLE CAR包含SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、或SEQ ID NO:16的序列,由此结合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分。优选地,所述抗LLE CAR包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的序列。

[0056] 所述抗LLE CAR,其中所述抗LLE CAR在真核细胞中表达。

[0057] 所述抗LLE CAR,其中所述抗LLE CAR在免疫细胞中表达。

[0058] 所述抗LLE CAR,其中所述抗LLE CAR在T细胞、NK细胞、NKT细胞、 γ/δ T细胞或Treg细胞中表达。

[0059] 所述抗LLE CAR,其中所述抗LLE CAR在然后将分化成免疫细胞,例如将表达抗LLE CAR的T细胞的干细胞、多谱系祖细胞或诱导多能干细胞中表达。

[0060] 在另一个方面,本发明提供了编码如本文公开的抗LLE CAR的一种或多种分离的多核苷酸。

[0061] 在另一个方面,本发明提供了包含编码如本文公开的抗LLE CAR的多核苷酸的载体或者包含编码如本文公开的抗LLE CAR的多种多核苷酸的多种载体。

[0062] 所述载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至至少一个调节元件用于表达由所述多肽编码的所述抗LLE CAR。

[0063] 所述一种载体或多种载体,其中所述一种或多种载体是一种或多种病毒载体。

[0064] 所述一种或多种载体,其中所述一种或多种病毒载体是一种或多种逆转录病毒载体或一种或多种慢病毒载体。

[0065] 可以构建一种或多种核酸分子,使得它们至少编码如本文公开的CAR的所有实施方式。当由所述分子编码的CAR的所有结构域都在一个多肽内时,可以存在连续的核酸分子。或者,可以存在两个或更多个核酸分子,例如当由所述分子编码的CAR的一些结构域是在分开的多肽上时。

[0066] 在另一个方面,本发明提供了分离的细胞,其包含如本文公开的抗LLE CAR。

[0067] 所述分离的细胞可以是真核细胞。

[0068] 所述分离的细胞可以是免疫细胞,例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、 γ/δ T细胞或Treg细胞。

[0069] 所述分离的细胞可以是干细胞、多谱系祖细胞或诱导的多能干细胞,其随后将分化成免疫细胞,例如将表达抗LLE CAR的T细胞。

[0070] 所述分离的细胞可以是T细胞,其中任选地所述T细胞不表达TcR $\alpha\beta$ 、PD1、CD3或CD96(例如,通过敲除这些基因之一)。

[0071] 所述分离的细胞可以是免疫细胞,其中任选地所述细胞不表达可以是检查点、耗尽或凋亡相关的信号传导受体以及配体例如PD-1、LAG-3、TIGIT、CTLA-4、FAS-L和FAS-R的辅助分子(例如通过敲除这些基因中的一个)。

[0072] 在另一个方面,本发明提供了分离的细胞,其包含编码如本文公开的抗LLE CAR的一种或多种多核苷酸。

[0073] 在另一个方面,本发明提供了分离的细胞,其包含含有编码如本文公开的抗LLE CAR的多核苷酸的一种或多种载体。

- [0074] 在一个方面,本发明提供了组合物,其包含
- [0075] a) 靶细胞结合分子(TCBM),其包含
- [0076] i) 抗原结合部分(ABM),其中所述ABM特异性结合靶细胞上表达的抗原,
- [0077] ii) 标记部分(LaM),其中所述LaM是在受试者中的天然存在的分子或其衍生物,
- [0078] iii) 缀合所述ABM和所述LaM的接头部分(LiM),从而形成接头/标记表位(LLE),和
- [0079] b) 抗接头/标记表位(抗LLE)嵌合抗原受体(CAR),所述抗LLE CAR包含
- [0080] I) 细胞外接头/标记表位(LLE)结合结构域,
- [0081] II) 跨膜结构域,和
- [0082] III) 信号转导结构域,
- [0083] 其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子更高的偏好结合所述LLE。
- [0084] 前文描述的TCBM和抗LLE CAR的所有特征也可以应用于所述组合物。
- [0085] 在一个方面,本发明提供治疗受试者的疾病的方法,其包括
- [0086] a) 向需要治疗的受试者施用靶细胞结合分子(TCBM)的一种或多种制剂,所述TCBM包含
- [0087] i) 抗原结合部分(ABM),其中所述ABM特异性结合靶细胞上表达的抗原,
- [0088] ii) 标记部分(LaM),其中所述LaM是在受试者中的天然存在的分子或其衍生物,
- [0089] iii) 缀合所述ABM和所述LaM的接头部分(LiM),从而形成接头/标记表位(LLE),和
- [0090] b) 向所述受试者施用一种或多种治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群,所述抗LLE CAR包含
- [0091] I) 细胞外接头/标记表位(LLE)结合结构域,
- [0092] II) 跨膜结构域,和
- [0093] III) 信号转导结构域,
- [0094] 其中所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子更高的偏好结合所述LLE,从而诱导所述靶细胞的细胞死亡。
- [0095] 前文所述的TCBM和抗LLE CAR的所有特征也可以应用于用于治疗受试者的疾病的所述方法。
- [0096] 所述方法,其中所述疾病的治疗是癌症,并且其中所述靶细胞是癌细胞。
- [0097] 所述方法,其中所述TCBM的多种制剂是相同或不同的TCBM制剂。
- [0098] 所述方法,其中所述多种治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群是相同或不同的抗LLE CAR表达细胞群。
- [0099] 所述方法,其中所述多种治疗有效的群体的所述抗LLE CAR是相同或不同的抗LLE CAR。
- [0100] 所述方法,其中所述向需要治疗的受试者施用靶细胞结合分子(TCBM)的所述多种制剂是同时或随后施用。
- [0101] 所述方法,其中所述施用所述多种治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群是同时或随后施用。
- [0102] 本发明涉及用于治疗患有例如癌症的疾病的受试者的CAR系统。本发明的CAR系统(例如,免疫细胞,例如表达包含LLE结合结构域的CAR的T细胞,和相应的靶细胞结合分子

(TCBM)) 利用靶向在治疗的受试者中不出现的表位(即修饰的自身抗原)的CAR。由于该系统中使用的标记部分是受试者中天然存在的分子,即自身抗原,因此它是非免疫原性的。在受试者中不天然存在的表位是通过偶联标记部分与接头部分,在标记部分和接头部分的连接处产生新的界面和/或环境而产生,使得可以产生可以用作如本文公开的系统的CAR的接头/标记表位结合结构域的新表位识别分子。

[0103] 因此,如本文公开的该CAR系统允许将细胞例如免疫细胞集中靶向至表达抗原的靶细胞,例如癌细胞。

[0104] 所述接头部分和所述标记部分是所述靶细胞结合分子(TCBM)的一部分,所述靶细胞结合分子也包含抗原结合部分(ABM),其中所述接头部分缀合LaM和ABM。通常,所述ABM针对靶细胞表面上表达的抗原。

[0105] 通过施用TCBM以及表达CAR的免疫细胞,免疫细胞应答可以仅靶向在靶细胞表面上表达抗原的那些细胞,从而降低脱靶毒性。表达CAR的免疫细胞可用作“通用”免疫细胞以靶向多种靶细胞,例如多种肿瘤,而无需制备单独的CAR构建体。由CAR识别的TCBM的标记/接头表位也可以保持恒定。只需要改变TCBM的ABM以允许系统靶向不同特性的靶细胞。

[0106] 以下说明如本文公开的CAR系统的示例:

[0107] 生物素是受试者(例如人)的循环系统中的天然存在的分子。因此,生物素对于所述受试者是非免疫原性的。

[0108] 制备TCBM,其包含生物素作为标记部分与6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分偶联(缀合),产生6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分。

[0109] TCBM还包含ABM,例如对靶细胞表面上的抗原(例如在癌细胞上表达的抗原GD-2或CD19)特异的抗体或scFv,其中6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分桥接生物素和ABM。转导免疫细胞以表达包含6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分结合结构域作为LLE结合结构域的CAR。因此,该CAR靶向上述TCBM。

[0110] 将两种组分,即TCBM和表达CAR的免疫细胞,施用于患有例如癌症的疾病的受试者。TCBM由靶细胞结合,例如癌细胞(通过TCBM的ABM部分与关联靶细胞抗原例如GD-2或CD19的结合)。然后TCBM的6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分被免疫细胞表达的抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR识别并结合。在6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基-ABM缀合物结合后,表达抗-6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR的免疫细胞被激活,靶细胞,例如癌细胞,可以被杀死。抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR以比受试者中的循环生物素更高的偏好结合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基缀合物。

[0111] 如本文公开的表达CAR的免疫细胞不可以通过直接结合靶细胞如癌细胞来杀死细胞。因此,TCBM充当表达CAR的免疫细胞和靶细胞之间的桥梁。只要产生TCBM的接头/标记表位的标记/接头部分是未天然见于受试者中的部分并且CAR的细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子更高的偏好结合所述LLE,则表达CAR的免疫细胞的活性可以被限制于靶细胞。此外,可以通过限制施用于受试者的TCBM的量来调节表达CAR的免疫细胞的激活,例如,如果检测到副作用,则通过操纵TCBM的输注。

[0112] 本发明的CAR系统利用TCBM作为表达CAR的免疫细胞和表达抗原的靶细胞之间的桥梁。TCBM包含通过接头部分连接的在分子的一端的标记部分(LaM)和在另一端的抗原结

合部分 (ABM)。对标记部分的特性的唯一要求仅在于其必须是受试者中天然存在的分子 (自身抗原) 并且其缀合的接头部分的变体可以被免疫细胞表达的 CAR 识别和结合, 所述 CAR 以比非缀合的接头部分 (天然存在的变体) 更高的亲和力与其缀合的接头部分的变体 (修饰的自身抗原) 结合。ABM 可包含单一抗原特异性 (单特异性)、两种或更多种抗原特异性 (双特异性和多特异性)。双特异性 ABM 的实例是与抗原 CD19 和 CD20 结合的 ABM。

[0113] ABM 还可以包含单价结合以及二价和多价结合位点。二价 ABM 的实例是包含识别抗原的不同表位的两个 scFv 的 ABM。

[0114] ABM 可以是针对衍生自宿主 (例如小鼠) 的免疫的靶标的免疫球蛋白。此外, 它还可以衍生自合理设计和重组表达。在另一种实施方式中, ABM 还可以衍生自例如定向进化和筛选技术例如噬菌体展示和核糖体展示的方法。标记部分和抗原结合部分可以通过接头部分共价缀合, 例如生物素和 6- (6-氨基己酰氨基) 己酰基部分的化学偶联。

[0115] 或者, 标记部分和抗原结合部分可以通过接头部分非共价缀合。此外, 或者, TCBM 可以在 ABM 和 LiM 之间包含其他部分或结构域。唯一的要求是 LiM 以使得允许产生如本文公开的接头/标记表位的方式与 LaM 缀合 (或偶联)。

[0116] 接头部分可以与标记部分缀合, 产生包含 LLE 的部分。与 LaM 偶联的 LiM 可以例如通过使用例如 LiM 的氨基反应性琥珀酰亚胺酯衍生物靶向蛋白 ABM 上的赖氨酸而随机偶联。

[0117] 或者, 接头部分可以与 ABM 位点特异性地缀合, 例如通过使用例如在所述 ABM 的编码序列中的工程化终止密码子处递送非天然氨基酸的无义抑制子 tRNA, 从而在重组表达的蛋白 ABM 中引入所述非天然氨基酸。

[0118] 可能能够产生如本文公开的 LLE 的每个分子可以用作接头部分。对接头部分的特性的唯一要求是接头部分可以被化学缀合 (或偶联) 到标记部分或被遗传 (重组) 编码, 并且应该能够在如本文公开的接头部分和标记部分的上下文、界面和/或环境处产生新表位。LiM 可以优先是在受试者中不引起或不倾向于引起免疫反应的分子, 例如 LiM 是自身抗原。在这种情况下, LaM 和 LiM 的界面产生新的表位, 即 LLE。

[0119] LiM 可以例如选自肽、蛋白质、核酸、碳水化合物、聚羟基烷酸酯、烷基链, 烷酸、羧酸 (例如, ϵ -氨基己酸 (6-氨基己酸) 或 6- (6-氨基己酰胺基) 己酸)、法呢基、聚乙二醇、脂质及其衍生物。

[0120] 特别优选的 LiM 可以是 6- (6-氨基己酰胺基) 己酰基部分, 例如衍生自 6- (6-氨基己酰胺基) 己酸或 6- (6-氨基己酰胺基) 己酸活性酯, 或 6-氨基己酰基部分, 例如衍生自 6-氨基己酸或 6-氨基己酸活性酯。

[0121] 所述抗 LLE CAR, 其中所述 LaM 是生物素, 并且所述 LiM 是 6- (6-氨基己酰胺基) 己酰基接头部分或 6-氨基己酰基接头部分。

[0122] 本领域技术人员将理解并认识到, 可以使用各种手段来制备由标记部分、连接部分和抗原结合部分组成的 TCBM。

[0123] 在施用至受试者之前, TCBM 可以制备成药学上可接受的制剂。这样的制剂可含有药学上可接受的赋形剂或载体。

[0124] ABM 结合靶细胞上的抗原的亲和力可以变化, 但通常结合亲和力可以是至少约 100 μ M、1 nM、10 nM 或 100 nM, 优选至少约 1 pM 或 10 pM, 甚至更优选至少约 100 pM。

[0125] 要求如本文公开的 CAR 的细胞外 LLE 结合结构域以比相应天然存在的分子更高的

偏好结合TCBM的LLE。

[0126] 所述CAR的细胞外LLE结合结构域可以使用可商购抗体或其抗原结合片段制备。

[0127] 或者,可以通过本领域技术人员公知的方法新生产用于选择的LLE的抗体或抗原识别分子。

[0128] CAR的LLE结合结构域结合TCBM的LLE的亲合力可以变化,但通常结合亲合力可以在0.01nM至1 μ M的范围内,优选在0.1-100nM的范围内,或更优选地在1-30nM的范围内。唯一的要求是在受试者中CAR的LLE结合结构域结合TCBM的LLE的亲合力必须高于CAR的LLE结合结构域结合天然存在的分子(即没有接头部分)的亲合力。优选地,所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子高至少两倍,优选至少5倍,更优选至少10倍,最优选至少高20倍的亲合力结合所述LLE。

[0129] 编码本发明的CAR的一种或多种DNA或RNA构建体(一种或多种核酸分子)可通过本领域公知的方法(例如,包括逆转录病毒和慢病毒的基于病毒的系统、包括电穿孔的物理方法、生物学方法、化学方法)转染或转导到宿主细胞中。不管用什么方法在宿主细胞中整合,优选稳定整合,编码本发明的CAR的DNA,结果是宿主细胞表达如本文公开的CAR。

[0130] 或者,核酸序列可以合成产生。

[0131] 在转染/转导过程后可以分离(富集或分离)如本文公开的表达CAR的工程化细胞,用于通过本领域公知的方法(例如基于荧光的分离技术,例如**FACS**[®]或磁性细胞分离方法,例如**MACS**[®] (Miltenyi Biotec GmbH))从非转染/转导的细胞产生这样的工程化CAR细胞。

[0132] 通常,可以从受试者获得细胞,例如免疫细胞,优选T细胞,用于产生本发明的表达CAR的工程化细胞。细胞,例如免疫细胞,优选T细胞,可以从多种来源获得,例如外周血单核细胞(PMBC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血或胸腺组织。为了富集这些细胞,可以使用本领域公知的方法,例如通过Ficoll[™]或PERCOLL[™]梯度离心或阳性/阴性选择技术,例如荧光分选(例如FCASort)或磁性分选(例如**MACS**[®])。优选地,富集的细胞群包含至少约90%的所选择的细胞类型。在特定方面,细胞群包含至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至是100%的所选择的细胞类型。

[0133] 示例性地,受试者的血液样品的T细胞被磁性地标记,例如用磁珠偶联至对CD4特异的抗体,洗涤,磁性富集和收集。然后可以将这些T细胞工程化以在其细胞表面上表达如本文公开的CAR。

[0134] 在本发明的一种实施方式中,表达如本文公开的CAR的分离/富集的工程化细胞,例如免疫细胞,优选T细胞,可以在遗传修饰之前或之后激活,并且使用本领域公知的方法扩增以增加工程化(T)细胞的数量,例如用由与人源化CD3和CD28激动剂缀合的胶体纳米基质组成的TransAct T细胞试剂(Miltenyi Biotec;W02014048920A1)对T细胞进行多克隆刺激。优选地,所述工程化细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的数量可以增加至治疗有效量。

[0135] 如本文公开的的表达CAR的细胞可以通过编码本发明的CAR的RNA进行工程化。可以通过本领域公知的方法(例如基于病毒的系统、物理方法、生物学方法、化学方法)将RNA转染或转导到宿主细胞中。无论用什么方法将编码本发明的CAR的RNA转移到宿主细胞中,结果是宿主细胞表达如本文公开的CAR。“RNA工程化细胞”在有限时间内表达CAR(瞬时表

达)。

[0136] 表达如本文公开的CAR的遗传修饰(免疫)细胞,优选T细胞,可以在封闭系统的自动化过程中产生。一种用于产生遗传修饰细胞,优选T细胞的方法,所述方法可以包括例如以下步骤:

[0137] a) 提供包含(免疫)细胞的细胞样品,

[0138] b) 通过离心准备细胞样品,

[0139] c) 磁性分离(免疫)细胞,优选T细胞,

[0140] d) 使用调节剂激活富集的(免疫)细胞,优选T细胞,

[0141] e) 遗传修饰(免疫)细胞,优选T细胞,以表达本发明的CAR,

[0142] f) 在培养室中扩增遗传修饰的(免疫)细胞,优选T细胞,

[0143] g) 洗涤培养的(免疫)细胞,优选T细胞。

[0144] 所有这些步骤可以在封闭系统中自动执行,优选地在封闭和无菌系统中执行。

[0145] 该方法特别适用于制备基因修饰的细胞,例如免疫细胞,优选T细胞,其中富集的(免疫)细胞,优选T细胞,通过使用病毒和/或非病毒载体进行基因修饰。

[0146] 这些步骤中的任何一个都可以增加、省略或者可以以不同的顺序发生。

[0147] 调节剂可选自激动性抗体和/或细胞因子。

[0148] 基因修饰的(免疫)细胞,优选T细胞,可以通过(免疫)细胞的磁性标记和培养之前或之后的磁性分离来富集以在最终的细胞产品中获得更高频率的基因修饰(免疫)细胞,优选T细胞。

[0149] 作为用于细胞修饰的封闭且无菌的系统,可以使用全自动细胞处理装置CliniMACS **Prodigy**[®]和相关的管组(Miltenyi Biotec GmbH, Germany) (W02009/072003)。

该封闭系统满足几乎任何类型的细胞产品的GMP级处理要求,并且可以允许减少洁净室要求,改进技术转移和协调细胞制备过程。

[0150] 如本文公开的CAR系统可用于治疗患有与抗原相关的疾病、病症或状况的受试者,所述抗原可以被如本文公开的TCBM的抗原结合部分特异性地结合。

[0151] 特别地,如本文公开的CAR系统可用于治疗患有癌症的受试者。可以分离受试者的细胞,例如免疫细胞,例如T细胞,或者可以使用建立的免疫细胞系。受试者可以患有所述癌症(患者)或可以是健康的受试者。这些免疫细胞在体外被遗传修饰以表达如本文公开的CAR。这些工程化细胞可以在体外激活并扩增至治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群。在细胞疗法中,除了第二药物组合物,TCBM制剂外,这些工程化细胞可以作为药物组合物(或治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群的制剂)输注给有需要的接受者。所述接受者中的输注的细胞可以能够杀死(或至少停止生长)表达被如本文公开的CAR系统识别的抗原的癌细胞。接受者可以是从其获得细胞的同一受试者(自体细胞疗法)或可以是相同物种的另一个受试者(同种异体细胞疗法)。

[0152] 可以在向受试者施用TCBM制剂之前将治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群施用于患者。或者,可以在向受试者施用治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群之前或同时将TCBM制剂施用于受试者。另外的变化包括在施用至受试者之前,体外培养治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群与TCBM制剂的TBCM。

[0153] 可以使用本领域技术人员已知的技术配制抗LLE-CAR表达(免疫)细胞群以施用至受试者。

[0154] 包含治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群的制剂可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂(载体或稀释剂)。包含在制剂中的赋形剂将具有不同的目的,这取决于例如抗LLE-CAR的LLE结合结构域的性质,所使用的免疫细胞的(亚)群体,和施用方式。通常使用的赋形剂的实例包括但不限于:盐水、缓冲盐水、右旋糖、注射用水、甘油、乙醇及其组合、稳定剂、增溶剂和表面活性剂、缓冲剂和防腐剂、张度剂、填充剂和润滑剂。

[0155] 抗LLE CAR表达细胞的一个或多个治疗有效群体的制剂可包含抗LLE-CAR表达(免疫)细胞的一个群体,或抗LLE-CAR表达(免疫)细胞的多于一个群体。抗LLE-CAR(免疫)细胞的不同群体可以基于LLE结合结构域的特性、激活结构域的特性、免疫细胞的(亚)群体的特性,或其组合而变化。

[0156] 可以使用本领域技术人员已知的方式和技术将包含抗LLE CAR表达细胞的一个或多个治疗有效群体的制剂施用于受试者。示例性方式包括但不限于静脉内注射。其他方式包括但不限于肿瘤内、皮内、皮下(s.c, s.q, sub-Q, Hypo)、肌肉内(i.m.)、腹膜内(i.p.)、动脉内、髓内、心内、关节内(关节)、滑膜内(关节液区域)、颅内、脊柱内和鞘内(脊髓液)。

[0157] 施用至受试者的包含抗LLE CAR表达细胞的一个或多个治疗有效群体的制剂包含有效治疗特定适应症或疾病的数量的抗LLE-CAR表达细胞,例如免疫细胞。通常,可以施用包含约 1×10^4 至约 1×10^{10} 个抗LLE-CAR表达细胞(例如免疫细胞)的制剂。在大多数情况下,所述制剂可以包含约 1×10^5 至约 1×10^9 个抗LLE-CAR表达细胞,例如免疫细胞,约 5×10^5 至约 5×10^8 个抗LLE-CAR表达细胞,例如免疫细胞,或约 1×10^6 至约 1×10^7 个抗LLE-CAR表达细胞,例如免疫细胞。然而,施用于受试者的抗LLE-CAR表达细胞(例如免疫细胞)的数量可在宽范围内变化,这取决于疾病的位置、来源、特性、程度和严重程度、待治疗的个体的年龄和状况等。医生可以最终确定要使用的合适剂量。

[0158] 可以使用本领域技术人员已知的技术配制TCBM用于施用于受试者。TCBM的制剂可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂(载体或稀释剂)。包含在所述制剂中的赋形剂具有不同的目的,这取决于例如标记部分、接头部分、ABM的性质和施用方式。通常使用的赋形剂的实例包括但不限于:盐水、缓冲盐水、右旋糖、注射用水、甘油、乙醇及其组合、稳定剂、增溶剂和表面活性剂、缓冲剂和防腐剂、张度剂、填充剂和润滑剂。

[0159] TCBM的制剂可包含一种类型的TCBM,或多种类型的TCBM。不同类型的TCBM可基于标记部分、接头部分、抗原结合部分或其组合的特性而变化。

[0160] 可以使用本领域技术人员已知的方式和技术将TCBM施用于受试者。示例性方式包括但不限于静脉内、腹膜内和肿瘤内注射。其他方式包括但不限于皮内、皮下(s.c, s.q, sub-Q, Hypo)、动脉内、髓内、心内、关节内(关节)、滑膜内(关节液区域)、颅内、脊柱内和鞘内(脊髓液)。

[0161] 将包含TCBM的制剂以有效治疗特定适应症或疾病的量施用至受试者。通常,可以将包含至少约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重的TCBM的制剂施用给需要治疗的受试者。在大多数情况下,考虑到施用途径、症状等,剂量可以是每天约 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重的TCBM。如图6所示,令人意外的是,使用如本文公开的CAR系统,可以使用浓度低至 $1\text{ng}/\text{ml}$ (对应于 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)的TCBM。然而,施用至受试者的制剂中的TCBM的量可在宽范围内变化,这取决于

疾病的位置、来源、特性、程度和严重程度、待治疗的个体的年龄和状况等。医生可以最终确定要使用的合适剂量。

[0162] CAR表达细胞制剂和TCBM制剂的施用之间的时间选择可以为宽范围,这取决于多种因素,包括所使用的(免疫)细胞类型、CAR的结合特异性、标记部分、接头部分和抗原结合部分的特性、靶细胞(例如待治疗的癌细胞)的特性、靶细胞在受试者中的位置、用于向受试者施用制剂的手段,以及接受治疗的受试者的健康、年龄和体重。实际上,TCBM制剂可以在遗传工程化(免疫)细胞制剂之前、同时或之后施用。

[0163] 取决于治疗的疾病,施用CAR表达细胞制剂的步骤,或施用TCBM制剂的步骤,或两者,可重复一次或多次。当两种或更多种TCBM制剂可以应用于受试者时,所应用的制剂可以包含相同或不同的TCBM。当两种或更多种工程化细胞制剂例如本发明的表达CAR免疫细胞被应用于受试者时,工程化细胞可以是相同细胞类型或不同细胞类型。细胞制剂例如免疫细胞也可包含一种以上的细胞类型,各自表达本发明的CAR。

[0164] 定义

[0165] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。通常,CAR可包含包含抗原结合结构域的细胞外结构域(细胞外部分)、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。细胞外结构域可以通过接头与跨膜结构域连接。细胞外结构域还可包含信号肽。本发明的CAR的细胞外部分包含如本文公开的接头/标记表位(LLE)结合结构域。具体地,如本文公开的CAR具有细胞外LLE结合结构域作为抗原结合结构域。

[0166] “信号肽”是指指导蛋白质在细胞内转运和定位的肽序列,例如转运和定位至某种细胞器(例如内质网)和/或细胞表面。

[0167] 通常,“抗原结合结构域”是指特异性结合抗原(从而能够靶向含有抗原的细胞)的CAR的区域。本发明的CAR可包含一个或多个抗原结合结构域。通常,CAR上的靶向区域是在细胞外的。抗原结合结构域可包含抗体或其抗原结合片段。抗原结合结构域可包括,例如,全长重链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段、二价单链抗体或双抗体。任何与给定抗原特异性结合的分子(例如来自天然存在的受体的亲和体或配体结合结构域)可用作抗原结合结构域。抗原结合结构域通常是scFv。通常,在scFv中,免疫球蛋白重链和轻链的可变区通过柔性接头融合以形成scFv。这样的接头可以是例如“(G₄/S₁)₃-接头”。

[0168] 在某些情况下,抗原结合结构域衍生自其中将使用CAR的相同物种是有益的。例如,当计划在人体内治疗性地使用它时,CAR抗原结合结构域包含人或人源化抗体或其抗原结合片段是有益的。人或人源化抗体或其抗原结合片段可通过本领域公知的多种方法制备。如本文公开的CAR具有细胞外接头/标记表位结合结构域作为抗原结合结构域,允许通过如本文公开的靶细胞结合分子间接地结合靶细胞上表达的抗原。

[0169] 如本文所用,“间隔区”或“铰链”是指位于抗原结合结构域和跨膜结构域之间的亲水区。本发明的CAR可以包含细胞外间隔区结构域,但也可以去掉这种间隔区。间隔区可包括例如抗体的Fc片段或其片段、抗体的铰链区或其片段、抗体的CH2或CH3区、辅助蛋白、人工间隔区序列或其组合。间隔区的突出实例是CD8α铰链。

[0170] CAR的跨膜结构域可以衍生自这样的结构域的任何期望的天然或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。跨膜结构域可以衍生自例如CD8

α 或CD28。当关键信号传导和抗原识别模块(结构域)在两个(或甚至更多个)多肽上时,CAR可具有两个(或更多个)跨膜结构域。由于CAR的每个多肽中的小分子依赖性异二聚化结构域,分裂的关键信号传导和抗原识别模块使得能够对CAR细胞表达进行小分子依赖性、可滴定和可逆的控制(Wu et al,2015,Science350:293-303)。

[0171] CAR的细胞质结构域(或细胞内信号传导结构域)负责激活其中表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能。“效应功能”是指细胞的特定功能,例如在T细胞中,效应功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。细胞内信号传导结构域是指转导效应物功能信号并指导表达CAR的细胞执行专门功能的蛋白质的部分。细胞内信号传导结构域可包括足以转导启动或阻断免疫细胞效应功能的信号的给定蛋白质的细胞内信号传导结构域的任何完整的、突变的或截短的部分。

[0172] 用于CAR的细胞内信号传导结构域的突出实例包括T细胞受体(TCR)的细胞质信号传导序列和在抗原受体结合后启动信号转导的共受体。

[0173] 通常,T细胞激活可以由两种不同类型的细胞质信号传导序列介导,首先是通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些(初级细胞质信号传导序列),其次是以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级细胞质信号传导序列,共刺激信号传导结构域)。因此,CAR的细胞内信号传导结构域可包含一个或多个初级细胞质信号传导结构域和/或一个或多个次级细胞质信号传导结构域。

[0174] 以刺激方式起作用的初级细胞质信号转导序列可含有ITAM(基于免疫受体酪氨酸的激活基序信号传导基序)。

[0175] 通常用于CAR的包含初级细胞质信号序列的ITAM的实例是衍生自TCR ζ (CD3 ζ)、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。最突出的是衍生自CD3 ζ 的序列。

[0176] CAR的细胞质结构域可以设计为自身包含CD3- ζ 信号传导结构域或与一个或多个任何其他期望的细胞质结构域组合。CAR的细胞质结构域可包含CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区域。共刺激信号传导区域是指包含共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是除了淋巴细胞对抗原的有效响应所需的抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。共刺激分子的实例是CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3。

[0177] CAR的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接,有或没有接头。长度优选为2-10个氨基酸的短的寡肽或多肽接头可形成连接。突出的接头是甘氨酸-丝氨酸双联体。

[0178] 例如,细胞质结构域可包含CD3- ζ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在另一个实例中,细胞质结构域可包含CD3- ζ 的信号传导结构域和CD27的信号传导结构域。在另一个实例中,细胞质结构域可包含CD3- ζ 的信号传导结构域、CD28的信号传导结构域和CD27的信号传导结构域。

[0179] 如上所述,出于CAR的分裂的关键信号传导和抗原识别模块的目的,CAR的细胞外部分或跨膜结构域或细胞质结构域也可包含异二聚化结构域。

[0180] 本发明的CAR,即包含LLE结合结构域的CAR,可以被设计为以任何顺序和/或组合包含如本文所述的上述结构域的任何部分或部分,产生功能性CAR。

[0181] 本文使用的术语“抗体”以最广泛的含义使用以涵盖各种形式的抗体结构,包括但不限于特异性识别(即结合)靶抗原的单克隆和多克隆抗体(包括全长抗体)、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段(即抗体、免疫粘附素和抗体-免疫粘附素嵌合体的抗原结合片段)。“抗体片段”包含全长抗体的一部分,优选其可变结构域,或至少其抗原结合位点(“抗体的抗原结合片段”)。抗体片段的实例包括Fab(片段抗原结合)、scFv(单链片段可变)、单结构域抗体、双抗体、dsFv、Fab’、双抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0182] 如本文所用,术语“抗原”旨在包括结合或引起一种或多种抗体产生的物质,并且可包括但不限于蛋白质、肽、多肽、寡肽、脂质、碳水化合物和其组合,例如,糖基化蛋白质或糖脂。如本文所用的术语“抗原”是指可以在靶细胞上表达并且可以被包括但不限于抗体或TCR、或工程化分子(包括但不限于转基因TCR、CAR、scFv或其多聚体、Fab片段或其多聚体、抗体或其多聚体、单链抗体或其多聚体、或可以以高亲和力执行结合至结构的任何其他分子)的适应性免疫系统识别的分子实体。

[0183] 本文所用的术语“抗-6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR”是指结合TCBM的CAR,所述TCBM含有生物素作为LaM,含有衍生自例如6-(6-氨基己酰胺基)己酸或6-(6-氨基己酰胺基)己酸活性酯的6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分作为LiM,并且含有针对靶细胞的抗原的ABM。

[0184] 6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分和生物素标记部分的界面、连接和/或相互作用部分产生接头/标记表位(LLE),即6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分。

[0185] 例如,将生物素-LC-LC-NHS(Thermo Fisher Scientific,Mw 567,70g/mol,目录号21343,CAS-No.89889-52-1)偶联至如本文公开的ABM导致可以被如本文公开的所述抗-6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分CAR结合的如本文公开的TCBM。

[0186] 如例如图1C中所示的6-(6-氨基己酰胺基)己酰基接头部分可以具有任何功能性化学基团,例如羧基、活性酯、乙酰胺或马来酰亚胺,其能够使用用于偶联至其的NH₂或SH基团偶联至如本文公开的ABM(例如抗体或其片段)。

[0187] 如本文所用的术语“靶细胞”是指在其细胞表面上表达抗原的细胞,其应被如本文公开的靶细胞结合分子的抗原结合部分识别(结合)。靶细胞可以是癌细胞或任何其他疾病细胞。

[0188] 术语“疾病”是指受试者中的功能异常或紊乱,例如癌症、自身免疫疾病或病毒、细菌、寄生虫或其他感染。

[0189] 如本文公开的CAR(多肽)、编码CAR的核酸分子、重组表达载体、表达CAR的细胞和表达CAR的细胞群,可以被分离和/或纯化。术语“分离的”意指从天然状态改变或移除。例如,分离的细胞群意味着这些细胞的富集和从通常在天然存在状态下与所述分离的细胞相关的其他细胞中分离。分离的细胞群是指基本上纯化的细胞群,其是比在自然界中发现的更均质的细胞群。优选地,富集的细胞群包含至少约90%的所选择的细胞类型。在特定方面,细胞群包含至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的所选的细胞类型。

[0190] 例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是从其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质也可以存在于非天

然环境中,例如存在于宿主细胞中。

[0191] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物,例如小鼠、大鼠、牛、猪、山羊、鸡、猴或人。优选地,受试者是人。受试者可以是患有例如癌症的疾病的受试者(患者),但受试者也可以是健康受试者。

[0192] 如本文所用的术语“自体的”是指衍生自相同受试者的任何材料,其随后被重新导入。

[0193] 如本文所用的术语“同种异体的”是指衍生自相同物种的与重新导入材料的受试者不同的受试者的任何材料,

[0194] 术语“治疗有效量”或“治疗有效群体”是指在受试者中提供治疗益处的细胞群的数量。

[0195] 与抗体、如例如在本文公开的TCBM中使用的其抗原结合片段、或CAR的抗原结合结构域相关的术语“特异性结合”或“特异于”是指识别并结合特定抗原但基本上不识别或结合样品中的其他分子的抗原结合结构域。特异性结合来自一个物种的抗原的抗原结合结构域也可以结合来自另一个物种的抗原。这种跨物种反应性对于许多抗体是典型的,因此不与该抗原结合结构域是特异性的定义相矛盾。特异性结合抗原的抗原结合结构域也可以结合抗原的不同等位基因形式(等位基因变体、剪接变体、同种型等)或来自相同基因家族的该抗原的同源变体。这种交叉反应性对于许多抗体是典型的,因此不与该抗原结合结构域是特异的定义相矛盾。

[0196] 如本文所用的术语“工程化细胞”和“遗传修饰的细胞”可互换使用。该术语意指含有和/或表达进而改变细胞或其后代的基因型或表型的外源基因或核酸序列。特别地,该术语是指细胞,优选免疫细胞,可以通过本领域公知的重组方法操作以稳定或瞬时表达在天然状态下不在这些细胞中表达的肽或蛋白质。例如,免疫细胞被工程化以在其细胞表面上表达人工构建体,例如嵌合抗原受体。例如,可以使用逆转录病毒或慢病毒载体将CAR序列递送到细胞中。

[0197] 术语“免疫细胞”或“免疫效应细胞”是指可以是免疫系统的一部分并且执行特定效应功能的细胞,例如 α - β T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、先天性淋巴细胞(ILC)、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞、 γ - δ T细胞、间充质干细胞或间充质基质细胞(MSC)、单核细胞或巨噬细胞。优选的免疫细胞是具有细胞毒性效应功能的细胞,例如 α - β T细胞、NK细胞、NKT细胞、ILC、CIK细胞、LAK细胞或 γ - δ T细胞。“效应功能”是指细胞的特定功能,例如在T细胞中,效应功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。

[0198] 本文所用的术语“治疗”(治疗)疾病是指降低受试者经历的疾病或病症的至少一种体征或症状的频率或严重性。

[0199] 如本文所用的术语“表达”定义为由其启动子在细胞中驱动的特异性核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0200] 术语“表位”是指可被免疫系统,具体地被抗体、B细胞或T细胞识别的抗原部分。例如,表位是抗体或其抗原结合片段结合至其的抗原的特定片段。

[0201] 如本文所用的术语“接头/标记表位”(LLE)或“标记/接头表位”可互换使用,并且是指由本文公开的TCBM的缀合的接头部分和标记部分的上下文、界面和/或环境形成的表

位。通过标记部分与接头部分的偶联产生的表位在受试者中不是天然存在的。产生的表位包含所述LaM的一部分和所述LiM的一部分。优选地,所述LLE在旨在用表达如本文公开的CAR的细胞治疗的受试者中不引起或不倾向于引起免疫反应。对LLE的唯一要求是它是与包含LLE结合结构域的CAR相关的表位。如本文公开的衍生自表位识别分子(例如识别标记/接头表位的抗体)的CAR的细胞外LLE结合结构域以比没有接头部分的内源性标记部分(即受试者中的天然存在的分子)(自身抗原)更高的偏好结合新产生的表位(即标记/接头表位)(修饰的自身抗原)。

[0202] 所述CAR的所述细胞外LLE结合结构域以比所述天然存在的分子高至少两倍,优选至少5倍,更优选至少10倍,最优选至少高20倍的亲和力结合所述LLE。

[0203] 如序列表方案中给出的SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20的氨基酸序列主要是如本文公开的CAR的部分或完整序列。所述SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20的序列还可以分别包含这些序列的变体,其具有缺失、增加或替换的一些氨基酸,同时仍保留如本文所述的预期功能。因此,该定义中包括的是分别为SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20的氨基酸序列的变体,例如分别基本上类似于SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20的氨基酸序列,在氨基酸序列水平上具有至少70%、或至少75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性的分别。通常,在该定义中包括分别不导致序列SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20的预期功能的有意改变的所有氨基酸变异。在本发明的上下文中,“序列同一性”可以使用本领域公知用于氨基酸序列的比对程序使用成对比对来确定。

[0204] “循环系统”是受试者的器官系统,其允许血液将营养物(例如氨基酸和电解质)、氧气、二氧化碳、激素和血细胞循环并输送往返体内细胞以提供营养并帮助对抗疾病,稳定温度和pH值,并维持体内平衡。循环系统包括两个独立的系统:分配血液的心血管系统和循环淋巴的淋巴系统。

[0205] 如本文所用,术语“受试者中的天然存在的分子或其衍生物”是指受试者中的分子或物质,优选地,所述分子位于细胞外或至少具有细胞外部分,例如跨膜蛋白。天然存在的分子可以以游离形式存在或者共价或非共价结合另一分子,例如结合蛋白质。例如,生物素以游离的形式在血液系统中循环,但也结合例如血浆蛋白。

[0206] 由于这种要求,这些分子是非免疫原性的,因为它们是受试者的内源性分子(自身抗原)。例如,生物素是受试者中天然存在的分子,因为它是受试者的血液系统(循环系统)中的循环分子。术语“其衍生物”在本文中意指受试者的所述天然存在的分子可以经历一些微小的修饰而不改变所述分子的性质。所述修饰与所述分子的接头部分的缀合不相同。

[0207] 实施方式

[0208] 除了如本文公开的CAR系统的上述应用之外,在下文中描述本发明的其他实施方式,但不旨在限于这些实施方式。

[0209] 在本发明的一种实施方式中,抗LLE CAR是抗6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分CAR,其中所述细胞外LLE结合结构域包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列,TCBM包含6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分和特异性地结合癌细胞抗原(例如抗GD2或CD19)的ABM。

[0210] 本文提供的结果显示,无论选择的ABM如何,抗6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分CAR的CAR系统和包含6-[6-(生物素酰氨基)己酰胺基]己酰基部分的TCBM很好地

起作用。

[0211] 已经产生了多种版本的抗-6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR结构,具有包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的scFV的可变重-轻链方向(HL和LH),以及可变细胞外间隔区序列(图2),并且已经将这些序列克隆到能够编码CAR分子以及标志物(LNGFR)的多顺反子慢病毒载体骨架中。

[0212] 图3显示,对于所有测试的构建体,病毒载体的产生和LNGFR的表达都是可能的。

[0213] 从PBMC富集T细胞,并使用编码如图2所示的构建体的慢病毒载体在体外激活和转导。然后将不同的抗-6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR T细胞与LS在1:1的比率下共培养。将缀合6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分的抗CD19抗体以给定剂量加入培养物中或不加入(阴性对照)。然后测量由抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR T细胞引起的细胞毒性。证实SEQ ID NO:11是最有效的构建体(图4)。

[0214] 使用不同的肿瘤细胞系和不同的抗体(分别为MCF7和抗CD19)确认结果,如图5A-D所示。

[0215] 抗GD2或抗CD19抗体的剂量滴定显示抗-6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR T细胞在低至1ng/ml的剂量下有效杀死其肿瘤靶标(图6A和B)。该剂量远低于体内抗肿瘤功能所需的剂量。细胞毒性进一步随不同的效应细胞与靶细胞的比率而变化(图7A和B)。

[0216] 在不存在标记(例如生物素化)抗体或存在对肿瘤特异的非标记抗体或存在对肿瘤不特异的标记抗体的情况下,抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR T细胞可以对肿瘤靶标不具有细胞毒性。这是使用2种不同模型的如图8和图9所示的情况。抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR功能必须不受血液中存在的潜在交叉反应性配体例如循环生物素的损害。人血清中存在的生物素的剂量范围为60至370pmol/L (Mock et al,1995,JofNutrition)。显示在存在高达30μg/mL的生物素的剂量(远超生物素的生理水平)或高达50%的人AB血清的情况下,抗6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分CAR的功能不受损害。参见图10和图11。

[0217] 在本发明的另一种实施方式中,如本文公开的抗LLE CAR在来自供体(同种异体)或患者(自体)的T细胞中表达。激活这些细胞并进行基因修饰(使用病毒载体或非病毒载体)以表达抗LLE CAR。将这些基因修饰的T细胞作为治疗有效的抗LLE CAR表达细胞群输注到患者体内。向患者输注确定剂量的TCBM制剂,所述TCBM制剂包含针对表达被TCBM识别的抗原的靶细胞的ABM。

[0218] TCBM可以在输注抗LLE CART细胞输注之前、期间和/或之后递送至接受者。

[0219] 然后,抗LLE CAR T细胞将识别与其特定靶标结合的TCBM。进而,抗LLE CAR T细胞对结合的TCBM的识别诱导输注的修饰的T细胞提供其预期的功能-主要是表达细胞因子和/或是细胞毒性的(图1)。

[0220] 例如,TCBM可以靶向恶性细胞表面的抗原,使得抗LLE CAR T细胞能够杀死肿瘤细胞。在另一个应用中,TCBM输注的由感染特定病原体的细胞表达的靶抗原,并使T细胞能够介导杀死感染的细胞或由基因修饰的T细胞释放炎性细胞因子。在另一个例子中,TCBM结合细胞表面抗原或在炎症部位表达的分子,以诱导来自T细胞的调节响应。T细胞响应的差异可以通过使用的T细胞的类型(例如细胞毒性CD8⁺T细胞或调节性CD4⁺T细胞)和用于产生抗

LLE CAR的细胞内信号传导结构域的类型来控制(例如CD3 ζ 和4-1BB以诱导促炎响应或CD3 ζ 和PD-1以诱导抗炎响应)。

[0221] 为了提供增强的控制 and 安全性,可以以剂量、空间和时间方式使用TCBM的制剂之一或组合。

[0222] 可以进行TCBM的剂量响应,由此患者接受抗LLE CAR T细胞和极低剂量的TCBM,然后连续增加TCBM的剂量直至观察到期望的响应或直至达到剂量限制性毒性。

[0223] 可以输注多种TCBM以靶向在一种或多种靶细胞上表达的多于一种靶抗原,有效地产生多克隆响应。

[0224] 具有不同ABM的TCBM可以一个接一个地递送。

[0225] 在脱离TCBM递送后,抗LLE CAR T细胞不再能够提供其期望的效应功能。但是,在重新输注TCBM后可以恢复该功能。

[0226] 如本文公开的CAR系统还可以以下列方式使用:第一波TCBM输注到患者的靶免疫调节细胞(例如Treg、M2、TAM、MDSC、骨髓衍生细胞、单核细胞)中。并且连续波的TCBM靶向肿瘤以被破坏。这种方法的目的是首先破坏免疫屏障,防止T细胞仅在时间限制性的时间窗口内有效地攻击肿瘤。

[0227] 在本发明的另一种实施方式中,抗LLE CAR在非常有效但在体内寿命短的NK细胞和/或NKT细胞中表达。这种选择细胞作为基因修饰的效应细胞是旨在用于其中体内基因修饰细胞的存在仅在规定的时段(例如少于6个月,或甚至至少于2个月)内需要的治疗。

[0228] 如本文公开的抗LLE CAR也可以在 γ/δ T细胞中表达,以获益于其效应物和归巢能力。该情况尤其适用于从供体到受体的同种异体转移以避免GvHD的情况。

[0229] 在本发明的一种实施方式中,如本文公开的结合抗LLE CAR的TCBM可以包含ABM中的两个不同的抗原识别位点(本文称为“双特异性”,而不是对于相同抗原为二价),其中TCBM的每个识别位点具有低亲和力和/或高 K_{off} ,因此靶标必须表达抗原两者,以使“二价”TCBM以足够的亲合力结合。仅表达一种靶标的细胞将不允许“二价”TCBM足够好地结合抗LLE CAR T细胞以递送其效应功能。

[0230] 在另一种方法中,TCBM靶向肽MHC复合物。

[0231] 如本文公开的抗LLE CAR还可以在干细胞和/或多谱系祖细胞和/或诱导多能干细胞中表达,优选由它们自身的启动子驱动,优选仅在T细胞中有活性的谱系特异性启动子。然后细胞将从基因修饰的干细胞和/或多谱系祖细胞分化,并产生将表达抗LLE CAR及其自身T细胞受体的T细胞。该策略优选用于患者进行同种异体干细胞移植的情况。一旦干细胞和/或多谱系祖细胞产生T细胞,就可以通过输注特定TCBM来驱动针对靶向的疾病的免疫响应。

[0232] 或者,使用能够特异性靶向适应性免疫系统的亚集例如CD8和/或CD4T细胞、NK、NKT细胞和/或 γ/δ T细胞的修饰病毒载体,在体内直接修饰患者的T细胞。

[0233] 如本文公开的抗LLE CAR还可以在总T细胞、CD8阳性T细胞或CD4阳性T细胞中表达,并与如本文公开的标记/接头部分(例如6-[6-(生物素酰胺基)己酰胺基]己酰基部分)缀合的抗体和/或Fab的文库组合使用以发现应该使用靶向基序(例如抗体)的哪种组合来杀死给定的靶细胞。然后可以使用适当的组合来治疗给定患者的疾病(即,指导的组合CAR疗法)。

[0234] 在本发明的另一种实施方式中,产生表达如本文公开的抗LLE CAR并且不表达TcR $\alpha\beta$ 的T细胞以产生“通用-通用”(U2) CAR T细胞。例如,可以以这种方式对将分化成T细胞的干细胞进行基因工程化,在患者中产生修饰的T细胞的完整组。修饰的T细胞可以以同种异体移植的形式施用给患者。U2抗LLE CAR方法符合通用靶向的标准,因为抗LLE CAR T细胞激活的特异性完全由TCBM的预定义的特异性决定。此外,TcR $\alpha\beta$ 链或CD3的敲除与T细胞受体复合物的连续表达失败,在不存在GvHD保证的情况下促进了在供体通用性方面的通用靶向,并且进一步地,其促进了TcR $\alpha\beta^+$ 和CD3 $^+$ 阳性细胞的靶向,而没有通过CAR靶向进行的自毁。

[0235] 在本发明的另一种实施方式中,免疫细胞表达如本文公开的抗LLE CAR,并且另外抑制或已经敲除了可以是检查点、耗尽或凋亡相关的信号传导受体以及配体例如PD-1、LAG-3、TIGIT、CTLA-4、FAS-L和FAS-R的辅助分子,而且抗LLE CAR细胞中CD4或CD8的敲除将允许瞬时靶向CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ 细胞,这可以是治疗自身免疫疾病例如移植物抗宿主病、实体器官排斥、原发性自身免疫疾病:T细胞和B细胞相关的自身免疫(类风湿性关节炎、慢性炎症性肠病、多发性硬化症、重症肌无力等)的有吸引力的选项。

[0236] 如上所述,如本文公开的抗LLE CAR可以在细胞例如免疫细胞中表达以靶向癌细胞的抗原以治疗癌症。可以治疗的癌症包括未血管化或尚未显著血管化的肿瘤,以及血管化肿瘤。癌症可包括非实体肿瘤(例如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体瘤。用如本文公开的CAR系统治疗的癌症的类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤、以及某些白血病或淋巴样恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤,和恶性肿瘤(例如肉瘤、癌和黑素瘤)。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。

[0237] 血液癌的实例包括白血病,包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓性白血病和成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病)、慢性白血病(例如慢性粒细胞(粒细胞)白血病、慢性髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓发育不良综合征、毛细胞白血病和骨髓发育不良。

[0238] 实体瘤是通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(例如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤的实例,例如肉瘤和癌,包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌,肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、腺乳头状癌、髓样癌、支气管源癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、Wilms肿瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和中枢神经系统肿瘤(例如胶质瘤(例如脑干胶质瘤和混合性胶质瘤)、胶质母细胞瘤(又称多形胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、中枢神经系统淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、网膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0239] 如本文公开的抗LLE CAR可以在免疫细胞中表达以靶向与病毒、细菌、寄生虫或其他感染相关的抗原以治疗感染。

[0240] 如本文公开的抗LLE CAR可以在细胞例如免疫细胞中表达以靶向自身抗原以治疗自身免疫疾病。

[0241] 然而,如本文公开的CAR系统不应解释为仅限于如本文公开的抗原靶标和疾病。相反,它应被解释为包括与其中如本文公开的CAR系统可用于治疗疾病的疾病相关的任何抗原靶标。

[0242] 实施例

[0243] 实施例1.抗LLE CAR T细胞的产生

[0244] 1.1编码抗LLE CAR的不同间隔区变体的慢病毒转载体构建体的文库的产生

[0245] 为了产生识别生物素的抗LLE CAR以及将生物素与识别靶细胞表位的抗体连接的接头部分的部分,基于抗bioMB抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)(SEQ ID NO:1和2)在VH-VL和VL-VH方向上设计scFv(单链可变片段)。可变链通过柔性 $(G_4S)_3$ 接头(SEQ ID NO:4)连接,人CD8前导序列(SEQ ID NO:3)置于scFv的N末端。优化序列以在人宿主细胞中表达,并通过DNA2.0合成,BamHI和NheI切割位点分别在scFv序列的5'和3'侧翼。将这些scFv亚克隆到含有基于人IgG4(HC)和人CD8茎的不同间隔区变体、2A元件以及表达标志物(LNGFR)的转移载体质粒中(图2)。在大肠杆菌NEB5 α 中扩增质粒DNA,并根据制造商的方案使用Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit制备。通过Sanger测序(GATC)验证所有序列。

[0246] 1.2 LV颗粒的产生

[0247] 为了产生慢病毒颗粒,使用25mL培养基(DMEM、10% (v/v) FCS、2mM L-谷氨酰胺)将 $0.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ HEK293T细胞接种在T175细胞培养瓶(175 cm^2)中并于37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 下孵育过夜。在第二天贴壁细胞通常表现出75-90%汇合度。将培养基更换为含有2mM L-谷氨酰胺、不含FCS的DMEM,并制备转染DNA混合物(使用Lipofectamine 3000,ThermoFisher试剂方案)。为此,使用 $0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (对于一个T175培养瓶为35 μg)的总DNA量,并制备两种单独的混合物A(DNA)和B(Lipofectamine)。对于混合物A:转移载体质粒 $0.073\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (12.7 μg)、辅助质粒1(VSVg) $0.018\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (3.18 μg)、辅助质粒2(gag/rev/pol) $0.109\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (19.09 μg)、P3000增强剂试剂2 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ 总DNA,和Opti-MEM $0.033\text{mL}/\text{cm}^2$ 通过短暂涡旋混合。对于混合物B:将Lipofectamine 3000 $0.75/\text{cm}^2$ 重悬于Opti-MEM $0.033\text{mL}/\text{cm}^2$ 中。将混合物A和B分别孵育5分钟,然后将混合物A和B轻轻混合在一起,并在室温下孵育20分钟。然后将脂质/DNA复合物逐滴加到接种的细胞中并在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育约12小时。此后,用 $0.133\text{mL}/\text{cm}^2$ 新鲜培养基(DMEM、10%FCS、2mM L-谷氨酰胺)替换培养基,并在37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 下孵育24小时。通过移液小心地除去细胞培养物上清液来收获组装的慢病毒颗粒。通过以5000 $\times g$ 离心10分钟从上清液中除去细胞碎片。然后将含LV的上清液直接用于转导T细胞,在4 $^\circ\text{C}$ 下储存过夜或在液氮中快速冷冻并储存在-80 $^\circ\text{C}$ 。对于第二轮慢病毒颗粒生产,向转染的HEK293T细胞中加入 $0.133\text{mL}/\text{cm}^2$ 新鲜培养基(DMEM、10%FCS、2mM L-谷氨酰胺),并在37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 下再继续孵育24小时。24小时后,如前所述收获上清液。

[0248] 1.3抗LLE CAR T细胞的转导、扩增和表达分析

[0249] 从健康供体抽取血液样品,并通过在Biocoll(Biochrom)上分离而产生PBMC。使用MACS技术(Miltenyi Biotec)选择 CD4^+ 和 CD8^+ T细胞。对于T细胞激活和扩增,根据制造商的说明使用T细胞激活/扩增试剂盒,人(Miltenyi Biotec)。将T细胞接种到24孔板中,每孔2mL T细胞悬浮液,浓度为在含有人AB血清(10% (v/v) GemCell)、IL-7(10ng/mL)和IL-15

(5ng/mL)的TexMACS培养基中 1×10^6 细胞/mL。

[0250] 在激活后第2天进行转导。为此,将LV上清液以3的MOI加入T细胞中,并通过上下移液小心地重悬浮细胞。在激活后第8天,根据制造商的说明,使用在LS柱(Miltenyi Biotec)上的抗LNGFR微珠通过MACS分离表达LNGFR的细胞。使用T细胞激活/扩增试剂盒,人(Miltenyi Biotec)重新激活选择的细胞,并以 1×10^6 个细胞/mL(每孔2mL)的浓度接种在24孔板中。然后将细胞连续扩增,并在其第一次激活后第14天通过FACS分析测定转导效率。为此,取出等分试样,并根据制造商的说明使用抗LNGFR APC(Miltenyi Biotec)对LNGFR表达进行染色(图3)。

[0251] 实施例2.TCBM产生

[0252] 根据本领域公知的方案通过在氨基处的琥珀酰亚胺基酯进行随机标记而进行抗体修饰。对于修饰,通过流经在缓冲液中平衡的Sephadex G25柱,将抗体重新缓冲至PEB缓冲液中。使用Bradford测定法测定收集的级分的蛋白质含量。合并含蛋白质的级分并测定总体积。通过280nm处的吸收测量最终蛋白质浓度。随后,将相应量的生物素-LC-LC-NHS(Thermo Fisher Scientific,分子量567,70g/mol,目录号21343,CAS号89889-52-1)溶解在DMSO中。将抗体和DMSO/标记物混合物在室温(21°C)孵育1小时,然后流经Sephadex G25柱。再次收集级分,测定蛋白质浓度并合并含蛋白质的级分。通过280nm处的吸收测量最终蛋白质浓度。通过孵育表达抗体靶标的抗体细胞系和用荧光染料缀合的抗生物素抗体进行二次染色,然后进行FACS分析,确认成功的生物素化。此外,HABA测定用于测定每个抗体的生物素分子数量。

[0253] 实施例3.用于细胞毒性分析的靶细胞系的产生

[0254] 3.1稳定转导的萤光素酶表达细胞系的产生

[0255] 根据1.2,LV颗粒的产生是类似的。肿瘤细胞转导方案与T细胞(1.3中描述)类似。使用的转移载体质粒pCDH-EF-eFFly-T2A-mCherry和pCDH-EF-eFFly-T2A-GFP由Helmholtz Zentrum Munchen(德国环境卫生研究中心,基因载体部门,BinjeVick博士和Irmela Jeremias PD医学博士)慷慨提供。转导后,将肿瘤细胞扩增(upscale)并通过流式细胞术评估转导效率(GFP激发488nm激光,带通滤波器525/50nm;mCherry激发561nm激光,带通滤波器615/20nm)。通过FACS细胞分选中-高(GFP/mCherry)群体而富集细胞,丢弃阴性、低阳性和高阳性细胞亚组。将中-高(GFP/mCherry)肿瘤细胞系再次扩增,评估(GFP/mCherry)荧光,冷冻保存并用于功能分析。用pCDH-EF-eFFly-T2A-mCherry和/或pCDH-EF-eFFly-T2A-GFP稳定转导以下细胞系:均为B细胞前体白血病细胞系的NALM-6和NALM-16,均为T细胞急性淋巴细胞白血病细胞系的TcR $\gamma \delta$ 阳性MOLT14和TcR $\alpha\beta$ 阳性JURKAT,以及均为神经母细胞瘤细胞系的LS和LAN-1。

[0256] 3.2表达截短的CD19的MCF-7转染子的产生

[0257] 通过转染线性化的、截短的CD19DNA构建体,通过在冰上在IMDM培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,Thermo Fisher Scientific)中电穿孔,稳定地转染贴壁乳腺癌细胞系MCF-7(Michigan Cancer Foundation-7)细胞系。电穿孔在200V电压和975 μ F下进行,时间常数在40至80之间。对于选择,抗生素G418(Geneticin,InvivoGen)以1mg/mL使用。通过基于FACS的细胞分选,分离具有中-高tCD19表达的均匀表达的MCF-7,并进行扩增以进行冷冻保存和功能分析。

[0258] 实施例4. 基于xCELLigence实时细胞分析 (RTCA) 装置的杀死测定4.1 用于xCELLigence的LS培养

[0259] -培养3天(最佳)

[0260] -5866个细胞/cm²->中间细胞培养瓶(75cm²) 调节至在15mL培养基中为 0.44×10^6 个细胞或大细胞培养瓶(175cm²) 调节至在35mL培养基中为 1×10^6 /mL。

[0261] -仅使用60%和80%汇合度的细胞

[0262] 收集和接种:

[0263] a) 丢弃培养基(RPMI 1640、10%FCS、1%青霉素/链霉素、5%L-谷氨酰胺)

[0264] b) 每个T175cm²烧瓶加入3mL胰蛋白酶/EDTA并孵育2分钟

[0265] c) 加入8mL完全培养基,小心分配细胞并以300g离心5分钟

[0266] d) 将细胞置于10mL新鲜培养基中并用台盼蓝溶液计数细胞

[0267] e) 根据xCELLigence方案接种细胞

[0268] 4.2 xCELLigence杀死测定方案

[0269] 第0天:

[0270] -ExpNotes:命名实验并将其保存在指定管理员(数据目录)下

[0271] -布局:命名孔

[0272] -时间表:添加步骤1(一次)用于校准(自动调整),添加步骤2(间隔30分钟(15分钟),完成测量时间48h(100h))

[0273] RTCA设备的校准:

[0274] -填充培养基50μl/孔,将板放入测量设备并按下开始按钮以启动校准。完成测量后取出板(“准备下一步”)

[0275] 靶标:

[0276] -将LS(之前培养三天)调整为 0.15×10^6 /mL

[0277] -在100μl中以15000个细胞/孔接种肿瘤细胞,

[0278] -加入100μL培养基/孔

[0279] -将板放回测量设备并按下开始按钮

[0280] -记录开始时间

[0281] 第1天:

[0282] 24小时后,细胞指数在1-3之间。按下停止按钮,将板从测量设备中取出以继续进行实验。如果细胞指数低于1,则丢弃实验。

[0283] 30分钟内移液:

[0284] a) 小心取出100μL培养基(剩余体积为100μL)

[0285] b) 以50μL体积添加效应细胞

[0286] c) 以50μL体积添加mAb

[0287] d) 所有孔中的总体积:200μL(在无mAb条件下补满培养基)将板置于测量装置中并继续数据采集。

[0288] 强制性对照:

[0289] -背景:每4孔仅培养基,+/-mAb

[0290] -每4孔仅靶标,+/-mAb

[0291] 实施例5.基于萤光素酶的杀死测定

[0292] 5.1背景

[0293] D-萤光素是萤火虫萤光素酶的双发光反应的底物。它与生存力线性相关,与靶细胞死亡负相关。

[0294] 5.2 D-萤光素-等分试样的制备

[0295] a) 将10mg D-萤光素(合成的, Sigma Aldrich, 目录号L9504 10MG)溶解在1mL DMSO中, 以达到10mg/mL的浓度

[0296] b) 加入24mL DMSO→浓度为0.4mg/mL

[0297] c) 准备55μL等分试样(10%额外体积)

[0298] d) 储存在-20℃

[0299] 5.2.1使用

[0300] a) 从55μL等分试样中取出50μL, 并加入在实验中使用的5mL培养基(CAVE:用于人血浆实验, 仅使用RPMI, 无FCS)→1:100稀释→浓度为0.004μg/μL=4μg/mL

[0301] b) 如果移液体积为50μL并且每个孔中的最终体积为200μL

[0302] →1:4稀释, 终浓度为1μg/mL

[0303] 5.3材料、细胞、试剂和仪器

[0304] a) 稳定转导的萤火虫萤光素酶阳性靶细胞系

[0305] b) 效应细胞

[0306] c) RPMI培养基, Merck-Millipore, 目录号:F1215-500mL

[0307] d) 平底白板, Greiner bio one, 目录号:655083

[0308] e) D-萤光素合成, 目录号:L9504, Sigma Aldrich

[0309] f) ADVIA 120Siemens Bayer(细胞计数)

[0310] g) Perkin Elmer Wallac 1420Victor2微板读数器(读板器)

[0311] 5.4程序

[0312] a) 靶细胞制备:(对一块板的计算)

[0313] 用ADVIA计数靶细胞用于测定。从细胞储备液中取10E06个细胞, 以300g离心10分钟, 完全除去上清液, 调整细胞数为 0.1×10^6 个细胞/50μL。

[0314] 为了保证每孔低孔偏差, 第1列和第12列用作100%对照, 仅肿瘤细胞。此外, 生物发光滴定100%、75%、50%、25%、10%和0%的靶细胞用于在Excel中通过线性趋势线计算来计算裂解公式。

[0315] b) 效应细胞制备

[0316] 用ADVIA计数效应细胞, 并加入50μL培养基中。

[0317] c) 在50μL培养基中以预定浓度在相应条件下加入抗体。

[0318] d) 根据“D-萤光素等分试样的制备”添加D-萤光素。

[0319] e) 将板置于37℃, 5%CO₂的培养箱中。

[0320] f) 在6、12、24和48小时测量生物发光。

[0321] g) 仪器设置: 生物发光的采集, 37℃, VICTOR Wallac读数器。

[0322] 实施例6.细胞内细胞因子染色(ICS)

[0323] 6.1缓冲液/试剂

- [0324] -PBS-EDTA:500mL PBS、2mM EDTA(当你有5M的浓度时为2mL)
- [0325] -FACS缓冲液:500mL PBS、2%FCS(10mL)、2mM EDTA(当你有5M的浓度时为2mL)、0.02%NaAzid(当你有10%的浓度时为1mL)
- [0326] -PermWash:500mL PBS、0.1%皂苷-S7900(0.5g)、0.05%BSA A-3059(2.5g)、0.02%NaAzid(当你有10%的浓度时为1mL)
- [0327] -布雷菲德菌素(Brefeldin)A Sigma(1:125)和/或莫能菌素(Monensin),例如GolgiStop
- [0328] -布雷菲德菌素建议用于细胞内细胞因子染色,莫能菌素用于CD107a
- [0329] -活/死着色:Invitrogen
- [0330] -Cytotfix/Cytoperm:BD
- [0331] -感兴趣的抗体
- [0332] -96孔圆底板
- [0333] 6.2程序
- [0334] -每隔一个孔使用孔以避免洗涤程序中的污染
- [0335] -总孵育体积200μL
- [0336] -孵育时间16小时
- [0337] 开始实验:在每个孔中加入50μL布雷菲德菌素A。
- [0338] 需要补偿:未染色的细胞(与实验中使用的完全相同)。它们在测定期间以相同的方式处理,但不染色。
- [0339] 染色1-3
- [0340] 开始前30分钟准备:
- [0341] -将离心机冷却至4℃
- [0342] -准备缓冲液
- [0343] -获取冰以将板存放在冰上
- [0344] -配制活/死染色溶液:50μL/孔,溶液1:400
- [0345] 孵育时间之后
- [0346] -离心板(1800rpm,2min,4℃)
- [0347] -用200μL PBSE洗涤(1800rpm,2min,4℃)
- [0348] -用200μL PBSE洗涤(1800rpm,2min,4℃)
- [0349] a) 加入50μL/孔的活/死溶液并重悬细胞(不是未染色的状态)
- [0350] 在4℃(黑暗)下孵育时间20分钟
- [0351] 在此期间:产生细胞外主混合物(mastermix)(在FACS缓冲液中),全部在一个falcon中
- [0352] 在L/D溶液的孵育时间后:
- [0353] -加入150μL FACS缓冲液(1800rpm,2min,4℃)
- [0354] -用200μL FACS缓冲液洗涤(1800rpm,2min,4℃)
- [0355] b) 加入50μL/孔细胞外主混合物并重悬细胞(既不是未染色的状态,也不是同型的状态)
- [0356] 在4℃(黑暗)下孵育时间20分钟

- [0357] 孵育时间后:
- [0358] -加入150 μ l FACS缓冲液(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0359] -用200 μ L FACS缓冲液洗涤(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0360] -加入100 μ l/孔Cytotfix/Cytoperm并重悬其
- [0361] 在4 $^{\circ}$ C (黑暗)下孵育时间20分钟
- [0362] 在此期间:产生细胞内主混合物(在PermWash中),全部在一个falcon中
- [0363] 孵育时间后(Cytotfix/Cytoperm):
- [0364] -加入100 μ l/孔PermWash(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0365] -用200 μ l PermWash洗涤(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0366] c) 加入50 μ L/孔细胞内主混合物并重悬其(不是未染色的)
- [0367] 在4 $^{\circ}$ C (黑暗)下孵育时间20分钟
- [0368] 在此期间:产生PFA溶液(总是新的,不保留)、FACS缓冲液+1%多聚甲醛、储备液浓度37%,200 μ L/孔
- [0369] 孵育时间(IZ)后:
- [0370] -加入150 μ L PermWash(1800rpm,4 $^{\circ}$ C,2分钟)
- [0371] -用200 μ L PermWash洗涤(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0372] -用200 μ L PermWash洗涤(1800rpm,2min,4 $^{\circ}$ C)
- [0373] -加入200 μ l/孔PFA并重悬其
- [0374] 储存在4-8 $^{\circ}$ C直至FACS分析
- [0375] 实施例7.使用CRISPR/Cas9技术产生抗LLE CAR⁺TcRa β ⁻T细胞
- [0376] 根据上述方案,从抗LLE CART细胞(SEQ ID NO:11)产生抗LLE CAR⁺TcRa β ⁻细胞。使用 **Neon[®]** 转染系统(电穿孔)通过基于mRNA的CRISPR/Cas9技术完成TcRa β 链的敲除。通过MACS技术富集高度纯化的抗LLE CART细胞,用于产生U2抗LLE CART细胞。
- [0377] 7.1使用**Neon[®]**转染系统对CAR T细胞进行电穿孔
- [0378] 材料/技术:
- [0379] a) 如1.3中所示产生抗LLE CART细胞(SEQ ID NO:11)。
- [0380] b) CART细胞培养基(TexMACS,10%人血清,10ng/mL IL7,5ng/mL IL15)
- [0381] c) DPBS-Dulbecco磷酸盐缓冲盐水
- [0382] d) 定制的修饰的gRNA(用于TCR敲低的指导RNA序列已经在文献中描述并且应该是本领域技术人员可获得的)
- [0383] e) Cas9mRNA从tebu-bio订购,目录号:L-6125-100
- [0384] f) **Neon[®]**转染系统10 μ L试剂盒,Thermo Fisher Scientific,目录号:MPK1025
- [0385] -电解缓冲液E
- [0386] -重悬缓冲液T
- [0387] -10 μ L **Neon[®]**吸头
- [0388] -**Neon[®]**电穿孔管

		储备液浓度	每 1E06 细胞使用的量
[0389]	<u>Cas9mRNA</u>	1000 ng/ μ L	5 μ g
	<u>sgRNA</u>	5000 ng/ μ L	25 μ g

[0390] 程序:

[0391] a) 在微量离心管中转移2E06CAR T细胞(SEQ ID NO:11)

[0392] b) 在微型离心机中以800g,5分钟,用1mL PBS缓冲液洗涤CAR T细胞(SEQ ID NO:11)细胞3次,并小心去除上清液

[0393] 列出使用的试剂:

		对照, 无 sgRNA	有 sgRNA
	<u>缓冲液 T</u>	100 μ L	90 μ L
[0394]	<u>Cas9 mRNA</u>	10 μ L	10 μ L
	<u>sgRNA</u>	0 μ L	10 μ L
	<u>总体积</u>	110 μ L	110 μ L

[0395] a) 用缓冲液E(3mL)填充电穿孔管

[0396] b) 加载程序

[0397] c) 使用100 μ L电穿孔吸头,并且每次电穿孔取100 μ L的相应样品

[0398] d) 使用100 μ L缓冲液T校准电穿孔装置Neon

[0399] e) 如果自检批准,没有错误,则继续样品电穿孔

[0400] 电穿孔设置:电压为1.400,脉冲为10,脉冲数为3,吸头类型为100 μ L

[0401] f) 对于每次电穿孔,将电穿孔移液管放入电穿孔管中。

[0402] g) 开始电穿孔过程

[0403] h) 电穿孔后,立即取出 **Neon®** 移液管,并将样品从10 μ L **Neon®** 吸头转移到预温的900 μ L CAR T细胞培养基中。

[0404] 通过流式细胞术和T7测试(实施例8)进行成功敲除的检测。

[0405] 实施例8.抗LLE CAR修饰的T细胞的功能分析

[0406] 从PBMC富集T细胞,并使用编码所示构建体的慢病毒载体在体外激活和转导。然后将不同的抗LLE CAR T细胞与肿瘤细胞(NALM6)以1比1的比率共培养。将生物素化的抗CD19抗体以给定剂量加入培养物中或不加入(阴性对照)。然后测量由抗LLE CAR T细胞和CD19 CAR T细胞引起的细胞毒性(图4)。表达由SEQ ID NO:11编码的CAR的CAR T细胞显示出最大的细胞毒性作用,与直接抗CD19 CAR T细胞(阳性对照)相当。结果表示从四个不同供体一式三份进行的四次独立实验的平均值。使用实时细胞毒性测定(RTCA xCELLigence)和不同的肿瘤细胞系确认结果。抗LLE CAR T细胞在生物素化的抗GD2抗体存在下对LS细胞显示出细胞毒性(图5B),再次由SEQ ID NO:11编码的CAR给出最有效的细胞毒性响应。此外,抗LLE CAR T细胞在生物素化的抗CD19抗体存在下表现出针对MCF-tCD19细胞的细胞毒性(图5D)。针对不同肿瘤相关抗原(例如CD19和GD2)的mAb滴定显示出在100pg/mL-10 μ g/mL靶标特异性标记的mAb浓度范围内的有利的抗LLE CAR T活性(图6A和B)。该剂量明显低于体内有效治疗应用所需要的抗体剂量。在注册于clinicaltrials.gov的临床试验“CH14.18 1021

Antibody and IL2 After Haplo SCT in Children with Relapsed Neuroblastoma” (NCT02258815)中,抗GD2mAb CH14.18在连续5天以20mg/m²施用,导致高于20μg/mL的高mAb血清浓度(未发表的数据,研究招募中)。因此,在我们的患者个体同情使用中,在高风险B系前体ALL患者中使用Fc优化的嵌合抗CD19mAb治疗(4G7SDIE),观察到高mAb浓度。以20mg/m²每2周应用4G7SDIE。实际上,在体内输注抗CD19抗体后,据报道血液中可检测到60-90μg/mL的水平(MolTher.2016,PMID:27380762)。针对靶向滴定的效应物显示出线性相关性(图7A和B)。

[0407] 此外,使用两种不同的模型,抗-LLE CAR T细胞在不存在标记抗体的情况下,或在存在对肿瘤特异的非标记抗体的情况下,或在存在对肿瘤不特异的标记抗体的情况下,对肿瘤靶细胞显示出低细胞毒性(图8、图9)。xCELLigence RTCA如4中概述用神经母细胞瘤细胞系LS(表达GD2的肿瘤细胞系)以效应物比靶标的比率为1:1进行。在该实验中,在仅有肿瘤细胞系而没有效应细胞(抗LLE CAR T细胞),有抗LLE CAR T细胞而没有mAb的情况下,以及在抗LLE CAR T细胞与未标记的GD2特异性mAb CH14.18和抗LLE CART与结合CD19(其不被LS表达)的特异性标记mAb(4G7SDIE)的情况下,仅观察到轻微差异(图8)。然而,仅在抗LLE CART加上标记的GD2特异性mAb CH14.18的情况下在不到24小时内观察到LS的完全裂解。24小时后,不可以从抗LLE CART细胞排除一些轻微的非特异性抗肿瘤活性(图8)。在基于萤光素酶的测定中获得,仅在存在抗CD19-生物素(4G7-生物素)的情况下,通过抗LLE CAR T细胞优先裂解NALM6靶细胞的类似结果(图9)。

[0408] 最后,抗LLE CAR功能必须不受血液中的潜在交叉反应性配体例如循环生物素损害。显示在存在高达30μg/mL的生物素的剂量(远超生物素的生理水平)或高达50%的人AB血清的情况下,抗LLE CAR的功能不受损害(图10和11)。xCELLigence RTCA如4中概述用神经母细胞瘤细胞系LS(表达GD2的肿瘤细胞系)和抗LLE CAR T细胞以效应物比靶标的比率为1:1在不存在或存在游离生物素(其在细胞培养基中以低(生理)浓度加到超生理浓度)的情况下进行。无论游离生物素浓度如何,在使用抗LLE CAR T细胞和10ng/mL GD2特异性mAb CH14.18的测试条件下,在不到24小时内观察到肿瘤细胞的完全根除(图10)。此外,在用B细胞前体白血病细胞系NALM-6进行的细胞毒性测量期间未观察到抗LLE CAR T细胞的抑制(图11)。生理和超生理浓度的游离生物素或人AB血清都不降低抗LLE CART细胞介导的裂解的特异性裂解(图11)。

[0409] 为了产生“通用-通用”(U2) CAR T细胞,如实施例7中所述产生抗LLE-CAR T (SEQ ID NO:11)TCRαβ敲除细胞。通过TCRαβ表达分析确认成功的敲除(图12A和B)。根据常规染色方案进行流式细胞术。将细胞在含有人白蛋白的PBS缓冲液中洗涤两次,以300g离心10分钟(加速/制动9/9),在黑暗中于4℃染色15分钟,然后再次洗涤两次,然后在根据制造商的方案用抗小鼠补偿珠(BD Biosciences,订购号552843)进行补偿后根据制造商的方案在BD-LSR II上采集。使用TcRab FITC(Miltenyi Biotec,抗TCRα/β-FITC,抗人(克隆:BW242/412),订购号130-098-690),LNGFR APC(Miltenyi Biotec,CD271(LNGFR)-APC,抗人(克隆:ME20.4-1.H4),订购号130-091-884),CD8APC-Cy7(BioLegend,抗人(克隆:SKI),订购号344713),CD4 UV1 BUV 395(BD Biosciences,(克隆:RPA-T4)订购号564724)。虽然CD4/CD8比率保持不变,但TcRαβ表达的降低清楚可见(图12A)。该结果通过T7和TIDE确认,其根据本领域公知的方案进行(图12B)。在存在和不存在10ng/ml抗GD2-生物素(ch14.18-生物素)抗

体的情况下进行抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 和TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 相对LS的基于阻抗的实时细胞毒性测定 (RTCA xCELLigence), 其显示通过CRISPR/Cas9技术产生的TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR (SEQ ID NO:11) T细胞在体外细胞溶解中表现得与TcR $\alpha\beta$ 阳性抗LLE CAR (SEQ ID NO:11) T细胞一样好 (图12C)。此外, 在通过抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 和TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞 (SEQ ID NO:11) 对MOLT14靶细胞进行特异性裂解的过程中, 通过表达或不表达TcR $\alpha\beta$ 链的抗LLE CAR T细胞观察到类似的靶标裂解 (图12D)。此外, 当在存在10ng/ml抗TcR $\alpha\beta$ -生物素mAB的情况下孵育48小时时, 在效应物:靶细胞比率为1:1下, TcR $\alpha\beta$ 敲除的抗LLE CAR T细胞显著降低JURKAT靶细胞的存活 (图12E)。

序列表

<110> Miltenyi Biotec GmbH

<120> 用于靶向多种抗原的适配体嵌合抗原受体表达细胞

<130> Mil_099

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗生物素抗体 (Bio3-18E7.2.A7.A4.A4) 重链 (VH)

<400> 1

[0001]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Asn Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu Leu Gly Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

120

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗生物素抗体 (Bio3-18E7. 2. A7. A4. A4) 轻链 (VL)

<400> 2

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0002]

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导序列 (人)

<400> 3

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

	1	5	10	15
	His Ala Ala Arg Pro			
	20			
	<210> 4			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> scFv 接头序列			
	<400> 4			
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	1	5	10	15
	<210> 5			
	<211> 14			
	<212> PRT			
[0003]	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 间隔区 #A (人 IgG4 HC 铰链)			
	<400> 5			
	Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro			
	1	5	10	
	<210> 6			
	<211> 47			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 间隔区 #B (人 CD8 stalk)			
	<400> 6			
	Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr			
	1	5	10	15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 7

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间隔区 #C (人 IgG4 HC 铰链+CH2+CH3)

<400> 7

Ala Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

[0004]

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
100 105 110

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

145 150 155 160
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
180 185 190
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Gly Lys
225 230

<210> 8
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> CD8 跨膜 (人)

<400> 8

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 9
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB (人)

<400> 9

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

	1		5				10				15						
	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	
				20					25					30			
	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu							
				35					40								
	<210>	10															
	<211>	112															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	CD3zeta 链 (人)															
	<400>	10															
	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	
	1				5					10					15		
[0006]	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	
				20					25					30			
	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	
				35					40					45			
	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	
		50					55					60					
	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	
	65					70					75				80		
	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	
					85					90					95		
	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	
				100						105					110		
	<210>	11															
	<211>	462															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVL/VH-IgG4 铰链-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 11

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65 70 75 80

[0007] Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
145 150 155 160

Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr
165 170 175

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg
180 185 190

Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr
195 200 205

	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	
	210						215					220					
	Asp	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	
	225					230					235					240	
	Met	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Gln	Arg	Val	Gly	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Leu	
					245					250					255		
	Leu	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	
					260					265					270		
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ile	Tyr	Ile	Trp	
			275					280						285			
	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	
		290					295						300				
	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	
	305					310					315					320	
[0008]	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	
					325					330					335		
	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	
					340					345					350		
	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	
			355					360						365			
	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	
		370					375					380					
	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	
	385					390					395					400	
	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	
					405					410					415		
	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	
					420				425					430			
	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	
					435				440					445			

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 12

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVH/VL-IgG4 铰链-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
 35 40 45

[0009]

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr
 50 55 60

Arg Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95

Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser
 115 120 125

Leu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 145 150 155 160

	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	
							165			170						175	
	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	
							180			185						190	
	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	
							195			200						205	
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	
							210			215						220	
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	
	225						230					235				240	
	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	
							245					250				255	
	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	
							260					265				270	
[0010]	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ile	Tyr	Ile	Trp	
							275					280				285	
	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	
							290					295				300	
	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	
	305						310					315				320	
	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	
							325					330				335	
	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val		
							340					345				350	
	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	
							355					360				365	
	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	
							370					375				380	
	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	
	385						390					395				400	

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
405 410 415

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
420 425 430

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
435 440 445

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455 460

<210> 13

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVL/VH-CD8Stalk-CD8TM-41BB-CD3z

[0011]

<400> 13

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
450 455 460

[0013]

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
465 470 475 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490 495

<210> 14

<211> 495

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVH/VL-CD8Stalk-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 14

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	
		35					40				45						
	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Thr	
		50					55				60						
	Arg	Leu	Asn	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	
	65					70				75						80	
	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	
					85				90						95		
	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	
				100					105					110			
	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Gln	Arg	Val	Gly	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	
		115						120					125				
	Leu	Leu	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	
		130					135					140					
[0014]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	
	145					150					155				160		
	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	
				165					170					175			
	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	
			180						185					190			
	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	
		195					200						205				
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	
		210					215					220					
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	
	225					230					235				240		
	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	
				245					250					255			
	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	
				260					265					270			

[0015]

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala			
275	280	285	
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly			
290	295	300	
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile			
305	310	315	320
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val			
325	330	335	
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
340	345	350	
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
355	360	365	
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg			
370	375	380	
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln			
385	390	395	400
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp			
405	410	415	
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro			
420	425	430	
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp			
435	440	445	
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg			
450	455	460	
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr			
465	470	475	480
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
485	490	495	

<210> 15
 <211> 678
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> CD8 前导-抗-BioVL/VH- IgG4 铰链+CH2+CH3-CD8TM-41BB-CD3z

 <400> 15

 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 20 25 30

 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 35 40 45

 Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln
 50 55 60

 [0016] Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 65 70 75 80

 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

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

 Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 145 150 155 160

 Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr
 165 170 175

 Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg

	180	185	190
	Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr		
	195	200	205
	Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys		
	210	215	220
	Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala		
	225	230	235 240
	Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu		
	245	250	255
	Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser		
	260	265	270
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val		
	275	280	285
[0017]	Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	290	295	300
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	305	310	315 320
	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	325	330	335
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr		
	340	345	350
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	355	360	365
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
	370	375	380
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	385	390	395 400
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	405	410	415

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
660 665 670

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675

<210> 16

<211> 678

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVH/VL- IgG4 铰链+CH2+CH3-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 16

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

[0019]

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr
50 55 60

Arg Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser
115 120 125

Leu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly
130 135 140

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val
	145					150					155					160
	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Gln
					165					170					175	
	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly
				180					185						190	
	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn
		195						200					205			
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
	210							215				220				
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg
	225				230						235					240
	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His
				245						250					255	
[0020]	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser
				260					265					270		
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val
		275						280					285			
	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
	290						295					300				
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
	305					310					315					320
	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				325						330				335		
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Gln	Ser	Thr
				340					345					350		
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
		355					360					365				
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser

370	375	380	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
385	390	395	400
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
	405	410	415
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
	420	425	430
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
	435	440	445
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr			
	450	455	460
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
465	470	475	480
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[0021]	485	490	495
Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly			
	500	505	510
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg			
	515	520	525
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln			
	530	535	540
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu			
545	550	555	560
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala			
	565	570	575
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu			
	580	585	590
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp			
	595	600	605

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
610 615 620

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
625 630 635 640

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
645 650 655

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
660 665 670

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
675

<210> 17

<211> 774

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0022]

<223> CD8 前导-抗-BioVL/VH-CH1+IgG4 铰链+CH2+CH3-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr

	100	105	110
	Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr		
	115	120	125
	Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	130	135	140
	Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val		
	145	150	155
	Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr		
	165	170	175
	Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg		
	180	185	190
	Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr		
	195	200	205
[0023]	Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys		
	210	215	220
	Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala		
	225	230	235
	Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu		
	245	250	255
	Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser		
	260	265	270
	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg Ser Thr		
	275	280	285
	Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
	290	295	300
	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
	305	310	315
	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
	325	330	335

	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr	
	340	345 350
	Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val	
	355	360 365
	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val	
	370	375 380
	Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
	385	390 395 400
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
	405	410 415
	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
	420	425 430
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr	
	435	440 445
[0024]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
	450	455 460
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser	
	465	470 475 480
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
	485	490 495
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val	
	500	505 510
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
	515	520 525
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
	530	535 540
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr	
	545	550 555 560
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
	565	570 575

	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
	580	585 590
	Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly	
	595	600 605
	Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg	
	610	615 620
	Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln	
	625	630 635 640
	Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu	
	645	650 655
	Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala	
	660	665 670
	Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu	
	675	680 685
[0025]	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp	
	690	695 700
	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu	
	705	710 715 720
	Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile	
	725	730 735
	Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr	
	740	745 750
	Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met	
	755	760 765
	Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
	770	
	<210> 18	
	<211> 774	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVH/VL-CH1+IgG4 铰链+CH2+CH3-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 18

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr
50 55 60

Arg Leu Asn Trp Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
65 70 75 80

[0026] Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser
115 120 125

Leu Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln
165 170 175

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly
180 185 190

Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn
195 200 205

	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	
	210						215					220					
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	
	225					230					235					240	
	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	
					245					250						255	
	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	
				260					265							270	
	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Ser	Thr	
			275					280						285			
	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
	290						295					300					
	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
	305					310					315					320	
[0027]	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					325					330						335	
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	
				340						345						350	
	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	
			355						360					365			
	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	
	370						375					380					
	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
	385					390					395					400	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
					405					410						415	
	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
				420					425					430			
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Gln	Ser	Thr	

	435	440	445
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	450	455	460
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser		
	465	470	475 480
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	485	490	495
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	500	505	510
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
	515	520	525
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
	530	535	540
[0028]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		
	545	550	555 560
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	565	570	575
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	580	585	590
	Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
	595	600	605
	Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg		
	610	615	620
	Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
	625	630	635 640
	Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
	645	650	655
	Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
	660	665	670

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
675 680 685

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
690 695 700

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
725 730 735

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
740 745 750

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
755 760 765

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
770

[0029]

<210> 19

<211> 569

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 前导-抗-BioVL/VH-IgG4 铰链+CH3-CD8TM-41BB-CD3z

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

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

[0030]

	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
305										310							320
	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
										325							335
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
										340							350
	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
										355							365
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
										370							380
	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	
385										390							400
	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	
										405							415
[0031]	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	
										420							430
	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	
										435							445
	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	
										450							460
	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	
465										470							480
	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	
										485							495
	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	
										500							510
	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	
										515							525
	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	

130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val			
145	150	155	160
Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln			
	165	170	175
Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly			
	180	185	190
Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn			
	195	200	205
Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg			
	210	215	220
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg			
225	230	235	240
Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His			
[0033]	245	250	255
Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ser			
	260	265	270
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg			
	275	280	285
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
	290	295	300
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
305	310	315	320
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	325	330	335
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	340	345	350
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
	355	360	365

	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
	370	380
	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly	
	385	400
	Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys	
	405	415
	Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg	
	420	430
	Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro	
	435	445
	Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser	
	450	460
[0034]	Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu	
	465	480
	Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg	
	485	495
	Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln	
	500	510
	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr	
	515	525
	Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp	
	530	540
	Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala	
	545	560
	Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
	565	

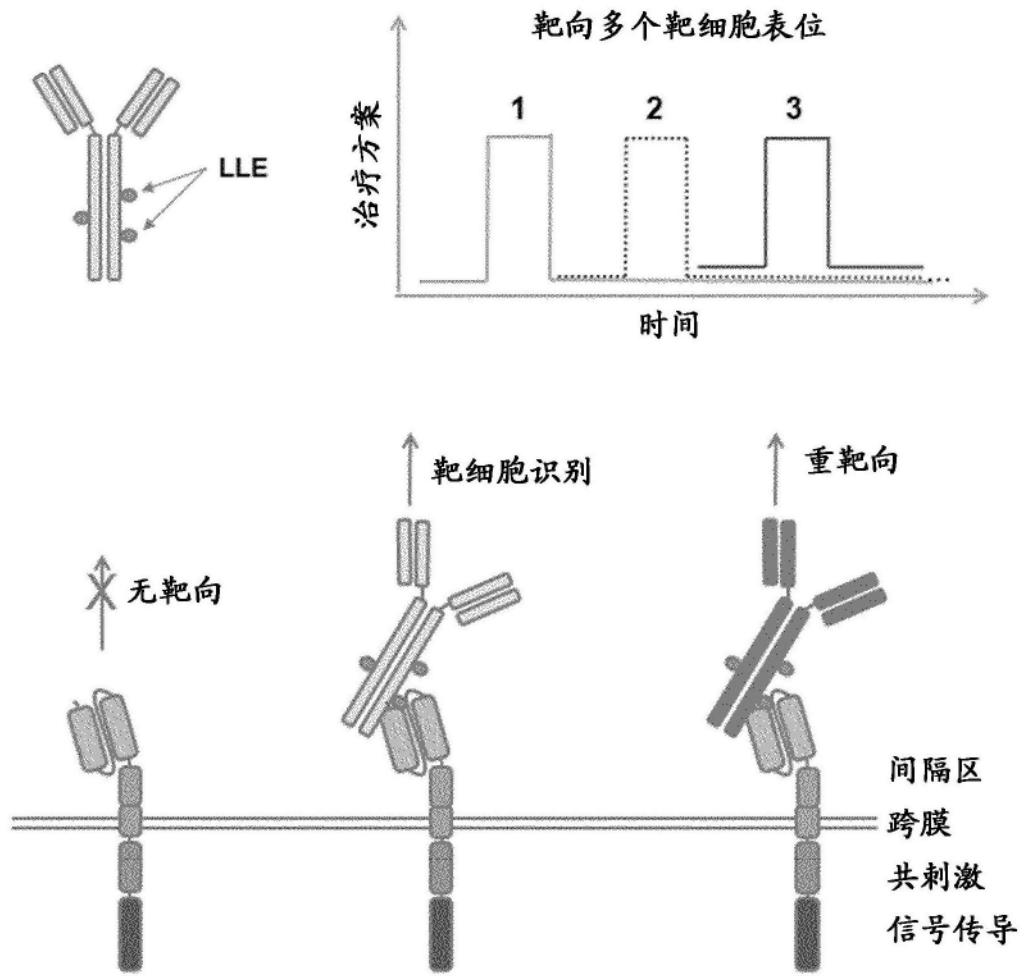


图1A

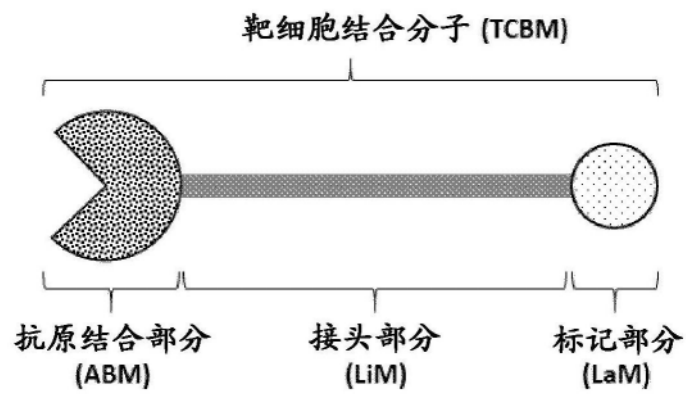


图1B

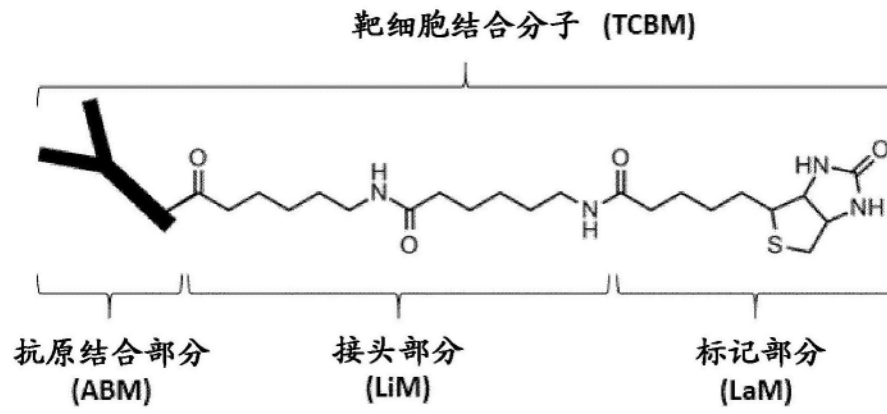


图1C

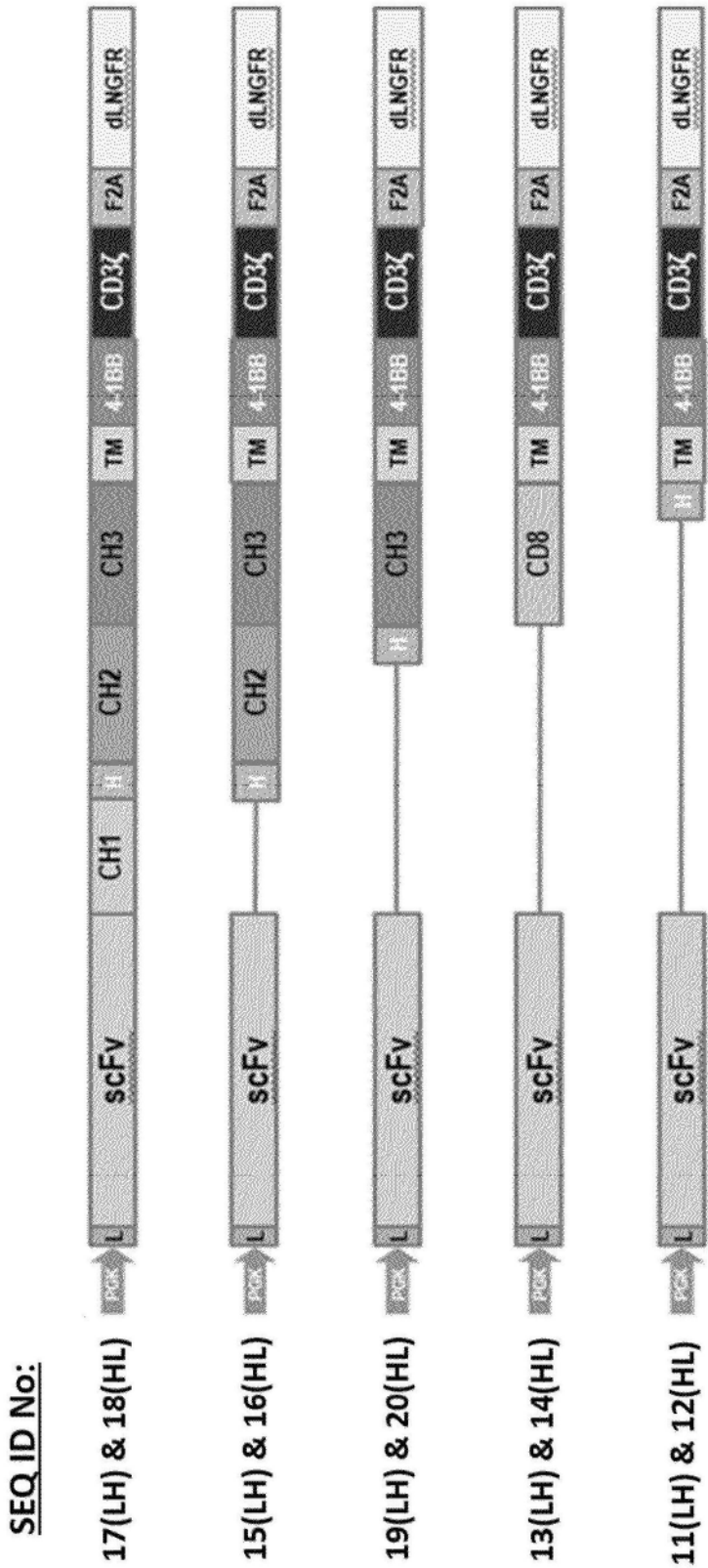


图2

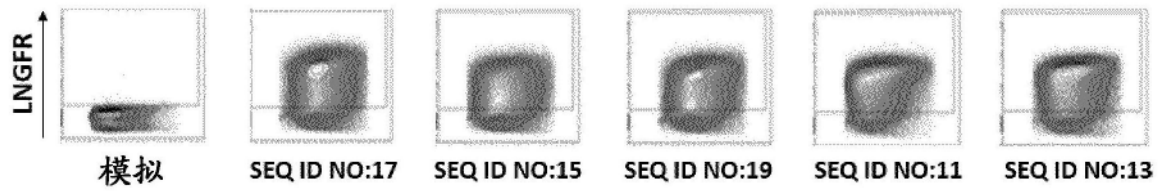


图3

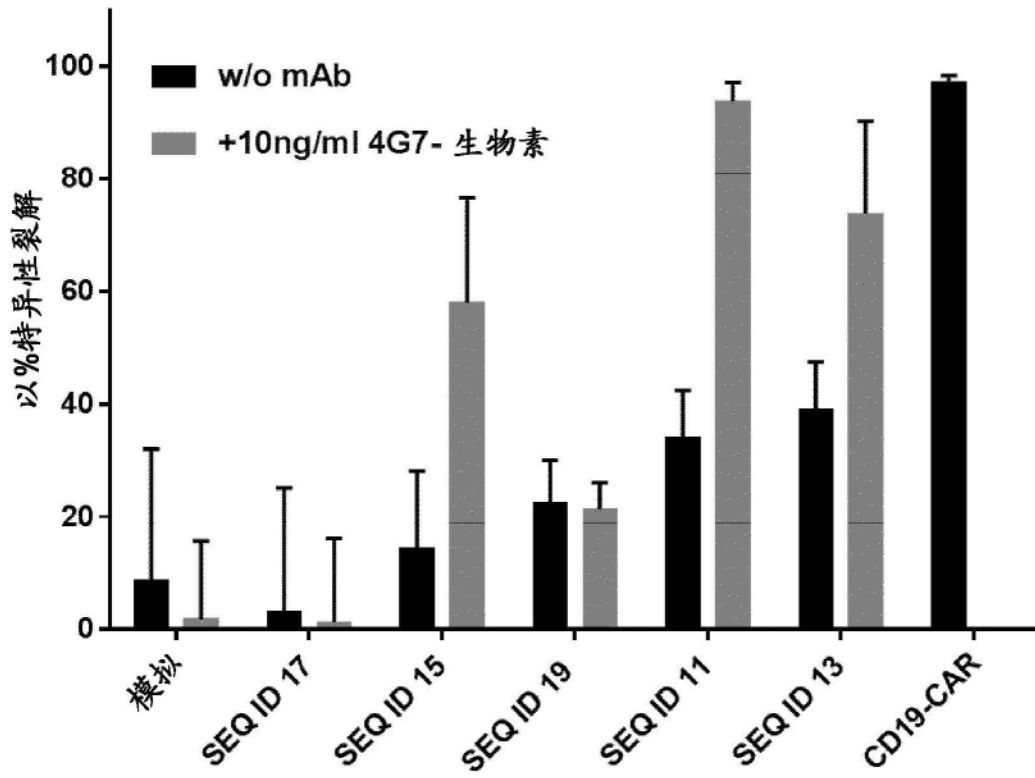


图4

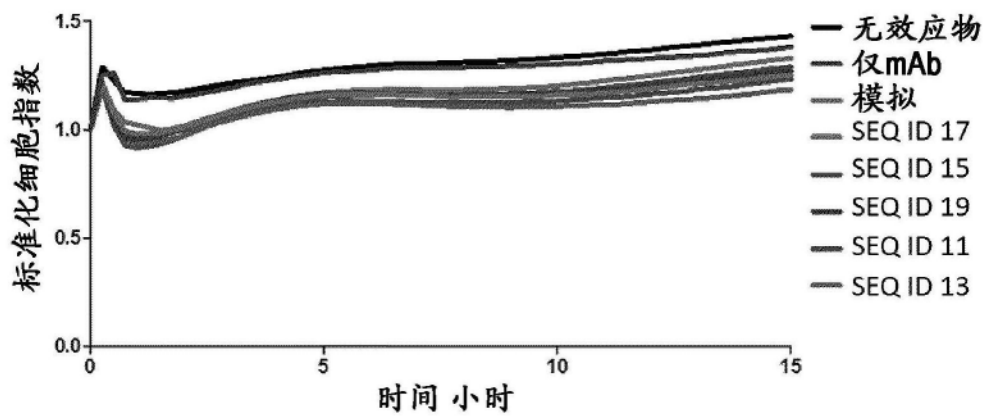


图5A

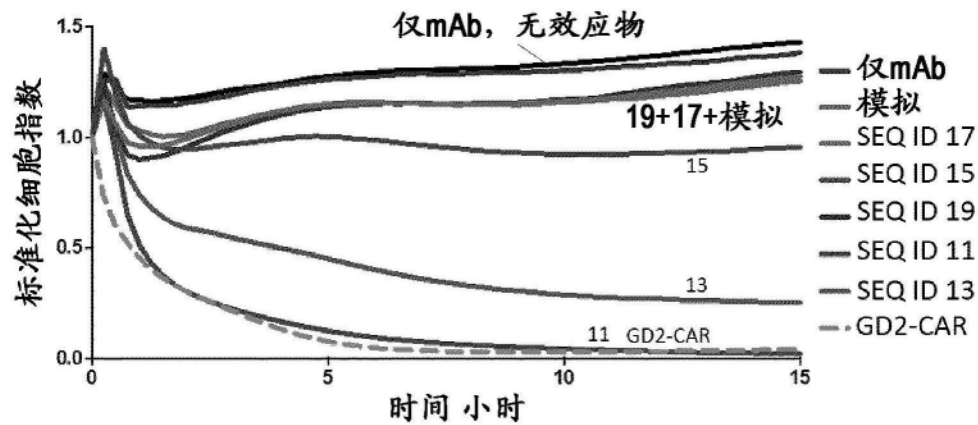


图5B

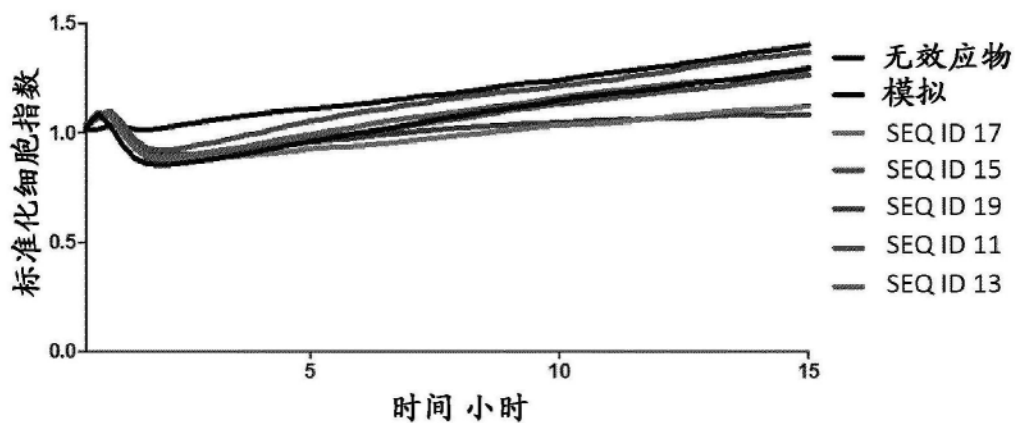


图5C

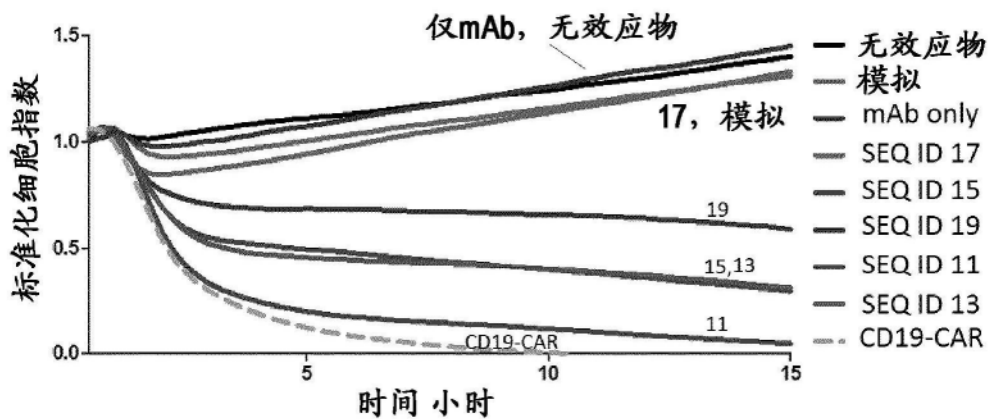


图5D

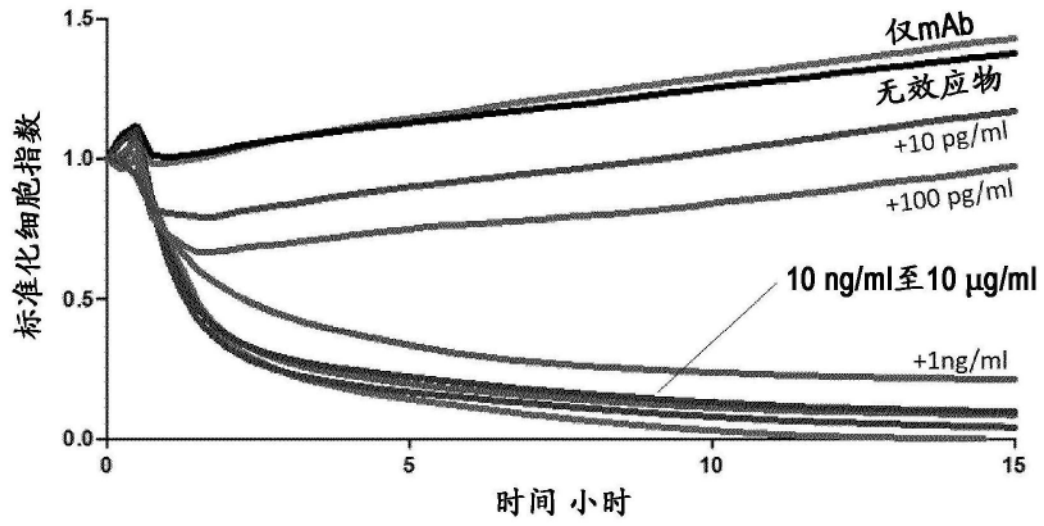


图6A

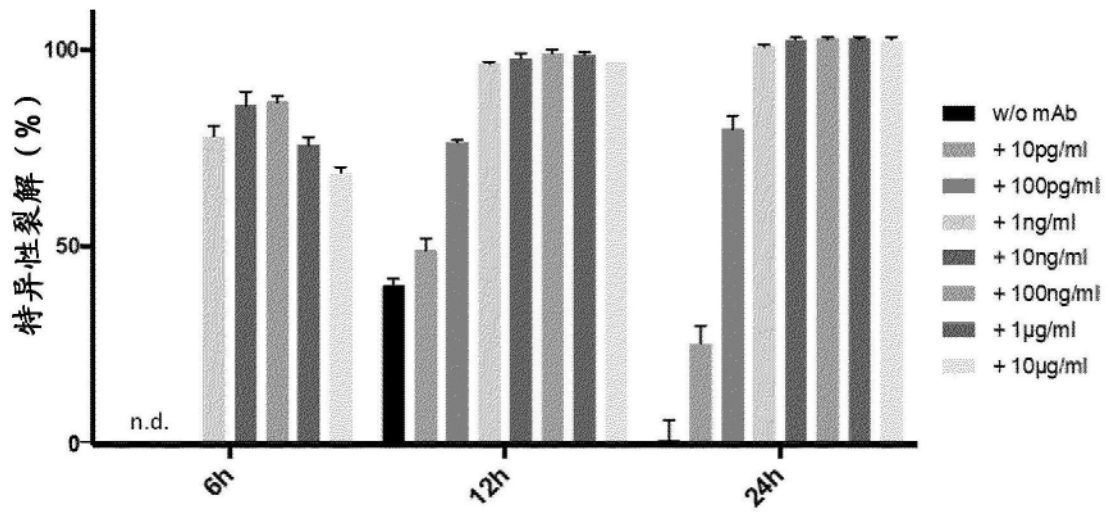


图6B

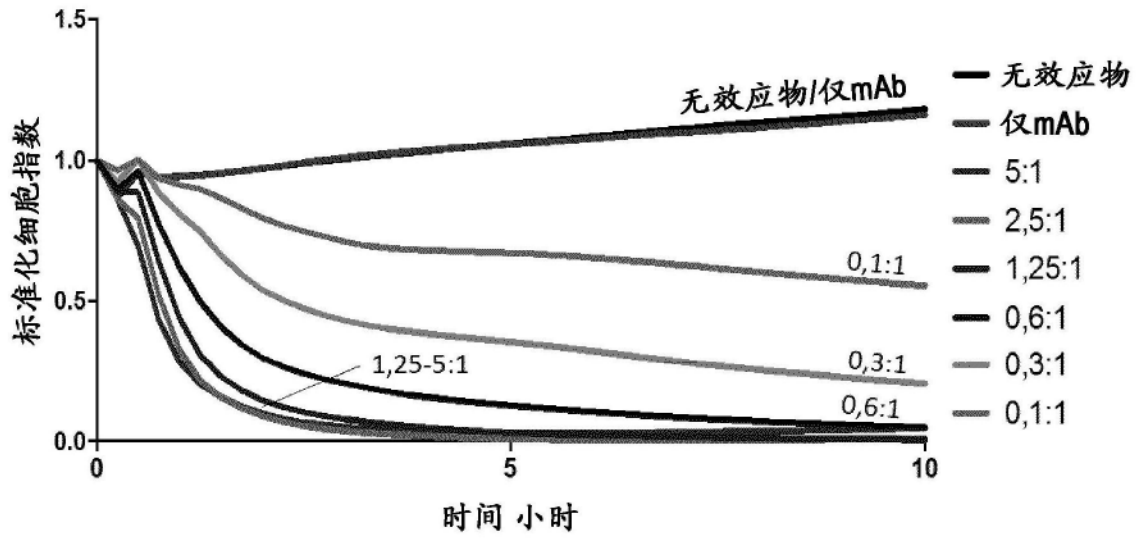


图7A

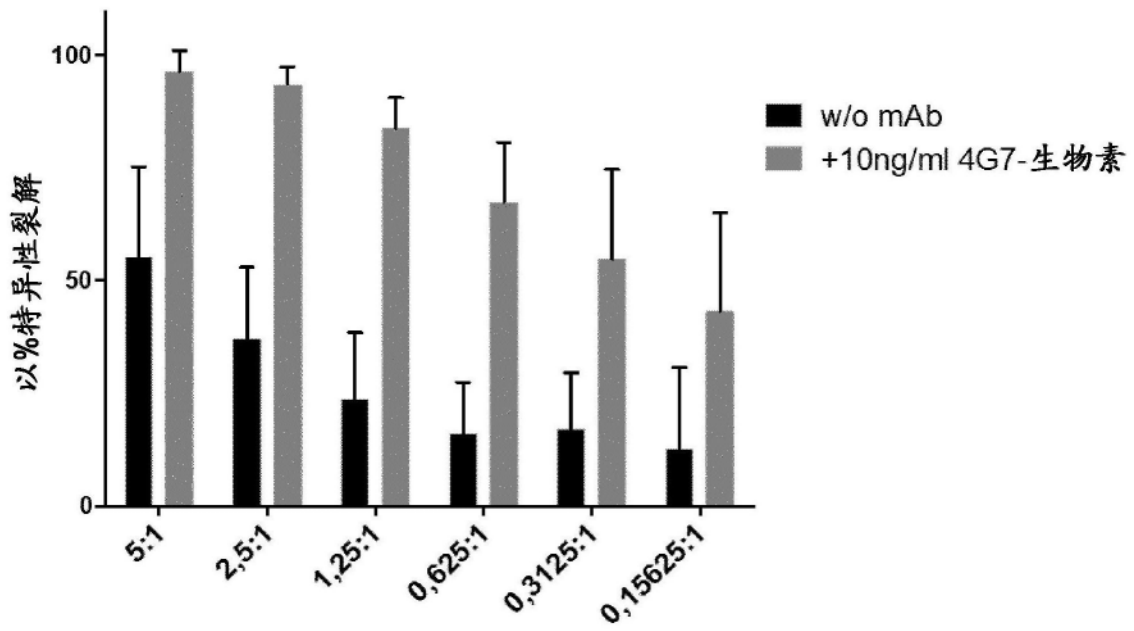


图7B

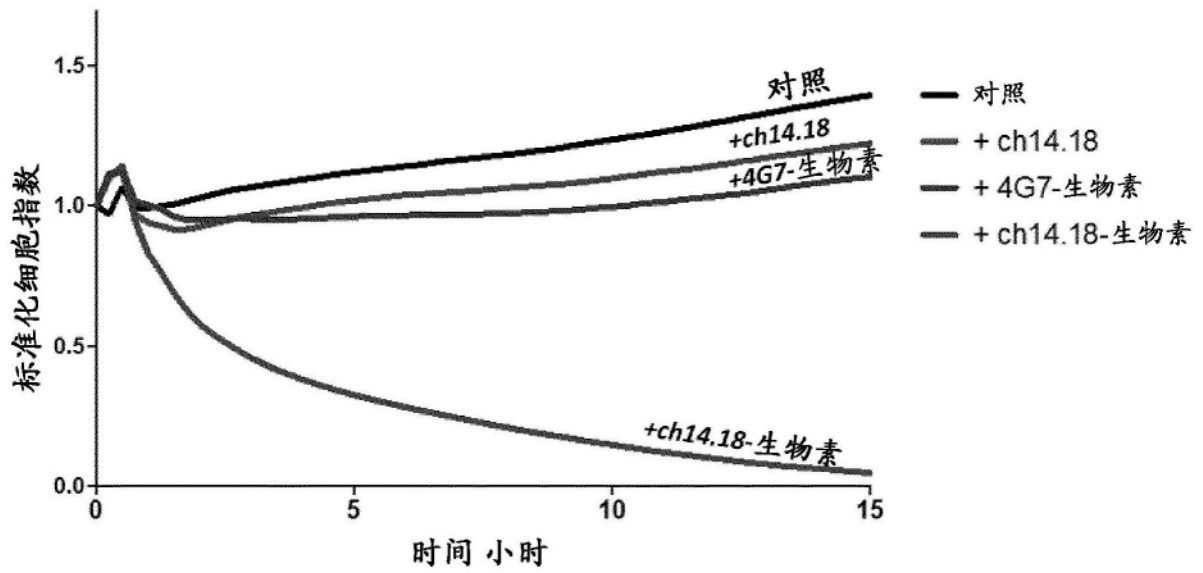


图8

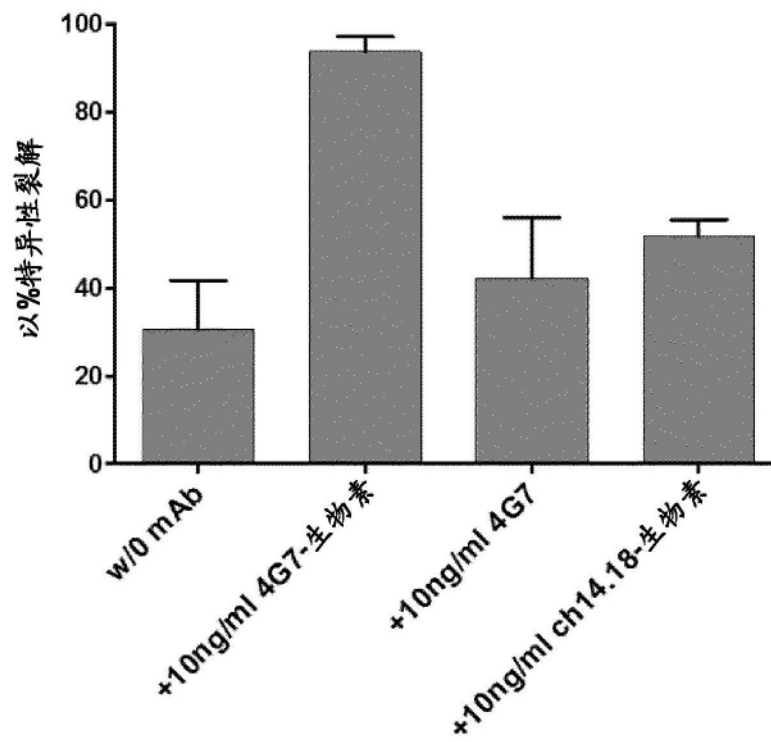


图9

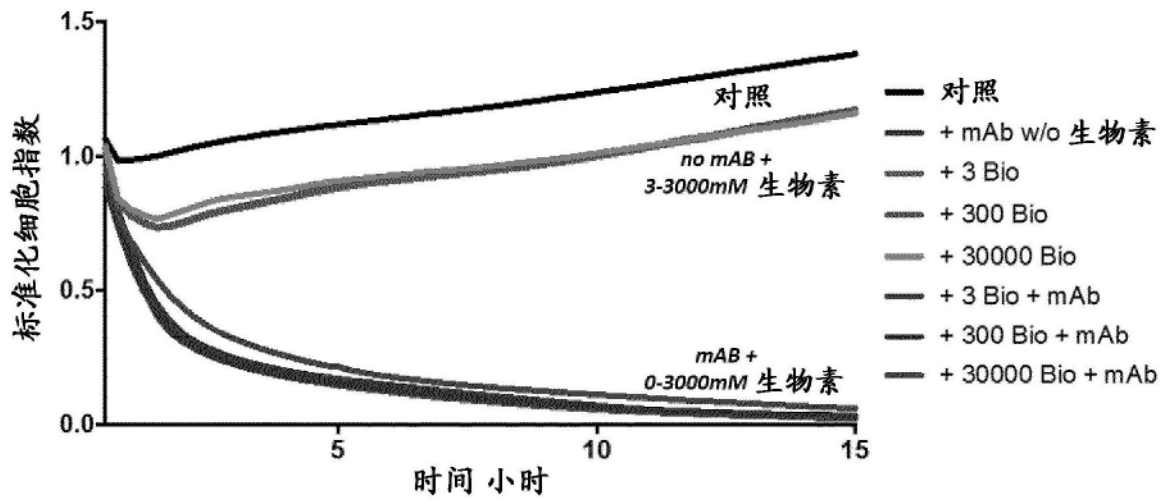


图10

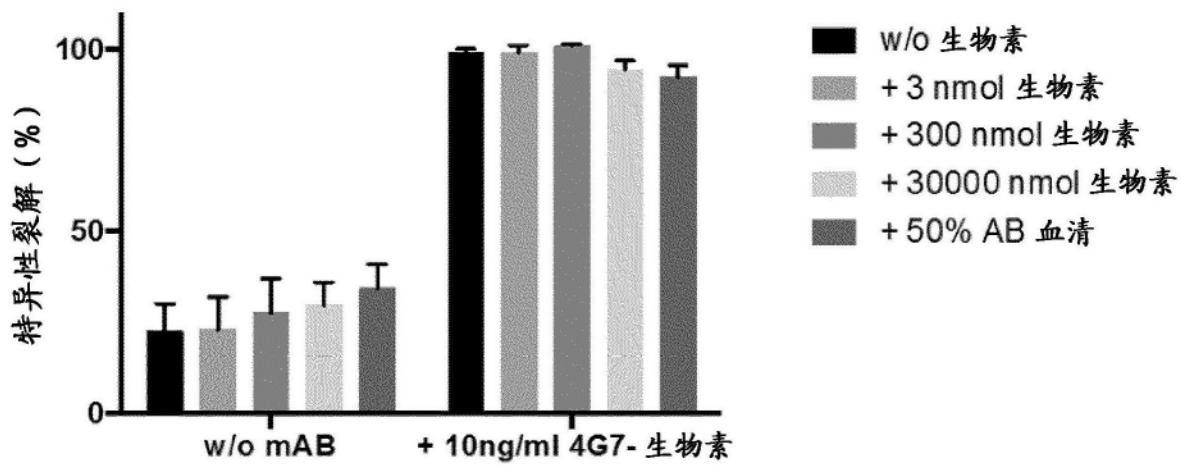


图11

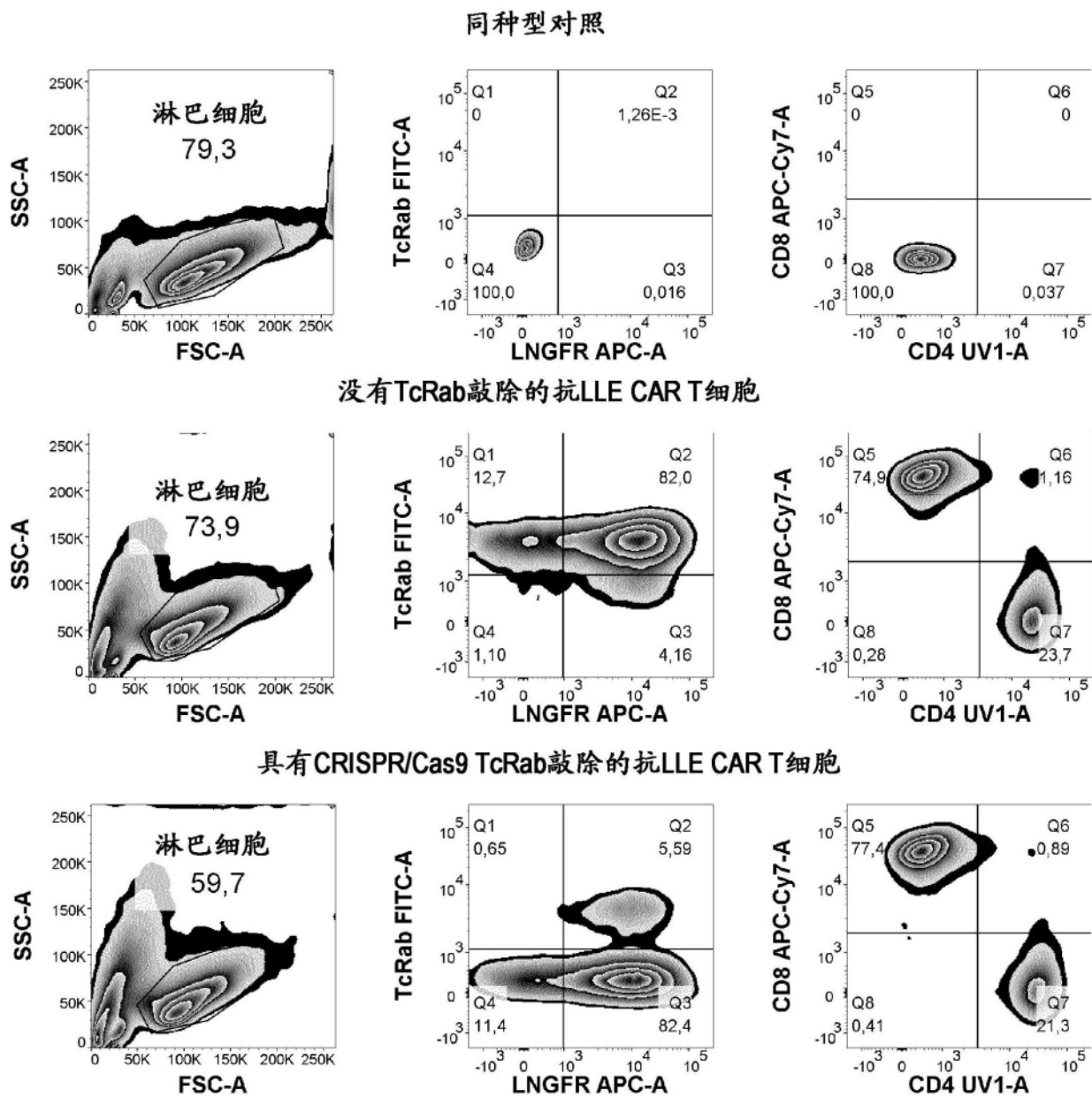


图12A

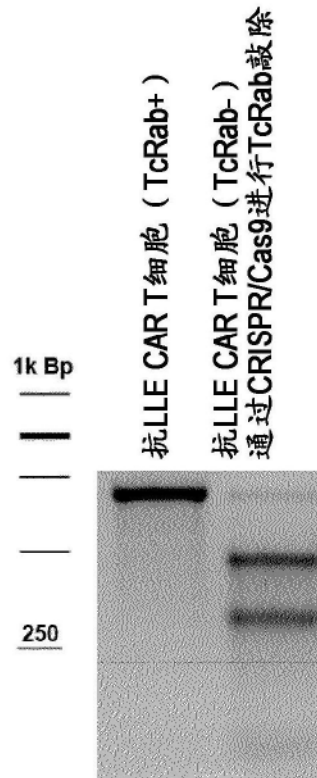


图12B

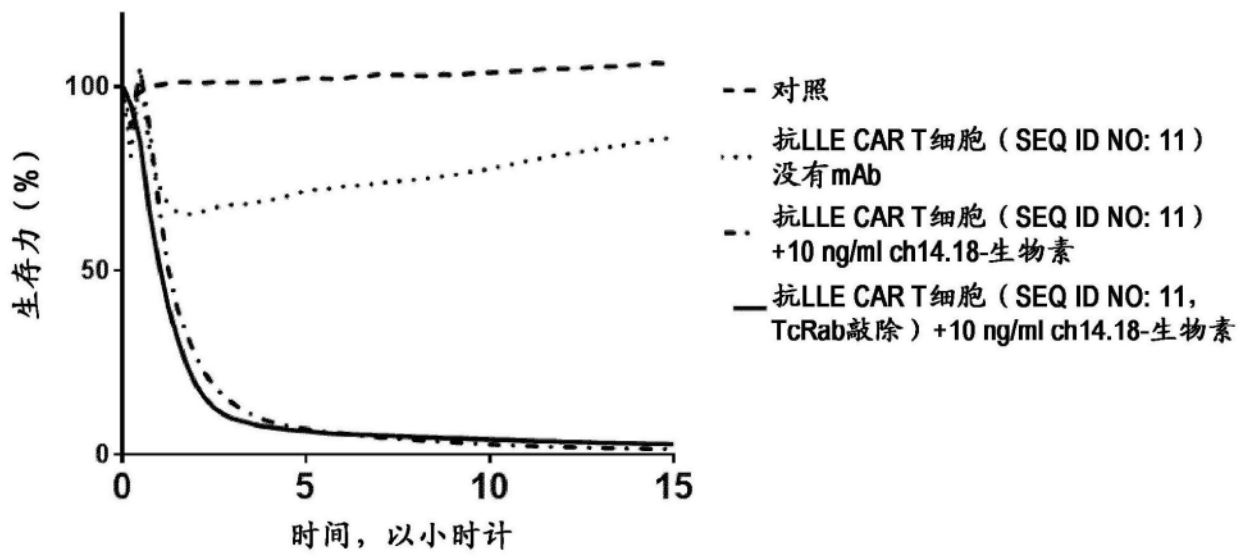


图12C

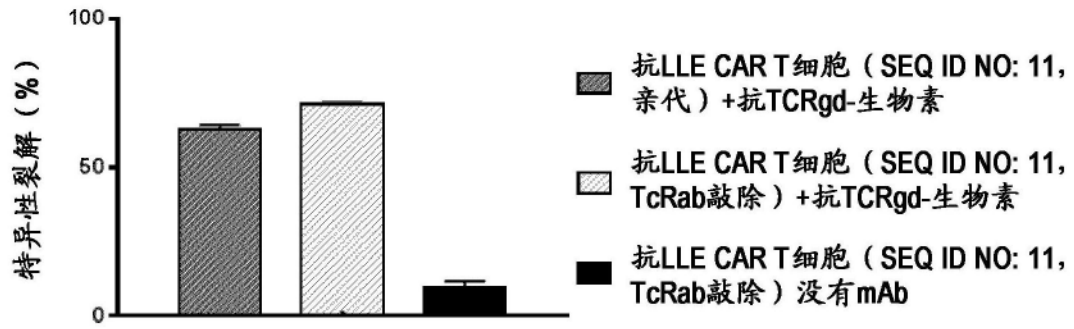


图12D

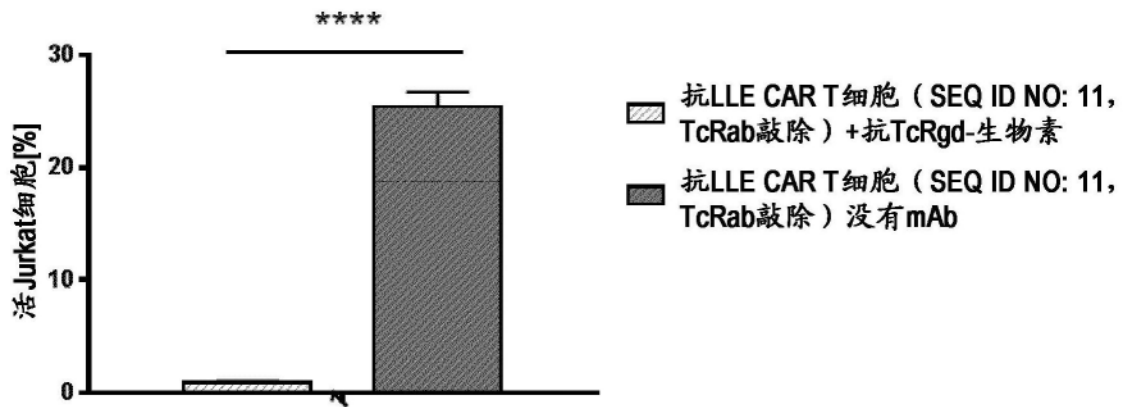


图12E