(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116712535 A
(43)申请公布日 2023.09.08

(21)申请号 202211723888.2
(22)申请日 2016.10.17
(30)优先权数据
62/242,685 2015.10.16 US
(62)分案原申请数据
201680067189.3 2016.10.17
(71)申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会
地址 美国纽约
(72)发明人 S·穆克吉 F·波拉特
A·马哈茂德阿里
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61K 35/15(2015.01)

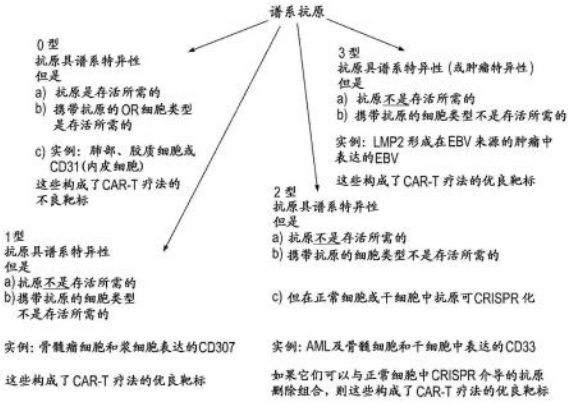
权利要求书4页 说明书49页
序列表（电子公布） 附图24页

(54)发明名称

用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法

(57)摘要

本文公开了施用靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂和缺乏所述谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞群用于血液恶性肿瘤的免疫治疗的方法。



CN 116712535 A

1.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,其包括向有需要的受试者施用:

(i)有效量的靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂,其中所述药剂包含结合所述谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段;和

(ii)缺乏所述谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞群。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是表达嵌合受体的免疫细胞,所述嵌合受体包含结合所述谱系特异性细胞表面抗原的所述抗原结合片段。

3.如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述免疫细胞、所述造血细胞或两者是同种异体或自体的。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述造血细胞是造血干细胞。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述谱系特异性细胞表面抗原是2型谱系特异性细胞表面抗原。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述2型谱系特异性细胞表面抗原为CD33。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体中的所述抗原结合片段是特异性结合作为人蛋白的所述谱系特异性细胞表面抗原的单链抗体片段(scFv)。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述scFv与人CD33结合。

9.如权利要求8所述的方法,其中所述scFv包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:12中的那些相同的互补决定区(CDR),所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:13中的那些相同的CDR。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变结构域。

11.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述谱系特异性细胞表面抗原是1型谱系特异性细胞表面抗原。

12.如权利要求11所述的方法,其中所述1型谱系特异性细胞表面抗原为CD19。

13.如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞为T细胞。

14.如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体还包含:

(a)铰链结构域

(b)跨膜结构域,

(c)至少一个共刺激结构域,

(d)细胞质信号传导结构域,或

(e)其组合。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述嵌合受体包含至少一个共刺激信号传导结构域,其源自选自由CD27、CD28、4-1BB、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、GITR、HVEM及其组合组成的组的共刺激受体。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域源自4-1BB、CD28或ICOS。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域包含CD28的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域。

18.如权利要求16或权利要求17所述的方法,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域来自CD28并且所述嵌合受体还包含来自4-1BB或ICOS的第二共刺激信号传导结构域。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体包含来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。

20.如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体包含来自CD8α或CD28α的铰链结构域。

21.如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体包含来自CD8、CD28或ICOS的跨膜结构域。

22.如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体从N端至C端包含:

(i)与所述谱系特异性细胞表面抗原结合的scFv、来自CD8α的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域、来自4-1BB的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;

(ii)与所述谱系特异性细胞表面抗原结合的scFv、来自CD8α的铰链结构域、来自CD28的跨膜结构域、来自CD28的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;或

(iii)与所述谱系特异性细胞表面抗原结合的scFv、来自CD8α的铰链结构域、来自CD28的跨膜结构域、来自CD28的第一共刺激结构域、来自4-1BB的第二共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。

23.如权利要求4-22中任一项所述的方法,其中所述造血干细胞为$CD34^{+}/CD33^{-}$。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述造血干细胞来自骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)。

25.如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述受试者患有霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。

26.如权利要求25所述的方法,其中所述受试者患有白血病,所述白血病为急性骨髓性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病或慢性淋巴母细胞性白血病。

27.一种包含编码嵌合受体的核苷酸序列的核酸,其中所述嵌合受体包含结合CD33的抗原结合片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,

其中所述抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:12中的那些相同的CDR,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:13中的那些相同的CDR。

28.如权利要求27所述的核酸,其中所述嵌合受体还包含至少一个共刺激结构域。

29.如权利要求28所述的核酸,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域源自选自由CD27、CD28、4-1BB、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、GITR、HVEM及其组合组成的组的共刺激受体。

30.如权利要求29所述的核酸,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域源自4-1BB、CD28或ICOS。

31.如权利要求30所述的核酸,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域包含CD28的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域。

32.如权利要求30或权利要求31所述的核酸,其中所述至少一个共刺激信号传导结构域来自CD28并且所述嵌合受体还包含来自4-1BB或ICOS的第二共刺激信号传导结构域。

33.如权利要求27-32中任一项所述的核酸,其中所述细胞质信号传导结构域来自CD3ζ。

34.如权利要求27-33中任一项所述的核酸,其中所述铰链结构域来自CD8α或CD28α。

35.如权利要求27-34中任一项所述的核酸,其中跨膜结构域来自CD8、CD28或ICOS。

36.如权利要求27-35中任一项所述的核酸,其中所述嵌合受体从N端至C端包含:

(i)所述抗原结合片段、来自CD8α的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域、来自4-1BB的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;

(ii)所述抗原结合片段、来自CD8α的铰链结构域、来自CD28的跨膜结构域、来自CD28的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;或

(iii)所述抗原结合片段,来自CD8α的铰链结构域、来自CD28的跨膜结构域、来自CD28的第一共刺激结构域、来自4-1BB的第二共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。

37.如权利要求27-36中任一项所述的核酸,其中所述抗原结合片段包含:

具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和

具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变结构域。

38.一种载体,其包含如权利要求27-37中任一项所述的核酸。

39.一种由如权利要求27-38中任一项所述的核酸编码的嵌合受体。

40.一种表达如权利要求39所述的嵌合受体的免疫细胞。

41.如权利要求40所述的免疫细胞,其为T细胞。

42.如权利要求40或权利要求41所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞获自患有造血系统恶性肿瘤的患者。

43.一种经基因工程改造的造血细胞,其缺乏在基因工程改造之前在所述造血细胞上呈递的谱系特异性细胞表面抗原。

44.如权利要求43所述的经基因工程改造的造血细胞,其中编码所述谱系特异性细胞表面抗原的内源基因的全部或一部分缺失。

45.如权利要求44所述的经基因工程改造的造血细胞,其中使用基因组编辑使编码所述谱系特异性细胞表面抗原的内源基因的全部或一部分缺失。

46.如权利要求45所述的经基因工程改造的造血细胞,其中所述基因组编辑涉及锌指核酸酶(ZFN)、基于转录活化因子样效应因子的核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas系统。

47.如权利要求43-46中任一项所述的经基因工程改造的造血细胞,其中所述谱系特异性细胞表面抗原为CD33或CD19。

48.如权利要求46所述的经基因工程改造的造血细胞,其中所述谱系特异性细胞表面抗原为CD33并且所述CD33的免疫球蛋白恒定(IgC)结构域的一部分缺失。

49.如权利要求43-48中任一项所述的经基因工程改造的造血细胞,其中所述造血细胞是造血干细胞。

50.如权利要求49所述的经基因工程改造的造血干细胞,其为$CD34^+/CD33^-$细胞。

51.如权利要求43-50中任一项所述的经基因工程改造的造血细胞,其来自骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)。

52.一种产生缺乏谱系特异性细胞表面抗原的细胞的方法,其包括:

提供细胞,并且

向所述细胞内引入

(i)包含与编码所述谱系特异性细胞表面抗原的所述核苷酸序列的一部分杂交的CRISPR-Cas系统向导RNA(gRNA)的核苷酸序列的核酸,以及

(ii)Cas核酸内切酶。

53.如权利要求52所述的方法,其中所述Cas核酸内切酶为Cas9或Cpf1。

54.如权利要求52或53所述的方法,其中(i)和(ii)在相同的核酸上或在不同的核酸上编码。

55.如权利要求52-54中任一项所述的方法,其中(i)和(ii)作为预先形成的核糖核蛋白复合物引入所述细胞内。

56.如权利要求52-55中任一项所述的方法,其中与所述gRNA杂交的所述核苷酸序列的部分由18-22个核苷酸组成。

57.如权利要求52-56中任一项所述的方法,其中所述谱系特异性细胞表面抗原为CD33或CD19。

58.如权利要求52-57中任一项所述的方法,其中所述细胞为造血细胞。

59.如权利要求58所述的方法,其中所述造血细胞是造血干细胞。

60.如权利要求59所述的方法,其中所述造血干细胞为$CD34^+$。

61.如权利要求52-60中任一项所述的方法,其中所述gRNA包含SEQ ID NO:11和28-31中任一个的核苷酸序列。

62.一种试剂盒,其包含:

(i)如权利要求40-42中任一项所述的免疫细胞和靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂,所述药剂包含结合所述谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段;和

(ii)如权利要求43-51中任一项所阐述的缺乏所述谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞群。

用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2016年10月17日的、发明名称为“用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法”的中国专利申请201680067189.3(PCT/US2016/057339)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请依据美国法典第119条(U.S.C.§119)要求于2015年10月16日提交的美国临时申请号62/242,685的权益,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 尽管经过数十年的努力,但以通过抗体或通过T细胞(经由T细胞受体)的抗原识别能力为基本依据,对抗癌症的治愈性免疫疗法已经非常难以实现(Cousin-Frankel,Science(2013)342:1432)。基于抗体的免疫疗法已广泛用于在下述情况中对抗癌症:与正常细胞相比肿瘤细胞中靶抗原上调的情况(例如,在Her-2扩增的乳腺癌中的Her-2),或肿瘤细胞表达可以被抗体或抗体-毒素缀合物(例如,抗CD20的利妥昔单抗(Rituximab))识别的抗原的情况(Baselga等,Annals Oncology(2001)12:S35)。虽然使用基于抗体的免疫疗法的临床试验已显示在有限数量的癌症类型中(通常与标准化疗联合使用时)患者存活率提高,但这些效果常常伴随着显著的安全性和疗效问题(Cousin-Frankel Cancer,Science(2013)342:1432)。

[0005] 针对癌症的有效T细胞疗法在临床上更难实现(Schmitt等,Hum.Gene Ther.(2009)20(11):1240)。针对癌症的有效T细胞疗法依赖于针对癌细胞上的抗原具有高亲和力结合的T细胞。嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)广泛用于以高亲和力和特异性识别细胞上的抗原并且不需要辅助识别分子,例如“呈递”肽的HLA抗原。CAR T细胞的T细胞受体与抗原结合重链和轻链“交换”,从而避免了对HLA辅助分子的需要。重组CAR T受体与信号传导结构域融合,导致CAR T受体与靶抗原结合后T细胞活化。

[0006] CAR T细胞的临床应用已被限于靶向窄范围的细胞表面抗原,进一步支持了癌症治疗中对改进的新方法的需要。具体而言,对于诸如急性骨髓性白血病(AML)等疾病而言需要新的方法,其中无法接受高强度化疗(现行护理标准)的老年患者的预后仍然很差,中位存活期仅为5至10个月(Dohner等,NEJM(2015)373:1136)。

[0007] 本文描述了靶向肿瘤细胞上某些类别的谱系特异性细胞表面抗原的癌症免疫治疗的新方法。然后将CAR T细胞治疗与通过输注或再输注缺乏谱系特异性细胞表面抗原的修饰细胞群替换非肿瘤细胞相结合。通过保持对体内具有CAR T细胞的患者的监护来预防或减少肿瘤的复发。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开至少部分基于以下发现:包含结合谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段的药剂(例如免疫细胞表达靶向CD33的嵌合受体)选择性引起表达谱系特异性细胞表面抗原的细胞的细胞死亡,而缺乏所述抗原的细胞(例如,经基因工程改造的造血细胞)避开了引起细胞死亡的治疗。基于这样的发现,预计涉及靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂(例如靶向CD33的CAR-T细胞)和缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞(例如,CD33)的

组合的免疫疗法将为造血系统恶性肿瘤提供有效的治疗方法。

[0010] 本公开的一个方面提供了用于治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用:(i)有效量的靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂,其中所述药剂包含结合谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段;和(ii)缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞群。在一些实施方案中,所述药剂可以是表达嵌合受体的免疫细胞(例如T细胞),所述嵌合受体包含结合谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段。在一些实施方案中,免疫细胞、造血细胞或两者是同种异体或自体的。在一些实施方案中,造血细胞是造血干细胞(例如,$CD34^+/CD33^-$HSC)。在一些实施方案中,造血干细胞可以从骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)获得。

[0011] 在一些实施方案中,抗原结合片段结合为2型谱系特异性细胞表面抗原的谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33)。在一些实施方案中,抗原结合片段结合为1型谱系特异性细胞表面抗原的谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD19)。

[0012] 在一些实施方案中,嵌合受体中的抗原结合片段是特异性结合谱系特异性细胞表面抗原的单链抗体片段(scFv),所述抗原可以是人蛋白,例如人CD33或CD19。在一些实施方案中,scFv结合人CD33并且包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:12中的那些相同的互补决定区(CDR),所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:13中的那些相同的CDR。在一个实例中,scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0013] 嵌合受体还可包含(a)铰链结构域,(b)跨膜结构域,(c)至少一个共刺激结构域,(d)细胞质信号传导结构域,或(e)其组合。在一些实施方案中,所述嵌合受体包含至少一个共刺激信号传导结构域,其可以源自CD27、CD28、4-1BB、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、GITR、HVEM或其组合的共刺激受体。在一些实施方案中,所述至少一个共刺激信号传导结构域是包含CD28的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域的混合共刺激结构域。在一个实例中,所述至少一个共刺激信号传导结构域来自CD28并且所述嵌合受体还包含来自4-1BB或ICOS的第二共刺激信号传导结构域。

[0014] 在一些实施方案中,嵌合受体包含来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含来自CD8α或CD28α的铰链结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含来自CD8、CD28或ICOS的跨膜结构域。

[0015] 在一些实施方案中,嵌合受体从N端至C端包含(i)与谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33或CD19)结合的scFv,来自CD8α的铰链结构域,来自CD8的跨膜结构域,来自4-1BB的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;(ii)与谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33或CD19)结合的scFv,来自CD8α的铰链结构域,来自CD28的跨膜结构域,来自CD28的共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域;或(iii)与谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33或CD19)结合的scFv,来自CD8α的铰链结构域,来自CD28的跨膜结构域,来自CD28的第一共刺激结构域,来自4-1BB的第二共刺激结构域和来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。

[0016] 在本文描述的任何方法中,受试者可能患有霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。在一些实例中,所述受试者患有白血

病,所述白血病为急性骨髓性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病或慢性淋巴母细胞性白血病。

[0017] 另一方面,本公开提供了包含编码如本文所描述的任何嵌合受体的核苷酸序列的核酸。嵌合受体可以包含结合CD33的抗原结合片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,例如来自CD3ζ的细胞质信号传导结构域。抗原结合片段(例如,scFv片段)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:12中的那些相同的CDR,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:13中的那些相同的CDR。在一些实施方案中,scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0018] 本公开的其它方面提供了包含本文提供的任何核酸的载体。同样在本公开的范围内的是由本文描述的核酸编码的嵌合受体和表达此类嵌合受体的免疫细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,免疫细胞可以从患有造血系统恶性肿瘤的患者获得。

[0019] 本公开的另一方面提供了经基因工程改造的造血细胞(例如,HSC),其缺乏在基因工程改造之前在造血细胞上呈递的谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33、CD19)。在一些实施方案中,编码谱系特异性细胞表面抗原的内源基因全部或一部分缺失,例如通过基因组编辑(例如涉及锌指核酸酶(ZFN)、基于转录活化因子样效应因子的核酸酶(TALEN)或CRISPR-Cas系统)。在一些实施方案中,所述谱系特异性细胞表面抗原为CD33并且CD33的免疫球蛋白恒定(IgC)结构域的一部分缺失。在一些实施方案中,造血细胞是造血干细胞(例如,$CD34^+/CD33^-$细胞)。

[0020] 在一些实施方案中,造血干细胞可以从骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)获得。

[0021] 本文还提供了产生如本文所描述的缺乏谱系特异性细胞表面抗原的细胞的方法。所述方法包括提供细胞并向细胞内引入(i)包含与编码所述谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33、CD19)的核苷酸序列的一部分杂交的CRISPR-Cas系统向导RNA(gRNA)的核苷酸序列的核酸,以及(ii)Cas内切核酸酶(例如,Cas9或Cpf1)。包含CRISPR-Cas系统gRNA的核苷酸序列的核酸和Cas核酸酶可以例如在相同的核酸上或在不同的核酸上编码,或作为预先形成的核糖核蛋白复合物引入细胞内。在一些实施方案中,与gRNA杂交的核苷酸序列的部分由18-22个核苷酸组成。在一些实例中,该gRNA包含SEQ ID NO:11或28-31的核苷酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,细胞是造血细胞,如造血干细胞(例如,$CD34^+$)。

[0023] 同样在本公开范围内的是试剂盒,其包含(i)权利要求B13的免疫细胞,靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂,其包含结合谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段;和(ii)缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞群(例如,造血干细胞)。在一些实施方案中,靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂可以是表达嵌合受体的免疫细胞,所述嵌合受体包含结合谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段。

[0024] 进一步地,本公开提供了用于治疗造血系统恶性肿瘤的药物组合物,其包含靶向谱系特异性细胞表面抗原的任何免疫细胞和/或缺乏谱系特异性细胞表面抗原的任何造血细胞;以及免疫细胞和造血细胞用于生产用于治疗造血系统恶性肿瘤的药物的用途。

[0025] 在下面的描述中阐述了本公开一个或多个实施方案的详情。从几个实施方案的详细描述以及所附权利要求看,本公开的其它特征或优点将显而易见。

[0026] 附图简述

[0027] 以下附图形成本说明书的一部分并且被包括在内以进一步论证本公开的某些方

面,其通过参考这些附图中的一个或多个,结合本文呈现的具体实施方案的详细描述可以更好地理解。

[0028] 图1呈现了0型、1型、2型和3型谱系特异性抗原的示例性说明。

[0029] 图2是显示表达靶向0型谱系特异性细胞表面抗原CD307的嵌合受体的免疫细胞的示意图。表达CD307的多发性骨髓瘤(MM)细胞以及表达CD307的其它细胞,如浆细胞,被表达抗CD307嵌合受体的免疫细胞靶向。

[0030] 图3是显示表达靶向2型谱系特异性细胞表面抗原CD33的嵌合受体的免疫细胞的示意图。急性骨髓性白血病(AML)细胞表达CD33。人造血干细胞(HSC)经基因工程改造为缺乏CD33,因此不被表达抗CD33嵌合受体的免疫细胞识别。HSC能够产生髓细胞。

[0031] 图4是显示使用CRISPR/Cas系统进行基因组编辑的示意图。sgRNA与谱系特异性细胞表面抗原的外显子的一部分杂交,并且Cas9核酸内切酶在前间区序列邻近基序(PAM)序列(5′-NGG-3′)的上游裂解。从上到下的序列对应SEQ ID NO:45和46。

[0032] 图5是显示使用CRISPR/Cas9系统破坏CD33的基因组编辑策略的示意图。编码Cas9蛋白的PX458载体和靶向CD33的向导RNA经核转染至人白血病细胞系K-562细胞中。在Cas9和向导RNA递送至细胞之前(上图)和之后(下图),使用抗CD33抗体对细胞群进行流式细胞术。基因组编辑导致基因编码区的缺失和细胞表面CD33的显著减少。

[0033] 图6是显示使用CRISPR/Cas9系统破坏CD45RA的基因组编辑策略的示意图。编码Cas9蛋白的PX458载体和靶向CD45RA的向导RNA经核转染至TIB-67网状细胞,肉瘤小鼠巨噬细胞样细胞中。在Cas9和向导RNA递送至细胞之前(上图)和之后(下图),使用抗CD45RA抗体对细胞群进行流式细胞术。基因组编辑导致基因编码区的缺失和细胞表面CD45RA的显著减少。

[0034] 图7显示了包含靶向CD33的抗原结合片段的示例嵌合受体的示意图。A:靶向CD33的通用嵌合受体,其包含抗CD33 scFv、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和信号传导结构域。B:靶向CD33的嵌合受体,其包含抗CD33scFv、来自CD8的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域和来自CD28和CD3ζ的胞内结构域。C:靶向CD33的嵌合受体,其包含抗CD33 scFv、来自CD8的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域和来自ICOS(或CD27、4-1BB或OX-40)和CD3ζ的胞内结构域。D:靶向CD33的嵌合受体,其包含抗CD33 scFv、来自CD8的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域和来自OX40、CD28和CD3ζ的胞内结构域。

[0035] 图8是免疫毒素的示意图。

[0036] 图9显示了在用空载体或编码抗CD33嵌合受体的载体转导的K562细胞中表达的抗CD33嵌合受体的表达。A:使用识别CD3ζ的一抗的蛋白质印迹。该表提供了试验的每种嵌合受体的估计分子量。B:流式细胞术分析,显示抗CD33嵌合受体染色阳性的细胞群的增加。

[0037] 图10显示抗CD33嵌合受体与CD33结合。A:丽春红(Ponceau)染色的蛋白质凝胶。泳道1、3、5:CD33分子。泳道2、4、6:CD33分子+APC缀合物。B:使用识别CD3ζ的一抗的蛋白质印迹。泳道1、3和5含有与CD33分子共孵育的嵌合受体,而泳道2、4和6含有与CD33-APC缀合物共孵育的嵌合受体。C:流式细胞术分析,显示表达抗CD33嵌合受体并结合CD33的细胞群的增加。

[0038] 图11显示表达所示嵌合受体的NK92细胞对K562细胞的细胞毒性。A:与空HIVzsG载体相比的CART1和CART2。B:与空HIVzsG载体相比的CART3。

[0039] 图12显示表达所示嵌合受体的NK92细胞对缺乏CD33的K562细胞的细胞毒性(在y轴上表示为细胞毒性百分比)。A:用靶向CD33的CRISPR/Cas试剂预处理的未分类的K562细胞群。B:缺乏CD33的K562细胞的单克隆物。从左到右的圆柱对应于空HIVzsG载体、CART1、CART2和CART3。

[0040] 图13显示了原代T细胞群的流式细胞术分析。A:基于T细胞标志物$C4^+$、$CD8^+$或$CD4^+$ $CD8^+$两者的表达的细胞分类。B:所示原代T细胞群上CD33的相对表达。

[0041] 图14显示表达所示嵌合受体的原代T细胞对K562细胞的细胞毒性。A:$CD4^+$T细胞。B:$CD4^+/CD8^+$(CD 4/8)和$CD8^+$(CD8)。

[0042] 图15显示使用CRISPR/Cas9系统和两种不同的gRNA(Crispr3,右上图和Crispr5,右下图)在K562细胞中进行CD33编辑的流式细胞术分析。

[0043] 图16显示缺乏CD33的K562细胞呈现正常的细胞增殖和红细胞生成分化。A:对第1天的所示细胞群+50μM氯高铁血红素的流式细胞术分析。B:对第9天的所示细胞群的流式细胞术分析。C:MTT细胞增殖测定。

[0044] 图17显示使用CRISPR/Cas9系统和两种不同的gRNA(crispr3,左下图和crispr5,右下图)在人$CD34^+$细胞中进行CD33编辑的流式细胞术分析。A:使用CRISPR/Cas9系统在人类$CD34^+$细胞中进行CD33编辑的流式细胞术分析。B:crispr3。C:crispr5。

[0045] 图18显示人$CD34^+/CD33^-$细胞与人$CD34^+/CD33^+$细胞相比的集落形成。从左到右的圆柱对应于无慢病毒感染、空载体对照、crispr1、crispr3和crispr5。

[0046] 发明详述

[0047] 当靶抗原也存在于受试者发育和/或存活所需或关键性涉及的正常、非癌细胞的细胞表面上时,靶向癌细胞的细胞表面存在的抗原的癌症免疫疗法特别具有挑战性。靶向这些抗原可能在受试者中产生有害作用,这是由于免疫疗法对癌细胞以外的此类细胞的细胞毒性作用。

[0048] 本文描述的方法、核酸和细胞允许靶向不仅存在于癌细胞上,而且存在于对受试者发育和/或存活至关重要的细胞上的抗原(例如,1型或2型抗原)。该方法包括:(1)使用靶向此类抗原的药剂减少携带靶标谱系特异性细胞表面抗原的细胞数量;并且(2)用缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞替换呈递抗原并且由于所述药剂的施用而可以被杀伤的正常细胞(例如,非癌细胞)。本文描述的方法可以保持对表达目标谱系特异性细胞表面抗原的靶细胞(包括癌细胞)的监护并且还可以保持表达谱系特异性抗原,对于受试者发育和/或存活可能至关重要的非癌细胞群。

[0049] 因此,本文描述了共同使用表达包含靶向谱系特异性细胞表面抗原如CD33或CD19的抗原结合片段的嵌合受体的免疫细胞和缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞如造血干细胞(HSC)用于治疗造血系统恶性肿瘤。本文还提供了嵌合受体、编码此类嵌合受体的核酸、包含此类核酸的载体和表达此类嵌合受体的免疫细胞(例如,T细胞)。本公开还提供了缺乏谱系特异性抗原的经基因工程改造的造血细胞,如本文描述的那些,以及制备此类造血细胞的方法(例如,基因组编辑方法)。

[0050] 定义

[0051] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,并且是指脊椎动物,优选哺乳动物例如人。哺乳动物包括但不限于人类灵长类动物、非人灵长类动物或鼠、牛、马、犬或猫科动物

物种。在本公开的上下文中，术语“受试者”还涵盖可体外或离体培养或体内操作的组织和细胞。术语“受试者”可以与术语“生物体”互换使用。

[0052] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物的聚合形式。多核苷酸的实例包括但不限于基因或基因片段的编码区或非编码区、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微型RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸中的一个或多个核苷酸可以经进一步修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸也可以在聚合之后修饰，例如通过与标记剂偶联。

[0053] 术语“杂交”是指其中一个或多个多核苷酸反应形成经由核苷酸残基的碱基之间的氢键结合而稳定的复合物的反应。氢键结合可以通过沃森-克里克碱基配对(Watson Crick base pairing)、Hoogstein结合或以任何其它序列特异性方式发生。该复合物可以包含形成双链体结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单一自我杂交链或这些的任何组合。杂交反应可以构成更广泛过程中的步骤，例如PCR的引发或酶对多核苷酸的裂解。能够与给定序列杂交的序列称为给定序列的“补体”。

[0054] 术语“重组表达载体”意指当构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列，并且使载体在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下与细胞接触时，容许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽的经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体。本公开的载体不是作为整体天然存在的。部分载体可以是天然存在的。本公开的非天然存在的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸，包括但不限于DNA和RNA，其可为单链或双链、合成的或部分获自天然来源，并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。

[0055] 如本文中所用，“转染”、“转化”或“转导”是指通过使用物理或化学方法将一种或多种外源多核苷酸引入宿主细胞中。

[0056] “抗体”、“抗体的片段”、“抗体片段”、“抗体的功能片段”或“抗原结合部分”可互换用于指抗体的一个或多个片段或部分，其保留了特异性结合特定抗原的能力(Holliger等，Nat.Biotech.(2005)23(9):1126)。本发明的抗体可以是抗体和/或其片段。抗体片段包括Fab、F(ab′)2、scFv、二硫键连接的Fv、Fc或变体和/或混合物。抗体可以是嵌合的、人源化的、单链的或双特异性的。本公开涵盖所有抗体同种型，包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。合适的IgG亚型包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。抗体轻链或重链可变区由被三个称为互补决定区(CDR)的高变区中断的骨架区组成。本发明抗体或抗原结合部分的CDR可以来自非人或人类来源。本发明抗体或抗原结合部分的骨架可以是人、人源化、非人(例如经修饰以降低在人类中的抗原性的鼠类骨架)或合成骨架(例如，共有序列)。

[0057] 本发明的抗体或抗原结合部分可以以解离常数(K_D)小于约10^{-7}M、小于约10^{-8}M、小于约10^{-9}M、小于约10^{-10}M、小于约10^{-11}M或小于约10^{-12}M特异性结合。根据本公开的抗体的亲和力可以使用常规技术容易地测定(参见，例如，Scatchard等，Ann.N.Y.Acad.Sci.(1949)51:660；和美国专利第5,283,173、5,468,614号或等同案)。

[0058] 术语“嵌合受体”、“嵌合抗原受体”或可选地“CAR”可通篇互换使用并且是指包含至少一个细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(本文也称为“细胞内信号传导结构域”)的重组多肽构建体，所述信号传导结构域包含源自如下定义的刺激分

子的功能性信号传导结构域。Lee等,Clin.Cancer Re s.(2012)18(10):2780;Jensen等,Immunol Rev.(2014)257(1):127;www.cancer.g ov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells。在一个实施方案中,刺激分子是与T细胞受体复合物缔合的ζ链。一方面,细胞质信号传导结构域还包含一个或多个源自如下定义的至少一种共刺激分子的功能性信号传导结构域。共刺激分子也可以是4-1BB(即,CD137)、CD27和/或CD28或那些分子的片段。另一方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和包含源自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和包含源自共刺激分子的功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。可选地,CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和包含源自一个或多个共刺激分子的两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。CAR还可包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和包含源自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。由核酸序列编码的CAR的抗原识别部分可以含有任何谱系特异性、抗原结合抗体片段。所述抗体片段可以包含一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)或前述任何区域的组合。

[0059] 术语“信号传导结构域”是指蛋白质的功能部分,其通过在细胞内传递信息起作用,以通过产生第二信使或通过响应此类信使而起到效应子的作用,经由限定的信号传导途径来调节细胞活性。

[0060] 术语“ζ”或可选地“ζ链”、“CD3-ζ”或“TCR-ζ”定义为以GenBank登录号NP_932170、NP_000725或XP_011508447提供的蛋白质;或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴、猿等的等效残基和“ζ刺激结构域”或可选地“CD3-ζ刺激结构域”或“TCR-ζ刺激结构域”定义为来自ζ链的细胞质结构域,足以功能性地传递T细胞活化所必需的初始信号的氨基酸残基。

[0061] 术语“经基因工程改造的”或“经遗传修饰的”是指通过基因工程,例如通过基因组编辑操作的细胞。即,细胞含有在所述细胞中并非天然存在的异源序列。通常,异源序列经由载体系统或用于将核酸分子引入包括脂质体的细胞的其它手段引入。异源核酸分子可以整合到细胞基因组中或可以存在于染色体外,例如呈质粒的形式。该术语还包括将经基因工程改造的、分离的CAR多肽引入细胞内的实施方案。

[0062] 术语“自体”是指源自相同个体的任何物质,随后将其重新引入相同个体中。

[0063] 术语“同种异体”是指源自与引入物质的个体相同的物种的不同动物的任何物质。当一个或多个基因座处的基因不相同时,称两个或更多个个体是彼此同种异体的。

[0064] 术语“细胞谱系”是指具有共同祖先并从相同类型的可鉴定细胞发育成特定的可鉴定/功能细胞的细胞。本文使用的细胞谱系包括但不限于呼吸、前列腺、胰腺、乳腺、肾、肠、神经、骨骼、血管、肝、造血、肌肉或心肌细胞谱系。

[0065] 当提到谱系特异性抗原的基因表达或功能时使用的术语“抑制”是指谱系特异性抗原的基因表达或功能水平的降低,其中抑制是干扰基因表达或功能的结果。抑制可以是完全的,在这种情况下,没有可检测到的表达或功能,或者可以是部分的。部分抑制的范围可以从几乎完全抑制到几乎不存在抑制。通过消除特定靶细胞,CAR T细胞可以有效地抑制

特定细胞谱系的总体表达。

[0066] “缺乏谱系特异性抗原的”细胞如造血细胞是指与其天然存在的对应物相比，谱系特异性抗原的表达水平显著降低的细胞，例如，相同类型的内源性造血细胞或不表达谱系特异性抗原，即不能通过常规测定如FACS检测的细胞。在一些情况下，“缺乏抗原”的细胞的谱系特异性抗原的表达水平可以低于天然存在的对应物的相同谱系特异性抗原的表达水平的约40％(例如30％、20％、15％、10％、5％或更低)。如本文中所用，术语“约”是指特定值+/-5％。例如，约40％的表达水平可以包括介于35％-45％之间的任何表达量。

[0067] 靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂

[0068] 本公开的方面提供了靶向例如靶癌细胞上的谱系特异性细胞表面抗原的药剂。此类药剂可以包含结合并靶向谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段可以是特异性结合谱系特异性抗原的单链抗体(scFv)。

[0069] A.谱系特异性细胞表面抗原

[0070] 如本文中所用，术语“谱系特异性细胞表面抗原”和“细胞表面谱系特异性抗原”可以互换使用并且是指充分存在于细胞表面并与一个或多个细胞谱系群相关的任何抗原。例如，抗原可以存在于一个或多个细胞谱系群上而在其它细胞群的细胞表面上不存在(或水平降低)。

[0071] 通常，谱系特异性细胞表面抗原可以基于许多因素分类，例如抗原和/或呈递抗原的细胞群是否是宿主生物体存活和/或发育所需的。下面表1中提供了示例类型的谱系特异性抗原的汇总。还参见图1。

[0072] 表1.谱系特异性抗原的分类

[0073]

谱系特异性抗原的类型	谱系特异性抗原的特征
0 型	a) 抗原是生物体存活所需的 并且 b) 携带 0 型抗原的细胞类型是生物体存活所需的，并不是肿瘤或肿瘤相关病毒所特有的
1 型	a) 抗原不是生物体存活所需的 并且 b) 携带 1 型抗原的细胞类型不是生物体存活所需的
2 型	a) 抗原不是生物体存活所需的 并且 b) 携带 2 型抗原的细胞类型是生物体存活所需的
3 型	a) 抗原不是生物体存活所需的 并且 b) 携带抗原的细胞类型不是生物体存活所需的 c) 抗原是肿瘤或肿瘤相关病毒所特有的 实例是 EBV 感染的细胞，包括 EBV 感染的肿瘤细胞(鼻咽癌和伯基特淋巴瘤(Burkitts Lymphoma))中的 LMP-2 抗原

[0074] 如表1和图1所示,0型谱系特异性细胞表面抗原对于组织稳态和存活是必需的,携带0型谱系特异性细胞表面抗原的细胞类型也可能是受试者存活所必需的。因此,鉴于0型谱系特异性细胞表面抗原或携带0型谱系特异性细胞表面抗原的细胞在稳态和存活中的重要性,使用常规CAR T细胞免疫疗法靶向这些类别的抗原可能是具有挑战性的,因为抑制或去除此类抗原和携带此类抗原的细胞可能对受试者的存活有害。因此,存活可能需要谱系特异性细胞表面抗原(例如0型谱系特异性抗原)和/或携带此类抗原的细胞类型,例如因为它在受试者中执行重要的非冗余性功能,那么这种类型的谱系特异性抗原可能是基于CAR T细胞的免疫疗法的不良靶标。

[0075] 与0型抗原相反,1型细胞表面谱系特异性抗原和携带1型细胞表面谱系特异性抗原的细胞不是组织稳态或受试者存活所需的。靶向1型细胞表面谱系特异性抗原不大可能在受试者中产生有害后果。例如,工程改造成靶向CD307(一种在正常浆细胞和多发性骨髓瘤(MM)细胞上唯一表达的1型抗原)的CAR T细胞将导致两种细胞类型的消除(图2)(Elkins等,Mol Cancer Ther.10:2222(2012))。然而,因为浆细胞谱系对于生物体的存活是可消耗的,所以CD307和其它1型谱系特异性抗原是适合基于CAR T细胞的免疫疗法的抗原。1型类

别的谱系特异性抗原可以在各种不同的组织中表达，包括卵巢、睾丸、前列腺、乳房、子宫内膜和胰腺。在一些实施方案中，所述药剂靶向为1型抗原的细胞表面谱系特异性抗原。

[0076] 与1型抗原相比，靶向2型抗原呈现出明显困难。2型抗原的特征在于：(1)该抗原对于生物体的存活不是必要的(即不是存活所需的)，及(2)携带该抗原的细胞谱系对于生物体的存活是必不可少的(即特定细胞谱系是存活所需的)。例如，CD33是在正常骨髓细胞以及急性骨髓性白血病(AML)细胞两者中表达的2型抗原(Dohner等，NEJM 373:1136(2015))。因此，工程改造成靶向CD33抗原的CAR T细胞可导致杀伤正常以及AML细胞，这可能与受试者的存活不相容(图3)。在一些实施方案中，所述药剂靶向为2型抗原的细胞表面谱系特异性抗原。

[0077] 可通过本公开的方法和组合物靶向多种抗原。针对这些抗原的单克隆抗体可以商业购买或使用标准技术产生，包括为动物免疫接种目标抗原，接着通过常规的单克隆抗体方法，例如以上所讨论的Kohler和Milstein的标准体细胞杂交技术，Nature(1975)256:495。抗体或编码抗体的核酸可以使用任何标准的DNA或蛋白质测序技术进行测序。

[0078] 在一些实施方案中，使用本文描述的方法和细胞靶向的细胞表面谱系特异性抗原是白细胞或白细胞亚群的细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是与骨髓细胞相关的抗原。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是分化抗原(CD)簇。CD抗原的实例包括但不限于CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD32c、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64a、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66F、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85A、CD85C、CD85D、CD85E、CD85F、CD85G、CD85H、CD85I、CD85J、CD85K、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD99R、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD150、CD152、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158b1、CD158b2、CD158d、CD158e1/e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、

CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD286、CD288、CD289、CD290、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300e、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、306、CD307a、CD307b、CD307c、D307d、CD307e、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD344、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362和CD363。参见www.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf。

[0079] 在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原为CD19、CD20、CD11、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD52、CD10、CD3/TCR、CD79/BCR和CD26。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原为CD33或CD19。

[0080] 可选地或另外，细胞表面谱系特异性抗原可以是癌症抗原，例如差异性地存在于癌细胞上的细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，癌症抗原是对组织或细胞谱系有特异性的抗原。与特定类型的癌症相关的细胞表面谱系特异性抗原的实例包括但不限于CD20、CD22(非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL))、CD52(B细胞CLL)、CD33(急性骨髓性白血病(AML))、CD10(gp100)(常见(前-B)急性淋巴细胞性白血病和恶性黑素瘤)、CD3/T细胞受体(TCR)(T细胞淋巴瘤和白血病)、CD79/B细胞受体(BCR)(B细胞淋巴瘤和白血病)、CD26(上皮和淋巴恶性肿瘤)、人白细胞抗原(HLA)-DR、HLA-DP和HLA-DQ(淋巴恶性肿瘤)、RCAS1(妇科癌、胆管腺癌和胰腺导管腺癌)以及前列腺特异性膜抗原。在一些实施方案中，细胞表面抗原CD33与AML细胞相关。

[0081] B.抗原结合片段

[0082] 如本文所述，任何抗体或其抗原结合片段均可用于构建靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂。此类抗体或抗原结合片段可以通过常规方法制备，例如杂交瘤技术或重组技术。

[0083] 例如，可以通过常规杂交瘤技术制备对目标谱系特异性抗原有特异性的抗体。可与载体蛋白如KLH偶联的谱系特异性抗原可用于为宿主动物免疫接种以产生与该复合物结合的抗体。宿主动物免疫接种的途径和方案通常与本文进一步描述的用于抗体刺激和生产的确定常规技术一致。用于产生小鼠、人源化和人抗体的一般技术是本领域已知的并且在本文中有描述。考虑到包括人在内的任何哺乳动物受试者或来自其中的抗体生成细胞均可操作以用作产生哺乳动物(包括人)杂交瘤细胞系的基础。通常，给宿主动物腹膜内、肌肉内、口服、皮下、足底和/或皮内接种一定量的免疫原，包括本文描述的免疫原。

[0084] 杂交瘤可使用Kohler,B.和Milstein,C.(1975)Nature 256:495-497描述的或Buck,D.W.等,In Vitro,18:377-381(1982)修改的一般体细胞杂交技术从淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备。可用的骨髓瘤细胞系，包括但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,Calif.,USA的那些，均可用于杂交。通常，所述技术涉及使用融合剂如聚乙二醇或通过本领域技术人员公知的电气装置使骨髓瘤

细胞和淋巴样细胞融合。融合后,将细胞从融合培养基中分离并使其在选择性生长培养基,例如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)培养基中生长以消除未杂交的母细胞。本文所描述的补充有或未补充血清的任何培养基均可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种替代方法,可以使用EBV永生化B细胞来产生本文所描述的TCR样单克隆抗体。扩增杂交瘤并亚克隆(如果需要),并通过常规免疫测定程序(例如,放射性免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测定)测定上清液的抗免疫原活性。

[0085] 可用作抗体源的杂交瘤涵盖产生能够与谱系特异性抗原结合的单克隆抗体的亲本杂交瘤的所有衍生物、后代细胞。产生此类抗体的杂交瘤可使用已知程序在体外或体内生长。单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化程序,诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱以及如果需要超滤从培养基或体液分离。不需要的活性(若存在),可以例如通过在吸附剂上进行制备(该吸附剂由附着于固相的免疫原制成)并且使所需抗体从免疫原上洗脱或释放来去除。为宿主动物免疫接种靶抗原或含有靶氨基酸序列的片段可以产生抗体群(例如,单克隆抗体),使用双功能或衍化剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺酸琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl或R1N=C=NR(其中R和R1是不同的烷基),使所述靶氨基酸序列与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质,例如钥孔血蓝素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合。

[0086] 若需要,可以为目标抗体(例如,由杂交瘤产生)测序并且可以将多核苷酸序列克隆到用于表达或繁殖的载体中。编码目标抗体的序列可维持在宿主细胞的载体中,然后可扩增宿主细胞并冷冻以便将来使用。在替代方案中,多核苷酸序列可用于基因操作以“人源化”抗体或改善抗体的亲和力(亲和力成熟)或其它特征。例如,可将恒定区工程改造为更类似于人恒定区,以在抗体用于临床试验和人类治疗时避免免疫反应。可能期望对抗体序列进行基因操作以获得对谱系特异性抗原的更大亲和力。本领域技术人员将显而易见的是,可对抗体产生一个或多个多核苷酸变化并仍然保持其对靶抗原的结合特异性。

[0087] 在其它实施方案中,通过使用已经工程改造为表达特异性人免疫球蛋白的商购小鼠,可以获得全人抗体。设计成产生更需要(例如,全人抗体)或更强的免疫反应的转基因动物也可用于生成人源化或人抗体。此类技术的实例是来自Amgen,Inc.的XenomouseRTM(Fremont,Calif.)和来自Medarex,Inc.的HuMAb-MouseRTM和TC MouseTM(Princeton,N.J.)。在另一种替代方案中,可以通过噬菌体展示或酵母技术重组制备抗体。参见,例如美国专利第5,565,332、5,580,717、5,733,743和6,265,150号;及Winter等(1994)Annu.Rev.Immunol.12:433-455。可选地,噬菌体展示技术(McCafferty等(1990)Nature348:552-553)可用于由来自未免疫供者的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库在体外产生人抗体和抗体片段。

[0088] 可以通过常规方法制备完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段。例如,可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab′)2片段,并且可以通过还原F(ab′)2片段的二硫桥产生Fab片段。

[0089] 经基因工程改造的抗体,例如人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体可以通过例如常规重组技术产生。在一个实例中,使用常规程序(例如,通过使用能够与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)可以容易地分离编码对靶抗原有特异性的单克隆抗体的DNA并测序。杂交瘤细胞作为此类DNA的优选来源。一经分离,

DNA就可置于一个或多个表达载体中，然后将表达载体转染至不会另外产生免疫球蛋白的宿主细胞例如大肠杆菌(E.coli)细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中，以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。参见，例如PCT公布第WO 87/04462号。然后可对DNA进行修饰，例如通过取代人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源鼠类序列，Morrison等，(1984)Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851，或通过使非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接。以这种方式，经基因工程改造的抗体，例如“嵌合”或“杂交”抗体，可以制备成具有靶抗原的结合特异性。

[0090] 为生产“嵌合抗体”而开发的技术在本领域中是公知的。参见，例如Morrison等(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851;Neuberger等(1984)Nature 312,604;和Takeda等(1984)Nature 314:452。

[0091] 构建人源化抗体的方法也是本领域公知的。参见，例如Queen等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10033(1989)。在一个实例中，按照本领域已知的方法对亲本非人抗体的VH和VL的可变区进行三维分子建模分析。接下来，使用相同的分子建模分析鉴定预计对于形成正确的CDR结构重要的骨架氨基酸残基。同时，使用亲本VH和VL序列作为搜索查询，从任何抗体基因数据库鉴定具有与亲本非人抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列的人VH和VL链。然后选择人VH和VL受体基因。

[0092] 所选人受体基因内的CDR区可以用来自亲本非人抗体或其功能变体的CDR区置换。必要时，预计在与CDR区相互作用中重要的母链骨架区内的残基(参见上面的描述)可用于取代人受体基因中的相应残基。

[0093] 单链抗体可以经由重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备。优选地，柔性接头并入两个可变区之间。可选地，描述用于生产单链抗体的技术(美国专利第4,946,778和4,704,692号)可以适于产生噬菌体或酵母scFv文库，并且可以按照常规方法从文库中鉴定对谱系特异性抗原有特异性的scFv克隆。可以进一步筛选阳性克隆以鉴定结合谱系特异性抗原的那些克隆。

[0094] 在一些情况下，目标谱系特异性抗原为CD33并且抗原结合片段特异性结合CD33，例如人CD33。下面提供了抗人CD33抗体的示例性重链可变区和轻链可变区的氨基酸和核酸序列。CDR序列以粗体显示并在氨基酸序列中加下划线。

[0095] 抗CD33重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)

[0096] QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQ**
KFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSS

[0097] 抗CD33重链可变区的核酸序列(SEQ ID NO:2)

[0098] CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGATGAG
CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCCG
GCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAG
AAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCACCACCGCCTACATGCAGCT
GAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGT
ACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

[0099] 抗CD33轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)

[0100] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKR

[0101] 抗CD33重链可变区的核酸序列(SEQ ID NO:1)

[0102]
```
GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCGAGAGGGTGACCAT
GAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGT
ACCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGC
GGCGTGCCCGACAGGTTCACCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG
CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCAGGACCTTCG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
```

[0103] 如本文所述用于构建靶向CD33的药剂的抗CD33抗体结合片段可以包含与SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13中的那些相同的重链和/或轻链CDR区。此类抗体可以在一个或多个骨架区中包含氨基酸残基变型。在一些情况下,抗CD33抗体片段可以包含与SEQ ID NO:12共享至少70%序列同一性(例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高)的重链可变区和/或可以包含与SEQ ID NO:13共享至少70%序列同一性(例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高)的轻链可变区。

[0104] 两个氨基酸序列的“百分比同一性”使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990,如同在Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-77,1993中修改的算法来测定。此类算法并入Altschul等J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)中。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序进行,得分=50,字长=3以获得与本公开的蛋白质分子同源的氨基酸序列。当两个序列之间存在空位时,可以利用空位BLAST,如Altschul等,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997所述。利用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0105] C.表达嵌合受体的免疫细胞

[0106] 在一些实施方案中,如本文所述靶向谱系特异性细胞表面抗原的药剂是表达嵌合受体的免疫细胞,嵌合受体包含能够结合谱系特异性抗原(例如,CD33或CD19)的抗原结合片段(例如,单链抗体)。嵌合受体的抗原结合片段识别在其细胞表面具有谱系特异性抗原的靶细胞(例如,癌细胞),将活化信号转导至嵌合受体的一个或多个信号传导结构域(例如,共刺激信号传导结构域和/或细胞质信号传导结构域),这样可以激活表达嵌合受体的免疫细胞中的效应子功能。

[0107] 如本文中所用,嵌合受体是指可以在宿主细胞表面表达的非天然存在的分子,并且包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段。通常,嵌合受体包含至少两个源自不同分子的结构域。除了本文描述的抗原结合片段之外,嵌合受体还可包含铰链结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激结构域和细胞质信号传导结构域中的一个或多个。在一些实施方案中,嵌合受体从N端至C端包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段、铰链结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体还包含至少一个共刺激结构域。

[0108] 在一些实施方案中,本文描述的嵌合受体包含铰链结构域,其可位于抗原结合片段和跨膜结构域之间。铰链结构域是通常在蛋白质的两个结构域之间发现的氨基酸区段,并且可以允许蛋白质的灵活性和一个或两个结构域相对于彼此的运动。可以使用提供此类灵活性和抗原结合片段相对于嵌合受体的另一个结构域的运动的任何氨基酸序列。

[0109] 铰链结构域可含约10-200个氨基酸,例如15-150个氨基酸、20-100个氨基酸或30-

60个氨基酸。在一些实施方案中，铰链结构域长度可为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个氨基酸。

[0110] 在一些实施方案中，铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域已知包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域对于在本文描述的嵌合受体中的使用相容。在一些实施方案中，铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分并赋予嵌合受体灵活性。在一些实施方案中，铰链结构域是CD8α或CD28α的。在一些实施方案中，铰链结构域是CD8α铰链结构域的一部分，例如含CD8α或CD28α铰链结构域的至少15个(例如，20、25、30、35或40个)连续氨基酸的片段。

[0111] 抗体，例如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体的铰链结构域对于在本文描述的嵌合受体中的使用也相容。在一些实施方案中，铰链结构域是连接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中，铰链结构域是抗体的并且包含抗体的铰链结构域和抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，抗体为IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中，抗体为IgG抗体。在一些实施方案中，抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区及CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区及CH3恒定区。

[0112] 同样在本公开范围内的是包含为非天然存在的肽的铰链结构域的嵌合受体。在一些实施方案中，Fc受体的细胞外配体结合结构域C端与跨膜结构域N端之间的铰链结构域是肽接头，例如(GlyxSer)n接头，其中x和n可以独立地为3-12之间的整数，包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。

[0113] 可用于本文描述的嵌合受体的铰链结构域中的其它肽接头是本领域已知的。参见，例如Wriggers等Current Trends in Peptide Science(2005)80(6):736-746和PCT公布WO 2012/088461。

[0114] 在一些实施方案中，本文描述的嵌合受体可以包含跨膜结构域。用于嵌合受体中的跨膜结构域可以是本领域已知的任何形式。如本文中所用，“跨膜结构域”是指在细胞膜，优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。对于在本文所用嵌合受体中的使用相容的跨膜结构域可从天然存在的蛋白质获得。可选地，跨膜结构域可以是合成的非天然存在的蛋白质区段，例如一种在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

[0115] 跨膜结构域基于跨膜结构域拓扑结构进行分类，包括跨膜结构域穿过膜的通过次数和蛋白质的取向。例如，单次通过的膜蛋白穿过细胞膜一次，而多次通过的膜蛋白穿过细胞膜至少两次(例如，2、3、4、5、6、7次或更多次)。在一些实施方案中，跨膜结构域是单次通过的跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域是单次通过的跨膜结构域，其将嵌合受体的N端定向至细胞的胞外侧并将嵌合受体的C端定向至细胞的胞内侧。在一些实施方案中，跨膜结构域从单次通过的跨膜蛋白获得。在一些实施方案中，跨膜结构域是CD8α的。在一些实施方案中，跨膜结构域是CD28的。在一些实施方案中，跨膜结构域是ICOS的。

[0116] 在一些实施方案中，本文描述的嵌合受体包含一个或多个共刺激信号传导结构域。如本文中所用，术语“共刺激信号传导结构域”是指介导细胞内信号转导以诱导免疫反

应如效应子功能的蛋白质的至少一部分。本文描述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白质的细胞质信号传导结构域，其转导信号并调节由免疫细胞如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞介导的反应。

[0117] 在一些实施方案中，嵌合受体包含一个以上(至少2、3、4个或更多个)共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中，嵌合受体包含一个以上从不同共刺激蛋白质获得的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中，嵌合受体不含共刺激信号传导结构域。

[0118] 通常，除刺激抗原特异性信号外，许多免疫细胞还需要共刺激，以促进细胞增殖、分化和存活，并激活细胞的效应子功能。宿主细胞中共刺激信号传导结构域的激活(例如，免疫细胞)可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、噬菌特性、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激蛋白的共刺激信号传导结构域对于在本文描述的嵌合受体中的使用相容。基于诸如嵌合受体将会在其中表达的免疫细胞的类型(例如，原代T细胞、T细胞系、NK细胞系)和所需免疫效应子功能(例如，细胞毒性)等因素来选择共刺激信号传导结构域的类型。用于嵌合受体的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白质的细胞质信号传导结构域，包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、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。在一些实施方案中，共刺激结构域源自4-1BB、CD28或ICOS。在一些实施方案中，共刺激结构域源自CD28并且嵌合受体包含来自4-1BB或ICOS的第二共刺激结构域。

[0119] 在一些实施方案中，共刺激结构域是包含一个以上共刺激结构域或一个以上共刺激结构域的部分的融合结构域。在一些实施方案中，共刺激结构域是来自CD28和ICOS的共刺激结构域的融合物。

[0120] 在一些实施方案中，本文描述的嵌合受体包含细胞质信号传导结构域。任何细胞质信号传导结构域均可用于本文描述的嵌合受体中。通常，细胞质信号传导结构域传递信号，例如细胞外配体结合结构域与其配体的相互作用，以刺激细胞反应，例如诱导细胞的效应子功能(例如，细胞毒性)。

[0121] 如将对本领域普通技术人员明显的，涉及T细胞活化的因子是细胞质信号传导结构域的基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的磷酸化。本领域已知的任何含ITAM的结构域均可用于构建本文描述的嵌合受体。通常，ITAM基序可以包含由6-8个氨基酸间隔的氨基酸序列YxxL/I的两个重复，其中每个x独立地为任何氨基酸，产生保守基序YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。在一些实施方案中，细胞质信号传导域来自CD3ζ。

[0122] 下面表2和3中提供了示例性嵌合受体。

[0123] 表2:嵌合受体的示例性组分

[0124]

嵌合受体组分	氨基酸序列
抗原结合片段	轻链-GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 14)-重链
CD28 共刺激结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 6)
ICOS 共刺激结构域(粗体)、ICOS 跨膜结构域(斜体)和 ICOS 细胞外结构域的一部分(下划线)	LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYES QLCCQLK*FWLPIGCAAFVVVCIL GCILI***CWLTKKKYSSSVHDPN GEYMFMRAVNTAKKSRLTDV TL** (SEQ ID NO: 7)
ICOS 共刺激结构域	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMF MRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 47)

[0125]

包括来自 CD28 的铰链结构域(斜体)和跨膜结构域(粗体)的 CD28/ICOS 嵌合体(下划线所示的 ICOS 部分)	*IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPLFPGPS***KPFWVLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWV**RS KRSRLLHSDYMFMRAVNTAKK SRLTDVTL (SEQ ID NO: 8)
CD3ζ 细胞质信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPQRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR (SEQ ID NO: 15)

[0126] 下面提供了用于构建嵌合受体的示例性组分的核酸序列。CD28细胞内信号传导结构域-DNA-人(SEQ ID NO:3)

[0127]

```
ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCA
TGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGG
TGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCC
CCGCCGCCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG
CCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAG
ACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT
ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
```

[0128] ICOS细胞内信号传导结构域-DNA-人(SEQ ID NO:4)

[0129]
CTATCAATTTTTGATCCTCCTCCTTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATATTTA
TGAATCACAACTTTGTTGCCAGCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTG
TAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGT
GTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAG
ACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC

[0130]
AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGA
AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA
AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0131] CD28/ICOS供刺激信号传导区-DNA-人(SEQ ID NO:5)

[0132]
ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCA
TGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGG
TGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGTTCATGAGAGC
AGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGA
GCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAA
GCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC
CCCTCGC

[0133] 在一些实施方案中,所述核酸序列编码结合CD33并且包含重链可变区和轻链可变区的抗原结合片段,所述重链可变区具有与SEQ ID NO:12中的CDR相同的CDR,所述轻链可变区具有与SEQ ID NO:13中的CDR相同的CDR。在一些实施方案中,所述抗原结合片段包含如SEQ ID NO:12所提供的重链可变区和如SEQ ID NO:13所提供的轻链可变区。在一些实施方案中,嵌合受体还包含至少一个跨膜结构域和一个细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体还包含铰链结构域和共刺激信号传导结构域。

[0134] 表3提供了本文描述的示例性嵌合受体。示例性构建体从N端至C端具有抗原结合片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实例中,嵌合受体还包含位于抗原结合片段和跨膜结构域之间的铰链结构域。在一些实例中,嵌合受体还包含一个或多个共刺激结构域,其可以位于跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间。

[0135] 表3:示例性嵌合受体

[0136]

构建体	载体	抗原结合片段特异性	铰链结构域	跨膜结构域	信号传导结构域1	信号传导结构域2	信号传导结构域3
CART1 (SEQ ID NO: 20)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD8α	CD8	4-1BB	CD3ζ	无
CART2 (SEQ ID NO: 21)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	无
CART3 (SEQ ID NO: 22)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	4-1BB	CD3ζ
CART8 (SEQ ID NO: 23)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD8α	ICOS	ICOS	4-1BB	CD3ζ
CART4dual (SEQ ID NO: 24)	HIV*z* *s*-dT	CD19	CD8α	CD28	CD3ζ	-	-
CART5dual (SEQ ID NO: 25)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	-	-
CART6 (SEQ ID NO: 26)	HIV*z* *s*-dT	CD19	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	-
CART7 (SEQ ID NO: 27)	HIV$_Z$ *s*-Gfp	CD33	CD28hge	CD28	CD28	CD3ζ	-

[0137] 下面提供了以上表3中列出的示例嵌合受体的氨基酸序列:CART1氨基酸序列(SEQ ID NO:20)

[0138]

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDIY
IWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0139] CART2氨基酸序列(SEQ ID NO:21)

[0140]
MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPF
WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0141] CART3氨基酸序列(SEQ ID NO:22)

[0142]
MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0143] CART8氨基酸序列(SEQ ID NO:23)

[0144]
MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFW
LPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTLTKRGRKKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR

[0145] CART4dual氨基酸序列(SEQ ID NO:24)

[0146]
MWLQSLLLLGTVACSISIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIGSTSGSGKPG
SGEGSTKGLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSALSNSIMY
FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGV
LACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0147] CART5dual氨基酸序列(SEQ ID NO:25)

[0148]
MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCRQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKP
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RS

[0149] CART6氨基酸序列(SEQ ID NO:26)

MWLQSLLLLGTVACSISIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIGSTSGSGKPG
SGEGSTKGLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSALSNSIMY

[0150]

FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGV
LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0151] CART7氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

[0152]
MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGS
TSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGV
IYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTV
SSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF
WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0153] 下面提供了以上表3中列出的示例嵌合受体的核酸序列:CART1核酸序列(SEQ ID NO:38)

[0154]
GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGA
GCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCT
GGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG
CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGG
CTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGT
GAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGAC
CCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCA
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTC
CAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGA
TGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCC
AGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGG
AGCCGTGCACACCAGAGGCCTGGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCT
GCTGCTGTCTCTCGTGATCACCAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTT
CATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAAGAAGA
AGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCA
GAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAG
AGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGA
ACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGG
CAAGGGCCACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCA
CATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0155] CART2核酸序列(SEQ ID NO:39)

GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGA
GCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCT
GGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG

CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGG
CTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGT
GAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGAC
CCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCA
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTC
[0156] CAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGA
TGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCA
CTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGC
CCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGC
CGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTG
TTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCT
GCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTA
CGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCC
TGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGA
CGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCA
GGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAA
GGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGA
CACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCT
AG

[0157] CART3核酸序列(SEQ ID NO:40)

[0158]
GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGA
GCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCT
GGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG
CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGG
CTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGT
GAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGAC
CCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCA
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTC
CAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGA
TGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCC
AGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGG
AGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGC
CTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACT
GCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCC
TTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACAGATCCAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACAT
CTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGCCGGTT
CCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGC
CTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGT
GCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGA
AGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAGGG
CGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACAC
CTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0159] CART4dual核酸序列(SEQ ID NO:41)

[0160]
GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAG
AGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACC

[0161]
CGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGC
TACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
CGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATC
TGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCT
GCCTGACTATGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGAT
CTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAA
CTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTG
CGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGAC
CGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAA
GCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTC
TCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCC
CTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTT
CATCATCTTTTGGGTGCGCGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGATGCCCCTGCCTATCAGCAGGGACA
GAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAG
AGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGA
ACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGG
CAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCA
CATGCAGGCTCTGCCCCCCTCGCTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0162] CART5dual核酸序列(SEQ ID NO:42)

[0163]

GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGA
GCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCT
GGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG
CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGG
CTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGT
GAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGAC
CCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCA
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTC
CAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGA
TGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCC
AGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGG
AGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGC
CTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACT
GCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCC
TTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACAGAAGCTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0164] CART6核酸序列(SEQ ID NO:43)

GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAG
AGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACC
CGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGC
TACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
CGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATC
TGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCT
GCCTGACTATGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGAT
CTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAA
CTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTG

[0165]

CGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGAC
CGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAA
GCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTC
TCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCC
CTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTT
CATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCC
CAGACGGCCAGGCCCCACCCGGAAACACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTA
CCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCT
GTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGA
CCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAA
AGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGCCA
CGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGC
TCTGCCCCCTCGCTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0167]

GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGT
GGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGA
GCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCT
GGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAG
CGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCA
GGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGG
CTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGT
GAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGAC
CCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCA
GAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTC
CAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGA
TGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCATCGAAGTGATGTACCCCCCTCCCTACCT
GGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCTCT
GTTTCCTGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAG
CCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAG
CGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCC
TCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTA
TCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCT
GGACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGG
CCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGCGA
GCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTA
TGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0168] 本文描述的任何嵌合受体均可通过常规方法如重组技术来制备。本文用于制备嵌合受体的方法涉及产生编码包含嵌合受体的每个结构域的多肽的核酸，所述嵌合受体包括抗原结合片段和任选地，铰链结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中，编码嵌合受体的每个组分的核酸使用重组技术连接在一起。

[0169] 嵌合受体的每个组分的序列可以通过常规技术获得，例如来自本领域已知的多种来源中的任何一种的PCR扩增。在一些实施方案中，嵌合受体的一个或多个组分的序列从人类细胞获得。可选地，可以合成嵌合受体的一个或多个组分的序列。可以使用诸如PCR扩增或连接的方法，将每个组分的序列(例如，结构域)直接或间接连接(例如，使用编码肽接头的核酸序列)以形成编码嵌合受体的核酸序列。可选地，可以合成编码嵌合受体的核酸。在一些实施方案中，核酸为DNA。在其它实施方案中，核酸为RNA。

[0170] 嵌合受体的一个或多个组分(例如，抗原结合片段等)内的一个或多个残基的突变，在每个组分的序列连接之前或之后。在一些实施方案中，可以在嵌合受体组分中产生一个或多个突变以调节(增加或减少)组分对靶标(例如，靶抗原的抗原结合片段)的亲和力和/或调节组分的活性。

[0171] 可以通过常规技术将本文描述的任何嵌合受体引入合适的免疫细胞中用于表达。在一些实施方案中，免疫细胞为T细胞，例如原代T细胞或T细胞系。可选地，免疫细胞可以是NK细胞，例如建立的NK细胞系(例如，NK-92细胞)。在一些实施方案中，免疫细胞是表达CD8($CD8^+$)或CD8和CD4($CD8^+/CD4^+$)的T细胞。在一些实施方案中，T细胞是建立的T细胞系的T细胞，例如293T细胞或Jurkat细胞。

[0172] 原代T细胞可以从任何来源获得，例如外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、组织诸如脾、淋巴结、胸腺或肿瘤组织。适于获得所需免疫细胞类型的来源对于本领域技术人员而言将

是显而易见的。在一些实施方案中，免疫细胞群源自患有造血系统恶性肿瘤的人类患者，例如源自骨髓或源自从患者获得的PBMC。在一些实施方案中，免疫细胞群源自健康供体。在一些实施方案中，免疫细胞获自随后将施用表达嵌合受体的免疫细胞的受试者。施用于从中获得所述细胞的相同受试者的免疫细胞被称为自体细胞，而从并非施用所述细胞的受试者的受试者获得的免疫细胞被称为同种异体细胞。

[0173] 所需类型的宿主细胞可以在通过将细胞与刺激分子共孵育而获得的细胞群内扩增，例如抗CD3和抗CD28抗体可用于扩增T细胞。

[0174] 为了构建表达本文描述的任何嵌合受体构建体的免疫细胞，可以通过如本文描述的常规方法构建用于稳定或瞬时表达嵌合受体构建体的表达载体并将其引入免疫宿主细胞内。例如，可以将编码嵌合受体的核酸克隆到合适的表达载体，例如与合适的启动子可操作连接的病毒载体中。可以在合适的条件下使核酸和载体与限制酶接触以在每个分子上产生可以彼此配对并用连接酶连接的互补末端。可选地，合成的核酸接头可以连接到编码嵌合受体的核酸末端。合成接头可含对应于载体中的特定限制位点的核酸序列。表达载体/质粒/病毒载体的选择将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型，但是应该适于在真核细胞中整合和复制。

[0175] 多种启动子可用于表达本文描述的嵌合受体，包括但不限于巨细胞病毒(CMV)中间体早期启动子、病毒LTR如劳斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR、莫洛尼小鼠(Maloney murine)白血病病毒(MMLV)LTR、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)LTR、脾脏病灶形成病毒(SFFV)LTR、猿病毒40(SV40)早期启动子、单纯疱疹tk病毒启动子、延伸因子1-α(EF1-α)启动子(有或无EF1-α内含子)。另外的用于表达嵌合受体的启动子包括免疫细胞中的任何组成型活性启动子。可选地，可以使用任何可调控启动子，使其表达可以在免疫细胞内被调节。

[0176] 另外，载体可含有例如以下的一些或全部：选择标记基因，例如用于选择宿主细胞中的稳定或瞬时转染子的新霉素基因；来自人CMV的立即早期基因的用于高水平转录的增强子/启动子序列；来自SV40的用于mRNA稳定性的转录终止和RNA加工信号；来自高表达基因如α-珠蛋白或β-珠蛋白的用于mRNA稳定性和翻译效率的5′-和3′-非翻译区；SV40多瘤复制起点和用于正确附加型复制的ColE1；内部核糖体结合位点(IRESes)、通用多克隆位点；用于有义和反义RNA体外转录的T7和SP6 RNA启动子；被触发时会导致携带载体的细胞死亡(例如，HSV胸苷激酶、诱导型半胱天冬酶如iCasp9)的“自杀开关”或“自杀基因”，及用于评估嵌合受体表达的报告基因。见下面部分VI。用于产生含有转基因的载体的合适载体和方法是本领域公知并且可用的。制备用于表达嵌合受体的载体的实例可以例如在US2014/0106449中找到，其通过引用整体并入本文。

[0177] 在一些实施方案中，嵌合受体构建体或编码所述嵌合受体的核酸为DNA分子。在一些实施方案中，嵌合受体构建体或编码所述嵌合受体的核酸为DNA载体并且可以电穿孔至免疫细胞(参见，例如Till等，Blood(2012)119(17):3940-3950)。在一些实施方案中，编码嵌合受体的核酸是可以电穿孔至免疫细胞的RNA分子。

[0178] 包含编码本文描述的嵌合受体构建体的核酸序列的任何载体也在本公开的范围内。此类载体可以通过合适的方法递送到宿主细胞如宿主免疫细胞中。将载体递送至免疫细胞的方法在本领域中是公知的并且可以包括DNA、RNA或转座子电穿孔、转染试剂如脂质

体或纳米颗粒以递送DNA、RNA或转座子;通过机械变形递送DNA、RNA或转座子或蛋白质(参见例如,Sharei等Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2013)110(6):2082-2087);或病毒转导。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体通过病毒转导递送至宿主细胞。用于递送的示例性病毒方法包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如,PCT公布号WO 90/07936、WO 94/03622、WO 93/25698、WO 93/25234、WO 93/11230、WO 93/10218、WO 91/02805;美国专利第5,219,740和4,777,127号;GB专利第2,200,651号;和EP专利第0 345242号)、基于α病毒的载体和腺相关病毒(AAV)载体(参见例如,PCT公布号WO 94/12649、WO 93/03769、WO 93/19191、WO 94/28938、WO 95/11984和WO 95/00655)。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体为逆转录病毒。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体为慢病毒。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体为腺相关病毒。

[0179] 在使用病毒载体将编码嵌合受体的载体引入宿主细胞的实例中,能够感染免疫细胞并携带载体的病毒颗粒可以通过本领域已知的任何方法产生,并且可以例如在PCT申请第WO 1991/002805A2、WO 1998/009271 A1号和美国专利6,194,191中找到。从细胞培养物上清液中收获病毒颗粒,并且可以在使病毒颗粒与免疫细胞接触之前分离和/或纯化病毒颗粒。

[0180] 制备表达本文描述的任何嵌合受体的宿主细胞的方法可包括离体活化和/或扩增免疫细胞。活化宿主细胞意味着刺激宿主细胞进入活化状态,其中所述细胞可能能够执行效应子功能(例如,细胞毒性)。活化宿主细胞的方法将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型。扩增宿主细胞可涉及任何导致表达嵌合受体的细胞数量增加的方法,例如,使宿主细胞增殖或刺激宿主细胞增殖。用于刺激宿主细胞扩增的方法将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型,并且将对于本领域技术人员显而易见。在一些实施方案中,表达本文描述的任何嵌合受体的宿主细胞在施用给受试者之前离体活化和/或扩增。

[0181] 在一些实施方案中,靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂是抗体-药物缀合物(ADC)。正如将对本领域普通技术人员显而易见的,术语“抗体-药物缀合物”可以与“免疫毒素”互换使用并且是指包含与毒素或药物分子偶联的抗体(或其抗原结合片段)的融合分子。抗体与相应抗原的结合允许将毒素或药物分子递送至在其细胞表面呈递抗原的细胞(例如,靶细胞),从而导致靶细胞死亡。

[0182] 在一些实施方案中,所述药剂为抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物包含抗原结合片段和在靶细胞中诱导细胞毒性的毒素或药物。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物靶向2型抗原。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物靶向CD33或CD19。

[0183] 在一些实施方案中,抗体-药物缀合物的抗原结合片段具有与SEQ ID NO:12所提供的重链可变区相同的重链CDR和与SEQ ID NO:13所提供的轻链可变区相同的轻链CDR。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物的抗原结合片段具有SEQ ID NO:12所提供的重链可变区和SEQ ID NO:13所提供的轻链可变区。

[0184] 适用于抗体-药物缀合物的毒素或药物是本领域公知的并且将对本领域普通技术人员显而易见。参见例如,Peters等Biosci.Rep.(2015)35(4):e00225。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物还可包含连接抗体和药物分子的接头(例如,肽接头,例如可裂解接头)。

[0185] 本文描述的ADC可以用作对已经接受如本文所描述的组合疗法的受试者的后续治疗。

[0186] 缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞

[0187] 本公开还提供了造血细胞如HSC,其已经遗传修饰为缺乏谱系特异性细胞表面抗原。在一些实施方案中,造血细胞是造血干细胞。造血干细胞(HSC)能够产生骨髓和淋巴祖细胞,其进一步产生骨髓细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突细胞、红细胞、血小板等)和淋巴样细胞(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)。HSC的特征在于表达可用于HSC的鉴定和/或分离的细胞表面标记CD34(例如,$CD34^+$),并且不存在与约束细胞谱系相关的细胞表面标记。

[0188] 在一些实施方案中,HSC从受试者,例如哺乳动物受试者获得。在一些实施方案中,哺乳动物受试者是非人灵长类动物、啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)、牛、猪、马或家畜。在一些实施方案中,HSC获自人类患者,例如患有造血系统恶性肿瘤的人类患者。在一些实施方案中,HSC获自健康供体。在一些实施方案中,HSC获自随后将施用表达嵌合受体的免疫细胞的受试者。施用于从中获得所述细胞的相同受试者的HSC被称为自体细胞,而从并非施用所述细胞的受试者的受试者获得的HSC被称为同种异体细胞。

[0189] 可以使用本领域已知的常规手段从任何合适的来源获得HSC。在一些实施方案中,HSC从来自受试者的样品,例如骨髓样品或血液样品获得。可选地或另外,HSC可以从脐带获得。在一些实施方案中,HSC来自骨髓或外周血单核细胞(PBMC)。通常,骨髓细胞可以从受试者的髂嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或其它髓腔获得。骨髓可从患者体内取出并通过本领域已知的各种分离和洗涤程序分离。用于分离骨髓细胞的示例性程序包括以下步骤:a)提取骨髓样品;b)将骨髓悬浮液离心分离成三个部分并收集中间部分或血沉棕黄层;c)将来自步骤(b)的血沉棕黄层部分在分离液(通常为Ficoll TM)中再次离心,并收集含有骨髓细胞的中间部分;和d)洗涤从步骤(c)收集的部分以回收可再输注的骨髓细胞。

[0190] HSC通常存在于骨髓中,但可以通过施用动员剂使其动员到循环血液中以便从外周血中收集HSC。在一些实施方案中,向获得HSC的受试者施用动员剂,例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。使用动员剂动员后收集的HSC数量通常大于不使用动员剂获得的细胞数量。

[0191] 在一些实施方案中,从受试者获得样品,然后富集所需细胞类型(例如$CD34^+/CD33^-$细胞)。例如,如本文所述,可以从血液中分离PBMC和/或$CD34^+$造血细胞。细胞也可以从其它细胞中分离,例如通过用与所需细胞类型的细胞表面上的表位结合的抗体分离和/或活化。可以使用的另一种方法包括使用针对细胞表面标记的抗体进行阴性选择以选择性富集特定细胞类型而不通过受体接合来活化细胞。

[0192] 在可以将HSC基因工程改造成缺乏谱系特异性细胞表面抗原之前或之后扩增HSC群。细胞可以在包含扩增培养基的条件下培养,扩增培养基包含一种或多种细胞因子,如干细胞因子(SCF)、Flt-3配体(Flt3L)、血小板生成素(TPO)、白细胞介素3(IL-3)或白细胞介素6(IL-6)。细胞可以扩增约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25天或任何必需的范围。在一些实施方案中,在从获自受试者的样品中分离所需细胞群(例如,$CD34^+/CD33^-$)后并且在基因工程改造之前扩增HSC。在一些实施方案中,在基因工程改造后扩增HSC,从而选择性地扩增已经经历了遗传修饰并且缺乏谱系特异性细胞表面抗原的细胞。在一些实施方案中,可以选择遗传修饰后具有所需特征(例如,表型或基因型)的一种细胞(“克隆”)或几种细胞并独立扩增。

[0193] 在一些实施方案中,造血细胞经基因工程改造成缺乏细胞表面谱系特异性抗原。

在一些实施方案中，造血细胞经基因工程改造成缺乏所述药剂所靶向的相同细胞表面谱系特异性抗原。如本文中所用，如果造血细胞和与经基因工程改造的造血细胞相同类型的天然存在的造血细胞(例如，其特征在于存在相同的细胞表面标记，例如CD34)相比，细胞表面谱系特异性抗原的表达显著降低，则认为造血细胞缺乏细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，造血细胞没有可检测到的细胞表面谱系特异性抗原表达。细胞表面谱系特异性抗原的表达水平可以通过本领域已知的任何方式评估。例如，可以通过用抗原特异性抗体检测抗原(例如，流式细胞术方法、蛋白质印迹法)来评估细胞表面谱系特异性抗原的表达水平。

[0194] 在一些实施方案中，将经基因工程改造的造血细胞上的细胞表面谱系特异性抗原的表达与天然存在的造血细胞上的细胞表面谱系特异性抗原的表达进行比较。在一些实施方案中，基因工程改造导致细胞表面谱系特异性抗原的表达水平与天然存在的造血细胞上的细胞表面谱系特异性抗原的表达相比降低至少约50％、60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％。

[0195] 在一些实施方案中，造血细胞缺乏编码细胞表面谱系特异性抗原的完整内源性基因。在一些实施方案中，编码细胞表面谱系特异性抗原的完整内源性基因已经缺失。在一些实施方案中，造血细胞包含编码细胞表面谱系特异性抗原的内源性基因的一部分。在一些实施方案中，造血细胞表达细胞表面谱系特异性抗原的一部分(例如截短蛋白)。在其它实施方案中，编码细胞表面谱系特异性抗原的内源性基因的一部分已经缺失。在一些实施方案中，编码细胞表面谱系特异性抗原的基因的至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或更多已经缺失。

[0196] 如本领域普通技术人员将认识到的，编码细胞表面谱系特异性抗原的核苷酸序列的一部分可缺失或一个或多个非编码序列，使得造血细胞缺乏抗原(例如，具有显著降低的抗原表达)。

[0197] 在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原为CD33。预测的CD33结构包括两个免疫球蛋白结构域、一个IgV结构域和一个IgC2结构域。在一些实施方案中，CD33的免疫球蛋白C结构域的一部分缺失。

[0198] 可以通过常规方法或本文描述的方法制备任何经基因工程改造的缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞，如HSC。在一些实施方案中，使用基因组编辑进行基因工程改造。如本文中所用，“基因组编辑”是指修饰生物体的基因组(包括任何蛋白质编码或非编码核苷酸序列)以敲除靶基因的表达的方法。通常，基因组编辑方法涉及使用能够裂解基因组核酸(例如在靶向核苷酸序列处)的核酸内切酶。可以修复基因组中的双链断裂，引入突变和/或可以将外源核酸插入靶向位点。

[0199] 通常基于参与在靶核酸中产生双链断裂的核酸内切酶的类型对基因组编辑方法进行分类。这些方法包括使用锌指核酸酶(ZFN)、基于转录活化因子样效应因子的核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和CRISPR/Cas系统。

[0200] 在本公开的一个方面中，使用其中谱系特异性抗原经修饰的正常细胞，进行经修饰的正常细胞群对肿瘤细胞的置换。此类修饰可以包括使用CRISPR-Cas9系统消耗或抑制任何谱系特异性抗原，其中成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-Cas9系统是经工程改造的、非天然存在的CRISPR-Cas9系统(图4)。

[0201] CRISPR-Cas系统已成功用于编辑各种生物体的基因组,包括但不限于细菌、人、果蝇、斑马鱼和植物。参见例如,Jiang等,Nature Biotechnology(2013)31(3):233;Qi等,Cell(2013)5:1173;DiCarlo等,Nucleic Acids Res.(2013)7:4336;Hwang等,Nat.Biotechnol(2013),3:227);Gratz等,Genetics(2013)194:1029;Cong等,Science(2013)6121:819;Mali等,Science(2013)6121:823;Cho等Nat.Biotechnol(2013)3:230;及Jiang等,Nucleic Acids Research(2013)41(20):e188。

[0202] 本公开利用与谱系特异性抗原多核苷酸中的靶序列杂交的CRISPR/Cas9系统,其中CRISPR/Cas9系统包含Cas9核酸酶和经工程改造的crRNA/tracrRNA(或单个向导RNA)。CRISPR/Cas9复合物可结合谱系特异性抗原多核苷酸并允许抗原多核苷酸的裂解,从而修饰该多核苷酸。

[0203] 本公开的CRISPR/Cas系统可以结合和/或裂解基因内或其附近的编码或非编码区,诸如例如前导序列、尾随序列或内含子内,或编码区上游或下游的非转录区内细胞表面谱系特异性抗原的目标区域。可以设计本公开中使用的向导RNA(gRNA),使得gRNA指导Cas9-gRNA复合物与基因组中的预定裂解位点(靶位点)的结合。可选择裂解位点以便释放含有未知序列区域或含有SNP、核苷酸插入、核苷酸缺失、重排等的区域的片段。

[0204] 基因区域的裂解可以包括通过Cas酶裂解靶序列位置处的一条或两条链。在一个实施方案中,这样,裂解可导致靶基因的转录减少。在另一个实施方案中,裂解可以进一步包括通过与外源性模板多核苷酸的同源重组来修复裂解的靶多核苷酸,其中修复导致靶多核苷酸的一个或多个核苷酸的插入、缺失或取代。

[0205] 术语“gRNA”、“向导RNA”和“CRISPR向导序列”可通篇互换使用并且是指包含决定CRISPR/Cas系统Cas DNA结合蛋白的特异性的序列的核酸。gRNA与宿主细胞基因组中的靶核酸序列杂交(部分或完全互补)。与靶核酸杂交的gRNA或其部分的长度可介于15-25个核苷酸、18-22个核苷酸或19-21个核苷酸之间。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列的长度可为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列的长度介于10-30或15-25个核苷酸之间。

[0206] 除了结合靶核酸的序列之外,在一些实施方案中,gRNA还包含支架序列。编码与靶核酸和支架序列互补的序列的gRNA的表达具有与靶核酸结合(杂交)和将核酸内切酶募集至靶核酸的双重功能,这样可以产生位点特异性CRISPR活性。在一些实施方案中,此类嵌合gRNA可以称为单向导RNA(sgRNA)。

[0207] 如本文中所用,“支架序列”(也称为tracrRNA)是指将Cas核酸内切酶募集至与互补gRNA序列结合(杂交)的靶核酸的核酸序列。包含至少一个茎环结构并募集核酸内切酶的任何支架序列均可用于本文描述的遗传元件和载体中。示例性的支架序列对于本领域技术人员而言显而易见并且可以在例如Jinek等,Science(2012)337(6096):816-821,Ran等,Nature Protocols(2013)8:2281-2308,PCT申请号WO2014/093694和PCT申请号WO2013/176772中找到。

[0208] 在一些实施方案中,gRNA序列不包含支架序列并且支架序列表达为单独的转录产物。在此类实施方案中,gRNA序列还包含与支架序列的一部分互补并且起到结合(杂交)支架序列并将核酸内切酶募集至靶核酸的作用的附加序列。

[0209] 在一些实施方案中,gRNA序列与靶核酸至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、

80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或至少100％互补(对于gRNA序列与靶多核苷酸序列的互补性的教导,也参见美国专利8,697,359,其通过引用并入)。已经证明,靶核酸3′末端附近CRISPR向导序列与靶核酸之间的错配可能会消除核酸酶裂解活性(Upadhyay等,Genes Genome Genetics(2013)3(12):2233-2238)。在一些实施方案中,gRNA序列与靶核酸3′末端(例如,靶核酸3′末端的最后5、6、7、8、9或10个核苷酸)至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或至少100％互补。

[0210] 靶核酸在3′侧侧接可能与核酸内切酶相互作用并且进一步参与使核酸内切酶活性靶向靶核酸的前间区序列邻近基序(PAM)。通常认为侧接靶核酸的PAM序列取决于核酸内切酶和核酸内切酶的来源。例如,对于源自酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的Cas9核酸内切酶,PAM序列为NGG。对于源自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的Cas9核酸内切酶,PAM序列为NNGRRT。对于源自脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)的Cas9核酸内切酶,PAM序列为NNNNGATT。对于源自嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)的Cas9核酸内切酶,PAM序列为NNAGAA。对于源自齿垢密螺旋体(Treponema denticola)的Cas9核酸内切酶,PAM序列为NAAAAC。对于Cpf1核酸酶,PAM序列为TTN。

[0211] 在一些实施方案中,基因工程改造细胞还包括将Cas核酸内切酶引入细胞。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和编码gRNA的核酸在相同核酸(例如,载体)上提供。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和编码gRNA的核酸在不同核酸(例如,不同载体)上提供。可选地或另外,Cas核酸内切酶可以以蛋白质形式提供或引入细胞内。

[0212] 在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是Cas9酶或其变体。在一些实施方案中,Cas9核酸内切酶源自酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟球菌、嗜热链球菌或齿垢密螺旋体。在一些实施方案中,编码Cas核酸内切酶的核苷酸序列可经密码子优化用于在宿主细胞中表达。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas9同源物或直系同源物。

[0213] 在一些实施方案中,编码Cas9核酸内切酶的核苷酸序列被进一步修饰以改变蛋白质的活性。在一些实施方案中,Cas9核酸内切酶是无催化活性的Cas9。例如,dCas9含有催化活性残基(D10和H840)的突变并且不具有核酸酶活性。可选地或另外,Cas9核酸内切酶可以与另一种蛋白质或其部分融合。在一些实施方案中,dCas9与阻遏因子结构域,例如KRAB结构域融合。在一些实施方案中,此类dCas9融合蛋白与本文描述的构建体一起用于多重基因抑制(例如CRISPR干扰(CRISPRi))。在一些实施方案中,dCas9与活化因子结构域,例如VP64或VPR融合。在一些实施方案中,此类dCas9融合蛋白与本文描述的构建体一起用于基因活化(例如,CRISPR活化(CRISPRa))。在一些实施方案中,dCas9与表观遗传调节结构域,例如组蛋白脱甲基酶结构域或组蛋白乙酰转移酶结构域融合。在一些实施方案中,dCas9与LSD1或p300或其部分融合。在一些实施方案中,dCas9融合物用于基于CRISPR的表观遗传调节。在一些实施方案中,dCas9或Cas9与Fok1核酸酶结构域融合。在一些实施方案中,与Fok1核酸酶结构域融合的Cas9或dCas9用于基因组编辑。在一些实施方案中,Cas9或dCas9与荧光蛋白(例如,GFP、RFP、mCherry等)融合。在一些实施方案中,与荧光蛋白融合的Cas9/dCas9蛋白用于基因组基因座的标记和/或可视化或用于鉴定表达Cas核酸内切酶的细胞。

[0214] 可选地或另外,Cas核酸内切酶为Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,宿主细胞表达源自普雷沃氏菌属(Provetella spp.)或弗朗西斯氏菌属(Francisella spp.)的Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,编码Cpf1核酸酶的核苷酸序列可经密码子优化用于在宿主细胞中

表达。

[0215] 在一些实施方案中，本公开提供了使用CRISPR/Cas9系统抑制造血细胞中的细胞表面谱系特异性抗原的组合物和方法，其中向导RNA序列与编码细胞表面谱系特异性抗原的核苷酸序列杂交。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是CD33并且gRNA与编码CD33的核苷酸序列的一部分杂交(图5)。表4中提供了靶向CD33的gRNA的实例，尽管可开发与CD33杂交并且可用于本文描述的方法中的另外的gRNA。

[0216] 表4提供了与CD33的一部分杂交或预测会与之杂交的示例性向导RNA序列。

[0217] 表4:靶向CD33的向导RNA序列

[0218]

名称	向导序列	向导位置	评分
本文中称为“Crispr 1”的hCD33-IgC1	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGCTGG (SEQ ID NO: 11)	Chr19 : +51729270	87
本文中称为“Crispr 3”的hCD33-IgC3	TGGCCGGGTTCTAGAGTGCCAGG (SEQ ID NO: 28)	Chr19 : -51729087	82
本文中称为“Crispr 5”的hCD33-IgC5	GGCCGGGTTCTAGAGTGCCAGGG (SEQ ID NO: 29)	Chr19 : -51729086	81

[0219]

hCD33 gRNA	CACCGAGGAGTGAGTAGTCCTGG (SEQ ID NO: 30)		
hCD33 gRNA	TCCAGCGAACTTCACCTGACAGG (SEQ ID NO: 31)		

[0220] 在一些实施方案中，可能需要进一步基因工程改造HSC，特别是同种异体HSC，以降低移植物抗宿主效应。例如，复发性AML的标准疗法是造血干细胞移植(HSCT)。然而，HSCT成功的至少一个限制因素是移植物抗宿主病(GVHD)，其涉及细胞表面分子CD45的表达。参见例如，Van Besie，Hematology Am.Soc.Hematol Educ Program(2013)56;Mawad Curr.Hematol.Malig.Rep.(2013)8(2):132。CD45RA和CD45RO是CD45的同种型(在除红细胞以外的所有造血细胞中均可找到)。在T淋巴细胞中，CD45RA在稚细胞上表达，而CD45RO在记忆细胞上表达。CD45RAT细胞在HSCT后对受者特异性抗原具有高反应性潜力，导致GVHD。因此，仍然需要也会降低移植排斥或GVHD可能性的有效且安全的AML治疗。CD45是1型谱系抗原，因为携带CD45的细胞是存活所必需的，但是可以使用CRISPR从干细胞中删除抗原。

[0221] 考虑到由于HSCT后GvHD的发展而引起的并发症，本公开还提供了用于靶向CD45RA的组合物和方法。此类组合物和方法旨在预防和/或降低GvHD的发病率或程度。

[0222] 因此，就GVHD而言，患者的治疗可涉及以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的T细胞，其中T细胞包含编码靶向CD45RA谱系特异性抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;及(2)为患者输注造血干细胞，其中造血细胞的CD45RA谱系特异性抗原的表达减少。

[0223] 另外，本公开提供了用于联合抑制CD33和CD45RA谱系特异性抗原的组合物和方

法。此类治疗方案可涉及以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的T细胞,其中T细胞包含编码靶向CD33和CD45RA谱系特异性抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;及(2)为患者输注或再输注自体或同种异体造血干细胞,其中造血细胞的CD33和CD45RA谱系特异性抗原的表达减少。

[0224] 在一些实施方案中,也使用CRISPR/Cas9系统在造血细胞中删除或抑制细胞表面谱系特异性抗原CD45RA。在一些实施方案中,gRNA序列与编码CD45RA的核苷酸序列的一部分杂交(图6)。表5中提供了靶向CD45RA的gRNA的实例,尽管可开发与CD45RA杂交并且可用于本文描述的方法中的另外的gRNA。

[0225] 表5提供了与人CD45的外显子4或外显子5杂交或预测会与之杂交的示例性向导RNA序列。

[0226] 表5:靶向CD45的向导RNA序列

[0227]

hCD45 靶标	向导 RNA
外显子 4	CCAAAGAGTCCGGGGATACT TGG (SEQ ID NO: 9)
	CCAAGTATCCCCGGACTCTT TGG(SEQ ID NO: 32)
	AGCATTATCCAAAGAGTCCG GGG (SEQ ID NO: 33)
	ACTTGGGTGGAAGTATTGTC TGG (SEQ ID NO: 34)
外显子 5	GTTGAGTTTTGCATTGGCGG CGG (SEQ ID NO: 10)
	GTCTGCGAGTCTGCGTGCGT GGG (SEQ ID NO: 35)
	CGTCTGCGAGTCTGCGTGCG TGG (SEQ ID NO: 36)
	GCGAGTCTGCGTGCGTGGGA AGG (SEQ ID NO: 37)

[0228] 本文还提供了产生缺乏细胞表面谱系特异性抗原的细胞的方法,其涉及提供细胞并将用于基因组编辑的CRISPR Cas系统的组分引入细胞内。在一些实施方案中,将包含与编码谱系特异性细胞表面抗原的核苷酸序列的一部分杂交或预测会与之杂交的CRISPR-Cas向导RNA(gRNA)的核酸引入细胞内。在一些实施方案中,将gRNA在载体上引入细胞内。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶引入细胞内。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶作为编码Cas核酸内切酶的核酸引入细胞内。在一些实施方案中,将gRNA和编码Cas核酸内切酶的核苷酸序列在相同核酸(例如,相同载体)上引入细胞内。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶呈蛋白质的形式引入细胞内。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和gRNA在体外预先形成并作为复合物引入细胞内。

[0229] 本公开还提供了经工程改造的、非天然存在的载体和载体系统,其可以编码CRISPR/Cas9复合物的一种或多种组分,其中载体包含编码以下的多核苷酸(i)与谱系特异性抗原序列杂交的(CRISPR)-Cas系统向导RNA和(ii)Cas9核酸内切酶。

[0230] 本公开的载体可以使用哺乳动物表达载体驱动哺乳动物细胞中一个或多个序列的表达。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,Nature(1987)329:840)和pMT2PC(Kaufman等,EMBO J.(1987)6:187)。用于哺乳动物细胞中时,表达载体的控制功能通常由一个或多个调控元件提供。例如,常用启动子源自多瘤、腺病毒2、巨细胞病毒、猿猴病毒40以及本文公开的和本领域已知的其它病毒。对于原核和真核细胞的其它合适的表达系统,参见例如,Sambrook等,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL第2版的第16和17章,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989。

[0231] 本公开的载体能够指导核酸优先在特定细胞类型中表达(例如,组织特异性调控元件用于表达核酸)。此类调控元件包括可以是组织特异性或细胞特异性的启动子。当适用于启动子时,术语“组织特异性”是指在不同类型的组织中相同目标核苷酸序列相对不表达时,能够指导目标核苷酸序列在特定类型的组织(例如,种子)中选择性表达的启动子。当适用于启动子时,术语“细胞类型特异性”是指在相同组织内的不同类型的细胞中相同目标核苷酸序列相对不表达时,能够指导目标核苷酸序列在特定类型的细胞中选择性表达的启动子。当适用于启动子时,术语“细胞类型特异性”还意指能够促进目标核苷酸序列在单个组织内的区域中选择性表达的启动子。启动子的细胞类型特异性可以使用本领域公知的方法,例如免疫组织化学染色来评估。

[0232] 常规的基于病毒或非病毒的基因转移法可用于在哺乳动物细胞或靶组织内引入编码CRISPR/Cas9的核酸。此类方法可用于将编码CRISPR-Cas系统组分的核酸施用于培养物或宿主生物体内的细胞中。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA(例如,本文描述的载体的转录产物)、裸核酸和与递送媒介物复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加型或整合基因组。有关基因治疗程序的综述。

[0233] 病毒载体可直接施用给患者(体内)或者可将其用于操纵体外或离体细胞,其中可向患者施用经修饰的细胞。在一个实施方案中,本公开利用基于病毒的系统,包括但不限于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒进行基因转移。此外,本公开提供了能够整合到宿主基因组中的载体,例如逆转录病毒或慢病毒。优选地,用于表达本公开的CRISPR-Cas系统的载体是慢病毒载体。

[0234] 在一个实施方案中,本公开提供将编码CRISPR-Cas的一种或多种载体引入真核细胞内。所述细胞可为癌细胞。可选地,所述细胞是造血细胞,如造血干细胞。干细胞的实例包括亚全能干细胞(pluripotent)、多能干细胞(multipotent)和单能干细胞(unipotent)。亚全能干细胞的实例包括胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、胚胎癌细胞和诱导型亚全能干细胞(iPSC)。在一个优选的实施方案中,本公开提供了将CRISPR-Cas9引入造血干细胞内。

[0235] 将本公开的载体递送至受试者的真核细胞。通过CRISPR/Cas9系统修饰真核细胞可以发生在细胞培养物中,其中该方法包括在修饰之前从受试者分离真核细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括将所述真核细胞和/或由其衍生的细胞返回至受试者。

[0236] 组合疗法

[0237] 如本文所述,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的药剂可以与缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞组合施用给受试者。如本文中所用,“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,并且是指脊椎动物,优选哺乳动物例如人。哺乳动物包括但不限

于人类灵长类动物、非人灵长类动物或鼠、牛、马、犬或猫科动物物种。在一些实施方案中，受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人类患者。

[0238] 在一些实施方案中，可将药剂和/或造血细胞与药学上可接受的载体混合形成药物组合物，其也在本公开的范围内。

[0239] 为了执行本文描述的方法，可以将有效量的包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段和有效量的造血细胞的药剂共同施用给需要治疗的受试者。如本文中所用，术语“有效量”可以与术语“治疗有效量”互换使用，并且是指药剂、细胞群或药物组合物(例如，包含药剂和/或造血细胞的组合物)足以在施用给有需要的受试者后产生预期活性的量。在本公开的上下文中，术语“有效量”是指化合物、细胞群或药物组合物足以延迟通过本公开的方法治疗的病症的表现，阻止其进展，缓解或减轻其至少一种症状的量。注意，当施用活性成分的组合时，组合的有效量可以包括或不包括如果单独施用将会有效的每种成分的量。

[0240] 如本领域技术人员所认识的，有效量根据所治疗的特定病状、病状的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、大小、性别和体重)、治疗持续时间、同时疗法的性质(若有)、特定施用途径和在保健医生的知识和专业技能范围内的类似因素变化。在一些实施方案中，有效量减轻、缓解、改善、改良、减少症状，或延迟受试者中任何疾病或病症的进展。在一些实施方案中，受试者为人。在一些实施方案中，受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人类患者。

[0241] 如本文所述，表达嵌合受体的造血细胞和/或免疫细胞是受试者自体的，即细胞从需要治疗的受试者获得，经基因工程改造为缺乏细胞表面谱系特异性抗原的表达或嵌合受体构建体的表达，然后施用给同一受试者。与施用非自体细胞相比，向受试者施用自体细胞可以导致宿主细胞的排斥减少。可选地，宿主细胞是同种异体细胞，即细胞从第一个受试者获得，经基因工程改造为缺乏细胞表面谱系特异性抗原的表达或嵌合受体构建体的表达，并施用给不同于第一受试者，但是物种相同的第二受试者。例如，同种异体免疫细胞可源自人类供者并施用给不同于供者的人类受者。

[0242] 在一些实施方案中，免疫细胞和/或造血细胞是同种异体细胞并且已经进一步基因工程改造以减轻移植物抗宿主病。例如，如本文所述，造血干细胞可以经基因工程改造(例如，使用基因组编辑)以减少CD45RA的表达。

[0243] 在一些实施方案中，表达本文描述的任何嵌合受体的免疫细胞以有效减少靶细胞(例如，癌细胞)数量的量施用给受试者，靶细胞数量减少至少20％，例如50％、80％、100％、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0244] 向哺乳动物(例如，人)施用的细胞(即，免疫细胞或造血细胞)典型的量可以例如在一百万至一千亿个细胞的范围内；然而，低于或高于该示例性范围的量也在本公开的范围内。例如，细胞的日剂量可为约100万至约500亿个细胞(例如，约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由上述任两个值限定的范围)，优选约1千万至约1000亿个细胞(例如，约2千万个细胞、约3千万个细胞、约4千万个细胞、约6千万个细胞、约7千万个细胞、约8千万个细胞、约9千万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由上述任两个值限定的范围)，更优选约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如，

约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞或由上述任两个值限定的范围)。

[0245] 在一个实施方案中,将嵌合受体(例如,编码嵌合受体的核酸)引入免疫细胞中,并且受试者(例如,人类患者)接受初次施用或剂量的表达嵌合受体的免疫细胞。药剂的一次或多次后续施用(例如,表达嵌合受体的免疫细胞)可以在前一次施用后间隔15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天提供给患者。每周可向受试者施用多于一个剂量的药剂,例如施用药剂2、3、4次或更多次。受试者每周可以接受多于一个剂量的药剂(例如,表达嵌合受体的免疫细胞),随后一周不施用药剂,最后接着是一个或多个附加剂量的药剂(例如,每周施用一次以上的表达嵌合受体的免疫细胞)。表达嵌合受体的免疫细胞可以每隔一天施用,每周施用3次,持续2、3、4、5、6、7、8周或更多周。

[0246] 在本公开的上下文中,就其涉及本文叙述的任何疾病病状而言,术语"治疗"等意指减轻或缓解与此类病状相关的至少一种症状,或者减缓或逆转此类病状的进展。在本公开的含义内,术语"治疗"还表示阻止、延迟发作(即疾病临床表现之前的时期)和/或降低疾病发展或恶化的风险。例如,关于癌症,术语"治疗"可能意指消除或减少患者的肿瘤负担,或预防、延迟或抑制转移等。

[0247] 在一些实施方案中,药剂包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段和缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群。因此,在此类治疗方法中,药剂识别(结合)表达细胞表面谱系特异性抗原的靶细胞以靶向杀伤。缺乏抗原的造血细胞允许再生药剂所靶向的细胞类型。在一些实施方案中,所述患者的治疗可涉及以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂,和(2)为患者输注或再输注自体或同种异体造血干细胞,其中造血细胞的谱系特异性疾病相关抗原的表达减少。在一些实施方案中,所述患者的治疗可涉及以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的表达嵌合受体的免疫细胞,其中所述免疫细胞包含编码结合细胞表面谱系特异性、疾病相关抗原的嵌合受体的核酸;及(2)为患者输注或再输注自体或同种异体造血干细胞(例如,造血干细胞),其中造血细胞的谱系特异性疾病相关抗原的表达减少。

[0248] 使用包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段和缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群的药剂的治疗方法的疗效可以通过本领域已知的任何方法来评估,并且对于熟练的医学专业人员来说将是显而易见的。例如,可以通过受试者的存活率或受试者或其组织或样品中的癌症负荷来评估所述疗法的疗效。在一些实施方案中,通过量化属于特定细胞群或谱系的细胞的数量来评估所述疗法的疗效。在一些实施方案中,通过量化呈递细胞表面谱系特异性抗原的细胞的数量来评估所述疗法的疗效。

[0249] 在一些实施方案中,药剂包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段和附随施用的造血细胞IS群。

[0250] 在一些实施方案中,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的药剂(例如表达如本文所描述的嵌合受体的免疫细胞)在施用造血细胞之前施用。在一些实施方案中,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的药剂(例如,表达如本文所描述的嵌合受体的免疫细胞)在施用造血细胞之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间

施用。

[0251] 在一些实施方案中,造血细胞在包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的药剂(例如表达如本文所描述的嵌合受体的免疫细胞)之前施用。在一些实施方案中,在施用包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的药剂之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间施用造血细胞群。

[0252] 在一些实施方案中,基本上同时施用靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂和造血细胞群。在一些实施方案中,施用靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂并评估患者一段时间,之后施用造血细胞群。在一些实施方案中,施用造血细胞群并评估患者一段时间,之后施用靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂。

[0253] 同样在本公开的范围内的是多次施用(例如,多个剂量)造血细胞和/或造血细胞群。在一些实施方案中,药剂和/或造血细胞群向受试者施用一次。在一些实施方案中,药剂和/或造血细胞群向受试者施用一次以上(例如,至少2、3、4、5次或更多次)。在一些实施方案中,药剂和/或造血细胞群向受试者定期施用,例如,每6个月一次。

[0254] 在一些实施方案中,受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人类受试者。如本文中所用,造血系统恶性肿瘤是指涉及造血细胞(例如,血细胞,包括祖细胞和干细胞)的恶性异常。造血系统恶性肿瘤的实例包括但不限于霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。白血病包括急性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病或慢性淋巴母细胞性白血病和慢性淋巴性白血病。

[0255] 在一些实施方案中,白血病是急性骨髓性白血病(AML)。AML的特征是异源性、克隆性、肿瘤性疾病,该疾病起源于逐渐获得破坏关键分化和生长调节途径的关键基因变化的转化细胞。(Dohner等,NEJM,(2015)373:1136)。CD33糖蛋白在大多数骨髓性白血病细胞以及正常骨髓和单核细胞前体上表达,并且已被认为是有吸引力的AML治疗的靶标(Laszlo等,Blood Rev.(2014)28(4):143-53)。虽然使用基于抗CD33单克隆抗体的疗法的临床试验已经显示与标准化学疗法组合时AML患者亚类中的存活率提高,但这些效果还伴有安全性和疗效问题。

[0256] 旨在靶向AML细胞的其它努力涉及产生表达选择性靶向AML中的CD33的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。Buckley等,Curr.Hematol.Malig.Rep.(2):65(2015)。然而,数据有限并且这种方法可能在治疗患者方面多么有效(不管是否消除所有靶向细胞)都存在不确定性。另外,因为髓系细胞对于生命是必不可少的,所以消耗受试者的髓系细胞可能对患者的存活具有不利影响。本公开至少部分旨在解决此类与AML治疗相关的问题。

[0257] 可选地或另外,本文描述的方法可用于治疗非造血系统癌症,包括但不限于肺癌、耳鼻咽喉癌、结肠癌、黑素瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、乳房癌、卵巢癌、基底细胞癌、胆道癌;膀胱癌;骨癌;乳房癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;上皮内肿瘤;肾癌;喉癌;肝癌;纤维瘤、神经母细胞瘤;口腔癌(例如唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;肾癌;呼吸系统癌;肉瘤;皮肤癌;胃部癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌;泌尿系统癌以及其它癌和肉瘤。

[0258] 癌症是上皮来源的癌症。旨在用本公开的方法治疗的癌症包括但不限于腺泡癌、

腺泡状癌、肺泡腺癌(也称为囊性腺样癌、腺肌上皮瘤、筛状癌和圆柱瘤)、腺癌、腺癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌(也称为细支气管癌、肺泡细胞瘤和肺腺瘤病)、基底细胞癌、基底样细胞癌(也称为基底细胞瘤(basaloma)或基底细胞癌(basiloma)和毛母质癌)、基底样癌、基底鳞状细胞癌、乳房癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、髓样癌、胆管细胞癌(也称为胆管瘤和胆管癌)、绒毛膜癌、胶样癌、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、胸廓癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌、胚胎性癌、髓样癌、眼球上癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、溃疡原癌、纤维癌、胶样癌、胶状癌、巨细胞癌、巨细胞癌、腺癌、粒层细胞癌、毛母质癌、血样癌、肝细胞癌(也称为肝细胞瘤、恶性肝细胞瘤和肝癌)、何氏细胞癌(Huirthle cell carcinoma)、透明癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher癌、Kulchitzky细胞癌、豆状癌、豆状癌、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、乳腺炎性癌、软癌、髓样癌、黑色素癌(carcinoma melanodes)、黑色素癌(melanotic carcinoma)、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌(mucous carcinoma)、粘液瘤样癌、鼻咽癌、黑色素癌(carcinoma nigrum)、燕麦细胞癌、骨化癌、骨样癌、卵巢癌、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前癌、前列腺癌、肾细胞癌(也称为肾腺癌和hypemephoroid carcinoma)、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德氏癌(scheinderian carcinoma)、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓样癌(carcinoma spongiosum)、鳞状癌、鳞状细胞癌、绳捆癌、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberous carcinoma)、疣状癌(verrucous carcinoma)、绒毛状癌。在优选的实施方案中,本公开的方法用于治疗患有乳房癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌或肾癌的受试者。

[0259] 肉瘤是骨和软组织中产生的间质瘤。识别不同类型的肉瘤并且这些包括:脂肪肉瘤(包括粘液样脂肪肉瘤和多形性脂肪肉瘤)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性外周神经鞘瘤(也称为恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤或神经原性肉瘤)、尤因氏瘤(Ewing′s tumor)(包括尤因氏骨肉瘤、骨外(即非骨)尤因氏肉瘤和原始神经外胚层肿瘤[PNET])、滑膜肉瘤、血管肉瘤(angiosarcoma)、血管肉瘤(hemangiosarcoma)、淋巴管肉瘤、卡波西肉瘤(Kaposi′s sarcoma)、血管内皮瘤、纤维肉瘤、硬纤维瘤(也称为侵袭性纤维瘤病)、隆凸性皮肤纤维肉瘤(DFSP)、恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、血管外皮细胞瘤、恶性间叶瘤、肺泡软组织肉瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、促结缔组织增生小细胞瘤、胃肠道基质肿瘤(GIST)(也称为GI基质肉瘤)、骨骼和骨外骨肉瘤(也称为骨源性肉瘤)及软骨肉瘤。

[0260] 在一些实施方案中,待治疗的癌症可以是难治性癌症。如本文中所用,“难治性癌症”是对所规定的护理标准具有抗性的癌症。这些癌症可能最初对治疗有反应(然后复发),或者它们可能对治疗完全没有反应。普通护理标准将根据癌症类型和受试者的进展程度而变化。可以是化疗或手术或放疗或其组合。本领域的普通技术人员知道此类护理标准。根据本公开治疗难治性癌症的受试者因此可能已经接触到针对其癌症的另一种治疗。可选地,如果癌症可能是难治性的(例如,鉴于对受试者癌细胞或病史的分析),那么受试者可能尚未接触过其它治疗。难治性癌症的实例包括但不限于白血病、黑素瘤、肾细胞癌、结肠癌、肝脏(肝)癌、胰腺癌、非霍奇金淋巴瘤和肺癌。

[0261] 表达本文描述的嵌合受体的任何免疫细胞均可在药学上可接受的载体或赋形剂中作为药物组合物施用。

[0262] 结合本公开的组合物和/或细胞使用的短语“药学上可接受的”是指此类组合物的分子实体和其它成分，其在生理上可耐受并且施用给哺乳动物(例如，人)时通常不产生不良反应。优选地，如本文中所用，术语“药学上可接受的”意指经联邦或州政府监管机构批准或列入美国药典或其它公认药典中用于哺乳动物且更特别是用于人类中。“可接受的”意指载体与组合物的活性成分(例如，核酸、载体、细胞或治疗性抗体)相容，并且不会对施用组合物的受试者产生不利影响。用于本发明方法中的任何药物组合物和/或细胞可以包含呈冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[0263] 药学上可接受的载体，包括缓冲剂，是本领域公知的，并且可以包含磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂；低分子量多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；氨基酸；疏水性聚合物；单糖；双糖；和其它碳水化合物；金属络合物；和/或非离子表面活性剂。参见例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams和Wilkins编辑，K.E.Hoover。

[0264] 用于治疗用途的试剂盒

[0265] 同样在本公开范围内的是用于靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂与缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群组合使用的试剂盒。此类试剂盒可包括一个或多个容器，其包含第一药物组合物和第二药物组合物，第一药物组合物包含含有结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的任何药剂(例如，表达本文描述的嵌合受体的免疫细胞)和药学上可接受的载体，所述第二药物组合物包含缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群(例如，造血干细胞)和药学上可接受的载体。

[0266] 在一些实施方案中，试剂盒可以包含在本文描述的任何方法中使用的说明书。所包括的说明书可以包含对第一和第二药物组合物向受试者施用以在受试者中实现预期活性的说明。试剂盒还可包含基于鉴定受试者是否需要治疗来选择适于治疗的受试者的说明。在一些实施方案中，说明书包含向需要治疗的受试者施用第一和第二药物组合物的说明。

[0267] 关于使用靶向细胞表面谱系特异性抗原的药剂和本文描述的第一和第二药物组合物的说明书通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装(例如，多剂量包装)或亚单位剂量。本公开试剂盒中提供的说明书通常是在标签或包装插页上的书面说明书。标签或包装插页指示药物组合物用于治疗、延迟受试者中疾病或病状的发作和/或缓解受试者中疾病或病状。

[0268] 本文提供的试剂盒呈合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、软包装等。还考虑了与特定装置如吸入器、鼻部施用装置或输注装置组合使用的包装。试剂盒可具有无菌接入孔(例如，容器可以是静脉溶液包或具有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。容器也可以具有无菌接入孔。药物组合物中的至少一种活性剂是本文描述的嵌合受体变体。

[0269] 试剂盒可任选地提供附加组分如缓冲剂和说明信息。通常，该试剂盒包含容器以及容器上或与容器相关的标签或包装插页。在一些实施方案中，本公开提供了包含上述试剂盒的内容物的制品。

[0270] 一般技术

[0271] 除非另有说明,本公开的实践将采用在本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。此类技术在文献中有全面解释,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1989)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987);Introuction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑):Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practice approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995);DNA Cloning:A practical Approach,第I和II卷(D.N.Glover编辑,1985);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985》;Transcription and Translation(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984》;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑(1986》;Immobilized Cells and Enzymes(lRL Press,(1986》;及B.Perbal,A practical Guide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等(编辑)。

[0272] 无需进一步详细描述,据信本领域的技术人员可以根据以上描述最大限度地利用本公开。因此以下具体实施方案应解释为仅仅是说明性的,而非以任何方式限制本公开的其余部分。出于本文引用的目的或主题,本文引用的所有出版物通过引用并入。

[0273] 实施例1:人白血病细胞系中CD33的体外删除

[0274] 为了测试CRSPR-Cas9系统靶向体外CD33的能力,使用Neon™(Thermo Fisher Scientific)和Cas9-GFP(PX458,酿脓链球菌)及含有NGG PAM序列的向导RNA(图4)共转染人白血病细胞K-562,其中向导RNA被设计为靶向hCD33基因组序列。转染48小时后,对GFP使用FACS分选来鉴定和分离表达Cas9的细胞。然后将细胞孵育96小时并通过流式细胞术测试CD33表达(图5)。使用抗CD33抗体的流式细胞术图显示了递送Cas9载体和向导RNA之前(上图)和之后(下图)K-562细胞的CD33表达。如图5所示,转染后98%的细胞没有CD33表达。

[0275] 该实施例证明了在人白血病细胞中使用CRISPR-Cas9系统有效地删除了CD33。

[0276] 实施例2:人白血病细胞系中CD45的体外删除

[0277] CRISPR-Cas9系统用于靶向体外CD45RA。简言之,使用Neon™试剂(Thermo Fisher Scientific)和Cas9-GFP(PX458,酿脓链球菌)及靶向hCD45RA基因组序列的CRISPRs gRNA

(含有“NGG”PAM序列)共转染TIB-67网状细胞肉瘤小鼠巨噬细胞样细胞。转染48小时后,使用针对GFP的FACS分选来鉴定和分离表达CRISPR-Cas9系统的细胞。然后将细胞孵育96小时并测试CD45RA表达(图6)。使用CD45RA抗体的流式细胞术图显示了递送Cas9载体和向导RNA之前(上图)和之后(下图)的CD45RA表达。

[0278] 类似于实施例1,其中在白血病细胞中成功地减少了CD33表达,本实施例中的发现表明使用CRISPR-Cas9系统有效靶向CD45RA。

[0279] 实施例3:靶向急性骨髓性白血病(AML)中的细胞表面谱系特异性CD33

[0280] 本实施例涵盖靶向AML中的CD33抗原。表6列出了该实施例的具体步骤。

[0281] 表6.实验设计大纲

[0282]

I. 靶向自体 CD33 的(CAR)T 细胞疗法	1. 产生抗 CD33 CAR 构建体 2. 从患者中分离 $CD8^+$T 细胞 3. 制备抗 CD33 CAR T 细胞 4. 将 CD33 CAR T 细胞再输注到患者体内
II. 使用 $CD34^+CD33^-$细胞的自体造血干细胞移植	1. 分离造血干细胞 2. 靶向 CD33 的 CRISPR-Cas9 质粒

[0283]

	3. 通过 CRISPR-CAS 系统产生 $CD34^+CD33^-$细胞 4. 将 $CD34^+CD33^-$细胞再输注到患者体内
III. 用附着于毒素(免疫毒素)的 CD33 抗体继续治疗患者	

[0284] I.靶向CD33的嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法

[0285] A.产生抗CD33 CAR构建体

[0286] 本文描述的靶向CD33的嵌合抗原受体按5′至3′的顺序可以由以下组分组成:pHIV-Zsgreen慢病毒主链(www.addgene.org/18121/)、肽信号序列、CD33 scFv、铰链、CD28分子的跨膜区域、CD28的细胞内结构域和TCR-ζ分子的信号传导结构域。

[0287] 首先,将肽信号序列、抗CD33轻链(SEQ ID NO:1)、柔性接头和抗CD33重链(SEQ ID.NO.2)克隆到pHIV-Zsgreen的具有最佳Kozak序列的EcoRI位点。

[0288] 下面提供了结合CD33的具有轻链-接头-重链-铰链-CD28/ICOS-CD3ζ的基本结构的示例性嵌合受体的核酸序列。

[0289] 第1部分:轻链-接头-重链(SEQ ID NO:16):Kozak起始位点以黑体显示。肽信号序列L1以斜体显示。抗CD33轻链和重链以粗体和斜体显示,由接头间隔开。

[0290] ggtgtcgtgagcggccgctgaactg**GCCACC**ATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCT
GGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGT**GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCC**
CGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCAAGAGGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
CGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGATCCCCGGCCA
GAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTT
CACCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCC
CGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGG
CACCAAGCTGGAGATCAAGAGGGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCGGCGA
GGGCAGCACCAAGGGC**CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGG**
CGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
CTGGATCAAGCAGACCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCAA
CGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAG
CAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTA

CTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGAC
CGTGAGCAGC

[0291] 第2部分:铰链-CD28/ICOS-CD3ζNotI限制酶识别位点以大写字母显示。翻译终止位点以黑体显示。BamHI限制性裂解位点以下划线显示。

[0292] CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:17)

[0293] GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatgga
accattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttct
aagccctttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagta
acagtggcctttattatttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgac
tacatgaacatgactccccgccgccccgggcccAcccgcaagcattaccagccctatgcc
ccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcc
cccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagag
gagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgaga
aggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcc
tacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttac
cagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccc
cctcgc**TAA**cgcccctctccctccccccccccctaa

[0294] ICOS共刺激结构域(SEQ ID NO:18)

[0295] GCGGCCGCActatcaatttttgatcctcctcctttaaagtaactcttacaggaggatat
ttgcatatttatgaatcacaactttgttgccagctgaagttctggttacccataggatgt
gcagcctttgttgtagtctgcattttgggatgcatacttatttgttggcttacaaaaaag
aagtattcatccagtgtgcacgaccctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaac
acagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctaagagtgaagttcagcaggagcgca
gacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacga
agagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaag
ccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcg
gaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggc
ctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcc
ctgcccccctcgc**TAA**cgcccctctccctccccccccccctaa

[0296] 融合(杂交)CD28和ICOS共刺激结构域(SEQ ID NO:19)

[0297]

GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctcttacctagacaatgagaagagcaatgga
accattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtccccctatttccggaccttct
aagccctttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagta
acagtggcctttattatttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgac
tacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccccta
agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctc
tataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggc
cgggaccctgagatgggggcgaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaat
gaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgc
cggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacc

tacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcTAAcgcccctctccctcccccccc
cctaa

[0298] 在下一步中,将铰链区、CD28结构域(SEQ ID NO:3)和TCR-ζ的细胞质组分克隆到pHIV-Zsgreen的NotI和BamHI位点(已经含有肽信号序列和CD33scFv)。可选地,CD28结构域可被ICOS结构域(SEQ ID NO:4)取代。

[0299] 除CD28和ICOS结构域之外,包含CD28和ICOS细胞内信号传导结构域片段的融合结构域将被工程改造(SEQ ID NO:5)并用于产生另外的嵌合受体。此类构型,其中嵌合受体包含抗原结合片段、抗CD33轻链可变区、接头、抗CD33重链可变区、CD28/ICOS杂合区(包括CD28的TM区)和TCR-ζ分子的信号传导结构域。

[0300] 本文提供了可用于产生嵌合受体的组分的示例氨基酸序列,例如本文提供了CD28结构域(SEQ ID NO:6)、ICOS结构域(SEQ ID NO:7)、CD28/ICOS杂合结构域(SEQ ID NO:8)和TCR-ζ。可选地,也可以产生嵌合受体(部分B)

[0301] B.产生抗CD33 CAR构建体的替代方法

[0302] 在图7的图A-D中呈现了示例嵌合受体的示意图。使用识别CD33抗原,与细胞外CD8铰链区、跨膜和细胞质信号传导结构域以及CD3ζ信号传导链连接的细胞外人源化scFv产生嵌合受体(图7,图B)。编码抗CD33嵌合受体的DNA将通过使用人源化scFv产生(Essand等,J Intern Med.(2013)273(2):166)。替代物包括含有代替CD28的OX-1或41-BB或CD28/OX1或CD28/4-1-B-B杂合物的CAR T细胞(图7,图C和D)。

[0303] 为了产生抗CD33 scFV序列,将用特异性引物扩增上述抗CD33抗体(SEQ ID NO:1和2)可变区的重链和轻链的编码区并将其克隆到用于在细胞中表达的pHIV-Zsgreen载体中。为了评价scFv(单链可变片段)与靶抗原的结合强度,将使scFv在Hek293T细胞中表达。为此,将载体(含编码区域的pHIV-Zsgreen)转化到大肠杆菌Top10F细菌中并制备质粒。获得的编码scFv抗体的表达载体将通过转染引入到Hek293T细胞中。培养转染细胞5天后,将去除上清液并纯化抗体。

[0304] 所得抗体可以通过本领域已知的方案使用骨架取代进行人源化。参见例如BioAtla(San Diego)提供的一种此类方案,其中源自模板抗体的合成CDR编码片段文库连接到来自人骨架库的人骨架区编码片段,人骨架库限于来自功能性表达抗体的种系序列(bioatla.com/applications/express-humanization/)。

[0305] 可以进行亲和力成熟以提高抗原结合亲和力。这可以使用本领域已知的一般技术完成,如噬菌体展示(Schier R.,J.Mol.Biol(1996),263:551)。可以使用例如Biacore分析

筛选变体的生物活性(例如,结合亲和力)。为了鉴定将会是修饰的良好候选物的高变区残基,可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有显著贡献的高变区残基。另外,所描述的组合文库也可以用于提高抗体的亲和力(Rajpal等,PNAS(2005)102(24):8466)。另外,BioAtla已经开发了用于抗体的快速高效亲和力成熟的平台,该平台也可用于抗体优化的目的(bioatla.com/applications/functional-maturation/)。

[0306] (C)CAR构建体的组装

[0307] 接下来,抗CD33 scFv将与细胞外CD8铰链区、跨膜和细胞质CD28信号传导结构域及CD3ζ信号传导链连接。简言之,将使用对抗CD33 scFv序列有特异性的引物来扩增如上所述的scFv。质粒(pUN1-CD8)。(www.invivogen.com/puno-cd8a),其携带完整的人CD8编码序列,将用于扩增CD8铰链和跨膜结构域(氨基酸135-205)。将由携带完整的人CD3ζ编码序列的Invivogen质粒pORF9-hCD247a(http://www.invivogen.com/PDF/pORF9-hCD247a_10E26v06.pdf)扩增CD3ζ片段。最后,将由通过Trizol方法使用从活化T细胞收集的RNA产生的cDNA扩增CD28(氨基酸153-220,对应于CD28的TM和信号传导结构域)。将使用剪接重叠延伸(SOE)PCR组装含有抗CD33-scFv-CD8-铰链+TM-CD28-CD3ζ的片段。然后将所得PCR片段克隆到pELPS慢病毒载体中。pELPS是第三代慢病毒载体pRRL-SIN-CMV-eGFP-WPRE的衍生物,其中CMV启动子被EF-1α启动子置换并且HIV的中央多嘌呤束插入启动子的5′(Milone等,Mol Ther.(2009)(8):1453,Porter等,NEJM(2011)(8):725)。所有构建体将通过测序进行验证。

[0308] 可选地,将产生含有ICOS、CD27、41BB或OX-40信号传导结构域而不是CD28结构域的CAR,将其引入T细胞内并测试清除CD33阳性细胞的能力(图7,图C)。还考虑了产生“第三代”嵌合受体(图7,图D),其组合了多个信号传导结构域,例如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40,以进一步增强效力(Sadelain等,Cancer Discov.(2013)4:388)。

[0309] (D)抗CD33 CAR T细胞制备

[0310] 将通过免疫磁性分离(Miltenyi Biotec)从患者的外周血中分离原代人$CD8^+$T细胞。将在完全培养基(补充有10%热灭活的FBS、100U/mL青霉素、100μg/mL硫酸链霉素、10mM HEPES的RPMI 1640)中培养T细胞并且如先前所述用涂有抗CD3和抗CD28 mAb的珠粒(Invitrogen)刺激(Levine等,J.Immunol.(1997)159(12):5921)。

[0311] 包装细胞系将用于产生能够转导靶细胞并含有抗CD33嵌合受体的病毒载体。为了产生慢病毒颗粒,将该实施例部分(1)中产生的CAR转染到永生化的正常胎肾293T包装细胞中,连同一起将用包括10%FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的高葡萄糖DMEM培养细胞。转染48-72小时后,将收集上清液并将重组慢病毒浓缩在不含FBS的DMEM中。接下来将在聚凝胺的存在下以约5-10的感染复数(MOI)转导原代$CD8^+$T细胞。人重组IL-2(R&D Systems)将每隔一天添加一次(50IU/mL)。刺激后将培养T细胞约14天。将通过ZsGreen报告基因的表达来评估人原代T细胞的转导效率(Clontech,Mountain View,CA)。

[0312] E.将CAR T细胞输注到患者体内

[0313] 在将抗CD33 CAR T细胞静脉输注到患者体内之前,将用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞并浓缩。提供闭合无菌体系的细胞处理器如Haemonetics CellSaver(Haemonetics Corporation,Braintree,MA)将用于配制前的洗涤和浓缩步骤。表达抗CD33嵌合受体的最终T细胞将配制到100ml补充有人血清白蛋白的无菌生理盐水中。最后,将在1-3天内为患者

输注1-10X10^{7}个T细胞/kg(Maude等,NEJM(2014)371(16):1507)。输注的表达抗CD33嵌合受体的T细胞的数量将取决于许多因素,例如癌症患者的状态、患者的年龄、先前的治疗等。

[0314] 此外,除了在AML患者中靶向CD33的嵌合受体之外,本文还考虑了表达靶向CD45RA的嵌合受体的免疫细胞。这可以通过两种不同的方法实现:1)单独产生表达抗CD33嵌合受体的免疫细胞和表达抗CD47RA嵌合受体的免疫细胞,并为患者单独输注两种类型的免疫细胞,或2)产生同时靶向CD33和CD45RA两者的免疫细胞(Kakarla等,Cancer(2):151(2014))。

[0315] II.使用CD34$^+$CD33$^-$细胞的自体造血干细胞移植(HSCT)

[0316] 可以理解的是,根据患者的年龄、状况、治疗史和进行治疗的机构,关于从患者中分离干细胞,预处理方案以及为患者输注干细胞的方案差异很大。因此,下面描述的方案仅为实例并受到本领域普通技术人员的常规优化。

[0317] A.过继转移抗CD33 CAR T细胞后使用外周血干细胞(PBSC)动员分离造血干细胞

[0318] 将通过每天静脉内施用10mg/kg的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)来刺激AML患者。CD34$^+$细胞阳性选择将使用免疫磁珠和免疫磁性富集装置进行。预计使用Fenwall CS 3000+细胞分离器收集至少2x10^{6}个CD34$^+$细胞/kg体重(Park等,Bone Marrow Transplantation(2003)32:889)。

[0319] B.患者预处理方案

[0320] 自体外周血干细胞移植(PBSCT)的预处理方案将使用依托泊苷(etoposide)(VP-16)+环磷酰胺(CY)+全身照射(TBI)进行。简言之,该方案将由以下组成:经26小时作为单剂量的1.8g/m^{2}依托泊苷(VP-16)静脉恒量输注(c.i.v.),接着是每天经2小时静脉输注60mg/kg的环磷酰胺(CY)持续3天,然后接下来3天是每天按300cGy全身照射(TBI)。

[0321] 要计算剂量,将使用理想体重或实际体重,以较小者为准。如先前所提到的,在确定精确的预处理方案时,将考虑诸如癌症患者的状况、患者的年龄、先前的治疗以及进行手术的机构类型等因素。

[0322] C.靶向CD33的CRISPR-Cas9系统的质粒构建

[0323] 含有插入片段Cas9和嘌呤霉素抗性的lentiCRISPR v2将从Addgene获得(质粒#52961)(Sanjana等,Nat Methods(2014)(8):783)。为了克隆单一向导RNA(sgRNA)CD33向导序列,将在37℃下裂解lentiCRISPR v2并用FastDigest BsmBI和FastAP(Fermentas)去磷酸化2小时。将使用crispr.mit.edu的在线优化设计工具设计靶向CD33的gRNA。可选地,gRNA将具有图12中描绘的序列(SEQ ID NO:11)。将从Integrated DNA Technologies(IDT)获得CD33 gRNA寡核苷酸,使用多核苷酸激酶(Fermentas)在37℃下保持30分钟进行磷酸化,并且通过加热至95℃保持5分钟并以1.5℃/分钟冷却至25℃进行退火。将使用T7连接酶使寡核苷酸退火,然后将退火的寡核苷酸在25℃下保持5分钟连接到凝胶纯化载体(Qiagen)中。然后可以使用不含内毒素的midi-prep试剂盒(Qiagen)扩增所得质粒(Sanjana等,Nat Methods(2014)(8):783)。

[0324] 可选地,可以使用双载体系统(其中gRNA和Cas由单独的载体表达),前面描述的方案(Mandal等,Cell Stem Cell(2014)15(5):643)。此处,Mandal等使用由非病毒载体表达的CRISPR-Cas系统实现人造血干细胞中基因的有效消融。

[0325] 简言之,含有C端SV40核定位信号序列的人密码子优化的Cas9基因将克隆到具有2A-GFP的CAG表达质粒中。为了指导Cas9裂解目标CD33序列,向导RNA(gRNA(SEQ

ID.NO.11))将从含有人U6聚合酶III启动子的质粒中单独表达。将从Integrated DNA Technologies(IDT)获得gRNA序列寡核苷酸,退火并使用BbsI限制性位点引入质粒中。由于对人U6启动子的'G'碱基的转录起始需求以及对PAM(前间区序列邻近基序)序列的需求,基因组靶标将包含$GN_{20}GG$核苷酸序列。

[0326] 除了为患者输注CD33耗尽的造血干细胞HSC外,还将开发随后为患者输注CD45RA耗尽的HSC的方案。可选地,发明人将使用CRISPR-Cas9系统同时减少CD33和CD45RA基因,产生$CD34^+CD33^-CD45RA^-$细胞。表4和5中显示了CD45RA和CD33的实例向导RNA序列)。

[0327] D.转染$CD34^+$细胞HSC以产生$CD34^+CD33^-$细胞

[0328] 新分离的外周血来源的$CD34^+$细胞(来自步骤4)将按1×10^6个细胞/ml接种在存在细胞培养等级干细胞因子(SCF)300ng/ml、FLT3-L 300ng/ml、血小板生成素(TPO)100ng/ml和IL-3 60ng/ml的无血清CellGro SCGM培养基中。在预刺激24小时后,将使用Amaxa人CD34细胞Nucleofector试剂盒(U-008)(#VPA-1003),用含有Cas9和CD33 gRNA的LentiCRISPR v2转染$CD34^+$HSC(Mandal等,Cell Stem Cell(2014)15(5):643)。转染24-48小时后,用1.2μg/ml嘌呤霉素选择$CD34^+CD33^-$细胞。在嘌呤霉素选择后,$CD34^+CD33^-$细胞将保持在无嘌呤霉素的培养基中几天。

[0329] E.将$CD34^+CD33^-$细胞再输注到患者体内

[0330] 使用无过滤器的标准血液施用装置,通过希克文导管(Hickman catheter)立即再输注用CRISPR-Cas9-CD33离体转染的$CD34^+$细胞($CD34^+CD33^-$细胞)(Hacein-Bey Abina等JAMA(2015)313(15):1550.

[0331] 通常,将监测已经接受以上所列治疗方案的患者循环胚细胞和血细胞减少症的再现。另外,根据特定患者的AML潜在机制,将通过检测信息分子或细胞遗传学标记的再现或信息流式细胞术模式来监测治疗的成功。例如,将使用与BCR(在22号染色体上)和ABL(在9号染色体上)探针的荧光原位杂交(FISH)来检测费城染色体阳性AML中BCR-ABL信号的重新出现。

[0332] 为了通过CRISPR-Cas9系统评价CD33删除的成功,将从患者中分离外周血$CD34^+$细胞(移植后)并评估CD33表达,例如使用流式细胞术、蛋白质印迹法或免疫组织化学法。

[0333] 如本文所述,该实施例中描述的HSCT可以是自体的或同种异体的,并且两种方法都适合并且可以并入本公开所描述的方法中。

[0334] III.任选步骤:用附着于毒素的CD33抗体继续治疗患者

[0335] A.用CD33免疫毒素吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab Ozogamicin,GO)治疗患者

[0336] 将用$9mg/m^2$的抗CD33抗体吉妥珠单抗奥唑米星(GO)作为2小时静脉输注,分2个剂量间隔2周治疗患者(Larson等,Cancer(2005),104(7):1442-52)。GO由与细胞抑制剂加利车霉素(calicheamicin)缀合的抗CD33的人源化单克隆抗体组成(图8)。

[0337] 可选地,抗CD33抗体可以与不同的毒素缀合,例如可以产生白喉毒素、假单胞菌外毒素A(PE)或蓖麻毒素A链(RTA)(Wayne等,Blood(2014)123(16):2470)。类似地,抗CD45RA抗体可以附着于毒素并包括在治疗方案中。

[0338] 实施例4:表达抗CD33嵌合受体的T细胞和NK细胞系诱导表达CD33的靶细胞的细胞死亡

[0339] 嵌合受体与CD33的结合

[0340] 使用常规重组DNA技术产生结合CD33的嵌合受体(例如,CART1、CART2、CART3)并插入pHIV-Zsgreen载体(Addgene;Cambridge,MA)中。使用含有嵌合受体的载体产生慢病毒颗粒,其用于转导不同细胞类型,例如T细胞系(例如,293T细胞)和NK细胞系(例如,NK92细胞)。通过蛋白质印迹法(图9,图A)和流式细胞术(图9,图B)检测嵌合受体的表达。

[0341] 通过荧光激活细胞分选术(FACS)选择表达嵌合受体的细胞并评估其结合CD33的能力。简言之,将表达嵌合受体的293T细胞的裂解物与CD33或CD33-别藻蓝蛋白(APC)缀合物共同孵育。将样品进行蛋白质电泳并用丽春红蛋白染剂(图10,图A)染色或转移到膜上并用抗CD3ζ一抗探测(图10,图B)。在这两种情况下,嵌合受体与其靶标CD33之间的结合。

[0342] 还使用CD33作为探针通过流式细胞术评估表达嵌合受体的K562细胞与CD33的结合(图10,图C)。与含空载体对照的细胞相比,嵌合受体(CART1、CART2或CART3)表达和CD33结合为阳性的细胞数量增加,表明嵌合受体结合CD33。

[0343] 表达嵌合受体的细胞诱导的细胞毒性。

[0344] 在功能上表征了表达嵌合受体的NK-92细胞诱导细胞表面呈递CD33的靶细胞的细胞毒性的能力(例如,K562是为CD33+的人慢性髓细胞性白血病细胞系)。为了进行细胞毒性测定,将用编码嵌合受体的慢病毒颗粒感染效应细胞(免疫细胞,如NK-92细胞)并扩增。感染7天后,通过FACS分析选择也由嵌合受体编码载体(例如,GFP+或Red+)编码的荧光标记来选择表达嵌合受体的细胞。选择的表达嵌合受体的细胞扩增一周。感染14天后,进行细胞毒性测定,包括用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)对靶细胞(表达靶细胞表面谱系特异性抗原CD33的细胞)进行染色,并对靶细胞和表达嵌合受体的细胞计数。将不同比率的靶细胞和表达嵌合受体的细胞在圆底96孔板中共同孵育4.5小时,之后添加7-氨基放线菌素D(7-AAD)以对非活性细胞进行染色。进行流式细胞术以对活性和非活性靶细胞群计数。如图11,图A和B所示,在评估的每种细胞比率下,表达嵌合受体CART1、CART2或CART3的NK92细胞诱导靶K562细胞的大量细胞死亡。

[0345] 为了确定K562细胞的细胞死亡取决于嵌合受体对CD33的特异性靶向,使用CRISPR/Cas系统将K562基因工程改造为缺乏CD33。简言之,在K562细胞中表达人密码子优化的Cas9核酸内切酶和靶向CD33的IgC结构域的一部分的gRNA,产生缺乏CD33的K562细胞群。扩增细胞并与表达嵌合受体的NK92细胞共同孵育,并如上所述进行细胞毒性测定。如图12的图A所示,汇集的缺乏CD33的K562细胞与表达嵌合受体的NK92细胞共同孵育显示细胞死亡适度减少。然而,当分离缺乏CD33的K562细胞的单一克隆物,扩增并用于进行细胞毒性测定时,观察到细胞毒性更显著的降低(图12,图B)。

[0346] 嵌合受体在原代T细胞中的表达

[0347] 通过FACS积极选择CD4+、CD8+或CD4+/CD8+细胞,从自供体获得的PMBC分离原代T细胞群,得到高纯度群体(图13,图A和B)。用含有嵌合受体(例如,CART1和CART8)的慢病毒载体转导每个原代T细胞群(CD4+、CD8+或CD4+/CD8+细胞)并且如上所述,使用所得的表达嵌合受体的原代T细胞进行细胞毒性测定。表达嵌合受体的CD4+T细胞群与K562(1000个靶K562细胞)共同孵育未导致K562细胞的细胞毒性(图14,图A)。相反,在使用表达嵌合受体的CD8+或CD4+/CD8+细胞和1000个靶K562细胞的细胞毒性测定中,CD8+或CD4+/CD8+细胞能够以低细胞比率诱导K562细胞的细胞死亡(图14,图B)。

[0348] 基因工程改造人造血干细胞

[0349] 设计几种gRNA以与CD33的IgC结构域杂交(参见例如,表4,SEQ ID NO:11或28-31)。每种gRNA与Cas9核酸内切酶一起在K562细胞中表达。通过流式细胞术评估CD33的表达(图15)。正如对于Crispr 3(SEQ ID NO:28)和Crispr5(SEQ ID NO:29)显示的,与表达CD33的对照细胞相比,在表达靶向CD33的CRISPR/Cas系统的细胞中发现CD33显著减少。

[0350] 还评估了缺乏CD33的造血干细胞的各种特征,包括增殖、红细胞分化和集落形成。简言之,通过将细胞暴露于氯高铁血红素而诱导缺乏CD33的造血干细胞分化,并在不同时间点通过流式细胞术评估CD71(红细胞前体的标记)(图16,图A和B)。缺乏CD33的造血干细胞经历红细胞分化,并且流式细胞图似乎与对照细胞(CD33+)相似。细胞还进行了MTT测定以测量缺乏CD33的造血干细胞的代谢活性。如图16的图C所示,缺乏CD33的造血干细胞与对照细胞表现相当。最后,使用显微集落形成测定法观察细胞增殖并形成细胞集落的能力。同样,缺乏CD33的造血干细胞也能够形成与对照细胞类似程度的集落(图18)。这些结果表明CRISPR/Cas删除CD33的一部分不会显著影响细胞增殖、分化或形成集落的能力。

[0351] 其它实施方案

[0352] 本说明书中公开的所有特征可以组合成任何组合。本说明书中公开的每个特征可以由作用相同、等同或用于类似目的的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅仅是一系列等同或类似特征的实例。

[0353] 从以上描述中,本领域技术人员可以容易地确定本公开的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可以做本公开的各种变化和修改以使其适应各种用法和条件。因此,其它实施方案也在权利要求范围内。

[0354] 等同形式

[0355] 虽然本文已经描述和说明了若干发明性实施方案,但本领域的普通技术人员将容易想到用于执行功能和/或获得结果和/或本文描述的一个或多个优点的各种其它手段和/或结构,并且每个这样的变型和/或修改都被认为是在本文描述的发明实施方案的范围内。更一般地,本领域的技术人员将容易认识到,本文描述的所有参数、尺寸、材料和构型都意为示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或构型将取决于特定应用或为其使用本发明教导的应用。本领域的技术人员将认识到,或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的具体发明实施方案的许多等同形式。因此,应该理解的是前述实施方案仅以举例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等同形式的范围内,可以以除了具体描述和要求保护的方式以外的方式来实践发明实施方案。本公开的发明实施方案涉及本文描述的每个单独的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。另外,如果此类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法并无相互不一致,则两个或更多个此类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合都包括在本公开的发明范围内。

[0356] 如本文所定义和使用的所有定义都应理解为控制字典定义,通过引用并入的文献中的定义和/或所定义术语的普通含义。

[0357] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请通过关于所引用的每一个的主题的引用并入,在一些情况下可以涵盖整个文档。

[0358] 除非明确指出相反,否则本文在说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一”和“一个(种)”应理解为意指“至少一个”。

[0359] 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指这样连接的要

素中的“任一个或两个”,即要素在一些情况下联合存在而在其它情况下分离存在。随“和/或”列出的多个要素应该以相同方式解释,即要素中的“一个或多个”这样连接。除了用“和/或”分句明确标识的要素之外,不管与明确标识的那些要素相关还是无关,其它要素可以任选存在。因此,作为非限制性实例,连同开放式语言如“包含”使用时,提到“A和/或B”在一个实施方案中可以仅指A(任选包括除B以外的要素);在另一个实施方案中,仅指B(任选包括除A以外的要素);再一个实施方案中,指A和B(任选包括其它要素);等等。

[0360] 如本文在说明书和权利要求中所用,“或”应当理解为具有与以上定义的“和/或”相同的含义。例如,当间隔列表中的项时,“或”或“和/或”应解释为包括性的,即包括至少一个,但也包括许多或一系列要素,以及任选地,其它未列出项中的一个以上。只有明确指出相反的术语,例如“仅一个”或“恰好一个”,或者在权利要求中使用时,“由...组成”将指包括许多或一系列要素中的恰好一个要素。一般而言,如本文中所用的术语“或”在前面有排他性术语例如“任一”、“一个”、“仅一个”或“恰好一个”时应当仅解释为指示排他性替代物(即“一个或另一个,但不是两个”)。当用于权利要求中时,“基本上由...组成”应具有其在专利法领域中使用的普通含义。

[0361] 如本文在说明书和权利要求书中所用,关于一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应该理解为意指选自该要素列表中的任何一个或多个要素的至少一个要素,但不一定包括要素列表内具体列出的每个要素中的至少一个并且不排除要素列表中的要素的任何组合。该定义还允许除了短语“至少一个”所指的要素列表内具体标识的要素以外,可任选存在不管与具体标识的那些要素相关还是无关的要素。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或等同地,“A或B中的至少一个”,或等同地“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可以指至少一个(任选包括多于一个)A,不存在B(并且任选包括除了B以外的要素);在另一个实施方案中指至少一个(任选包括多于一个)B,不存在A(并且任选包括除了A以外的要素);再一个实施方案中指至少一个(任选包括多于一个)A和至少一个(任选包括多于一个)B(并且任选包括其它要素);等等。

[0362] 还应该理解的是,除非明确指出相反,否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或操作的任何方法中,该方法的步骤或操作的顺序不一定限于叙述该方法的步骤或操作的顺序。

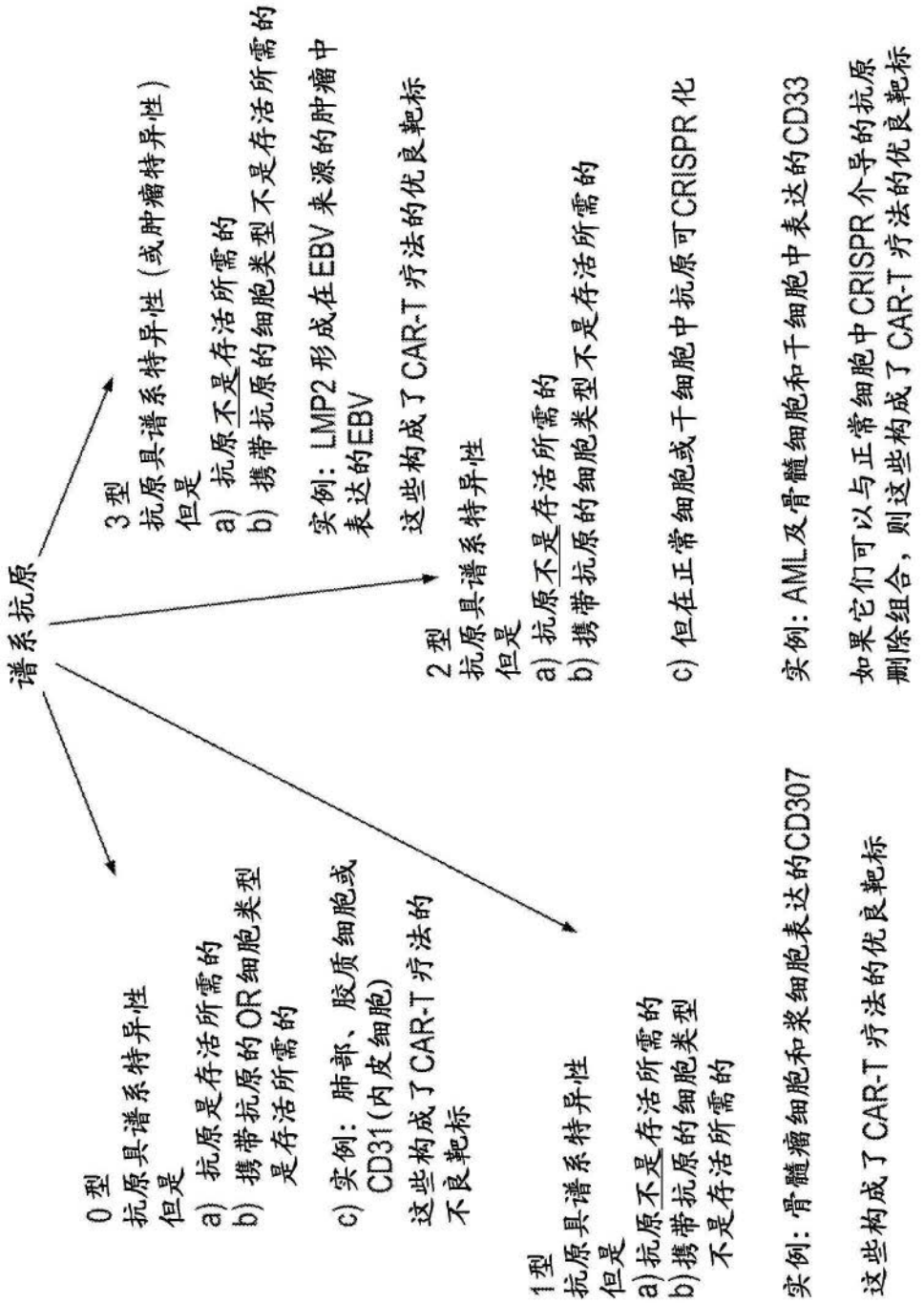

谱系抗原
0型
抗原具谱系特异性
但是
a) 抗原是存活所需的
b) 携带抗原的OR细胞类型
是存活所需的
c) 实例：肺部、胶质细胞或
CD31(内皮细胞)
这些构成了CAR-T疗法的
不良靶标
1型
抗原具谱系特异性
但是
a)抗原不是存活所需的
b)携带抗原的细胞类型
不是存活所需的
实例：骨髓瘤细胞和浆细胞表达的CD307
这些构成了CAR-T疗法的优良靶标
2型
抗原具谱系特异性
但是
a) 抗原不是存活所需的
b) 携带抗原的细胞类型不是存活所需的
c) 但在正常细胞或干细胞中抗原可CRISPR化
实例：AML及骨髓细胞和干细胞中表达的CD33
如果它们可以与正常细胞中CRISPR介导的抗原
删除组合，则这些构成了CAR-T疗法的优良靶标
3型
抗原具谱系特异性（或肿瘤特异性）
但是
a) 抗原不是存活所需的
b) 携带抗原的细胞类型不是存活所需的
实例：LMP2形成在EBV来源的肿瘤中
表达的EBV
这些构成了CAR-T疗法的优良靶标

图1

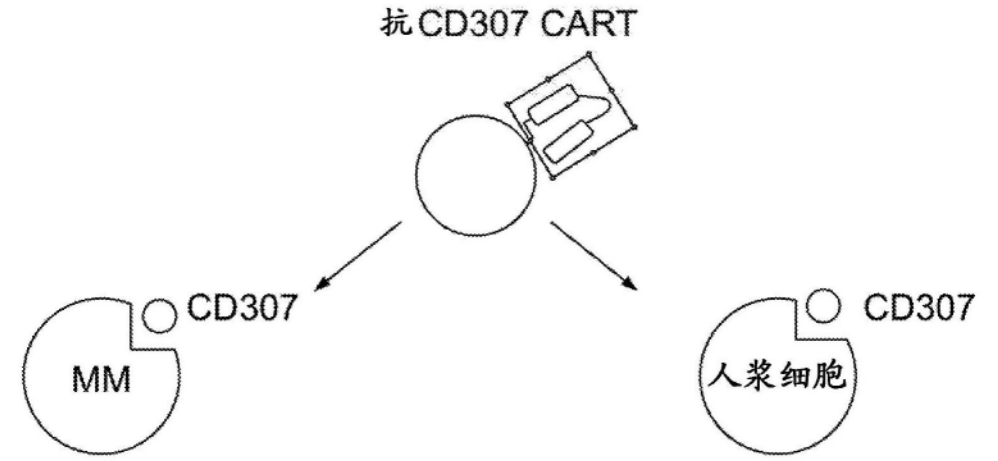

抗CD307 CART
CD307
MM
CD307
人浆细胞

图2

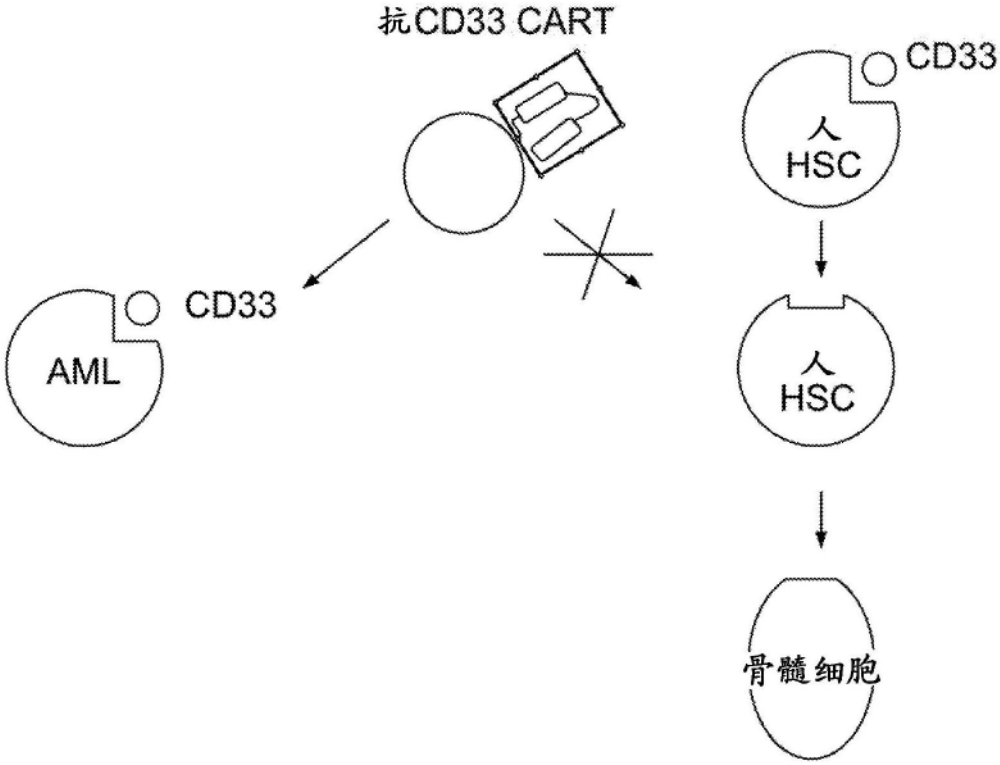

抗CD33 CART
CD33
AML
CD33
人
HSC
人
HSC
骨髓细胞

图3

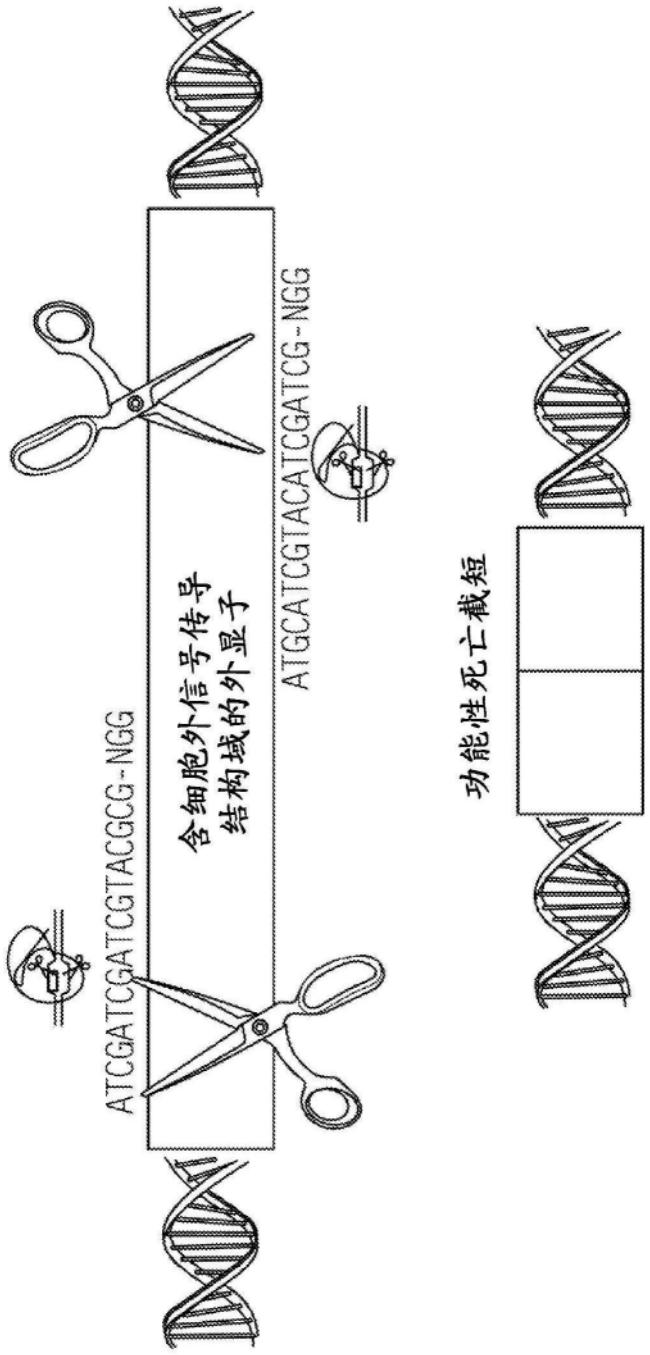

ATCGATCGATCGTACGCG-NGG
含细胞外信号传导
结构域的外显子
ATGCATCGTACATCGATCG-NGG
功能性死亡截短

图4

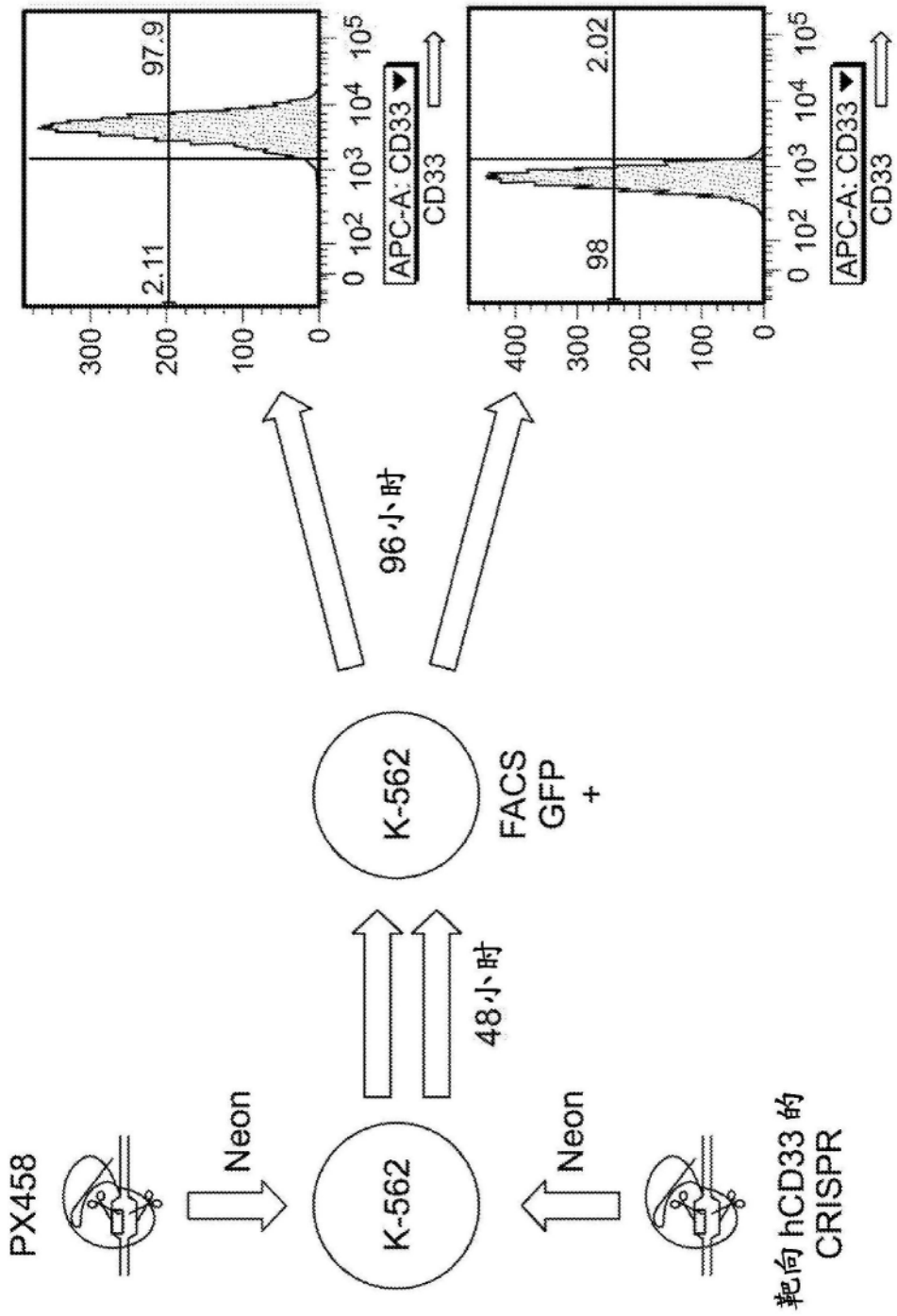

PX458
Neon
K-562
48小时
Neon
靶向hCD33的CRISPR
K-562
FACS
GFP
+
96小时
97.9
2.11
APC-A: CD33
CD33
2.02
98
APC-A: CD33
CD33

图5

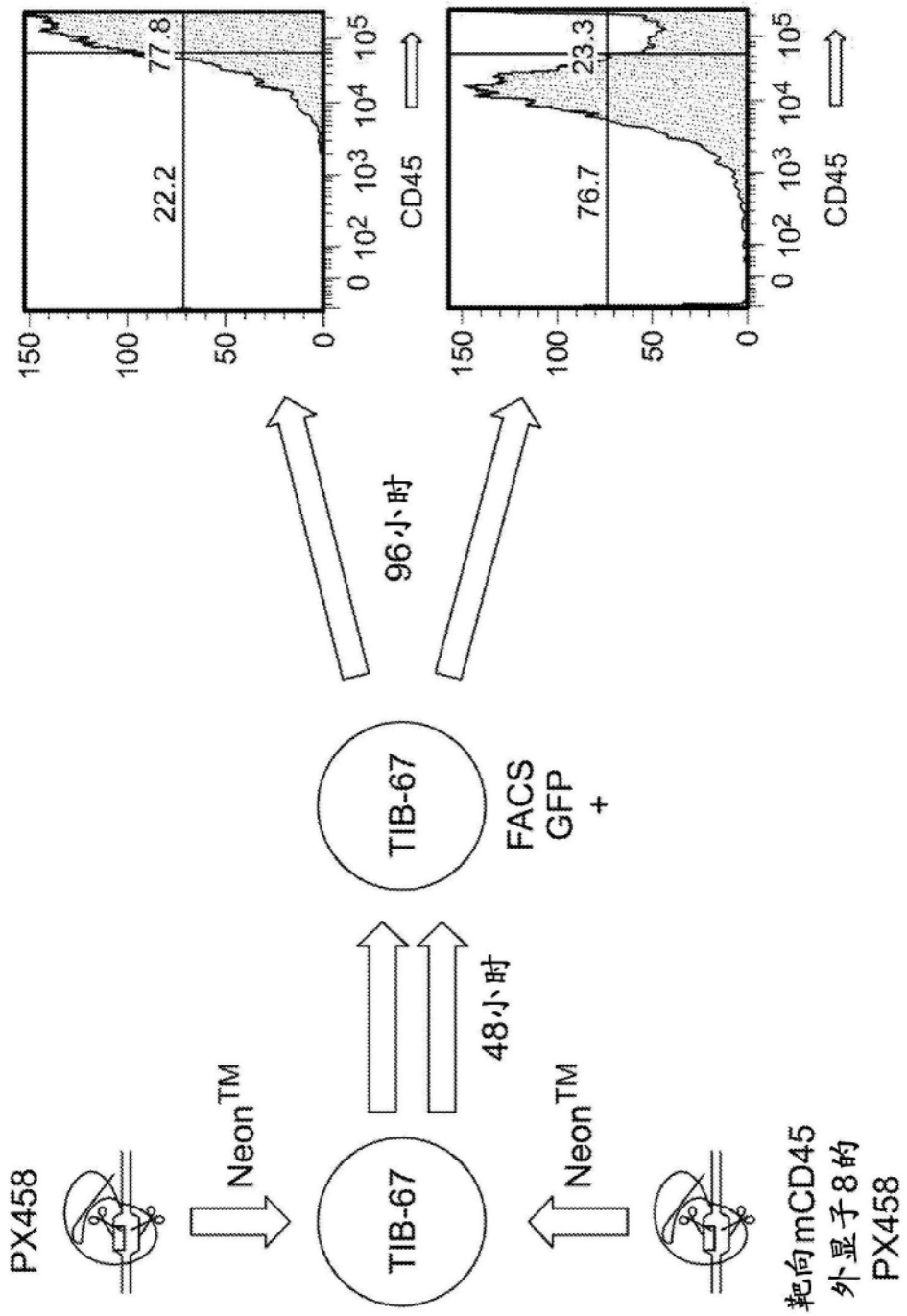

PX458
Neon™
TIB-67
48小时
Neon™
靶向mCD45外显子8的PX458
TIB-67
FACS
GFP
+
96小时
77.8
22.2
CD45
23.3
76.7
CD45

图6

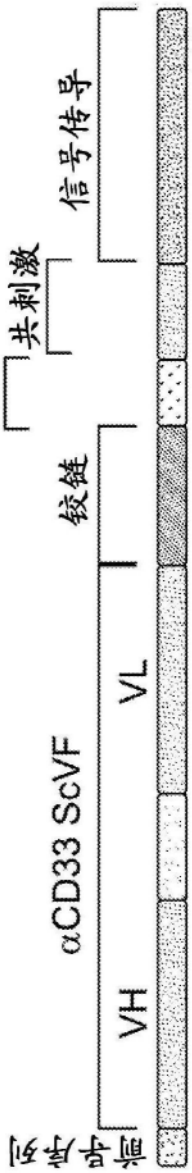


图7A

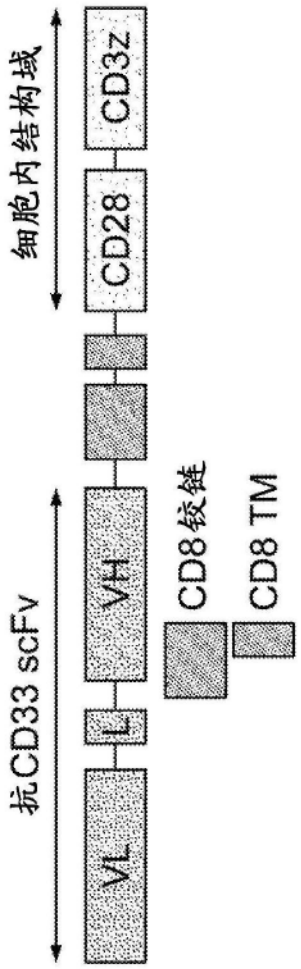


图7B

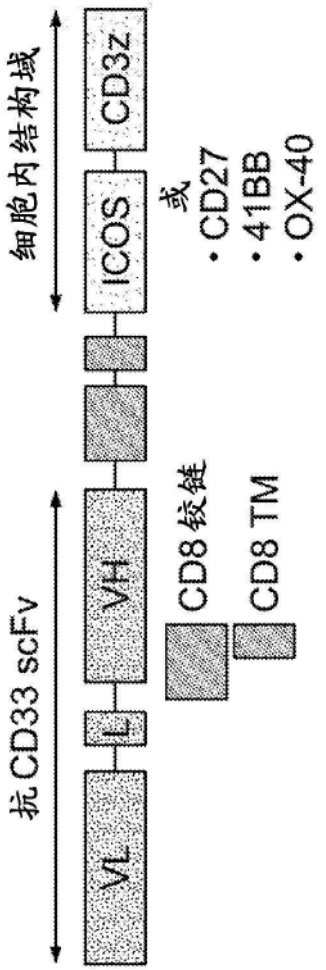

细胞内结构域
CD3z
ICOS
或
·CD27
·41BB
·OX-40
CD8 铰链
CD8 TM
抗 CD33 scFv
VH
L
VL

图7C

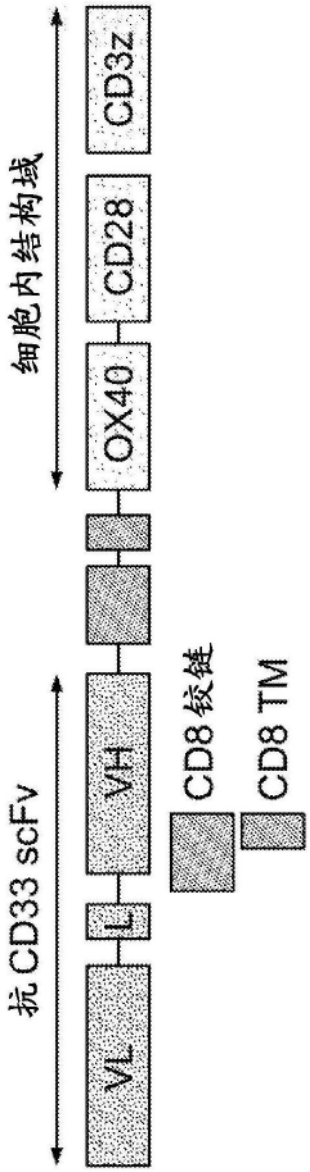


图7D

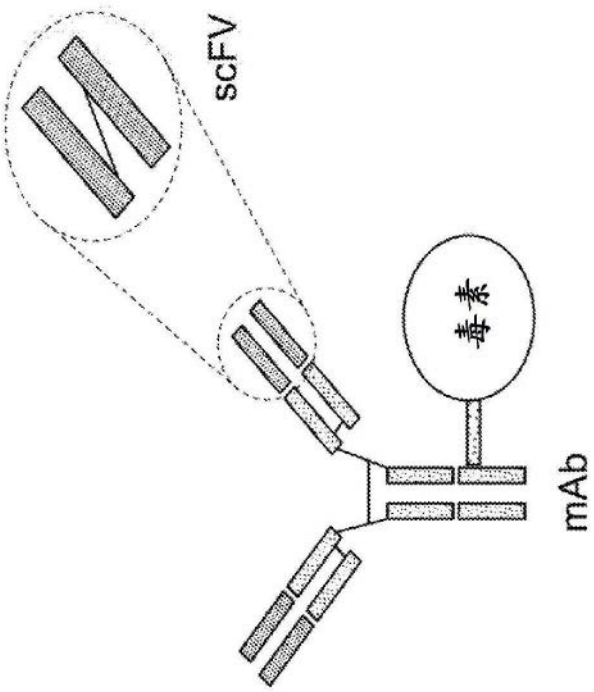
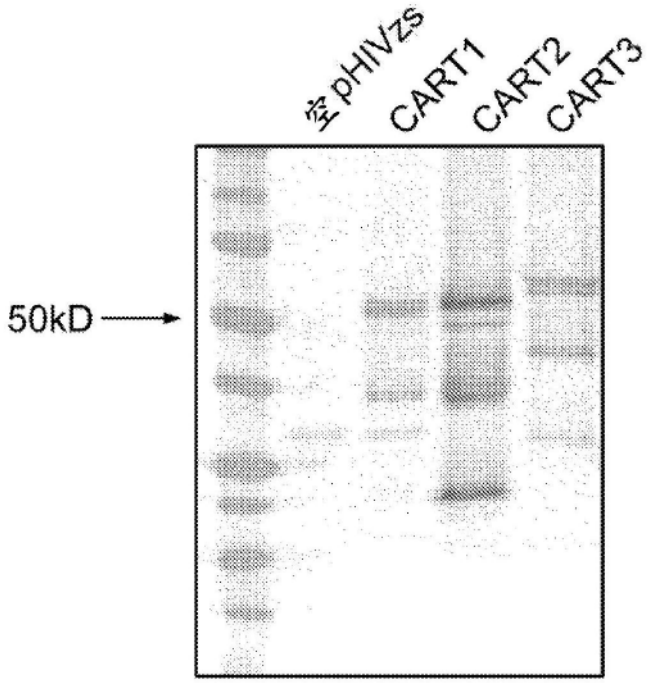


图8



用抗CD3TCRz(ab)染色
表位：C端CD3z

构建体	MW kDa
CART1	55.3AAAA
CART2	56.3
CART3	61

图9A

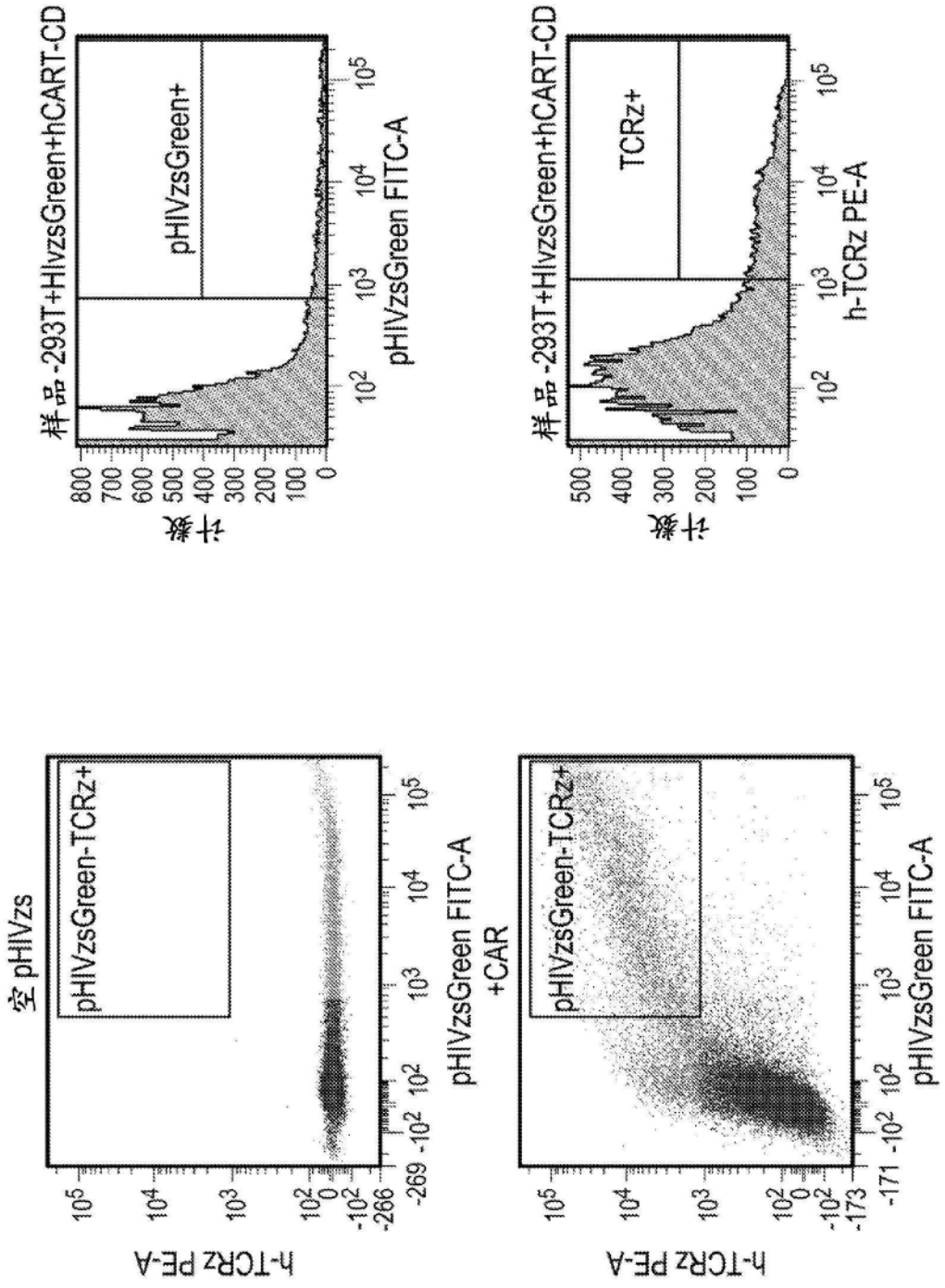

样品-293T+HIvzsGreen+hCART-CD
pHIVzsGreen+
计数
pHIVzsGreen FITC-A
样品-293T+HIvzsGreen+hCART-CD
TCRz+
计数
h-TCRz PE-A
空 pHIVzs
pHIVzsGreen-TCRz+
h-TCRz PE-A
pHIVzsGreen FITC-A
+CAR
pHIVzsGreen-TCRz+
h-TCRz PE-A
pHIVzsGreen FITC-A

图9B

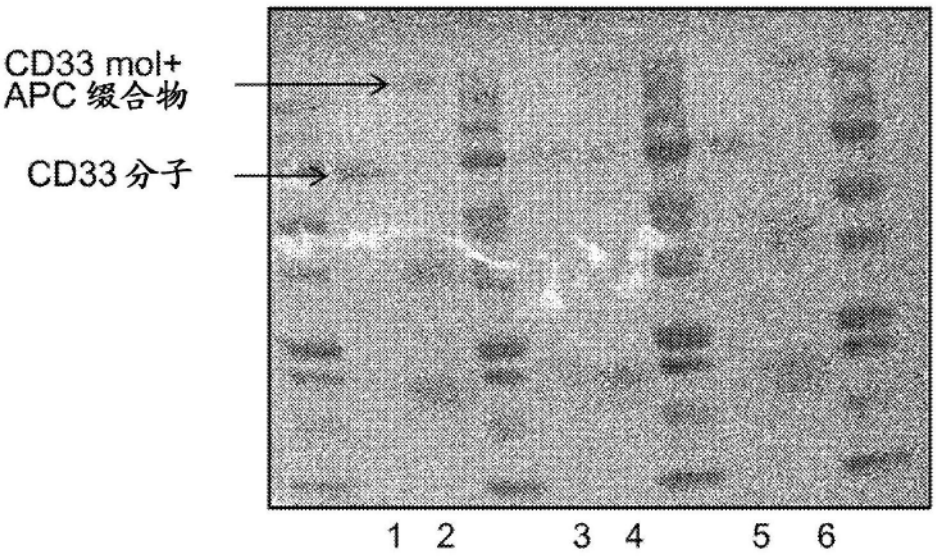

CD33 mol+
APC 缀合物
CD33 分子
1 2 3 4 5 6

图10A

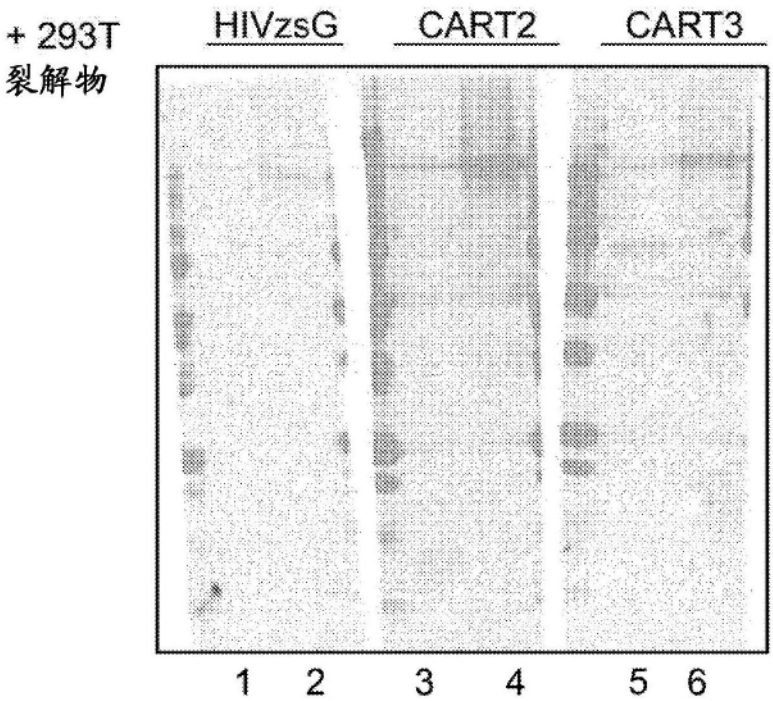

+ 293T
裂解物
HIVzsG
CART2
CART3
1 2 3 4 5 6

图10B

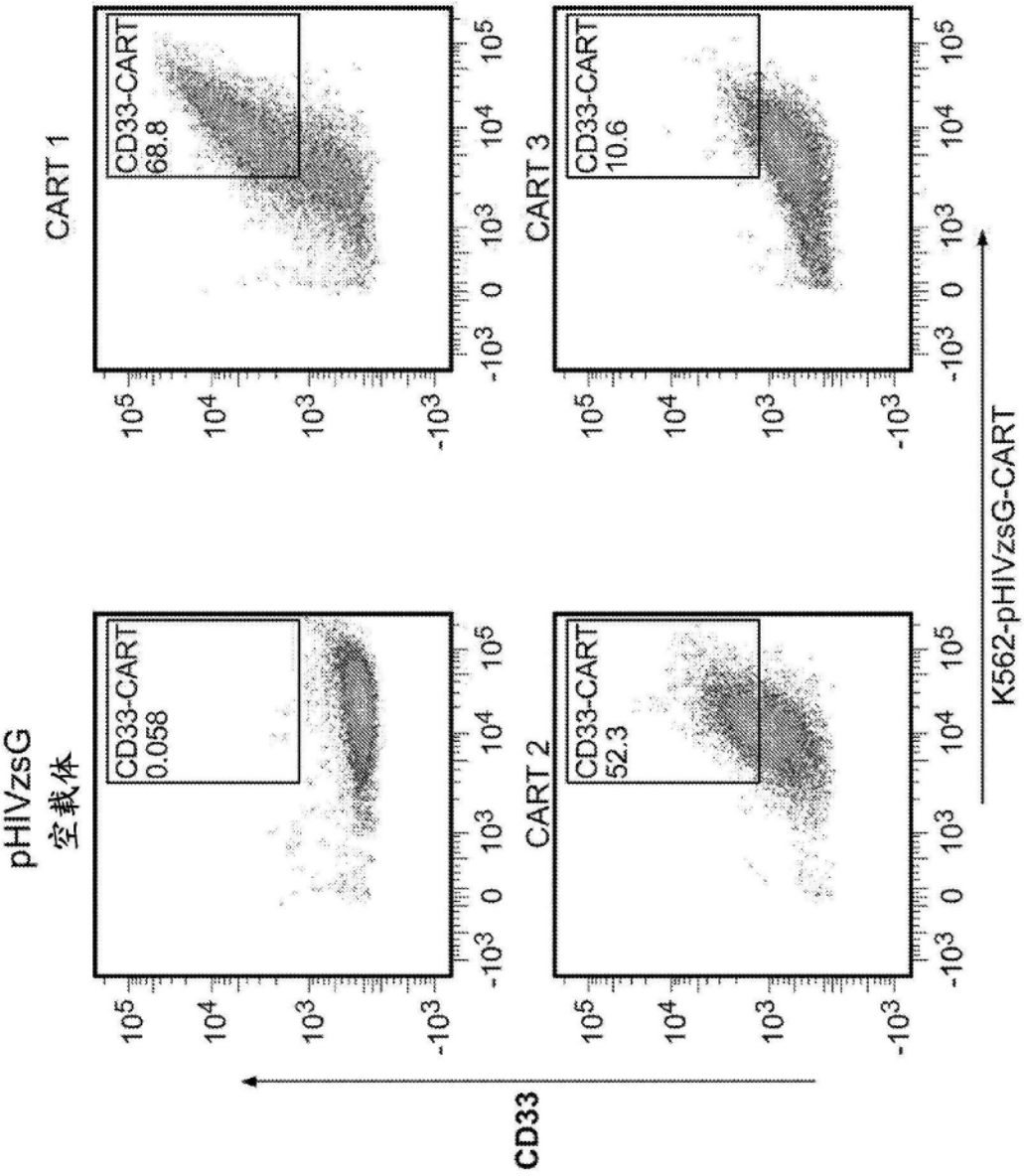

pHIVzsG
空载体
CART 1
CART 2
CART 3
CD33-CART
68.8
CD33-CART
0.058
CD33-CART
52.3
CD33-CART
10.6
CD33
K562-pHIVzsG-CART

图10C

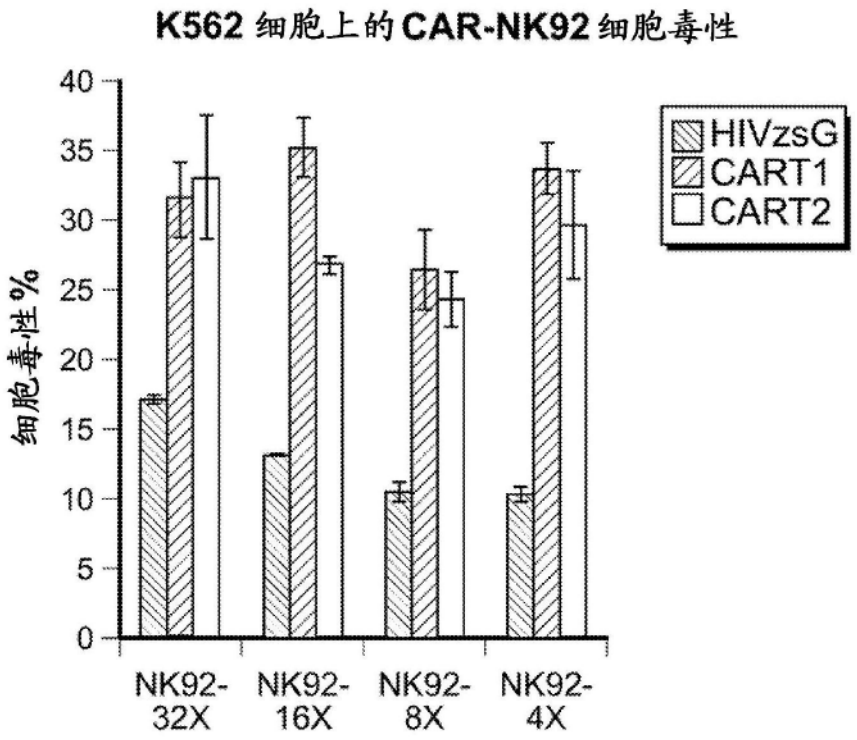

K562 细胞上的CAR-NK92 细胞毒性
细胞毒性%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
HIVzsG
CART1
CART2
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图11A

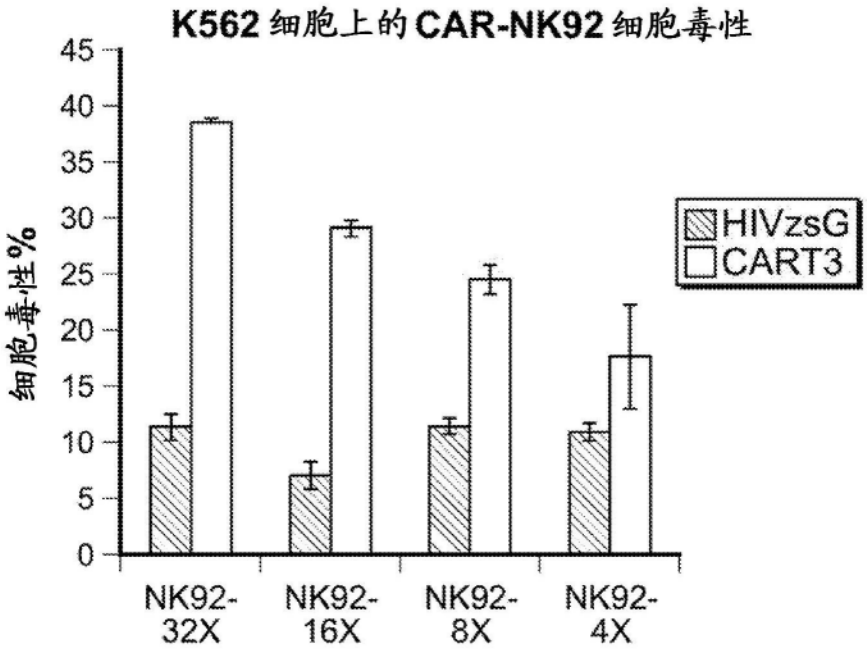

K562 细胞上的CAR-NK92 细胞毒性
细胞毒性%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
HIVzsG
CART3
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图11B

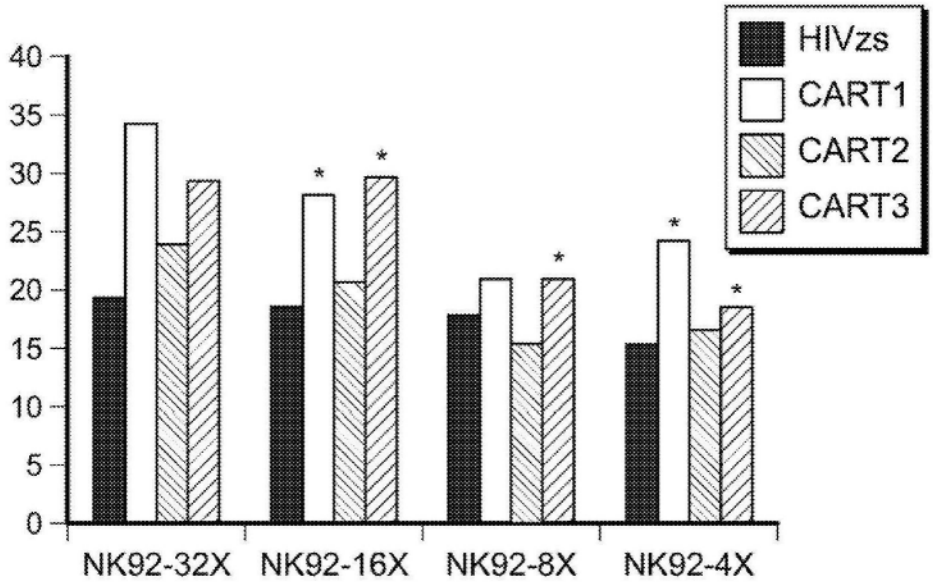

HIVzs
CART1
CART2
CART3
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图12A

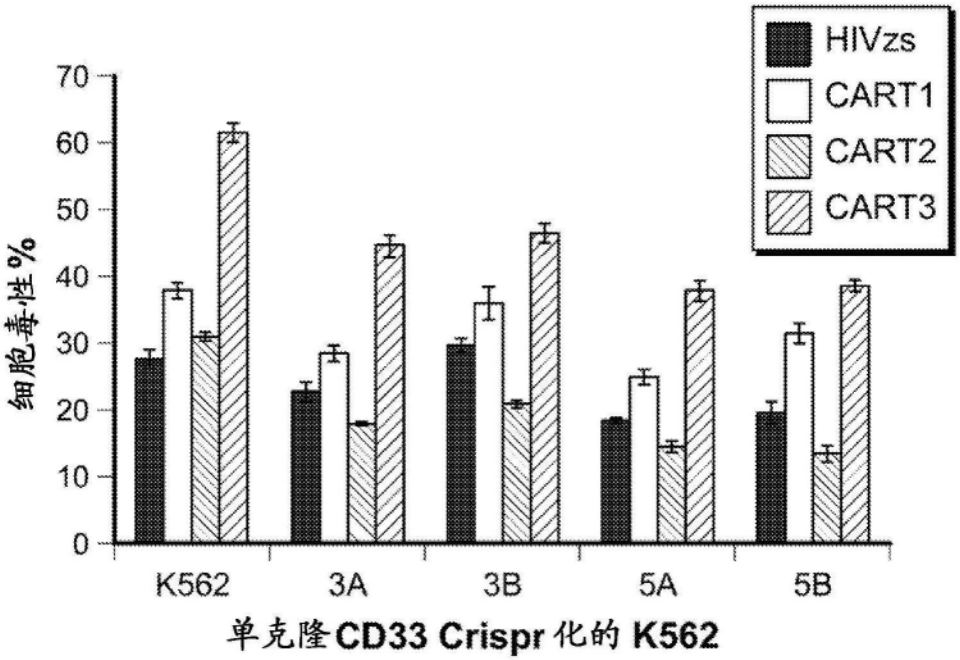

HIVzs
CART1
CART2
CART3
细胞毒性%
70
60
50
40
30
20
10
0
K562
3A
3B
5A
5B
单克隆CD33 Crispr化的K562

图12B

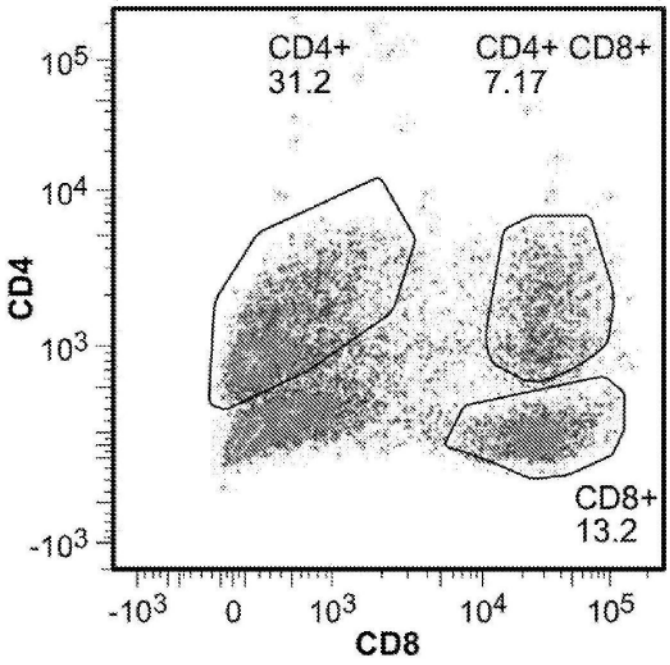

CD4+
31.2
CD4+ CD8+
7.17
CD8+
13.2
CD4
CD8
10^5
10^4
10^3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
-10^3

图 13A

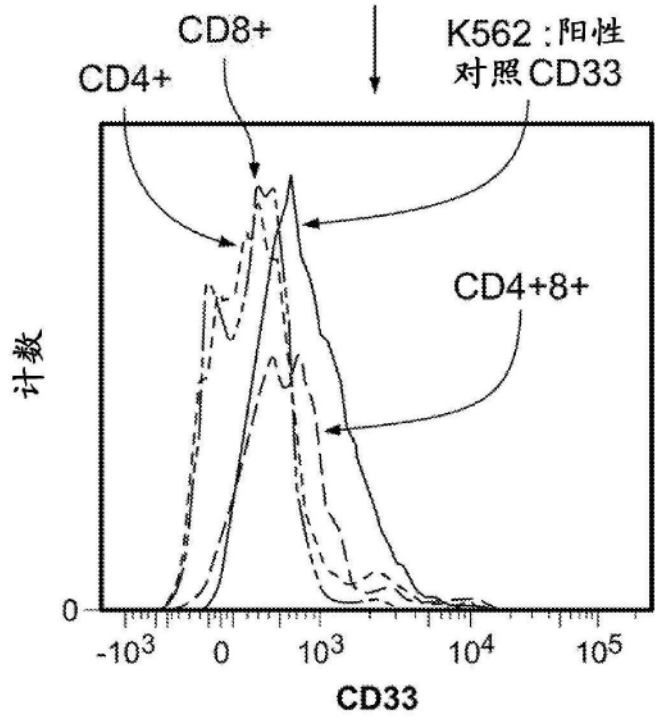

CD8+
CD4+
K562：阳性
对照CD33
CD4+8+
计数
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
CD33

图 13B

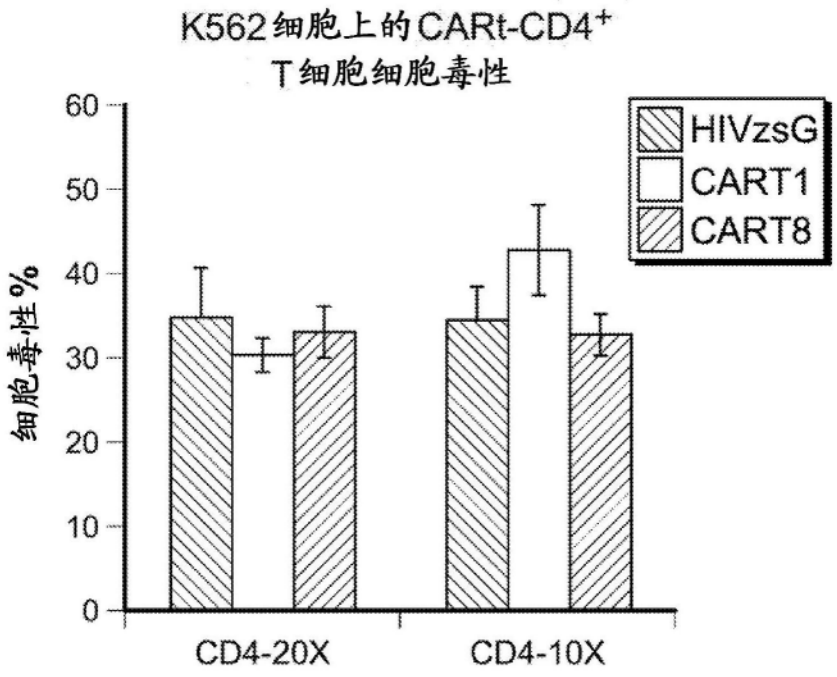

K562细胞上的CARt-CD4+
T细胞细胞毒性
细胞毒性%
60
50
40
30
20
10
0
HIVzsG
CART1
CART8
CD4-20X
CD4-10X

图14A

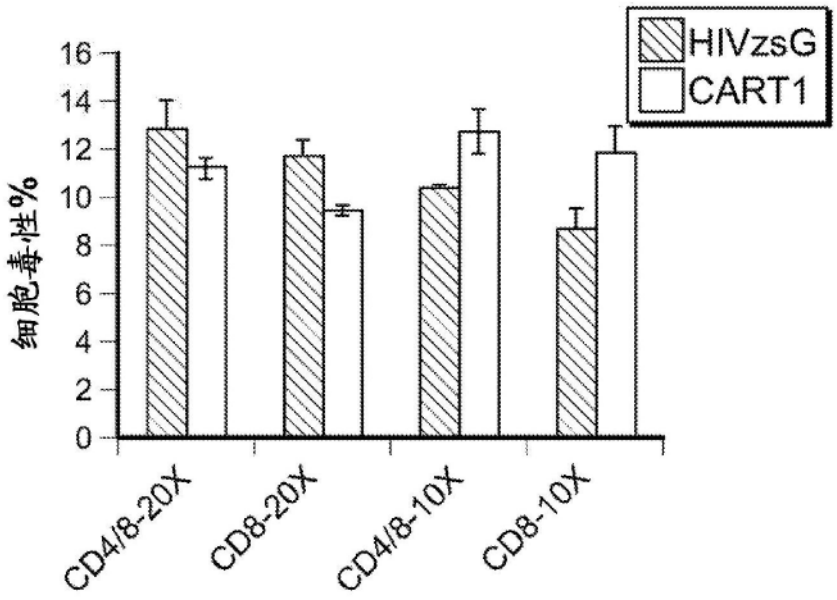

细胞毒性%
16
14
12
10
8
6
4
2
0
HIVzsG
CART1
CD4/8-20X
CD8-20X
CD4/8-10X
CD8-10X

图14B

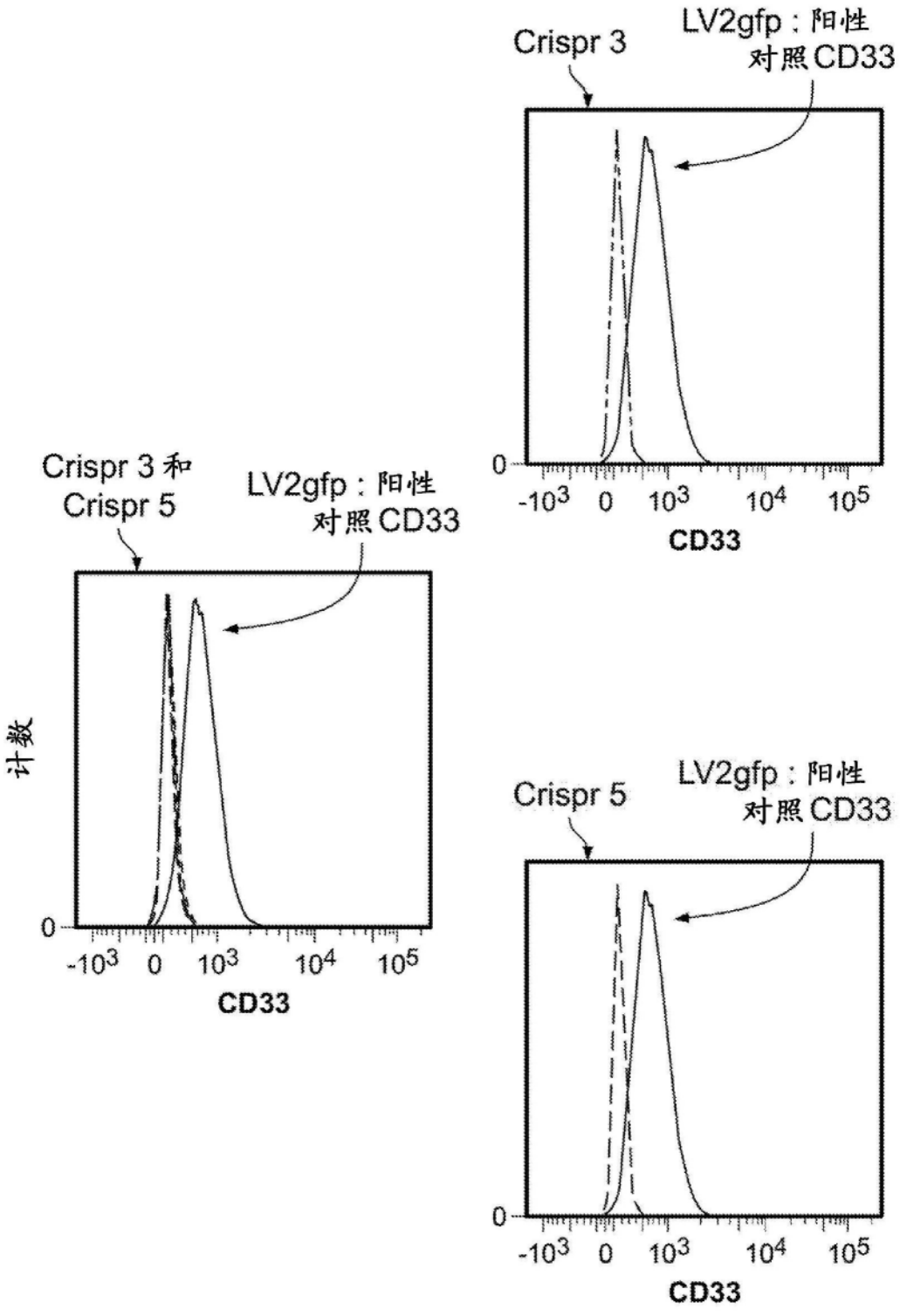

Crispr 3
LV2gfp：阳性
对照CD33
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33
Crispr 3和
Crispr 5
LV2gfp：阳性
对照CD33
计数
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33
Crispr 5
LV2gfp：阳性
对照CD33
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33

图15

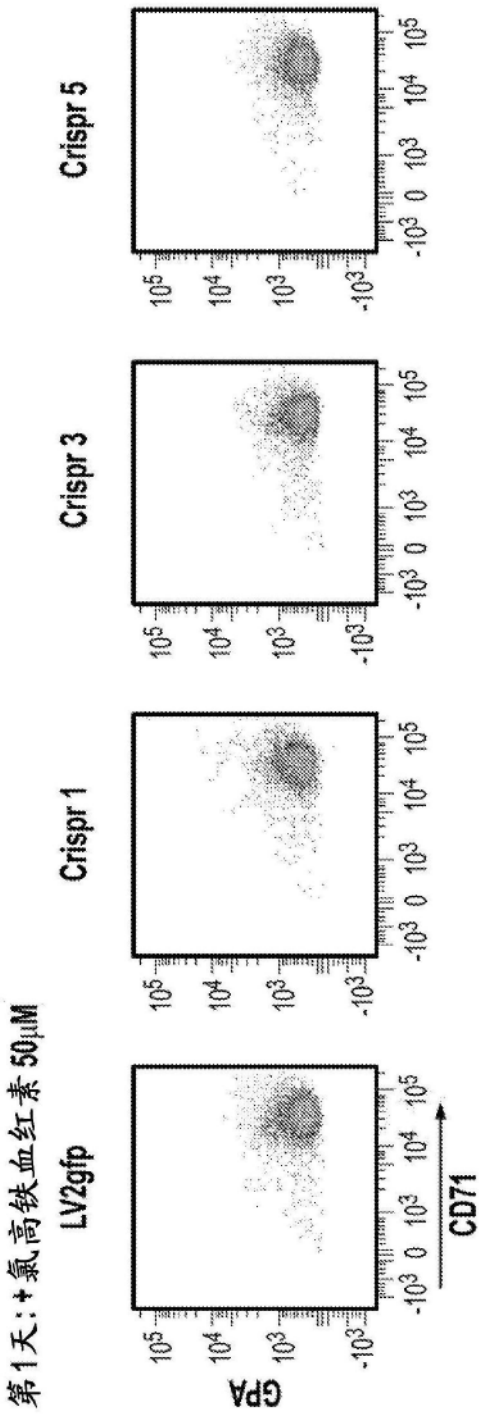


图16A

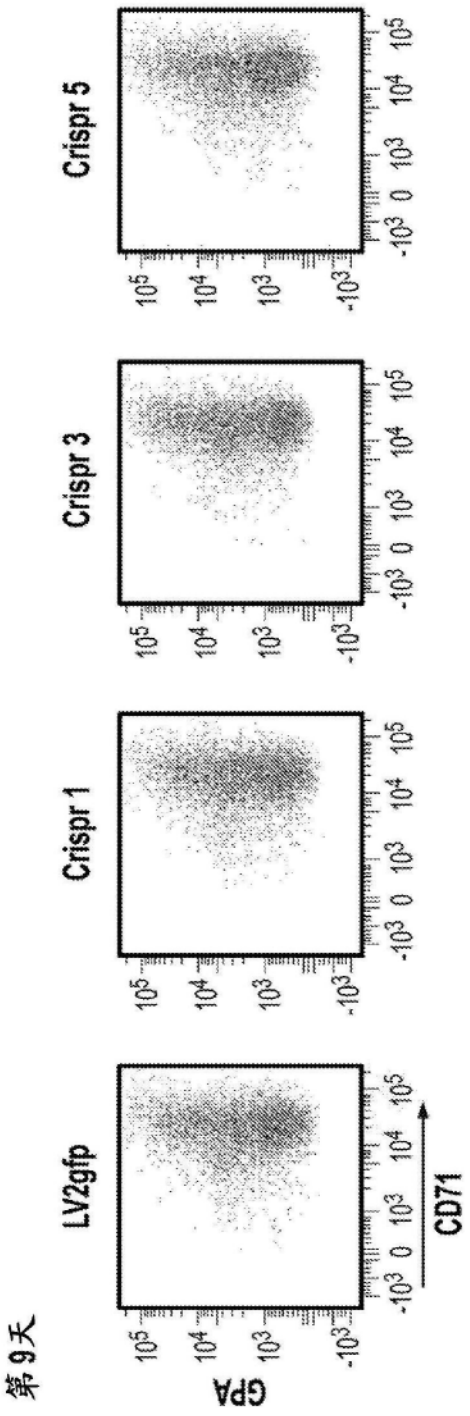


图16B

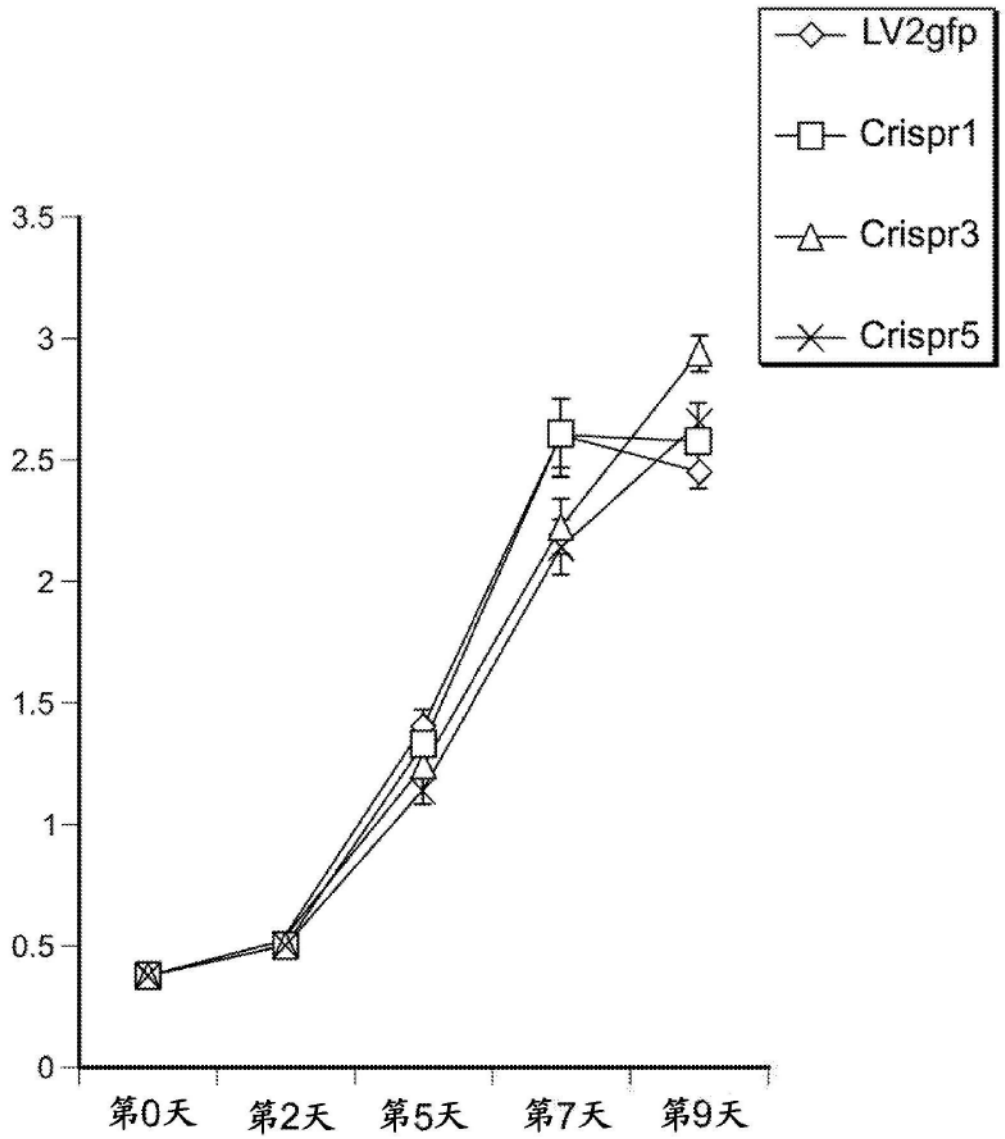

LV2gfp
Crispr1
Crispr3
Crispr5
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
第0天
第2天
第5天
第7天
第9天

图16C

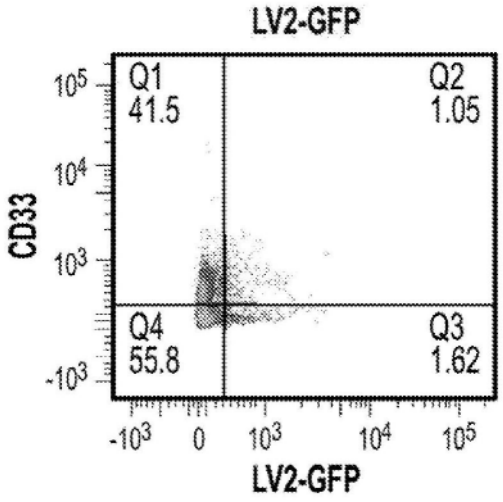


图17A

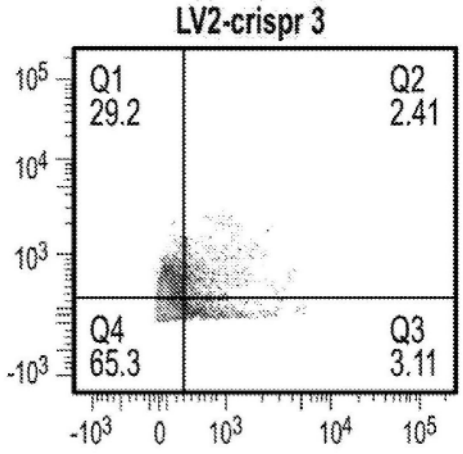


图17B

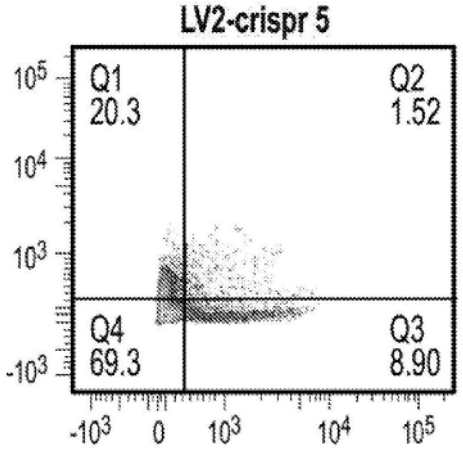


图17C

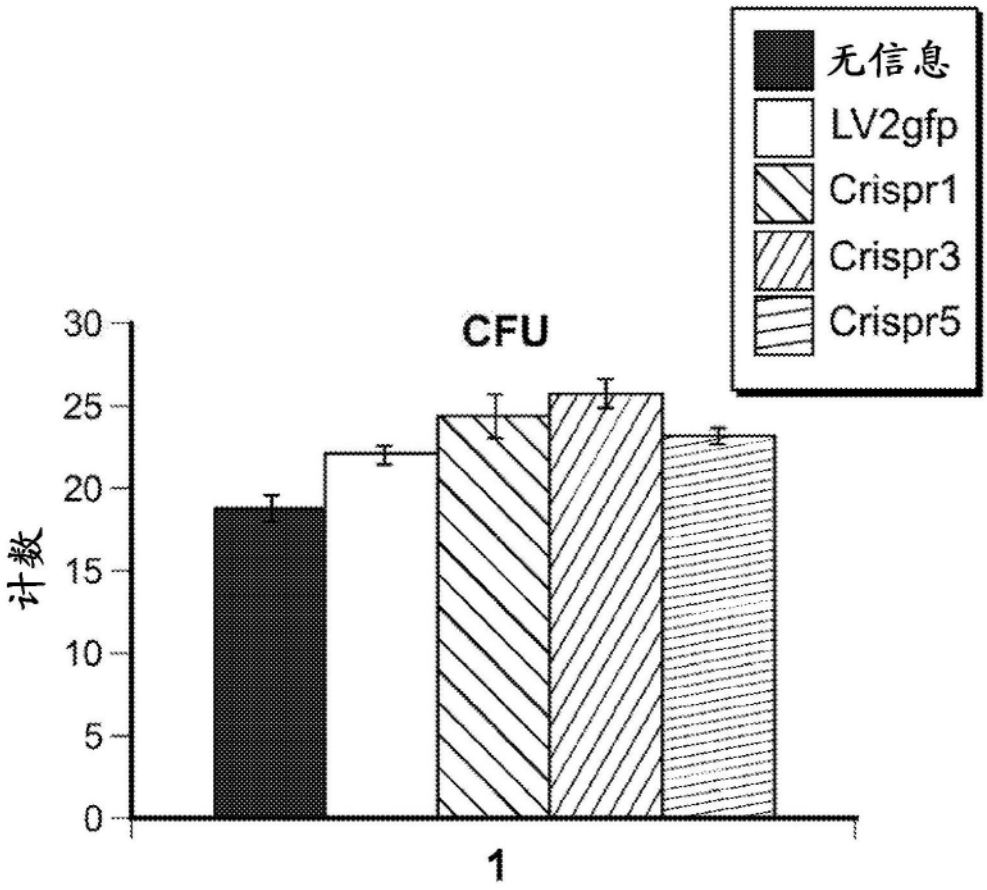


图18